

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu bersifat eksperimen dengan desain penelitian komparatif. Tujuan dilakukan penelitian ini yaitu untuk mengetahui perbedaan kualitas sediaan jaringan kanker payudara (*Carcinoma mammae*) yang diwarnai dengan hematoxylin eosin dan ekstrak buah strawberry sebagai alternatif pengganti eosin. Adanya perbedaan kualitas sediaan pada pemeriksaan jaringan histopatologi kanker payudara dengan menggunakan ekstrak buah strawberry konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30% dan eosin, maka akan dilakukan uji analisa data statistik dengan menggunakan uji *Kruskall Wallis test* dengan nilai signifikansi  $p < 0,05$ .

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **1. Lokasi Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Klinik Morotai kota Bandar Lampung.

##### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret tahun 2025.

#### **C. Populasi Sampel**

Populasi sampel pada penelitian ini yaitu jaringan kanker payudara (*Carcinoma mammae*) yang terdapat di Laboratorium Patologi Klinik Morotai Bandar Lampung. Banyak sampel ditentukan dengan rumus Federer, rumusnya adalah:

$$(t-1)(n-1) \leq 15$$

keterangan :

t : jumlah perlakuan

n : jumlah pengulangan pada setiap perlakuan

Adapun total sampel yang dilakukan pada penelitian dihitung dengan menggunakan rumus Federer yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Maka pengulangan sampel dilakukan sebanyak 5 sampel dalam 5 perlakuan jadi pada penelitian ini digunakan total sampel sebanyak 25 sampel dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

1) Kriteria inklusi

- a. Blok paraffin jaringan kanker payudara dilakukan pemotongan *sectioning* dengan ketebalan yang sama (4  $\mu$ m).
- b. Menggunakan jaringan kanker payudara dengan tipe yang sejenis

2) Kriteria eksklusi

- a. Sediaan retak
- b. Sediaan hilang

#### D. Variabel dan Definisi Operasional

| Variabel Penelitian            | Definisi                                                                                                             | Cara Ukur                                                            | Alat Ukur                 | Hasil Ukur                                                                                                       | Skala Ukur |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Variabel bebas</b><br>Eosin | Zat warna yang digunakan untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel                                               | Observasi                                                            | MSDS                      | Eosin                                                                                                            | Nominal    |
| Ekstrak strawberry             | Ekstrak pekat yang dihasilkan dari proses ekstraksi strawberry dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% | Pengenceran:<br>$V_1 \cdot \%_1 = V_2 \cdot \%_2$<br>Metode Maserasi | Gelas ukur dan pipet ukur | 1. Ekstrak strawberry 15%<br>2. Ekstrak strawberry 20%<br>3. Ekstrak strawberry 25%<br>4. Ekstrak strawberry 30% | Nominal    |

| Variabel Penelitian                                               | Definisi                                                                                                                                                             | Cara Ukur                                                  | Alat Ukur                      | Hasil Ukur                     | Skala Ukur |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------|
| <b>Variabel terikat</b>                                           |                                                                                                                                                                      |                                                            |                                |                                |            |
| Kualitas pewarnaan hematoxylin eosin pada sediaan kanker payudara | Sediaan jaringan kanker payudara yang diwarnai menggunakan Eosin dan ekstrak buah strawberry berdasarkan inti sel, sitoplasma, keseragaman dan intensitas pewarnaan. | Metode skoring (Sravya et al., 2018) di modifikasi BPMPPPI | Mikroskop dan lembar observasi | Tidak baik (4-6)<br>Baik (7-8) | Ordinal    |
| Inti sel                                                          | Pada inti sel berwarna biru, berbentuk oval atau bulat serta berada di tengah sel                                                                                    | Metode skoring (Sravya et al., 2018) di modifikasi BPMPPPI | Mikroskop dan lembar observasi | Tidak baik (1)<br>Baik (2)     | Ordinal    |
| Sitoplasma                                                        | Sitoplasma yang terwarnai oleh eosin akan berwarna merah dan berada diantara sel inti dan membran sel                                                                | Metode skoring (Sravya et al., 2018) di modifikasi BPMPPPI | Mikroskop dan lembar observasi | Tidak baik (1)<br>Baik (2)     | Ordinal    |
| Keseragaman warna                                                 | Warna seragam dan jelas, rata serta dapat diidentifikasi                                                                                                             | Metode skoring (Sravya et al., 2018) di modifikasi BPMPPPI | Mikroskop dan lembar observasi | Tidak baik (1)<br>Baik (2)     | Ordinal    |
| Intensitas pewarnaan                                              | Intensitas pewarnaan yang jernih serta dapat diidentifikasi                                                                                                          | Metode skoring (Sravya et al., 2018) di modifikasi BPMPPPI | Mikroskop dan lembar observasi | Tidak baik (1)<br>Baik (2)     | Ordinal    |

## E. Teknik Pengumpulan Data

### 1. Alat

Gelas ukur, botol reagen berwarna gelap, ph meter, wadah kaca, saringan, *rotarory vacuum evaporator*, oven, blender, toples kaca, *tissue embedding*, mikrotom, *basemold*, pisau mikrotom, objek glass, pensil, *waterbath*, rak pewarnaan, *deck glass*, *scalpel*, *sput*, corong kaca, neraca analitik, mikroskop.

## 2. Bahan

Etanol, buah strawberry, aquadest, sampel jaringan kanker payudara, reagen hematoxylin, reagen eosin, Alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, parafin, alkohol absolut, xylol, paraffin.

## 3. Cara Pembuatan Ekstrak Buah Strawberry

- Buah strawberry yang akan digunakan dicuci dengan bersih
- Strawberry yang telah bersih dikeringkan dengan cara ditutup dengan kain hitam dan dijemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung.
- Strawberry dihaluskan dengan cara di blender.
- Timbang sebanyak 500 gram strawberry yang telah dihaluskan lalu dimasukkan kedalam botol kaca, lalu tambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 5.000 ml dan diamkan selama 3 X 24 jam sesekali diaduk.
- Pisahkan antara endapan dengan filtrat strawberry setelah 3X 24 jam dengan cara disaring menggunakan kertas saring.
- Hasil filtrat yang didapat dilanjutkan menggunakan alat *rotary evaporator* untuk proses penguapan pelarut sehingga diperoleh ekstrak kental.
- Lakukan pengenceran konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30% pada ekstrak buah strawberry dengan menggunakan rumus pengenceran.
- Ukur pH ekstrak strawberry yang telah diencerkan dengan menggunakan indikator pH, apabila pH masih bersifat basa maka tambahkan HCL 0,1 N hingga pH menjadi asam yaitu 4 - 5,5.

## 4. Prosedur Kerja Pembuatan Sediaan

- Pematangan jaringan

Tabel 3.1 proses pematangan jaringan

| Tahap      | Reagensia           | Waktu    |
|------------|---------------------|----------|
| Fiksasi    | Formalin buffer 10% | 2 Jam    |
| Dehidrasi  | Alkohol 70%         | 15 Menit |
|            | Alkohol 80%         | 15 Menit |
|            | Alkohol 96%         | 15 Menit |
|            | Etanol              | 30 Menit |
| Clearing   | Xylol I             | 15 Menit |
|            | Xylol II            | 15 Menit |
|            | Xylol III           | 15 Menit |
|            | Parafin I           | 15 Menit |
| Infiltrasi | Paraffin II         | 15 Menit |

Sumber: Prosedur tetap prosesing jaringan laboratorium patologi klinik Morotai Bandar Lampung

## b. Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE)

Tabel 3.2 Tahap pewarnaan Hematoxylin-Eosin

| Tahap                | Reagensia          | Waktu      |
|----------------------|--------------------|------------|
| Deparafinisasi       | Xylol I            | 5 Menit    |
|                      | Xylol II           | 5 Menit    |
| Dehidrasi            | Alkohol absolut    | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%        | 2 Menit    |
|                      | Alkohol 70%        | 2 Menit    |
|                      | Aquadest           | 2 Menit    |
| Pewarnaan inti       | Hematoxylin        | 7-10 Menit |
| Pencucian            | Air mengalir       | 1 Menit    |
| Pewarnaan sitoplasma | Eosin              | 1-2 Menit  |
| Dehidrasi            | Alkohol 70%        | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%        | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut I  | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut II | 2 Menit    |
| Clearing             | Xylol I            | 5 Menit    |
|                      | Xylol II           | 5 Menit    |
| Mounting             | Entelan            |            |

Sumber: Prosedur tetap prosesi jaringan klinik Morotai Bandar Lampung

Tabel 3.3 Tahap pewarnaan hematoxylin- ekstrak strawberry 15%

| Tahap                | Reagensia              | Waktu      |
|----------------------|------------------------|------------|
| Deparafinisasi       | Xylol I                | 5 Menit    |
|                      | Xylol II               | 5 Menit    |
| Dehidrasi            | Alkohol absolut        | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%            | 2 Menit    |
|                      | Alkohol 70%            | 2 Menit    |
|                      | Aquadest               | 2 Menit    |
| Pewarnaan inti       | Hematoxylin            | 7-10 Menit |
| Pencucian            | Air mengalir           | 1 Menit    |
| Pewarnaan sitoplasma | Ekstrak strawberry 15% | 1-2 Menit  |
| Dehidrasi            | Alkohol 70%            | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%            | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut I      | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut II     | 2 Menit    |
| Clearing             | Xylol I                | 5 Menit    |
|                      | Xylol II               | 5 Menit    |
| Mounting             | Entelan                |            |

Tabel 3.4 tahap pewarnaan hematoxylin-ekstrak strawberry 20%

| Tahap                | Reagensia              | Waktu      |
|----------------------|------------------------|------------|
| Deparafinisasi       | Xylol I                | 5 Menit    |
|                      | Xylol II               | 5 Menit    |
| Dehidrasi            | Alkohol absolut        | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%            | 2 Menit    |
|                      | Alkohol 70%            | 2 Menit    |
|                      | Aquadest               | 2 Menit    |
| Pewarnaan inti       | Hematoxylin            | 7-10 Menit |
| Pencucian            | Air mengalir           | 1 Menit    |
| Pewarnaan sitoplasma | Ekstrak strawberry 20% | 1-2 Menit  |
| Dehidrasi            | Alkohol 70%            | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%            | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut I      | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut II     | 2 Menit    |

| Tahap    | Reagensia | Waktu   |
|----------|-----------|---------|
| Clearing | Xylol I   | 5 Menit |
|          | Xylol II  | 5 Menit |
| Mounting | Entelan   |         |

Tabel 3.5 tahap pewarnaan hematoxylin-ekstrak strawberry 25%

| Tahap                | Reagensia              | Waktu      |
|----------------------|------------------------|------------|
| Deparafinisasi       | Xylol I                | 5 Menit    |
|                      | Xylol II               | 5 Menit    |
| Dehidrasi            | Alkohol absolut        | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%            | 2 Menit    |
|                      | Alkohol 70%            | 2 Menit    |
|                      | Aquadest               | 2 Menit    |
| Pewarnaan inti       | Hematoxylin            | 7-10 Menit |
| Pencucian            | Air mengalir           | 1 Menit    |
| Pewarnaan sitoplasma | Ekstrak strawberry 25% | 1-2 Menit  |
| Dehidrasi            | Alkohol 70%            | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%            | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut I      | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut II     | 2 Menit    |
| Clearing             | Xylol I                | 5 Menit    |
|                      | Xylol II               | 5 Menit    |
| Mounting             | Entelan                |            |

Tabel 3.6 tahap pewarnaan hematoxylin-ekstrak strawberry 30%

| Tahap                | Reagensia              | Waktu      |
|----------------------|------------------------|------------|
| Deparafinisasi       | Xylol I                | 5 Menit    |
|                      | Xylol II               | 5 Menit    |
| Dehidrasi            | Alkohol absolut        | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%            | 2 Menit    |
|                      | Alkohol 70%            | 2 Menit    |
|                      | Aquadest               | 2 Menit    |
| Pewarnaan inti       | Hematoxylin            | 7-10 Menit |
| Pencucian            | Air mengalir           | 1 Menit    |
| Pewarnaan sitoplasma | Ekstrak strawberry 30% | 1-2 Menit  |
| Dehidrasi            | Alkohol 70%            | 1 Menit    |
|                      | Alkohol 96%            | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut I      | 1 Menit    |
|                      | Alkohol absolut II     | 2 Menit    |
| Clearing             | Xylol I                | 5 Menit    |
|                      | Xylol II               | 5 Menit    |
| Mounting             | Entelan                |            |

## 5. Interpretasi Hasil

Hasil pewarnaan sediaan histopatologi kanker payudara nantinya akan dibaca dan dinilai oleh dokter spesialis Patologi Anatomi dengan berdasarkan penilaian skoring.

Tabel 3.7 kriteria penilaian kualitas sediaan pewarnaan Hematoxylin Eosin

| Kriteria Penilaian   | Deskripsi                                                    | Skor |
|----------------------|--------------------------------------------------------------|------|
| Sitoplasma           | Jaringan ikat dan sitoplasma tidak jelas                     | 1    |
|                      | Jaringan ikat dan sitoplasma jelas                           | 2    |
| Sel inti             | Inti sel tidak jelas                                         | 1    |
|                      | Inti sel jelas                                               | 2    |
| Keseragaman warna    | Keseragaman warna tidak merata dan jelas                     | 1    |
|                      | Keseragaman warna merata dan jelas                           | 2    |
| Intensitas pewarnaan | Warna tidak terlihat cerah atau kurang menyerap warna.       | 1    |
|                      | Warna terlihat cerah, pekat serta menyerap warna dengan baik | 2    |

(Sumber: Sravya et al., 2018 telah dimodifikasi BPMPPPI)

## F. Pengolahan Data

Data hasil penelitian yang telah didapatkan, maka selanjutnya dilakukan pengolahan data dengan tahapan sebagai berikut:

1. *Coding*, yaitu pemberian kode untuk memudahkan pengentrian data saat dimasukkan ke komputer (*entry data*)
2. *Entry data*, merupakan proses memasukkan data yang sudah didapat ke dalam aplikasi, contohnya SPSS
3. *Scoring*, merupakan pemberian skor terhadap data yang telah diberi kode serta memberikan bobot dan nilai pada data tersebut.

## G. Analisis Data

Data skoring yang telah diperoleh berdasarkan penilaian ahli patologi anatomi ditotalkan lalu dihitung rata rata skoring. Pemberian nilai skor untuk 4 parameter yaitu 1-2 dengan total skor baik apabila mencapai skor 80%, nilai 4-6 masuk dengan kategori tidak baik serta 7-8 masuk pada kategori baik (Sravya et al., 2018). Hasil skoring dari penilaian dilakukan analisis dengan *Kruskal Wallis Test* dengan nilai signifikan  $p < 0,05$ .