

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Jenis dan Desain penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimen dengan desain post- test only control group, yang bertujuan untuk mengetahui kualitas hasil pewarnaan histopatologi pada kanker serviks. Penelitian ini menggantikan eosin pada tahap pewarnaan hematoksilin Eosin dengan menggunakan ekstrak daun pacar air (*Impatiens balsamina L.*) dan membandingkannya dengan penggunaan eosin. Terdapat dua jenis variabel dalam penelitian ini: variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah pembuatan sediaan histopatologi dari kanker serviks menggunakan ekstrak daun pacar air (*Impatiens balsamina L.*), sedangkan variabel terikatnya adalah kualitas pewarnaan Hematoksilin Eosin pada jaringan histopatologi kanker serviks, yang dinilai berdasarkan sitoplasma, karakteristik inti sel, dan Kontras warna hasil pewarnaan.

Spesimen jaringan kanker serviks akan dianalisis dengan dua perlakuan, yaitu menggunakan daun pacar air (*Impatiens balsamina L.*) dan eosin dalam proses pewarnaan Hematoksilin Eosin pada tahap pewarnaan eosin, dilakukan uji Kruskal Wallis Test dengan nilai signifikansi ( $p > 0.05$ ) untuk mengetahui perbedaan kualitas sediaan pewarnaan Hematoksilin Eosin antara penggunaan daun pacar air (*Impatiens balsamina L.*) dan eosin dalam pembuatan preparat jaringan kanker serviks.

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

###### **1. Waktu Penelitian**

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Maret-April 2025.

###### **2. Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian ini di Laboratorium Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung.

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari spesimen kanker serviks yang diambil dari Laboratorium Klinik Morotai Patologi di Kota Bandar Lampung, umumnya spesimen jaringan kanker serviks yang tersedia telah melalui proses pemotongan, fiksasi, dan pembuatan blok parafin. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini telah memperoleh izin dari pasien sebelum pengambilan sampel

oleh dokter. Sampel tersebut menjadi hak penuh rumah sakit untuk diperiksa dan dapat digunakan dikemudian hari untuk berbagai keperluan penting, termasuk penelitian. Penentuan jumlah pengulangan dalam penelitian akan dilakukan dengan menggunakan rumus federer sebagaimana dijelaskan (Harsojuwono *et al.*, 2021) .

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

Keterangan:

n = Banyaknya pengulangan

t = Jumlah kelompok perlakuan

Berdasarkan rumus federer diatas, maka dapat dihitung banyaknya pengulangan yang dapat dilakukan yaitu:

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

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

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

$$n \geq 5$$

Dari hasil perhitungan menggunakan rumus federer diatas, diperoleh banyaknya pengulangan minimal adalah 5 kali dalam 5 perlakuan. Jadi, sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 25 sampel jaringan kanker serviks dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1) Kriteria Inklusi

- a. Jaringan dipotong halus (*sectioning*)
- b. Ketebalan pemotongan 3 $\mu$ .

2) Kriteria Eksklusi

- a. Spesimen jaringan kanker serviks yang tidak mempunyai data yang terdapat pada formulir dan wadah specimen.
- b. Spesimen jaringan kanker serviks yang telah rusak atau hanya sedikit jaringan yang dapat diambil.
- c. Sel-sel kanker kerosis luas
- d. Blok parafin rusak / hilang

## D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

| Variabel                         | Definisi Operasional  | Cara Ukur   | Alat Ukur                      | Hasil Ukur  | Skala Ukur |
|----------------------------------|---|---|--------------------------------|---|------------|
| Variabel Bebas                   |   |   |                                |   |            |
| Pembuatan sediaan histopatologi  | Pewarnaan sediaan   | V1M1=V2M2   | Gelas Ukur                     | Eosin   | Nominal    |
| Ekstrak daun pacar air           | Metode Hematoxilin Eosin, menggunakan eosin sebagai reagen Kontrol dan ekstrak Daun pacar air pada sediaan perlakuan. | Observasi   | MSDS                           | Ekstrak daun pacar air 5%<br>Ekstrak daun pacar air 10%<br>Ekstrak daun pacar air 15%<br>Ekstrak daun pacar air 20% |            |
| Variabel Terikat                 |   |   |                                | 4-6 Tidak baik  |            |
| Kualitas Pewarnaan Histopatologi |   |   |                                | 7-8 Baik  |            |
| 1. Inti sel                      | Inti sel akan terwarnai Oleh hematoxilin dengan warna biru atau ungu  | Metode Skoring (Sravya <i>et al.</i> , 2018) yang telah dilakukan modifikasi. | Mikroskop dan Lembar Observasi | 1 Tidak baik<br>2 Baik  | Ordinal    |
| 2. Sitoplasma                    | Sitoplasma memiliki warna merah yang Dihasilkan dari pewarna eosin  | Metode Skoring (Sravya <i>et al.</i> , 2018) yang telah Dilakukan modifikasi. | Mikroskop dan Lembar Observasi | 1 Tidak baik<br>2 Baik  | Ordinal    |
| 3. Intensitas warna              | Merupakan ukuran Kecerahan ataupun kegelapan dari suatu Warna pada objek yang diamati                                 | Metode Skoring (Sravya <i>et al.</i> , 2018) yang telah Dilakukan modifikasi. | Mikroskop dan Lembar Observasi | 1 Tidak baik<br>2 Baik  | Ordinal    |
| 4. Kontras warna                 | Kontras pewarnaan adalah perbedaan kecerahan antara objek dan latar belakang pada sediaan yang diwarnai               | Metode Skoring (Sravya <i>et al.</i> , 2018) yang telah dilakukan modifikasi  | Mikroskop dan Lembar Observasi | 1 Tidak baik<br>2 Baik  | Ordinal    |

## E. Pengumpulan Data

### 1. Pembuatan ekstrak daun pacar air.

Pembuatan simplisia dan ekstrak daun pacar air dilakukan dilaboratorium MIPA Biologi Universitas Lampung dengan proses pengekstrasian simplisia daun pacar air dengan metode maserasi.

#### a. Alat

Gelas kimia, gelas ukur, toples kaca, neraca analitik, *rotary vacuum evaporator*, *waterbath*, oven, gunting, blender, saringan.

#### b. Bahan

Etanol, aquades, serbuk daun pacar air.

#### c. Prosedur Kerja

- 1) Daun Pacar Air dipotong menjadi bagian-bagian kecil- kecil.
- 2) Selanjutnya, daun dikeringkan dalam oven pada suhu 40 derajat Celsius selama 18 jam.
- 3) Setelah itu, daun yang kering dihaluskan menggunakan blender hingga menyerupai bubuk kopi.
- 4) Kemudian, sebanyak 500 gram bubuk tersebut ditimbang dan dimasukkan ke dalam toples kaca.
- 5) Tambahkan 5 liter pelarut etanol 96% dan aduk hingga homogen.
- 6) Simplisia di maserasi selama 3 hari
- 7) Simplisia di saring hingga didapat maserat
- 8) Maserat yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator kurang lebih 12 jam dengan kecepatan 60 rpm, suhu 40 derajat celcius hingga pelarut menguap dan diperoleh ekstrak menjadi kental.
- 9) Selanjutnya, dibuat pengenceran ekstrak daun pacar air dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20% menggunakan rumus ( $V1.M1 = V2.M2$ ).

### 2. Pengambilan Sampel

Beberapa langkah yang perlu dipersiapkan sebelum melakukan penelitian, antara lain:

- a) Mencari referensi yang diperlukan untuk memperoleh data ilmiah terkait penelitian.
- b) Melakukan pra-survei di lokasi penelitian, yaitu di klinik Patologi Morotai,

Kota Bandar Lampung

- c) Mengajukan surat izin penelitian kepada Direktur Poltekkes Tanjungkarang agar dapat diteruskan ke Klinik Patologi Morotai, Kota Bandar Lampung.
- d) Setelah menerima surat izin dari Klinik Patologi Morotai Bandar Lampung, langkah selanjutnya adalah melaksanakan penelitian di Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung.

### 3. Alat dan Bahan

#### a. Alat

Alat-alat yang digunakan meliputi rak pengecatan, pinset, pipet tetes, spuit, kaca objek, preparat, mikrotom, oven, pisau, kaset embedding, dan bak air panas.

#### b. Bahan :

Alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, parafin, alkohol absolut, aquadest, xylol, ekstrak daun pacar air, hematoxylin, eosin, entelan dan spesimen jaringan kanker serviks.

### 4. Metode Pemeriksaan

#### a. Pematangan Jaringan

Tabel 3.2 Tahap Pematangan Jaringan

| No | Tahap                    | Zat                 | Waktu    |
|----|--------------------------|---------------------|----------|
| 1. | Fiksasi                  | Formalin Buffer 10% | 48 Jam   |
| 2. | Dehidrasi                | Alkohol 70%         | 15 Menit |
|    |                          | Alkohol 80%         | 15 Menit |
|    |                          | Alkohol 96%         | 15 Menit |
|    |                          | Etanol              | 30 Menit |
| 3. | Clearing                 | Xylol I             | 15 Menit |
|    |                          | Xylol II            | 15 Menit |
|    |                          | Xylol III           | 15 Menit |
| 4. | Impregnating – Embedding | Paraffin I          | 15 Menit |
|    |                          | Paraffin II         | 15 Menit |

Sumber : (Prosedur Tetap Klinik Morotai Patologi Kota B. Lampung)

## b. Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

Tabel 3.3 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

| No | Tahap                                   | Zat   | Waktu                                |
|----|---|---|--------------------------------------|
| 1. | Defarafinisasi (menghilangkan paraffin) | Xylol 1<br>Xylol 2  | 5 menit<br>5 menit                   |
| 2. | Dehidrasi (memasukan air)               | Alkohol absolut<br>Alkohol 96%<br>Alkohol 70%<br>Aquadess | Menit<br>Menit<br>2 Menit<br>2 Menit |
| 3. | Pewarnaan Hematoxylin                   | Hematoxylin   | 7-10 Menit                           |
| 4. | Pencucian                               | Air Mengalir  | 1 Menit                              |
| 5. | Pewarnaan Eosin                         | Eosin   | 1-2 Menit                            |
| 6. | Dehidrasi (menghilangkan air)           | Alkohol 70%<br>Alkohol 96%<br>Alkohol absolut             | 2 Menit<br>2 Menit<br>2 Menit        |
| 7. | Clearing (Penjernihan)                  | Xylol 1<br>Xylol 2  | 1 Menit<br>1 Menit                   |
| 8. | Mounting                                | Entelan   |                                      |

Sumber : (Prosedur Tetap Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung)

Tabel 3.4 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak DaunPacar Air 5%

| No | Tahap                                   | Zat   | Waktu                                    |
|----|---|---|--|
| 1. | Defarafinisasi (menghilangkan paraffin) | Xylol 1<br>Xylol 2  | 5 menit<br>5 menit                       |
| 2. | Dehidrasi (memasukan air)               | Alkohol absolut<br>Alkohol 96%<br>Alkohol 70%<br>Aquadess | 1 Menit<br>2 Menit<br>2 Menit<br>2 Menit |
| 3. | Pewarnaan Hematoxylin                   | Hematoxylin   | 7-10 Menit                               |
| 4. | Pencucian                               | Air Mengalir  | 1 Menit                                  |
| 5. | Pewarnaan Eosin                         | Ekstrak daun pacar air 5%                                 | 1-2 Menit                                |
| 6. | Dehidrasi (menghilangkan air)           | Alkohol 70%<br>Alkohol 96%<br>Alkohol absolut             | 2 Menit<br>2 Menit<br>2 Menit            |
| 7. | Clearing (Penjernihan)                  | Xylol 1<br>Xylol 2  | 1 Menit<br>1 Menit                       |
| 8. | Mounting                                | Entelan   |  |

Tabel 3.5 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Pacar Air 10%

| No | Tahap                                   | Zat   | Waktu                                    |
|----|---|---|--|
| 1. | Defarafinisasi (menghilangkan paraffin) | Xylol 1<br>Xylol 2  | 5 menit<br>5 menit                       |
| 2. | Dehidrasi (memasukan air)               | Alkohol absolut<br>Alkohol 96%<br>Alkohol 70%<br>Aquadess | 3 Menit<br>4 Menit<br>2 Menit<br>2 Menit |
| 3. | Pewarnaan Hematoxylin                   | Hematoxylin   | 7-10 Menit                               |
| 4. | Pencucian                               | Air Mengalir  | 1 Menit                                  |
| 5. | Pewarnaan Eosin                         | Ekstrak daun pacar air 10%                                | 1-2 Menit                                |

|    |                               |                 |         |
|----|-------------------------------|-----------------|---------|
| 6. | Dehidrasi (menghilangkan air) | Alkohol 70%     | 2 Menit |
|    |                               | Alkohol 96%     | 2 Menit |
|    |                               | Alkohol absolut | 2 Menit |
| 7. | Clearing (Penjernihan)        | Xylol 1         | 1 Menit |
|    |                               | Xyylol 2        | 1 Menit |
| 8. | Mounting                      | Entelan         |         |

Tabel 3.6 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Pacar Air 15%

| No | Tahap                                   | Zat                        | Waktu      |
|----|---|----------------------------|------------|
| 1. | Defarafinisasi (menghilangkan paraffin) | Xylol 1                    | 5 menit    |
|    |   | Xylol 2                    | 5 menit    |
| 2. | Dehidrasi (memasukan air)               | Alkohol absolut            | 5 Menit    |
|    |   | Alkohol 96%                | 6 Menit    |
|    |   | Alkohol 70%                | 2 Menit    |
|    |   | Aquades                    | 2 Menit    |
| 3. | Pewarnaan Hematoxylin                   | Hematoxylin                | 7-10 Menit |
| 4. | Pencucian                               | Air Mengalir               | 1 Menit    |
| 5. | Pewarnaan Eosin                         | Ekstrak daun pacar air 15% | 1-2 Menit  |
| 6. | Dehidrasi (menghilangkan air)           | Alkohol 70%                | 2 Menit    |
|    |   | Alkohol 96%                | 2 Menit    |
|    |   | Alkohol absolut            | 2 Menit    |
| 7. | Clearing (Penjernihan)                  | Xylol 1                    | 1 Menit    |
|    |   | Xyylol 2                   | 1 Menit    |
| 8. | Mounting                                | Entelan                    |            |

Tabel 3.7 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Pacar Air 20%

| No | Tahap                                   | Zat                        | Waktu      |
|----|---|----------------------------|------------|
| 1. | Defarafinisasi (menghilangkan paraffin) | Xylol 1                    | 5 menit    |
|    |   | Xylol 2                    | 5 menit    |
| 2. | Dehidrasi (memasukan air)               | Alkohol absolut            | 7 Menit    |
|    |   | Alkohol 96%                | 8 Menit    |
|    |   | Alkohol 70%                | 2 Menit    |
|    |   | Aquades                    | 2 Menit    |
| 3. | Pewarnaan Hematoxylin                   | Hematoxylin                | 7-10 Menit |
| 4. | Pencucian                               | Air Mengalir               | 1 Menit    |
| 5. | Pewarnaan Eosin                         | Ekstrak daun pacar air 20% | 1-2 Menit  |
| 6. | Dehidrasi (menghilangkan air)           | Alkohol 70%                | 2 Menit    |
|    |   | Alkohol 96%                | 2 Menit    |
|    |   | Alkohol absolut            | 2 Menit    |
| 7. | Clearing (Penjernihan)                  | Xylol 1                    | 1 Menit    |
|    |   | Xyylol 2                   | 1 Menit    |
| 8. | Mounting                                | Entelan                    |            |

## 5. Interpretasi Hasil

Hasil pewarnaan sediaan jaringan kanker serviks nantinya akan dinilai oleh dokter spesialis patologi anatomi berdasarkan dengan penilai *skoring*.

Tabel 3.8 Kriteria Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin Eosin

| No | Struktur             | Deskripsi                                   | Skala Nominal |
|----|----------------------|---|---------------|
| 1. | Inti sel             | Inti sel tidak jelas                        | 1             |
|    |                      | Inti sel jelas                              | 2             |
| 2. | Sitoplasma           | Tidak jelasnya jaringan ikat dan sitoplasma | 1             |
|    |                      | Jelasnya jaringan ikat dan sitoplasma       | 2             |
| 3. | Intensitas Pewarnaan | Warna kurang diserap intensitas ringan      | 1             |
|    |                      | Warna baik diserap intensitas kuat          | 2             |
| 4. | Kontras pewarnaan    | Kontras pewarnaan tidak baik                | 1             |
|    |                      | Kontras pewarnaan baik                      | 2             |

Sumber : (Sravya et al., 2018)dari modifikasi BPMPP

Tabel 3.9 skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

| No | Deskripsi  | Nilai |
|----|------------|-------|
| 1. | Tidak Baik | 4-6   |
| 2. | Baik       | 7-8   |

Sumber : (Sravya et al., 2018)dengan modifikasi BPMPP

## 6. Hasil Penilaian Sediaan

Tabel 3.10 Hasil Pewarnaan Sediaan Jaringan Kanker Serviks Menggunakan Eosin

| Penilaian Kualitas Pewarnaan Sediaan Jaringan Kanker Serviks |            |          |            |                  |               |
|--|------------|----------|------------|------------------|---------------|
| Pewarnaan HE menggunakan eosin                               | Kriteria   | Inti Sel | Sitoplasma | Intensitas Warna | Kontras Warna |
|  | Tidak Baik |          |            |                  |               |
|  | Baik       |          |            |                  |               |
|  | Total      |          |            |                  |               |

Tabel 3.11 Hasil Pewarnaan Sediaan Kanker Serviks Dengan Ekstrak Daun Pacar Air 5%

| Penilaian Kualitas Pewarnaan Sediaan Jaringan Kanker Serviks |            |          |            |                  |               |
|--|------------|----------|------------|------------------|---------------|
| Pewarnaan HE menggunakan ekstrak daun pacar air 5%           | Kriteria   | Inti Sel | Sitoplasma | Intensitas Warna | Kontras Warna |
|  | Tidak Baik |          |            |                  |               |
|  | Baik       |          |            |                  |               |
|  | Total      |          |            |                  |               |

Tabel 3.12 Hasil Pewarnaan Sediaan Kanker Serviks Dengan Ekstrak Daun Pacar Air 10%

| Penilaian Kualitas Pewarnaan Sediaan Jaringan Kanker Serviks |            |          |            |                  |               |
|--|------------|----------|------------|------------------|---------------|
| Pewarnaan HE menggunakan ekstrak daun pacar air 10%          | Kriteria   | Inti Sel | Sitoplasma | Intensitas Warna | Kontras Warna |
|  | Tidak Baik |          |            |                  |               |
|  | Baik       |          |            |                  |               |
|  | Total      |          |            |                  |               |



Tabel 3.13 Hasil Pewarnaan Sediaan Kanker Serviks Dengan Ekstrak Daun Pacar Air 15%

| Penilaian Kualitas Pewarnaan Sediaan Jaringan Kanker Serviks |            |          |            |                  |               |
|--|------------|----------|------------|------------------|---------------|
| Pewarnaan HE   | Kriteria   | Inti Sel | Sitoplasma | Intensitas Warna | Kontras Warna |
| menggunakan ekstrak daun pacar air 15%                       | Tidak Baik |          |            |                  |               |
|  | Baik       |          |            |                  |               |
|  | Total      |          |            |                  |               |

Tabel 3.14 Hasil Pewarnaan Sediaan Kanker Serviks Dengan Ekstrak Daun Pacar Air 20%

| Penilaian Kualitas Pewarnaan Sediaan Jaringan Kanker Serviks |            |          |            |                  |               |
|--|------------|----------|------------|------------------|---------------|
| Pewarnaan HE   | Kriteria   | Inti Sel | Sitoplasma | Intensitas Warna | Kontras Warna |
| menggunakan ekstrak daun pacar air 20%                       | Tidak Baik |          |            |                  |               |
|  | Baik       |          |            |                  |               |
|  | Total      |          |            |                  |               |

## F. Pengolahan Data dan Analisa Data

### 1. Pengolahan Data

Proses pengolahan data dilakukan setelah data terkumpul berdasarkan hasil pengamatan melalui tahap-tahap sebagai berikut:

- Coding yaitu pemberian kode untuk memudahkan pengentrian data ketika dimasukan ke komputer (data entry)
- Entry Data yaitu memasukan data-data yang sudah terkumpul kedalam aplikasi atau program komputer, program SPSS V.25 for Windows
- Skoring yaitu pemberian skor terhadap variabel yang diperiksa agar mendapatkan nilai yang signifikan

## G. Analisa Data

Pada penelitian ini, data skoring yang diperoleh dari hasil penilaian ahli Patologi Anatomi ditotal, dihitung rerata skoring. Nilai ekor tidak baik 4-6 dan baik 7-8 (Srivaya et al., 2018) dengan modifikasi. Data yang diperoleh dilakukan uji *Kruskall Wallis Test* ( $p > 0,05$ ). untuk melihat ada tidaknya perbedaan hasil mikroskopis pewarnaan hematoxilin-eosin antar kelompok.

## H. Persetujuan Etik (Ethical Clearance)

Penelitian yang dilakukan atas izin komisi etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang. Dengan penggunaan spesimen jaringan kanker serviks sebagai sampel yang akan dianalisis, manusia bertindak sebagai subjek penelitian. Identitas sampel dapat terjaga kerahasiannya, penelitian ini, hanya ditulis dengan kode dan nomor tertentu. Penelitian ini menggunakan standar prosedur yang berlaku.