

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 Kruskall 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 dilangsungkan 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 fereder 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 3μ .

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 Ekstrak daun pacar air 5%	
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 10% Ekstrak daun pacar air 15% Ekstrak daun pacar air 20%	Nominal
Variabel Terikat					
Kualitas Pewarnaan Histopatologi	Pemenuhan persyaratan Kualitas pewarnaan histopatologi meliputi : inti sel, sitoplasma, intensitas pewarnaan, kontras pewarnaan			4-6 Tidak baik 7-8 Baik	
1. Inti sel	Inti sel akan terwarnai Metode Oleh hematoxilin dengan Skoring warna biru atau ungu (Sravya <i>et al.</i> , 2018) yang telah dilakukan modifikasi.		Mikroskop dan Lembar Observasi	1 Tidak baik 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 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 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 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 pengekstrasi 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.	Defarafinasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1 Xylol 2	5 menit 5 menit
2.	Dehidrasi (memasukan air)	Alkohol absolut Alkohol 96% Alkohol 70% Aquades	Menit Menit 2 Menit 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% Alkohol 96% Alkohol absolut	2 Menit 2 Menit 2 Menit
7.	Clearing (Penjernihan)	Xylol 1 Xyylol 2	1 Menit 1 Menit
8.	Mounting	Entelan	

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

Tabel 3.4 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Pacar Air 5%

No	Tahap	Zat	Waktu
1.	Defarafinasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1 Xylol 2	5 menit 5 menit
2.	Dehidrasi (memasukan air)	Alkohol absolut Alkohol 96% Alkohol 70% Aquades	1 Menit 2 Menit 2 Menit 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% Alkohol 96% Alkohol absolut	2 Menit 2 Menit 2 Menit
7.	Clearing (Penjernihan)	Xylol 1 Xyylol 2	1 Menit 1 Menit
8.	Mounting	Entelan	

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

No	Tahap	Zat	Waktu
1.	Defarafinasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1 Xylol 2	5 menit 5 menit
2.	Dehidrasi (memasukan air)	Alkohol absolut Alkohol 96% Alkohol 70% Aquades	3 Menit 4 Menit 2 Menit 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.	Defarafinasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1 Xylol 2	5 menit 5 menit
2.	Dehidrasi (memasukan air)	Alkohol absolut Alkohol 96% Alkohol 70% Aquades	5 Menit 6 Menit 2 Menit 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% Alkohol 96% Alkohol absolut	2 Menit 2 Menit 2 Menit
7.	Clearing (Penjernihan)	Xylol 1 Xyylol 2	1 Menit 1 Menit
8.	Mounting	Entelan	

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

No	Tahap	Zat	Waktu
1.	Defarafinasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1 Xylol 2	5 menit 5 menit
2.	Dehidrasi (memasukan air)	Alkohol absolut Alkohol 96% Alkohol 70% Aquades	7 Menit 8 Menit 2 Menit 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% Alkohol 96% Alkohol absolut	2 Menit 2 Menit 2 Menit
7.	Clearing (Penjernihan)	Xylol 1 Xyylol 2	1 Menit 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 sel jelas	1 2
2.	Sitoplasma	Tidak jelasnya jaringan ikat dan sitoplasma Jelasnya jaringan ikat dan sitoplasma	1 2
3.	Intensitas Pewarnaan	Warna kurang diserap intensitas ringan Warna baik diserap intensitas kuat	1 2
4.	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik Kontras pewarnaan baik	1 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 BPMPI

6. Hasil Penilaian Sediaan

Tabel 3.10 Hasil Pewarnaan Sediaan Jaringan Kanker Serviks Menggunakan Eosin

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

Tabel 3.12 Hasil Pewarnaan Sediaan Kanker Serviks Dengan Ekstrak Daun Pacar Air10%

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

Tabel 3.13 Hasil Pewarnaan Sediaan Kanker Serviks Dengan Ekstrak Daun Pacar Air15%

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

Tabel 3.14 Hasil Pewarnaan Sediaan Kanker Serviks Dengan Ekstrak Daun Pacar Air20%

Pewarnaan HE	Kriteria	Penilaian Kualitas Pewarnaan Sediaan Jaringan Kanker Serviks			
		Inti Sel	Sitoplasma	Intensitas Warna	Kontras Warna
menggunakan ekstrak daun pacar air 20%	Tidak Baik				
ekstrak daun pacar	Baik				
air 20%	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 variablel 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 (Sravya 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.