

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis dan desain penelitian yang digunakan adalah eksperimen. Desain penelitian ini memeliki 3 perlakuan dengan perlakuan kontrol yang menggunakan reagen pewarna hematoxylin eosin baru, dan 2 perlakuan lainnya yaitu menggunakan reagen pewarna hematoxylin eosin lama 3 bulan pemakaian tanpa penyesuaian pH dan reagen pewarna hematoxylin eosin lama 3 bulan pemakaian dengan penyesuaian pH. Variabel bebas dalam penelitian ini ialah pewarnaan hematoxylin dan eosin, dengan variable terikat berupa kualitas hasil pewarnaan histopatologi kanker payudara. Adanya perbedaan hasil kualitas sediaan pewarnaan hematoxilin eosin baru sebagai kontrol, hematoxylin eosin lama 3 bulan pemakaian tanpa penyesuaian pH dan dengan penyesuaian pH, maka dilakukan uji *Kruskall Wallis Test* dengan nilai signifikasi ($p<0.05$).

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

1. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2025.

2. Lokasi

Penelitian dilaksanakan di Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah 27 preparat jaringan kanker payudara yang diberi 3 perlakuan berbeda yaitu pewarnaan menggunakan reagen hematoxylin eosin baru sebagai kontrol sebanyak 9 preparat, pewarnaan hematoxylin eosin lama 3 bulan pemakaian sebagai perlakuan 1 sebanyak 9 preparat dan pewarnaan hematoxylin eosin lama 3 bulan pemakaian dengan penyesuaian pH sebagai perlakuan 2 sebanyak 9 preparat. Penentuan untuk banyaknya pengulangan di dalam penelitian ini didapatkan dengan menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

Keterangan:

n = Banyaknya pengulangan

t = Jumlah kelompok perlakuan

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

$$(3-1)(n-1) \geq 15$$

$$2(n-1) \geq 15$$

$$n \geq 9$$

Dari hasil perhitungan menggunakan rumus Federer diatas, diperoleh banyaknya pengulangan adalah 9 kali dalam 3 perlakuan.

Dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1) Kriteria Inklusi

Jaringan kanker payudara dilakukan pemotongan pada tahap sectioning dengan ketebalan pemotongan 4μ .

2). Kriteria Eksklusi

- a) Spesimen jaringan kanker payudara yang telah rusak atau hanya sedikit spesimen jaringan yang dapat diambil.
- b) Sediaan preparat rusak
- c) Sediaan preparat 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:					
Pewarnaan Hematoxylin	Pewarnaan dengan metode Hematoxylin	1. Lembar observasi	1. pH meter	1. Reagen HE baru	Nominal
Eosin	eosin pada jaringan kanker payudara menggunakan reagen baru sebagai kontrol, menggunakan reagen pewarna hematoxylin dan eosin lama pemakaian 3 bulan sebagai perlakuan 1, dan menggunakan reagen pewarna hematoxylin dan eosin lama pemakaian 3 bulan dengan penyesuaian pH sebagai perlakuan 2	2. Menggunakan pH meter 2. MSDS	untuk mengukur pH reagen HE	2. Reagen HE pemakaian 3 bulan tanpa penyesuaian pH 3. Reagen HE pemakaian 3 bulan dengan penyesuaian pH	
Variabel Terikat:					
Kualitas Hasil Pewarnaan Histopatologi Kanker payudara	Hasil penilaian kualitas pewarnaan histopatologi kanker payudara meliputi 4 parameter: Inti sel: Inti sel berwarna biru atau ungu yang terwarnai oleh Hematoxylin , Sitoplasma: Sitoplasma berwarna merah muda yang terwarnai oleh Eosin,	Metode Skoring (Sravya et al, 2018 yang telah dimodifikasi BPMPI)	Mikroskop Dan Lembar observasi	Tidak baik, Rerata skor (4-6) Baik, Rerata skor (7-8)	Ordinal
				Tidak baik (1) Baik (2)	
				Tidak baik (1) Baik (2)	
	Intensitas pewarnaan: ukuran kecerahan dari warna intisel dan sitoplasma yang diamati, dan			Tidak baik (1) Baik (2)	
	Kontras pewarnaan: terlihat jelas perbedaan kontras warna antar inti dan sitoplasma.			Tidak baik (1) Baik (2)	

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Persiapan Penelitian

- a. Mencari sumber pustaka untuk memproleh data ilmiah penelitian
- b. Melakukan Prasurvey pada lokasi penelitian yaitu di Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung
- c. Pengajuan surat izin penelitian ke Direktur Poltekkes Tanjung karang untuk diteruskan kepada Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung
- d. Setelah mendapatkan surat izin dari Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung, kemudian melakukan penelitian di Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung.

2. Prosedur Pemeriksaan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Rak pengecatan, pinset, wadah pewarnaan, pipet tetes/spuit, deck glass, pH meter.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Buffer formalin 10%, alkohol 70%, alcohol 80%, alkohol 95%, alcohol absolut, aquadest, xylol, Harris Hematoxylin baru dengan pH 2,4, Histoline Eosin Y alcoholic solution 1% dengan pH 4,8, entelan, spesimen jaringan kanker payudara, buffer pH 4, buffer pH 7, buffer pH 10, larutan asam asetat, dan larutan Naoh.

3. Cara Kerja

a. Fiksasi, dilakukan dengan menggunakan formalin buffer 10% dalam waktu 24 jam.

b. Pematangan Jaringan

- 1) Dehidrasi dengan alkohol bertingkat, dimulai dari Alkohol 70% - Alkohol 80% - Alkohol 95% selama masing-masing waktu 1 jam. Selanjutnya menggunakan larutan Alkohol absolut selama 2 jam.
- 2) Clearing dengan menggunakan xylol 1 dan xylol 2 selama masing-masing waktu 1 jam.
- 3) Impregnasi dengan menggunakan parafin cair diulang sebanyak 3x selama masing-masing waktu 25 menit.

- c. Blocking, dilakukan pencetakan jaringan dengan parafin cair menggunakan basemold. Hasil akhir berupa blok parafin.
- d. Mikrotomi dan floating, dilakukan pemotongan blok jaringan menjadi irisan tipis menggunakan mikrotom dengan ukuran ketebalan 4 mikron. Lakukan floating, potongan jaringan yang sudah dipotong oleh mikrotom diapungkan di atas waterbath, lalu ditempelkan pada objek glass. Setelah itu objek glass dikeringkan. Setelah kering, objek glass diletakkan di atas penghangat hotplate/oven, dan siap untuk diwarnai.
- e. Pengukuran pH reagen Hematoxylin dan Eosin
 - 1) Pada kelompok kontrol, reagen pewarna hematoxylin dan eosin baru sebelum digunakan, masing-masing diukur terlebih dahulu berapa nilai pH nya dengan menggunakan alat pH meter yang telah terkalibrasi, lalu catat nilai pH-nya (larutan hematoxylin pH 2,6 dan larutan eosin pH 4,8), kemudian dilakukan pewarnaan pada 9 preparat jaringan kanker payudara sebagai kontrol dari perlakuan.
 - 2) Pada kelompok perlakuan pertama, sebelum dilakukan pewarnaan dengan reagen pewarna Hematoxylin dan Eosin lama 3 bulan pemakaian, reagen hematoxylin dan reagen eosin masing-masing diukur berapa nilai pH nya dengan menggunakan alat pH meter yang sebelumnya sudah terkalibrasi, lalu catat nilai pH-nya (larutan hematoxylin lama 2,9 dan larutan eosin lama pH 4,6). Kemudian dilakukan pewarnaan terhadap 9 preparat jaringan kanker payudara.
 - 3) Pada kelompok perlakuan kedua, sebelum dilakukan pewarnaan, reagen pewarna Hematoxylin lama 3 bulan pemakaian dilakukan penyesuaian pH dengan cara ditambahkan larutan asam asetat menggunakan pipet tetes sampai dengan diperoleh nilai pH yang sama dengan nilai pH standar reagen pewarna hematoxylin harris yang baru dan reagen pewarna eosin lama ditambahkan larutan naoh menggunakan pipet tetes sampai dengan diperoleh nilai pH yang sama dengan nilai pH standar reagen pewarna eosin yang baru, yang diukur oleh pH meter yang telah terkalibrasi. Kemudian dilakukan pewarnaan terhadap 9 preparat jaringan kanker payudara. Untuk lebih jelas dapat dilihat pada tabel 3.2:

Tabel 3.2 Penyesuaian pH Larutan Hematoxylin dan Eosin

Jenis Reagen	pH Reagen Baru	pH Reagen Lama	Hasil Penyesuaian Reagen HE	pH Reagen Hasil Penyesuaian
Hematoxylin	2,6	2.9	+ 25 mL (Larutan Asam Asetat 1,2%) + 5 tetes (Larutan Asam Asetat 37%)	2.9 → 2.6
Eosin	4.8	4.6	+ 5 mL (Larutan NaOH 0.1 N)	4.6 → 4.8

f. Pewarnaan Hematoxylin Eosin

- 1) Deparafinasi, dilakukan dengan menggunakan larutan xylol diulang sebanyak 2x dalam waktu masing-masing 15 menit.
- 2) Rehidrasi, dilakukan dengan alkohol penurunan, dari alkohol absolut – alkohol 95% - alkohol 70% selama masing-masing waktu 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan aquades selama 3 menit.
- 3) Pewarnaan inti dilakukan dengan memakai reagen harris hematoxylin baru (sebagai kontrol), dengan reagen hematoxylin lama 3 bulan pemakaian (sebagai perlakuan pertama), dan dengan reagen hematoxylin lama 3 bulan pemakaian setelah penyesuaian pH (sebagai perlakuan kedua). Masing-masing dilakukan dalam waktu 15 menit.
- 4) Pencucian, dilakukan selama 5 menit dengan air mengalir.
- 5) Diferensiasi dilakukan dengan menggunakan larutan asam alkohol 1% dalam waktu 5 detik.
- 6) Pencucian dilakukan dengan air mengalir selama 1 menit.
- 7) Blueing dilakukan dengan menggunakan Lithium Carbonat 3 celup diikuti dengan pencucian dengan air mengalir.
- 8) Pewarnaan sitoplasma dilakukan dengan memakai reagen eosin baru (sebagai kontrol), dengan reagen eosin lama 3 bulan pemakaian (sebagai perlakuan pertama), dan dengan reagen eosin lama 3 bulan pemakaian setelah penyesuaian pH (sebagai perlakuan kedua). Masing-masing dilakukan dalam waktu 3-5 menit.
- 9) Dehidrasi, dilakukan dengan alkohol bertingkat, dari alkohol 70% - alkohol 95% - alkohol absolut selama masing-masing waktu 3 menit.

- 10) Clearing, dilakukan dengan menggunakan larutan xylol diulang sebanyak 2x selama masing-masing waktu 3 menit.
- 11) Mounting, dilakukan dengan meneteskan 1 tetes entelan di atas preparat jaringan, kemudian tutup dengan cover glass.

4. Interpretasi Hasil

Hasil pewarnaan preparat jaringan kanker payudara akan dinilai oleh dokter spesialis patologi anatomi berdasarkan dengan penilaian *skoring*.

Tabel 3.3 Kriteria Penilaian Kualitas Hasil Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No	Struktur Skor	Deskripsi	
1.	Inti sel	Warna ungu kebiruan pada inti sel tidak jelas	1
		Warna ungu kebiruan pada inti sel jelas	2
2.	Sitoplasma	Warna merah muda sitoplasma kurang jelas	1
		Warna merah muda sitoplasma tajam dan jelas	2
3.	Intensitas pewarnaan	Intensitas ringan menyerap, warna kurang	1
		Intensitas kuat menyerap, warna baik	2
4.	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik	1
		Kontras pewarnaan baik	2

Sumber : Sravya *et al.*, 2018 yang dimodifikasi BPMPI

Tabel 3.4 Skoring Penilaian Kualitas Hasil Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

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

Sumber : Sravya *et al.*, 2018 yang dimodifikasi BPMPI

F. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

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

- a. Coding yaitu pemberian kode pada setiap sediaan preparat jaringan kanker payudara sebagai identitas sampel agar tidak tertukar saat pembacaan oleh dokter Sp.PA serta untuk memudahkan pengentrian data ketika dimasukkan ke computer (data entry).
- b. Entry Data yaitu memasukkan data-data penilaian kualitas sediaan preparat jaringan kanker payudara yang telah dinilai oleh ahli patologi

dan sudah terkumpul ke dalam aplikasi/program komputer, misalnya program SPSS for Windows.

- c. Tabulating yaitu setelah data dientry, hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk distriusi frekuensi berupa tabel.
- d. Cleaning yaitu apabila semua data selesai dimasukkan, perlu dicek kembali untuk melihat kemungkinan adanya kesalahan kode, ketidaklengkapan, dan lainnya kemudian dilakukan pembetulan atau koreksi dan membersihkan data- data yang tidak diperlukan.

2. Analisa Data

Pada penelitian ini, data skoring yang diperoleh dari hasil penilaian ahli Patologi Anatomi ditotal, dihitung rerata skoring. Nilai skor 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 kualitas hasil mikroskopis pewarnaan hematoxilin eosin antar kelompok.

G. Ethical Clearance (Persetujuan Etik)

Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan No.178/KEPK-TJK/IV/2025 pada tanggal 26 April 2025. Penelitian ini menggunakan standar prosedur yang berlaku.