

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan desain post-test only control grup. Terdapat dua jenis variabel dalam penelitian ini yaitu, variabel bebas dan juga terikat, variabel bebas pengaruh variasi lama penyimpanan ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) dengan konsentrasi 25%, dan waktu penyimpanan 7 hari dan 14 hari. Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini yaitu berupa kualitas pewarnaan Hematoxilin Eosin jaringan histopatologi kanker payudara. Berdasarkan sitoplasma, karakteristik inti sel, dan juga hasil akhir dari kontras pewarnaan.

Spesimen jaringan kanker payudara akan diteliti dengan dua perlakuan yaitu menggunakan ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) pada konsentrasi 25% dengan variasi lama penyimpanan 7 hari dan 14 hari, setelah itu dilakukan uji *Kruskall Wallis Test* dengan nilai signifikansi ($p > 0.05$).

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan April- Mei 2025.

2. Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) dengan kriteria daun pucuk muda dengan ukuran sekitar 60-70 cm serta daun jati muda bewarna merah kecoklatan. Pada konsentrasi 25% dengan lama penyimpanan 7 hari dan 14 hari. Penentuan untuk banyaknya pengulangan didalam penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan rumus Federer sebagai berikut.

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

Keterangan:

n= Banyaknya pengulangan

t= Jumlah kelompok perlakuan

Berdasarkan rumus Federer di atas, maka dapat dihitung banyaknya pengulangan yang dapat dilakukan yaitu :

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

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

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

$$(n - 1) \geq 7,5$$

$$n \geq 8,5$$

$$n = 9$$

Dari hasil perhitungan rumus Federer diatas, diperoleh banyaknya pengulangan minimal adalah 9 kali dengan sampel yang digunakan adalah ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) dengan 3 kali perlakuan yaitu kontrol menggunakan eosin dan lama penyimpanan 7 hari dan 14 hari.

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 <i>Eosin</i>	Eosin adalah agen pewarnaan Hematoxilin Eosin pada sediaan sebagai reagen control.	Observasi	Lembar MSDS dan Etiket	Eosin	Nominal
Variasi waktu penyimpanan ekstrak daun jati (<i>Tectona grandis</i>) .	Ekstrak daun jati dengan konsentrasi 25% sebagai perlakuan. Dan menggunakan variasi waktu penyimpanan 7 hari dan 14 hari .	Observasi	Kalender	7 hari 14 hari	Ordinal
Variabel Terikat Kualitas Pewarnaan Histopatologi	Pemenuhan persyaratan kualitas pewarnaan sediaan histopatologi yang diukur secara			Tidak baik 4-6 Baik 7-8	Nominal

Kanker Payudara.	mikroskopis dengan mengamati: inti sel, sitoplasma intensitas warna, kontras pewarnaan.				
1. Inti sel	Inti sel akan terwarnai oleh hematoxilin dan akan memberikan warna biru.	Metode Skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dilakukan modifikasi.	Mikroskop dan observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal
2. sitoplasma	Sitoplasma yang akan terwarnai oleh Eosin dan memiliki warna merah muda.	Metode Skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dilakukan modifikasi.	Mikroskop dan Observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal
3. intensitas warna	Merupakan ukuran kecerahan dari suatu warna pada gambar atau objek yang diamati. Untuk membedakan komponen sel dibawah mikroskop.	Metode Skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dilakukan modifikasi.	Mikroskop dan observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal
4. Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan merupakan perbedaan warna yang jelas antara struktur jaringan yang berbeda, antara objek dan latar belakang pada gambar atau objek yang diwarnai didalam pewarnaan HE sendiri kontras pewarnaan akan sangat penting untuk membedakan antara warna biru untuk mewarnai inti dan merah mewarnai sitoplasma.	Metode Skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dilakukan modifikasi.	Mikroskop dan Observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal

E. Pengumpulan Data

1. Ada beberapa proses pengumpulan data yang dilakukan sesuai dengan cara dan prosedur berikut :
 - a) Mencari sumber pustaka yang dibutuhkan untuk memperoleh data ilmiah penelitian.

- b) Melakukan prasurevei di klinik Morotai Patologi Anatomi Bandar Lampung.
- c) Melakukan pengajuan surat izin penelitian terhadap Direktur Poltekkes Tanjungkarang. agar dapat diteruskan kepada Klinik Patologi Morotai Kota Bandar Lampung.
- d) Setelah mendapatkan surat izin dari Klinik Patologi Morotai Bandar Lampung, selanjutnya yaitu melakukan penelitian di Klinik Patologi Morotai Kota Bandar Lampung.

2. Pembuatan ekstrak daun jati

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, gelas beaker, gelas ukur, tube, kaca objek, pipet tetes, label, gunting, rotary vacuum evaporator, waterbath, oven, blender, saringan, botol reagen gelap, Rak pengecatan, pinset, spuit, deck glass, preparat, mikrotom, blade, dan cassette embedding.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol, aquades, ekstrak daun jati (*Tectona grandis*). Alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, parafin, alkohol absolut, aquadest, xylol, hematoxylin, eosin, entelan dan spesimen jaringan histologi kanker payudara.

c. Prosedur Kerja

- 1) Daun jati muda paling merah bagian pucuk digunting menjadi ukuran kecil-kecil.
- 2) Dicuci bersih.
- 3) Dikeringkan didalam oven dengan suhu 40°C selama 18 jam.
- 4) Di haluskan didalam blender sehingga menjadi simplisia.
- 5) Ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan kedalam toples kaca.
- 6) Ditambahkan 5 liter pelarut etanol 96% kemudian homogenkan.
- 7) Direndam selama 24 jam.
- 8) Setelah 24 jam dilanjutkan ke alat evaporator hingga pelarut menguap dan ekstrak menjadi kental.
- 9) Dilakukan pembuatan ekstrak daun jati dengan konsentrasi 100%

- 10) Dilakukan pengenceran ekstrak daun jati dengan konsentrasi 25%
Rumus ($V_1.M_1 = V_2.M_2$).

Untuk menghitung volume pelarut yang dibutuhkan menggunakan rumus pengenceran:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Dimana:

- V_1 = Volume larutan awal (mL)
- M_1 = Konsentrasi larutan awal (%)
- V_2 = Volume larutan akhir (mL)
- M_2 = Konsentrasi larutan akhir (%)

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100\% = 100 \times 25\%$$

$$V_1 = 100 \times 25 / 100$$

$$V_1 = 25 \text{ mL}$$

Setelah mengambil volume ekstrak 25 mL tambahkan pelarut sampai volume 100 mL.

3. Penyimpanan ekstrak daun jati

- a. Dimasukkan ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) konsentrasi 25% kedalam botol gelap.
- b. Ditempelkan label tanggal pada wadah penyimpanan ekstrak daun jati.
- c. Dicatat awal penyimpanan ekstrak daun jati dan tanggal akhir penyimpanan.
- d. Ekstrak disimpan pada suhu rendah 10°C direfrigerator.

4. Metode pemeriksaan

- a. Prosedur kerja pematangan jaringan
 - 1) Difiksasi sediaan dengan menggunakan Formalin buffer 10% selama 48 jam.
 - 2) Dilakukan Dehidrasi pada sediaan menggunakan alkohol 70% 80% dan 96% masing masing 15 menit.
 - 3) Selanjutnya menggunakan Alkohol Absolute/Etanol selama 30 menit.
 - 4) Dilakukan proses clearing menggunakan Xylol I,II, dan III masing masing selama 15 menit.

- 5) Dilakukan Impregnating menggunakan Parafin I dan II selama 1 menit.
- b. Tahap pewarnaan hematoxilin eosin
- 1) Dilakukan Defaranisasi pada sediaan menggunakan Xylol 1 dan 2 masing masing selama 5 menit.
 - 2) Dilakukan Dehidrasi pada sediaan menggunakan alkohol absolut selama 1 menit, dan menggunakan alkohol 96% alkohol 70% dan aquadest masing masing selama 2 menit.
 - 3) Dilakukan pewarnaan inti pada sediaan menggunakan Hematoxilin selama 7-10 menit.
 - 4) Dilakukan pencucian sediaan menggunakan air mengalir selama 1 menit.
 - 5) Dilakukan pewarnaan Sitoplasma pada sediaan menggunakan eosin selama 1-2 menit.
 - 6) Dilakukan Dehidrasi pada sediaan menggunakan alkohol 70% Alkohol 96% dan Alkohol absolut masing masing selama 2 menit.
 - 7) Dilakukan clearing (Penjernihan) pada sediaan menggunakan Xylol 1 dan Xylol 2 masing masing selama 1 menit.
 - 8) Tahap terakhir dilakukan Mounting pada sediaan menggunakan Entelan (Prosedur Tetap Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung).
- c. Pewarnaan Sitoplasma menggunakan ekstrak Daun Jati
- 1) Dilakukan Deparafinisasi pada sediaan menggunakan Xylol 1 dan 2 masing masing selama 5 menit.
 - 2) Dilakukan Dehidrasi pada sediaan menggunakan alkohol absolut selama 1 menit, dan menggunakan alkohol 96% alkohol 70% dan aquadest masing masing selama 2 menit.
 - 3) Dilakukan pewarnaan Inti pada sediaan menggunakan Hematoxilin selama 7-10 menit.
 - 4) Dilakukan pencucian sediaan menggunakan air mengalir selama 1 menit.

- 5) Dilakukan pewarnaan Hematoxilin pada sediaan menggunakan ekstrak daun jati dengan konsentrasi 25% masing-masing selama 1-2 menit yang sudah disimpan selama 7 hari dan 14 hari disimpan dalam botol gelap dan suhu penyimpanan yang rendah yaitu 10°C .
- 6) Dilakukan Dehidrasi pada sediaan menggunakan Alkohol 70% Alkohol 96% dan Alkohol absolut masing masing selama 2 menit.
- 7) Dilakukan clearing (Penjernihan) pada sediaan menggunakan Xylol 1 dan Xylol 2 masing masing selama 1 menit.
- 8) Tahap terakhir dilakukan Mounting pada sediaan menggunakan Entelan. (Prosedur Tetap Klinik Morotai Patologi Kota Bandar Lampung).

5. Interpretasi Hasil

Hasil pewarnaan preparat histopatologi kanker payudara nantinya akan dinilai oleh dokter spesialis patologi anatomi berdasarkan dengan penilai skoring.

Tabel 3.2 Kriteria skoring penilaian kualitas pewarnaan

No.	Struktur	Deskripsi	Skala nominal
1	Inti sel	Inti sel tidak jelas	1
		Sel Jelas	2
2	Sitoplasma	Sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas	1
		Sitoplasma dan jaringan ikat jelas	2
3	Intensitas pewarnaan	Intensitas ringan menyerap warna kurang	1
		Intensitas kuat menyerap warna baik	2
4	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik kontras	1
		pewarnaan baik	2

Sumber : (Sravya, 2018)dari modifikasi BPMPPi

Tabel 3.3 skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxilin Eosin

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

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

F. Pengolahan Data dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

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

1. *Coding* yaitu pemberian kode pada setiap sediaan preparat jaringan kanker payudara sebagai identitas sampel agar tidak tertukar pada saat pembacaan oleh dokter Sp.PA serta untuk memudahkan pengentrian data Ketika dimasukkan ke komputer (data entry).
2. *Entry Data* yaitu memasukkan data-data penilaian kualitas sediaan preparat jaringan kanker payudara yang telah dinilai oleh ahli patologi dan sudah terkumpul kedalam aplikasi/program komputer, program SPSS V.25 for Windows.
3. *Tabulating* yaitu setelah data dientry, hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk distribusi frekuensi berupa tabel.
4. *Cleaning* yaitu apa bila semua data selesai dimasukkan, perlu dicek kembali untuk melihat kemungkinan adanya kesalahan kode, keidaklengkapan , dan lainnya kemudian dilakukan pembetulan aau koreksi dan membersihkan data data yang tidak diperlukan.

G. Analisa Data

Pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan zat pewarna yang digunakan dalam mewarnai sitoplasma sediaan jaringan kanker payudara. 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, 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 ini dilaksanakan setelah mendapatkan laik etik dari komisi etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang, dengan No.329/KEPK-TJK/V/2025, tanggal 14 Mei 2025. Proses penelitian tidak menimbulkan dampak berbahaya bagi lingkungan, dan limbah yang dihasilkan akan dikumpulkan serta dimusnahkan sesuai prosedur pengelolaan limbah. Identitas subjek penelitian

dijaga kerahasiaannya, dan seluruh biaya penelitian ditanggung sepenuhnya oleh peneliti.