

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true eksperiment* dengan *post test only control group design* yang bertujuan untuk membandingkan hasil pewarnaan Hematoxylin Eosin pada spesimen histologi yang menggunakan eosin sebagai kontrol dan ekstrak kuncup daun jati sebagai alternatif alami pengganti eosin.

### **B. Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu BIOSCIENCE UNDANA untuk ekstraksi kuncup daun jati dan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. W.Z. Johannes Kupang untuk pewarnaan Hematoxylin Eosin pada bulan Maret-April 2024.

### **C. Variabel Penelitian**

#### **1. Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak kuncup daun jati konsentrasi 20%, 30%, 40%.

#### **2. Variabel Terikat**

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu gambaran mikroskopis inti dan sitoplasma sediaan histologi menggunakan ekstrak kuncup daun jati pada proses pewarnaan Hematoxylin Eosin.

#### D. Sampel

Sampel yang digunakan berupa blok parafin sediaan histologi yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. W.Z. Johannes Kupang.

Penentuan banyaknya pengulangan pada penelitian ini digunakan rumus Federer sebagai berikut (Khansa dkk., 2019) :

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

Keterangan :

r = banyaknya pengulangan

t = jumlah kelompok perlakuan

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

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

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

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

$$2r - 2 \geq 15$$

$$2r \geq 15 + 2$$

$$r \geq 15/2$$

$$r \geq 8,5$$

$$r \geq 9$$

Hasil perhitungan menggunakan rumus Federer diatas, diperoleh banyaknya pengulangan minimal adalah 9 kali. Hasil pengulangan tersebut

kemudian dibagi menjadi 3 kelompok yakni 3 kali pengulangan pada ekstrak kuncup daun jati 20%, 3 kali pengulangan pada ekstrak kuncup daun jati 30% dan 3 kali pengulangan ekstrak kuncup daun jati 40%.

## E. Definisi Operasional

**Tabel 3.1 Definisi operasional**

| Variabel  | Definisi Operasional   | Skor  | Skala   |
|---|--|---|---------|
| Eosin   | Reagen pewarnaan yang digunakan pada preparat kontrol dengan konsentrasi 1%  |   |         |
| Ekstrak kuncup daun jati                                | Ekstraksi kuncup daun jati dalam etanol 96% dengan konsentrasi 20%, 30%, dan 40%   |   |         |
| Hasil mikroskopis sediaan histologi dengan pewarnaan HE | Hasil pengamatan secara mikroskopis menggunakan mikroskop terhadap sediaan histologi yang diwarnai dengan ekstrak kuncup daun jati | Skor 1 (tidak baik) jika inti dan sitoplasma terwarnai dengan tidak sempurna, warna tidak jelas serta tidak dapat dibedakan dan tidak dapat diidentifikasi<br><br>Skor 2 (kurang baik) jika inti dan sitoplasma terwarnai sebagian, warna kurang jelas namun masih dapat dibedakan dan diidentifikasi<br><br>Skor 3 (baik) jika inti dan sitoplasma terwarnai dengan sempurna, warna jelas serta dapat dibedakan dan dapat diidentifikasi | Ordinal |

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Pengurusan surat izin dan kode etik

## **2. Pembuatan ekstrak daun jati**

### a. Alat

Gunting, blender, saringan, timbangan analitik, botol kaca, *aluminium foil*, gelas ukur, gelas kimia, kertas saring, *rotary vacuum evaporator*.

### b. Bahan

Kuncup daun jati, asam sitrat 10%, aquades

### c. Prosedur Kerja

Prosedur pembuatan ekstrak kuncup daun jati menggunakan metode SURIANTI, dkk. (2019) yang dimodifikasi. Daun jati dicuci dan digunting menjadi kecil-kecil, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam selama 1 minggu. Setelah itu daun jati dihaluskan dengan blender. Sebanyak 200 gram serbuk kuncup daun jati lalu dimaserasi selama 3 x 24 jam dengan menggunakan 1,2 Liter pelarut campuran aquades : asam sitrat 10% (5:1) lalu disaring dengan corong buchner. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu <math><60^{\circ}\text{C}</math> hingga pelarut menguap dan ekstrak menjadi kental. Selanjutnya dibuat ekstrak kuncup daun jati 20%, 30%, dan 40% menggunakan etanol 96%.

## **3. Pemilihan blok parafin**

Blok parafin yang digunakan dalam penelitian ini adalah blok parafin jaringan histologi dari koleksi Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. W. Z. Johannes Kupang.

#### 4. Pemotongan blok parafin

##### a. Alat

Mikrotom, kuas, *objek glass*, *waterbath*, dan *hotplate*.

##### b. Bahan

Blok parafin jaringan *Ca mammae*

##### c. Prosedur Kerja

Pemotongan blok parafin menggunakan alat khusus yang disebut mikrotom. Mikrotom adalah alat yang dilengkapi pisau tajam yang dapat memotong blok parafin dengan ketebalan dan ukuran yang dapat diatur sesuai keinginan. Cara memotong blok parafin menggunakan mikrotom yaitu :

1. Pisau yang dipakai dipastikan harus tajam dan bersih lalu sudut kemiringan pisau mikrotom diatur berkisar pada 35°.
2. Blok parafin yang berisi jaringan diletakkan pada dudukkan mikrotom dan pastikan dikunci dengan kuat.
3. Ketebalan yang diinginkan diatur. Ketebalan yang dipakai pada pemotongan kasar yaitu 15-30  $\mu\text{m}$ .
4. Tuas digerakkan hingga blok parafin terpotong dengan ketebalan yang telah diatur, lalu pita-pita parafin tanpa jaringan dibuang dengan menggunakan kuas sampai mendapatkan potongan yang mengandung preparat jaringan.

5. Kemudian dilanjutkan dengan pemotongan halus menggunakan ketebalan 3-4  $\mu\text{m}$ . Tuas pemotong diputar hingga didapatkan pita parafin yang mengandung jaringan.
6. Pita jaringan diangkat dengan kuas dan dipindahkan ke *waterbath* dengan suhu 37°C dan didiamkan beberapa saat sampai pita parafin mengembang dan tidak terlipat.
7. Setelah pita parafin mengembang dengan baik, *objek glass* dimasukkan kedalam *waterbath* dan angkat pita parafin perlahan dengan *objek glass* sampai semua bagian pita parafin melekat pada *objek glass*.
8. *Objek glass* yang berisi pita parafin diletakkan diatas *hotplate* dengan suhu 40-45°C, lalu diamkan beberapa saat dan dilanjutkan ke tahap pewarnaan.

## 5. Pewarnaan

Pewarnaan Hematoxylin Eosin menggunakan eosin dan ekstrak kuncup daun jati dengan konsentrasi 20%, 30%, dan 40%. Pewarnaan dilakukan secara manual dengan menempatkan reagen pada botol-botol kaca kecil kemudian sediaan dimasukkan kedalam botol dan didiamkan sesuai waktu pada masing-masing tahap pewarnaan. Prosedur pewarnaan disajikan dalam tabel berikut :

**Tabel 3.2 Pewarnaan HE.**

| No. | Nama tahapan    | Nama reagen  | Waktu    |
|-----|-----------------|--|----------|
| 1.  | Deparafinasi    | Xylol I  | 2 menit  |
|     |                 | Xylol II   | 2 menit  |
|     |                 | Xylol III  | 2 menit  |
| 2.  | Rehidrasi       | Alkohol 100 %  | 2 menit  |
|     |                 | Alkohol 100 %  | 2 menit  |
|     |                 | Alkohol 95 %   | 2 menit  |
| 3.  | <i>Clearing</i> | Aquades  | 5 menit  |
| 4.  | Pewarnaan 1     | Hematoxylin  | 16 menit |
| 5.  | <i>Clearing</i> | Aquades  | 5 menit  |
| 6.  | Bluing          | Bluing   | 1 menit  |
| 7.  | <i>Clearing</i> | Aquades  | 2 menit  |
| 8.  | Dehidrasi       | Alkohol 95 %   | 1 menit  |
| 9.  | Pewarnaan 2     | • Eosin (sebagai kontrol)  | 40 detik |
|     |                 | • Ekstrak kuncup daun jati sebagai larutan uji dengan etanol 96% sebagai pengencer |          |
|     |                 | -Konsentrasi 20%   | 15 menit |
|     |                 | -Konsentrasi 30%   | 15 menit |
|     |                 | -Konsentrasi 40%   | 15 menit |
| 10. | Dehidrasi       | Alkohol 100 %  | 1 menit  |
|     |                 | Alkohol 100 %  | 1 menit  |
|     |                 | Alkohol 100 %  | 1 menit  |
|     |                 | Alkohol 100 %  | 1 menit  |
| 11. | Penjernihan     | Xylol I  | 1 menit  |
|     |                 | Xylol II   | 1 menit  |
|     |                 | Xylol III  | 1 menit  |

Sumber : SOP Pewarnaan HE RSUD Prof. W. Z. Johannes Kupang

## 6. Mounting

Setelah proses pewarnaan, sediaan ditetes dengan entelan lalu ditutup dengan *deck glass* lalu dikeringkan.

## 7. Pembacaan sediaan

Pembacaan dilakukan secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop digital Camera-Olympus CX41. Diamati gambaran mikroskopis

inti sel dan sitoplasma sediaan histologi yang telah diwarnai dengan perbesaran 400x pada 10 lapang pandang di tiap-tiap preparat.

### **G. Analisis Hasil**

Data pada penelitian ini dianalisis secara deskriptif dengan memberikan penilaian skor 1, skor 2, dan skor 3 pada sediaan histologi pewarnaan HE dan ditampilkan dalam bentuk tabel distribusi frekuensi. Selanjutnya dilakukan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat ada tidaknya perbedaan bermakna hasil mikroskopis pewarnaan HE antar kontrol dengan kelompok perlakuan.