

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif dengan jenis penelitian eksperimen sungguhan (*true eksperimen*) dengan membandingkan hasil pewarnaan HE sediaan histologi menggunakan xylol sebagai kontrol dan dengan menggunakan air perasan jeruk nipis murni sebagai perlakuan pada tahap deparafinisasi untuk mengetahui apakah air perasan jeruk nipis murni dapat dijadikan sebagai alternatif larutan pengganti xylol pada pewarnaan HE sediaan histologi.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Sampel jaringan uterus diambil dan diperiksa di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. Dr, W.Z. Yohanes Kupang.

2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei tahun 2025

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah bahan yang berpotensi sebagai pengganti xylol untuk deparafinisasi pada pewarnaan hematoksilin eosin yaitu air perasan jeruk nipis.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil pemeriksaan mikroskopis jaringan, dengan parameter pengamatan inti sel dan sitoplasma.

D. Populasi

Jaringan Uterus bagian mioma diambil di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. Dr, W.Z. Yohanes Kupang.

E. Sampel dan Teknik Sampling

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah blok parafin yang didalamnya adalah jaringan uterus bagian mioma sisa pemeriksaan pasien yang sudah didiagnosis. Sampel diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. Dr. W.Z. Johannes Kupang.

F. Defenisi Operasional

Tabel 3.1 Defenisi Operasional

Variabel	Defenisi Operasional	Skor Pengukuran	Skala Data
Xilol	Reagen yang digunakan pada proses deparafinisasi sebagai control		
Air jeruk nipis	Larutan yang digunakan dalam proses deparafinisasi yang berpotensi sebagai pengganti xilol yaitu: Air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 100% .		
Hasil pengamatan mikroskopis Jaringan.	Hasil pengamatan secara mikroskopis pada preparat histologi dalam pewarnaan hematoxilin eosin dengan melihat inti sel dan sitoplasma pada preparat.	(Skor 1) tidak baik (Skor 2) kurang baik (Skor 3) baik	Ordinal

G. Prosedur Penelitian

1. Pengajuan kode etik penelitian
2. Pengajuan surat ijin penelitian
3. Prosedure kerja
 - a. Alat

Mikrotom, hot plate, waterbath, mikroskop, blok parafin, gelas kimia, gelas ukur, objek glass, deck glass, kuas stopwatch.

b. Bahan

Air perasanjeruknipis, hematoksilin, eosin, aquades, xilol, alkohol, bluing, jaringan, dan entelan.

c. Prosedure kerja

1) Pemilihan blok parafin

Blok parafin yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan uterus dalam bentuk blok parafin yang telah disimpan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. DR. W. Z. Johannes Kupang.

2) Pemotongan

Pemotongan blok parafin dilakukan menggunakan pisau khusus yang biasanya disebut dengan mikrotom. Mikrotom adalah alat yang dilengkapi pisau yang tajam dan dapat mengiris potongan blok parafin dengan ketebalan dan ukuran yang diinginkan. Berikut adalah cara pemotongan blok parafin dengan mikrotom:

- a) Pisau yang dipakai harus tajam dan bersih serta diatur sudut kemiringan pisau mikrotom yang berkisar pada 35°.
- b) Blok parafin yang berisi jaringan diletakkan pada dudukan mikrotom dan pastikan dikunci dengan kuat.
- c) Atur ketebalan yang dipakai pada pemotongan kasar yaitu 15-30 μm .

- d) Gerakan tuas pemotong hingga blok parafin terpotong dengan ketebalan yang telah diatur, buang pita-pita parafin tanpa jaringan dengan menggunakan kuas sampai mendapatkan potongan yang mengandung preparat jaringan.
- e) Dilanjutkan pemotongan halus dengan ketebalan 3-4 μm , lalu putar tuas pemotong hingga didapatkan pita parafin yang mengandung jaringan.
- f) Angkat pita jaringan dengan kuas dan pindahkan ke waterbath dengan suhu 37°C dan diamkan beberapa saat sampai pita parafin mengembang dan tidak terlipat.
- g) Setelah pita parafin mengembang dengan baik, masukan objek gelas kedalam waterbath dan angkat pita parafin perlahan dengan objek gelas sampai semua bagian pita parafin melekat pada objek gelas.
- h) Letakkan objek gelas yang berisi pita parafin diatas hotplate dengan suhu 40°C-45°C, lalu diamkan beberapa saat dan lanjutkan ke tahap pewarnaan.

3) Pewarnaan

Tahapan pewarnaan HE dijabarkan dalam bentuk tabel sebagai berikut (Tanesib, 2022).

Tabel 3.2 Pewarnaan Hematoksilin Eosin Menggunakan Xilol

No	Tahapan	Nama Reagen	Waktu
1.	Deparafinisasi	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.	Pencucian	Aquades	5 menit
4.	Pewarnaan 1	Hematoksilin	16 menit
5.	Pencucian	Aquades	5 menit
6.	Bluing	Bluing	1 menit
7.	Pencucian	Aquades	2 menit
8.	Dehidrasi	Alkohol 95%	1 menit
9.	Pewarnaan 2	Eosin	40detik
10.	Dehidrasi	Alkohol 100%	1 menit
		Alkohol 100%	1 menit
		Alkohol 100%	1 menit
		Alkohol 100%	1 menit
11.	Clearing	Xylol I	1 menit
		XylolIII	1 menit
		Xylol III	1 menit

Tabel 3.3 Pewarnaan Hematoksilin Eosin Menggunakan Air JerukNipisMurni

No	Tahapan	Nama Reagen	Waktu
1.	Deparafinisasi	Jeruk Nipis 100%	2 menit
		Jeruk Nipis 100%	2 menit
		Jeruk Nipis 100%	2 menit
2.	Rehidrasi	Alkohol 100%	2 menit
		Alkohol 100%	2 menit
		Alkohol 95%	2 menit
3.	Pencucian	Aquades	5 menit
4.	Pewarnaan 1	Hematoksilin	16 menit
5.	Pencucian	Aquades	5 menit
6.	Bluing	Bluing	1 menit
7.	Pencucian	Aquades	2 menit
8.	Dehidrasi	Alkohol 95%	1 menit
9.	Pewarnaan 2	Eosin	40 detik
10.	Dehidrasi	Alkohol 100%	1 menit
		Alkohol 100%	1 menit
		Alkohol 100%	1 menit
		Alkohol 100%	1 menit
11.	Clearing	Xylol I	1 menit
		Xylol II	1 menit
		Xylol III	1 menit

4) Mounting

Mounting adalah proses perekatan jaringan pada kaca penutup dengan menggunakan bahan perekat (adhesive). Entelan adalah bahan perekat yang digunakan sebagai mounting.

5) Pembacaan hasil

Pembacaan hasil dilakukan dengan pengamatan secara mikroskopis menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400X setiap 10 lapang pandang pada setiap preparat. Hasil pengamatan divalidasi oleh dokter spesialis patologi anatomi.

H. Analisis Hasil

Data pada penelitian ini dianalisis dengan memberikan penilaian skor sebagai berikut; 1 (tidak baik) warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah pada sitoplasma dan sediaan tidak seragam, skor 2 (kurang baik) warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah pada sitoplasma tidak jelas dan warna preparat seragam, skor 3 (baik) warna biru pada inti sel terlihat sangat jelas, warna merah pada sitoplasma dan warna preparat seragam. Hasil analisis histology dengan pewarnaan HE disajikan dalam bentuk tabel yang menunjukkan distribusi frekuensi untuk setiap perlakuan beserta hasil skor penilaian mikroskopis.