

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimen sungguhan (*true eksperimen*) dengan desain *post-test only control grup design* yang bertujuan untuk membandingkan hasil gambaran pewarnaan Hematoksilin Eosin pada sediaan histologi yang menggunakan eosin sebagai kontrol dan ekstrak kuncup daun jati sebagai alternatif alami pengganti eosin.

B. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di laboratorium Farmakonosi prodi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang untuk pembuatan ekstrak kuncup daun jati dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUD SK Lerik Kupang untuk melakukan pewarnaan Hematoksilin Eosin pada bulan April – Mei 2025.

C. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kuncup daun jati dengan konsentrasi 40%, 35%, dan 30% serta dengan waktu pewarnaan Hematoksilin Eosin selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit.

2. Variabel terikat

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

D. Sampel

Sampel ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuncup daun jati yang diambil sekitar daerah Kelurahan Oeleta, Kecamatan Alak, Kota Kupang. Ekstrak ini terdapat pada bagian paling atas memiliki bentuk yang bulat dengan ujung meruncing dan menempel pada batang secara berpasangan.

Sampel jaringan yang digunakan berupa blok parafin sediaan histologi (*Carcinoma Mammae*) yang terdapat pada Laboratorium Patologi Anatomi RSUD SK Lerik Kota Kupang. Penentuan banyaknya pengulangan pada penelitian ini digunakan rumus Feederer sebagai berikut (Khansa, 2019):

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

Keterangan :

r = banyak pengulangan

t = jumlah kelompok perlakuan

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

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

$$(r - 1)(9 - 1) \geq 15$$

$$(r - 1)(8) \geq 15$$

$$8r - 8 \geq 15$$

$$8r \geq 15 + 8$$

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 23/8$$

$$r \geq 2,8$$

$$r \geq 3$$

Hasil perhitungan menggunakan rumus Federer diatas, diperoleh banyaknya pengulangan minimal adalah 3 kali.

E. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skor Pengukuran	Skala
Eosin	Zat pewarna sintetis yang digunakan dalam pewarnaan Hematoksilin Eosin pada sediaan kontrol.		
Ekstrak kuncup daun jati	Pewarna alami yang diperoleh dari hasil ekstraksi kuncup daun jati (<i>Tectona grandis</i>) menggunakan pelarut etanol 96% kemudian diuapkan hingga menjadi ekstrak kental, yang dilarutkan dengan aquades dengan konsentrasi ekstrak kuncup daun jati 30%, 35% dan 40% (10 menit, 15 menit, dan 20 menit).		
Hasil mikroskopis sediaan sitologi dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin	Hasil pengamatan secara mikroskopis menggunakan mikroskop terhadap sediaan histologi yang diwarnai dengan ekstrak kuncup daun jati.	Skor 1 (tidak baik) jika inti sel dan sitoplasma tidak terwarnai dengan jelas sehingga tidak dapat dibedakan antara inti sel dan sitoplasma Skor 2 (kurang baik) jika inti sel dan sitoplasma terwarnai kurang jelas namun masih dapat dibedakan antara inti sel dan sitoplasma Skor 3 (baik) jika inti sel dan sitoplasma terwarnai dengan jelas sehingga dapat dibedakan antara inti sel dan sitoplasma	Ordinal

F. Prosedur Penelitian

1. Mengurus surat izin dan kode etik

2. Pembuatan ekstrak daun jati

a. Alat

Gelas kimia, gelas ukur, toples kaca, neraca analitik, rotary vacuum evaporator, waterbath, oven, guting, blender, saringan.

b. Bahan

Etanol, aquades, serbuk kuncup daun jati, dan ekstrak daun jati.

c. Prosedur Kerja

Prosedur pembuatan ekstrak kuncup daun jati menggunakan metode maserasi dengan modifikasi.

- 1) Kuncup daun jati dicuci dan digunting menjadi kecil – kecil.
- 2) Kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari dengan di tutup kain hitam selama 1 minggu.
- 3) Setelah itu kuncup daun jati diblender hingga halus, serbuk kuncup daun jati ditimbang sebanyak 250 gram.
- 4) Dimasukan ke dalam toples kaca, ditambahkan 2,5 liter pelarut etanol 96%, kemudian dihomogenkan.
- 5) Perendaman dilakukan selama 24 jam, dilanjutkan ke alat evaporator dengan suhu < 60 hingga pelarut menguap dan ekstrak menjadi kental.
- 6) Selanjutnya membuat ekstrak daun jati 40%, 35%, dan 30% menggunakan aquades.

3. Pemilihan blok parafin

Blok parafin yang digunakan dalam penelitian ini adalah blok parafin jaringan *Ca Mammae* dari Laboratorium Patologi Anatomi RSUD S.K. Lerik Kota Kupang.

4. Pemotongan blok parafin

Untuk membuat suatu sediaan histologi, jaringan diambil terlebih dahulu dari sumbernya kemudian siap untuk diproses. Ada beberapa rangkaian proses dalam pembuatan sediaan histologi diantaranya adalah fiksasi, dehidrasi, penjernihan, impegnasi, blocking, pemotongan block, floating dan pewarnaan.

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. 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 dudukan mikrotom dan pastikan dikunci dengan kuat.

- 3) Ketebalan yang diinginkan diatur. Ketebalan yang dipakai pada pemotongan kasar yaitu 15-30 μm .
- 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 μm . 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 Hematoksilin Eosin

Pewarnaan dilakukan secara manual dengan menempatkan reagen pada botol-botol kaca kecil kemudian sediaan dimasukkan kedalam botol dan di diamkan sesuai waktu pada masing-masing tahap pewarnaan. Prosedur pewarnaan disajikan dalam tabel berikut :

Tabel 3.2 Tahapan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

No.	Nama Reagen	Waktu
1.	Xylol I	5 menit
2.	Xylol II	5 menit
3.	Xylol III	5 menit
4.	Alkohol 96%	1 menit
5.	Alkohol 96%	1 menit
6.	Alkohol 80%	1 menit
7.	Alkohol 70%	1 menit
8.	Running Water	10 menit
9.	Haematoxylin	15 menit
10.	Running Water	10 menit
11.	Alcoholic Eosin	1 menit
12.	Ekstrak kuncup daun jati sebagai larutan uji dengan aquades sebagai pengencer	
	• Konsentrasi 40%	10 menit 15 menit 20 menit
	• Konsentraasi 35%	10 menit 15 menit 20 menit
	• Konsentrasi 30%	10 menit 15 menit 20 menit
13.	Alkohol 80%	1 menit
14.	Alkohol 90%	1 menit
15.	Alkohol 96%	1 menit
16.	Alkohol 96%	1 menit
17.	Alkohol 96%	1 menit
18.	Xylol I	5 menit
19.	Xylol II	5 menit
20.	Xylol III	5 menit

Sumber : SOP Pewarnaan Hematoksilin Eosin RSUD S.K. Kota Kupang

6. Mounting

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

7. Pembacaan sediaan

Pembacaan hasil dilakukan dengan pengamatan 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 tiap-tiap preparat.

G. Analisis Hasil

Data pada penelitian ini dianalisis secara deskriptif dengan memberikan penilaian skor 1 (tidak baik), skor 2 (kurang baik), dan skor 3 (baik) 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 pada kelompok perlakuan dan kontrol.