

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

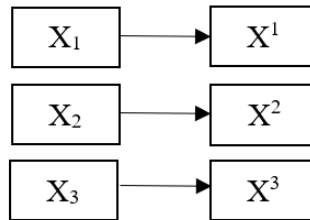
1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Pada penelitian deskriptif, objek atau subjek penelitian digambarkan sesuai dengan keadaan sebenarnya. Penelitian ini mempelajari situasi tertentu, proses yang sedang berlangsung serta pengaruh dari suatu fenomena (Muhajirin dkk., 2024). Pada penelitian ini dilakukan pengamatan secara mikroskopis terhadap pewarnaan hematoksilin eosin pada jaringan kanker payudara yang melalui proses deparafinisasi menggunakan minyak kelapa murni sebagai alternatif xylol.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian *cross sectional*. Desain penelitian *cross sectional* menganalisis hubungan antara variabel bebas dan terikat yang dilakukan pada satu waktu pengamatan yang sama (Capili, 2021). Pada penelitian ini yang berperan sebagai variabel bebas adalah minyak kelapa murni, xylol, suhu dan waktu deparafinisasi. Variabel terikat adalah pewarnaan hematoksilin eosin pada jaringan kanker payudara. Data mengenai kedua variabel ini diamati secara bersamaan untuk mengetahui pewarnaan hematoksilin eosin pada jaringan kanker payudara yang telah

melalui proses deparafinisasi menggunakan minyak kelapa murni dibandingkan dengan xylol sebagai agen deparafinisasi standar.

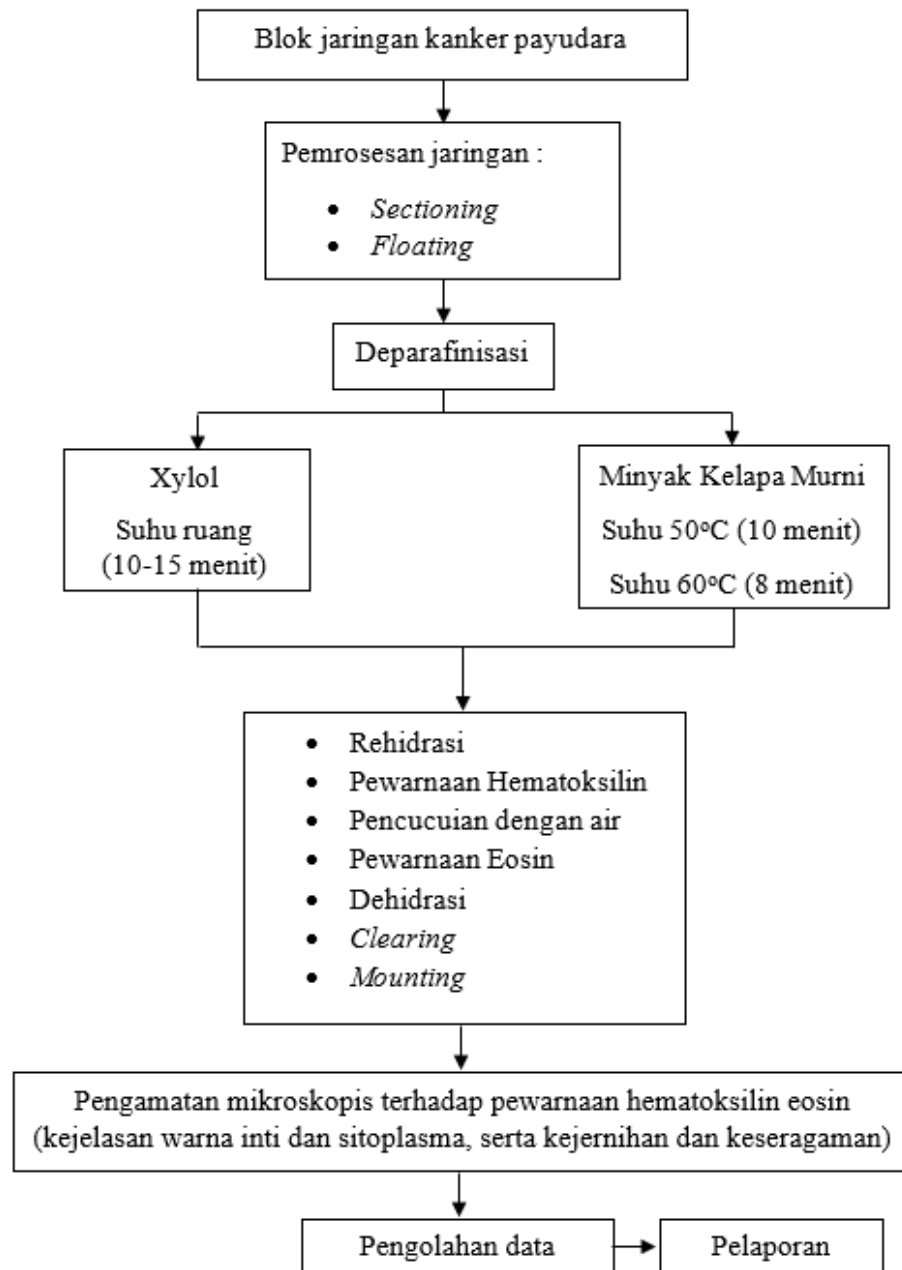


Gambar 1. Desain Penelitian Cross-Sectional

Keterangan :

- X₁ : Deparafinisasi dengan *xylol*
- X¹ : Skor pewarnaan hematoksin eosin jaringan kanker payudara
- X₂ : Deparafinisasi dengan minyak kelapa murni pada suhu 50°C selama 10 menit
- X² : Skor pewarnaan hematoksin eosin jaringan kanker payudara
- X₃ : Deparafinisasi dengan minyak kelapa murni pada suhu 60°C selama 8 menit
- X³ : Skor pewarnaan hematoksin eosin jaringan kanker payudara

B. Rancangan Penelitian



Gambar 2. Rancangan Penelitian

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah blok jaringan kanker payudara pada tahun 2024-2025 yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Aisyiyah Ponorogo berdasarkan kriteria berikut :

a. Kriteria inklusi

- 1) Blok parafin merupakan arsip yang masih tersimpan dengan baik, lengkap data identitasnya di Laboratorium Patologi Anatomi RSU Aisyiyah Ponorogo
- 2) Blok parafin berasal dari kasus dengan diagnosis histopatologis dan sudah dikonfirmasi oleh dokter patologi anatomi
- 3) Blok parafin jaringan kanker payudara yang telah difiksasi dengan Neutral Buffer formalin 10%
- 4) Blok parafin dalam kondisi baik, tidak retak, tidak rusak, dan dapat dipotong dengan mikrotom.

b. Kriteria eksklusi

- 1) Blok parafin jaringan kanker payudara yang telah rusak
- 2) Blok parafin yang tidak lengkap data identitas dan diagnosis histopatologisnya
- 3) Blok parafin yang setelah dipotong tidak menunjukkan jaringan yang representatif untuk penilaian pewarnaan hematoxylin eosin.

Penelitian ini menggunakan blok jaringan kanker payudara yang akan diproses menjadi lima preparat untuk setiap kelompok uji. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali pada pembacaan 5 lapang pandang pada tiap preparat.

2. Objek Penelitian

Objek pada penelitian ini adalah pewarnaan hematoksilin eosin pada jaringan kanker payudara yang telah melalui proses deparafinisasi menggunakan minyak kelapa murni dengan pemanasan 50°C selama 10 menit dan 60°C selama 8 menit kemudian dibandingkan dengan xylol sebagai agen deparafinisasi standar. Pewarnaan pada preparat dinilai berdasarkan kejelasan warna pada inti sel, sitoplasma, kejernihan serta keseragaman pewarnaan.

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 19 Oktober 2025 – 2 Januari 2026.

2. Tempat Penelitian

- a) Laboratorium Kimia Dasar Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Matematika dan IPA Universitas Negeri Yogyakarta untuk menguji viskositas minyak kelapa murni pada suhu 50°C dan 60°C.
- b) Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Aisyiyah Ponorogo untuk tahap pemrosesan jaringan, pewarnaan hingga pengamatan mikroskopis preparat.

E. Variabel Penelitian atau aspek-aspek yang diamati/diteliti

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah xylol sebagai agen deparafinisasi standar dan minyak kelapa murni sebagai agen deparafinisasi alternatif dengan pemanasan 50°C selama 10 menit dan 60°C selama 8 menit.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pewarnaan hematoksilin eosin pada jaringan payudara dengan parameter kejelasan warna inti, sitoplasma, kejernihan serta keseragaman pewarnaan.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

a. Xylol

Xylol sebagai agen deparafinisasi standar yang digunakan dalam penelitian ini adalah xylol dengan merk Brataco yang biasa digunakan untuk pengujian di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Aisyiyah Ponorogo.

b. Minyak kelapa murni

Minyak kelapa murni sebagai agen deparafinisasi alternatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk *Coconut Carrier Oil* yang diproduksi oleh PT. Syailendra Bumi Investam menggunakan kelapa *Cocos nucifera Linneaus*, bersifat nonpolar,

dan memiliki viskositas 67,8 mP.S pada suhu 50°C dan 57,8 mP.S pada suhu 60°C.

c. Suhu

Suhu yang digunakan pada tahap deparafinisasi dalam penelitian ini adalah 50°C dan 60°C. Suhu pemanasan berfungsi untuk menurunkan viskositas agen deparafinisasi alternatif. Pemilihan kedua suhu tersebut didasarkan pada titik leleh parafin. Jenis parafin yang digunakan ialah Parafin Wax Pro Histo, yang memiliki rentang titik leleh antara 58,8°C hingga 60°C.

d. Waktu

Penelitian ini menggunakan waktu 10 menit dan 8 menit, dihitung setelah suhu stabil mencapai 50°C dan 60°C. Waktu 10 menit digunakan pada suhu pemanasan 50°C dan waktu 8 menit digunakan pada suhu pemanasan 60°C.

2. Variabel Terikat

Pewarnaan hematoksilin eosin pada jaringan kanker payudara yang dinilai menggunakan parameter penilaian (Ariyadi & Suryono, 2017) dengan skala 1-3 menggunakan metode skoring berdasarkan indikator penilaian kejelasan warna inti, sitoplasma, dan keseragaman serta kejernihan pewarnaan. Penilaian dilakukan oleh Dokter Spesialis Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Aisyiyah Ponorogo.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Pengumpulan

Jenis pengumpulan data pada penelitian ini adalah data primer, yaitu data yang dikumpulkan langsung di lapangan oleh peneliti.

2. Teknik Pengumpulan

Teknik pengumpulan data yang digunakan untuk penelitian ini adalah penilaian pewarnaan hematoksin eosin pada jaringan kanker payudara yang telah melalui proses deparafinisasi menggunakan xylol sebagai standar dan minyak kelapa murni sebagai alternatif. Penilaian dilakukan menggunakan skoring pada pewarnaan hematoksin eosin, meliputi parameter kejelasan warna pada inti sel dan sitoplasma, keseragaman serta kejernihan pewarnaan. Setiap preparat jaringan diamati sebanyak lima lapang pandang mikroskopik untuk memastikan hasil yang representatif (mewakili kondisi seluruh preparat). Pada setiap lapang pandang dilakukan penilaian pewarnaan hematoksin eosin sesuai dengan indikator penilaian yang telah ditentukan. Proses penilaian dilakukan oleh dokter spesialis patologi anatomi untuk menjamin validitas dan objektivitas.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Alat

a. Pemotongan blok parafin (*sectioning*)

1) Mikrotom

2) Pinset

- b. *Floating*
 - 1) *Waterbath*
 - 2) *Object glass*
 - 3) *Slide warmer/hot plate*
- c. Pewarnaan (*staining*)
 - 1) *Chamber pengecatan*
 - 2) *Pafrain dispenser*
 - 3) *Timer*
 - 4) *Thermometer*
- d. *Mounting*
 - 1) *Deck glass*
- e. Pemeriksaan histologi jaringan
 - 1) Mikroskop
- f. Pelaporan
 - 1) Alat tulis
 - 2) Alat dokumentasi

2. Bahan

- a. Pewarnaan (*staining*)
 - 1) Cat Hematoksilin
 - 2) Cat Eosin
 - 3) Alkohol
 - 4) Akuades
 - 5) Xylol

- 6) Minyak kelapa murni
- b. *Mounting*
 - 1) *Entellan biomount* Bio Optica
- c. Pemeriksaan histologi jaringan
 - 1) Slide jaringan yang telah diwarnai dan *dimounting*
- d. Pelaporan
 - 1) Lembar kriteria penilaian

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Uji validitas merupakan penilaian untuk menentukan apakah suatu instrumen penelitian mampu menghasilkan pengukuran yang benar (valid). Dengan kata lain, kemampuan alat ukur tersebut dalam menilai apa yang seharusnya diukur, serta memastikan ketepatan pengukuran sesuai yang diteliti (Maulana, 2022). Pada penelitian ini dilakukan validitas dengan mengevaluasi apakah prosedur pewarnaan serta penggunaan minyak kelapa murni sesuai terhadap standar yang relevan dengan penelitian ini. Penilaian terhadap alat ukur ini dilakukan oleh ahli di bidang patologi anatomi untuk memastikan alat ukur dengan topik penelitian.

Uji reliabilitas merupakan metode yang digunakan untuk menilai konsistensi dan kestabilan hasil yang diberikan suatu instrumen penelitian ketika diuji berulang kali (Azizah & Chalimatusadiah, 2025). Dalam penelitian ini, instrumen yang digunakan adalah hasil pewarnaan pada preparat jaringan kanker payudara dengan penilaian pewarnaan. Pada

penelitian ini dilakukan pengulangan pemeriksaan pewarnaan pada tiga kelompok.

J. Prosedur Penelitian

1. Uji Pendahuluan

- a. Menyerahkan minyak kelapa murni ke Laboratorium Kimia Dasar Pendidikan Kimia Universitas Negeri Yogyakarta untuk dilakukan uji viskositas pada suhu 50°C dan 60°C
- b. Menghitung koefisien difusi menggunakan data viskositas yang telah diketahui dengan Hukum Fick yang dihubungkan dengan asumsi Stokes-Einstien:

- 1) Koefisien difusi (D) berbanding lurus dengan suhu (T) dan

berbanding terbalik dengan viskositas (η). $D = \frac{T}{\eta}$

- 2) Waktu yang diperlukan (t) berbanding terbalik dengan

koefisien difusi (D). $t = \frac{1}{D}$

- 3) Menggabungkan kedua hubungan tersebut diperoleh waktu (t) berbanding lurus dengan viskositas (η) dan berbanding terbalik dengan suhu (T)

$$= t = \frac{\eta}{T}$$

Sehingga, peningkatan koefisien difusi (D) akan mempercepat proses difusi dan waktu (t) yang dibutuhkan akan lebih singkat.

$$\text{Suhu } 50^{\circ}\text{C} = \text{Suhu } 60^{\circ}\text{C}$$

$$\frac{D \cdot t}{L \cdot L} = \frac{D \cdot t}{L \cdot L}$$

L : (ketebalan jaringan) konstan yaitu 3 μm , sehingga didapatkan rumus :

$$D_{50^{\circ}\text{C}} \cdot t_{50^{\circ}\text{C}} = D_{60^{\circ}\text{C}} \cdot t_{60^{\circ}\text{C}}$$

$$\frac{t_{60^{\circ}\text{C}}}{t_{50^{\circ}\text{C}}} = \frac{D_{50^{\circ}\text{C}}}{D_{60^{\circ}\text{C}}}$$

Kemudian, substitusi rumus koefisien $D = \frac{T}{\eta}$

$$\frac{t_{60^{\circ}\text{C}}}{t_{50^{\circ}\text{C}}} = \frac{T_{50^{\circ}\text{C}}}{T_{60^{\circ}\text{C}}} \times \frac{\eta_{60^{\circ}\text{C}}}{\eta_{50^{\circ}\text{C}}}$$

Substitusi data ke dalam rumus :

- a) Suhu 1: $50^{\circ}\text{C} \rightarrow T_{50} = 50 + 273.15 = 323.15 \text{ K}$
- b) Suhu 2: $60^{\circ}\text{C} \rightarrow T_{60} = 60 + 273.15 = 333.15 \text{ K}$
- c) Viskositas pada 50°C : $\eta_{50} = 57.8 \text{ cP}$
- d) Viskositas pada 60°C : $\eta_{60} = 67.8 \text{ cP}$
- e) Waktu referensi: $t_{50} = 10$ (berdasarkan penelitian (Badjuri dkk., 2023))

Perhitungan :

- a) Hitung rasio viskositas

$$\frac{\eta_{60}}{\eta_{50}} = \frac{57.8}{67.8} = 0,8525$$

- b) Hitung rasio temperatur (dalam Kelvin)

$$\frac{T_{50}}{T_{60}} = \frac{323.15}{333.15} = 0.9699$$

c) Hitung t_{60} menggunakan rumus:

$$t_{60} = t_{50} \times \left(\frac{\eta_{60}}{\eta_{50}} \right) \times \left(\frac{T_{50}}{T_{60}} \right)$$

$$t_{60} = 10 \times 0,85 \times 0,97$$

$$= 8,2688$$

Hasil akhir: $t_{60} = 8,2688$ menit (dibulatkan menjadi 8 menit).

2. Tahap Perizinan

a. Perizinan

Perizinan dilakukan untuk dapat melakukan penelitian di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Aisyiyah Ponorogo.

b. Kaji Etik

Kaji etik dalam penelitian ini diperlukan agar dapat melakukan penelitian menggunakan sampel arsip blok jaringan kanker payudara, peneliti mengajukan surat kelayakan etik kepada Komite Etik Penelitian Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

3. Tahap Pelaksanaan

a. Persiapan blok jaringan

Jaringan dikeluarkan dari lemari penyimpanan dan dilihat kualitasnya sebelum diproses.

b. Pemotongan blok jaringan dengan mikrotom (*sectioning*)

- 1) Pada blok parafin dilakukan “*trimming*” terlebih dahulu untuk memotong bagian parafin yang tidak diperlukan

- 2) Setelah permukaan blok parafin memperlihatkan seluruh permukaan jaringan, blok parafin ditempatkan pada pemegang blok mikrotom
 - 3) Jaringan pada blok dipotong dengan mikrotom setebal 3 μm .
- c. Pengapungan jaringan (*floating*)
- 1) Pita jaringan diapungkan pada *waterbath* suhu 50°C dan dipastikan tidak ada kerutan atau lipatan pada jaringan
 - 2) Pita jaringan diambil dan diletakkan pada *object glass* (pengolahan jaringan optimal akan menghasilkan irisan/pita jaringan yang tidak pecah saat diletakan dalam *waterbath*)
 - 3) Meniriskan *object glass* yang terdapat pita jaringan
- d. Pewarnaan (*staining*)
- 1) *Object glass* dengan pita jaringan dipanaskan di atas *slide warmer* bersuhu maksimal 60°C selama 30 menit.
 - 2) Deparafinisasi, memasukkan *object glass* dengan pita jaringan ke dalam larutan:
 - a) Deparafinisasi 1: xylol selama 10-15 menit
 - b) Deparafinisasi 2: minyak kelapa murni 50°C selama 10 menit
 - c) Deparafinisasi 3: minyak kelapa murni 60°C selama 8 menit
 - 3) Rehidrasi: preparat yang sudah melalui proses deparafinisasi dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat (100%, 95%, dan 70%) masing-masing selama 1 menit
 - 4) Rendam preparat dalam *chamber* berisi air selama 1 menit

- 5) Preparat dimasukkan ke dalam larutan hematoksin selama 5-7 menit
 - 6) Rendam preparat dalam *chamber* berisi air selama 1 menit
 - 7) Preparat dimasukkan ke dalam larutan eosin selama 1 menit
 - 8) Rendam preparat dalam *chamber* berisi air sebanyak 10 celupan
 - 9) Dehidrasi dengan alkohol bertingkat (70%, 95%, dan 100%) masing-masing selama 1 menit
 - 10) *Clearing* menggunakan xylol selama 5-10 menit
- e. Penutupan/perekatan (*mounting*)
- 1) *Entellan biomount* Bio Optica ditetaskan sebanyak 1 tetes pada preparat yang sudah diwarnai
 - 2) Preparat yang sudah diwarnai ditutup menggunakan *deck glass*.
- f. Tahap pengamatan
- 1) Sediaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x
 - 2) Melakukan penilaian pewarnaan hematoksin eosin
 - 3) Melakukan dokumentasi pada beberapa lapang pandang yang diamati.

K. Manajemen Data

Data yang terkumpul dari penelitian ini akan dianalisis menggunakan analisis deskriptif.

1. Penyajian Data

Penyajian data dilakukan setelah data keseluruhan terkumpul. Selanjutnya, dari pengolahan data akan diperoleh jawaban dari masalah

yang diteliti. Semua data primer yang telah dikumpulkan kemudian disusun dalam bentuk tabel. Kriteria skor pewarnaan hematoksilin eosin disajikan dalam tabel berikut :

Tabel 1. Parameter Penilaian Pewarnaan Hematoksilin Eosin (Ariyadi & Suryono, 2017)

No.	Deskripsi	Skala Ordinal	Skor
1.	Kualitas warna pada jaringan kanker payudara, warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah pada sitoplasma tidak jelas, keseragaman pewarnaan serta kejernihan pewarnaan tidak baik.	Tidak baik	1
2.	Kualitas warna pada jaringan kanker payudara, warna biru pada inti sel kurang jelas, warna merah pada sitoplasma kurang jelas, keseragaman pewarnaan serta kejernihan pewarnaan kurang baik, namun preparat masih dapat diamati.	Kurang baik	2
3.	Kualitas warna pada jaringan kanker payudara, warna biru pada inti sel terlihat jelas, warna merah pada sitoplasma terlihat jelas, keseragaman pewarnaan serta kejernihan pewarnaan baik dan preparat dapat diamati dengan jelas.	Baik	3

Kategori penilaian menggunakan rata-rata untuk setiap kelompok uji, sebagai berikut:

1,00 - 1,66 = Tidak baik

1,67 - 2,32 = Kurang baik

2,33 - 3,00 = Baik

2. Analisa Deskriptif

Gambar mikroskopis yang telah terdokumentasi dianalisis secara deskriptif mengenai perbedaan pewarnaan hematoksilin eosin jaringan kanker payudara yang melalui proses deparafinisasi menggunakan xylol dan minyak kelapa murni dengan pemanasan 50°C selama 10 menit dan

60°C selama 8 menit. Seluruh data yang terkumpul akan disajikan ke dalam bentuk tabel kemudian dianalisis secara deskriptif untuk membandingkan pewarnaan hematoksilin eosin pada jaringan kanker payudara yang melalui proses deparafinisasi menggunakan xylol sebagai standar dan minyak kelapa murni sebagai alternatif pada suhu 50°C selama 10 menit dan 60°C selama 8 menit.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta dengan nomor: DP.04.03/e-KEPK.1/1313/2025. Subjek penelitian ini adalah arsip blok parafin jaringan payudara manusia.