

BAB III METOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimen. Desain penelitian yaitu *cross sectional*. Tujuan yang dilakukan untuk mengetahui suatu gejala yang timbul sebagai akibat perlakuan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen. Sampel organ paru-paru dengan variasi waktu fiksasi 24 jam, 12 jam, 6 jam, dan 4 jam yang dilakukan dengan pewarnaan Hematoksin Eosin. Adanya perbedaan kualitas sediaan pada pemeriksaan Histopatologi pada fiksasi dengan variasi waktu 24 jam, 12 jam, 6 jam, dan 4 jam dengan metode pewarnaan Hematoksin Eosin, maka dilakukan uji Analisa data statistik menggunakan uji *Kruskall Wallis Test* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Balai Veteriner Lampung.

2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2024.

C. Populasi Sampel

Populasi sampel dalam penelitian ini adalah organ paru-paru mencit di Balai Veteriner Lampung. Penentuan jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer. Rumus Federer adalah rumus jumlah subjek untuk penelitian eksperimental. Rumusnya adalah $(t-1)(n-1) \leq 15$ bahwa (t) merupakan jumlah perlakuan, sedangkan (n) merupakan pengulangan pada setiap perlakuan.

Total Sampel yang dilakukan penelitian dihitung menggunakan rumus Federer, sebagai berikut:

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

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$3n-2 \geq 15$$

$$n \geq 17$$

$$n \geq 17/3$$

$$n \geq 5.6$$

$$n = 6$$

Maka pengulangan sampel dilakukan sebanyak 6 sampel dalam 4 perlakuan jadi pada penelitian ini digunakan sebanyak 24 sampel.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Oprasional

Variabel	Definisi Oprasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas					
Variasi waktu fiksasi	Proses pewarnaan jaringan paru-paru mencit dengan Hematoksilin Eosin	Stopwatch	Lembar observasi, stiker	24 jam 12 jam 6 jam 4 jam	Nominal
Variabel Terikat					
Kualitas Sediaan Histologi	Persyaratan kualitas pewarnaan sediaan meliputi keseragaman Warna, inti sel, sitoplasma sel, Intensitas pewarnaan	Metode skoring (Sravya, 2018) yang dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop, lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Inti sel	Warna ungu kebiruaan pada inti sel, inti sel jelas	Metode skoring (Sravya, 2018) yang dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop, lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Sitoplasma sel	Warna merah atau merah muda pada sitoplasma terlihat jelas	Metode skoring (Sravya, 2018) yang dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop, lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Keseragaman warna	Pewarnaan keseluruhan merata, keseluruhan terwanai dengan baik	Metode skoring (Sravya, 2018) yang dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop, lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Intensitas pewarnaan	Warna terlihat cerah atau pekat terhadap keseluruhan sediaan yang telah diwarnai	Metode skoring (Sravya, 2018) yang dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop, lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Alat

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini:

Tissue processor, *tissue embedding*, Rak pengecatan, pinset, papan potong, flotation bath, lemari pendingin, glass ukur, hotplate, cetakan blocking, mikrotom, pisau mikrotom *disposable*, objek glass, deck glass, inkubator (38-42°C), corong kaca, staining jar, wax dispenser, dan mikroskop.

2. Bahan

Bahan yang digunakan sebagai berikut:

Aquades, larutan natural buffer formalin 10%, larutan Alkohol 80%, larutan alkohol 95%, larutan alkohol absolut, larutan xylol, parafin, dan cat Hematoksilin Eosin.

3. Cara Kerja

a. Euthanasia

Euthanasia dilakukan dengan membiuskan mencit dengan Klorofom.

b. Pembedahan mencit

Pembedahan dilakukan dengan mengambil jaringan yang dibutuhkan untuk pembuatan sediaan.

c. Processing Preparat

Persiapan sampel histologi apusan:

Pada pembuatan sediaan apus histologi dilakukan Langkah-langkah sebagai berikut (Balai Veteriner Lampung, 2018):

- 1) Pada tahap pertama yang dilakukan adalah dengan cara memfiksasi jaringan organ dengan minimal fiksasi yaitu 24 jam.

Tabel 3.2 Standar Operasional Prosedur Waktu Fiksasi dan Variasi Waktu

Waktu SOP	Waktu Variasi
24 jam	4 jam
	6 jam
	12 jam
	24 jam

Tabel 3.3 Proses Fiksasi dengan Variasi Waktu dan Waktu SOP

Fiksasi	Waktu Fiksasi
Formalin buffer 10%	4 jam
Formalin buffer 10%	6 jam
Formalin buffer 10%	12 jam
Formalin buffer 10%	24 jam

- 2) Setelah dilakukan fiksasi selanjutnya adalah proses pematangan jaringan merupakan pengeluaran air dan larutan fiksasi yang ada dalam jaringan.

Tabel 3.4 Prosesing Jaringan (Pematangan jaringan)

Proses	Reagensia	Waktu
Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
	Alkohol 95%	2 jam
	Alkohol absolut	2 jam
	Alkohol absolut	3 jam
Clearing	Xylol	3 jam
	Xylol	3 jam
Infiltrasi	Parafin	2 jam
	Parafin	2 jam

Sumber : SOP Balai Veteriner Lampung, 2018)

- 3) Kemudian pada tahap selanjutnya dilakukan pembuatan blok parafin (*Blocking*).
- 4) Trimming dilakukan pada parafin yang telah didinginkan terlebih dahulu dilemari pendingin sebelum melakukan pemotongan blok parafin dengan ketebalan 15 μm yang bertujuan untuk membuang kelebihan parafin
- 5) Kemudian dilakukan pemotongan halus untuk menghasilkan pita parafin dengan ketebalan sekitar 3 μm .
- 6) Kemudian pada tahap selanjutnya pita parafin dimasukkan ke dalam waterbath agar tidak ada lipatan.
- 7) Kemudian tahap selanjutnya pewarnaan dengan Hematoksilin Eosin.

d. Prosedur Pewarnaan

Prosedur pewarnaan dilakukan setelah processing jaringan untuk melihat perubahan histologi jaringan berikut Langkah-langkah pewarnaan (Balai Veteriner Lampung, 2018):

Tabel 3.5 Prosedur Pewarnaan Hematoksilin Eosin

No	Reagensia	Waktu
1	Xylol I	5 menit
2	Xylol II	5 menit
3	Xylol III	5 menit
4	Alkohol absolut I	5 menit
5	Alkohol absolut II	5 menit
6	Alkohol 95 %	5 menit
7	Alkohol 95 %	5 menit
8	Alkohol 90 %	5 menit
9	Alkohol 90 %	5 menit
10	Aquades	1 menit
11	Harris-heamatoxylin	5 menit
12	Aquades	15 menit
13	Eosin	2 menit

14	Alkohol 90%	3 menit
15	Alkohol 90%	3 menit
16	Alkohol 95%	3 menit
17	Alkohol 95%	3 menit
18	Alkohol absolut	3 menit
19	Alkohol absolut	3 menit
20	Xylol IV	5 menit
21	Xylol V	5 menit
22	Keringkan, teteskan dengan entelen ditutup dengan deck glass	

Sumber : SOP Balai Veteriner Lampung, 2018

e. Penilaian Kualitas Sediaan

Tabel 3.6 Penilaian Kualita Sediaan Histologi

No	Parameter Penilaian	Deskripsi	Skor
1.	Sitoplasma sel	Warna merah atau merah muda pada sitoplasma tidak terlihat jelas	1
	a.Tidak baik		
	b.Baik	Warna merah atau merah muda pada sitoplasma terlihat jelas	2
2.	Inti Sel	Warna pada inti sel tidak berwarna ungu kebiruan, inti sel tidak jelas	1
	a.Inti Sel Tidak Jelas (Tidak Baik)		
	b. Inti Sel Jelas (Baik)	Warna pada inti sel ungu kebiruan, inti sel jelas	2
3.	Keseragaman Pulasan	Keseragaman warna tidak merata dan jelas, keseluruhan tidak terwanai dengan baik	1
	a.Tidak Baik		
	b.Baik	Keseragaman warna merata dan jelas, keseluruhan terwanai dengan baik	2
4.	Intensitas pewarnaan	Warna tidak terlihat cerah atau pekat terhadap keseluruhan terwanai	1
	a. Tidak Baik		
	b. Baik	Warna terlihat cerah atau pekat terhadap keseluruhan sediaan yang telah diwarnai	2

Sumber ; Sravya, 2018 yang telah dimodifikasi BPMPPPI

f. Skoring Kualitas Hasil Pewarnaan

Tabel 3.7 Skoring Mikroskopis Sediaan

No	Deskripsi	Nilai
1	Baik	6-8
2	Tidak Baik	4-5

Sumber : Sravya, 2018 yang telah dimodifikasi BPMPPPI

Nilai skoring yang diberikan kepada 4 parameter, yaitu skor 1-2 dengan total skor yang dapat dikatakan baik, apabila mencapai 80%, dengan kategori baik 6-8 dengan katogori baik, dan 4-5 dengan kategori tidak baik.

F. Pengolahan data

Proses pengolahan data dilakukan dengan mengumpulkan data berdasarkan hasil pengamatan melalui tahap-tahap sebagai berikut:

1. *Coding* yaitu pemberian kode untuk memudahkan pengentriaan data ketika dimasukkan ke komputer (data entry)
2. Entry Data yaitu dengan memasukkan data-data yang telah terkumpul ke dalam aplikasi / program komputer, misalnya SPSS.
3. Skoring merupakan pemberian skor terhadap tabel agar mendapatkan nilai yang signifikan.

G. Analisis Data

Data skoring yang di peroleh dari penilaian ahli Patologi Anatomi ditotalkan kemudiaan dihitung rata-rata skoring. Nilai skoring yang diberikan yaitu 1-2 dengan total skor dikatakan baik apabila mencapai skor 80%, yaitu 6-8 kategori baik dan 4-5 kategori tidak baik (Sravya, 2018). Perbandingan kualitas sediaan apusan histologi dengan variasi waktu fiksasi 4 jam, 6 jam, 12 jam dan 24 jam sesuai SOP dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin, dapat dianalisis menggunakan uji statistik *Kruskall Wallis Test* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$