

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimen. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui suatu gejala yang timbul sebagai akibat perlakuan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen. Sampel jaringan jantung mencit diamati dengan perlakuan yang sama tetapi menggunakan cairan *clearing* yang berbeda yaitu *xylol* dan minyak kayu putih. Dilakukan uji analisa data statistik menggunakan *Wilcoxon Signed Rank Test* dengan nilai signifikansi  $p < 0,05$  pada hasil skoring terhadap kriteria kualitas sediaan histopatologi jaringan jantung mencit (*Mus musculus*) dengan penggunaan *xylol* dan minyak kayu putih pada proses *clearing*.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Balai Veteriner Lampung.

2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-April 2024.

#### **C. Populasi dan Sampel**

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini menggunakan 32 preparat sediaan jantung mencit .

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah preparat sediaan organ jantung mencit. Terdapat dua kelompok perlakuan yaitu perlakuan *clearing* dengan menggunakan *xylol* dan minyak kayu putih. total sampel yang digunakan adalah 32 preparat sediaan jantung mencit yang ditentukan berdasarkan rumus Federer, sebagai berikut:

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

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

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

$$1n-1 \geq 15$$

$$1n \geq 16$$

$$n \geq 16$$

$$\text{total sampel: } n \times t = 16 \times 2 = 32$$

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap kelompok

t = banyaknya kelompok

Sampel penelitian adalah total sampel preparat sediaan jantung mencit yang memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Preparat dengan sediaan jaringan yang sama
- 2) Preparat dengan ketebalan pembedahan  $3\mu\text{m}$
- 3) Preparat dengan penggunaan reagen pewarnaan baru
- 4) Preparat dengan penggunaan minyak kayu putih merk Cap Lang

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Preparat rusak
- 2) Preparat pecah

### D. Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel Bebas Proses <i>clearing</i>	Proses <i>clearing</i> dengan menggunakan <i>xylol</i> sebagai <i>control</i> dan minyak kayu putih sebagai perlakuan.	Observasi	Lembar MSDS dan Etiket	<i>Xylol</i> dan Minyak Kayu Putih 100%	Nominal
Variabel Terikat					
Kualitas hasil pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE) pada preparat sediaan jantung mencit	Kualitas hasil pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE) pada preparat sediaan jantung mencit yang diukur secara mikroskopis dengan mengamati inti sel, sitoplasma, intensitas warna, dan keseragaman warna. Inti sel berbentuk oval maupun bulat dan berada di tengah sel. Inti sel ketika diwarnai dengan <i>Hematoxylin</i> akan menghasilkan warna ungu.	Metode skoring (Srivaya dkk, 2018) dengan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	1. Tidak Baik 2. Baik	Ordinal
1. Inti Sel	Sitoplasma merupakan cairan yang berada diantara inti sel dan membran sel. Sitoplasma ketika diwarnai dengan <i>Eosin</i> akan menghasilkan warna merah muda.	Metode skoring (Srivaya dkk, 2018) dengan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	1. Tidak Baik 2. Baik	Ordinal
2. Sitoplasma	Intensitas warna yang baik akan menghasilkan warna cerah atau pekat terhadap sediaan yang telah diwarnai.	Metode skoring (Srivaya dkk, 2018) dengan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	1. Tidak Baik 2. Baik	Ordinal
3. Intensitas Warna	Keseragaman warna yang jelas dan dapat diidentifikasi dengan baik.	Metode skoring (Srivaya dkk, 2018) dengan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	1. Tidak Baik 2. Baik	Ordinal
4. Keseragaman Warna					

## E. Teknik Pengumpulan Data

### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

*Beaker glass*, pinset, kaca objek, *deck glass*, satu set wadah pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE).

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

Organ jantung mencit, *xylol*, minyak kayu putih merk Cap Lang, dan cairan pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE).

### 3. Cara Kerja Prosesing Preparat

- a. Mencit dibius.
- b. Mencit direntangkan diatas *sterofoam* lalu dilakukan pembedahan menggunakan pisau pada bagian ventral mencit.
- c. Tahap pematangan jaringan pada preparat histopatologi

Tabel 3.1 Prosedur pematangan jaringan dengan penggunaan *xylol* pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Fiksasi dengan cairan NBF 10%	24 jam
2.	Dehidrasi dengan alkohol 80%	2 jam
3.	Dehidrasi dengan alkohol 95%	2 jam
4.	Dehidrasi dengan alkohol absolut I	2 jam
5.	Dehidrasi dengan alkohol absolut II	3 jam
6.	<i>Clearing</i> dengan <i>xylol</i> I	3 jam
7.	<i>Clearing</i> dengan <i>xylol</i> II	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

Sumber : (Balai Veteriner Lampung, 2023).

Tabel 3.2 Prosedur pematangan jaringan dengan penggunaan minyak kayu putih pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Fiksasi dengan cairan NBF 10%	24 jam
2.	Dehidrasi dengan alkohol 80%	2 jam
3.	Dehidrasi dengan alkohol 95%	2 jam
4.	Dehidrasi dengan alkohol absolut I	2 jam
5.	Dehidrasi dengan alkohol absolut II	3 jam
6.	<i>Clearing</i> dengan minyak kayu putih I	3 jam
7.	<i>Clearing</i> dengan minyak kayu putih II	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

- d. Organ jantung mencit diletakan ke dalam *base mold* dan memposisikan jaringan dengan benar menggunakan pinset dan menuang parafin cair hingga menutupi cetakan pada *base mold* lalu tutup dengan *cassate tissue*.
- e. Cetakan diletakan pada suhu dingin atau *freezer* hingga kering lalu melepaskan hasil cetakan.
- f. Tahap *sectioning* (pemotongan) organ dilakukan menggunakan mikrotom.
- g. Pita parafin diletakan di *waterbath* dengan suhu  $\leq 60^{\circ}\text{C}$  dan ambil pita parafin menggunakan kaca objek.
- h. Tahap pewarnaan dilakukan menggunakan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Tabel 3.3 Prosedur Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan penggunaan *xylol* pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Deparafinisasi ke dalam <i>xylol</i> I, <i>xylol</i> II, dan <i>xylol</i> III	5 menit
2.	Masukan ke dalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II	5 menit
3.	Masukan ke dalam alkohol 95% I dan alkohol 95% II	5 menit
4.	Masukan ke dalam alkohol 90% I dan alkohol 90% II	5 menit
5.	Rendam dengan aquadest	1 menit
6.	Masukan ke dalam pewarna <i>Harris-Hematoxylin</i>	5 menit
7.	Rendam dengan aquadest	15 menit
8.	Masukan ke dalam pewarna <i>Eosin</i>	2 menit
9.	Masukan ke dalam alkohol 90% III dan alkohol 90% IV	3 menit
10.	Masukan ke dalam alkohol 95% III dan alkohol 95% IV	3 menit
11.	Masukan ke dalam alkohol absolut III dan alkohol absolut IV	3 menit
12.	Masukan ke dalam <i>xylol</i> IV dan <i>xylol</i> V ( <i>Clearing</i> )	5 menit
13.	Proses penutupan jaringan diantara <i>deck glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan ( <i>Mounting</i> )	

Sumber : (Balai Veteriner Lampung, 2023).

Tabel 3.4 Prosedur Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan penggunaan minyak kayu putih pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Deparafinisasi ke dalam <i>xylol</i> I, <i>xylol</i> II, dan <i>xylol</i> III	5 menit
2.	Masukan ke dalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II	5 menit
3.	Masukan ke dalam alkohol 95% I dan alkohol 95% II	5 menit
4.	Masukan ke dalam alkohol 90% I dan alkohol 90% II	5 menit
5.	Rendam dengan aquadest	1 menit
6.	Masukan ke dalam pewarna <i>Harris-Hematoxylin</i>	5 menit
7.	Rendam dengan aquadest	15 menit
8.	Masukan ke dalam pewarna <i>Eosin</i>	2 menit
9.	Masukan ke dalam alkohol 90% III dan alkohol 90% IV	3 menit
10.	Masukan ke dalam alkohol 95% III dan alkohol 95% IV	3 menit
11.	Masukan ke dalam alkohol absolut III dan alkohol absolut IV	3 menit
12.	Masukan ke dalam minyak kayu putih I dan minyak kayu putih II ( <i>Clearing</i> )	5 menit
13.	Proses penutupan jaringan diantara <i>deck glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan ( <i>Mounting</i> )	

- i. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan menilai kualitas preparat sediaan jantung mencit dengan metode skoring pada parameter inti sel, sitoplasma, intensitas warna, dan keseragaman warna.
- j. Pengolahan data dilakukan berdasarkan skoring hasil pengamatan sediaan jantung mencit yang telah melalui proses histoteknik.

#### **F. Pengolahan Data**

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

1. *Coding* yaitu pemberian kode untuk memudahkan pengentrian data ketika dimasukkan ke komputer (*data entry*).
2. *Entry Data* yaitu memasukan data-data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi atau program komputer, yaitu SPSS.
3. *Scoring* yaitu pemberian skor terhadap parameter penilaian kualitas sediaan.

#### **G. Analisis Data**

Data skoring yang diperoleh dari hasil penilaian Patologi Anatomi ditotal, dihitung rata-rata skoring. Dilakukan analisis menggunakan uji statistik *Wilcoxon Signed Rank Test* dengan nilai signifikansi  $p < 0,05$  terhadap kualitas sediaan histopatologi jaringan jantung mencit (*Mus musculus*) dengan penggunaan *xylol* dan minyak kayu putih pada proses *clearing*.