

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimen dengan kriteria penelitian deskriptif. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbedaan kualitas sediaan jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*) yang diwarnai dengan Hematoxylin Eosin dan larutan buah strawberry sebagai pengganti Eosin secara mikroskopis.

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

##### 1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Balai Veteriner Provinsi Lampung

##### 2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-April 2024

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

Populasi dalam penelitian ini merupakan kumpulan preparat jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*) yang diwarnai dengan Hematoxylin Eosin dengan membandingkan pewarnaan antara reagen Eosin dan larutan buah strawberry sebagai pengganti Eosin. Total sampel yang digunakan untuk penelitian dihitung menggunakan rumus federer, sebagai berikut :

Keterangan :

n : besar sampel setiap kelompok

t : jumlah tiap kelompok

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

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan tersebut didapat hasil minimal 6 kali pengulangan dalam satu kelompok. Sehingga jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini  $6 \times 4 = 24$  preparat ginjal mencit.

#### D. Variabel dan Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi	Cara ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas Pembuatan sediaan ginjal mencit menggunakan larutan buah strawberry	pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) pada ginjal mencit menggunakan reagen Eosin dan buah strawberry sebagai pengganti Eosin	larutan	Corong dan <i>beaker glass</i>	1. Eosin 2. Strawberry 25% 3. Strawberry 50% 4. Strawberry 75%	Nominal
Variabel terikat kualitas pewarnaan Hematoxylin Eosin pada sediaan ginjal mencit	Hasil pengamatan secara mikroskopis sediaan ginjal mencit yang dilakukan pewarnaan dengan Hematoxylin Eosin dan larutan strawberry yang dilihat dari inti sel, sitoplasma, keseragaman warna, dan intensitas pewarnaan	Metode skoring (Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPPMPI	Lembar observasi dan Mikroskop	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Inti sel	Inti sel berwarna biru, berbentuk oval atau bulat dan berada di tengah sel	Metode skoring (Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPPMPI	Lembar observasi dan Mikroskop	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
sitoplasma	Sitoplasma berwarna merah, sitoplasma merupakan cairan yang berada diantara membran sel dan inti sel	(Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPPMPI	Lembar observasi dan Mikroskop	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal

Keseragaman warna	Keseragaman warna jelas, rata dan dapat diidentifikasi	Metode skoring (Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPPMPP	Lembar observasi dan Mikroskop	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Intensitas pewarnaan	Intensitas warna yang tampak jernih dan dapat diidentifikasi	Metode skoring (Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPPMPP	Lembar observasi dan Mikroskop	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal

## E. Teknik Pengumpulan Data

### 1. Alat

*Tissue processor, tissue embedding, mikrotom, pisau mikrotom disposable, automatic staining, jarum ose, inkubator (38-42°C), preparat, flotation bath, deck glass, mikroskop, pensil, pinset, skalpel no.22, cassette embedding, hot plate dan wax dispenser.*

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu :

Sampel jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*), reagen Hematoxylin, reagen Eosin, larutan buah strawberry konsentrasi 25%, 50% dan 75%

### 3. Pembuatan Larutan Strawberry

- a. Konsentrasi 25% : 25 gram strawberry dan 75 ml etanol 96%, lalu ditambah HCL 0,1 N ± 25 ml sampai pH asam
- b. Konsentrasi 50% : 50 gram strawberry dan 75 ml etanol 96%, lalu ditambah HCL 0,1 N ± 25 ml sampai pH asam
- c. Konsentrasi 75% : 75 gram strawberry dan 75 ml etanol 96%, lalu ditambah HCL 0,1 N ± 25 ml sampai pH asam

### 4. Cara Kerja Pembuatan Larutan Buah Strawberry

- a. Siapkan alat dan bahan
- b. Timbang strawberry sesuai dengan kebutuhan disetiap pengenceran

- c. Blender strawberry dengan menambahkan etanol 96% lalu saring hingga halus
  - d. Setelah itu ditambahkan HCL 0,1 N untuk membuat larutan menjadi asam
  - e. Ukur pH larutan hingga pH asam 4
5. Cara Kerja Pembuatan Preparat

- a. Persiapan sampel jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*)  
Spesimen untuk pengujian Histopatologi berupa bagian perbatasan antara organ yang normal dan berlesi yang diambil dimasukkan ke dalam buffer neutral formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian jaringan dengan 10 bagian buffer neutral formalin 10%.
- b. Teknik Pembuatan Sediaan Histopatologi
  1. Setelah proses fiksasi dilakukan pemotongan jaringan (trimming) yaitu pemotongan tipis jaringan dengan ketebalan kurang lebih 5 mikron.
  2. Dehidrasi, jaringan didehidrasi pada *tissue processor* selama 23 jam
  3. *Embedding, cassette embedding* yang telah diisi spesimen jaringan dimasukkan ke dalam *tissue processor* dengan pengaturan waktu sebagai berikut :

Proses	Reagensia	Waktu
Fiksasi	Formalin buffer 10%	24 jam
Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
	Alkohol 95%	2 jam
	Alkohol absolute	2 jam
	Alkohol absolute	3 jam
Clearing	Xylol I	3 jam
	Xylol II	3 jam
Impregnasi	Parafin	2 jam
	Parafin	2 jam

4. *Cassete embedding* dikeluarkan dari *tissue prosesor*
5. Keluarkan organ dari *cassete embedding* lalu masukan dalam bismout lalu tuangkan parafin ke dalam bismout, tutup dengan *cassete embedding* kemudian beri label lalu dinginkan pada alat *processor embedding* bagian yang dingin

6. Pemotongan, pemotongan blok jaringan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-5 mikron
7. Gelas preparat dibersihkan supaya bersih, kemudian diisi dengan nomor patologi dengan menggunakan pensil kaca. Mikrotom distel menunjukkan 3 mikron, pisau mikrotom kasar difiksir pada mikrotom
8. Ambil blok jaringan, permukaan yang akan dipotong didinginkan dan difiksir pada mikrotom. Blok jaringan dipotong dengan pisau mikrotom kasar, sehingga didapatkan permukaan yang rata
9. Pisau mikrotom diganti dengan pisau yang halus, blok jaringan dipotong kembali, dipilih potongan yang terbaik. Potongan jaringan diambil dengan menggunakan kuas dan jarum ose. Jaringan diapungkan ke dalam bak air yang telah berisi larutan pengapung. Jaringan dibiarkan mengapung, bagian yang melipat diratakan sehingga permukaannya rata
10. Jaringan disalut dengan gelas preparat yang telah berisi nomor patologi. Preparat dimasukkan ke dalam *hotplate* dan dibiarkan semalam, minimal 12 jam jaringan siap diwarnai
11. Pewarnaan, untuk melihat perubahan histopatologis jaringan, preparat diwarnai dengan Hematoxylin dan Eosin. Proses pewarnaan dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 3.1 Pewarnaan Hematoxylin Eosin dengan menggunakan reagen Eosin

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Deparafinisasi (menghilangkan parafin )	Xylol I	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2	Rehidrasi	Alkohol absolut I	5 menit
		Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan hematoxylin	Harris-Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan Eosin	Eosin	2 menit
7	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
8	Clearing	Xylol IV	5 menit
		Xylol V	5 menit
9	Mounting	Permount	

Sumber : Balai Veteriner Lampung (2023)

Tabel 3.2 pewarnaan Hematoxylin Eosin dengan menggunakan larutan buah strawberry 25%

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Deparafinisasi (menghilangkan parafin )	Xylol I	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2	Rehidrasi	Alkohol absolut I	5 menit
		Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan hematoxylin	Harris-Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan Eosin	Larutan Strawberry 25%	2 menit
7	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
8	Clearing	Xylol IV	5 menit
		Xylol V	5 menit
9	Mounting	Permount	

Tabel 3.3 pewarnaan Hematoxylin Eosin dengan menggunakan larutan buah strawberry 50%

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Deparafinisasi (menghilangkan parafin )	Xylol I	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2	Rehidrasi	Alkohol absolut I	5 menit
		Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan hematoxylin	Harris-Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan Eosin	Larutan Strawberry 50%	2 menit
7	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
8	Clearing	Xylol IV	5 menit
		Xylol V	5 menit
9	Mounting	Permout	

Tabel 3.4 pewarnaan Hematoxylin Eosin dengan menggunakan larutan buah strawberry 75%

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Deparafinisasi (menghilangkan parafin )	Xylol I	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2	Rehidrasi	Alkohol absolut I	5 menit
		Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan hematoxylin	Harris-Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan Eosin	Larutan Strawberry 75%	2 menit
7	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
8	Clearing	Xylol IV	5 menit
		Xylol V	5 menit
9	Mounting	Permout	

12. Pemeriksaan pada mikroskop dengan perbesaran 10x, 100x dan 400x

## **F. Pengolahan Data**

Pengolahan data dilakukan setelah mendapatkan data dari hasil penelitian melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

1. *Coding* yaitu pemberian kode untuk memudahkan pengentrian data ketika dimasukkan ke komputer
2. *Entry data* yaitu memasukkan data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi, misalnya SPSS
3. *Scoring*, yaitu proses pemberian skor pada data yang telah diberi kode dan memberikan nilai serta bobot pada data tersebut

## **G. Analisis Data**

Data dari hasil pemberian skor yang diperoleh berdasarkan penilaian ditotal lalu dihitung rerata skoring. Nilai skor yang diberikan untuk 4 parameter yaitu 1-2 dengan total skor dikatakan baik apabila mencapai angka 80%, dengan nilai 1-5 masuk pada kategori tidak baik dan 6-8 kategori baik (sravya et al., 2018). Hasil skoring dari penilaian parameter dianalisis dengan *Kruskal Wallis Test* dengan nilai signifikan  $p < 0,05$ .