

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 dua perlakuan kelompok eksperimen. Sampel jaringan hati mencit diamati dengan perlakuan yang sama tetapi menggunakan larutan *clearing* yang berbeda yaitu *Xylol* dan Minyak Biji Anggur. Adanya perbedaan kualitas sediaan histologi jaringan hati mencit (*Mus musculus*) Menggunakan *Xylol* dan Minyak Biji Anggur metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin*, maka dilakukan Uji Wilcoxon Signed Rank Test dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Balai Venteriner Lampung.

2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari-Maret 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini menggunakan sediaan jaringan hati mencit.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah preparat sediaan organ hati mencit. Terdapat dua kelompok perlakuan yaitu perlakuan *clearing* dengan menggunakan *Xylol* dan Minyak biji anggur, minyak biji anggur yang di dapatkan dari Shopee dengan merek TSb dengan konsentrasi 100% murni. Total sampel yang di gunakan adalah 32 preparat sediaan organ hati 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

t = banyaknya kelompok/ perlakuan

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

- a. Kriteria Inklusi
 - 1) Pemotongan seragam, ketebalannya $4\mu\text{m}$
 - 2) Jaringan organ hati mencit
- b. Kriteria Eksklusi
 - 1) Ketebalan lebih atau kurang dari $4\mu\text{m}$

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Devinisi Operasional dan Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel Bebas Proses <i>Clearing</i>	Proses <i>clearing</i> dengan menggunakan larutan <i>xylol</i> sebagai <i>control</i> dan minyak biji anggur sebagai perlakuan	Lembar MSDS dan Etiket	Larutan <i>xylol</i> dan minyak biji anggur merek TSb 100% murni	Nominal
Variabel Terikat Gambaran Mikroskopis Jaringan	Kualitas hasil pewarnaan pada preparat sediaan jaringan hati mencit yang diukur secara mikroskopis dengan mengamati inti sel, sitoplasma, latar belakang, dan keseragaman warna			
1. Inti Sel	Inti sel berbentuk oval maupun bulat dan berada di tengah sel. Inti sel ketika di warnai dengan <i>Hematoxylin Eosin</i> akan menghasilkan warna biru keunguan.	Metode skoring (Sravya dkk,2018) dengan modifkasi	-Baik -Tidak baik	Ordinal
2. Sitoplasma	Sitoplasma merupakan cairan yang berada diantara inti sel dan membrane sel. Sitoplasma Ketika di warnai dengan <i>Eosin</i> akan menghasilkan warna merah muda.	Metode skoring (Sravya dkk,2018) dengan modifkasi	-Baik -Tidak baik	Ordinal

3. Intensitas warna	Menghasilkan warna cerah atau pekat terhadap sediaan yang telah diwarnai	Metode skoring (Sravya dkk,2018) dengan modifikasi	-Baik -Tidak baik	Ordinal
4. Keseragaman warna	Keseragaman warna yang jelas dan dapat diidentifikasi dengan baik.	Metode skoring (Sravya dkk,2018) dengan modifikasi	-Baik -Tidak baik	Ordinal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang di gunakan pada penelitian ini adalah :

Beaker glass, kaca objek, deck glass, satu set pewarnaan *Hematoxylin Eosin*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

Organ hati mencit, larutan pewarna *Hematoxylin Eosin* larutan *xylol*, dan Minyak biji anggur.

3. Cara Kerja

a. Proses Euthanasia

Pembiusan dilakukan dengan inhalasi menggunakan klorofom. Setelah hewan terbius sempurna, proses selanjutnya adalah melakukan pembedahan dan pengambilan organ hati mencit.

b. Proses Pembuatan Preparat

Tabel 3.2 Proses Pematangan Jaringan Menggunakan *Xilol*

No.	Tahap	Reagensia	Waktu
1.	Fiksasi	Formalin Buffer 10%	24 jam
2.	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
		Alkohol 95%	2 jam
		Alkohol absolut I	2 jam
		Alkohol absolut II	3 jam
3.	<i>Clearing</i>	<i>Xylol</i> I	3 jam
		<i>Xylol</i> II	3 jam
4.	Infiltrasi	Parafin I	2 jam
		Parafin II	2jam

Sumber : (Balai Venteriner Lampung, 2018)

Tabel 3.3 Proses Pematangan Jaringan Menggunakan Minyak Biji Anggur

No.	Tahap	Reagensia	Waktu
1.	Fiksasi	Formalin Buffer 10%	24 jam
2.	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
		Alkohol 95%	2 jam
		Alkohol absolut I	2 jam
		Alkohol absolut II	3 jam
		Minyak Biji Anggur I	3 jam
3.	Clearing	Minyak Biji Anggur II	3 jam
		Minyak Biji Anggur II	3 jam
4.	Infiltrasi	Parafin I	2 jam
		Parafin II	2jam

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

Tabel 3.4 Prosedur Pewarnaan *Hematoxylin Eosin*

No.	Tahap	Waktu
1.	Deparafinisasi ke dalam <i>xylol</i> I dan <i>xylol</i> II, <i>xilol</i> III	5 menit
2.	Masukkan kedalam alkohol absolut I, alkohol absolut II	5 menit
3.	Rendam menggunakan aquadest	1 menit
4.	Masukkan ke dalam pewarna <i>Hematoxylin</i>	20 menit
5.	Rendam menggunakan aquadest	1 menit
6.	Rendam menggunakan aquadest	1 menit
7.	Rendam menggunakan aquadest	15 menit
8.	Masukkan ke dalam pewarna <i>Eosin</i>	2 menit
9.	Masukkan kedalam alkohol 96% I, alkohol 96% II	3 menit
10.	Masukkan ke dalam alkohol absolut III dan alkohol absolut IV	3 menit
11.	Masukkan ke dalam <i>xylol</i> IV dan <i>xylol</i> V (<i>clearing</i>)	5 menit
12.	Masukkan penutupan jaringan diantara <i>cover glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan (<i>Mounting</i>)	

Sumber: (Balai Venteriner Lampung, 2018).

- h. Pengamatan secara mikroskopis dengan menilai kualitas preparat sediaan organ hati mencit dengan metode skoring pada parameter inti sel, sitoplasma, latar belakang, dan keseraagaman warna.

- i. Pengolahan data dilakukan berdasarkan skoring hasil pengamatan sediaan organ hati mencit

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 computer (data entry)
2. Entry data yaitu memasukkan data-data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi atau program komputer, misalnya SPSS.
3. Skoring 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 adanya perbedaan kualitas sediaan histologi jaringan hati mencit (*Mus musculus*) menggunakan *Xylol* dan Minyak Biji Anggur Pada Proses Pematangan Jaringan, dianalisis menggunakan Uji Wilcoxon Signed Rank Test dengan Tingkat signifikansi $p < 0,05$.