

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Pada penelitian ini jenis penelitian yang digunakan bersifat eksperimen dengan rancangan *cross sectional*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui suatu gejala yang timbul akibat perlakuan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen. Sampel organ kolon mencit diamati dengan perlakuan variasi waktu dehidrasi 30 menit, 25 menit, dan 20 menit dibandingkan SOP 120 menit pada proses pematangan jaringan. Adanya perbedaan kualitas sediaan jaringan kolon mencit pada hasil pewarnaan dengan variasi waktu dehidrasi 30 menit, 25 menit, dan 20 menit dibandingkan dengan SOP 120 Menit pada proses pematangan jaringan dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*, maka dilakukan uji analisa data statistik menggunakan *Kruskal Wallis Test* dengan nilai signifikan $p < 0,05$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Balai Veteriner Lampung

2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-April 2024

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh sediaan kolon mencit yang ada di Balai Veteriner Lampung pada bulan Maret-April 2024.

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

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

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$n \geq 18/3$$

$$n \geq 6$$

Perlakuan yang digunakan adalah 4 dengan pengulangan sebanyak 6 sampel. Jadi, sampel yang digunakan dalam penelitian ini digunakan 6 sampel pada setiap perlakuan dengan total 24 sediaan, dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

- a. Kriteria Inklusi
 1. Pemotongan seragam dengan ukuran 3 μ
 2. Menggunakan mencit jantan dan sehat
 3. Menggunakan organ kolon mencit
- b. Kriteria Eksklusi
 1. Mencit betina dan sakit
 2. Selain organ kolon mencit

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas	Proses pewarnaan jaringankolon mencit dengan Hematoxylin Eosin menggunakan variasi waktu dehidrasi pada saat <i>processing</i> jaringan dengan alkohol bertingkat menggunakan 3 tingkatan alkohol dan sampel direndam sesuai dengan masing-masing variasi waktu selama 3 tingkatan	Observasi	Stopwatch	1. 120 Menit (Kontrol) 2. 30 Menit 3. 25 Menit 4. 20 Menit	Nominal
Variabel terikat	Pemenuhan persyaratan kualitas pewarnaan histologi meliputi pewarnaan inti sel, pewarnaan sitoplasma, keseragaman warna, kejernihan pewarnaan dan kejelasan pewarnaan	Ankle, 2011 dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop dan Lembar Observasi	1. Baik 2. Tidak Baik	Ordinal
Kualitas Hasil Pewarnaan	Warna ungu kebiruan pada inti sel terlihat jelas pada gambaran mikroskopis	Ankle, 2011 dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop dan Lembar Observasi	1. Baik 2. Tidak Baik	Ordinal
Pewarnaan Inti Sel	Warna merah atau merah muda pada sitoplasma terlihat jelas pada gambaran mikroskopis	Ankle, 2011 dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop dan Lembar Observasi	1. Baik 2. Tidak Baik	Ordinal

Keseragaman Warna	Warna seragam antara sel bagian luar dan sel bagian dalam pada keseluruhan gambaran mikroskopis	Ankle, 2011 dimodifikasi BPPMPP	Mikroskop dan Lembar Observasi	1. Baik 2. Tidak Baik	Ordinal
Kejernihan Pewarnaan	Hasil pewarnaan inti sel dan sitoplasma terlihat jernih atau tidak buram	Ankle, 2011 dimodifikasi BPPMPP	Mikroskop dan Lembar Observasi	1. Baik 2. Tidak Baik	Ordinal
Kejelasan Pewarnaan	Ada perbedaan kontras warna antara inti sel dan sitoplasma	Ankle, 2011 dimodifikasi BPPMPP	Mikroskop dan Lembar Observasi	Baik 2. Tidak Baik	Ordinal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini:

Pinset, *scalpel*, *forsep*, mikrotom, oven, *base mold*, *deck glass*, *object glass*, mikroskop cahaya.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Organ kolon mencit, larutan *buffer* formalin, parafin, *Hematoxylin Eosin*, larutan *xylol*, alkohol, parafin, aquades.

3. Cara Kerja

a. Proses Euthanasia

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

b. Proses Pembuatan Jaringan

Tabel 3.2 Tahap Pembuatan Jaringan

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Fiksasi	Buffer Formalin 10 %	24 Jam
2	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 Jam
		Alkohol 95%	2 Jam
		Alkohol Absolut	2 Jam
		Alkohol Absolut	3 Jam
3	Clearing	Xylol 1	3 Jam
		Xylol 2	3 Jam
4	Impregnasi-Embedding	Parafin 1	2 Jam
		Parafin 2	2 Jam

Sumber: Balai Veteriner Lampung 2023

c. Prosedur pewarnaan *Hematoxylin Eosin*Tabel 3.3 Tahap Pewarnaan *Hematoxylin Eosin*

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Defarafinisasi	Xylol 1	5 Menit
		Xylol 2	5 Menit
		Xylol 3	5 Menit
2	Rehidrasi	Alkohol Absolut 1	5 Menit
		Alkohol Absolut 2	5 Menit
		Alkohol 95%	5 Menit
		Alkohol 95%	5 Menit
		Alkohol 90%	5 Menit
		Alkohol 90%	5 Menit
3	Pencucian	Aquades	1 Menit
4	Pewarnaan Hematoxylin	Harris-Hematoxylin	5 Menit
5	Pencucian	Aquades	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
		Alkohol Absolut	3 Menit
		Alkohol Absolut	3 Menit
8	Clearing	Xylol 4	5 Menit
		Xylol 5	5 Menit
9	Mounting	Entelan	

Sumber: Balai Veteriner Lampung 2023

d. Prosedur Pembuatan Sediaan Histologi Tahap Dehidrasi Pada Proses Pematangan Jaringan Sesuai SOP:

Tabel 3.4 *processing* pembuatan jaringan tahap dehidrasi sesuai SOP

No.	Keterangan	Waktu
1	Alkohol 80%	120 Menit
2	Alkohol 95%	120 Menit
3	Alkohol Absolut	120 Menit
4	Alkohol Absolut	120 Menit

Sumber: Balai Veteriner Lampung 2023

e. Persiapan Sediaan Histologi Dengan Variasi Waktu Dehidrasi Pada Proses Pematangan Jaringan :

Tabel 3.5 *processing* pembuatan jaringan dengan variasi waktu dehidrasi 30 menit

No.	Keterangan	Waktu
1	Alkohol 80%	30 Menit
2	Alkohol 95%	30 Menit
3	Alkohol Absolut	30 Menit
4	Alkohol Absolut	30 Menit

Tabel 3.6 *processing* pembuatan jaringan dengan variasi waktu dehidrasi 25 menit

No.	Keterangan	Waktu
1	Alkohol 80%	25 Menit
2	Alkohol 95%	25 Menit
3	Alkohol Absolut	25 Menit
4	Alkohol Absolut	25 Menit

Tabel 3.7 *processing* pembuatan jaringan dengan variasi waktu dehidrasi 20 menit

No.	Keterangan	Waktu
1	Alkohol 80%	20 Menit
2	Alkohol 95%	20 Menit
3	Alkohol Absolut	20 Menit
4	Alkohol Absolut	20 Menit

f. Penilaian Kualitas Hasil Pewarnaan

Tabel 3.8 penilaian kualitas pewarnaan

No.	Parameter Penilaian	Deskripsi	Skor
1.	Pewarnaan Inti Sel		
	a. Baik	Warna ungu kebiruan pada inti sel terlihat jelas pada gambaran mikroskopis	1
	b. Tidak Baik	Warna ungu kebiruan pada inti sel terlihat jelas pada gambaran mikroskopis	0
2.	Pewarnaan Sitoplasma		
	a. Baik	Warna merah atau merah muda pada sitoplasma terlihat jelas pada gambaran mikroskopis	1
	b. Tidak Baik	Warna merah atau merah muda pada sitoplasma terlihat jelas pada gambaran mikroskopis	0
3.	Keseragaman Warna		
	a. Baik	Intensitas warna yang merata pada seluruh lapang pandang	1
	b. Tidak Baik	Intensitas warna yang tidak merata pada seluruh lapang pandang	0
4.	Kejernihan Pewarnaan		
	a. Baik	Hasil pewarnaan inti sel dan sitoplasma terlihat jernih atau tidak buram	1
	b. Tidak Baik	Hasil pewarnaan inti sel dan sitoplasma tidak terlihat jernih atau buram	0
5.	Kejelasan Pewarnaan		
	a. Baik	Ada perbedaan kontras warna antara inti sel dan sitoplasma	1
	b. Tidak Baik	Tidak ada perbedaan kontras warna antara inti sel dan sitoplasma	0

Sumber : (Ankle, 2011) dengan modifikasi BPMPPPI

g. Skoring Kualitas Hasil Pewarnaan

Tabel 3.9 Skoring Kualitas Mikroskopis Sediaan

No	Deskripsi	Nilai
1	Baik	4-5
2	Tidak Baik	0-3

Sumber: (Ankle,2011) dengan modifikasi BPMPPPI

Nilai skor yang diberikan pada 5 parameter total ada 5 skor, apabila mencapai 80% dikatakan baik dengan skor 4-5 dan dikatakan tidak baik diberikan skor 0-3.

F. Pengolahan Data

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

- a. *Coding* yaitu pemberian kode pada data berupa angka agar dapat diproses saat pengentrian data pada computer.
- b. *Entry Data* yaitu memasukkan format pengumpulan data ke dalam aplikasi/program komputer, yaitu program SPSS
- c. *Scoring* yaitu data hasil yang dikategorikan baik akan mendapatkan skor 1, dan data hasil yang dikategorikan tidak baik akan mendapat skor 0. Kemudian dihitung dan dijumlahkan.

G. Analisis Data

Data skoring yang diperoleh dari hasil penilaian ahli Patologi Anatomi ditotal, dihitung rerata skoring. Nilai skor yang diberikan pada 5 parameter total ada 5 skor, apabila mencapai 80% dikatakan baik dengan skor 4-5 dan dikatakan tidak baik diberikan skor 0-3. Adanya perbedaan kualitas pewarnaan *Hematoxylin Eosin* sediaan jaringan kolon mencit dengan variasi waktu dehidrasi 30 menit, 25 menit, dan 20 menit dibandingkan 120 menit sesuai dengan SOP pada proses pematangan jaringan, dianalisis menggunakan *Kruskal Wallis Test* dengan nilai signifikan $p < 0,05$.