

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan desain *Posttest-Only Control Grup Design*. Menggunakan Teknik sampling *Purposive sampling*. Dengan 2 variabel yaitu variabel bebas berupa pewarnaan Ekstrak Daun Andong Merah konsentrasi (15%, 30%, 45%, 60%, 75%) sebagai pengganti eosin, variabel terikat berupa kualitas pewarnaan sediaan ginjal mencit. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi perbedaan kualitas pewarnaan sediaan histologi ginjal mencit pada proses pewarnaan Hematoxylin Eosin menggunakan ekstrak daun andong merah dengan variasi konsentrasi sebagai pengganti eosin yang kemudian diamati dan dinilai menggunakan *skoring* pada parameter inti sel, sitoplasma, intensitas pewarnaan dan kontras pewarnaan.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organi FMIPA Universitas Lampung dan Laboratorium Balai Veteriner Lampung.

2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Mei 2024.

C. Populasi dan Sampel

Populasi sampel dalam penelitian ini adalah Mencit di Laboratorium Balai Veteriner Lampung pada bulan April 2024. Sampel dalam penelitian ini merupakan bagian dari populasi yakni ginjal dari mencit jantan. Teknik pengumpulan sampel menggunakan teknik *Purposive sampling*. Penentuan jumlah sampel dan pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Federer (1963). Rumus Federer adalah rumus jumlah subjek tiap kelompok perlakuan dalam penelitian eksperimental. Rumusnya yaitu $(r - 1) (t - 1) \geq 15$ bahwa (t) merupakan jumlah perlakuan, sedangkan (r) merupakan pengulangan pada tiap perlakuan.

Perhitungan Rumus Federer:

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

$$(r - 1) (6 - 1) \geq 15$$

$$(r - 1) (5) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka didapatkan hasil bahwa pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali dalam 6 perlakuan. Jadi, sampel yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari seluruh populasi dengan teknik *Purposive sampling* berjumlah 24 sampel, dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

a. Kriteria Inklusi

- 1) Organ ginjal mencit jantan normal.
- 2) Blok paraffin ginjal mencit dilakukan pemotongan *sectioning* dengan ketebalan 3 μ m.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Slide hilang
- 2) Slide rusak atau pecah

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					
Pewarnaan Sediaan Ginjal Mencit dengan Eosin dan Ekstrak Daun Andong Merah	Pada proses pewarnaan menggunakan Eosin sebagai kontrol dan perlakuan dengan Ekstrak Daun Andong Merah.	1. Observasi untuk eosin 2. Pengenceran: $V_1M_1 = V_2M_2$ untuk ekstrak daun andong merah	1. SDS untuk eosin 2. Gelas ukur untuk pengenceran ekstrak daun andong merah	1. Eosin 2. Ekstrak daun andong merah 15% 3. Ekstrak daun andong merah 30% 4. Ekstrak daun andong merah 45% 5. Ekstrak daun andong merah 60% 6. Ekstrak daun andong merah 75%	Nominal

Variabel Terikat					
Kualitas Hasil Pewarnaan	Penilaian kualitas pewarnaan sediaan histologi ginjal mencit berdasarkan kejelasan inti sel, kejelasan sitoplasma, intensitas pewarnaan dan kontras pewarnaan.	Observasi dan skoring (Sravya et al. 2018) yang dimodifikasi berdasarkan BPMPPPI	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (4-6) Baik (7-8)	Nominal
Inti sel	Kualitas pewarnaan inri sel dinilai baik bila inti sel terpulas warna ungu kebiruan terlihat jelas	Observasi dan skoring (Sravya et al. 2018) yang dimodifikasi berdasarkan BPMPPPI	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal
Sitoplasma	Kualitas pewarnaan sitoplasma dinilai baik jika sitoplasma terpulas warna merah muda terlihat jelas	Observasi dan skoring (Sravya et al. 2018) yang dimodifikasi berdasarkan BPMPPPI	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal
Intensitas pewarnaan	Intensitas pewarnaan dinilai baik jika tingkat kejelasan warna oleh pewarnaan yang menyerap kuat/padat	Observasi dan skoring (Sravya et al. 2018) yang dimodifikasi berdasarkan BPMPPPI	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal
Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan dinilai baik jika terdapat perbedaan yang jelas antara kontras warna inti dengan sitoplasma	Observasi dan skoring (Sravya et al. 2018) yang dimodifikasi berdasarkan BPMPPPI	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal

E. Pengumpulan Data

1. Persiapan alat dan bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kertas saring, wadah kaca 3000 mL, rotatory evaporator, botol reagen warna gelap, pH meter, pinset, Skalpel no 22, tissue cassette, inkubator (38-42°C), tissue embedding, basemold, mikrotom, pisau mikrotom disposable, objek glass, pensil, flotation bath, hot plate, Rak pewarnaan, wadah pewarnaan, deck glass, mikroskop binokuler.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 95%, simplisia daun andong merah, ginjal mencit, buffer formalin 10%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 90% alkohol absolut, xylol, paraffin, aquades, Harris-haematoxylin, Eosin, ekstrak daun andong merah dan permount.

2. Cara Kerja

a. Prosedur Ekstraksi Daun Andong Merah Metode Maserasi

Daun andong merah yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun Andong Merah dengan kriteria daun muda (daun ke 2-3) yang dominan memiliki warna merah dan didapatkan dari Unit Konservasi Budidaya Biofarmaka (UKBB) Pusat Studi Biofarmaka Tropika IPB dalam bentuk serbuk simplisia, kemudian dilakukan ekstraksi Di Laboratorium Kimia Organik Universitas Lampung dengan cara:

- 1) Dimasukkan 500 gram serbuk simplisia halus daun andong merah kedalam botol/toples bertutup, lalu ditambahkan pelarut Ethanol 95% sebanyak 3000 ml dan diamkan selama 3x24 Jam suhu ruang sambil sesekali diaduk, setelah 3x24 Jam dipisahkan antara endapan dan filtratnya dengan kertas saring dan corong kaca.
- 2) Hasil filtrat yang didapat dilakukan penguapan menggunakan alat rotary evaporator pada suhu 41°C selama ≥ 6 Jam hingga didapat ekstrak kental. (SOP Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung, 2023)

- 3) Ekstrak kental yang didapat kemudian dilakukan pengenceran konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% dengan menggunakan rumus pengenceran.

b. Prosedur Pembuatan dan Pewarnaan Sediaan Histologi

1. Processing Jaringan

Tabel 3.2 Tahap Pematangan Jaringan

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 Jam
		Alkohol 95%	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
2	Clearing	Xylol	3 Jam
		Xylol	3 Jam
3	Impregnasi	Parafin	2 Jam
		parafin	2 Jam

Sumber: Manual Standar Balai Veteriner Lampung (2023)

2. Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Tabel 3.3 Tahap Pewarnaan Hematoxylin 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	Hematoxylin	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	Dimounting dengan Permount	

Sumber: Manual Standar Balai Veteriner Lampung (2023)

Tabel 3.4 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Andong 15%

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	Hematoxylin	5 Menit
12	Aquades	15 Menit
13	Ekstrak Daun Andong Merah 15%	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	Dimounting dengan Permout	

Tabel 3.5 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Andong 30%

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	Hematoxylin	5 Menit
12	Aquades	15 Menit
13	Ekstrak Daun Andong Merah 30%	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	Dimounting dengan Permout	

Tabel 3.6 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Andong 45%

No	Reagensia	Waktu
1	Xylol I	5 Menit
2	Xylol II	5 Menit
3	Xlylol 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	Hematoxylin	5 Menit
12	Aquades	15 Menit
13	Ekstrak Daun Andong Merah 45%	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	Dimounting dengan Permout	

Tabel 3.7 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Andong 60%

No	Reagensia	Waktu
1	Xylol I	5 Menit
2	Xylol II	5 Menit
3	Xlylol 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	Hematoxylin	5 Menit
12	Aquades	15 Menit
13	Ekstrak Daun Andong Merah 60%	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	Dimounting dengan Permout	

Tabel 3.8 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak Daun Andong 75%

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	Hematoxylin	5 Menit
12	Aquades	15 Menit
13	Ekstrak Daun Andong Merah 75%	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	Dimounting dengan Permount	

3. Interpretasi Hasil

Tabel 3.9 Kriteria Skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Histologis

No	Struktur	Deskripsi	Skor
1	Inti Sel	Warna ungu kebiruan pada inti sel tidak jelas	1
		Warna ungu kebiruan pada inti sel jelas	2
2	Sitoplasma	Warna merah muda pada sitoplasma tidak jelas	1
		Warna merah muda pada sitoplasma jelas	2
3	Intensitas Pewarnaan	Tingkat kejelasan warna oleh pewarnaan yang menyerap lemah/pudar	1
		tingkat kejelasan warna oleh pewarnaan yang menyerap kuat/padat	2
4	Kontras pewarnaan	Tidak terdapat perbedaan yang jelas antara kontras warna inti yang berwarna ungu kebiruan dengan sitoplasma yang berwarna merah muda	1
		Terdapat perbedaan yang jelas antara kontras warna inti yang berwarna ungu kebiruan dengan sitoplasma yang berwarna merah muda	2

Sumber: Sravya *et al.*, 2018 yang dimodifikasi BPMPPPI

Kualitas pewarnaan dievaluasi dan dinilai berdasarkan kriteria skoring pada Tabel 3.9. Hasil skoring kualitas pewarnaan kemudian dihitung jumlah nilai skor dan diklasifikasikan hasil kualitas sediaan baik atau tidak baik berdasarkan tabel Tabel 3.10.

Tabel 3.10 Skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Histologis

No	Deskripsi	Nilai
1	Tidak Baik	4-6
2	Baik	7-8

Sumber: Sravya *et al.*, 2018 yang dimodifikasi BPMPPi

F. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

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

- a. Coding yaitu pemberian kode untuk memudahkan pengentrian data Ketika dimasukkan ke computer (data entry).
- b. Entry Data yaitu memasukkan data-data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi/program computer, misalnya program SPSS for windows.
- c. Skoring yaitu pemberian skor pada variabel yang diperiksa atau variabel terikat seperti kejelasan inti sel, kejelasan sitoplasma, intensitas pewarnaan, dan kontras pewarnaan bersasarkan kriteria skoring yang telah ditentukan.

2. Analisis Data

Data skoring diperoleh dari hasil penilaian ahli ditotal dan dihitung rerata skoring. Untuk mengetahui adanya perbedaan hasil kualitas pewarnaan sediaan antara satu kelompok dengan kelompok lainnya maka data dianalisis menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis Test* untuk membandingkan penilaian antara lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan secara keseluruhan (hematoxylin-eosin, hematoxylin-ekstrak daun andong merah 15%, hematoxylin-ekstrak daun andong merah 30%, hematoxylin-ekstrak daun andong merah 45%, hematoxylin-ekstrak daun andong merah 60%, dan hematoxylin-ekstrak daun andong merah 75%). Pengambilan keputusan H_0 ditolak jika tingkat signifikansi $p < 0,05$.

G. Ethical Clearence

Penelitian ini dilakukan setelah mendapatkan izin dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan No.013/KEPK-TJK/I/2024 pada Tanggal 6 Februari Tahun 2024.