

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimen. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan kualitas preparat histologi jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*) menggunakan fiksasi dengan aktivitas pemanasan pada suhu 40°C dengan perbandingan waktu 1 jam, 2 jam, 3 jam dan 4 jam dan tidak menggunakan pemanasan, pemanasan pada tahap pematangan jaringan yang diberikan perlakuan satu atau lebih kelompok eksperimen. Sampel jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*) diamati dengan dua perlakuan yaitu menggunakan proses pemanasan dengan suhu 40°C dengan perbandingan waktu 1 jam, 2 jam, 3 jam dan 4 jam dan tidak menggunakan pemanasan. Adanya perbedaan dalam kualitas sediaan preparat yang didapat, maka akan dilakukan uji *Kruskal Wallis Test* dengan nilai signifikansi ($p \text{ value} < 0,05$).

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Balai Veteriner Lampung.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah jaringan ginjal yang masuk ke Instalasi Patologi Anatomi Balai Veteriner Lampung, pada bulan Mei 2024. Sampel dalam penelitian ini merupakan bagian dari populasi yakni ginjal dari mencit yang dilakukan proses pemotongan pada jaringan.

2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini sebanyak 25 yang menggunakan jaringan ginjal mencit yang di berikan perlakuan dengan cara pemanasan dengan suhu 40°C dengan waktu perbandingan 1 jam, 2 jam, 3 jam dan 4 jam dan tidak menggunakan pemanasan (20-25°C) suhu kamar. Penentuan jumlah sampel dan pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Faderer (1963).

Rumus Federer adalah rumus jumlah subjek tiap kelompok perlakuan dalam penelitian eksperimen. Total sampel yang dilakukan penelitian dihitung menggunakan rumus Federer, sebagai berikut:

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15$$

$$n \geq 5$$

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					
Pemanasan dengan suhu 40°C pada proses fiksasi jaringan ginjal dan tanpa pemanasan (20-25°C) suhu kamar	Proses fiksasi dilakukan dengan proses pemanasan jaringan ginjal dilakukan pengecatan dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin.	Pengamatan oleh dokter hewan balai veteriner lampung	- Oven - Timer	40°C 1 Jam 2 Jam 3 Jam 4 Jam	Nominal
Variabel Terikat					
Kualitas Sediaan histologi ginjal mencit	Penilaian kualitas sediaan histopatologi jaringan ginjal mencit berdasarkan enam parameter antara lain Inti Sel, Sitoplasma, Ketebalan merata, tanpa lipatan, goresan mata pisau merata, dan kontras pewarnaan.	Obsevasi dan skoring BPMPPI, yang dimodifikasi Sravya <i>et al.</i> , 2018.	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik 6-7 Kurang Baik 8-9 Baik 10-12	Nominal

Inti Sel	Inti sel yang bersifat asidofilik akan mewarnai oleh pewarna asam (Hematoxylin) sehingga berwarna biru.	Ovservasi dan skoring BPPMPI, yang dimodifikasi Sravya <i>et al.</i> , 2018.	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal
Sitoplasma	Sitoplasma sel yang bersifat asidofilik akan mewarnai oleh pewarna asam (Eosin) sehingga berwarna merah.	Ovservasi dan skoring BPPMPI, yang dimodifikasi Sravya <i>et al.</i> , 2018	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal
Ketebalan	Proses pemotongan blok jaringan merata dengan ketebalan 3-5 μ m	Ovservasi dan skoring BPPMPI, yang dimodifikasi Sravya <i>et al.</i> , 2018	Mikrotom dan lembar observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal
Tanpa Lipatan	Proses pengambangan pita paraffin.	Ovservasi dan skoring BPPMPI, yang dimodifikasi Sravya <i>et al.</i> , 2018	Waterbath dan lembar observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal
Goresan mata pisau	Proses pemotongan merata tidak ada goresan mata pisau yang tidak rata.	Ovservasi dan skoring BPPMPI, yang dimodifikasi Sravya <i>et al.</i> , 2018	Pisau dan lembar observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal
Kontras pewarnaan	Perbedaan warna antara inti sel dengan sitoplasma. Inti sel berwarna keunguan dan sitoplasma berwarna merah.	Ovservasi dan skoring BPPMPI, yang dimodifikasi Sravya <i>et al.</i> , 2018	Mikroskop dan lembar observasi	Tidak baik 1 Baik 2	Nominal

Sumber: BPPMPI, 2019 yang dimodifikasi Sravya *et al.*, 2018

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Persiapan Penelitian

- a. Melakukan Pra-survey pada lokasi penelitian yaitu di Balai Veteriner Lampung.
- b. Pengajuan surat izin penelitian Direktur Poltekkes Tanjungkarang untuk diteruskan kepada Balai Veteriner Lampung.
- c. Setelah surat izin dari Balai Veteriner Lampung, kemudian melakukan penelitian di Balai Veteriner Lampung.

2. Prosedur Pemeriksaan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

Tissue processor, tissue embedding, Rak pengecatan, pinset, wadah pewarnaan, pipet tetes/sput, deck glass, preparate, mikrotom, oven, blade, cassette embedding dan waterbath.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

Buffer formalin 10%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol absolut, aquadest, xylol, hematoxylin, eosin, entelan dan specimen jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*).

3. Cara Kerja

a. Processing Jaringan

Tabel 3.2 Tahap Processing Jaringan

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Fiksasi	Formalin buffer 10%	2 Jam
2	Dehidrasi	Formalin buffer 10%	2 Jam
		Alkohol 80%	2 Jam
		Alkohol 95%	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
3	Clearing	Alkohol absolut	2 Jam
		Xylol	3 Jam
4	Impregnasi	Xylol	3 Jam
		Parafin	2 Jam
5	Embedding	Parafin	2 Jam
		Parafin	2 Jam

Sumber: SOP Balai Veteriner Lampung, 2023

Tabel 3.3 Tahap Processing Jaringan Variasi Waktu Pada Fiksasi 1 Jam Suhu 40°C

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Fiksasi	Formalin buffer 10% pada suhu 40°C	1 Jam
2	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 Jam
		Alkohol 95%	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
3	Clearing	Xylol	3 Jam
		Xylol	3 Jam
4	Impregnasi	Parafin	2 Jam
		Parafin	2 Jam
5	Embedding	Parafin	

Sumber: SOP Balai Veteriner Lampung, 2023

Tabel 3.4 Tahap Processing Jaringan Variasi Waktu Pada Fiksasi 2 Jam Suhu 40°C

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Fiksasi	Formalin buffer 10% pada suhu 40°C	2 Jam
2	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 Jam
		Alkohol 95%	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
3	Clearing	Xylol	3 Jam
		Xylol	3 Jam
4	Impregnasi	Parafin	2 Jam
		Parafin	2 Jam
5	Embedding	Parafin	

Sumber: SOP Balai Veteriner Lampung, 2023

Tabel 3.5 Tahap Processing Jaringan Variasi Waktu Pada Fiksasi 3 Jam Suhu 40°C

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Fiksasi	Formalin buffer 10% pada suhu 40°C	3 Jam
2	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 Jam
		Alkohol 95%	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
3	Clearing	Xylol	3 Jam
		Xylol	3 Jam
4	Impregnasi	Parafin	2 Jam
		Parafin	2 Jam
5	Embedding	Parafin	

Sumber: SOP Balai Veteriner Lampung, 2023

Tabel 3.6 Tahap Processing Jaringan Variasi Waktu Pada Fiksasi 4 Jam Suhu 40°C

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Fiksasi	Formalin buffer 10% pada suhu 40°C	4 Jam
2	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 Jam
		Alkohol 95%	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
		Alkohol absolut	2 Jam
3	Clearing	Xylol	3 Jam
		Xylol	3 Jam
4	Impregnasi	Parafin	2 Jam
		Parafin	2 Jam
5	Embedding	Parafin	

Sumber: SOP Balai Veteriner Lampung, 2023

a. Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

Tabel 3.7 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	15Menit
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

4. Interpretasi Kualitas Hasil Sediaan Histopatologi

Kualitas sediaan histopatologi dinilai oleh dokter spesialis patologi anatomi. Hasil skoring kualitas pewarnaan kemudian dihitung jumlah nilai skor dan diklasifikasikan hasil kualitas sediaan baik, tidak baik atau kurang baik pada table dibawah.

Tabel 3.8 Skoring Penilaian Kualitas Sediaan

No	Deskripsi	Nilai
1	Tidak Baik	6-7
2	Kurang Baik	8-9
3	Baik	10-12

Sumber : BPMPPPI, 2019 yang dimodifikasi Sravya *et al.*, 2018

Tabel 3.9 Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan

No	Parameter penilaian	Deskripsi	Skor
1	Inti sel	Inti sel tidak jelas	1
		Inti sel jelas	2
2	Sitoplasma	Sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas	1
		Sitoplasma dan jaringan ikat jelas	2
3	Ketebalan	Tidak merata	1
		Merata	2
4	Lipatan	Ada lipatan	1
		Tanpa lipatan	2
5	Goresan mata pisau	Tidak merata	1
		Merata	2
6	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik	1
		Kontras perwarnaan baik	2

Sumber : BPMPPPI, 2019 yang dimodifikasi Sravya *et al.*, 2018

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 kedalam aplikasi/program komputer, misalnya program SPSS for Windows.
- c. Tabulating Setelah data dientry hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk distriusi frekuensi berupa tabel.
- d. Cleaning yaitu apabila semua data selesai dimasukkan, perlu dicek kembali untuk melihat kemungkinan adanya kesalahan kode, ketidaklengkapan, dan lainnya kemudian dilakukan pembetulan atau koreksi dan membersihkan data-data yang tidak diperlukan.

2. Analisa Data

Pada penelitian ini, data yang diperoleh dari hasil pematangan dan pewarnaan dengan cara fiksasi menggunakan pemanasan dengan suhu dan waktu tertentu adalah data *scoring* yang diperoleh dari hasil penilaian ahli Patologi Anatomi ditotal, dihitung rerata skoring. Nilai skor tidak baik 6-7, kurang baik 8-9 dan baik 10-12 (BPMPPPI, 2019 yang dimodifikasi Sravya *et al.*, 2018). Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan hasil kualitas sediaan jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*) antara satu kelompok dengan

kelompok lainnya maka data dianalisis menggunakan uji statistic *Kruskal Wallis Test* pada tingkat signifikansi ($p\ value < 0,05$).

G. Ethical Clearance

Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan ethical clearance dari Komisi Etik Poltekkes Tanjungkarang dengan No.357/KEPK-TJK/III/2024 pada tanggal 25 Maret 2024. Hewan sebagai subjek dengan menggunakan spesimen jaringan ginjal mencit sebagai sampel yang akan diperiksa. Penelitian ini menggunakan standar prosedur yang berlaku.