

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimen. Sampel jaringan paru-paru mencit diamati dengan perlakuan yang sama tetapi menggunakan cairan *clearing* dan *deparafinisasi* yang berbeda yaitu *xylol*, minyak kayu putih 100%, *eucalyptus oil* original, dan *eucalyptus oil* kombinasi (*lavender*, *green tea* dan *rose*). Dilakukan uji analisa data statistik menggunakan *Kruskal-Wallis* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$ pada hasil skoring terhadap kriteria kualitas sediaan jaringan paru-paru mencit (*Mus musculus*) dengan penggunaan *xylol*, minyak kayu putih 100%, *eucalyptus oil* original, dan *eucalyptus oil* kombinasi pada proses *clearing* dan *deparafinisasi*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian :

Penelitian dilakukan pada Laboratorium Patologi Anatomi Balai Veteriner Lampung.

2. Waktu :

Penelitian dilaksanakan pada Maret 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini menggunakan 30 preparat sediaan paru-paru mencit (*Mus musculus*).

2. Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah preparat sediaan organ paru-paru mencit. Terdapat 6 kelompok perlakuan yaitu perlakuan *clearing* dan *deparafinisasi* dengan menggunakan *xylol*, minyak kayu putih, *eucalyptus oil* original dan kombinasi (*lavender*, *green tea* dan *rose*). total sampel yang digunakan adalah 30 preparat sediaan paru-paru mencit yang ditentukan berdasarkan rumus Federer, sebagai berikut:

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

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

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

$$n - 1 \geq 15/4$$

$$n - 1 \geq 3.75 (4)$$

$$n \geq 4 + 1$$

$$n \geq 5$$

$$\text{total sampel: } n \times t = 5 \times 6 = 30$$

Keterangan: n = jumlah sampel tiap kelompok

t = banyak kelompok

Sampel penelitian adalah total sampel preparat sediaan paru-paru mencit yang memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi sebagai

a. Kriteria Inklusi

- 1) Preparat dengan sediaan jaringan yang sama
- 2) Preparat dengan ketebalan pemotongan $3\mu\text{m}$
- 3) Preparat dengan penggunaan reagen pewarnaan baru
- 4) Preparat dengan penggunaan minyak kayu putih 100% brand Cap Lang
- 5) Preparat dengan penggunaan *eucalyptus oil* original brand Cap Lang
- 6) Preparat dengan penggunaan *eucalyptus oil* varian *lavender* brand Cap Lang
- 7) Preparat dengan penggunaan *eucalyptus oil* varian *green tea* brand Cap Lang
- 8) Preparat dengan penggunaan *eucalyptus oil* varian *rose* brand Cap Lang

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Preparat rusak
- 2) Preparat pecah

D. Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas <i>Xylol</i>	<i>Xylol</i> adalah agen pada proses <i>clearing</i> dan <i>deparafinisasi</i> sebagai <i>control</i> .	Observasi	Lembar MSDS dan Etiket	<i>Xylol</i>	Nominal
Minyak kayu putih 100% cap lang	Proses <i>clearing</i> dan <i>deparafinisasi</i> dengan menggunakan	Observasi	Lembar MSDS dan Etiket	Bukan <i>xylol</i>	Nominal

<i>Eucalyptus oil</i> original cap lang	minyak kayu putih 100% cap lang sebagai perlakuan. Proses <i>clearing</i> dan <i>deparafinisasi</i> dengan menggunakan <i>eucalyptus oil</i> original cap lang sebagai perlakuan.	Observasi	Lembar MSDS dan Etiket	Bukan <i>xylol</i>	Nominal
<i>Eucalyptus oil</i> kombinasi (<i>lavender</i>, <i>green tea</i> dan <i>rose</i>) cap lang	Proses <i>clearing</i> dan <i>deparafinisasi</i> dengan menggunakan kombinasi (<i>lavender</i> , <i>green tea</i> dan <i>rose</i>) cap lang sebagai perlakuan.	Observasi	Lembar MSDS dan Etiket	Bukan <i>xylol</i>	Nominal
Variabel Terikat					
Kualitas hasil pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE) pada preparat sediaan paru-paru mencit	Kualitas hasil pewarnaan HE pada preparat sediaan paru-paru mencit yang dihitung jumlah hasil skoringnya secara mikroskopis dengan mengamati inti sel, sitoplasma, intensitas warna, dan keseragaman warna.			Tidak baik 5-6 baik 7-8	
Inti Sel	Inti sel berbentuk oval atau bulat dan berada di tengah sel. Inti sel ketika diwarnai dengan <i>Hematoxylin</i> akan menghasilkan warna ungu.	Metode skoring (Srivaya <i>et al.</i> , 2018) dengan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	Tidak Baik 1 Baik 2	Nominal
Sitoplasma	Sitoplasma merupakan cairan yang berada diantara inti sel dan membran sel. Sitoplasma ketika diwarnai dengan <i>Eosin</i> akan menghasilkan warna merah muda.	Metode skoring (Srivaya <i>et al.</i> , 2018) dengan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	Tidak Baik 1 Baik 2	Nominal
Intensitas Warna	Intensitas warna yang baik akan menghasilkan warna cerah atau pekat terhadap sediaan yang telah diwarnai.	Metode skoring (Srivaya <i>et al.</i> , 2018) dengan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	Tidak Baik 1 Baik 2	Nominal
Keseragaman warna	Keseragaman warna yang jelas dan dapat diidentifikasi dengan baik.	Metode skoring (Srivaya <i>et al.</i> , 2018) dengan modifikasi.	Mikroskop dan Lembar Observasi	Tidak Baik 1 Baik 2	Nominal

E. Teknik Pengumpulan

1. Alat : *Beaker glass*, pinset, *object glass*, *cover glass*, dan satu set pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE).
2. Bahan : Organ paru-paru mencit, *xylol*, minyak kayu putih brand Cap Lang, *eucalyptus oil* original, dan *eucalyptus oil* kombinasi (*lavender*, *green tea* dan *rose*) brand Cap Lang, dan cairan pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE).
3. Cara Kerja Pembuatan Preparat
 - a. Mencit dibius dan direntangkan diatas *sterofoam* lalu dilakukan pembedahan menggunakan pisau pada bagian ventral mencit
 - b. Tahap pematangan jaringan pada preparat jaringan

Tabel 3.1 Prosedur pematangan jaringan dengan penggunaan *xylol* pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Fiksasi dengan cairan NBF 10%	24 jam
2.	Dehidrasi dengan alkohol 80%	2 jam
3.	Dehidrasi dengan alkohol 95%	2 jam
4.	Dehidrasi dengan alkohol absolut I	2 jam
5.	Dehidrasi dengan alkohol absolut II	3 jam
6.	Clearing dengan xylol I	3 jam
7.	Clearing dengan xylol II	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

Sumber : (Balai Veteriner Lampung, 2023).

Tabel 3.2 Prosedur pematangan jaringan dengan penggunaan minyak kayu putih pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Fiksasi dengan cairan NBF 10%	24 jam
2.	Dehidrasi dengan alkohol 80%	2 jam
3.	Dehidrasi dengan alkohol 95%	2 jam
4.	Dehidrasi dengan alkohol absolut I	2 jam
5.	Dehidrasi dengan alkohol absolut II	3 jam
6.	Clearing dengan minyak kayu putih I	3 jam
7.	Clearing dengan minyak kayu putih II	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

Tabel 3.3 Prosedur pematangan jaringan dengan penggunaan *eucalyptus oil* pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Fiksasi dengan cairan NBF 10%	24 jam
2.	Dehidrasi dengan alkohol 80%	2 jam
3.	Dehidrasi dengan alkohol 95%	2 jam
4.	Dehidrasi dengan alkohol absolut I	2 jam
5.	Dehidrasi dengan alkohol absolut II	3 jam
6.	Clearing dengan eucalyptus oil I	3 jam
7.	Clearing dengan eucalyptus oil II	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

Tabel 3.4 Prosedur pematangan jaringan dengan penggunaan *eucalyptus oil* varian *lavender* pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Fiksasi dengan cairan NBF 10%	24 jam
2.	Dehidrasi dengan alkohol 80%	2 jam
3.	Dehidrasi dengan alkohol 95%	2 jam
4.	Dehidrasi dengan alkohol absolut I	2 jam
5.	Dehidrasi dengan alkohol absolut II	3 jam
6.	Clearing dengan <i>eucalyptus oil</i> varian <i>lavender</i> I	3 jam
7.	Clearing dengan <i>eucalyptus oil</i> varian <i>lavender</i> II	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

Tabel 3.5 Prosedur pematangan jaringan dengan penggunaan *eucalyptus oil* varian *green tea* pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Fiksasi dengan cairan NBF 10%	24 jam
2.	Dehidrasi dengan alkohol 80%	2 jam
3.	Dehidrasi dengan alkohol 95%	2 jam
4.	Dehidrasi dengan alkohol absolut I	2 jam
5.	Dehidrasi dengan alkohol absolut II	3 jam
6.	Clearing dengan <i>eucalyptus oil</i> varian <i>green tea</i> I	3 jam
7.	Clearing dengan <i>eucalyptus oil</i> varian <i>green tea</i> II	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

Tabel 3.6 Prosedur pematangan jaringan dengan penggunaan *eucalyptus oil* varian *rose* pada proses *clearing*

No.	Tahap	Waktu
1.	Fiksasi dengan cairan NBF 10%	24 jam
2.	Dehidrasi dengan alkohol 80%	2 jam
3.	Dehidrasi dengan alkohol 95%	2 jam
4.	Dehidrasi dengan alkohol absolut I	2 jam
5.	Dehidrasi dengan alkohol absolut II	3 jam
6.	Clearing dengan <i>eucalyptus oil</i> varian <i>rose</i> I	3 jam
7.	Clearing dengan <i>eucalyptus oil</i> varian <i>rose</i> II	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

- c. Organ paru-paru mencit diletakan ke dalam *base mold* dan atur posisi jaringan dengan benar menggunakan pinset dan tuang parafin cair hingga
- d. Cetakan *base mold* diletakan pada *freezer* hingga beku lalu lepaskan hasil cetakan.
- e. Pemotongan *trimming* dan *sectioning* organ menggunakan mikrotom.
- f. Pita parafin diletakan di *waterbath* dengan suhu $\leq 60^{\circ}\text{C}$ dan ambil pita parafin menggunakan *object glass*.
- g. *Hematoxylin Eosin* (HE) digunakan pada proses pewarnaan.

Tabel 3.7 Prosedur Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan penggunaan *xylol* pada proses *clearing* dan *deparafiniasi*

No.	Tahap	Waktu
1.	Deparafinisasi ke dalam <i>xylol</i> I, <i>xylol</i> II, dan <i>xylol</i> III	5 menit
2.	Masukan ke dalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II	5 menit
3.	Masukan ke dalam alkohol 95% I dan alkohol 95% II	5 menit
4.	Masukan ke dalam alkohol 90% I dan alkohol 90% II	5 menit
5.	Rendam dengan aquadest	1 menit
6.	Masukan ke dalam pewarna <i>Harris-Hematoxylin</i>	5 menit
7.	Rendam dengan aquadest	15 menit
8.	Masukan ke dalam pewarna <i>Eosin</i>	2 menit
9.	Masukan ke dalam alkohol 90% III dan alkohol 90% IV	3 menit
10.	Masukan ke dalam alkohol 95% III dan alkohol 95% IV	3 menit
11.	Masukan ke dalam alkohol absolut III dan alkohol absolut IV	3 menit
12.	Masukan ke dalam <i>xylol</i> IV dan <i>xylol</i> V (<i>Clearing</i>)	5 menit
13.	Proses penutupan jaringan diantara <i>deck glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan (<i>Mounting</i>)	

Sumber : (Balai Veteriner Lampung, 2023)

Tabel 3.8 Prosedur Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan penggunaan minyak kayu putih pada proses *clearing* dan *deparafiniasi*

No.	Tahap	Waktu
1.	Deparafinisasi ke dalam minyak kayu putih I, II, dan III	5 menit
2.	Masukan ke dalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II	5 menit
3.	Masukan ke dalam alkohol 95% I dan alkohol 95% II	5 menit
4.	Masukan ke dalam alkohol 90% I dan alkohol 90% II	5 menit
5.	Rendam dengan aquadest	1 menit
6.	Masukan ke dalam pewarna <i>Harris-Hematoxylin</i>	5 menit
7.	Rendam dengan aquadest	15 menit
8.	Masukan ke dalam pewarna <i>Eosin</i>	2 menit
9.	Masukan ke dalam alkohol 90% III dan alkohol 90% IV	3 menit
10.	Masukan ke dalam alkohol 95% III dan alkohol 95% IV	3 menit
11.	Masukan ke dalam alkohol absolut III dan alkohol absolut IV	3 menit
12.	Masukan ke dalam minyak kayu putih IV dan minyak kayu putih V (<i>Clearing</i>)	5 menit
13.	Proses penutupan jaringan diantara <i>deck glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan (<i>Mounting</i>)	

Tabel 3.9 Prosedur Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan penggunaan *eucalyptus oil* pada proses *clearing* dan *deparafiniasi*

No.	Tahap	Waktu
1.	Deparafinisasi ke dalam <i>eucalyptus oil</i> I, II, dan III	5 menit
2.	Masukan ke dalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II	5 menit
3.	Masukan ke dalam alkohol 95% I dan alkohol 95% II	5 menit
4.	Masukan ke dalam alkohol 90% I dan alkohol 90% II	5 menit
5.	Rendam dengan aquadest	1 menit
6.	Masukan ke dalam pewarna <i>Harris-Hematoxylin</i>	5 menit
7.	Rendam dengan aquadest	15 menit
8.	Masukan ke dalam pewarna <i>Eosin</i>	2 menit
9.	Masukan ke dalam alkohol 90% III dan alkohol 90% IV	3 menit
10.	Masukan ke dalam alkohol 95% III dan alkohol 95% IV	3 menit
11.	Masukan ke dalam alkohol absolut III dan alkohol absolut IV	3 menit
12.	Masukan ke dalam <i>eucalyptus oil</i> IV dan <i>eucalyptus oil</i> V (<i>Clearing</i>)	5 menit
13.	Proses penutupan jaringan diantara <i>deck glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan (<i>Mounting</i>)	

Tabel 3.10 Prosedur Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan penggunaan *eucalyptus oil* varian *lavender* pada proses *clearing* dan *deparafiniasi*

No.	Tahap	Waktu
1.	Deparafinisasi ke dalam <i>eucalyptus oil</i> varian <i>lavender</i> I, II, dan III	5 menit
2.	Masukan ke dalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II	5 menit
3.	Masukan ke dalam alkohol 95% I dan alkohol 95% II	5 menit
4.	Masukan ke dalam alkohol 90% I dan alkohol 90% II	5 menit
5.	Rendam dengan aquadest	1 menit
6.	Masukan ke dalam pewarna <i>Harris-Hematoxylin</i>	5 menit
7.	Rendam dengan aquadest	15 menit
8.	Masukan ke dalam pewarna <i>Eosin</i>	2 menit
9.	Masukan ke dalam alkohol 90% III dan alkohol 90% IV	3 menit
10.	Masukan ke dalam alkohol 95% III dan alkohol 95% IV	3 menit
11.	Masukan ke dalam alkohol absolut III dan alkohol absolut IV	3 menit
12.	Masukan ke dalam <i>eucalyptus oil</i> varian <i>lavender</i> IV dan V (<i>Clearing</i>)	5 menit
13.	Proses penutupan jaringan diantara <i>deck glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan (<i>Mounting</i>)	

Tabel 3.11 Prosedur Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan penggunaan *eucalyptus oil* varian *green tea* pada proses *clearing* dan *deparafiniasi*

No.	Tahap	Waktu
1.	Deparafinisasi ke dalam <i>eucalyptus oil</i> varian <i>green tea</i> I, II, dan III	5 menit
2.	Masukan ke dalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II	5 menit
3.	Masukan ke dalam alkohol 95% I dan alkohol 95% II	5 menit
4.	Masukan ke dalam alkohol 90% I dan alkohol 90% II	5 menit
5.	Rendam dengan aquadest	1 menit
6.	Masukan ke dalam pewarna <i>Harris-Hematoxylin</i>	5 menit
7.	Rendam dengan aquadest	15 menit
8.	Masukan ke dalam pewarna <i>Eosin</i>	2 menit
9.	Masukan ke dalam alkohol 90% III dan alkohol 90% IV	3 menit
10.	Masukan ke dalam alkohol 95% III dan alkohol 95% IV	3 menit
11.	Masukan ke dalam alkohol absolut III dan alkohol absolut IV	3 menit
12.	Masukan ke dalam <i>eucalyptus oil</i> varian <i>green tea</i> IV dan V (<i>Clearing</i>)	5 menit
13.	Proses penutupan jaringan diantara <i>deck glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan (<i>Mounting</i>)	

Tabel 3.12 Prosedur Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan penggunaan *eucalyptus oil* varian *rose* pada proses *clearing* dan *deparafiniasi*

No.	Tahap	Waktu
1.	Deparafinisasi ke dalam <i>eucalyptus oil</i> varian <i>rose</i> I, II, dan III	5 menit
2.	Masukan ke dalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II	5 menit
3.	Masukan ke dalam alkohol 95% I dan alkohol 95% II	5 menit
4.	Masukan ke dalam alkohol 90% I dan alkohol 90% II	5 menit
5.	Rendam dengan aquadest	1 menit
6.	Masukan ke dalam pewarna <i>Harris-Hematoxylin</i>	5 menit
7.	Rendam dengan aquadest	15 menit
8.	Masukan ke dalam pewarna <i>Eosin</i>	2 menit
9.	Masukan ke dalam alkohol 90% III dan alkohol 90% IV	3 menit
10.	Masukan ke dalam alkohol 95% III dan alkohol 95% IV	3 menit
11.	Masukan ke dalam alkohol absolut III dan alkohol absolut IV	3 menit
12.	Masukan ke dalam <i>eucalyptus oil</i> varian <i>rose</i> IV dan V (<i>Clearing</i>)	5 menit
13.	Proses penutupan jaringan diantara <i>deck glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan (<i>Mounting</i>)	

- h. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan menilai kualitas preparat sediaan paru-paru mencit dengan metode skoring pada parameter inti sel, sitoplasma, intensitas warna, dan keseragaman warna.
- i. Pengolahan data dilakukan berdasarkan skoring hasil pengamatan sediaan paru-paru mencit yang telah melalui proses histoteknik.

F. Pengolahan Data

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

1. *Coding* adalah pemberian kode untuk memudahkan pengentrian data ketika dimasukkan ke komputer (*data entry*).
2. *Entry Data* adalah memasukan data-data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi SPSS
3. *Scoring* adalah pemberian skor terhadap parameter penilaian kualitas sediaan.

G. Analisis data

Data skoring yang didapatkan dari hasil penilaian Patologi Anatomi ditotal, dan dihitung rata-rata skoring. Dilakukan analisis menggunakan uji statistik *Kruskal-Wallis* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$ terhadap kualitas sediaan jaringan paru-paru mencit (*Mus musculus*) dengan penggunaan *xylol*, minyak kayu putih, *eucalyptus oil* original, dan *eucalyptus oil* kombinasi (*lavender*, *green tea* dan *rose*) pada proses *clearing* dan *deparafinisasi*.