

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu kuantitatif eksperimen dengan variabel bebas yaitu proses pewarnaan sediaan histologi organ hati mencit dengan ekstrak buah murbei pada konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%, variabel terikat yaitu kualitas sediaan histologi organ hati mencit dilihat dari inti sel, sitoplasma, intensitas pewarnaan, dan keseragaman warna. Desain penelitian yang digunakan yaitu *komparatif* dan tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui perbandingan kualitas sediaan jaringan organ hati mencit (*Mus musculus*) yang diwarnai dengan Hematoxylin dan ekstrak buah Murbei (*Morus alba L.*) konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35% sebagai pewarna alternatif pengganti Hematoxylin pada pewarnaan Hematoxylin Eosin.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Lokasi pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Balai Veteriner Provinsi Lampung.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2025.

C. Populasi dan Sampel

Populasi sampel pada penelitian ini yaitu kumpulan preparat sediaan jaringan hati mencit (*Mus musculus*) yang diwarnai oleh Hematoxylin Eosin dan membandingkan antara pewarna Hematoxylin dan ekstrak buah murbei sebagai pengganti Hematoxylin. Buah murbei yang digunakan untuk pewarnaan adalah buah yang masih segar, bersih dari kotoran, berwarna hitam pekat dan sudah matang. Agar proses penyerapan berjalan dengan cepat, buah yang digunakan harus dalam keadaan halus dan segar (Susanti *et al.*, 2020).

Total sampel yang akan digunakan pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer, sebagai berikut:

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

Keterangan:

t : jumlah tiap kelompok

n : Besar sampel setiap kelompok

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan dengan menggunakan rumus Federer didapatkan besar sampel setiap kelompok yaitu 4, artinya ada 4 kali pengulangan dalam satu kelompok. Sehingga dalam penelitian ini jumlah sampel yang digunakan yaitu $4 \times 6 = 24$ preparat jaringan hati mencit.

Sampel sediaan organ hati mencit yang digunakan pada penelitian ini harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Slide dengan ketebalan pemotongan blok parafin menggunakan ukuran $4\mu\text{m}$
- 2) Slide organ hati mencit

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Ketebalan lebih atau kurang dari $4\mu\text{m}$
- 2) Slide hilang
- 3) Slide rusak atau pecah

D. Variabel dan Definisi Operasional

Variabel penelitian	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Variabel bebas:					
Hematoxylin	Hematoxylin merupakan pewarna sintetis yang memberikan warna biru inti sel	Observasi	Lembar MSDS dan Etiket	Hematoxylin	Nominal
Ekstrak Buah Murbei	Ekstrak buah murbei merupakan zat yang dihasilkan dari buah murbei yang telah di ekstraksi	$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$, Metode Maserasi	<i>Beaker glass</i> (Ivana <i>et al.</i> , 2022)	1. Murbei 15% 2. Murbei 20% 3. Murbei 25% 4. Murbei 30% 5. Murbei 35%	Nominal
Variabel terikat: kualitas pewarnaan Hematoxylin Eosin pada sediaan hati mencit	Sediaan hati mencit yang diwarnai dengan Hematoxylin Eosin dan ekstrak buah murbei dilihat dari inti sel, sitoplasma, keseragaman warna, dan intensitas pewarnaan secara mikroskopis	Metode skoring (Sravya <i>et al.</i> , 2018) dimodifikasi oleh BPMPPPI	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (4-6) Baik (7-8)	Ordinal
Inti sel	Inti sel berwarna biru dan terletak di tengah sel	Metode skoring (Sravya <i>et al.</i> , 2018) dimodifikasi oleh BPMPPPI	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (1) Baik (2)	Ordinal
Sitoplasma	Sitoplasma berwarna merah	Metode skoring (Sravya <i>et al.</i> , 2018) dimodifikasi	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (1) Baik (2)	Ordinal

oleh BPMPPPI					
Keseragaman warna	Keseragaman warna jelas, warna merata dan dapat diidentifikasi	Metode skoring (Sravya <i>et al.</i> , 2018) dimodifikasi oleh BPMPPPI	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (1) Baik (2)	Ordinal
Intensitas pewarnaan	Intensitas warna tampak jernih, bebas dari kotoran dan dapat diidentifikasi	Metode skoring (Sravya <i>et al.</i> , 2018) dimodifikasi oleh BPMPPPI	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (1) Baik (2)	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Alat

Preparat, *deck glass*, pisau mikrotom *disposable*, mikrotom, *embedding*, *basemold*, *cassete embedding*, *tissue processor*, *tissue embedding*, jarum ose, inkubator (38-42° C), *flotation bath*, mikroskop, pensil, pinset, scalpel no.22, *hot plate*, *wax dispenser*, rak pengecatan, dan papan potong.

2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi:

Sampel jaringan hati mencit (*Mus musculus*), alkohol absolut, alkohol 80%, alkohol 95%, larutan xylol, parafin, larutan neutral buffer formalin 10%, pewarna Hematoxylin dan Eosin, ekstrak buah murbei (*Morus alba L.*) konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%.

3. Pembuatan simplisia

Simplisia merupakan hasil penghalusan sampel, pembuatan simplisia ini menggunakan buah murbei (*Morus alba L.*) yang siap dipanen berumur 6 bulan, sudah matang berwarna hitam dan masih segar, kemudian buah dicuci lalu dihaluskan.

4. Pembuatan ekstrak buah murbei

Proses pembuatan ekstraksi buah murbei dilakukan di Laboratorium Organik FMIPA Universitas Lampung, metode yang digunakan dalam

ekstraksi buah murbei yaitu metode maserasi dan menggunakan etanol sebagai pelarut.

- 1) Simplisia yang telah kering di haluskan menggunakan blender
 - 2) Sebanyak 500 gram simplisia yang telah halus dimasukkan ke dalam botol berwarna hitam. Dilarutkan menggunakan 5 L larutan etanol hingga simplisia terendam dengan baik.
 - 3) Lalu di maserasi selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk
 - 4) Setelah 3x24 jam simplisia disaring menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat
 - 5) Kumpulan filtrat yang didapat diuapkan dengan *rotatory evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental.
5. Pembuatan konsentrasi buah murbei
- a. Larutan ekstrak kental 100% diencerkan menjadi beberapa konsentrasi yaitu 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%.
 - b. Pengenceran konsentrasi ekstrak buah murbei menggunakan rumus pengenceran yaitu $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$
 - c. pH pengenceran ekstrak buah murbei diukur menggunakan indikator pH, jika pH masih bersifat asam maka tambahkan beberapa tetes NaOH 0,1 M hingga pH menjadi basa 8,1-10,1
6. Prosedur kerja pembuatan preparat
- a. Persiapan sampel jaringan hati mencit
Pengambilan organ hati pada mencit dengan cara *dislokasi cervical*, dan kemudian hewan di bedah untuk diambil organnya. Organ yang telah diambil lalu dicuci menggunakan NaCl fisiologis, lalu difiksasi menggunakan *buffer neutral formalin* 10%.
 - b. Proses pembuatan sediaan histologi
 1. Setelah proses fiksasi 24 jam, jaringan di potong (*grossing*) dan disesuaikan ukurannya dengan bentuk basemold.

2. Lakukan proses pematangan jaringan, tujuannya yaitu untuk mengeluarkan kandungan air dan lautan fiksasi yang ada di dalam jaringan.

Proses	Reagensia	Waktu
Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
	Alkohol 95%	2 jam
	Alkohol absolut	2 jam
	Alkohol absolut	3 jam
Clearing	Xylol	3 jam
	Xylol	3 jam
Infiltrasi	Parafin	2 jam
	Parafin	2 jam

3. Kemudian proses blocking, yaitu penanaman jaringan pada *basemold* dan diisi dengan parafin cair lalu ditutup dengan *cassete embedding*.
4. *Trimming*, yaitu pemotongan kasar menggunakan ketebalan 10-35 μ m, bertujuan untuk membuang sisa-sisa parafin di bagian atas blok parafin.
5. Lalu *sectioning* atau pemotongan halus, menggunakan ketebalan 3-5 μ m untuk mendapatkan pita yang halus.
6. Pita parafin yang didapat diambil menggunakan jarum ose lalu di pindahkan ke dalam waterbath agar tidak terjadi lipatan.
7. Pita parafin diambil dengan cara menempelkannya dengan objek glass.
8. Tahap selanjutnya yaitu staining atau pewarnaan sediaan menggunakan Hematoxylin Eosin dan ekstrak buah murbei konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%. Proses pewarnaan dapat dilihat sebagai berikut:

Tabel 3.1 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Menggunakan Hematoxylin

No	Tahap	Reagen	Waktu
1.	Deparafinisasi	Xylol I	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
		Alkohol absolut I	5 menit
2.	Rehidrasi	Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit

No	Tahap	Reagen	Waktu
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3.	Pencucian	Aquadest	1 menit
4.	Pewarnaan inti	Harris-Hematoxylin	5 menit
5.	pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan sitoplasma	Eosin	2 menit
7.	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
9.	Clearing	Xylol VI	5 menit
		Xylol V	5 menit
10.	Mounting	Canada Balsam	

Sumber: Balai Veteriner Lampung, 2023

Tabel 3.2 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Menggunakan Ekstrak Murbei 15%

No	Tahap	Reagen	Waktu
1.	Deparafinisasi	Xylol I	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2.	Rehidrasi	Alkohol absolut I	5 menit
		Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3.	Pencucian	Aquadest	1 menit
4.	Pewarnaan inti	Ekstrak Murbei 15%	5 menit
5.	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan sitoplasma	Eosin	2 menit
7.	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
9.	Clearing	Xylol VI	5 menit
		Xylol V	5 menit
10.	Mounting	Canada Balsam	

Tabel 3.3 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Menggunakan Ekstrak Murbei 20%

No	Tahap	Reagen	Waktu
1.	Deparafinisasi	Xylol I	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2.	Rehidrasi	Alkohol absolut I	5 menit
		Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3.	Pencucian	Aquadest	1 menit
4.	Pewarnaan inti	Ekstrak Murbei 20%	5 menit

No	Tahap	Reagen	Waktu
5.	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan sitoplasma	Eosin	2 menit
7.	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
9.	Clearing	Xylol VI	5 menit
		Xylol V	5 menit
10.	Mounting	Canada Balsam	

Tabel 3.4 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Menggunakan Ekstrak Murbei 25%

No	Tahap	Reagen	Waktu
1.	Deparafinisasi	Xylol I	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2.	Rehidrasi	Alkohol absolut I	5 menit
		Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3.	Pencucian	Aquadest	1 menit
4.	Pewarnaan inti	Ekstrak Murbei 25%	5 menit
5.	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan sitoplasma	Eosin	2 menit
7.	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
9.	Clearing	Xylol VI	5 menit
		Xylol V	5 menit
10.	Mounting	Canada Balsam	

Tabel 3.5 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Menggunakan Ekstrak Murbei 30%

No	Tahap	Reagen	Waktu
1.	Deparafinisasi	Xylol I	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2.	Rehidrasi	Alkohol absolut I	5 menit
		Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3.	Pencucian	Aquadest	1 menit
4.	Pewarnaan inti	Ekstrak Murbei 30%	5 menit
5.	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan sitoplasma	Eosin	2 menit
7.	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit

No	Tahap	Reagen	Waktu
9.	Clearing	Alkohol 95%	3 menit
		Xylol VI	5 menit
		Xylol V	5 menit
10.	Mounting	Canada Balsam	

Tabel 3.6 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin Menggunakan Ekstrak Murbei 35%

No	Tahap	Reagen	Waktu
1.	Deparafinisasi	Xylol I	5 menit
2.	Rehidrasi	Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
		Alkohol absolut I	5 menit
		Alkohol absolut II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3.	Pencucian	Aquadest	1 menit
4.	Pewarnaan inti	Ekstrak Murbei 35%	5 menit
5.	Pencucian	Aquadest	15 menit
6.	Pewarnaan sitoplasma	Eosin	2 menit
7.	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
9.	Clearing	Xylol VI	5 menit
		Xylol V	5 menit
10.	Mounting	Canada Balsam	

9. Selanjutnya sediaan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.

F. Pengolahan Data

Tahap pengolahan data dilakukan setelah mendapatkan data dari hasil pengamatan, data dikumpulkan dan diolah melalui beberapa tahapan sebagai berikut:

1. *Coding*, yaitu pemberian kode pada data untuk memudahkan pengentrian data ketika dimasukkan ke computer.
2. *Entry Data*, yaitu memasukkan kumpulan data kedalam aplikasi atau program computer, misalnya SPSS.
3. *Scoring*, yaitu pemberian nilai/skor pada data yang sudah diberi label kode.

G. Analisis Data

Data skoring yang telah didapat dari penilaian oleh ahli Patologi Anatomi dijumlahkan dan ditentukan rata-ratanya. Nilai skor yang diberikan kepada 4 parameter yaitu 1-2 dengan total skor dikatakan baik apabila mencapai angka 80%, skor 4-6 masuk ke dalam kategori tidak baik, dan 7-8 masuk ke dalam kategori baik (Sravya *et al.*, 2018). Gambaran kualitas sediaan organ hati mencit yang diwarnai dengan pewarna Hematoxylin dan ekstrak buah murbei konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%, dapat dianalisis menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis Test* dengan nilai signifikan $p < 0,05$.