

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen, dengan desain *Cross Sectional*. Menggunakan teknik sampling *Purposive sampling*. Terdapat dua variabel yaitu variabel bebas pembuatan sediaan jaringan hati mencit (*Mus muscullus*) difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin 10%* (NBF) sebagai kontrol dan untuk perlakuan menggunakan madu konsentrasi (10%, 15%, dan 20%), variabel terikatnya berupa kualitas pewarnaan *Hematoxylin Eosin*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Balai Veteriner kota Bandar Lampung.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni – Juli 2025

C. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel Bebas Pembuatan sediaan jaringan hati mencit (<i>Mus muscullus</i>) menggunakan : Neutral Buffer Formalin 10% sebagai kontrol.	NBF yaitu formalin yang di buffer dengan phospat konsentrasi 10% yang pengjerjaannya sesuai SDS.	Lembar data keamanan (LDK) / safety data sheet (SDS) untuk NBF.	Lembar data keamanan (LDK) / safety data sheet (SDS) untuk NBF.	NBF konsentrasi 10%	Nominal
Madu konsentrasi 10%, 15%, dan 20% sebagai perlakuan.	Menggunakan madu dengan merek Madu Perhutani yang terstandar oleh BPOM RI MD 152110001428	Rumus pengencera: $V1 \times \%1 = V2 \times \%2$ untuk konsentrasi madu.	Gelas ukur, pipet, dan tabung untuk pengenceran Madu.	Madu konsentrasi 10%, 15%, dan 20%.	

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

D. Populasi dan Sampel

Populasi sampel dalam penelitian ini adalah Mencit (*Mus muscullus*) di Laboratorium Balai Veteriner Lampung pada bulan Februari 2025. Sampel dalam penelitian ini merupakan bagian dari populasi yakni jaringan hati mencit jantan. Teknik pengambilan sampel menggunakan sistem *purposive sampling*. Penentuan jumlah sample dan pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Federer (1963). Rumus federer adalah rumus jumlah subjek tiap kelompok perlakuan untuk

penelitian eksperimental. Rumusnya adalah $(t-1)(n-1) \geq 15$ bahwa (t) merupakan jumlah perlakuan, sedangkan (n) merupakan pengulangan pada tiap perlakuan.

Perhitungan rumus Federer :

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

$$t = 4$$

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$n \geq 18/3$$

$$n \geq 6$$

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

1. Kriteria inklusi

- a. Menggunakan hati mencit jantan normal.
- b. Fiksasi 24 jam.
- c. Menggunakan *sectioning* 4 mikron.

2. Kriteria eksklusi

- a. Mencit sakit/tidak sehat
- b. Blok parafin tidak baik/tidak layak
- c. Slide rusak atau pecah

E. Pengumpulan Data

1. Persiapan Penelitian

- a. Mencari sumber pustaka untuk memperoleh data ilmiah penelitian
- b. Melakukan Pra survey pada lokasi penelitian yaitu di Laboratorium Balai Veteriner Lampung.

- c. Pengajuan surat izin penelitian ke Direktur Poltekkes Tanjungkarang untuk diteruskan kepada Laboratorium Balai Veteriner Lampung.
- d. Setelah mendapatkan surat izin dari Laboratorium Balai Veteriner Lampung, kemudian melakukan penelitian di Laboratorium Veteriner Lampung.

2. Prosedur Penelitian

a. Alat :

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Spuit, pisau mata lurus dan melengkung untuk menyayat kulit, gunting dengan ujung tumpul (enterotome) dan ujung lancip, pinset, tissue processor atau wadah botol kaca, inkubator, cassette embedding, base mold (cetakan), Embedding Automatic, alat mikrotom, pisau mikrotom, jarum ose, kuas, gelas preparat atau slide, waterbath, hotplate, wadah pewarnaan, rak pengecatan, timer, pipet tetes, deck glass, mikroskop.

b. Bahan :

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Neutral Buffer Formalin 10%, madu, aquadest, hematoxylin, eosin, alkohol 75%, alkohol 80%, alkohol 85%, alkohol 95%, alkohol absolut, xylol, parafin, dan jaringan hati mencit.

3. Cara Kerja

a. Pengenceran Madu

Madu diencerkan dengan varian konsentrasi 10%, 15%, dan 20% menggunakan rumus pengenceran : (Manu, 2013)

$$\boxed{V_1 \times \%_1 = V_2}$$

Keterangan :

V_1 = Volume larutan uji yang dipipet

$\%_1$ = Konsentrasi larutan uji (100%)

V_2 = Volume larutan uji yang akan dibuat dengan aquadest steril

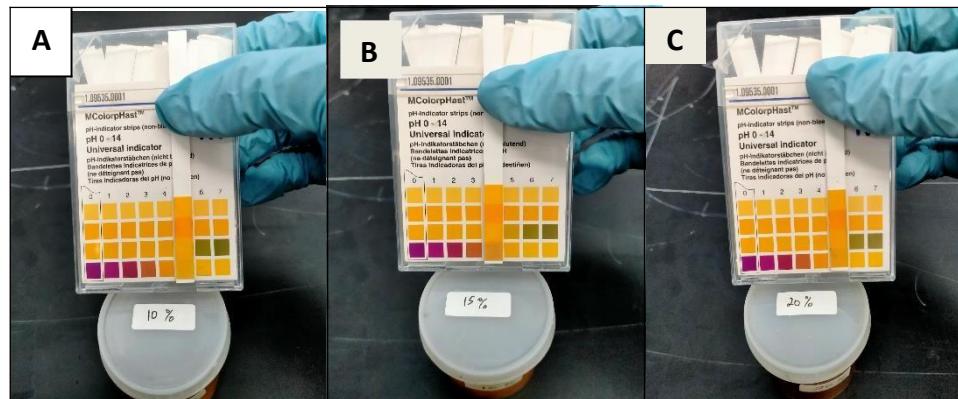
$\%_2$ = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

Membuat pengenceran madu menggunakan Aquadest :

- 1 fiksasi berjumlah 100 ml = 1 : 100%
- Pengenceran madu 10% = 10 ml madu + 90 ml aquadest
- Pengenceran madu 15% = 15 ml madu + 85 ml aquadest
- Pengenceran madu 20% = 20 ml madu + 80 ml aquadest

b. Uji PH Madu

Uji Ph madu menggunakan kertas laksus hasilnya sebagai berikut :



Gambar 3. 1 Uji Ph Madu (A) Ph Madu 10% adalah 4, (B) Ph Madu 15% adalah 3, (C) Ph Madu 20% adalah 4.

c. Pengambilan dan Penanganan Sampel

Spesimen untuk pengujian histopatologi berupa bagian organ hati mencit yang diambil dan dimasukkan kedalam wadah yang telah diberi identitas sampel, kemudian masukkan kedalam *neutral buffer formalin* 10% dengan perbandingan 1 bagian jaringan dengan 10 bagian *neutral buffer formalin* 10% begitu pula dengan madu yang menggunakan pengenceran 10%, 15%, 20% dan dilakukan fiksasi selama 24 jam.

d. Teknik Pengujian Histopatologi

Setelah proses fiksasi dilakukan pemotongan jaringan (trimming) dengan ketebalan kurang lebih 5 mikron dan dimasukkan kedalam cassette embedding kemudian dimasukkan kedalam tisue processor atau wadah botol kaca dengan perlakuan dan pengaturan waktu seperti tabel berikut :

Tabel 3. 2 Pematangan Jaringan Kontrol

No.	Proses	Reagensia	Waktu
1.	Fiksasi	Formalin buffer 10%	12 Jam
		Formalin buffer 10%	12 Jam
2.	Dehidrasi	Allkohol 80%	2 Jam
		Allkohol 95%	2 Jam

		Allkohol absolut	2 Jam
		Allkohol absolut	3 Jam
3.	Clearing (Penjernihan)	Xylol	3 Jam
		Xylol	3 Jam
4.	Impregnasi (Infiltrasi)	Parafin	2 jam
		Parafin	2 Jam

Sumber : (Prosedur Tetap/SOP Laboratorium Balai Veteriner Lampung)

Tabel 3. 3 Pematangan Jaringan Perlakuan konsentrasi 10%

No.	Proses	Reagensia	Waktu
1.	Fiksasi	Madu 10%	12 Jam
		Madu 10%	12 Jam
2.	Dehidrasi	Allkohol 80%	2 Jam
		Allkohol 95%	2 Jam
		Allkohol absolut	2 Jam
		Allkohol absolut	3 Jam
3.	Clearing (Penjernihan)	Xylol	3 Jam
		Xylol	3 Jam
4.	Impregnasi (Infiltrasi)	Parafin	2 jam
		Parafin	2 Jam

Sumber : (Prosedur Tetap/SOP Laboratorium Balai Veteriner Lampung)

Tabel 3. 4 Pematangan Jaringan Perlakuan konsentrasi 15%

No.	Proses	Reagensia	Waktu
1.	Fiksasi	Madu 15%	12 Jam
		Madu 15%	12 Jam
2.	Dehidrasi	Allkohol 80%	2 Jam
		Allkohol 95%	2 Jam
		Allkohol absolut	2 Jam
		Allkohol absolut	3 Jam
3.	Clearing (Penjernihan)	Xylol	3 Jam
		Xylol	3 Jam
4.	Impregnasi (Infiltrasi)	Parafin	2 jam
		Parafin	2 Jam

Sumber : (Prosedur Tetap/SOP Laboratorium Balai Veteriner Lampung)

Tabel 3. 5 Pematangan Jaringan Perlakuan konsentrasi 20%

No.	Proses	Reagensia	Waktu
1.	Fiksasi	Madu 20%	12 Jam
		Madu 20%	12 Jam
2.	Dehidrasi	Allkohol 80%	2 Jam
		Allkohol 95%	2 Jam
		Allkohol absolut	2 Jam
		Allkohol absolut	3 Jam
3.	Clearing (Penjernihan)	Xylol	3 Jam
		Xylol	3 Jam
4.	Impregnasi (Infiltrasi)	Parafin	2 jam
		Parafin	2 Jam

Sumber : (Prosedur Tetap/SOP Laboratorium Balai Veteriner Lampung)

e. Blocking (*Embedding*)

Cassete embedding dikeluarkan dari tisuee processor atau wadah botol kaca kemudian keluarkan organ yang telah di infiltrasi, lalu masukkan

parafin setengahnya dari base mold lalu masukkan organ, kemudian tutup dengan cassette embedding yang sudah diberi identitas sebelumnya, tuang parafin sampai memenuhi tutup cassette embedding, terakhir dinginkan pada alat processor embedding dibagian yang cool/dingin semalam.

f. Pemotongan (*Cutting*)

Pemotongan blok jaringan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 mikron sebagai berikut :

- Gelas preparat dibersihkan dengan handuk atau tissue supaya bersih, kemudian dilabeli isi dengan penomoran identitas, lalu mikrotom disetel menunjukkan 4 mikron. Pisau mikrotom kasar difiksir pada mikrotom.
- Ambil blok jaringan, permukaan yang akan dipotong dengan pisau mikrotom kasar, sehingga didapatkan permukaan yang rata.
- Pisau mikrotom diganti dengan pisau yang halus. Blok jaringan dipotong kembali, dipilih potongan yang terbaik. Potongan jaringan diambil dengan menggunakan jarum ose dan pinset kecil, gunakan kuas untuk membersihkan sisa potongan yang tidak digunakan. Jaringan diapungkan kedalam waterbath (bak air) bagian yang melipat diratakan sehingga permukaannya rata.
- Jaringan disalut dengan gelas preparat yang telah dilabeli. Preparat dimasukkan kedalam hotplate dan dibiarkan semalam, jaringan siap diwarnai.

g. Pewarnaan (*Staining*)

Untuk melihat perubahan histopatologi jaringan, preparat diwarnai dengan Hematoxylin-Eosin proses pewarnaan dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel 3. 6 Tahap Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

No.	Proses	Reagensia	Waktu
1.	Deparafinisasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1	5 menit
		Xylol 2	5 menit
		Xylol 3	5 menit
2.	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol absolut 1	5 menit
		Alkohol absolut 2	5 menit
		Alkohol absolut 3	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit

3.	Pewarnaan hematoxylin	Alkohol 85% Alkohol 75% Aquadest Harris-Haematoxylin	5 menit 5 menit 1 menit 5 menit
4.	Pewarnaan eosin	Aquadest Eosin	15 menit 2 menit
5.	Rehidrasi (memasukkan air)	Alkohol 75% Alkohol 85% Alkohol 95% Alkohol absolut 1 Alkohol absolut 2 Alkohol absolut 3	3 menit 3 menit 3 menit 3 menit 3 menit 3 menit
6.	Clearing (Penjernihan)	Xylol 4 Xylol 5	5 menit 5 menit
7.	Mounting (proses penutupan) jaringan diantara <i>cover glass</i> dengan <i>objek glass</i> oleh entelan	Entelan	

Sumber : (Prosedur Tetap/SOP Laboratorium Balai Veteriner Lampung)

h. Pemeriksaan pada Mikroskop

Preparat jaringan yang telah diwarnai, kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x, 100x, dan 400x.

4. Interpretasi Hasil

Hasil pewarnaan jaringan hati mencit (*Mus muscullus*) dinilai oleh dokter spesialis patologi anatomi berdasarkan dengan nilai *skoring*.

Tabel 3. 7 Kriteria Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No.	Struktur	Deskripsi	Skala Nominal
1.	Inti sel	Inti sel tidak jelas Inti sel jelas	1 2
2.	Sitoplasma	Sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas Sitoplasma dan jaringan ikat jelas	1 2
3.	Intensitas Pewarnaan	Intensitas ringan menyerap warna kurang Intensitas kuat menyerap warna baik	1 2
4.	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik Kontras pewarnaan baik	1 2

Sumber : (Sravya dkk, 2018) dengan dimodifikasi BPMPI

Tabel 3. 8 Skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

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

Sumber : (Sravya dkk, 2018) dengan modifikasi BPMPI

F. Pengolahan 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 komputer (data entry)
- b. *Entry Data* yaitu memasukkan data-data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi atau program komputer, program SPSS V.27 for Windows
- c. *Skoring* yaitu pemberian skor terhadap variablel yang diperiksa agar mendapatkan nilai yang signifikan.

G. Analisa Data

Pada penelitian ini, metode kerja yang digunakan adalah metode histoteknik dengan kontrol positif larutan fiksatif *Neutral Buffer Formalin* 10% (NBF). Jenis penelitian ini adalah eksperimen dengan desain *cross sectional*. Data skoring yang diperoleh dari hasil penilaian ahli Patologi Anatomi ditotal, dihitung rerata skoring. Nilai skor tidak baik 4-6 dan baik 7-8 (Sravya dkk, 2018) dengan modifikasi, untuk mengetahui adanya perbedaan kualitas hasil sediaan histopatologi jaringan hati mencit (*Mus muscullus*) dengan perwarnaan *Hematoxylin-Eosin* antara kelompok *Neutral Buffer Formalin* dan Madu data dianalisis menggunakan uji Normalitas apabila normal, jika tidak normal dilanjutkan menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis Test*.

H. Ethical Clearance

Penelitian ini dilakukan setelah mendapatkan izin dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Tanjung Karang dengan No.337/KEPPK-TJK/V/2025 Pada Tanggal 26 Mei Tahun 2025.