

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu penelitian yang bersifat eksperimen dengan desain penelitian *Posttest Only Control Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan kualitas sediaan jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*) yang diwarnai dengan hematoxylin eosin dan ekstrak buah tomat ceri sebagai pengganti eosin secara mikroskopis. Spesimen ginjal mencit akan dianalisis dengan dua perlakuan, yaitu menggunakan ekstrak buah tomat ceri dan eosin pada proses pewarnaan Hematoxylin Eosin. Dilakukan uji *Kruskal Wallis Test* dengan nilai signifikansi ($p < 0,05$) untuk mengetahui perbedaan kualitas sediaan pewarnaan Hematoxylin Eosin antara ekstrak buah tomat ceri dan eosin dalam pembuatan sediaan jaringan ginjal mencit.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Veteriner Kota Bandar Lampung

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-April 2025

C. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini yaitu mencit normal di Balai Veteriner Kota Bandar Lampung. Sampel dalam penelitian ini merupakan bagian dari populasi, yaitu spesimen jaringan ginjal mencit jantan normal. Penentuan jumlah sampel ini ditentukan menggunakan rumus Federer (1963). Rumus Federer merupakan rumus yang digunakan untuk menentukan jumlah sampel untuk penelitian eksperimental. Rumusnya adalah $(t-1)(n-1) \geq 15$, dengan (t) adalah jumlah perlakuan, sedangkan (n) adalah jumlah pengulangan dari setiap perlakuan.

Perhitungan rumus Federer :

$$\begin{aligned}(n-1)(t-1) &\geq 15 \\(n-1)(6-1) &\geq 15 \\(n-1)(5) &\geq 15 \\5n-5 &\geq 15 \\5n &\geq 20 \\n &\geq 4\end{aligned}$$

Keterangan :

n : besar sampel setiap kelompok

t : jumlah tiap kelompok

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka didapatkan hasil bahwa pengulangan dilakukan sebanyak 4 sampel dalam 6 perlakuan. Jadi, banyak sampel yang diperlukan untuk penelitian ini berjumlah 24 sampel sediaan jaringan ginjal mencit, dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

1. Kriteria Inklusi

- a. Organ ginjal mencit normal
- b. Preparat sediaan ginjal mencit dengan ketebalan pemotongan 3 μ m.
- c. Tidak ada kerusakan dalam pembuatan sediaan

2. Kriteria Eksklusi

- a. Slide hilang
- b. Slide pecah atau rusak

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 jaringan ginjal mencit	Pewarnaan Hematoxylin Eosin pada sediaan jaringan ginjal mencit	Ekstraksi metode maserasi	Gelas Ukur	1. Ekstrak buah tomat ceri 20%	Nominal
1. Menggunakan ekstrak buah tomat ceri	menggunakan ekstrak buah tomat ceri sebagai perlakuan pengganti eosin	V1MI=V2M2		2. Ekstrak buah tomat ceri 40%	
				3. Ekstrak buah tomat ceri 60%	
				4. Ekstrak buah tomat ceri 80%	
				5. Ekstrak buah tomat ceri 100%	
2. Menggunakan eosin	Pewarnaan Hematoxylin Eosin pada sediaan jaringan ginjal mencit menggunakan reagen Eosin sebagai kontrol	Observasi	MSDS	Eosin	Nominal

Variabel Terikat					
Kualitas pewarnaan Hematoxylin Eosin sediaan jaringan ginjal mencit	Hasil pengamatan secara mikroskopis sediaan jaringan ginjal mencit dengan pewarnaan Eosin dan ekstrak buah tomat ceri	Metode Skoring (Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPMPPi	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (4-6) Baik (7-8)	Nominal
1. Inti Sel	Inti sel berbentuk oval atau bulat dan terletak di Tengah sel. Inti sel akan terlihat berwarna ungu ketika diwarnai dengan Hematoxylin	Metode Skoring (Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPMPPi	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal
2. Sitoplasma	Sitoplasma merupakan cairan yang berada di antara inti sel dengan membran sel. Sitoplasma akan terlihat berwarna merah muda ketika diwarnai dengan Eosin	Metode Skoring (Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPMPPi	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal
3. Intensitas Warna	Intensitas warna yang baik akan menghasilkan warna cerah atau pekat terhadap sediaan yang telah diwarnai	Metode Skoring (Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPMPPi	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal
4. Kecerahan Warna	Kecerahan warna yang jelas dan dapat diidentifikasi dengan baik	Metode Skoring (Sravya dkk, 2018) di modifikasi BPMPPi	Lembar observasi dan mikroskop	Tidak baik (1) Baik (2)	Nominal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Persiapan Penelitian

- Mencari literatur untuk mendapatkan perspektif ilmiah terkait penelitian
- Melakukan pra-survey di lokasi penelitian yaitu Balai Veteriner Kota Bandar Lampung
- Mengajukan surat izin penelitian melalui Direktur Poltekkes Tanjung Karang untuk diteruskan ke Balai Veteriner Kota Bandar Lampung
- Setelah memperoleh izin dari Balai Veteriner Kota Bandar Lampung, kemudian melaksanakan penelitian di lokasi tersebut.

2. Prosedur Pemeriksaan

a. Alat

Alat yang dibutuhkan pada penelitian ini yaitu: Gelas ukur, wadah pewarnaan, rak pengecatan, pipet tetes, basemold, preparat, embedding, mikrotom, waterbath, pinset, deck glass, pH meter, dan mikroskop.

b. Bahan

Bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini yaitu: Buffer formalin 10%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol absolut, aquadest, xylol, parafin, eosin, hematoxylin, entelan, spesimen jaringan ginjal mencit, dan ekstrak buah tomat ceri.

3. Cara Kerja

a. Pembuatan Ekstrak Buah Tomat Ceri

Pembuatan simplisia dan ekstrak buah tomat ceri dilakukan di Laboratorium MIPA Biologi Universitas Lampung dengan proses pengekstrasian simplisia buah tomat ceri dengan metode maserasi.

- 1) Buah tomat ceri dilakukan determinasi terlebih dahulu.
- 2) Buah tomat ceri dipotong-potong lalu dikeringkan dengan oven suhu 40°C selama 18 jam.
- 3) Buah tomat ceri yang sudah kering di blender hingga halus.
- 4) Simplisia buah tomat ceri yang telah halus dimasukkan sebanyak 500 gram ke dalam botol berwarna hitam. Ditambahkan larutan etanol 96% sebanyak 5 liter.
- 5) Simplisia di maserasi selama 3 hari.
- 6) Simplisia disaring hingga didapat maserat.
- 7) Maserat yang didapat kemudian di pekatkan dengan rotary evaporator kurang lebih selama 12 jam dengan kecepatan 60 rpm, suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak agak kental.
- 8) Ekstrak yang sudah jadi kemudian dicek pH nya menggunakan pH meter untuk memastikan pH ekstrak sama dengan reagen kontrol yaitu eosin. Jika pH belum asam, tambahkan HCl hingga pH asam.

b. Pembuatan Konsentrasi Bahan Uji

1) Larutan ekstrak 100% lalu diencerkan menjadi konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%

2) Rumus pengenceran ekstrak buah tomat ceri yang digunakan adalah:

$$V1.M1 = V2.M2$$

c. Pematangan Jaringan

Tabel 3. 2 Tahap Pematangan Jaringan

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Fiksasi	Buffer Formalin 10%	24 jam
2	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
		Alkohol 95%	2 jam
		Alkohol Absolut	2 jam
		Alkohol Absolut	3 jam
3	Clearing	Xylol 1	3 jam
		Xylol 2	3 jam
4	Impregnasi - Embedding	Parafin 1	2 jam
		Parafin 2	2 jam

Sumber : (Balai Veteriner Lampung, 2023)

d. Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Tabel 3. 3 Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Deparafinisasi	Xylol 1	5 menit
		Xylol 2	5 menit
		Xylol 3	5 menit
2	Rehidrasi	Alkohol Absolut 1	5 menit
		Alkohol Absolut 2	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquades	1 menit
4	Pewarnaan Hematoxylin	Harris-Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquades	15 menit
6	Pewarnaan Eosin	Eosin	2 menit
7	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol Absolut	3 menit
		Alkohol Absolut	3 menit
8	Clearing	Xylol 4	5 menit
		Xylol 5	5 menit
9	Mounting	Entelan	

Sumber: (Balai Veteriner Lampung, 2023)

Tabel 3. 4 Pewarnaan HE menggunakan ekstrak buah tomat ceri

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Deparafinisasi	Xylol 1	5 menit
		Xylol 2	5 menit
		Xylol 3	5 menit
2	Rehidrasi	Alkohol Absolut 1	5 menit
		Alkohol Absolut 2	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquades	1 menit
4	Pewarnaan Hematoxylin	Harris-Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquades	15 menit
6	Pewarnaan Eosin	Ekstrak buah tomat ceri	2 menit
7	Dehidrasi	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol Absolut	3 menit
		Alkohol Absolut	3 menit
8	Clearing	Xylol 4	5 menit
		Xylol 5	5 menit
		Entelan	
9	Mounting		

4. Interpretasi Hasil

Tabel 3. 5 Kriteria Skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No	Struktur	Deskripsi	Skala Nominal
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	Intensitas Pewarnaan	Intensitas ringan menyerap warna dengan lemah atau pudar	1
		Intensitas kuat menyerap warna baik dan jelas	2
4	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik	1
		Kontras pewarnaan baik	2

Sumber : (Srvaya dkk, 2018) yang dimodifikasi BPMPPi

Tabel 3. 6 Skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin Eosin

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

Sumber : (Srvaya dkk, 2018) yang dimodifikasi BPMPPi

F. Pengolahan Data

Setelah data dikumpulkan dari hasil pengamatan, data diolah melalui proses dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Coding, yaitu memberikan kode untuk mempermudah pengentrian data saat dimasukkan ke computer
- b. Entry Data, yaitu memasukkan data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi atau program computer, seperti program SPSS for windows
- c. Skoring, pemberian skor untuk masing-masing variabel yang diperiksa

G. Analisis Data

Data dari hasil penelitian ditotal lalu dihitung rata-rata skor. Nilai skor diberikan untuk 4 parameter, dengan total skor dikatakan baik jika mencapai angka 80% yaitu 7-8. Sedangkan total skor dikatakan tidak baik jika hanya mencapai nilai 4-6 (Sravya et al., 2018). Untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan hasil kualitas sediaan pewarnaan dan kualitas sediaan histopatologi ginjal mencit antara satu kelompok dengan yang lainnya, data dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis Test* dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

H. Ethical Clearance

Penelitian dilaksanakan atas persetujuan ethical clearance dari Komisi Etik Poltekkes Tanjungkarang. Hewan sebagai objek dengan menggunakan spesimen jaringan ginjal mencit sebagai sampel yang akan diperiksa. Penelitian ini menggunakan standar prosedur yang berlaku. Limbah jaringan dan reagen sisa proses penelitian akan dilakukan sesuai dengan Standar Operasional Prosedur yang berlaku di Balai Veteriner Lampung.