

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimen. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui suatu gejala yang timbul sebagai akibat perlakuan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen. Sampel jaringan jantung mencit diamati dengan beberapa perlakuan dan juga cairan *clearing* yang berbeda. Dilakukan uji Analisa statistic menggunakan Uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann Whitnay* terhadap kriteria kualitas sediaan histopatologi jaringan jantung mencit (*Mus musculus*) dengan menggunakan minyak kacang tanah (*Peanut Oil*) dengan menggunakan suhu ruang dan pemanasan suhu 30°C, pemanasan 40°C juga menggunakan *xylol* pada proses *clearing*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Balai Veteriner Lampung.

2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Mei 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini menggunakan Mencit yang ada di Balai Veteriner Lampung.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini merupakan bagian dari pupulasi yaitu preparate Jantung Mencit (*Mus Musculus*). Penentuan jumlah sampel dan pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Faderer. Total sampel yang digunakan dihitung sebagai berikut:

$$\text{Rumus : } (t-1) (n-1) \geq 15$$

Keterangan:

n = Banyaknya pengulangan

t =Jumlah kelompok perlakuan

Perhitungan :

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

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

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

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

$$n \geq 5+1$$

$$n \geq 6$$

Dengan melakukan 4 perlakuan, maka didapatkan 6 pengulangan pada masing-masing perlakuan yang berbeda sehingga total keseluruhan sampel yang digunakan adalah 24 sediaan.

Sampel penelitian ini adalah preparate jantung mencit yang memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Preparat dengan ketebalan pemotongan 3-7 μ m.
- 2) Organ jantung mencit dengan keadaan normal.
- 3) Preparat dengan penggunaan reagen pewarnaan baru.
- 4) Preparat dengan menggunakan minyak kacang tanah.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Preparat rusak.
- 2) Preparat pecah.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi oprasional

Variabel	Definisi Oprasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Proses <i>clearing</i> Menggunakan <i>Xylol</i> dan Minyak Kacang Tanah.	Proses clearing dengan menggunakan <i>xylol</i> sebagai control dan minyak kacang tanah dengan menggunakan: 1. Suhu ruang. 2. Pemanasan suhu 30°C. 3. Pemanasan suhu 40°C.	Observasi	Lembar MSDS, Etiket, Oven dan Termometer	1. <i>Xylol</i> 2. Minyak Kacang Tanah Merek Micang	Nominal
Kualitas hasil pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) pada preparat sediaan jantung mencit	pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) pada preparat sediaan jantung mencit yang diukur secara mikroskopis dengan mengamati inti sel, sitoplasma, intensitas warna, dan keseragaman warna.			4-6 Tidak baik 7-8 Baik	
Penilaian Kualitas Sediaan					
1. Inti sel	Inti sel berbentuk oval maupun bulat dan berada di tengah sel. Inti sel ketika diwarnai dengan Hematoxylin akan menghasilkan warna ungu.	Metode <i>skorsing</i> (Srivaya dkk, 2018) dengan modifikasi	Mikroskop dan Lembar Observasi	1 Tidak Baik 2 Baik	Ordinal
2. Sitoplasma	Sitoplasma merupakan cairan yang berada diantara inti sel dan membran sel. Sitoplasma ketika diwarnai dengan Eosin akan menghasilkan warnamerah muda.	Metode <i>skorsing</i> (Srivaya dkk, 2018) dengan modifikasi	Mikroskop dan Lembar Observasi	1 Tidak Baik 2 Baik	Ordinal
3. Intensitas Warna	Intensitas warna yang baik akan menghasilkan warna cerah atau pekat terhadap sediaan yang telah diwarnai.	Metode <i>skoring</i> (Srivaya dkk, 2018) dengan modifikasi	Mikroskop dan Lembar Observasi	1 Tidak Baik 2 Baik	Ordinal
4. Keseragaman Warna	Keseragaman warna yang jelas dan dapat diidentifikasi dengan baik.	Metode <i>skorsing</i> (Srivaya dkk, 2018) dengan modifikasi	Mikroskop dan Lembar Observasi	1 Tidak Baik 2 Baik	Ordinal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

Beaker glass, pinset, kaca objek, deck glass, oven, thermometer, satu set wadah pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE).

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

Organ jantung mencit, *xylol*, minyak kacang tanah merek Micang, dan cairan pewarna Hematoxylin Eosin (HE).

3. Cara Kerja Prosesing Preparat

a. Mencit dibius.

b. Mencit direntangkan diatas sterofom lalu dilakukan pembedahan menggunakan pisau pada bagian ventral mencit.

c. Tahap pematangan jaringan pada preparat histopatologi.

Tabel 3. 2 Prosedur pematangan jaringan menggunakan *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 <i>xylol</i> I	3 jam
7.	Clearing dengan <i>xylol</i> II	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

Sumber : (Balai Veteriner Lampung, 2023).

Tabel 3. 3 Prosedur pematangan jaringan menggunakan minyak kacang tanah (*Peanut Oil*) dengan suhu ruang 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.	<i>Clearing</i> dengan minyak kacang tanah suhu ruang	3 jam
7.	<i>Clearing</i> dengan minyak kacang tanah suhu ruang	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

Tabel 3. 4 Prosedur pematangan jaringan menggunakan minyak kacang tanah (*Peanut Oil*) dengan suhu 30°C 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.	<i>Clearing</i> dengan minyak kacang tanah pemanasan suhu 30°C	3 jam
7.	<i>Clearing</i> dengan minyak kacang tanah pemanasan suhu 30°C	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

Tabel 3. 5 Prosedur pematangan jaringan menggunakan minyak kacang tanah (*Peanut Oil*) dengan suhu 40°C 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.	<i>Clearing</i> dengan minyak kacang tanah pemanasan suhu 40°C	3 jam
7.	<i>Clearing</i> dengan minyak kacang tanah pemanasan suhu 40°C	3 jam
8.	Infiltrasi dengan parafin I	2 jam
9.	Infiltrasi dengan parafin II	2 jam

- d. Organ jantung mencit diletakan ke dalam base mold dan memposisikan jaringan dengan benar menggunakan pinset dan menuang parafin cair hingga menutupi cetakan pada base mold lalu tutup dengan *cassate tissue*.
- e. Cetakan diletakan pada suhu dingin atau *freezer* hingga kering lalu melepaskan hasil cetakan.
- f. Tahap *sectioning* (pemotongan) organ dilakukan menggunakan mikrotom.
- g. Pita parafin diletakan di waterbath dengan suhu $\leq 60^{\circ}\text{C}$ dan ambil pita parafin menggunakan kaca objek.
- h. Tahap pewarnaan dilakukan menggunakan Hematoxylin Eosin (HE).

Tabel 3. 6 Prosedur Pewarnaan Hematoxylin Eosin mrnggunakan *xylol* pada proses *clearing*.

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

Sumber : (Balai Veteriner Lampung, 2023).

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

4. Penilaian Kualitas Sediaan

Menurut Sravya 2018 yang telah dimodifikasi, kualitas sediaan dinilai dengan 4 parameter dan masing-masing diberikan skor 1 atau 2, dengan skor total yaitu 4-5 kategori tidak baik dan 6-8 kategori baik.

Tabel 3. 7 Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan Mikroskopis Pewarnaan Hematoxylin Eosin.

No.	Kategori	Deskripsi	Kualitas	
			Sediaan	Skor
1.	Inti Sel	Tidak tampak jelas warna ungu pada inti sel	Tidak Baik	1
		Tampak jelas warna ungu pada inti sel	Baik	2
2.	Sitoplasma	Tidak tampak jelas warna merah muda pada sitoplasma	Tidak Baik	1
		Tampak jelas warna merah muda pada sitoplasma	Baik	2
3.	Intensitas Warna	Preparat dengan hasil warna yang redup atau tidak pekat	Tidak Baik	1
		Preparat dengan hasil warna yang cerah atau pekat	Baik	2
4.	Keseragaman Warna	Pewarnaan preparat tidak seragam dan sediaan tidak bisa didiagnosis	Tidak Baik	1
		Pewarnaan preparat seragam	Baik	2

Sumber : (Sravya dkk, 2018) dengan modifikasi BPMPPPI.

Tabel 3. 8 Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan Mikroskopis Pewarnaan Hematoxylin Eosin.

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

F. Pengolahan Data

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

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

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penilaian sediaan histopatologi jantung mencit secara mikroskopis dengan perbesaran 40x, dihitung rerata dengan *scoring* terhadap kriteria penilaian. Data yang diperoleh dilakukan analisis menggunakan *Uji Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adakah perbandingan kualitas pewarnaan menggunakan minyak kacang tanah (*Peanut Oil*) menggunakan suhu ruang, suhu 30°C, suhu 40°C, dan *Xylol* pada proses pematangan jaringan histopatologi jaringan jantung mencit (*Mus musculus*).

H. Persetujuan Etik

Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan No. 052/KEPK-TJK/III/2025. Hewan sebagai subjek dengan melakukan eksperimen pada organ jantung mencit (*Mus musculus*) sebagai sampel yang akan diperiksa. Penelitian ini dilakukan menggunakan standar prosedur yang berlaku.