

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan merupakan penelitian *eksperimen* dengan desain post-test only control grup desain yang bertujuan untuk mengetahui kualitas hasil pewarnaan histologi ginjal mencit pada tahap pewarnaan Hematoxylin Eosin menggunakan ekstrak kubis ungu dan hematoxylin sebagai kontrol. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak kubis ungu (*Brassica oleracea var. capitata L*) dengan variasi konsentrasi 80%, 90%, dan 100%, sedangkan variabel terikat pada penelitian ini yaitu sediaan histologi ginjal mencit berdasarkan karakteristik sitoplasma, karakteristik inti sel, dan juga hasil akhir dari pewarnaan berupa keseragaman warna.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan kebeberapa tempat sebagai berikut:

- a) Laboratorium MIPA Biologi Universitas Lampung (melakukan determinasi terhadap kubis ungu (*Brassica oleracea var. capitata L*))
- b) Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung (melakukan pembuatan ekstrak kubis ungu (*Brassica oleracea var. capitata L*))
- c) Laboratorium Balai Veteriner Lampung (melakukan determinasi hewan mencit (*Mus musculus*) dan melakukan prosedur pembuatan sediaan ginjal mencit (*Mus musculus*))

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April-Mei 2025.

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan ada 2 dalam penelitian ini adalah:

- 1) Mencit (*Mus musculus*) dengan karakteristik: Mencit jantan, sehat, usia 2,5-3 bulan, dan berat badan 25-35 gram.
- 2) Kubis ungu (*Brassica oleracea var. capitata L*) dengan karakteristik: Segar, berdiameter 38-40 mm, dan berat 700-1.100 gram.

Sampel yang digunakan yaitu Mencit (*Mus musculus*) yang telah memenuhi kriteria penelitian yang selanjutnya akan dibuat sediaan jaringan ginjal mencit dan Kubis ungu (*Brassica oleracea var. capitata L*) yang telah memenuhi kriteria penelitian yang selanjutnya akan dibuat ekstrak dengan variasi konsentrasi 80%, 90%, dan 100%. Teknik pengambilan sampel sediaan ginjal mencit dilakukan menggunakan metode purposive sampling. Penentuan untuk banyaknya pengulangan didalam penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan rumus Federer sebagai berikut (Harsojuwono et al., 2021)

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

Keterangan:

n = Banyaknya pengulangan

t = Jumlah kelompok perlakuan

maka dapat dihitung banyaknya pengulangan yang dapat dilakukan yaitu :

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

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

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

$$n \geq 3$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka didapatkan hasil bahwa perlakuan dilakukan sebanyak 4 kali dalam 3 pengulangan. Berikut dibawah ini tabel pengulangan sampel yang akan dilakukan:

Tabel 3.1 tahap pengulangan sampel

No	Konsentrasi	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3
1.	80%	4 Sediaan	4 Sediaan	4 Sediaan
2.	90%	4 Sediaan	4 Sediaan	4 Sediaan
3.	100%	4 Sediaan	4 Sediaan	4 Sediaan
4.	Kontrol Hematoxylin	1 Sediaan	1 Sediaan	1 Sediaan

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.2 Variabel dan Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas					
Ekstrak kubis ungu	Ekstrak kubis ungu yang akan digunakan sebagai pewarna jaringan ginjal mencit pengganti pewarnaan Hematoxylin Eosin yang dilakukan di Balai Veteriner Lampung	Pengenceran Ekstrak kubis ungu: V1M1=V2M2	Gelas ukur	Ekstrak kubis ungu 80%, 90%, 100%	Nominal
Variabel Terikat					
Sediaan Histologi Ginjal Mencit	jaringan ginjal mencit yang telah diproses untuk dianalisis dibawah mikroskop dengan inti sel, sitoplasma, intensitas warna dan kontras warna yang sesuai dengan pemenuhan standar pewarnaan hitologi.	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMPI	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak Baik Skor (1) 2. Baik Skor (2)	Nominal
	inti sel dengan kualitas baik akan terwarnai oleh hematoxylin dan akan memberikan warna ungu pada saat pewarnaan	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMPI	Mikroskop dan lembar obeservasi	1. Tidak Baik Skor (1) 2. Baik Skor (2)	Nominal
	sitoplasma dengan kualitas baik jika berada diantara inti sel dan membran sel, yang terwarnai oleh eosin yang memiliki warna merah muda	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMPI	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak Baik Skor (1) 2. Baik Skor (2)	Nominal
	Intensitas warna merupakan ukuran kecerahan/kegelapan dari suatu warna pada gambar atau objek yang diamati.	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMPI	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak Baik Skor (1) 2. Baik Skor (2)	Nominal

Kontras Pewarnaan merupakan perbedaan kecerahan antara objek dan latar belakang pada objek yang diwarnai ungu dan merah muda.	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMPI	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak Baik Skor (1) 2. Baik Skor (2)	Nominal
---	--	--------------------------------	--	---------

Sumber: Sravya *et al.*, (2018) yang dimodifikasi BPMPI.

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Persiapan Penelitian

Ada beberapa hal yang harus dipersiapkan saat ingin melakukan penelitian diantaranya :

- a) Mencari literatur untuk memproleh data ilmiah penelitian.
- b) Melakukan Pra-survey sebelum penelitian pada lokasi penelitian yaitu di Laboratorium MIPA Biologi Universitas Lampung, Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung dan Laboratorium Balai Veteriner Lampung.
- c) Melakukan pengajuan surat izin penelitian terhadap Direktur Poltekkes Tanjungkarang agar dapat diteruskan kepada Laboratorium MIPA Biologi Universitas Lampung, Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung dan Laboratorium Balai Veteriner Lampung.
- d) Setelah mendapatkan surat izin penelitian:
 - 1. Laboratorium MIPA Biologi Universitas Lampung (melakukan determinasi kubis ungu untuk memastikan spesies dari kubis ungu yang dibawa yaitu (*Brassica oleracea var. Capitata L*))
 - 2. Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung (melakukan pembuatan ekstrak kubis ungu dengan variasi konsentrasi 80%, 90% dan 100%)
 - 3. Laboratorium Balai Veteriner Lampung (melakukan determinasi hewan mencit untuk memastikan spesies yang digunakan yaitu (*Mus musculus*) dan pembuatan sediaan jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*))
- 2. Prosedur pemeriksaan
- a) Persiapan Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah, oven, blender, gelas ukur,

neraca analitik, gunting, pH meter, saringan stainless steel, rak pengecatan, pinset, wadah pewarnaan, pipet tetes, basemold, preparat, mikrotom, blade, cassette, embedding, waterbath, dan desk glass.

b) Persiapan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kubis ungu, Etanol 96%, Alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, parafin, alkohol absolut, aquadest, xylol, ekstrak kubis ungu, hematoxylin, eosin, dan Spesimen Jaringan ginjal mencit.

3. Prosedur Kerja Pembuatan Ekstrak Kubis Ungu

a) Pembuatan Bubuk Kubis Ungu

1. Kubis ungu yang telah dilakukan determinasi disiapkan untuk tahap selanjutnya.
2. Cuci kubis ungu untuk menghilangkan kotoran dan pestisida yang mungkin ada di permukaannya.
3. Potong kubis ungu menjadi bagian-bagian kecil agar lebih mudah diproses.
4. Keringkan didalam oven dengan suhu 60°C selama 3 jam hingga benar-benar kering. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan kandungan air dalam kubis agar tidak mudah rusak.
5. Setelah kubis ungu kering, proses selanjutnya adalah menggiling kubis menjadi bubuk halus menggunakan blender
6. Setelah digiling, bubuk kubis ungu akan disaring menggunakan saringan stainless steel dengan ukuran diameter 20cm x 60mesh untuk memisahkan partikel yang lebih besar atau kasar. Hanya bubuk halus yang akan digunakan. Proses penyaringan ini memastikan kualitas dan konsistensi produk akhir
7. Kemudian ditimbang sebanyak 250 gram kemudian dimasukkan kedalam toples kaca.

b) Pembuatan Ekstrak Kubis Ungu

Kubis ungu yang telah menjadi bubuk selanjutnya dibuat ekstrak kubis ungu yang akan dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung dengan proses pengekstrasi simplisia ekstrak kubis ungu dengan metode maserasi:

1. Ambil kubis ungu yang sudah menjadi bubuk
 2. Tambahkan 2,5 liter pelarut etanol 96% kemudian homogenkan.
 3. Perendaman dilakukan selama 24 jam.
 4. Setelah 24 jam dilanjutkan ke alat *evaporator* hingga pelarut menguap dan ekstrak menjadi kental.
- c) Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Kubis Ungu
1. Konsentrasi ekstrak kubis ungu yang digunakan adalah 80%, 90%, dan 100%. Masing-masing konsentrasi tersebut dibuat dengan cara penimbangan dan pengenceran ekstrak etanol kubis ungu (konsentrasi 100%) dengan aquadest.
 2. Variasi konsentrasi selanjutnya dilakukan dengan mengencerkan ekstrak etanol kubis ungu dari konsentrasi yang lebih tinggi menggunakan persentase perbandingan konsentrasi %(v/v) yang dapat ditentukan melalui Rumus berikut

$$(V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2)$$

Keterangan:

V1 : Konsentrasi awal ekstrak (sebelum pencampuran)

C1 : Volume ekstrak yang digunakan

V2 : Konsentrasi yang diinginkan

C2 : Volume larutan yang ingin dibuat

4. Prosedur Kerja Pembuatan Sediaan Jaringan Ginjal Mencit (*Mus musculus*)

a) Proses Euthanasia

Proses euthanasia dilakukan dengan cara pembiusan melalui inhalasi menggunakan kloroform. Setelah hewan sepenuhnya terbius, langkah berikutnya adalah melakukan pembedahan dan pengambilan organ ginjal mencit (*Mus musculus*)

b) Fiksasi Jaringan

Setelah ginjal mencit diambil lakukan proses fiksasi dilakukan dengan menggunakan larutan buffer formalin 10% selama 24 jam.

c) Proses Pematangan Jaringan

1. Dehidrasi

Setelah jaringan difiksasi, langkah berikutnya adalah menghilangkan air dalam jaringan dengan menggunakan alkohol dalam konsentrasi yang meningkat, dimulai dari alkohol 80%, 95%, alkohol absolute, dengan masing-masing waktunya 2 jam (Manual Standar Balai Veteriner Lampung 2023).

2. Clearing

Penjernihan merupakan salah satu tahapan membuat jaringan menjadi jernih dan transparan menggunakan larutan Xylol. Tahap ini bertujuan mengeluarkan alkohol dari jaringan dengan menggantikan dengan parafin. Larutan yang digunakan yaitu Xylol I dan Xylol II, dengan masing-masing waktu 3 jam (Manual Standar Balai Veteriner Lampung 2023)

3. Impregnating – Embedding

Pematangan jaringan yaitu proses Impregnating atau Embedding, tahap ini bertujuan untuk membuat jaringan tersebut agar dapat mengeras disuhu ruang serta mempertahankan fungsi dari sel dan komponen, larutan yang digunakan yaitu Parafin dengan waktu 2 jam (Manual Standar Balai Veteriner Lampung 2023).

d) Penanaman Jaringan

Setelah dilakukan pematangan jaringan, tahap selanjutnya penanaman jaringan dengan mengeluarkan organ dari cassette embedding lalu masukan kedalam bistmoul lalu tuangkan parafin kedalam bistmout, tutup dengan cassette embedding kemudian beri label lalu dinginkan pada alat processor embedding bagian yang dingin (Manual Standar Balai Veteriner Lampung 2023).

e) Pemotongan Jaringan (*cutting*)

Pemotongan blok jaringan menggunakan mikrotom ketebalan 3-5 mikron

- 1) Gelas preparat dibersihkan dengan handuk supaya bersih, kemudian diisi dengan nomor patologi menggunakan pensil kaca Mikrotom distel menunjukan 3 mikron. Pisau marotom kasar difiksir pada mikrotom.
- 2) diambil blok jaringan Permukaan yang akan dipotong, didinginkan dan difiksir pada mikrotom. Blok jaringan dipotong dengan pisau mikrotom

kasar, sehingga didapatkan permukaan yang rata.

3) Pisau mikrotom diganti dengan pisau yang halus. Blok jaringan dipotong kembali, dipilih potongan yang terbaik. Potongan jaringan diambil dengan menggunakan kuas dan jarum ose. Jaringan diapungkan kedalam bak air yang telah berisi larutan. Jaringan dibiarkan mengapung, bagian yang melipat diratakan sehingga permukaannya rata

4) Jaringan disalut dengan gelas perparat yang telah berisi nomor patologi. Preparat dimasukkan ke dalam hotplate dan dibiarkan semalam, minimal 12 jam jaringan siap diwarnai (Manual Standar Balai Veteriner Lampung 2023).

f) Pewarnaan Menggunakan Ekstrak Kubis Ungu-Eosin

1. Dehidrasi yang bertujuan untuk menghilangkan paraffin, dilakukan menggunakan larutan Xylol I, Xylol II, Xylol III, dengan masing-masing waktu 5 menit.
2. Rehidrasi bertujuan untuk memasukan air, dengan menggunakan larutan alkohol bertingkat mulai dari alkohol absolute I, alkohol absolute II, alkohol 95%, alkohol 90%, dan alkohol 90%, dengan masing-masing waktu 5 menit.
3. Pencucian slide dengan menggunakan aquadest selama 1 menit.
4. Pewarnaan hematoxylin menggunakan ekstrak kubis ungu dengan konsentrasi 80%, 90%, dan 100% dengan waktu 5 menit
5. Pencucian slide dengan menggunakan aquadest selama 15 menit.
6. Pewarnaan eosin menggunakan larutan eosin selama 2 menit.
7. Dehidrasi yang bertujuan untuk menghilangkan air dengan menggunakan larutan alkohol bertingkat mulai dari alkohol 90%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol absolute, alkohol absolute, masing-masing waktu 3 menit.
8. Clearing dengan menggunakan larutan Xylol IV, dan Xylol V dengan masing-masing waktu 5 menit.
9. Mounting yang dilakukan dengan menggunakan deck glass berupa kaca penutup yang biasanya terbuat dari bahan fiberglass tipis dan larutan permount (Manual Standar Balai Veteriner Lampung 2023).
10. Dilakukan prosedur yang sama untuk tahap pengulangan 1, pengulangan 2, pengulangan 3.

g) Pewarnaan Kontrol Menggunakan Hematoxylin-Eosin

1. Dehidrasi yang bertujuan untuk menghilangkan paraffin, dilakukan menggunakan larutan Xylol I, Xylol II, Xylol III, dengan masing-masing waktu 5 menit.
 2. Rehidrasi bertujuan untuk memasukan air, dengan menggunakan larutan alkohol bertingkat mulai dari alkohol absolute I, alkohol absolute II, alkohol 95%, alkohol 90%, dan alkohol 90%, dengan masing-masing waktu 5 menit.
 3. Pencucian slide dengan menggunakan aquadest selama 1 menit.
 4. Pewarnaan hematoxylin menggunakan reagen hematoxylin sebagai kontrol dengan waktu 5 menit
 5. Pencucian slide dengan menggunakan aquadest selama 15 menit.
 6. Pewarnaan eosin menggunakan larutan eosin selama 2 menit.
 7. Dehidrasi yang bertujuan untuk menghilangkan air dengan menggunakan larutan alkohol bertingkat mulai dari alkohol 90%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol absolute, alkohol absolute, dengan masing-masing waktu 3 menit.
 8. Clearing dengan menggunakan larutan Xylol IV, dan Xylol V dengan masing-masing waktu 5 menit.
 9. Mounting yang dilakukan dengan menggunakan deck glass berupa kaca penutup yang biasanya terbuat dari bahan fiberglass tipis dan larutan permount (Manual Standar Balai Veteriner Lampung 2023).
 10. Dilakukan prosedur yang sama untuk tahap pengulangan 1, pengulangan 2, pengulangan 3.
5. Interpretasi Hasil

Tabel 3.3 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 et al., 2018)dari modifikasi BPMPP

Tabel 3.4 skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin-Eosin pada Inti Sel, Sitoplasma, Intensitas Warna, dan Kontras Pewarnaan

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

Sumber : (Sravya et al., 2018)dengan modifikasi BPMPPI

F. Pengolahan Data dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

Proses pengolahan data dilakukan setelah data terkumpul berdasarkan Hasil pengamatan melalui tahap-tahap sebagai berikut :

- Coding yaitu Pemberian kode pada preparat jaringan ginjal mencit yang sudah dibuat untuk memudahkan pengentrian data dengan kualitas pewarnaan dan ketahanan pada setiap variasi konsentrasi 80%, 90%, dan 100% ketika dimasukkan ke komputer (data entry).
- Pemberian skor sesuai dengan kriteria penilaian pada setiap preparat jika Tidak Baik berada di rentang 4-6, dan Baik berada direntang 7-8.
- Entry Data yaitu Memasukkan data-data hasil penilaian yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi atau program komputer, program SPSS V.25 for Windows.

2. Analisa Data

Dalam penelitian ini, data skoring yang diperoleh dari penilaian oleh ahli kemudian dihitung rata-rata skornya. Skor dikategorikan sebagai Tidak Baik jika berada di rentang 4-6, dan Baik jika berada direntang 7-8 (Sravya et al., 2018). Data yang telah dikumpulkan kemudian dianalisis dengan cara analisis bivariat yaitu analisis yang melibatkan dua variabel untuk memeriksa apakah ada perbedaan hasil mikroskopis pewarnaan ekstrak kubis ungu dengan pewarna hematoxylin sebagai kontrol pada sediaan jaringan ginjal mencit dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis Test* dengan tingkat signifikansi ($p<0,05$) dan untuk mengetahui perbedaan kualitas pada setiap konsentrasi 80%, 90%, dan 100% dilakukan uji *Mann-Whitney test* dengan tingkat signifikansi ($p<0,05$).

G. Ethical Clearance

Penelitian dilaksanakan setelah mendapatkan persetujuan ethical clearance dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan No. 176/KEPK-TJK/IV/2025 pada 26 April 2025. 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.