

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain Posttest-Only Control Group. Teknik sampling yang digunakan adalah *Purposive Sampling*. Penelitian melibatkan dua variabel, yaitu variabel bebas berupa pewarnaan dengan ekstrak Daun Pucuk Merah sebagai pengganti eosin dengan konsentrasi (30%, 50%, 75%, 80%, 100%) dan variabel terikat berupa kualitas pewarnaan sediaan hepar mencit. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi perbedaan kualitas pewarnaan sediaan histologi hepar mencit dalam proses pewarnaan Hematoxylin Eosin menggunakan ekstrak daun Pucuk Merah sebagai pengganti eosin. Hasil pewarnaan kemudian diamati dan dinilai menggunakan skoring berdasarkan parameter seperti inti sel, sitoplasma, intensitas pewarnaan, serta keseragaman warna.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung dan Laboratorium Balai Veteriner Lampung.

2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2025.

C. Populasi dan Sampel

Populasi sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan di Laboratorium Balai Veteriner Lampung pada bulan Maret 2025. Sampel diambil dari populasi hepar mencit jantan. Teknik pengambilan sampel dilakukan menggunakan metode *purposive sampling*. Penentuan jumlah sampel dan pengulangan ditentukan berdasarkan rumus Federer (1963). Rumus Federer adalah rumus jumlah subjek tiap kelompok perlakuan dalam penelitian eksperimental. Rumusnya yaitu $(r-1)(t-1) \geq 15$ bahwa (t) merupakan jumlah perlakuan, sedangkan (r) merupakan pengulangan pada tiap perlakuan. Perhitungan rumus Federer:

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Hasil perhitungan tersebut maka di dapatkan hasil bahwa pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali dalam 6 perlakuan. Jadi, sampel yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari seluruh populasi dengan teknik *Purposive sampling* berjumlah 24 sampel, dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

a. Kriteria Inklusi

- 1) Organ hepar mencit jantan normal.
- 2) Blok paraffin hepar mencit dilakukan pemotongan *sectioning* dengan ketebalan 3 μ m.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Slide hilang.
- 2) Slide rusak atau pecah

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas					
Pewarnaan Sediaan Hepar Mencit dengan Eosin dan Ekstrak Daun Pucuk Merah	Pewarnaan dengan metode HE menggunakan Eosin sebagai kontrol dan ekstrak daun pucuk merah untuk sediaan perlakuan	1. Lembar observasi 2. Metode Maserasi dengan Pengenceran: $V_1\%1=V_2\%2$ untuk ekstrak daun pucuk merah	1. Lembar MSDS 2. Gelas ukur untuk pengenceran ekstrak daun pucuk merah	1. Eosin 2. Ekstrak daun pucuk merah 30%, 50%, 75%, 80%, 100%	Ordinal
Kualitas Pewarnaan Sediaan Histologi Hepar Mencit	Pemenuhan standar pewarnaan histologi mencakup: pewarnaan inti sel, sitoplasma, intensitas warna, serta kontras pewarnaan.	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMP	Mikroskop dan lembar observasi	4-6 Tidak baik 7-8 Baik	Ordinal
Inti sel	Inti sel akan diwarnai oleh Hematoxylin, menghasilkan warna biru atau ungu saat proses pewarnaan.	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Sitoplasma	Sitoplasma yang berada diantara inti sel dan membran sel, akan diwarnai oleh eosin dan menghasilkan warna merah muda.	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Intensitas warna	Intensitas warna mengacu pada tingkat kecerahan atau kegelapan suatu warna pada gambar atau objek yang diamati, yang kemudian dibandingkan dengan Kontrol	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMPPPI	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Keseragaman warna	Warna yang seragam dan memiliki karakteristik yang jelas sehingga mudah dibedakan dari warna lain.	Metode skoring (Sravya et al., 2018) yang telah dimodifikasi BPMPPPI.	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal

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

E. Pengumpulan Data

1. Pembuatan ekstrak daun pucuk merah

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi oven, neraca analitik, gelas ukur, toples kaca, *vacuum rotary evaporator*, pH meter, waterbath, saringan, botol reagen, pinset, scalpel no 22, tissue embedding, basemold, tissue cassette, incubator 38-40°C, mikrotom, pisau mikrotom disposable, spuit, objek glass, pensil, flotation bath, hot plate, rak pewarnaan, wadah pewarnaan, deckglass, mikroskop binokuler.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi etanol 96%, aquadest, serbuk ekstrak daun pucuk merah, hepar mencit, buffer formalin 10%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 90%, alkohol absolut, xylol, paraffin, aquadest, Hematoxylin, Eosin, ekstrak Daun pucuk merah.

2. Cara kerja

a. Prosedur Kerja Ekstraksi daun pucuk merah metode maserasi

Metode maserasi dilakukan dengan merendam serbuk tanaman dalam pelarut yang sesuai di wadah tertutup pada suhu ruangan (Badaring *et al.*, 2020) Penelitian ini menggunakan pada daun pucuk merah yang dominan berwarna merah. Daun diperoleh dari Unit Konservasi Budidaya Biofarmaka (UKBB) Pusat Studi Biofarmaka Tropika IPB dan diolah menjadi serbuk simplisia sebelum dilakukan proses ekstraksi di Laboratorium Kimia Organik Universitas Lampung dengan cara:

- 1) Siapkan alat dan bahan yang digunakan.
- 2) Serbuk simplisia sebanyak 500 gram ditempatkan dalam wadah tertutup, lalu tambahkan 3000 mL pelarut ethanol 95% campuran tersebut direndam pada suhu ruang selama 3x24 jam dengan pengadukan sesekali setelah proses perendaman selesai proses

perendaman selesai, endapan dipisahkan dari filtrat menggunakan kertas saring dan corong kaca.

- 3) Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 41°C selama minimal 6 jam hingga menghasilkan ekstrak yang kental (SOP Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung, 2023). Didapatkan hasil ekstrak sebanyak 110 gram
 - 4) Ekstrak kental yang didapat kemudian dilakukan pengenceran konsentrasi 30%, 50%, 75%, 80%, 100% dengan menggunakan rumus pengenceran.
- b. Prosedur kerja pembuatan dan pewarnaan sediaan Histologi
- 1) Proses euthanasia dilakukan dengan cara pembiusan melalui inhalasi menggunakan kloroform. Hewan sepenuhnya terbius, langkah berikutnya adalah melakukan pembedahan dan pengambilan organ hepar mencit, lalu dimasukkan kedalam larutan buffer formalin 10% untuk difiksasi selama 24 jam.
 - 2) Pematangan jaringan

Tabel 3.2 Tahap pematang jaringan

No	Proses	Reagensia	Waktu
1.	Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
		Alkohol 95%	2 jam
		Alkohol absolute	2 jam
		Alkohol absolute	2 jam
2.	Clearing	Xylol I	3 jam
		Xylol II	3 jam
3.	Infiltrasi/impregnasi	Paraffin	2 jam
		Paraffin	2 jam

Sumber: Manual Standar Balai Veteriner Lampung (2023).

3) Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Tabel 3.3 Tahap pewarnaan Hematoxylin-Eosin

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Defarafinisasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2	Rehidrasi (memasukkan air)	Alkohol absolute I	5 menit
		Alkohol absolute II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan Inti	Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit

6	Pewarnaan Sitoplasma	Eosin	2 menit
7	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit
8	Clearing	Xylol IV	5 menit
		Xylol V	5 menit
9	Mounting	Permount	

Sumber: Manual Standar Balai Veteriner Lampung (2023).

Tabel 3.4 Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak daun pucuk merah 30%

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Defarafinisasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2	Rehidrasi (memasukkan air)	Alkohol absolute I	5 menit
		Alkohol absolute II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan Inti	Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan Sitoplasma	Ekstrak daun pucuk merah 100%	2 menit
7	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit
8	Clearing	Xylol IV	5 menit
		Xylol V	5 menit
9	Mounting	Permount	

Tabel 3.5 Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak daun pucuk merah 50%

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Defarafinisasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2	Rehidrasi (memasukkan air)	Alkohol absolute I	5 menit
		Alkohol absolute II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan Inti	Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan Sitoplasma	Ekstrak daun pucuk merah 80%	2 menit
7	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit

8	Clearing	Xylol IV	5 menit
		Xylol V	5 menit
9	Mounting	Permount	

Tabel 3.6 Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak daun pucuk merah 75%

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Defarafinisasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2	Rehidrasi (memasukkan air)	Alkohol absolute I	5 menit
		Alkohol absolute II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan Inti	Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan Sitoplasma	Ekstrak daun pucuk merah 75%	2 menit
7	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit
8	Clearing	Xylol IV	5 menit
		Xylol V	5 menit
9	Mounting	Permount	

Tabel 3.7 Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak daun pucuk merah 80%

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Defarafinisasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1	5 menit
		Xylol II	5 menit
		Xylol III	5 menit
2	Rehidrasi (memasukkan air)	Alkohol absolute I	5 menit
		Alkohol absolute II	5 menit
		Alkohol 95%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
		Alkohol 90%	5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan Inti	Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan Sitoplasma	Ekstrak daun pucuk merah 50%	2 menit
7	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 95%	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit
		Alkohol absolute	3 menit
8	Clearing	Xylol IV	5 menit
		Xylol V	5 menit
9	Mounting	Permount	

Tabel 3.8 Pewarnaan Hematoxylin-Ekstrak daun pucuk merah 100%

No	Proses	Reagensia	Waktu
1	Defarafinisasi (menghilangkan paraffin)	Xylol 1 Xylol II Xylol III	5 menit 5 menit 5 menit
2	Rehidrasi (memasukkan air)	Alkohol absolute I Alkohol absolute II Alkohol 95% Alkohol 90% Alkohol 90%	5 menit 5 menit 5 menit 5 menit 5 menit
3	Pencucian	Aquadest	1 menit
4	Pewarnaan Inti	Hematoxylin	5 menit
5	Pencucian	Aquadest	15 menit
6	Pewarnaan Sitoplasma	Ekstrak daun pucuk merah 30%	2 menit
7	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol 90% Alkohol 90% Alkohol 95% Alkohol absolute Alkohol absolute	3 menit 3 menit 3 menit 3 menit 3 menit
8	Clearing	Xylol IV Xylol V	5 menit 5 menit
9	Mounting	Permount	

4) Interpretasi Hasil

Tabel 3.9 Kriteria skoring penilaian kualitas pewarnaan

No	Struktur	Deskripsi	Skor
1	Inti sel	Warna ungu kebiruan pada inti sel tidak jelas.	1
		Warna ungu kebiruan pada inti sel jelas.	2
2	Sitoplasma	Warna merah muda pada sitoplasma terlihat tidak jelas.	1
		Warna merah muda pada sitoplasma terlihat tajam dan jelas.	2
3	Intensitas pewarnaan	Tingkat kejelasan warna dari pewarnaan yang tampak lemah/pudar.	1
		Tingkat kejelasan warna dari pewarnaan yang tampak kuat atau padat.	2
4	Keseragaman warna	Tidak ada perbedaan warna yang jelas antara warna ungu kebiruan pada inti sel dan merah muda pada sitoplasma.	1
		Ada perbedaan warna yang jelas antara warna ungu kebiruan inti sel dan merah muda pada sitoplasma.	2

Sumber: Sravya *et al.*, 2018 yang dimodifikasi BPMPPPI.

Tabel 3.10 Skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin-Eosin

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

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

F. Pengolahan Data dan Analisis data

Pengolahan data dilakukan setelah data dikumpulkan berdasarkan hasil pengamatan, melalui beberapa tahapan sebagai berikut:

- a. Coding yaitu proses memberikan kode pada data untuk mempermudah saat melakukan entri data ke computer.
- b. Entry data yaitu proses memasukkan data yang sudah terkumpul ke dalam aplikasi atau program computer, seperti SPSS V.25 for Windows.
- c. Skoring yaitu proses memberikan skor pada variabel yang diteliti untuk mendapatkan nilai yang bermakna.

G. Analisis Data

Data dari hasil pemberian skoring yang diperoleh dari penilai oleh ahli Patologi Anatomi dijumlahkan, kemudian dihitung rata-rata skornya. Skor dikategorikan sebagai tidak baik jika berada di rentang 4-6, dan baik jika berada di rentang 7-8 (Sravya et al., 2018) dengan beberapa modifikasi. Data yang dikumpulkan kemudian di uji menggunakan Kruskal-Wallis Test dengan tingkat signifikan $p < 0,05$ untuk menentukan apakah ada perbedaan hasil mikroskopis pewarnaan Hematoxylin Eosin antar kelompok.

H. Ethical Clearance

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik Poltekkes Tanjungkarang, dengan No.051/KEPK-TJK/III/2025. Pada tanggal 12 Maret 2025. Hewan sebagai subjek dengan menggunakan spesimen jaringan hepar mencit sebagai sampel yang akan diperiksa. Penelitian ini menggunakan standar prosedur yang berlaku.