

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah kuantitatif eksperimental, dengan desain penelitian komparatif, membandingkan penggunaan larutan fiksatif NBF 10% dengan bahan alternatif ekstrak asam kandis pada preparat sediaan histologi organ ginjal mencit. Asam kandis dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etanol hingga mendapatkan biang/pasta kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 15%, 30%, dan 45%. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa dan berapa lama ekstrak asam kandis dapat menghasilkan sediaan histologi organ ginjal mencit yang mirip dengan penggunaan larutan fiksatif NBF 10%. Pada penelitian ini terdapat dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas yaitu penggunaan larutan fiksatif NBF 10% dan ekstrak asam kandis 15%, 30%, 45% selama 24 dan 48 jam pada organ ginjal mencit. Sedangkan untuk variabel terikatnya adalah kualitas hasil sediaan histologi organ ginjal mencit berdasarkan pewarnaan inti sel, sitoplasma sel, intensitas pewarnaan, dan keseragaman warna.

Pembuatan sediaan histologi organ ginjal mencit terdapat 7 perlakuan pada proses fiksasi yaitu menggunakan ekstrak asam kandis konsentrasi 15%, 30%, 45% selama 24 dan 48 jam serta menggunakan larutan fiksatif NBF 10% selama 24 jam sebagai kontrol. Hasil perbandingan kualitas sediaan histologi organ ginjal mencit yang difiksasi dengan ekstrak asam kandis konsentrasi 15%, 30%, 45% selama 24 dan 48 jam serta larutan NBF 10% berdasarkan pewarnaan inti sel, sitoplasma sel, intensitas pewarnaan, dan keseragaman warna dilakukan uji analisa data statistik menggunakan uji *Kruskall Wallis* dan *Mann Whitney* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Balai Veteriner Bandar Lampung.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2025.

C. Populasi dan Sampel

Mencit adalah populasi dari penelitian ini, sediaan organ ginjal mencit sebagai sampel penelitian. Untuk mendapatkan jumlah pengulangan maka digunakan rumus *Federer* yaitu untuk menentukan berapa banyak pengulangan dari setiap perlakuan sehingga didapatkan total sampel yang akan digunakan pada penelitian eksperimental.

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

Keterangan:

n = Banyaknya pengulangan

t = Jumlah kelompok perlakuan

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

$$(n-1)(7-1) \geq 15$$

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

$$(6n-6) \geq 15$$

$$(6n) \geq 21$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari rumus *Federer*, terdapat 7 perlakuan diperoleh 4 pengulangan di setiap perlakuannya maka total sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 28 sampel dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1. Kriteria Inklusi

- a. Organ atau jaringan dalam keadaan baik dan utuh
- b. Tidak ada kelainan anatomis pada organ atau jaringan

2. Kriteria Eksklusi

- a. Kondisi preparat kotor, pecah, ataupun rusak
- b. Kondisi organ atau jaringan terjadi autolisis maupun kematian sel
- c. Kondisi jaringan mengalami robekan, goresan ataupun berlubang

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas					
Penggunaan NBF 10% pada proses fiksasi	Organ ginjal mencit difiksasi dengan larutan fiksatif NBF 10% sebagai kontrol	Observasi	Lembar MSDS	NBF 10%	Nominal
Penggunaan ekstrak asam kandis 15%, 30%, 45%	Organ ginjal mencit difiksasi dengan ekstrak asam kandis selama 24 & 48 jam	Pengenceran $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Gelas ukur dan pipet ukur	Ekstrak asam kandis 15%, 30%, 45%	Nominal
Variabel terikat					
Kualitas hasil pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) pada preparat histologi organ ginjal mencit	Penilaian kualitas sediaan histologi organ ginjal mencit berdasarkan inti sel, sitoplasma, intensitas pewarnaan dan keseragaman warna.	Metode skoring (Srivaya dkk, 2018 dimodifikasi BPMPPPI)	Mikroskop dan lembar observasi	4-6 (Tidak Baik) 7-8 (Baik)	Ordinal
Inti Sel	Warna ungu kebiruan pada inti sel, inti sel jelas	Metode skoring (Srivaya dkk, 2018 dimodifikasi BPMPPPI)	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Sitoplasma Sel	Warna merah atau merah muda pada sitoplasma terlihat jelas	Metode skoring (Srivaya dkk, 2018 dimodifikasi BPMPPPI)	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Intensitas Pewarnaan	Warna terlihat cerah atau pekat terhadap keseluruhan sediaan yang telah diwarnai	Metode skoring (Srivaya dkk, 2018 dimodifikasi BPMPPPI)	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal
Keseragaman Warna	Pewarnaan keseluruhan merata, keseluruhan terwarnai dengan baik	Metode skoring (Srivaya dkk, 2018 dimodifikasi BPMPPPI)	Mikroskop dan lembar observasi	1. Tidak baik 2. Baik	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat pelindung diri (APD) yang terdiri dari sarung tangan lateks, jas lab, dan masker, wadah dengan tutup yang sesuai (volumenya sesuai dengan ukuran sampel), label, pisau bedah, pinset, *cassette*, *base mold*, cetakan *embedding*, mikrotom, *tissue water bath*, *hot plate*, *slide*, *deck glass*, oven laboratorium (disetel pada 60°C).

2. Bahan

Organ ginjal mencit, Larutan fiksatif NBF 10%, ekstrak asam kandis 15%, 30%, 45%, larutan alkohol absolut, larutan alkohol 75%, 85%, 90% dan 95%, *clearing agent* (xylol), lilin parafin, aquadest, hematoxylin eosin dan canada balsam/entelan.

3. Pembuatan Ekstrak Asam Kandis

- a. Asam kandis yang kering dibuat simplisia dengan cara dihaluskan
- b. Simplisia ditimbang 500 gram dan larutkan dalam 5 liter etanol 96%
- c. Larutan didiamkan selama 3x24 jam
- d. Larutan setelah direndam, lalu disaring kemudian dilakukan evaporasi sampai mendapatkan biang/pasta dan dibuat menjadi ekstrak asam kandis 100%
- e. Ekstrak asam kandis 100% diencerkan menjadi konsentrasi 15%, 30%, 45% menggunakan rumus $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$
- f. Pengecekan pH dilakukan untuk mengetahui larutan sudah kondisi pH netral, apabila larutan masih dalam kondisi pH asam, ditambahkan pereaksi NaOH 2 M.

4. Pembuatan Preparat

- a. Mencit dilakukan pembiusan terlebih dahulu memakai kloroform
- b. Pembedahan mencit dilakukan dengan mengambil organ ginjal untuk dijadikan preparat histologi
- c. Proses pertama dalam pembuatan sediaan dengan melakukan fiksasi sebagai berikut:

Tabel 3.2 Proses Fiksasi Menggunakan Asam Kandis

Larutan Fiksasi	Waktu Fiksasi
NBF 10%	24 jam
Ekstrak Asam Kandis 15%, 30%, 45%	24 jam
Ekstrak Asam Kandis 15%, 30%, 45%	48 jam

- d. Dilanjutkan proses pematangan jaringan untuk mengeluarkan larutan fiksatif pada jaringan.

Tabel 3.3 Proses Pematangan Jaringan

Proses	Reagensia	Waktu
Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
	Alkohol 95%	2 jam
	Alkohol Absolut	2 jam
	Alkohol Absolut	3 jam
<i>clearing</i>	Xylol	3 jam
	Xylol	3 jam
Infiltrasi	Parafin	2 jam
	Parafin	2 jam

(Sumber: SOP Balai Veteriner Lampung, 2024)

- e. Proses setelahnya yaitu penanaman jaringan dengan menuangkan parafin cair secukupnya pada *base mold*, posisikan jaringan sesuai yang diharapkan, tutup dengan kaset jaringan lalu tambahkan kembali parafin sampai batas maksimal kemudian dinginkan blok jaringan.
- f. Dilakukan potongan kasar atau *trimming* pada blok jaringan dalam keadaan sudah dingin dengan ketebalan 15 μm untuk menyisihkan parafin yang berlebih pada blok jaringan.
- g. Selanjutnya potongan halus atau *sectioning* untuk mendapatkan potongan jaringan dengan ketebalan 3 μm .
- h. Potongan jaringan yang sudah terbentuk dimasukkan pada *waterbath* agar jaringan bebas dari lipatan.
- i. Jaringan diambil dengan *object glass* lalu diberi label kemudian letakkan pada hot plate setelah itu dilakukan pewarnaan menggunakan Hematoxylin Eosin.

Tabel 3.4 Proses Pewarnaan Preparat Histologi

No	Reagensia	Waktu
1)	Xylol I	5 Menit
2)	Xylol II	5 Menit
3)	Xylol III	5 Menit
4)	Alkohol Absolut I	5 Menit
5)	Alkohol Absolut II	5 Menit
6)	Alkohol Absolut III	5 Menit
7)	Alkohol 95%	5 Menit
8)	Alkohol 85%	5 Menit
9)	Alkohol 75%	5 Menit
10)	Aquadest	1 Menit
11)	Harris-Hematoxylin	5 Menit
12)	Aquadest	15 Menit
13)	Eosin	2 Menit
14)	Alkohol 90%	3 Menit
15)	Alkohol 90%	3 Menit
16)	Alkohol 95%	3 Menit
17)	Alkohol 95%	3 Menit
18)	Alkohol Absolut	3 Menit
19)	Alkohol Absolut	3 Menit
20)	Xylol IV	5 Menit
21)	Xylol V	3 Menit
22)	<i>Mounting</i> dengan canada balsam.	

(Sumber: SOP Balai Veteriner Lampung, 2024)

F. Pengolahan Data

Hasil data yang didapatkan berasal dari penilaian dokter spesialis Patologi Anatomi. Adanya perbedaan kualitas sediaan histologi organ ginjal mencit berdasarkan pewarnaan inti, sitoplasma, intensitas pewarnaan dan keseragaman warna dilakukan uji analisa menggunakan uji *Kruskall Wallis* dan *Mann Whitney* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$.

Langkah-langkah pengolahan data dilakukan dengan data yang terkumpul berdasarkan hasil pengamatan melalui tahap-tahap sebagai berikut:

1. *Coding* yaitu memberikan kode pada data setelah dientry sehingga mempermudah data ketika dimasukkan ke komputer (*data entry*).
2. *Entry Data* yaitu data yang telah terkumpul diproses dengan aplikasi atau program komputer seperti SPSS.
3. *Skoring* yaitu memberikan penilaian berupa skor terhadap tabel agar memperoleh nilai yang signifikan.

G. Analisis Data

Hasil penilaian dari dokter Patologi Anatomi berupa skoring dijumlahkan lalu dihitung rata-rata skoringnya. Nilai skoring yang diberikan yaitu 1-2 dengan total skor dikatakan baik apabila mencapai skor 80%, yaitu 7-8 kategori baik dan 4-6 kategori tidak baik (Srarya dkk, 2018). Hasil Perbandingan kualitas sediaan histologi organ ginjal mencit menggunakan NBF 10% dan ekstrak asam kandis 15%, 30%, 45% selama 24 dan 48 jam dilakukan analisis menggunakan uji *Kruskall Wallis* dan *Mann Whitney* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$.