

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen, yaitu penelitian sistematis memanipulasi satu atau lebih variabel independen untuk mengukur dampaknya terhadap variabel dependen, dengan tujuan untuk menentukan sebab akibat atau hubungan kausal diantara variabel tersebut (Sugiyono, 2012).

Jaringan diberikan perlakuan perendaman langsung dengan BNF 10% (0 menit), kemudian dilakukan penundaan fiksasi BNF 10% dengan waktu penundaan 30 menit, 1 jam, 2 jam, dan 4 jam. Hasil dari perlakuan tersebut berupa skoring dari hasil gambaran mikroskopis jaringan dengan pewarnaan *Haematoxylini Eosin*.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *one group pre test post test*. Rancangan *one group pre test post test* tidak ada kelompok pembandingan (kontrol), tetapi paling tidak sudah dilakukan observasi pertama (*pre test*) yang memungkinkan menguji perubahan-perubahan yang terjadi setelah adanya eksperimen (Sugiyono, 2012).

Hasil gambaran mikroskopis jaringan yang langsung difiksasi dengan BNF 10% (0 menit) menjadi langkah observasi pertama penelitian ini untuk

mengetahui adanya perubahan-perubahan yang terjadi setelah diberikan perlakuan penundaan fiksasi dengan BNF 10% pada lama waktu 30 menit, 1 jam dan 2 jam dan 4 jam.

Tabel 6. Desain Penelitian

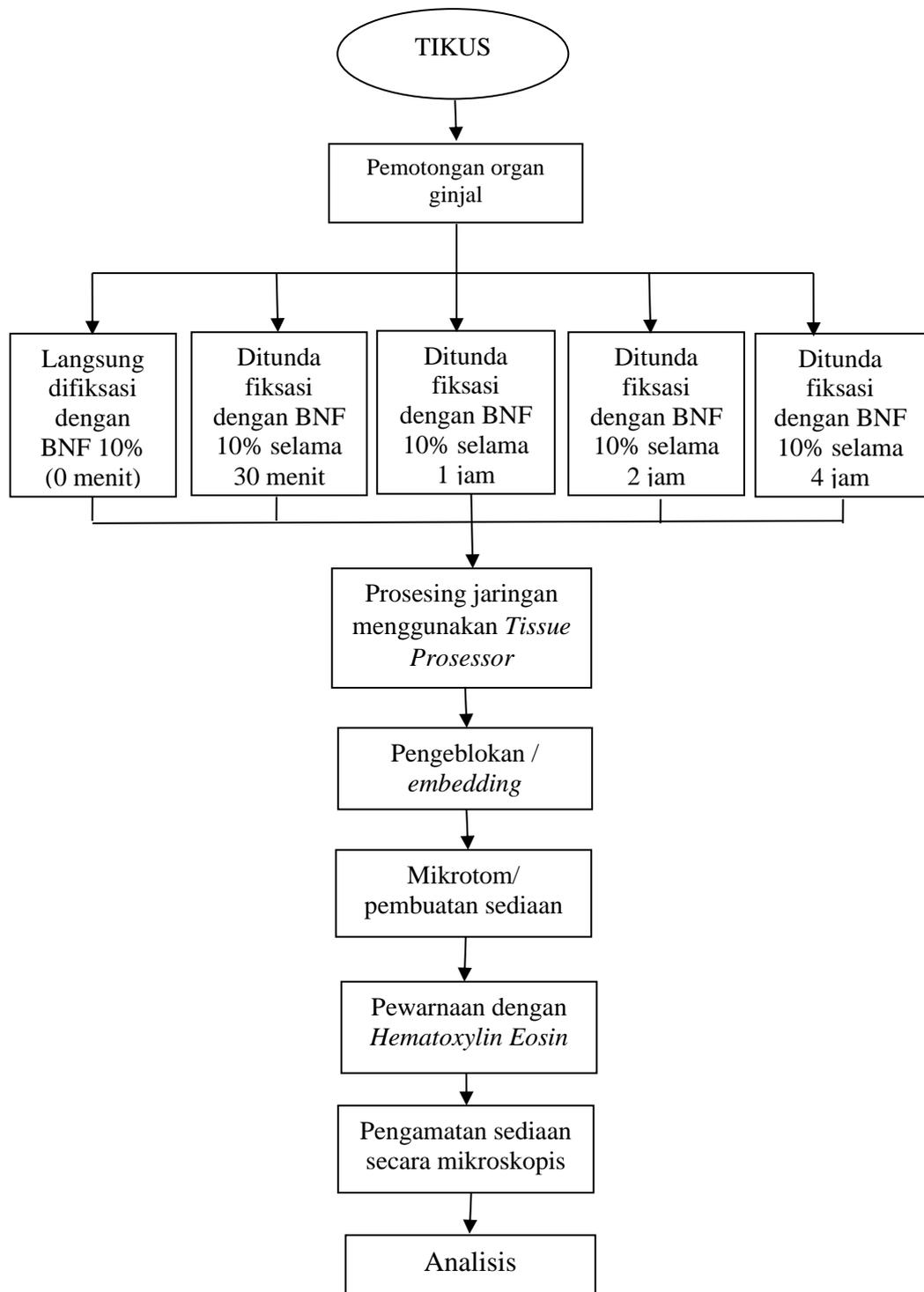
Pre test	Perlakuan	Post test
O ₁	X	O ₂

Sumber : Sugiyono, 2012.

Keterangan :

- O₁ : Hasil gambaran mikroskopis jaringan yang langsung difiksasi dengan BNF 10% (0 menit)
- X : Penundaan fiksasi jaringan dengan BNF 10% dengan variasi waktu 30 menit, 1 jam, 2 jam, dan 4 jam.
- O₂ : Hasil gambaran mikroskopis jaringan setelah diberi perlakuan penundaan fiksasi dengan BNF 10% dengan variasi waktu 30 menit, 1 jam, 2 jam, dan 4 jam.

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah organ ginjal tikus putih (*Mus musculus*) jenis wistar usia 3 bulan dengan berat 150-200 gram . Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, sehingga banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus *federer* yang mana mendapatkan hasil sebagai berikut :

(Fauziyah, 2019)

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

$$(n-1)(5-1) \geq 15 \quad t : \text{Jumlah perlakuan}$$

$$(n-1)4 \geq 15 \quad n : \text{Jumlah sampel}$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75 = 5$$

Berdasarkan perhitungan diatas didapatkan jumlah sampel adalah 5. Penelitian ini peneliti akan menggunakan sampel sebanyak 6 ekor tikus, yang masing-masing ginjal tikus dilakukan 5 perlakuan yang berbeda, yaitu perlakuan 1 adalah jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) langsung difiksasi dengan BNF 10% (0 menit), perlakuan ke 2 adalah dilakukan penundaan fiksasi dengan BNF 10% selama 30 menit, perlakuan ke 3 adalah dilakukan penundaan fiksasi dengan BNF 10% selama 1 jam, perlakuan ke 4 adalah dilakukan penundaan fiksasi dengan BNF 10% selama 2 jam dan perlakuan ke 5 adalah dilakukan penundaan fiksasi dengan BNF 10% selama 4 jam . Masing-masing bagian atau perlakuan

dipotong dan dibuat 1 sediaan atau preparat, sehingga total sediaan yang digunakan adalah $6 \times 5 = 30$ sediaan. Semua sediaan jaringan ginjal tikus akan diwarnai dengan *Haematoxylin Eosin* dan diamati secara mikroskopis dengan pembesaran 400x.

D. Waktu dan Tempat Penelitian.

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 01 sampai 07 Oktober 2023.

2. Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Sleman Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama waktu penundaan fiksasi dengan BNF 10% selama 30 menit, 1 jam, 2 jam, dan 4 jam.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil gambaran mikroskopis jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin*.

F. Definisi Operasional

1. Lama waktu penundaan fiksasi dengan BNF 10% 30 menit adalah waktu penundaan fiksasi dengan BNF 10% yang dilakukan 30 menit setelah jaringan di isolasi.

2. Lama waktu penundaan fiksasi BNF 10% 1 jam adalah waktu penundaan fiksasi dengan BNF 10% yang dilakukan 1 x 60 menit setelah jaringan di isolasi.
3. Lama waktu penundaan fiksasi dengan BNF 10% 10% 2 jam adalah waktu penundaan fiksasi dengan BNF 10% yang dilakukan 2 x 60 menit setelah jaringan di isolasi.
4. Lama waktu penundaan fiksasi dengan BNF 10% 4 jam adalah waktu penundaan fiksasi dengan BNF 10% yang dilakukan 4 x 60 menit setelah jaringan di isolasi.
5. Hasil gambaran mikroskopis jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) adalah skoring hasil gambaran mikroskopis jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) yang diamati dibawah mikroskop pembesaran 400x.

Ketentuan skoring pewarnaan inti sel dan sitoplasma :

- a. Skoring 1 yaitu intensitas warna biru pada inti sel dan warna merah muda pada sitoplasma tidak baik.
- b. Skoring 2 yaitu intensitas warna biru pada inti sel dan warna merah muda pada sitoplasma kurang baik.
- c. Skoring 3 yaitu intensitas warna biru pada inti sel dan warna merah muda pada sitoplasma baik.

Ketentuan skoring sel membengkak :

- a. Skoring 1 yaitu sel membengkak > 50% dari sediaan (sebagian besar)
- b. Skoring 2 yaitu sel membengkak < 50% dari sediaan (sebagian kecil)
- c. Skoring 3 yaitu tidak ada sel membengkak

Ketentuan skoring sel menyusut :

- d. Skoring 1 yaitu sel menyusut $> 50\%$ dari sediaan (sebagian besar)
- e. Skoring 2 yaitu sel menyusut $< 50\%$ dari sediaan (sebagian kecil)
- f. Skoring 3 yaitu tidak ada sel menyusut

Ketentuan skoring sel lisis :

- a. Skoring 1 yaitu sel lisis $> 50\%$ dari sediaan (sebagian besar)
- b. Skoring 2 yaitu sellisis $> 50\%$ dari sediaan (sebagian kecil)
- c. Skoring 3 yaitu tidak ada sel lisis

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer yaitu hasil gambaran mikroskopis dari jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) yang telah dilakukan skoring. Data primer adalah data yang diperoleh atau dikumpulkan secara langsung dari sumber datanya. Data primer disebut juga data asli atau data baru yang memiliki sifat kekinian (Rinaldi, 2017).

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik yang digunakan untuk mengumpulkan data primer adalah dengan melihat hasil gambaran mikroskopis sediaan jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) dengan menggunakan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* yang langsung difiksasi dengan BNF 10% (0 menit), ditunda 30 menit, 1 jam, 2 jam dan 4 jam.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Instrumen yang digunakan :
 - a. Mesin pengolahan jaringan (*Tissue Processing*) Leica TP 102
 - b. *Histocore Acardi Hot Leica*
 - c. *Histocore Acardi Cool Leica*
 - d. Mesim pemotongan *Leica RM 2235*
 - e. Mesin pewarnaan *automatic Leica DM 500*
 - f. *Waterbath Leica*
 - g. *Flatening Table Laica HI 1220*
 - h. Mikroskop *Olympus*
 - i. Kaset jaringan
 - j. Pisau mikrotom
 - k. Objek glas
 - l. Deck glas
 - m. Alat pencetak jaringan (*bas moll*)
 - n. Alat pelindung diri (APD)
 - o. Kaca mata (*Google*)
 - p. Talenan
 - q. Pisau bedah (*Aesculap*)
 - r. Pinset
 - s. Penggaris
 - t. Gunting
 - u. Pensil

2. Bahan yang digunakan :

- a. Bufer Netral Formalin 10% (BNF)
- b. Alkohol (70%, 80%, 95%, absolut)
- c. *Xylol*
- d. Parafin cair
- e. *Haematoxylin*
- f. *Eosin*
- g. *Entelan*

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Validasi hasil dilakukan oleh dokter spesialis patologi anatomi dan didukung oleh kesahihan alat ukur sudah terstandar. Kalibrasi alat dilakukan setiap 1 tahun sekali. Mutu pemeriksaan ditunjukkan dengan PMI (Pemantapan Mutu Internal) dan PME (Pemantapan Mutu Eksternal) menggunakan jaringan normal appendix dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* setiap 1 tahun.

J. Prosedur Penelitian

- a. Persiapan alat dan bahan pengambilan sampel

Perangkat peralatan yang harus dipersiapkan untuk melakukan isolasi atau pengambilan jaringan ginjal tikus terdiri atas peralatan bedah minor seperti gunting, pinset, kain kasa, talenan, lampu, obat anastesi, botol wadah jaringan dan larutan BNF 10%.

- b. Persiapan sampel

Hewan percobaan tikus dipilih yang sehat, mempunyai status gizi yang baik dan dipelihara sesuai dengan syarat-syarat pemeliharaan hewan percobaan.

Tahap selanjutnya adalah pembiusan hewan percobaan. Setelah tikus terbius dengan sempurna, selanjutnya melakukan operasi pengambilan organ ginjalnya. 6 ekor tikus diambil organ ginjalnya dan masing-masing tikus dibagi menjadi 5 bagian. Masing-masing bagian jaringan dimasukkan kedalam botol wadah sampel lalu ditutup. Potongan pertama langsung disiram dengan larutan BNF 10% yang dikategorikan sebagai 0 menit, dan bagian potongan jaringan yang lainnya dilakukan penundaan perendaman dengan BNF 10% sesuai urutan waktu penundaan perendamannya yaitu setelah 30 menit, 1 jam, 2 jam dan 4 jam.

- c. Pelaksanaan Prosesing Jaringan Sampel
 - a. Masukkan semua bagian potongan jaringan ginjal tikus kedalam kaset, sebelumnya kaset diberi kode sesuai dengan kode sampel.
 - b. Kemudian diproses di *Tissue proceccing* selama 18,5 jam.
 - c. Melakukan pengeblokan atau pencetakan (*Embedding*).
 - d. Melakukan pemotongan blok dengan mikrotom (*Sectioning*) setebal 3-5 mikron.
 - e. Melakukan *Floating*.
 - f. Melakukan pewarnaan *Haematoxylin* dan *Eosin* dengan alat Automatic staining.
 - g. Melakukan perekatan (*Mounting*).
 - h. Melakukan pelabelan pada sediaan.
 - i. Kemudian slide dibaca oleh dokter Spesialis Patologi Anatomi menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100X dan 400X.

K. Manajemen Data

Data primer yang telah terkumpul berupa hasil gambaran mikroskopis sediaan jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) yang langsung difiksasi dengan BNF 10% (0 menit), ditunda 30 menit, 1 jam, 2 jam dan 4 jam, dengan skala ordinal dan interval untuk selanjutnya dilakukan analisis deskriptif dan analisis statistik.

1. Analisis deskriptif

Analisis deskriptif adalah fokus pada deskripsi atau gambaran mendalam tentang fakta yang sedang diteliti, yang bertujuan memberikan pemahaman yang lebih baik tentang fakta tersebut, mengidentifikasi karakteristiknya, dan menjelaskan apa yang sedang terjadi. Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel untuk menggambarkan pengaruh penundaan fiksasi dengan BNF 10% terhadap hasil gambaran mikroskopis sediaan jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) dengan pewarnaan *Haematoxylin eosin*.

2. Analisis statistik

Uji statistik dilakukan dengan menggunakan *software Statistical Progame for Social Science (SPSS) versi 20 for windows* dengan uji Normalitas terlebih dahulu, jika berdistribusi normal dilakukan uji *One-Way ANNOVA* dan jika tidak berdistribusi normal dilakukan uji non parametrik yaitu *Kruskall Wallis* untuk mengetahui pengaruh penundaan fiksasi dengan BNF 10% terhadap hasil gambaran mikroskopis sediaan jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*).

Untuk membuktikan ada tidaknya pengaruh dari perlakuan penelitian ini diuraikan dengan jawaban sementara yang termuat pada uji hipotesis. Pengambilan keputusan berdasarkan nilai *Asymp Sig* yang diperoleh untuk mengetahui apakah hipotesis diterima atau ditolak. Apabila diperoleh nilai *Asymp Sig* $\geq 0,05$ maka H_0 diterima dan apabila nilai *Asymp Sig* $< 0,05$ maka H_0 ditolak.

H_0 : Tidak ada pengaruh penundaan fiksasi dengan BNF 10% terhadap hasil gambaran mikroskopis sediaan jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin*.

H_a : Ada pengaruh penundaan fiksasi dengan BNF 10% terhadap hasil gambaran mikroskopis sediaan jaringan ginjal tikus (*Mus musculus*) dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin*.

L. Etika Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan hewan percobaan tikus (*Mus musculus*) jenis wistar usia 3 bulan yang dibeli di bagian Farmakologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan menerapkan prinsip 3 R, yaitu :

1. *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman maupun literatur.
2. *Reduction* adalah memanfaatkan hewan percobaan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal.
3. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, mengurangi ketidaknyamanan hewan percobaan.

Kemudian jaringan ginjal tikus dibawa untuk diperiksa di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Sleman Yogyakarta dengan mengajukan *ethical clearance* ke Komite Etik Penelitian RSUD Sleman Yogyakarta.