

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *Quasi-Experimental Design*. Penelitian *quasi-experimental design* merupakan bentuk penelitian yang melibatkan pengelompokan unit eksperimen ke dalam kelompok perlakuan dan kelompok kontrol tanpa melalui proses penugasan secara acak (*non-random assignment*) dan tidak sepenuhnya mengontrol variabel luar yang memengaruhi eksperimen (Adiputra *et.al.*, 2021). Penelitian yang dilakukan adalah melakukan pengamatan makroskopis dan mikroskopis jaringan hati dan pankreas tikus Wistar yang difiksasi dengan menggunakan NBF 10% sebagai agen fiksatif kontrol dan menggunakan agen fiksatif alternatif berupa larutan *Ethmeth* sebagai perlakuan dengan subjek ke dalam kedua kelompok tidlak dipilih secara acak (randomisasi).

2. Desain Penelitian

Desain penelitian dalam penelitian ini menggunakan penelitian *Posttest-Only Control Group*. Desain penelitian *Posttest-Only Control Group* merupakan salah satu desain dalam quasi-eksperimental yang digunakan untuk menilai pengaruh suatu perlakuan dengan cara membandingkan hasil pengukuran akhir antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pada desain ini, subjek penelitian dibagi ke dalam

dua kelompok, di mana kelompok perlakuan diberikan intervensi (x), sedangkan kelompok kontrol tidak diberikan intervensi atau hanya menerima perlakuan standar. Pengukuran terhadap variabel dependen hanya dilakukan setelah perlakuan diberikan (*posttest*), tanpa adanya pengukuran awal (*pretest*) (Campbell, *et.al.*, 1963). Dalam penelitian ini kelompok post-test 1 adalah pengamatan jaringan hati dan pankreas tikus Wistar yang difiksasi menggunakan larutan *Ethmeth* dan kelompok post-test 2 adalah pengamatan jaringan hati dan pankreas tikus Wistar yang difiksasi menggunakan larutan NBF 10%, kedua kelompok masing-masing diamati secara makroskopis dan mikroskopis masing-masing kelompok, pada pengamatan makroskopis parameter yang diukur berdasarkan ukuran dan penyusutan sebelum dan setelah fiksasi, serta perubahan warna. Pada pengamatan mikroskopis parameter yang diukur berdasarkan kejelasan inti sel, sitoplasma dan keseragaman warna pada preparat jaringan hati dan pankreas tikus Wistar.

Group	Treatment	<i>Post-test</i>
Experiment 1	X ₁	O ₁
Experiment 2	X ₂	O ₂

Gambar 5. Desain Penelitian *Posttest-Only Control Group*

Keterangan:

- X₁ = Metode fiksasi jaringan hati dan pankreas menggunakan larutan *Ethmeth*
- X₂ = metode fiksasi jaringan hati dan pankreas menggunakan NBF 10%
- O₁ = Hasil pengamatan morfologi jaringan hati dan pankreas difiksasi dengan larutan *Ethmeth*
- O₂ = Hasil pengamatan morfologi jaringan hati dan pankreas difiksasi dengan larutan NBF 10%

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah preparat histologi organ hati dan organ pankreas tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sesuai tujuan penelitian.

a. Kriteria inklusi

- 1) Tikus Wistar dengan kondisi sehat, aktif, dan bebas dari penyakit bawaan
- 2) Usia tikus Wistar 8-12 minggu
- 3) Berat tikus Wistar 180-250 gr (sesua standar laboratorium)
- 4) Tikus Wistar yang tidak pernah diperlakukan farmakologis atau induksi penyakit

b. Kriteria eksklusi

- 1) Tikus Wistar tampak sakit atau memiliki kondisi kesehatan tidak normal sebelum dilakukan perlakuan
- 2) Tikus Wistar mati saat penelitian sebelum dilakukan pembedahan
- 3) Tikus Wistar yang mengalami trauma, luka atau cedera pada organ hati dan pankreas untuk kualitas histomorfologi

2. Objek Penelitian

Objek penelitian ini berupa jaringan organ tikus (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari jaringan hati dan pankreas yang kemudian dianalisis secara makroskopis sebelum dan sesudah fiksasi serta secara mikroskopis setelah menjadi preparat histologi, dengan menggunakan dua jenis bahan fiksatif, yaitu NBF 10% sebagai kontrol dan *Ethmeth* sebagai alternatif fiksatif.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan pada bulan 3 Oktober 2025 sampai 21 April 2026.

2. Tempat Penelitian

Pada penelitian ini akan dilaksanakan di:

- a. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM untuk tahap proses pembedahan dan eksisi organ.

- b. Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada untuk tahap histoteknik; fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi, *embedding*, *sectioning*, *floating*, pewarnaan (*staining*), perekatan (*mounting*) dan *labeling*.
- c. Pusat Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Gedung Radiopoetro untuk tahap Interpretasi pengamatan preparat jaringan oleh dokter penyelia spesialis patologi anatomi.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perlakuan fiksasi jaringan menggunakan larutan fiksatif *Ethmeth* dan NBF 10% sebagai agen fiksatif alternatif dan larutan fiksatif NBF 10% sebagai standar agen fiksatif.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis morfologi jaringan hati dan pankreas tikus Wistar.

E. Batasan Istilah

1. Fiksasi merupakan bagian dari histoteknik yaitu proses kimiawi yang bertujuan untuk mengawetkan dan menstabilkan struktur jaringan setelah diangkat dari tubuh untuk menghasilkan kondisi yang mendekati fisiologis aslinya. Dilakukan dengan cara merendam jaringan yang telah

diangkat ke dalam larutan fiksatif yang mengandung zat-zat kimia tertentu untuk mencegah terjadinya degradasi dan perubahan setelah pengangkatan jaringan.

2. *Neutral Buffered Formaline* (NBF) 10% merupakan larutan fiksatif standar yang paling umum digunakan dalam histologi untuk mengawetkan jaringan dengan cara mengikat silang protein. Larutan ini terdiri dari formaldehida 10% dan larutan buffer yang diperoleh melalui pengenceran 100 ml formaldehida 37-40% dengan penambahan 900 ml larutan buffer, sehingga dapat mempertahankan struktur morfologi jaringan secara optimal dan meminimalisir artefak selama proses fiksasi. Proses fiksasi menggunakan NBF 10% dilakukan selama 12-24 jam.
3. Larutan *Ethmeth* merupakan larutan fiksatif koagulan non-additif berbasis dasar alkohol yang bekerja melalui mekanisme denaturasi dan dehidrasi protein. Larutan tersebut terdiri atas campuran etanol 75% dan methanol 25%. Metanol berperan sebagai komponen dengan daya penetrasi cepat dan kemampuan denaturasi kuat, sedangkan etanol berfungsi sebagai dehidrasi yang menggantikan air dalam jaringan dan memicu koagulasi protein, sehingga membantu mempertahankan morfologi seluler.
4. Tikus Wistar merupakan tikus albino yang sering digunakan dalam berbagai penelitian. Tikus Wistar dipilih sebagai model hewan dalam penelitian histologi karena memiliki karakter genetik yang stabil,

morfologi organ yang mirip dengan manusia, dan mudah untuk dipelihara serta ditangani dalam kondisi laboratorium. Pada pemanfaatannya tikus wistar digunakan juga untuk mempelajari kondisi fisiologis maupun patologis pada penyakit manusia.

5. Hati merupakan organ penting dalam tubuh yang memiliki peran dalam metabolisme bahan-bahan atau zat-zat toksik dalam tubuh. Jaringan hati tersusun atas beberapa jenis sel utama, antara lain hepatosit, sel endotel, sel makrofag (dikenal sebagai sel kupffer), dan sel ito yang berperan menyimpan lemak. Struktur jaringan pada hati yaitu lunak dan terdapat beberapa komponen hati yang dapat berpengaruh terhadap proses fiksasi yaitu adanya lemak, darah dan air dengan kadar yang tinggi.
6. Pankreas merupakan organ yang terletak di rongga retroperitoneal sebelah kiri atas abdomen, pankreas terdiri dari tiga bagian yakni kepala, badan, dan ekor. Organ ini tersusun atas dua komponen utama, yaitu kelenjar eksokrin dan endokrin. Secara histologis, struktur pankreas didominasi oleh kelenjar eksokrin yang tersusun rapat membentuk unit-unit asinus. Asinus-asinus ini berfungsi dalam sekresi enzim pencernaan yang penting untuk proses pencernaan makanan.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Data pada penelitian ini menggunakan data primer. Data ini diperoleh dari skor kualitas histomorfologi pada jaringan hati dan pankreas tikus Wistar.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang akan digunakan pada penelitian ini adalah penilaian terhadap observasi makroskopis dan mikroskopis. Pada observasi makroskopis meliputi ukuran sebelum fiksasi, penyusutan (cm), dan perubahan warna, yang didokumentasikan dengan foto sebelum dan sesudah fiksasi serta dicatat pada lembar observasi. Pada observasi makroskopis dilakukan penilaian terhadap kualitas preparasi histomorfologi pada jaringan hati dan pankreas tikus Wistar yang telah melalui proses fiksasi menggunakan larutan fiksatif *Ethmeth* dan *Neutral buffered formalin 10% (NBF)*. Penilaian dilakukan menggunakan skoring pada kualitas morfologi yang mencakup parameter kejelasan warna inti sel, sitoplasma dan keseragaman warna. Setiap preparat jaringan dilakukan observasi penilaian pada lima lapang pandang dibawah mikroskop berdasarkan kriteria yang telah ditentukan. Pemilihan 5 lapang pandang pada setiap preparat didasarkan pada penelitian oleh (Gholami *et al.*, 2015; Poloni *et al.*, 2020), yaitu 3-5 lapang pandang per preparat dianggap cukup representatif untuk menggambarkan kualitas histomorfologi jaringan. Proses observasi penilalian dilakukan oleh Dokter Penyelia Bidang Histologi.

G. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Instrumen Penelitian

Minor set surgeon, kaset, papan bedah, *Sakura tissue-Tek TEC tissue processor*, *tissue paraffin embedding station Sakura tissue-Tek TEC*,

blok kaset untuk mikrotom, cetakan logam/piringan logam, *Thermo scientific microtome*, pinset, *waterbath*, gelas objek, termometer, *chamber* pengecetan, oven, *timer*; *deck glass*, mikroskop yang terhubung dengan optilab.

2. Bahan penelitian

Larutan garam fisiologis (NaCl), eter (zat anastesi), kain kasa steril, *Neutral buffered formalin* (NBF) 10 %, larutan *Ethmeth*, alkohol 70%, 95% dan 100 %, xylol 1 dan 2, parafin 1 dan 2, parafin cair, cat *Hematoxylin*, cat eosin, alkohol, akuadest, *Canada balsam* (oleoresin), minyak imersi, hewan coba tikus Wistar jantan umur 1-2 bulan.

H. Prosedur Penelitian

1. Tahap Perizinan

a. Perizinan

Perizinan dilakukan untuk memperoleh persetujuan menggunakan fasilitas Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada.

b. Kaji Etik

Kaji etik telah memperoleh persetujuan etik berdasarkan surat keputusan Komite Etik Penelitian Poltekkes Kemenkes Yogyakarta pada tanggal 7 Januari 2026 dengan nomor; DP.04.03/e-KEPK.1/023/2026.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Persiapan dan pembedahan tikus Wistar

- 1) Tikus Wistar diperoleh kemudian dilakukan pembiusan menggunakan larutan eter.
- 2) Tubuh hewan diletakkan pada papan bedah, dilakukan pembedahan dan diambil organ bagian hati dan pankreas.
- 3) Organ hati dan pankreas dicuci menggunakan garam fisiologis (NaCl).

b. Persiapan dan pembuatan larutan NBF 10% dan *Ethmeth*

- 1) NBF 10%
 - a) Menyiapkan \pm 800 mL aquadest di dalam beaker glass sebagai pelarut awal
 - b) Melarutkan 4 g natrium fosfat monobasa (NaH_2PO_4) dan 6,5 g natrium fosfat dibasa (Na_2HPO_4) untuk membentuk sistem buffer
 - c) Menambahkan 100 mL formalin 37–40% ke dalam larutan buffer dan mengaduk hingga homogen
 - d) Memindahkan larutan ke dalam labu ukur 1.000 mL dan menambahkan aquadest hingga mencapai volume akhir.
 - e) Menghomogenkan larutan serta memeriksa pH dengan target 7,0–7,4, kemudian melakukan penyesuaian apabila diperlukan.

- f) Menyimpan larutan dalam botol gelap yang diberi label lengkap dan ditempatkan pada suhu ruang.

2) *Ethmeth*

- a) Menyiapkan alat dan bahan berupa etanol absolut (96–100%) dan metanol absolut, serta beaker glass bersih dan kering
- b) Mengukur etanol absolut sebanyak 3 bagian sesuai dengan volume akhir yang diinginkan (contoh 750 mL untuk volume akhir 1.000 mL)
- c) Mengukur metanol absolut sebanyak 1 bagian (contoh 250 mL untuk volume akhir 1.000 mL)
- d) Menuangkan etanol absolut ke dalam beaker glass, kemudian menambahkan metanol absolut secara perlahan
- e) Mengaduk campuran etanol dan metanol hingga tercampur homogen dan tidak terjadi pemisahan fase
- f) Memindahkan larutan ke dalam wadah penyimpanan tertutup rapat dan berwarna gelap.
- g) Memberi label lengkap yang mencantumkan nama larutan (*Ethmeth*), perbandingan komposisi (etanol : metanol = 3 : 1), tanggal pembuatan, dan nama pembuat
- h) Menyimpan larutan pada suhu ruang, jauh dari sumber panas dan api karena sifatnya yang mudah menguap dan mudah terbakar.

c. Fiksasi

- 1) Organ hati dan pankreas sebelum difiksasi, dilakukan pengamatan makroskopis sesuai parameter uji dan di dokumentasikan
- 2) Organ hati dan pankreas dipotong dan diukur diameternya yaitu 3-4 cm
- 3) Volume pada saat fiksasi yaitu 20:1 bagian antara larutan fiksatif dengan jaringan
- 4) Organ hati dan pankreas kemudian dimasukkan kedalam tabung yang berisi *Neutral buffered formalin* 10% (NBF) selama 24 jam
- 5) Organ hati dan pankreas dimasukkan kedalam tabung yang berisi larutan *EthMeth* selama 24 jam
- 6) Organ dimasukkan ke dalam kaset dan diberi label
- 7) Kaset dimasukkan ke alat *Sakura tissue-Tek TEC tissue processor*.

d. Pengamatan Makroskopis

- 1) Organ hati dan pankreas yang telah difiksasi menggunakan larutan NBF 10% dan larutan *EthMeth* dikeluarkan dari tabung fiksasi
- 2) Organ hati dan pankreas kemudian dilakukan pengamatan pada masing-masing perlakuan agen fiksatif
- 3) Mengukur organ dengan penggaris, kemudian dilakukan dokumentasi

- 4) Melakukan pengamatan secara makroskopis sesuai dengan parameter uji dan dokumentasi pada organ hati dan pankreas
- e. Proses pematangan jaringan (*dehidrasi, clearing, infiltrasi*)
- 1) Dilakukan pengaturan program alat *Sakura tissue-Tek* TEC *tissue processor* agar kaset jaringan dapat langsung diproses dehidrasi di dalam alkohol
 - 2) Memasukkan jaringan pada alat tersebut kemudian secara otomatis jaringan akan melalui proses dehidrasi, *clearing* dan infiltrasi selama 7 jam
- f. Penanaman (*embedding*)
- 1) Mengeluarkan jaringan dari kaset kemudian diletakkan pada piring logam (*embedding*)
 - 2) Memasukkan parafin cair pada nozzle TEC langsung ke cetakan mold hingga seluruh jaringan terendam dengan menyeluruh, kemudian ditutup dengan kaset
 - 3) Memindahkan cetakan ke pelat pendingin (*cold plate*) untuk mengeraskan blok parafin
- g. Pemotongan (*sectioning*)
- 1) Menempatkan blok parafin berisi jaringan ke dalam pemegang blok mikrotom
 - 2) Melakukan pemotongan blok jaringan dengan mengirisnya menggunakan mikrotom setebal 3 μm untuk mendapatkan pita jaringan

h. Pengapungan (*floating*)

- 1) Pita jaringan yang sudah didapatkan dari blok jaringan kemudian dilakukan pengapungan pada *waterbath* dengan 50°C dan memastikan tidak ada pengerutan pada jaringan
- 2) Mengambil pita jaringan dan melekatkan pada gelas objek

i. Pewarnaan (*staining*)

- 1) Melakukan deparafinisasi dengan merendam preparat ke dalam larutan xylol I, II, dan III masing masing selama 3 menit
- 2) Melakukan rehidrasi dengan merendam preparat jaringan ke dalam alkohol dengan masing masing konsentrasi menurun dari 100%, 95%, 80%, 70% dan masing-masing direndam selama 3 menit
- 3) Membilas preparat jaringan dengan air mengalir hingga bersih
- 4) Memasukan preparat jaringan ke dalam larutan hemaktosilin selama 7-15 menit
- 5) Mencuci Kembali preparat jaringan menggunakan air mengalir hingga bersih selama 3 menit
- 6) Memasukan preparat jaringan ke dalam larutan eosin selama 1-3 menit
- 7) Preparat jaringan dibilas dengan air sebanyak 3 kali pencelupan untuk menghilangkan eosin yang berlebih

- 8) Membilas preparat jaringan dengan rangkaian alkohol bertingkat (70%, 80%, 95% dan 100%) masing-masing 3 kali pencelupan untuk menghilangkan air
 - 9) Melakukan perendaman preparat jaringan ke dalam xylol I, II dan III selama 3-5 menit untuk membersihkan preparat dari sisa alcohol
- j. Penutupan (*mounting*)
- 1) Meneteskan secukupnya (1 tetes) cairan *Canada balsam* pada preparat jaringan yang sudah diwarnai, kemudian tutup menggunakan *deck glass*.
- k. Pengamatan
- 1) Menempatkan preparat jaringan pada meja pengamatan dibawah mikroskop
 - 2) Melakukan pengamatan dengan perbesaran 40x lensa objektif pada 5 lapang pandang tiap preparat
 - 3) Melakukan analisa penilaian skor kualitas histomorfologi jaringan berdasarkan inti sel, sitoplasma, dan keseragaman warna.
 - 4) Pada setiap preparat jika sudah dilakukan penilaian, maka akan dilakukan rata-rata nilai per preparat dan rata-rata per kelompok yang sudah ditentukan.

I. Manajemen Data

Data yang terkumpul berdasarkan penelitian ini akan dianalisis menggunakan analisis deskriptif.

1. Penyajian Data

Setelah semua data terkumpul, akan dilakukan analisis guna menjawab pertanyaan yang diajukan dalam penelitian ini. Semua data primer yang telah terkumpul kemudian disajikan dalam bentuk tabel. Data makroskopis meliputi ukuran sebelum fiksasi, penyusutan (mm), dan perubahan warna. Data tersebut ditampilkan dalam tabel ringkasan dan dilengkapi foto makroskopis sebelum dan sesudah fiksasi untuk memperkuat deskripsi. Kriteria penilaian serta skoring kualitas histomorfologi jaringan sebagai berikut :

Tabel 1. Kriteria Penilaian Kualitas Histomorfologi Preparat Jaringan Hati dan Pankreas Tikus Wistar difiksasi dengan NBF 10% dan *Ethmeth*

No	Struktur	Deskripsi	Skoring	Skala Ordinal
1	Inti sel (nukleus)	Warna biru pada inti sel sangat jelas	3	Baik
		Warna biru pada inti sel kurang jelas	2	Kurang baik
		Warna biru pada inti sel tidak jelas	1	Tidak baik
2	Sitoplasma	Warna merah pada sitoplasma sangat jelas	3	Baik
		Warna merah pada sitoplasma kurang jelas	2	Kurang baik
		Warna merah sitoplasma tidak jelas	1	Tidak baik
3	Pewarnaan	Keseragaman warna dapat terdiagnosis dengan jelas	3	Baik
		Keseragaman warna kurang jelas tetapi dapat terdiagnosis	2	Kurang baik
		Keseragaman warna tidak jelas dan tidak terdiagnosis	1	Tidak baik

Sumber: Julianti, 2017.

Kategori penilaian menggunakan rata-rata untuk setiap kelompok fiksatif, sebagai berikut:

1,00 – 1,66 = Tidak baik

1,67-2,32 = Kurang baik

2,33-3,00 = Baik

2. Analisis Deskriptif

Hasil pada pengamatan makroskopis dan mikroskopis yang telah didokumentasikan dan dianalisa oleh dokter penyelia patologi, dijelaskan secara deskriptif secara makroskopis meliputi perubahan warna, konsistensi, penyusutan ukuran jaringan, homogenitas permukaan, dan keutuhan bentuk setelah fiksasi, serta secara mikroskopis mengenai kualitas histomorfologi pada jaringan hati dan pankreas tikus Wistar yang dilakukan fiksasi menggunakan larutan *EthMeth* dan NBF 10%. Hasil pengamatan dianalisa menggunakan kriteria yang telah ditetapkan mencakup kejelasan warna inti sel, sitoplasma, dan keseragaman warna.

J. Etika Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan mengutamakan prinsip etika penelitian guna melindungi hak dan kesejahteraan subjek penelitian. Nomor kode etik pada penelitian ini yaitu DP.04.03/e-KEPK.1/023/2026 Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Perlakuan terhadap hewan coba yaitu tikus Wistar, mengikuti protokol kesejahteraan hewan. Proses mematikan hewan coba dilakukan dengan metode *euthanasia* yang bertujuan untuk memastikan kematian terjadi secara cepat, manusiawi, dan tanpa rasa sakit. Seluruh prosedur dirancang untuk menjunjung tinggi prinsip 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*) bertujuan untuk mengoptimalkan pemanfaatan hewan coba dengan menggantikan hewan bila memungkinkan, mengurangi jumlah hewan yang diperlukan, serta memperbaiki prosedur agar mengurangi penderitaan hewan dan menjaga kesejahteraan hewan coba, serta meningkatkan kualitas dan etika dalam pelaksanaan penelitian.