

BAB III

METODE PENELITIAN

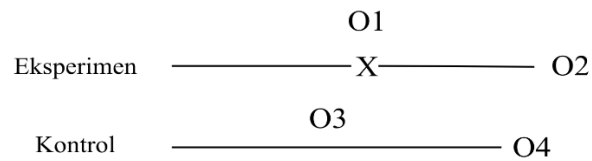
A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional. Penelitian deskriptif observasional merupakan jenis penelitian yang dilakukan dengan cara mengamati fenomena atau subjek penelitian tanpa memberikan perlakuan, manipulasi, atau intervensi terhadap variable yang diteliti, sehingga hubungan antar variable yang muncul merupakan hasil dari proses yang terjadi secara alami (Creswell dan Creswell, 2018). Pada penelitian ini, dilakukan pengamatan terhadap histomorfologi jaringan hepar tikus Wistar yang diberikan alternatif agen penjernih berupa minyak zaitun yang dipanaskan pada suhu 40°C.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain kuasi eksperimental dengan tipe *intact groups design*. Desain ini dipilih karena peneliti menggunakan kelompok yang sudah terbentuk sebelumnya tanpa dilakukan randomisasi. Kelompok eksperimen dan kelompok kontrol dipilih dari kelas yang sudah ada, sehingga peneliti hanya memberikan perlakuan pada satu kelompok dan membandingkannya dengan kelompok lain.



Gambar 1. Desain Penelitian Kuasi Eksperimental

Keterangan :

O1 : Minyak zaitun sebagai *clearing agent* alternatif

O2 : Kualitas histomorfologi jaringan hepar yang di clearing menggunakan minyak zaitun

O3 : Xylol sebagai *clearing agent* standar

O4 : Kualitas histomorfologi jaringan hepar yang di clearing menggunakan xylol

X : Perlakuan berupa pemanasan

B. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek

Subjek dalam penelitian ini adalah organ hepar tikus Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada dengan kriteria sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus Wistar jantan dengan rentang umur 8-10 minggu
- 2) Berat badan 150-200 gram
- 3) Usia tikus 10-14 minggu
- 4) Tidak menunjukkan gejala penyakit atau pernah diberikan perlakuan

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus terlihat sakit sebelum diberikan perlakuan
- 2) Tikus mati saat penelitian sebelum dilakukannya pembedahan
- 3) Abnormalitas morfologi atau cacat

2. Objek

Objek penelitian ini adalah kualitas histomorfologi jaringan yang dibagi menjadi dua kelompok sebagai berikut:

- a. Kelompok kontrol positif : dilakukan perlakuan sesuai standar kerja yaitu penjernihan menggunakan xylol.
- b. Kelompok perlakuan uji coba : dilakukan perlakuan proses penjernihan menggunakan bahan alternatif pengganti xylol yaitu *Extra Virgin Olive Oil* yang diberikan perlakuan yaitu pemanasan hingga suhu mencapai 40°C.

Tikus Wistar yang memenuhi kriteria inklusi selanjutnya akan diproses melalui tahapan histoteknik untuk di ambil salah satu jaringannya yaitu hepar tikus Wistar dan diwarnai menggunakan *Hemtoxylin & Eosin* (H&E). Dari organ hepar, akan dibuat 2 blok dan masing-masing blok dibuat 2 preparat yang akan dibaca 5 lapang pandang tiap preparatnya. Maka akan didapatkan 20 data dari sampel tersebut.

C. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari - Februari tahun 2026.

2. Tempat Penelitian

- a. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM untuk tahap pembedahan dan eksisi organ.
- b. Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada untuk tahap fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi, *embedding*, *sectioning*, *floating*, pewarnaan, perekatan dan *labelling*.

D. Variabel Penelitian atau Aspek-aspek yang diteliti

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah xylol sebagai agen penjernih standar dan minyak zaitun sebagai alternatif agen penjernih dengan pemanasan 40°C.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kualitas preparat histologi dengan parameter kejelasan warna inti sel, sitoplasma, dan keseragaman pewarnaan.

3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah lamanya proses *clearing*.

E. Batasan Istilah

1. Minyak Zaitun

Minyak zaitun yang dimaksud pada penelitian ini adalah minyak zaitun murni atau *Extra Virgin Olive Oil* sebagai agen penjernih alternatif dan dipanaskan pada suhu 40°C sebelum digunakan pada jaringan hepar tikus Wistar .

2. Agen Penjernih (*Clearing Agent*)

Agen penjernih adalah bahan yang digunakan setelah proses dehidrasi dan sebelum *embedding* yang tujuannya menggantikan alkohol dalam jaringan sehingga parafin dapat masuk secara optimal.

3. Xylol

Xylol merupakan pelarut aromatik yang digunakan sebagai standar dalam proses penjernihan sehingga menghasilkan preparat histologi yang optimal.

4. Hepar

Organ hepar yang digunakan merupakan hepar yang didapatkan dari tikus Wistar yang dijadikan sampel untuk dianalisis perubahan histomorfologinya setelah diberi perlakuan.

5. Tikus Wistar (*Rattus norvegicus* galur Wistar)

Tikus Wistar digunakan sebagai hewan coba karena karakteristik biologismya yang stabil, mudah dipelihara dan memiliki respons fisiologis yang dapat diprediksi.

6. Histomorfologi

Histomorfologi merupakan gambaran struktur mikroskopis jaringan yang meliputi hepatosit, sinusoid, dan vena sentral yang dianalisis untuk melihat perubahan struktur jaringan setelah diberi perlakuan.

7. Viskositas

Viskositas merupakan sifat fisik suatu fluida yang menggambarkan seberapa besar resistensi internal fluida terhadap aliran. Viskositas sangat dipengaruhi oleh suhu. Pada zat cair, viskositas umumnya menurun dengan meningkatnya suhu. Hal ini disebabkan oleh peningkatan energi kinetik molekul mengurangi gaya kohesi antar molekul.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan data primer yaitu data yang diperoleh dari hasil skoring kualitas histomorfologi jaringan hepar tikus Wistar.

2. Teknik Pengumpulan

Teknik pengumpulan data yang akan digunakan pada penelitian ini adalah penilaian kualitas preparat histologi pada jaringan hepar dengan parameter berdasarkan kejelasan warna inti sel, sitoplasma, dan keseragaman pewarnaan yang telah melalui proses penjernihan menggunakan xylol dan minyak zaitun murni yang dipanaskan dengan suhu 40°C. Penilaian dilakukan menggunakan cara skoring. Akan dibuat 2

blok jaringan dengan perlakuan yang berbeda, dan setiap blok akan diperoleh masing-masing 2 preparat. Setiap preparat jaringan diamati 5 lapang pandang dibawah mikroskop. Pada setiap lapang pandang dilakukan penilaian kualitas preparat histologi dengan kriteria yang telah ditentukan. Penilaian ini dilakukan oleh Dokter Penyelia Bidang Histologi selaku pihak berwenang dalam melakukan validasi hasil pemeriksaan kualitas histomorfologi jaringan hepar tikus.

G. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Alat
 - a. Pisau bedah
 - b. Pinset
 - c. Kaset
 - d. Papan bedah
 - e. Gunting bedah
 - f. *Thermo scientific automatic tissue processing*
 - g. Oven
 - h. *Sakura Tissuee-Tek TEC*
 - i. Blok kaset untuk mikrotom
 - j. Cetakan logam atau plastik
 - k. *Thermos scientific microtome*
 - l. *Waterbath*
 - m. Gelas objek
 - n. *Thermometer*

- o. *Chamber* pengecatan
- p. Timer
- q. Mikroskop
- r. Alat tulis
- s. Alat dokumentasi

2. Bahan

- a. Larutan NaCl fisiologis
- b. Zat anestik
- c. Kain kasa steril
- d. *Neutral Buffer Formalin* 10%
- e. Alkohol (70%, 95% dan 100%)
- f. Xylol
- g. Minyak zaitun murni
- h. Parafin 1 dan 2
- i. Cat hematoksilin
- j. Cat eosin
- k. Akuades
- l. *Canada balsam*
- m. Minyak imersi
- n. Lembar

kriteria

penilaian

H. Prosedur Penelitian

1. Tahap Perizinan

- a. Perizinan dilakukan untuk menggunakan Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada.

- b. Kaji Etik

Kaji etik diperlukan untuk melakukan penelitian menggunakan sampel hewan coba, peneliti mengajukan surat kelayakan etik penelitian kepada Komite Etik Penelitian Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta.

2. Tahapan Pelaksanaan

- a. Persiapan Organ

- 1) Tikus Wistar dibius menggunakan eter.
- 2) Melakukan pembedahan hewan coba.
- 3) Melakukan eksisi organ hepar Tikus Wistar.
- 4) Jaringan yang sudah dieksisi dibilas menggunakan NaCl fisiologis.

- b. Fiksasi

- 1) Jaringan hepar ditempatkan ke dalam larutan *Neutral Buffer Formalin* 10 % (NBF 10%).
- 2) Jaringan direndam selama 24 jam untuk memastikan penetrasi sempurna.

- c. Dehidrasi

- 1) Dehidrasi dilakukan menggunakan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolut).

d. Penjernihan (*clearing*)

- 1) Penjernihan menggunakan xylol sebagai standar dengan cara di rendam pada larutan xylol I selama 30 menit dan xylol 2 selama 30 menit.
- 2) Penjernihan menggunakan minyak zaitun dilakukan dengan cara memanaskan minyak zaitun hingga suhu mencapai 40°C lalu jaringan di rendam selama 30 menit.

e. Infiltrasi

- 1) Memasukkan organ hepar kedalam parafin cair pada suhu 56 - 59°C 3x masing-masing 1 jam.

f. Penyematan (*Embedding*)

- 1) Jaringan ditempatkan dalam cetakan.
- 2) Ditambahkan parafin cair.
- 3) Tunggu 30-45 menit pada suhu ruang hingga parafin memadat membentuk blok parafin.

g. Pemtongan (*Sectioning*)

- 1) Potong blok parafin menggunakan mikrotom.
- 2) Ambil pita irisan lalu rentangkan diatas waterbath dengan suhu 40-45°C.

h. Penempelan

- 1) Ambil irisan pada waterbath menggunakan kaca objek sehingga irisan langsung menempel pada kaca objek.
- 2) Keringkan pada suhu ruang.

i. Pewarnaan

- 1) Melakukan deparafinisasi menggunakan xylol selama 5 menit.
- 2) Melakukan rehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (alkohol absolut, 95%, 90%, 80%, dan 70%).
- 3) Preparat dicelupkan pada pewarna *Hematoxylin* selama 5-10 menit.
- 4) Melakukan *blueing* selama 1 menit.
- 5) Preparat dicelupkan pada pewarna eosin 1-2 menit.

j. Rehidrasi

- 1) Preparat dicelupkan pada alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolut) 1 menit setiap Langkah.

k. Penjernihan (*Clearing*)

- 1) Preparat direndam dalam larutan xylol I dan II masing-masing 3 menit.

l. *Mounting*

- 1) Meneteskan balsam pada preparate.
- 2) Tutup dengan *deck glass*.
- 3) Diamkan hingga kering.

m. Tahapan Pengamatan

- 1) Sediaan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x.
- 2) Melakukan penilaian skor pewarnaan *Hematoxylin & Eosin*.
- 3) Melakukan dokumentasi pada lapang pandang tiap preparat.

I. Manajemen Data

Data yang terkumpul dari penelitian ini dianalisis menggunakan analisis deskriptif.

1. Penyajian Data

Penyajian data dilakukan setelah semua data terkumpul. Dari pengolahan data akan diperoleh jawaban dari masalah yang diteliti. Semua data primer yang telah terkumpul akan disusun dalam bentuk tabel dan diberikan skoring sebagai penilaian kualitas preparat. Kriteria skor pewarnaan akan di sajikan dalam tabel berikut:

Tabel 1. Kriteria Skor Pewarnaan untuk Menilai Kualitas Preparat

No	Struktur	Deskripsi	Skoring	Skala Ordinal
1	inti sel	Warna biru pada inti sel tidak jelas	1	Tidak baik
		Warna biru pada inti sel kurang jelas	2	Baik
		Warna biru pada inti sel sangat jelas	3	Sangat baik
2	sitoplasma	Warna merah pada sitoplasma tidak jelas	1	Tidak baik
		Warna merah pada sitoplasma kurang jelas	2	Baik
		Warna merah pada sitoplasma sangat jelas	3	Sangat baik
3	Pewarnaan	Keseragaman warna tidak jelas dan tidak terdiagnosis	1	Tidak baik
		Kkeseragaman warna kurang jelas tapi dapat terdiagnosis	2	Baik
		Keseragaman warna dapat terdiagnosis dengan jelas	3	Sangat baik

Sumber: Julianti, 2017 dengan modifikasi penulis.

J. Etika Penelitian

Berdasarkan surat etik yang sudah dipenuhi penulis dengan nomor : No.DP.04.03/e-KEPK.1/058/2026, pada penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus Wistar sebagai subjek. Tikus Wistar akan di bius menggunakan zat anestik untuk mengurangi rasa sakit saat mematikan tikus. Peneliti bertanggung jawab secara moral dan etis untuk menjaga kesejahteraan hewan selama penelitian ini berlangsung. Semua prosedur yang dilakukan harus mematuhi prinsip untuk memanfaatkan penggunaan hewan, meminimalkan jumlah hewan yang digunakan dan mengurangi penderitaan hewan sehingga menjamin kesejahteraan hewan uji.

