

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu bersifat deskriptif dengan rancangan penelitian eksperimen dengan desain pendekatan *cross sectional*. Penelitian deskriptif bertujuan untuk menggambarkan hasil pengamatan jaringan hati ayam yang difiksasi dengan *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10%, Gula Pasir (*Saccharum officinarum*) 10%,15% ,20%, 100%.

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu data primer. Data primer diperoleh dengan cara eksperimen. Organ hati ayam yang kemudian dilakukan tahapan fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi paraffin, *embedding*, deparafinisasi, *staining* (pengecetan), dan *mounting*. Tahapan fiksasi jaringan hati ayam akan difiksasi menggunakan larutan sebagai berikut :

1. Larutan fiksasi NBF 10 % (Kontrol)
2. Larutan fiksasi gula pasir 10%
3. Larutan fiksasi gula pasir 15%
4. Larutan fiksasi gula pasir 20%
5. Larutan fiksasi gula pasir 100%

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### **1. Waktu**

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan februari-maret 2025.

##### **2. Tempat Penelitian**

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soeratno Gemolong, Dusun I Sragen, Jawa Tengah.

#### **C. Sampel**

Sampel pada penelitian ini menggunakan lima ekor ayam jenis broiler (*Gallus domesticus*) yang diambil hatinya. Ada lima hati ayam yang difiksasi dengan berbagai larutan yaitu satu hati ayam difiksasi menggunakan NBF 10% dan empat hati ayam yang masing-masing difiksasi dengan gula pasir 100%.

## D. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan antara lain alat pelindung diri (APD), *handscoons*, timbangan, tabung reaksi, pipet, botol penyimpanan, *tissue processor*, *tissue cassette*, *base mold*, *microtome*, *waterbath*, mikroskop, *embedding*, *cold plate*, rak pengecatan, *staining jar*, pisau, pinset, kulkas, telenan, pinset, *hot plate*, timer, baki, objek glass, deck glass, gelas becker

### 2. Bahan

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu NBF 10%, gula pasir tebu 10%, 15%, 20%, 100%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95% dan alkohol 100% (absolute), aquades, xilol, parafin cair, pewarna H&E, entelan, minyak imersi, organ hati ayam.

## E. Prosedur Penelitian

### 1. Bahan Fiksasi

Komposisi *Formalin buffer* 10% :

- Formaldehyde 40% HCHO : 100 ml
- Sodium phosphate monobasic NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O : 4 gr
- Sodium phosphate basic NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 6,5 gr
- Aquadest : 900 ml

### 2. Pengenceran gula pasir

Rumus pengenceran :

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan :

V1 = Volume larutan awal (sebelum pengenceran)

N1 = Konsentrasi larutan awal (sebelum pengenceran)

V2 = Volume larutan setelah pengenceran

N2 = konsentrasi larutan setelah pengenceran

#### a. Gula 10%

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan :

$$V_1 \times 100 \% = 100 \text{ ml} \times 10 \%$$

$$V_1 = 10 \text{ ml}$$

Jadi pembuatan larutan 10 % gula pasir dari 100 ml gula pasir konsentrasi 10 % perlu menimbang 10 gr gula

pasir dengan 90 ml aquades, sehingga total volume larutan menjadi 100 ml.

**b. Gula 15%**

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan :

$$V_1 \times 100 \% = 100 \text{ ml} \times 15 \%$$

$$V_1 = 15 \text{ ml}$$

Jadi pembuatan larutan 15 % gula pasir dari 100 ml gula pasir konsentrasi 100% perlu mencampurkan 15 gr gula pasir dengan 85 ml aquades, sehingga total volume larutan menjadi 100 ml.

**c. Gula 20%**

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan :

$$V_1 \times 100 \% = 100 \text{ ml} \times 20 \%$$

$$V_1 = 20 \text{ ml}$$

Jadi pembuatan larutan 20 % gula pasir dari 100 ml gula pasir konsentrasi 100% perlu mencampurkan 20 gr gula pasir dengan 80 ml aquades, sehingga total volume larutan menjadi 100 ml

**d. Gula Pasir 100%**

Gula pasir tanpa dilarutkan dengan aquadest diletakkan dalam wadah untuk dilakukan fiksasi.

**3. Pengambilan organ hewan**

- a. Ayam broiler (*Gallus domesticus*) dengan pemeliharaan secara umum tanpa perlakuan khusus dipilih secara random dari peternakan, kemudian disembelih tanpa pembusukan lalu diambil organ hati.
- b. Organ hati ayam normal langsung dimasukkan dalam larutan fiksasi yaitu :
  - 1) Larutan NBF 10%
  - 2) Larutan Gula Pasir 10%
  - 3) Larutan Gula Pasir 15%
  - 4) Larutan Gula Pasir 20%
  - 5) Larutan Gula Pasir 100%

**4. Proses Jaringan**

Untuk memproses jaringan memakai alat *automatic tissue processor* yang bekerja  $\pm 18,5$  jam. Dalam processing

jaringan (Fiksasi, dehidrasi, *clearing*, dan infiltrasi parafin) lebih baik bergoyang kiri kanan/ turun naik untuk mempercepat processing.

- a. Fiksasi, dilakukan fiksasi menggunakan larutan NBF 10% dan larutan gula pasir konsentrasi 10%, 15%, 20%, 100%.
- b. Dehidrasi, potongan jaringan dimasukan ke alkohol bertingkat dari terendah ke tinggi mulai dari kadar 70%, 80%, 95%, absolut I,II,III.
- c. *Clearing*, jaringan dimasukkan kedalam xilol I, II, III.
- d. Infiltrasi Parafin, potongan jaringan dimasukkan dalam paraffin I, II

## 5. Pengeblokan (*Embedding*)

Jaringan yang sudah diproses segera dikeluarkan dan dimasukkan dalam *mold embedding* yang sesuai ukuran jaringan sebelumnya yang telah diisi paraffin cair, kemudian diberi identitas dan dicetak lagi dengan paraffin cair hingga penuh. Setelah itu, letakkan pada alat *cold embedding* setelah mengeras kurang lebih 15 menit lalu cetakan bisa dilepas.

## 6. Pemotongan dengan mikrotom

Pada proses ini jaringan yang sudah diblok paraffin dan dilepaskan dari *mold embedding*, dilakukan pendinginan dengan *cold plate*  $\pm 15$  menit sampai blok tersebut dingin. Kemudian blok jaringan tersebut, dijepit pada alat mikrotom setelah itu lakukan pemotongan dengan pisau mikrotom dengan kemiringan  $\pm 30^\circ\text{C}$  setebal 2-5  $\mu\text{m}$ . Hasil pemotongan yang disebut pita dimasukkan kedalam *waterbath* yang mana sebelumnya sudah dihangatkan  $\pm 50^\circ\text{C}$  kemudian diambil dengan objek glass dan diberi nomor dengan pensil sesuai nomer registrasi, setalah itu lakukan inkubasi.

## 7. Inkubasi

Proses Inkubasi disini berfungsi untuk menghilangkan kadar air yang terbawa oleh hasil potongan atau pita sehingga jaringan dapat menempel dengan baik pada objek glass. Preparat dipanaskan diatas *hot plate* dengan suhu  $\pm 50^\circ\text{C}$  (dibawah titik cair paraffin) selama  $\pm 15$  menit.

## 8. Pewarnaan HE

- a. Deparafinasi, masing- masing preparate dimasukkan ke xylol I, II, III masing-masing selama 3 menit

- b. Rehidrasi, preparat masuk ke alkohol 100%, 95%, 80%, 70% masing- masing 2 menit
- c. Preparat masuk ke air mengalir selama 5 menit
- d. Pengecatan inti selama 15 menit, preparat masuk ke larutan mayer hematoksilin
- e. Preparate dicuci dengan air mengalir selama 7 menit
- f. *Counter stain* selama 2 menit, lalu preparate masuk ke dalam larutan eosin
- g. Preparat masuk ke air wadah I,II,III masing-masing 3 celup
- h. Dehidrasi, preparat dimasukkan kedalam alkohol 70%, 80%, 95%, 100% masing-masing 3 celup
- i. *Clearing*, preparat dimasukkan dalam xylol I, dan II masing-masing selama 2 menit
- j. *Mounting*, preparat diberi 1 tetes entelan dan ditutup dengan deck glass.

## 9. Pengamatan mikroskopis

Preparat yang telah diwarnai dan telah dilakukan mounting dilakukan pengamatan dibawah mikroskopis.

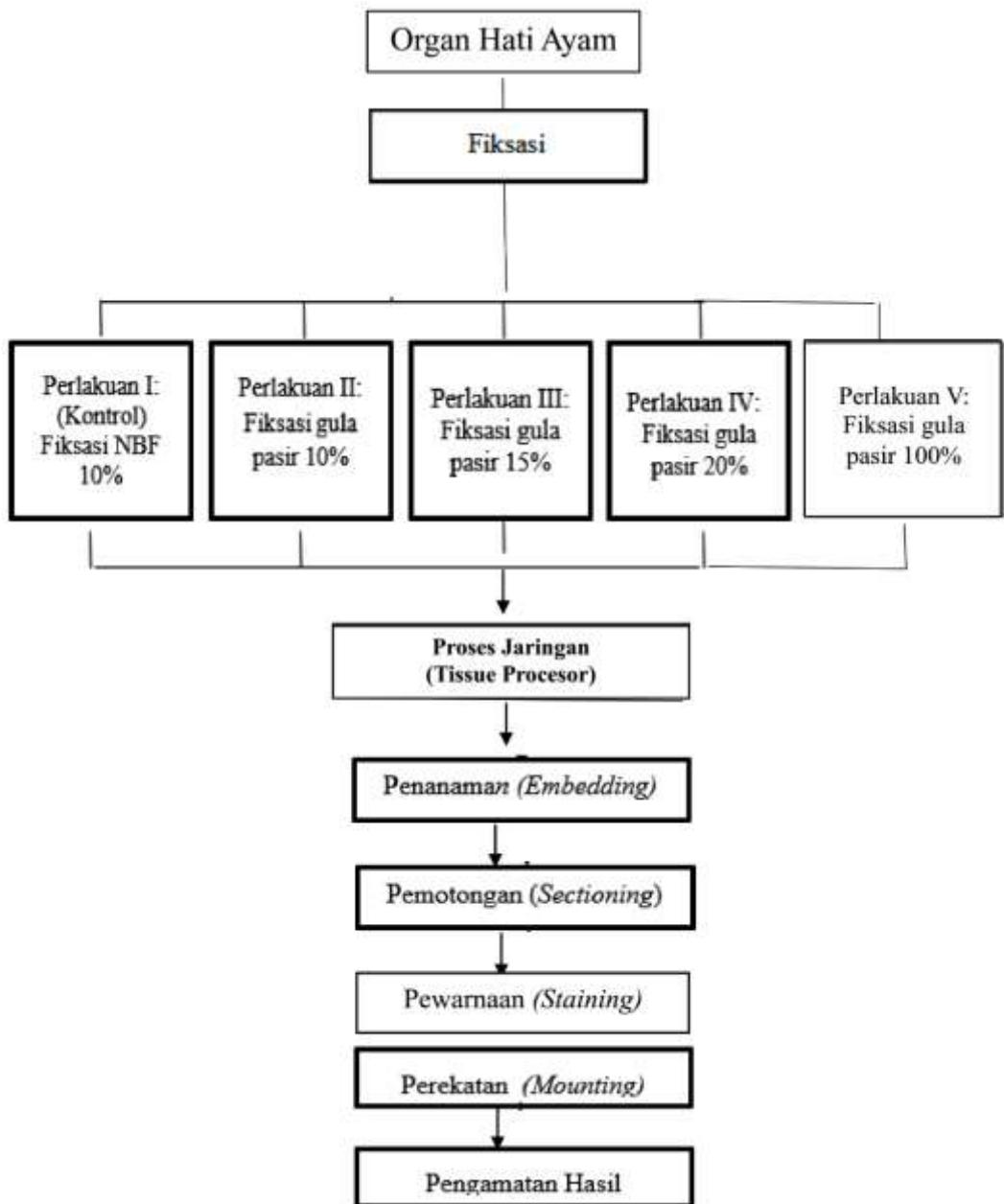
## F. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan yaitu dengan cara observasi hasil gambaran jaringan hati ayam yang difiksasi dengan NBF10% dan gula pasir konsentrasi 10%, 15%, 20%, 100%.

## G. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisa dengan teknik analisis deskriptif penyajian data dalam bentuk gambar dan deskripsi sebagai metode penyajian data.

## H. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian