

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), *handscoon*, 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$: 4 gr
- Sodium phosphate basic NaH_2PO_4 : 6,5 gr
- Aquadest : 900 ml

2. Pengenceran gula pasir

Rumus pengenceran :

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan :

V_1 = Volume larutan awal (sebelum pengenceran)

N_1 = Konsentrasi larutan awal (sebelum pengenceran)

V_2 = Volume larutan setelah pengenceran

N_2 = 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 dimasukkan 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 di blok paraffin dan dilepaskan dari *mold embedding*, dilakukan pendinginan dengan *cold plate* ± 15 menit sampai blok tersebut dingin. Kemudian blok jaringan tersebut, dijepit pada alat mikrotom setelah itu lakukan pemotongan dengan pisau mikrotom dengan kemiringan $\pm 30^\circ$ setebal 2-5 μm . 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 nomor registrasi, setelah 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 ± 15 menit.

8. Pewarnaan HE

- a. Deparafinisasi, 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. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 7 menit
- f. *Counter stain* selama 2 menit, lalu preparat 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.

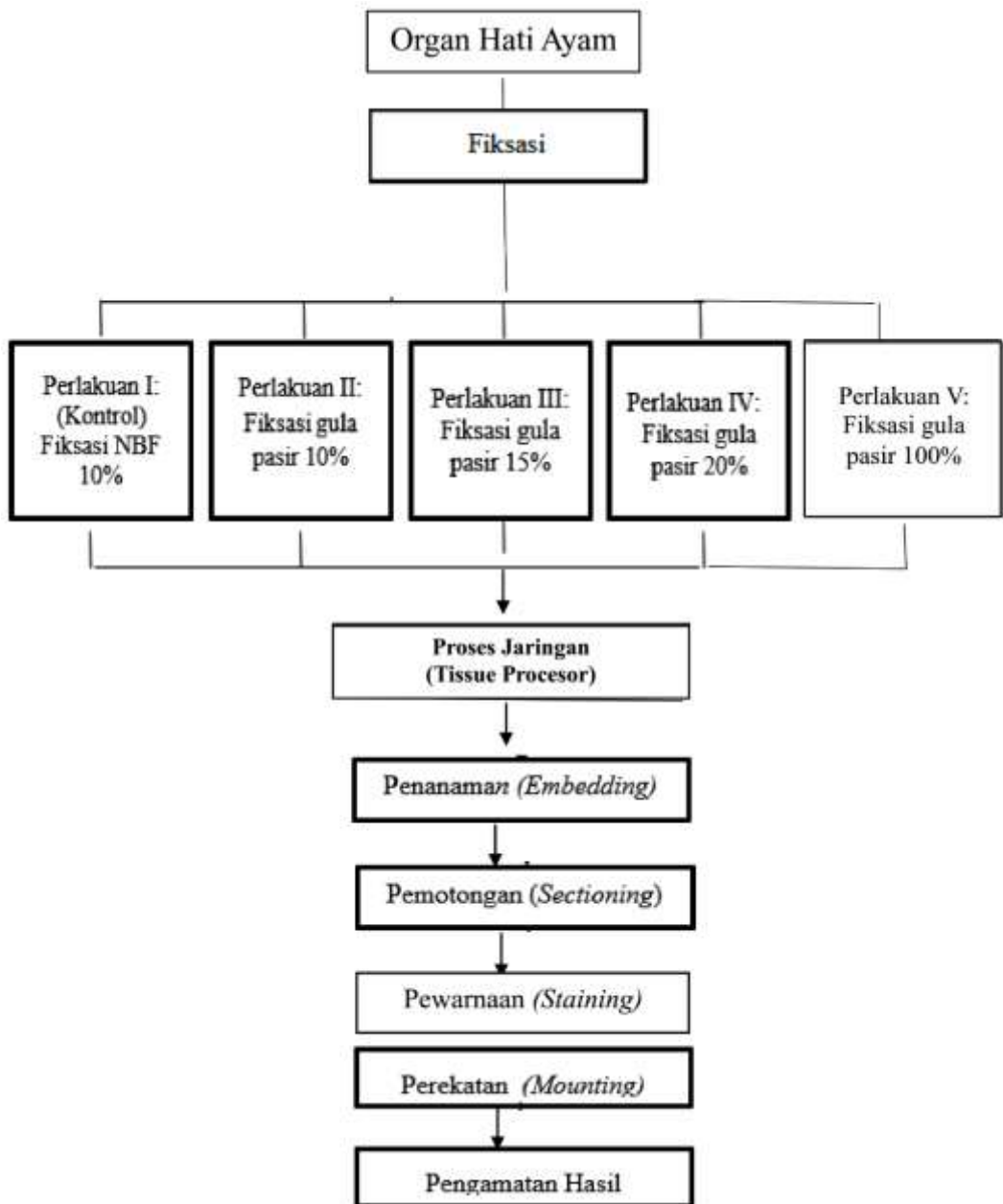
F. Teknik Pengumpulan Data

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