

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Metode penelitian yang diterapkan adalah penelitian deskriptif dengan desain eksperimen. Penelitian deskriptif ini bertujuan untuk memberikan gambaran mengenai hasil preparat jaringan hati ayam yang difiksasi menggunakan berbagai jenis larutan dengan pewarnaan *Hematoksilin-Eosin*.

Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer, yang diperoleh melalui kegiatan eksperimen langsung. Organ hati ayam diambil kemudian dilakukan tahapan *fiksasi, dehidrasi, clearing, infiltrasi paraffin, embedding, deparafinasi, staining* (pengecatan), dan *mounting*. Pada tahap fiksasi jaringan hati ayam akan difiksasi menggunakan larutan sebagai berikut:

1. larutan I : menggunakan NBF 10%
2. larutan II : menggunakan madu 5%
3. larutan III : menggunakan madu 15%
4. larutan IV : menggunakan madu 100% (tanpa pengenceran)

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

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

Penelitian dilakukan pada bulan Maret - April 2025

## 2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soeratno Gemolong, yang berlokasi di Dusun 1, Gemolong, Sragen, Jawa Tengah.

## C. Sampel

Sampel pada penelitian ini menggunakan tiga ekor ayam jenis broiler (*Gallus domesticus*) yang diambil hatinya. Ada 4 hati ayam akan difiksasi dengan berbagai larutan yaitu pertama satu hati ayam di fiksasi menggunakan NBF 10% sebagai kontrol, satu hati ayam difiksasi dengan madu 5%, satu hati ayam difiksasi dengan madu 15%, dan satu hati ayam difiksasi dengan madu 100% (madu asli) masing-masing difiksasi selama 24 jam.

## D. Alat dan Bahan

### 1. Alat Pemeriksaan

Peralatan yang dimanfaatkan dalam penelitian ini meliputi alat pelindung diri (APD), *Tissue processor*, *tissue casset*, *base mold*, *microtome*, *waterbath*, mikroskop, *embedding*, *cold plate*, rak pengecatan, staining jar, pisau, lidi, kulkas, oven, talenan, pinset, *hot plate*, *timer*, baki, *objek glass*, *deck glass*, kulkas, gelas beker, pot atau wadah sampel

### 2. Bahan Pemeriksaan

Bahan yang digunakan pada pemeriksaan ini meliputi NBF 10%, madu dengan konsentrasi 5%, 15%, dan 100%, alkohol 70%, 80%, 95%, serta

100% (absolut), xilol, parafin cair, pewarna hematoksilin-eosin, entelan, toluena, serta organ hati ayam.

## **E. Prosedur Penelitian**

### **1. Komposisi larutan fiksasi**

#### **a. NBF 10%**

- Formaldehyde 40%  $\text{CH}_2\text{O}$  : 100 ml
- Sodium phosphate monobasic  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  : 4 gr
- Sodium phosphate basic  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  : 6,5 gr
- Aquadest : 900 ml

#### **b. Pengenceran Madu**

##### **Rumus pengenceran :**

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan:

$V_1$  = volume larutan sebelum dilakukan pengenceran

$N_1$  = konsentrasi larutan sebelum dilakukan pengenceran

$V_2$  = volume larutan setelah proses pengenceran

$N_2$  = konsentrasi larutan setelah proses pengenceran

#### **1) Madu 5%**

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan:

$$V_1 \times 100\% = 100 \text{ ml} \times 5\%$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

Jadi, untuk membuat larutan 5% madu dari 100 mL madu asli konsentrasi 100%, perlu mencampurkan 5 mL madu asli dengan 95 mL air suling atau aquadest, sehingga total volume larutan menjadi 100 mL dengan konsentrasi 5% madu.

### 2) Madu 15%

$$V_1N_1=V_2N_2$$

Keterangan:

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

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

Jadi, untuk membuat larutan 15% madu dari 100 mL madu asli konsentrasi 100%, perlu mencampurkan 15 mL madu asli dengan 85 mL air suling atau aquadest, sehingga total volume larutan menjadi 100 mL dengan konsentrasi 15% madu.

### 3) Madu 100% (madu asli)

$$V_1N_1=V_2N_2$$

Keterangan:

$$V_I \times 100\% = 100 \text{ ml} \times 100\%$$

$$V_I = 100 \text{ ml}$$

Jadi, untuk mendapatkan larutan madu 100% tidak ditambah dengan air suling atau aquadets dan tidak melakukan proses pengenceran.

## 2. Pengambilan organ hewan

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

## 3. Proses jaringan

- a. Fiksasi, dilakukan fiksasi menggunakan larutan NBF 10%, madu 5%, madu 15%, dan madu 100%.
- b. *Dehidrasi*, potongan jaringan dimasukkan ke alkohol bertingkat mulai dari kadar 70%, 80% dan 100%.
- c. *Clearing*, jaringan masuk kedalam larutan xilol.
- d. *Infiltrasi Paraffin*, Potongan jaringan dimasukan kedalam larutan parafin.

## 4. Pengeblokan (*Embedding*)

Jaringan yang telah diprosesing dikeluarkan dan segera dimasukan ke dalam *mold embedding* yang sesuai dengan ukuran jaringan sebelumnya setelah diisi dengan parafin cair sedikit, kemudian diberi identitas dan dicetak lagi dengan parafin cair hingga penuh. Setelah itu, diletakan pada *cold embedding* setelah mengeras  $\pm 20$  menit dan cetakan dilepaskan.

## 5. Pemotongan menggunakan mikrotom

Blok parafin yang berisi jaringan, setelah dilepaskan dari cetakan *embedding*, didinginkan kembali pada *cold plate* hingga benar-benar mengeras. Selanjutnya, blok jaringan yang telah dingin dijepit pada mikrotom dan dipotong menggunakan pisau mikrotom dengan sudut kemiringan sekitar  $\pm 30^\circ$  dan ketebalan irisan 4 mikron. Potongan pita jaringan kemudian dimasukkan ke dalam *waterbath* yang telah dipanaskan hingga  $\pm 40^\circ\text{C}$ , lalu diangkat menggunakan kaca objek dan diberi tanda nomor dengan pensil sesuai nomor registrasi.

## 6. Prosedur pewarnaan Hematoksilin Eosin

### a. *Deparafinisasi*

Preparat direndam terlebih dahulu dalam xilol I dan xilol II masing-masing selama 5 menit, kemudian bagian tepi jaringan dibersihkan menggunakan kain kasa.

### b. Selanjutnya, preparat dimasukkan secara berurutan ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (alkohol 100% (absolut), 80%, dan 70%), masing-masing selama 3 menit.

### c. Pewarnaan Inti

Slide preparat dimasukkan kedalam hematoksilin selama 3-7 menit.

### d. Kemudian dibilas menggunakan air mengalir

### e. Pewarnaan Eosin

Preparat dimasukan ke larutan eosin selama 30 detik

f. *Dehidrasi*

Slide preparat dimasukan ke dalam alkohol 70%, 80%, 100% (absolut) masing-masing 10 celupan.

g. *Clearing*

Merendam preparat jaringan dalam larutan xilol I selama 1 menit

h. *Mounting*

Proses *mounting* dilakukan dengan meneteskan entelan pada preparat, kemudian ditutup menggunakan kaca penutup (*deck glass*).

## 7. Pengamatan Mikroskopis

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

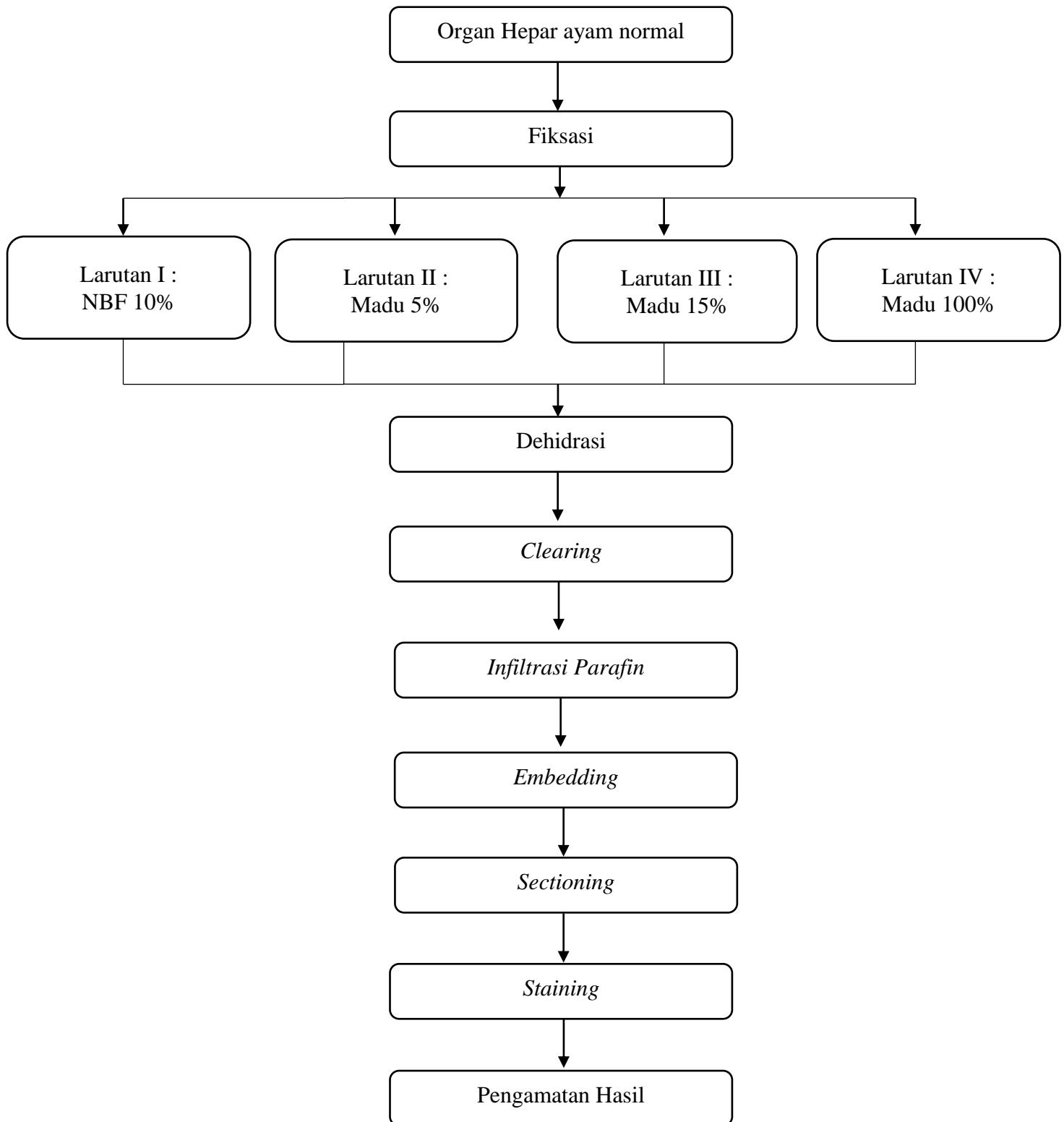
## F. Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data yang diterapkan dilakukan melalui pengamatan terhadap hasil fiksasi dengan larutan NBF 10%, madu 5%, madu 15%, madu 100% pada pewarnaan Hematoktoksilin-Eosin. Pada penelitian ini fiksasi memerlukan waktu 24 jam dan pengamatan mikroskopis hasil pembuatan preparat.

## G. Teknik Analisa Data

Data yang terkumpul dianalisis menggunakan metode analisis deskriptif. Hasil data disajikan dalam bentuk visual (gambar) dan uraian deskriptif sebagai cara penyampaian informasi.

## H. Alur Penelitian



**Gambar 2. Alur Penelitian**