

III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional pada ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*) yaitu dengan pemeriksaan histopatologi ikan, didasarkan atas perubahan sel pada organ hepar dan otot. Lokasi penelitian akan dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, bulan April 2023. Pembuatan preparat dilaksanakan di Padia Lab PNF Animal Diagnostic Laboratory. Pembacaan preparat dilakukan di laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

3.2 Sampel dan Besar Sampel

Hewan yang digunakan adalah ikan mujair dengan berat 200 - 300 gram dengan panjang 15 - 20 cm yang dipancing oleh masyarakat yang memfungsikan Sungai Mas untuk memancing dan sumber protein hewani. Banyaknya ikan yang diambil adalah 30 ekor ikan.

3.3 Materi Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: coolbox, scalpel, pinset anatomis, gunting tumpul tajam, lap kering, tissu basah dan tissu kering, sarung tangan, latex, pot, label, spidol, kain kassa, dan kain kassa non steril.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: ikan mujair, buffer netral formalin 10%, alcohol 70%, 80%, 90%, xylol, paraffin, gliserin, chloroform, CMC na 1%, lithium karbonat, hematoksillin eosin (HE).

3.4 Sampel Penelitian

Hewan penelitian adalah ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*) yang diambil dari sungai Jagir sebanyak 30 ekor ikan dewasa dengan panjang 15-20 cm dan berat 200-300 gram dan disimpan dalam coolbox. Setelah itu ikan dikeluarkan dari coolbox satu persatu bertujuan untuk diidentifikasi, ditimbang berat dan dilakukan nekropsi sebanyak 30 ikan untuk diambil organ hepar dan otot. Organ Hepar dan otot kemudian dimasukkan ke dalam larutan Buffer Netral Formalin (BNF) 10%. Selanjutnya dibuat preparat histopatologis dengan pewarnaan Haematoxillin dan Eosin (HE).

3.4.1 Besaran Sampel

Menggunakan 30 sampel ikan mujair dengan berat 200-300 gram dan panjang ikan 15-20 cm

3.5 Metode Penelitian

3.5.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian observasi eksperimental.

3.5.2 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Kualitas Air
2. Variabel terikat : Gambaran histopatologi organ hepar dan otot ikan mujair (*O. mossambicus*)
3. Variabel kendali : Nekrosis dan Degenerasi

3.5.3 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*). Di ambil dari Sungai Mas Surabaya. Pengambil sampel dilakukan dengan cara membeli ikan yang telah dipancing secara acak oleh penjual ikan yang ada di sungai mas, Surabaya, ikan tersebut dibawah dengan menggunakan coolbox dan Es batu.

3.6 Pembuatan Sediaan Histopatologi

Spesimen organ (hepar dan otot) yang telah ada, dipotong dengan ukuran 1x1cm dengan ketebalan 2-3 mm dan diletakkan dalam tissue cassette. Organ yang telah dipotong direndam ke dalam larutan fiksasi Buffer Netral Formalin (BNF) 10%, minimal selama 24 jam. Hal ini bertujuan untuk menghentikan proses enzimatis pada jaringan dan menjaga bagian-bagian sel terfiksasi pada tempatnya. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi, yaitu proses untuk menarik air dari jaringan dengan merendam organ hasil fiksasi ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat, yaitu alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95% dan alkohol absolut 100%. Perendaman organ hasil fiksasi pada masing-masing konsentrasi alkohol dilakukan selama 2 jam. Ada dua tahap dalam melakukan perendaman agar

organ terfiksasi pada alkohol 95% dan alkohol absolut 100%, yaitu menggunakan gelas beker 1 dan gelas beker 2. Hal ini bertujuan agar air yang terkandung dalam pori-pori jaringan dapat tertarik dengan sempurna. Pori-pori yang telah terdehidrasi akan menjadi kosong dan nantinya akan diisi oleh parafin dalam proses infiltrasi (Lestari dkk., 2018).

Tahap selanjutnya adalah clearing, yaitu proses yang dilakukan dengan cara merendam organ hasil dehidrasi pada larutan xylol. Xylol mudah bercampur dengan alkohol yang berasal dari proses dehidrasi tersebut. Proses clearing juga dapat melarutkan parafin pada proses infiltrasi sehingga diperoleh jaringan yang jernih dan bersih tanpa kotoran ataupun artefak yang dapat mengganggu proses pembacaan. Setelah dilakukan proses clearing, maka dilakukan infiltrasi, yaitu proses pengisian parafin ke dalam pori-pori jaringan organ. Hal ini bertujuan untuk mengeraskan jaringan agar mudah dipotong setipis mungkin dengan menggunakan pisau mikrotom. Parafin yang digunakan adalah berplastik yang memiliki titik lebur 58°C. Proses infiltrasi dilakukan dengan dua tahap, yaitu tahap parafin 1 dan parafin 2, masing-masing tahapan dilakukan 24 selama dua jam agar pori-pori jaringan organ terisi parafin dengan sempurna (Lestari dkk., 2018).

Embedding (*blocking*) merupakan proses penanaman spesimen organ ke dalam parafin yang dicetak menjadi blok-blok parafin dalam wadah khusus berupa tissue cassette/block besi. Parafin yang digunakan sama dengan parafin yang digunakan dalam proses infiltrasi. Embedding (*blocking*) bertujuan untuk memudahkan proses pemotongan jaringan karena blok parafin yang terbentuk dapat dilekatkan pada holder mikrotom tepat di depan pisaunya. Setelah parafin menjadi blok-blok, maka

selanjutnya dilakukan pemotongan spesimen berparafin menggunakan Rotary Mikrotom Spencer, USA. Spesimen dipotong dengan ketebalan 4-5 micrometer (μm) yang nantinya akan berupa “pita-pita” jaringan yang saling bersambungan. Potongan-potongan tersebut diletakkan di atas penangas air dengan suhu 37°C . Hal ini bertujuan agar potongan “pita-pita” tersebut tidak mengkerut dan tidak berlekatan satu sama lain. Sediaan potongan-potongan jaringan, dipilih yang terbaik dan diletakkan pada gelas objek yang telah ditetesi perekat putih telur. Kemudian disimpan di dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 56°C untuk mencairkan parafin yang melekat pada jaringan dan melekatkan jaringan pada gelas objek secara sempurna (Lestari dkk., 2018).

Preparat yang telah difiksasi pada gelas objek diwarnai dengan Haematoxillin dan Eosin. Awalnya preparat dimasukkan kedalam xylol 1 dan xylol 2 selama dua menit untuk melarutkan parafin yang masih melekat pada gelas objek. Untuk hidrasi diperlukan larutan alkohol absolut 100% selama dua menit, alkohol 95%, dan alkohol 80% masing-masing selama satu menit. Kemudian cuci dalam air kran selama satu menit, dimasukkan ke dalam pewarna Mayer's Haematoxyllin selama 10 menit, cuci lagi dalam air kran selama 30 detik, dan dimasukkan ke dalam Lithium carbonat selama 15-30 detik, dan cuci dalam air kran selama dua menit. Setelah itu preparat dimasukkan ke dalam larutan pewarna Eosin selama 2-3 menit, kemudian cuci dalam air kran selama 30-60 detik untuk menghilangkan Eosin yang masih tertinggal. Setelah pewarnaan, preparat dimasukkan ke dalam larutan alkohol 95% dan alkohol absolut 1 sebanyak 10 celupan serta alkohol absolut 2 selama dua menit. Setelah tahap pewarnaan selesai, maka dilakukan

perekatan (*mounting*) menggunakan zat perekat permount dengan entelan, kemudian ditutup dengan gelas penutup (*cover glass*). Selanjutnya sediaan preparat siap diamati (Lestari dkk., 2018).

3.7 Pembacaan Slide Histopatologi

Preparat diperiksa dengan cara pengamatan dibawah mikroskop Olympus BX5 untuk memeriksa perubahan histopatologi. Pengamatan yang dilakukan adalah mengamati perubahan-perubahan yang terjadi pada histopatologi organ hepar dan otot ikan mujair. Perubahan yang diamati adalah nekrosis dan degenerasi (Pembesaran 100x dan 400x) menggunakan 5 lapang pandang.

Menurut Solfaine (2019), Sistem skoring pada histopatologi organ hepar dan otot terbagi menjadi beberapa model, dan berikut adalah sistem skoring derajat kerusakan histopatologi organ hepar dan otot ikan mujair dengan parameter Nekrosis dan Degenerasi:

Tabel 3.1 Skor Penilaian derajat nekrosis histopatologi organ hepar dan otot

Lesi Histopatologis	Skor	Nilai (%)
Nekrosis	0	0 dari seluruh LP
Nekrosis	2	< 25 % dari seluruh LP
Nekrosis	4	26-50 % dari seluruh LP
Nekrosis	6	51-75 % dari seluruh LP
Nekrosis	8	>76 % dari seluruh LP

Sumber: Solfaine (2019).

Tabel 3.2 Skor Penilaian derajat degenerasi histopatologi organ hepar dan otot

Degenerasi	0	0 dari seluruh LP
Degenerasi	1	<25 % dari seluruh LP
Degenerasi	2	26-50 % dari seluruh LP
Degenerasi	3	51-75 % dari seluruh LP
Degenerasi	4	>76 dari seluruh LP

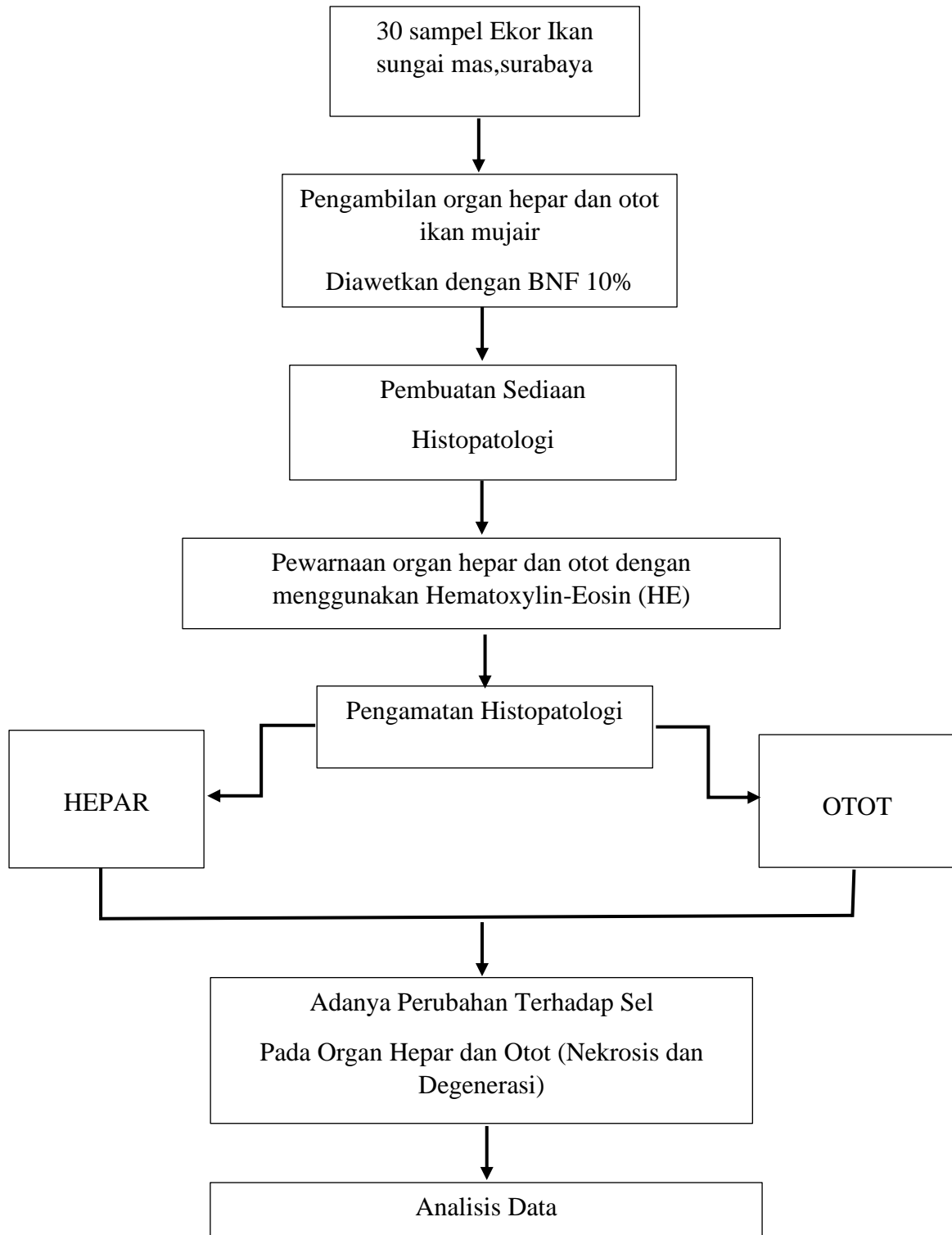
3.7.1 Nekrosis

Ikan yang terkena nekrosis di temukan adanya perubahan pada sel jaringan yang di akibatkan oleh kematian pada sel itu sendiri (Meha dkk., 2016). Nekrosis merupakan perubahan sel yang mengarah kepada kematian sel, yang di akibatkan oleh zat toksik yang masuk bersama dengan aliran darah menuju organ. Ciri dari nekrosis atau kematian sel dijumpai adanya perubahan pada organel, pembengkakan sel dengan hilangnya membrane plasma, dan perubahan inti disertai dengan hipokromik. Nekrosis salah satunya disebabkan oleh adanya zat kimia yang bersifat toksin (Sudira dkk., 2019)

3.7.2 Degenerasi

Degenerasi disebabkan oleh kekurangan bahan esensial yaitu , oksigen atau asam panthotenat, kekurangan sumber energi yang mengganggu metabolisme, pemanasan mekanik, luka akibat listrik, akumulasi substansi yang abnormal di dalam sel-sel yang disebabkan oleh virus, bakteri, atau parasit atau oleh bahan-kimia yang beracun, ketidakseimbangan nutrisi, dan zat-zat iritan yang ringan (Widowati dkk., 2020). Degenerasi juga menyebabkan inti sel hati menjadi tertekan. Tekanan yang diberikan terhadap inti sel hati menyebabkan terjadi penciutan sel yang kemudian berdampak pada kematian sel (Zulfahmi dkk., 2015).

3.8 Alur Penelitian



3.9 Analisis Data

Data histopatologi hepar dan otot ikan mujaer dianalisis secara deskriptif, dan Parameter yang diamati adalah gambaran histopatologi (Nekrosis dan degenerasi)