

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Sampel ikan diperoleh dari pasar ikan Gunung sari, pasar ikan Pabean dan pasar ikan Simo. Pengambilan dan pengamatan sampel darah serta nekropsis dan pengamatan secara makroskopis organ usus serta analisis histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian ini berlangsung dari tanggal 15 Januari hingga 19 Januari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Spuit, jarum syringe, tabung heparin, objek glass, cover glass, pipet sahli, tabung Hb, batang pengaduk, mikroskop binokuler. Perangkat pembedahan atau peralatan bedah, microtome putar, oven, media penyisipan parafin, prosesor jaringan otomatis, wadah organ, label, alat tulis, kamera digital dan ember, kain lap/kanebo serta alas.

3.2.2 Bahan Penelitian

Tiga puluh ekor ikan nila, minyak cengkeh, HCL 0,1 N, aquadest, air, oil emersi, buffered neutral formalin 10%, dan alcohol 70% digunakan sebagai komponen. Xylol, parafin, air suling, air mengalir, dan zat pewarna hematoxyllin and eosin (HE), formalin 10%, 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% alcohol secara berurutan.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode studi hematologi dan histologi yang dilakukan di laboratorium. Sampel usus ikan nila diambil untuk preparat histologi yang akan digunakan sebanyak tiga puluh ekor. Pengamatan mikroskopis usus ikan nila untuk pemeriksaan preparat histopatologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x digunakan untuk memeriksa dan mengambil gambar preparat spesimen. Infiltrasi sel radang, nekrosis, dan kelainan usus merupakan kriteria yang diteliti (Windarti dan Simarmata, 2015).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel Ikan Nila

Ikan nila diambil sampelnya dari area yang sudah ditentukan dengan 30 ekor ikan diperoleh dari masing-masing lokasi. Sampel ikan hidup dan utuh diperoleh dengan kriteria ukuran sekitar 300 gram, serta ikan dengan aktivitas yang kurang dalam akuarium (ikan yang jarang bergerak atau berenang dapat dikatakan ikan kurang sehat).

3.4.2 Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah ikan diambil pada ikan masih dalam keadaan hidup agar darah tidak membeku, darah diambil dengan spuit 3ml, letak pengambilannya di antara sisik ikan di dekat ekor pada vena caudalis, kemudian sampel darah yang didapatkan ditampung pada tabung heparin

yang mengandung antikoagulan didalamnya untuk mencegah terjadinya penggumpalan darah. Masukkan jarum syringe dari belakang anal ke arah vertebrae (tulang belakang) hingga jarum menyentuh tulang.

3.4.3 Pengambilan Sampel Organ

Ikan di euthanasia dengan larutan minyak cengkeh yang dicampur dengan air, sebanyak 5 tetes minyak cengkeh dengan air 5 liter untuk 1 ikan dalam ember (Daniel *et.al.*, 2015), kemudian dilakukan nekropsi dan pengamatan secara makroskopis pada organ usus ikan. Setelah di nekropsi sampel dipindahkan dengan cepat ke dalam wadah organ yang telah diberi dengan buffered neutral formalin 10%. Sampel kemudian diproses untuk pembuatan histopatologi usus di Laboratorium Patologi Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

3.4.4 Pembuatan Preparat Histopatologi Usus

Preparat histopatologi dibuat sampel organ direhidrasi dengan alkohol bertingkat setelah difiksasi dalam formalin 10%, 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% alkohol secara berurutan, setelah 24 sampai 48 jam, dibenamkan dalam parafin, dan dipotong setebal 5 mikron. Sampel kemudian diberi metode pewarnaan HE. Mikroskop Olympus CX21 dengan pembesaran 100x dan 400x digunakan untuk memeriksa dan mengambil gambar preparat spesimen. Infiltrasi sel radang, nekrosis, dan kelainan usus merupakan kriteria yang diteliti (Windarti dan Simarmata, 2015).

3.4.5 Pengamatan Mikroskopis

a. Darah

Sampel yang sudah terkumpul dilakukan pengamatan hemoglobin dan diperiksa dengan metode sahli yang dilakukan secara visual. Fungsi pengamatan hemoglobin guna mengukur jumlah hemoglobin dalam darah tujuannya untuk deteksi dini terhadap adanya gejala anemia. Terjadinya anemia juga terkait dengan adanya kerusakan zat besi di dalam metabolisme dan akan berakibat terhadap defisiensi atau berkurangnya absorpsi makanan di dalam usus. Dengan berkurangnya zat besi di dalam darah, maka akan menyebabkan berkurangnya konsentrasi hemoglobin di dalam darah.

Metode sahli adalah metode yang sering digunakan di laboratorium untuk mengukur kadar hemoglobin dalam darah. Menurut Aturrohman (2020), adapun prinsip dan tolak ukur pengamatan hemoglobin dengan metode sahli sebagai berikut:

- Prinsip metode sahli
 1. Hemoglobin dihidrolisis dengan HCl: Hemoglobin dihidrolisis dengan HCl menjadi globin ferroheme.
 2. Ferroheme dioksidasi oleh oksigen: Ferroheme dioksidasi oleh oksigen yang ada di udara dan bereaksi dengan ion Cl membentuk ferrihemechlorid yang juga disebut hematin atau hemin.

3. Warna yang terbentuk dibandingkan dengan warna standar:
Warna yang terbentuk ini dibandingkan dengan warna standar (hanya dengan mata telanjang). Perubahan warna hemin dibuat menggunakan pengenceran hingga warnanya sama dengan warna standar.
- Tolak ukur metode sahli
 1. Kelebihan: Pengerjaan metode ini lebih mudah dan biaya pemeriksaan murah. Dapat digunakan di laboratorium yang memiliki fasilitas terbatas.
 2. Kekurangan: Ketelitian alat rendah, proses memipet darah dan pengenceran yang tidak tepat dapat mempengaruhi hasil. Perlu dilakukan pengenceran yang tepat untuk memastikan warna yang terbentuk sama dengan warna standar.

Pengukuran kadar hemoglobin yaitu dengan cara menghisap darah ikan dengan pipet sahli hingga skala 20mm. Bersihkan ujung pipet dengan tissue dari sisa darah yang menempel. Berikutnya pindahkan darah ke tabung hemoglobin yang telah berisi 10 mm HCL 0,1 N. Diamkan kedua bahan tersebut selama 3-5 menit agar hemoglobin bereaksi dengan HCL untuk membentuk asam hematin sambil diaduk. Masukkan tabung pengencer ke dalam komparator blok untuk memperbandingkan warna larutan darah dengan warna standar, jika belum sama tambahkan sedikit demi sedikit aquadest ke dalam tabung pengencer hingga larutan darah sama dengan larutan standar. Tingkat larutan darah dihitung pada skala sebagai

kadar Hb (gr/%). Pemeriksaan hemoglobin berguna untuk menilai tingkat anemia serta perkembangan penyakit terkait anemia (Sarkiah, dkk., 2016).

b. Usus

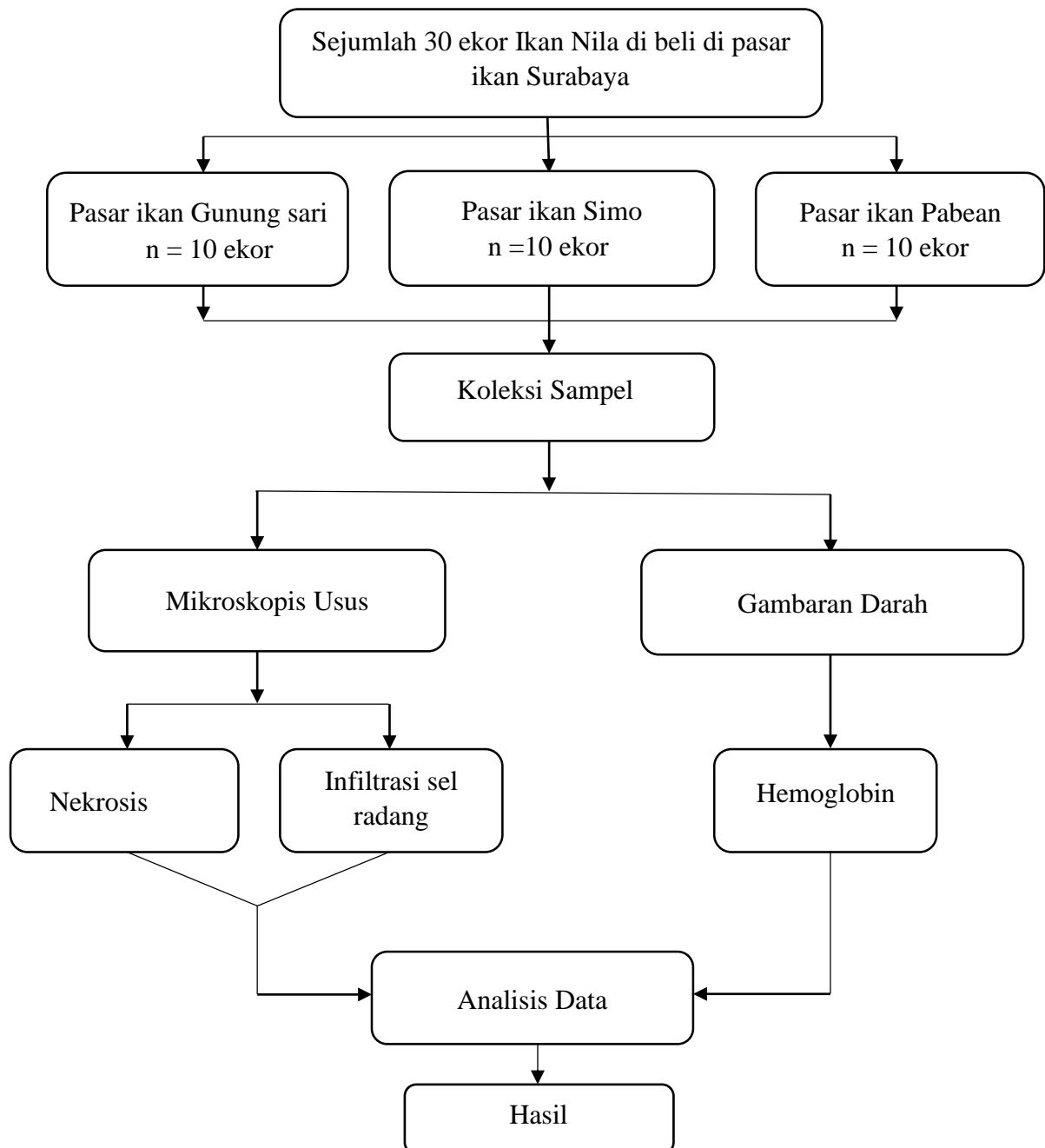
Persiapan histopatologis usus ikan nila memungkinkan untuk diperiksa keadaan mikroskopisnya dan mengidentifikasi kelainan pada usus. Parameter abnormalitas yang terdeteksi adalah infiltrasi sel radang dan nekrosis. Seperti yang dilansir Lestari dkk, (2018), peringkat penilaian histopatologi berkisar dari 0 (normal) yaitu tidak adanya lesi atau perubahan nekrotik maupun perubahan lainnya, 1 (ringan) yaitu jika jumlah nekrotik kurang dari 30% yang diperoleh dari seluruh lapang pandang, 2 (sedang) yaitu jika jumlah nekrotik direntang 31-70% dari seluruh lapang pandang, dan 3 (berat) jika jumlah nekrotik direntang 71-100% dari seluruh lapang pandang.

Tabel 3.1 Skoring Penilaian Histopatologi
Standar Metode Skoring (Lestari dkk., 2018)

| Skor | Nekrosis | Keterangan |
|-------------|---|-------------------|
| 0 | Tidak ada lesi /perubahan nekrotik | Normal |
| 1 | Jika jumlah nekrotik <30% dari seluruh Lapang Pandang | Ringan |
| 2 | Jika jumlah nekrotik antara 31-70% dari seluruh Lapang Pandang | Sedang |
| 3 | Jika jumlah nekrotik antara 71-100% dari seluruh Lapang Pandang | Berat |

| Skor | Infiltrasi Sel Radang | Keterangan |
|-------------|---|-------------------|
| 0 | Tidak ada lesi /perubahan sel radang | Normal |
| 1 | Jika jumlah sel radang <30% dari seluruh Lapang Pandang | Ringan |
| 2 | Jika jumlah sel radang antara 31-70% dari seluruh Lapang Pandang | Sedang |
| 3 | Jika jumlah sel radang antara 71-100% dari seluruh Lapang Pandang | Berat |

3.5 Kerangka Penelitian



3.6 Analisis Data

Data selanjutnya dianalisis menggunakan uji Kruskal Wallis untuk mengetahui perbedaan antara kelompok control dan intervensi. Suatu hipotesis dianggap signifikan jika ($p < 0,05$). Kemudian dilakukan uji Mann Whitney kembali untuk mengetahui perbedaan pada tiap kelompok (Hidayati dkk., 2018). Dan untuk pemeriksaan darah menggunakan One Way ANNOVA dan Post Hoc Test Tuckey.