

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai April 2015. Pemeriksaan sifat fisika air dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang dan pembuatan preparat histologi insang ikan di Laboratorium UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta. Pengambilan sampel ikan dan sampel air limbah di kolam PT Aek Tarum Kec. Lempuing Jaya-OKI.

#### **B. Definisi Operasional**

Jenis penelitian ini adalah eksperimen. Data yang diperoleh akan dianalisis dengan metode deskriptif kualitatif. Penentuan sampel ikan dan air menggunakan metode *purposive random sampling*. Preparat histologi insang ikan dibuat dengan menggunakan metode parafin dan pewarnaan *Haematoxylin-Eosin*. Penentuan kolam limbah menggunakan metode observasi. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah air limbah yang di kolam limbah PT. Aek Tarum sedangkan variabel terikatnya adalah insang ikan yang ada di kolam limbah PT. Aek Tarum.

#### **C. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat :**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pH meter, alat bedah, gelas benda, mikroskop, fotomikrografi, *hotplate*, penggaris, kamera digital, pipet tetes, botol film untuk menyimpan sampel, kertas label, tisu,

seperangkat alat untuk pewarnaan HE, *objek glass*, *cover glass*, oven, mikrotom dan pisau mikrotom.

## **2. Bahan :**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan, larutan bouin, formalin 4%, toluene, alkohol seri (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% dan alkohol absolut), xylol, parafin, glyserin, albumin, entelan, aquades, air mengalir

## **D. Cara Kerja**

### **1. Menentukan Kolam**

Dua kolam limbah dari beberapa kolam telah dipilih berdasarkan kriteria warna air yang paling mencolok. Pengambilan air limbah dilakukan dengan cara mengambil langsung di kolam limbah. Air limbah diambil dari kolam dan disimpan dalam botol lalu dibawa ke laboratorium untuk diteliti sifat fisiknya

### **2. Penangkapan Ikan**

Pengambilan sampel ikan dilakukan di dua kolam dengan menggunakan alat pancing, ikan dipancing langsung di lokasi jadi setiap ikan yang berhasil ditangkap berpeluang menjadi sampel untuk dijadikan preparat di setiap masing-masing kolam.

### **3. Analisis Insang Ikan**

#### **a. Pembuatan Preparat Histologi Insang (Saputro, 2015)**

Ikan diperoleh dari hasil tangkapan, selanjutnya ikan disimpan dalam wadah yang berisi air, bus ikan dengan alkohol, kemudian dipotong bagian insang sesuai ukuran yang ditentukan dan dimasukkan ke dalam

formalin 4% dan dibawa ke laboratorium untuk dibuat preparat (Sumiarsih & Windarti, 2009).

### 1) Pengambilan Organ

Insang diambil dengan cara dipotong/diiris sesuai kebutuhan.

### 2) Fiksasi Organ

Fiksasi bertujuan untuk mempertahankan bentuk dan keadaan sampel organ yang akan dibuat preparatnya. Fiksasi organ ini menggunakan larutan *formalin* dan dilakukan selama 24 jam.

### 3) Pencucian dan Dehidrasi

Dilakukan dengan menggunakan alkohol bertingkat.

- (a) Alkohol 40 % : sebanyak 4 sampai 5.
- (b) Alkohol 60 % : selama 1 jam diganti 2 kali @ 30 menit.
- (c) Alkohol 70 % : selama 1 jam diganti 2 kali @ 30 menit.
- (d) Alkohol 80 % : selama 2 jam diganti 2 kali @ 1 jam.
- (e) Alkohol 90 % : selama 2 jam diganti 2 kali @ 1 jam.
- (f) Alkohol 95 % : selama 2 jam diganti 2 kali @ 1 jam.
- (g) Alkohol 100 % : selama 1 jam diganti 2 kali @ 30 menit.
- (h) Toluene : selama satu malam

Catatan : Setelah direndam dalam alkohol 100 %, ambil organ kemudian diletakkan diatas kertas tisu dan segera dimasukkan ke dalam Toluene.

#### **4) Infiltrasi**

Sampel organ yang direndam dalam Toluene kemudian diambil, selanjutnya di rendam dalam larutan Toluene-Paraffin dan Paraffin dengan ketentuan sebagai berikut :

- (a) Toluene : Parafin (50 % : 50 %) : selama 1 jam
- (b) Parafin 1 : selama 1,5 jam, Parafin 2 : selama 1,5 jam dan Parafin 3 : selama 1,5 jam.

Seluruh proses perendaman dilakukan di dalam oven dengan suhu 60 °C.

#### **5) Embedding/Penyelubungan**

Sampel organ diletakkan pada blok paraffin berupa kotak-kotak kecil dan disimpan pada suhu ruang selama 24 jam.

#### **6) Section / Pematangan**

Sampel organ yang telah diselubungi dengan paraffin selanjutnya dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan tertentu.

#### **7) Pewarnaan**

- (a) Masukkan irisan organ/jaringan ke dalam Xylol 1 selama minimal 30 menit, kemudian dilanjutkan dengan Xylol 2 selama minimal 30 menit.
- (b) Rendam irisan organ/jaringan ke dalam alkohol bertingkat : Absolut, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50%, 40 %, 30 % dan aquades, masing-masing selama  $\pm$  5-6 detik.

- (c) Rendam irisan organ/jaringan ke dalam pewarna *Hematoxylin* selama  $\pm 10$  menit.
- (d) Cuci dengan air mengalir selama  $\pm 10$  menit, kemudian bilas dengan aquades.
- (e) Rendam dengan alkohol bertingkat : 30%, 40%, 50 %, 60%, 70%, masing-masing selama 5 detik.
- (f) Masukkan ke dalam pewarna *Eosin* selama  $\pm 3$  menit.
- (g) Rendam ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, absolute selama  $\pm 5$  detik.
- (h) Bersihkan alkohol dengan kertas tisu, tapi jangan sampai terkena bagian organ/jaringan.
- (i) Rendam ke dalam Xylol 1 selama minimal 30 menit kemudian dilanjutkan dengan Xylol 2 selama minimal 30 menit.
- (j) Tutup organ/jaringan secara perlahan dan hati-hati dengan menggunakan *Canada Balsam* atau *Entellan*.
- (k) Pengamatan dan Pelabelan  
Preparat/slide siap diamati dengan mikroskop dan diberi label identitas preparat.

#### **b. Analisis Mikroskopis Insang Ikan**

Pengamatan struktur mikroskopis pada insang ikan adalah dengan mengamati keadaan struktur insang yang tampak dengan menggunakan mikroskop. Kemudian difoto bagian yang tampak mengalami kerusakan. Data yang diperoleh secara makroskopis dan mikroskopis dianalisis secara deskriptif (Nadrah dkk, 2013).