

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia menghadapi masalah besar dalam pengelolaan sampah plastik. Sebagai negara dengan populasi terbesar keempat di dunia, Indonesia merupakan pencemar plastik terbesar ketiga setelah Cina dan India, dengan tingkat konsumsi plastik yang terus meningkat (Batutah et al., 2022). Sekitar 70% dari sampah plastik di Indonesia tidak dikelola dengan baik, setara dengan sekitar 4,8 juta ton sampah plastik. Dari jumlah tersebut, diperkirakan 0,62 juta ton (9%) berakhir di perairan dan laut. Data dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) menunjukkan bahwa sekitar 0,27–0,60 juta ton sampah plastik masuk ke laut Indonesia setiap tahunnya. Indonesia memproduksi sekitar 7,8 juta ton sampah plastik per tahun (Kamaruddin et al., 2022).

Statistik menunjukkan bahwa sampah plastik mencapai 14% dari total sampah di Indonesia (Ikhsanudin et al., 2022). Plastik yang masuk ke laut memerlukan waktu yang sangat lama untuk terurai sehingga dapat mengancam kelestarian ekosistem laut. Plastik membutuhkan sekitar seribu tahun untuk terdegradasi sepenuhnya. Selama periode ini, bahan kimia dalam plastik akan larut dan terurai menjadi partikel kecil yang disebut mikroplastik. Meskipun plastik akhirnya terurai, senyawa kimia yang berasal dari gas alam tetap beracun dan berbahaya. Polimer sintesis pertama kali dibuat pada tahun 1869, dan plastik pertama kali diproduksi pada tahun 1907. Mayoritas makro dan mikroplastik di laut akhirnya menetap di dasar laut dengan konsentrasi tertinggi ditemukan di ngarai bawah laut yang terhubung langsung dengan sumber plastik dari daratan (Silitonga et al., 2022).

Pencemaran mikroplastik di perairan kini menjadi isu global yang sangat mendesak karena dampaknya yang besar terhadap ekosistem akuatik (Suardy et al., 2020). Mikroplastik adalah partikel plastik berukuran kurang dari 5 mm yang berasal dari berbagai sumber, termasuk produk konsumen, degradasi plastik yang lebih besar, dan bahan industri (Azizah et al., 2020). Senyawa kimia yang sering ditemukan dalam mikroplastik salah satunya adalah stirena, yang banyak digunakan dalam industri plastik dan karet (Rusidi et al., 2024). Mikroplastik stirena di perairan Indonesia telah meningkat secara signifikan. Sekitar 55% dari semua spesies ikan memiliki bukti puing-puing yang diproduksi mirip dengan Amerika yang dilaporkan 67% (Dewi, 2022). Namun, mayoritas sampah di Indonesia adalah plastik, sedangkan di Amerika Utara mayoritas adalah serat sintesis yang terdapat pada pakaian dan beberapa jenis jaring. Implikasi dari fakta bahwa ikan terkontaminasi mikroplastik adalah plastik dan bahan kimianya akan terakumulasi dalam rantai makanan. Oleh karena itu, bukan hanya plastik yang ditransfer melalui rantai makanan, tetapi juga bahan kimia dari plastik (Tanaka et al., 2013). Limbah polistirena yang tidak dikelola dengan baik, seperti *styrofoam*, banyak ditemukan di pantai dan perairan, terpecah menjadi partikel-partikel mikroplastik akibat proses alami seperti paparan sinar matahari dan abrasi mekanis (Faleti, 2022). Partikel-partikel ini kemudian memasuki rantai makanan laut, mengancam kehidupan akuatik

serta berpotensi membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsi hasil laut (Hu et al., 2021). Selain itu, mikroplastik stirena dapat mengadsorpsi bahan kimia berbahaya dan polutan, memperparah efek toksisitas terhadap organisme laut dan manusia (Weis et al., 2015). Situasi ini menuntut perhatian dan tindakan segera untuk mengembangkan strategi pengelolaan limbah yang lebih efektif serta upaya mitigasi yang komprehensif guna melindungi ekosistem perairan Indonesia. Paparan mikroplastik yang mengandung stirena di perairan dapat menimbulkan efek toksik pada organisme akuatik, termasuk ikan (Rochman et al., 2015).

Ikan *Oryzias celebensis*, yang merupakan spesies endemik di perairan Sulawesi, merupakan model yang ideal untuk studi toksikologi karena sensitivitasnya terhadap perubahan lingkungan (Sari et al., 2018). Ikan *O. celebensis* memiliki banyak keunggulan seperti waktu generasi yang singkat, pemijahan berulang kali sepanjang tahun dan kekayaan informasi genom, sehingga spesies ini telah menjadi salah satu model uji paling populer untuk penelitian toksikologi (Lin et al., 2016). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa paparan bahan kimia beracun dapat menyebabkan perubahan signifikan pada struktur mikroanatomi dan fisiologi ikan. Namun, studi khusus yang meneliti efek stirena dalam mikroplastik terhadap mikroanatomi jantung dan hepar pada ikan *O. celebensis* masih sangat terbatas. Penelitian mendalam mengenai hal ini sangat penting untuk mengisi kesenjangan informasi yang ada.

Mikroanatomi jantung dan hepar ikan merupakan aspek yang krusial dalam penelitian toksikologi, mengingat kedua organ ini memiliki peran penting dalam menjalankan fungsi metabolisme dan fisiologi tubuh. Jantung, sebagai organ utama dalam sistem sirkulasi darah, sangat peka terhadap perubahan lingkungan yang dapat memengaruhi kinerjanya, seperti munculnya kerusakan miokardium, atau fibrosis akibat paparan bahan polutan. Di sisi lain, hepar berfungsi sebagai pusat metabolisme dan detoksifikasi, sehingga sering kali menjadi target utama kerusakan akibat zat beracun. Kerusakan ini biasanya ditandai dengan adanya perubahan mikroanatomi seperti pembentukan vakuolisasi, nekrosis, atau inflamasi (Klavins et al., 2022).

Perubahan pada mikroanatomi jantung dan hepar dapat digunakan sebagai indikator utama toksisitas sistemik akibat paparan zat kimia berbahaya, seperti stirena. Penelitian ini meneliti efek mikroplastik yang mengandung stirena terhadap mikroanatomi organ tersebut, sambil mendorong langkah-langkah mitigasi yang lebih efektif untuk mengurangi dampak polutan pada ekosistem perairan dan memastikan keberlanjutan sumber daya air di masa mendatang.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh paparan stirena terhadap perubahan histopatologi jantung pada ikan *Oryzias celebensis*?
2. Bagaimana pengaruh paparan stirena terhadap perubahan histopatologi hepar pada ikan *Oryzias celebensis*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk menganalisis pengaruh paparan stirena terhadap perubahan histopatologi jantung pada ikan *Oryzias celebensis*.
2. Untuk menganalisis pengaruh paparan stirena terhadap perubahan histopatologi hepar pada ikan *Oryzias celebensis*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh paparan stirena terhadap perubahan histopatologi jantung dan hepar pada ikan *Oryzias celebensis*. Selain itu, melalui penelitian ini dapat menjadi salah satu cara untuk mengetahui dasar bagi upaya konservasi dan pengelolaan lingkungan perairan yang lebih baik serta sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya yang ingin meneliti lebih lanjut.

1.5 Hipotesis

Berdasarkan teori yang akan dipaparkan pada halaman berikutnya, maka dapat ditarik hipotesis bahwa pengaruh paparan stirena pada ikan *O. celebensis* dapat berpengaruh terhadap mikroanatomi jantung dan hepar.

1.6 Keaslian Penelitian

Penelitian tentang pengaruh paparan stirena terhadap gambaran histopatologi jantung dan hepar pada ikan *O. celebensis* belum pernah dilakukan tetapi penelitian serupa pernah dilakukan.

Tabel 1. Keaslian penelitian

Penulis	Judul
Wang et al., 2022	<i>Toxic effects of polystyrene nanoplastics and polybrominated diphenyl ethers to zebrafish (Danio rerio)</i>
Zhou et al., 2022	<i>Long-Term Exposure to Polystyrene Nanoplastics Impairs the Liver Health of Medaka</i>

1.7 Teori

1.7.1 Stirena

Stirena merupakan monomer kunci dalam pembuatan polistirena, umumnya stirena digunakan untuk berbagai keperluan seperti kemasan makanan, bahan dan produk sekali pakai. Karakteristik polistirena yang ringan, ekonomis, dan tahan terhadap air serta sejumlah besar bahan kimia, menjadikannya sulit terdegradasi di lingkungan, sehingga berkontribusi pada akumulasi mikroplastik. Mikroplastik ini menyebar di berbagai habitat, dari sungai hingga lautan dan atmosfer (Yoon et al., 2022).

Stirena sendiri berpotensi toksik, paparan stirena dapat memicu iritasi pada mata, kulit, dan sistem pernapasan, serta menyebabkan efek neurologis jika terpapar dalam dosis tinggi (Suman et al., 2020). Adanya stirena dalam mikroplastik juga meningkatkan potensi resiko kesehatan karena kemampuannya sebagai pembawa kontaminan lain. Upaya saat ini untuk mengatasi polusi mikroplastik melibatkan teknik deteksi yang lebih maju, seperti spektroskopi, mikroskopi, peningkatan pengelolaan limbah, dan inisiatif daur ulang (Munawar dan Sabjan, 2022).



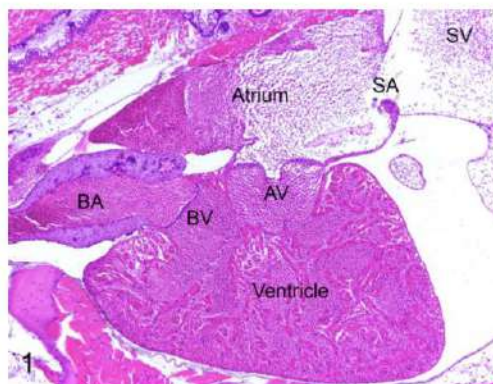
Gambar 1. Struktur stirena (Surinlert et al., 2020)

World Health Organisation (WHO) telah mengklasifikasikan stirena sebagai kemungkinan karsinogenik bagi manusia. Lebih dari 90% stirena membentuk metabolit stirena 7,8-oksida melalui jalur metabolisme yang melibatkan oksidasi hati oleh sitokrom P450. Metabolit ini merangsang replikasi sel dan menyebabkan proliferasi sel serta menginduksi kerusakan untai tunggal RNA dalam sel darah putih dan meningkatkan kerusakan sitogenetik, yang meliputi kerusakan kromosom (Ajaj et al., 2021).

1.7.2 Histologi Jantung

Jantung ikan memiliki sel yang tersusun secara longitudinal, dengan lapisan-lapisan yang terdiri atas epikardium, miokardium, dan endokardium. Endokardium merupakan membran bagian dalam yang melapisi permukaan dalam jantung, terdiri atas sel endotelial dan jaringan ikat. Membran luar jantung, yaitu epikardium, tersusun dari epitel pipih sederhana yang dilapisi oleh jaringan ikat. Lapisan tengah yaitu lapisan otot berada pada bagian atrium dan ventrikel (Akhter dan Saha, 2013).

Jantung ikan *O. celebensis* terletak di dalam perikardium, berada di bagian anterior dari rongga tubuh utama, dan umumnya di posisi ventral faring. (Pope dan Ferguson, 2006). Darah yang tidak teroksigenasi masuk ke dalam *sinus venosus* yang memiliki dinding tipis dan sebagian besar terdiri dari jaringan ikat kolagen. Dari sana, darah mengalir melalui katup sinoatrial ke atrium, yang memiliki dinding tipis dan trabekula yang membentuk jaringan longgar. Kontraksi atrium disertai dengan dilatasi ventrikel, yang mendorong darah ke ventrikel melalui katup atrioventrikular.



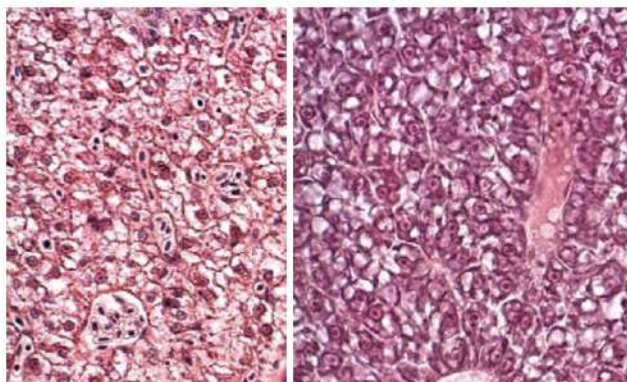
Gambar 2. Histologi normal jantung (Cooper dan Spitsbergen 2016)

Dinding ventrikel jauh lebih tebal dibandingkan dengan atrium. Terdapat dua lapisan, yaitu lapisan luar yang padat otot dan lapisan dalam yang lebih berpori, dengan banyak trabekula. Ketika ventrikel berkontraksi, tekanan tinggi tercipta, yang menyebabkan darah dipompa menuju *bulbus arteriosus* melalui katup ventrikel-bulbar. *Bulbus arteriosus* memiliki dinding yang tebal, tersusun dari jaringan fibroelastik dan beberapa serat otot polos. Dengan sifat elastisnya, *bulbus arteriosus* dapat mengembang, yang membantu meredakan tekanan denyut dari ventrikel. Dari sana, darah didistribusikan ke insang melalui *aorta ventralis* yang mengalir melalui arteri brankial aferen (Menke et al., 2011).

1.7.3 Histologi Hepar

Hati atau hepar ikan *O. celebensis* adalah organ metabolisme utama yang menjalankan berbagai fungsi penting seperti metabolisme, penyimpanan nutrisi, dan produksi empedu. Secara mikroskop anatomi, hati ikan ini terdiri dari hepatosit, sinusoid, dan kanalikuli empedu. Hepatosit, sebagai sel utama hati, berbentuk polihedral dengan inti sel yang jelas. Hepatosit ikan tersusun dalam pola tidak teratur tanpa pembentukan lobulus seperti pada hati mamalia. Sel-sel ini dikelilingi oleh sinusoid, kapiler khusus yang memungkinkan interaksi langsung antara darah dan hepatosit. Struktur sinusoid ini dilapisi oleh sel endotel yang fenestrasi, memungkinkan pertukaran molekul besar antara darah dan sel hati. Kanalikuli empedu, yang terbentuk di antara membran hepatosit, bertanggung jawab mengangkut empedu menuju saluran empedu utama dan akhirnya ke kantong empedu. (Laurén dan Wails, 2018).

Sel Kupffer, yang umumnya terdapat dalam hati mamalia, tidak ditemukan di hati ikan. Di samping itu, terdapat perbedaan yang mencolok antara hati ikan jantan dan betina, di mana hepatosit betina menunjukkan kecenderungan basofilik yang lebih tinggi akibat produksi vitelogenin. Perbedaan ini berkaitan dengan perbedaan fungsi hati pada ikan *O. celebensis* jantan dan betina dalam mendukung proses reproduksi (Menke et al., 2011).



Gambar 3. Histologi hepar normal. Kiri jantan, kanan betina (Menke et al., 2011)

Hepar merupakan organ utama yang berperan dalam metabolisme serta berfungsi dalam detoksifikasi dan biotransformasi. Selain itu, hepar juga menjadi organ penting untuk mengidentifikasi dan mendeteksi kerusakan sebagai indikator kesehatan tubuh. Keberadaan vakuola dalam sitoplasma hepatosit, yang mengandung lipid atau glikogen, merupakan bagian normal dari proses metabolisme pada ikan. Hepar ikan rentan mengalami kerusakan akibat paparan bahan kimia. Hal ini disebabkan oleh lambatnya aliran darah yang keluar dari hepar, sehingga kemampuan hepar untuk membersihkan zat kimia beracun dan metabolit menurun. Berbagai faktor dapat menyebabkan kerusakan pada hepar, dan karena organ ini memiliki peran penting dalam berbagai proses metabolisme, kerusakan tersebut dapat memberikan dampak serius terhadap fungsi metabolisme tubuh hewan (Camargo dan Martinez, 2007).

1.7.4 Ikan *Oryzias celebensis*

Oryzias celebensis, juga dikenal sebagai Medaka Sulawesi, adalah jenis ikan air tawar yang berasal dari Sulawesi, Indonesia. Ikan *Oryzias* tergolong vertebrata yang dijumpai di persawahan, danau, sungai, dan rawa yang memiliki jumlah serta variasi spesies yang relatif banyak. Spesies ini merupakan kelompok ikan dari kelas *Actinopterygii* (Risnawati et al., 2015). Nama genus *Oryzias* berasal dari nama ilmiah tanaman padi yaitu *Oryza*, sehingga spesies *Oryzias* diakui paling banyak sebagai ikan air tawar, sedangkan beberapa spesies lainnya mendiami jenis perairan lainnya (Hilgers dan Schwarzer, 2019).

Adapun klasifikasi *O. celebensis* menurut menurut Weber (1894) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
 Filum : Chordata
 Subfilum : Pisces
 Classis : Actinopterygii
 Ordo : Beloniformes
 Familia : Adrianichthyidae
 Genus : *Oryzias*
 Species : *Oryzias celebensis*



Gambar 4. Ikan *Oryzias celebensis* (Risnawati et al., 2015)

Tahun 2009, ditemukan 32 spesies ikan *Oryzias* sp. di Asia, di mana 14 di antaranya hanya terdapat di perairan Pulau Sulawesi, dan spesies lainnya berada di danau tertentu di pulau tersebut. Sulawesi, dengan ekosistem yang beragam menjadi habitat bagi berbagai spesies endemik yang tidak dapat dijumpai di tempat lain di dunia. Spesies dalam genus *Oryzias* telah menunjukkan kemampuan luar biasa untuk beradaptasi dengan berbagai kondisi lingkungan, termasuk variasi salinitas, suhu, dan kualitas air (Hilgers dan Schwarzer, 2019).

1.7.5 Ciri-Ciri Ikan *Oryzias celebensis*

Ikan medaka (*O. celebensis*) secara etimologis berarti 'mata di atas' (*me* = mata; *daka* = tinggi, besar), karena ikan *O. celebensis* memiliki mata yang terletak di posisi tinggi di atas hidung dengan ukuran yang cukup besar, hal ini dapat dilihat dengan jelas pada saat malam hari atau pada saat stadium juvenil, keberadaan kedua mata pada ikan *O. celebensis* terlihat sangat dominan (Fahmi et al., 2015). Ikan *O. celebensis* memiliki tubuh yang memanjang dan berwarna kuning transparan dengan garis samar-samar di samping tubuh bagian belakang, dan siripnya berwarna kuning. Ikan ini memiliki sifat seksual sekunder dikromatisme dimana ikan jantan memiliki warna yang lebih menarik dibandingkan ikan betina (Hasanah et al., 2022). Sirip ekornya memiliki 24 garis memanjang, dan tubuhnya memiliki 30-32 deret sisik sepanjang sisi badan (Said dan Hidayat, 2015). Tubuhnya ditutupi sisik sikloid dengan panjang longitudinal antara 29-33 mm. Ikan ini memiliki ukuran panjang antara 2 - 4,5 cm. Ikan *O. celebensis* memiliki tipe mulut terminal dengan panjang moncongnya 5,4 mm (dengan rentang 3,2 mm hingga 7,6 mm), sepasang sirip dada (*Pinnae pectoralis*), sepasang sirip perut (*Pinnae abdominalis*) yang pendek, dan sirip punggung (*Pinna dorsalis*) yang jauh lebih pendek dibanding sirip dubur (*Pinna analis*) yang terletak dekat dengan sirip ekor (*Pinna caudalis*). Pada bagian tepi sirip ekor (*Pinna caudalis*), ikan *O. celebensis* berwarna kuning orange dan memiliki garis hitam pada bagian ekornya. Bagian submarginal pada punggung dan perut sirip ekornya berwarna kuning orange, sementara selaput sirip perutnya kuning pucat (Magtoon dan Termvidchakorn, 2009).

Ikan *O. celebensis* memiliki sejumlah ciri yang sama satu sama lain dengan genus *Oryzias* lainnya, termasuk siklus hidup yang singkat, embrio dan korion yang transparan, reproduksi yang cepat, telur menetas 7 hari setelah pembuahan. Selain itu, benih yang baru menetas berkembang dan matang secara seksual selama 3 bulan. Setiap hari, ikan *O. celebensis* betina biasanya akan bertelur dalam jumlah banyak dan jumlah telur yang dihasilkan dapat bervariasi tergantung pada usia dan

kondisi fisik individu betina. Selain itu, Ikan *O. celebensis* merupakan organisme yang bersifat *euryhaline* yaitu memiliki kemampuan dalam menoleransi tingkat salinitas dengan jangkauan yang luas (Myosho et al., 2018).

1.7.6 Pemanfaatan Ikan *Oryzias celebensis*

Ikan *O. celebensis* adalah ikan yang berukuran kecil yang bersifat ovivar yang berasal dari Asia tenggara seperti Indonesia digunakan baik sebagai ikan hias maupun non-makanan (Serdianti et al., 2023). Ikan ini memiliki beberapa karakteristik yang menyebabkannya sangat bermanfaat untuk uji toksikologi berbagai bahan beracun. Ikan *O. celebensis* memiliki sejumlah keunggulan yang menjadikannya populer sebagai hewan model (Chowdhury et al., 2022). Keunggulan ini termasuk ukuran ikan yang kecil (sekitar 4-5 cm), daya tahan tubuh yang relatif kuat, kemampuan dipelihara di berbagai wadah dan lingkungan penelitian, kemampuan membedakan jantan dan betina hanya berdasarkan morfologi atau bentuk sirip, kecenderungan untuk bertelur sepanjang hari (Fahmi et al., 2015).

O. celebensis yang dalam bahasa lokal disebut Binnisi, berdasarkan standar yang dikeluarkan *American Standard Testing Material (ASTM)*, telah memenuhi sebagai hewan model untuk uji toksikologi. Selain itu, ikan ini adalah salah satu hewan model yang paling terkenal di kalangan ilmuwan untuk mempelajari berbagai topik ilmiah, terutama dalam bidang biologi dan kedokteran, dan berfungsi sebagai alternatif untuk ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai hewan model (Adewoyin et al., 2022). Penyakit parkinson yang disebabkan oleh faktor genetik dan lingkungan dapat diteliti menggunakan ikan medaka sebagai hewan model. Beberapa jenis ikan medaka mutan telah dikembangkan untuk menguji potensi pengobatan diabetes, kanker, terutama kanker kulit, dan penyakit degeneratif lainnya (Sari, 2021).

BAB 2 METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juli – Desember 2024 di Laboratorium Terintegrasi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin dan Balai Besar Veteriner Maros sebagai lokasi pembuatan preparat histologi serta Laboratorium Patologi Veteriner Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin sebagai lokasi pembacaan *slide*. Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa ikan *O. celebensis*. Hewan coba ini diperoleh dari sungai Pita, Bantimurung, Kab. Maros. Perawatan hewan dan protokol percobaan telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin dengan nomor surat 674/UN4.6.4.5.31/ PP36/2024.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang akan digunakan saat penelitian ini dilakukan yaitu: mikroskop stereo (*Olympus CX23*, Japan), kamera, *optilab*, gelas kimia, *cover glass*, *object glass*, akuarium, filter air, *water pump*, *power heads*, pasir malang, sendok tanduk, saringan ikan, selang, konektor, gunting, seperangkat alat untuk pewarnaan HE, kuas kecil, *incubator*, *tissue cassette*, cetakan jaringan, kaset pink mikrotom, pisau mikrotom, dan peralatan histoteknik, mikromotor, *scalpel*, *blade 15*, *styrofoam*, sarung tangan, tabung *ependorf*, *cutter*, ATK (Alat Tulis Kantor), pipa, spoit 1 cc, mikropipet, tip, termometer, wadah kultur nauplius *Artemia* sp., botol sampel, dan pipet tetes.

2.2.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini diantaranya: ikan *O. celebensis*, bakteri starter, fengli (*Otohime* B1), nauplius *Artemia* sp., stirena (*Styrene*, *ReagentPlus®*, contains 4-tert-butylcatechol as stabilizer, ≥99%), *aquabidest*, β-hidroxyethylphenyl eter, *hematoxylin* dan *eosin*, formalin 10%, *xylol*, garam dapur, tisu, parafin, dan kertas label.

2.3 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental laboratoris. Alokasi sampel penelitian menggunakan metode *Simple Random Sampling*. Sampel diambil dari populasi ikan medaka dan besar sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer:

$$(t - 1) (n - 1) > 15$$

Keterangan:

t = Jumlah kelompok

n = Jumlah subjek kelompok

$$\begin{aligned}
 (t-1)(n-1) &\geq 15 \\
 (5-1)(n-1) &\geq 15 \\
 4(n-1) &\geq 15 \\
 n-1 &\geq 15/4 \\
 n-1 &\geq 3,75 \\
 n &\geq 3,75 + 1 \\
 n &\geq 4,75
 \end{aligned}$$

Besar sampel pada penelitian ini adalah 75 ekor ikan medaka yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, dimana setiap kelompok terdiri atas 3 kali ulangan ($n = 5$ ekor per pengulangan):

- KLP A: (Kelompok perlakuan): Kelompok ikan yang diberikan paparan dengan konsentrasi etanol 0,5 % selama 96 jam.
- KLP B: (Kelompok perlakuan): Kelompok ikan yang diberikan paparan stirena dengan konsentrasi etanol 0,5 % + stirena 0,01 mg/L selama 96 jam.
- KLP C: (Kelompok perlakuan): Kelompok ikan yang diberikan paparan stirena dengan konsentrasi etanol 0,5 % + stirena 0,025 % mg/L selama 96 jam.
- KLP D: (Kelompok perlakuan): Kelompok ikan yang diberikan paparan stirena dengan konsentrasi etanol 0,5% + stirena 0,050 mg/L selama 96 jam.
- KLP E: (Kelompok perlakuan): Kelompok ikan yang diberikan paparan stirena dengan konsentrasi etanol 0,5% + stirena 0,075 mg/L selama 96 jam.

2.4 Prosedur Kerja

2.4.1 Pengambilan Sampel

Ikan *O. celebensis* ditangkap langsung menggunakan alat perangkap ikan (*trap*) di Sungai Pita, Bantimurung, Kabupaten Maros. Sebelum menangkap sampel, dilakukan observasi terlebih dahulu. Sungai ini berada dekat dengan pemukiman warga. Ikan yang ditangkap memiliki ukuran sekitar ≥ 4 cm. Sampel ikan disimpan dalam wadah plastik dengan tambahan oksigen agar tetap hidup sampai tiba di lokasi pemeliharaan.

2.4.2 Pemeliharaan dan Adaptasi Hewan Uji

Setibanya di laboratorium, ikan *O. celebensis* akan menjalani masa aklimatisasi selama 4 minggu. Selama periode ini, ikan akan ditempatkan dalam akuarium dengan suhu 28°C serta siklus cahaya 14 jam terang dan 10 jam gelap. Ikan akan diberi pakan komersial, yaitu *Otohime B1* dan nauplius *Artemia* sp., dengan jumlah yang disesuaikan 5% dari berat tubuh mereka. *Otohime B1* akan diberikan dua kali sehari pada pukul 08.00 dan 16.00, sedangkan nauplius *Artemia* sp. akan diberikan satu kali sehari pada pukul 12.00.

2.4.3 Pembuatan Larutan Stok Stirena

Larutan stirena disiapkan dengan cara membuat larutan stok terlebih dahulu. Pembuatan larutan stok dengan melarutkan 1 mg stirena murni dalam 5 ml etanol 0,5% kemudian ditambahkan hingga mencapai 1000 mL *aquabidest*. Konsentrasi

awal larutan stok, yaitu 0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,50 mg/L, dan 0,75 mg/L, telah ditentukan secara teliti. Setelah proses pengenceran diambil konsentrasi antara lain 0,01 mg/L, 0,025 mg/L, 0,050 mg/L dan 0,075 mg/L yang masing-masing dilarutkan dengan *aquabidest* hingga 1000 mL sesuai perlakuan.

2.4.4 Perlakuan Hewan Uji

Ikan yang telah diaklimatisasi selanjutnya diletakkan pada akuarium pengamatan (ukuran 15x15x20 cm) dan dibagi menjadi kelompok kontrol (larutan etanol 0,5%) dan kelompok *stirena*. Akuarium diisi dengan larutan pengujian sebanyak 1000 ml dengan larutan etanol 0,5% dan larutan *stirena* masing-masing 0,01 mg, 0,025 mg, 0,050 mg dan 0,075 mg. Selama periode pengamatan, ikan tidak diberikan pakan komersil maupun nauplius *Artemia* sp., serta ikan tetap dikondisikan dengan siklus cahaya 14 jam terang dan 10 jam gelap. Tiap 24 jam, air akuarium akan dilakukan pergantian larutan pengujian secara berkala. Hewan uji *dinekropsi* 96 jam setelah paparan untuk mengevaluasi kondisi organ. Proses nekropsi diawali dengan pemberian larutan anestesi β -hidroxyethylphenyl eter. Sayatan ventral dari sirip anal hingga *operculum* dilakukan untuk mengekspos organ *visceral*. Hepar diangkat, direndam dalam larutan *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10%, dan difiksasi menggunakan formalin 10%, sementara jantung diambil dengan hati-hati untuk menjaga integritas struktur organ.

2.4.5 Pembuatan Preparat Histologi

Proses pembuatan preparat histoteknik menurut standar Balai Besar Veteriner Maros melibatkan pengawetan organ, pemeriksaan histopatologi, dan pewarnaan HE. Sampel jaringan diawetkan dalam larutan BNF 10% selama sekitar 2 hari sebelum dilakukan pemotongan. Jika diperlukan, dekalsifikasi dilakukan untuk menghilangkan mineral menggunakan larutan seperti asam format atau asam nitrat agar jaringan keras, seperti tulang, dapat diiris dengan mudah. Jaringan kemudian dipotong setebal 0,5–1 cm, ditempatkan dalam keranjang pemrosesan, dan diberi label spesimen menggunakan pensil. Sisa jaringan disimpan dalam botol berisi BNF dengan tutup rapat dan diatur sistematis hingga waktu penyimpanan maksimal tiga bulan, setelah itu dimusnahkan sesuai prosedur. Tahap akhir melibatkan *embedding* jaringan ke dalam kaset yang kemudian diproses menggunakan *tissue processor* sesuai pengaturan waktu standar.

Embedding cassette dikeluarkan dari *tissue processor* dan ditempatkan dalam wadah yang sudah disiapkan di alat *embedding center*. Spesimen dikeluarkan satu per satu dari keranjang *tissue* dan dimasukkan ke dalam blok *paraffin*, dengan memastikan nomor spesimen tidak tertukar. Cetakan dan keranjang diletakkan pada sisi kanan dan kiri dispenser *paraffin*. Spesimen diletakkan di atas cetakan dan diisi dengan *paraffin* dengan menekan tombol pada alat. Cetakan diberi nomor sesuai dengan nomor spesimen yang ada pada keranjang. Kemudian, cetakan dipindahkan ke bagian dingin hingga *paraffin* membeku, lalu dipisahkan dari keranjang. Spesimen yang telah terpisah siap untuk dipotong menggunakan mikrotom. Blok jaringan difiksasi pada mikrotom, dipotong dengan ketebalan 5-6 mikron menggunakan pisau

mikrotom tajam. Potongan yang tidak rusak dan terentang sempurna dipilih dan dipindahkan ke *floating out* dengan suhu sekitar 40°C. *Gelatin powder* yang telah dilarutkan digunakan untuk memastikan potongan jaringan tidak mengerut. Potongan jaringan yang telah dipilih diletakkan pada gelas *slide* yang sudah diberi nomor. *Slide* kemudian dipanaskan selama minimal dua jam.

Pewarnaan harus dilakukan setelah memeriksa kejernihan semua bahan pewarna dan memastikan kesesuaiannya dengan jadwal penggantian yang telah ditentukan, yang mencakup tiga kali penggunaan untuk setiap pemakaian. Pewarnaan yang selesai dilanjutkan dengan proses penutupan preparat menggunakan *coverslip*. Siapkan *coverslip* sesuai jumlah preparat yang telah diwarnai, lalu tambahkan 1-2 tetes *entellan* pada masing-masing *coverslip*. Tempelkan *coverslip* pada slide preparat dengan hati-hati agar gelembung udara tidak terbentuk. Biarkan preparat tertutup hingga kering sempurna. *Slide glass* kemudian dibersihkan menggunakan *xylol* dan diberi nomor sesuai etiket yang tertera pada *slide glass* tersebut. Preparat siap untuk diamati di bawah mikroskop stereo.

2.4.6 Pengamatan Mikroskopik dan Pembacaan Preparat

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran lensa subjektif 10x serta lensa objektif 10x dan 40x. Gambar diambil menggunakan *Optilab Advanced*, kemudian hasil pemeriksaan dicatat dan diidentifikasi untuk mendapatkan hasil yang definitif. Analisis semi-kuantitatif dilakukan menurut penelitian sebelumnya dari (Steinbach et al., 2016; Arman 2021). Preparat histopatologi dipilih secara acak dari kelompok etanol 0,5% dan kelompok perlakuan yang mewakili masing-masing ulangan untuk dievaluasi. Tiap preparat diamati pada lima lapang pandang, yaitu pada keempat sudut dan bagian tengah preparat. Penentuan persentase skoring berdasar pada pengamatan visual dari kelima lapang pandang. Lalu pada setiap preparat dihitung nilai rerata dari parameter yang telah ditentukan. Penilaian terhadap gambaran histopatologi jantung dan hepar dilakukan dengan semi-kuantitatif skor berdasar pada kriteria sebagai berikut:

Tabel 2. Derajat kerusakan histopatologi jantung (Steinbach et al., 2016)

Skor/ Kerusakan	0	1	2	3	4
Hemoragi	Tidak ada hemoragi (< 5% jaringan mengalami hemoragi)	Hemoragi ringan (5%–25% jaringan mengalami hemoragi)	Hemoragi sedang (26%–50% jaringan mengalami hemoragi)	Hemoragi berat (51%–75% jaringan mengalami hemoragi)	Hemoragi sangat berat (> 75% jaringan mengalami hemoragi)

Vakuolisasi	Tidak ada vakuolisasi (< 5% jaringan mengalami degenerasi hidropik)	Vakuolisasi ringan (5%–25% jaringan mengalami mi Vakuolisasi)	Vakuolisasi sedang (26%–50% jaringan mengalami mi Vakuolisasi)	Vakuolisasi berat (51%–75% jaringan mengalami mi Vakuolisasi)	Vakuolisasi sangat berat (> 75% jaringan mengalami mi Vakuolisasi)
Infiltrasi sel radang	Tidak ada infiltrasi sel radang (< 5% jaringan mengalami infiltrasi)	Infiltrasi sel radang ringan (5%–25% jaringan mengalami mi infiltrasi)	Infiltrasi sel radang sedang (26%–50% jaringan mengalami mi infiltrasi)	Infiltrasi sel radang berat (51%–75% jaringan mengalami mi infiltrasi)	Infiltrasi sel radang sangat berat (> 75% jaringan mengalami mi infiltrasi)
Nekrosis	Tidak ada nekrosis (< 5% jaringan mati)	Nekrosis ringan (5%–25% jaringan mati)	Nekrosis sedang (26%–50% jaringan mati)	Nekrosis berat (51%–75% jaringan mati)	Nekrosis sangat berat (> 75% jaringan mati)

Tabel 3. Derajat kerusakan histopatologi hepar (Arman, 2021)

Skor/ Kerusakan	0	1	2	3	4
Kongesti	Tidak ditemukan kongesti (< 5% area jaringan menunjukkan kongesti)	Kongesti ringan (5%–25% area jaringan menunjukkan kongesti)	Kongesti sedang (26%–50% area jaringan menunjukkan kongesti)	Kongesti berat (> 50% area jaringan menunjukkan kongesti)	Kongesti sangat berat (> 75% area jaringan menunjukkan kongesti)
Vakuolisasi	Tidak ditemukan vakuolisasi (< 5% sel	Vakuolisasi (5%–25% sel menunjuk	Vakuolisasi (26%–50% sel menunjuk	Vakuolisasi (> 50% sel menunjuk	Vakuolisasi (> 75% area jaringan

	menunjukkan n vakuolisasi)	kan vakuolisa si)	kan vakuolisa si)	kan vakuolisa si)	menunjuk kan vakuolisa si)
Infiltrasi sel radang	Tidak ditemukan infiltrasi radang (< 5% area jaringan menunjukkan infiltrasi)	Infiltrasi ringan (5%–25% area jaringan menunjuk kan infiltrasi)	Infiltrasi sedang (26%– 50% area jaringan menunjuk kan infiltrasi)	Infiltrasi berat (51%– 75% area jaringan menunjuk kan infiltrasi)	Infiltrasi sangat berat (> 75% area jaringan menunjuk kan infiltrasi)
Nekrosis	Tidak ditemukan nekrosis (< 5% sel menunjukkan nekrosis)	Nekrosis ringan (5%–25% sel menunjuk kan nekrosis)	Nekrosis sedang (26%– 50% sel menunjuk kan nekrosis)	Nekrosis berat (> 50% sel menunjuk kan nekrosis)	Nekrosis sangat berat (> 75% area jaringan menunjuk kan nekrosis)

2.5 Teknik Analisis Data

Metode di tahap ini menjelaskan analisis mikroanatomi jantung dan hepar pada ikan *O. celebensis*. Untuk menganalisis perubahan yang terjadi pada jantung dan hepar setelah paparan stirena, digunakan analisis semi-kuantitatif dengan memberikan skor pada setiap lapang pandang.