

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di bulan Desember 2019 sampai dengan Januari 2020. Tempat penelitian di Laboratorium Universitas Muhammadiyah Gresik dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Tumbuhan Uji

Tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah tumbuhan Lamun *Halodule uninervis* dan *Cymodocea serrulata* yang berasal dari perairan yang berpotensi tercemar logam berat timbal (Pb). Setiap spesies terdiri dari dua individu sampel yang berpotensi sebagai ulangan sebanyak 12 individu. ditentukan masing-masing sebanyak 12 bagian.

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Alat dan Fungsinya

No.	Alat	Fungsinya
1.	Pisau bedah	Untuk memotong
2.	Cassette	Untuk tempat jaringan setelah dipotong
3.	<i>Tissue embedding</i>	Untuk menjaga bagian dari jaringan agar tidak berubah
4.	<i>Basemold</i>	Untuk membuat blok parafin
5.	Mikrotom	Untuk memotong tipis jaringan
6.	Mikroskop	Untuk mengamati jaringan

Tabel 2. Bahan dan Fungsinya

No.	Bahan	Fungsinya
1.	Lamun <i>Halodule uninervis</i>	Sebagai tumbuhan uji yang akan dianalisa
2.	Lamun <i>Cymodocea serrulata</i>	Sebagai tumbuhan uji yang akan dianalisa
3.	Formaldehyde 10%	Untuk mengawetkan jaringan
4.	Aquades	Untuk menempelkan preparat pada kaca
5.	Alcohol	Untuk menarik air yang ada pada jaringan
6.	Parafin cair	Untuk pembuatan blok preparat
7.	HE	Untuk memberi warna pada jaringan

3.4 Metode Penelitian

Penelitian menggunakan metode deskriptif kualitatif untuk menjelaskan objek yang diselidiki yaitu struktur Lamun *Halodule uninervis* dan *Cymodocea serrulata* yang berasal dari perairan tercemar. Terdiri dari 3 (tiga) bagian tubuh yaitu : akar, *rhizome* dan daun. Penyelidikan dikhususkan di bagian-bagian utama struktur akar, *rhizome* dan daun. Struktur yang diselidiki yaitu epidermis, korteks, endodermis pada bagian akar. Epidermis, korteks, kolenkim, sklerenkim, parenkim, xylem, floem dan endodermis pada bagian *Rhizome*. Epidermis, xylem, floem pada bagian daun. Di setiap struktur yang diidentifikasi bagian-bagian dan nama setiap bagian dengan mengacu literatur ilmiah baik buku teks maupun jurnal ilmiah terbaru. Setiap bagian-bagian struktur yang dianalisis perbedaan antara kedua jenis sampel yang dibandingkan, baik dengan pendekatan kuantitatif (*t-test*, $\alpha = 0,05$) maupun kualitatif.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Sediaan Histologis

Sediaan histologis dibuat dengan mengikuti acuan kerja yang ditetapkan oleh Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Cairan fiksatif yang digunakan untuk mengawetkan jaringan pada tumbuhan Lamun *Halodule uninervis* dan *Cymodocea serrulata* adalah larutan fiksatif formaldehyde 10%. Pemilihan jaringan (trimming), jaringan terfiksasi dipotong dengan pisau bedah yang tajam yang sudah disterilkan agar jaringan tidak mengalami kerusakan dalam proses pengerjaan. Setelah dilakukan proses trimming kemudian jaringan yang sudah dipotong akan dimasukkan ke dalam cassette. Cassette yang sudah berisi jaringan kemudian dilakukan perendaman dengan menggunakan aquades selama satu menit dengan tujuan untuk menghindari terjadinya pengkerutan pada jaringan akibat terlalu lama terkena udara. Dilakukan dehidrasi jaringan yang tujuannya untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang sudah difiksasi sehingga nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dapat dipakai untuk membuat zat prepat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok prepat. Setelah itu

dilakukan perendaman dengan menggunakan alcohol yang tujuannya untuk menarik air keluar dari sel/jaringan.

Pembuatan blok jaringan digunakan untuk menjaga bagian-bagian dari jaringan agar jaringan tidak berubah seperti pada kondisi tahap awal pemotongan dengan menggunakan alat yang disebut *tissue embedding*. Pembuatan blok parafin dengan menggunakan cetakan anti karat atau *basemold*, pada proses ini digunakan zat pembedam yaitu parafin cair panas dengan suhu 70°C.

Pengirisan jaringan adalah proses pemotongan blok jaringan dengan menggunakan mikrotom. Mikrotom adalah alat yang dipakai untuk memotong tipis suatu jaringan. Sampel jaringan berparafin bergerak maju secara manual menuju pisau sesuai dengan ketebalan irisan yang diinginkan. Hasil dari irisan jaringan ini berupa pita tipis yang irisan-irisan tipis ini akan membantu ketepatan dalam mendiagnosa.

Pewarnaan jaringan merupakan proses pemberian warna pada jaringan yang sudah dipotong sehingga jaringan dapat dianalisa dengan mudah. Pengamatan jaringan diamati dengan menggunakan mikroskop. Pewarna yang sering digunakan secara rutin adalah pewarna *hematoksilin eosin* (HE). Pada pewarna HE digunakan 2 (dua) macam zat warna yaitu hematoksilin yang berfungsi untuk mewarna sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta *cosin* yang merupakan *counterstaining*.

3.5.2 Pengamatan Preparat Histologis

Bagian histologis Lamun *Halodule uninervis* dan *Cymodocea serrulata* diperiksa di berbagai posisi untuk menentukan dasar seluler dari sel Lamun dengan jenis yang berbeda.

Setiap slide preparat histologis akar, *rhizome* dan daun di scan dengan menggunakan mikroskop scanning *dot slide* Olympus dan software OlyVIA. Hasil scanning diamati dengan Windows 10 untuk mengobservasi jaringan yang ada dalam jaringan akar, *rhizome* dan daun. Bagian-bagian jaringan diukur panjang/diameter/perimeter sub jaringan diukur menggunakan bantuan program *Image-J 1.5.5*. Data dianalisis menggunakan program *Microsoft Excel 2010*.

3.6 Variabel Penelitian

Sampel dianalisis aspek morfometrik epidermis, korteks, endodermis pada bagian akar. Epidermis, korteks, kolenkim, sklerenkim, parenkim, xylem, floem dan endodermis pada bagian *Rhizome*. Epidermis, xylem, floem pada bagian daun. Bagian yang diteliti akan diteliti menggunakan mikroskop untuk menentukan penebalan sel terhadap bagian akar, *rhizome* dan daun.

3.6.1 Epidermis

Menurut Waluyo (2006), jaringan epidermis adalah jaringan terluar yang ada pada tumbuhan yang meliputi dari akar, batang dan daun. Epidermis biasanya hanya meliputi selaput sel yang pipih dan rapat. Epidermis melindungi jaringan yang ada didalamnya serta digunakan sebagai tempat pertukaran zat. Jaringan epidermis dapat berkembang dan mengalami perubahan menjadi sel rambut akar, sel penutup pada stomata dan spina. Epidermis semacam kulit pada tubuh kita yang merupakan komponen perlindungan pertama untuk melawan kerusakan fisik dan organisme patogenik.

3.6.2 Korteks

Korteks adalah bagian terluar dari batang atau akar yang dibatasi dibagian luar epidermis dan bagian dalam endodermis. Sistem jaringan dasar pada korteks disusun oleh sel-sel parenkim. Jaringan korteks setiap individu menunjukkan adanya zat ergastik yang berupa kritas drus pada sel-sel parenkim korteks dan zat ergastik lainnya yang ditandai dengan warna yang lebih gelap dari sel-sel parenkim. Jaringan korteks tersusun atas sel-sel parenkim dengan berkas pembuluh yang tersebar di jaringan korteks (Nurhayati, 2016)

3.6.3 Kolenkim

Jaringan kolenkim adalah jaringan hidup yang mempunyai sifat seperti jaringan parenkim dan secara struktural dapat dianggap sebagai jaringan parenkim khusus yang membantu organ muda pada tumbuhan. Jika kolenkim dan parenkim letaknya berdampingan maka keduanya akan berbaaur menjadi bentuk transisi. Kemiripan antara kolenkim dan parenkim juga ditunjukkan dengan adanya

kloroplas pada kolenkim dan kemampuan kolenkim dalam melanjutkan aktivitas meristem (Joko Waluyo, 2006).

3.6.4 Sklerenkim

Jaringan sklerenkim tersusun atas sel-sel dengan dinding sekunder yang tebal. Jaringan sklerenkim berfungsi sebagai penyokong atau penguat dan biasanya juga sebagai pelindung. Sel sklerenkim dibagi menjadi dua, yaitu serabut sklerenkim dan sklereid. Serabut sklerenkim berbentuk panjang, ramping, berujung runcing dan memiliki dinding tipis yang bersifat elastis. Sifat elastis ini berfungsi bagi tumbuhan untuk kembali pada posisi yang semula ketika tumbuhan tersebut bergerak atau tertiuap angin. Sklereid adalah sel yang lebih pendek dibandingkan dengan serabut sklerenkim yang berfungsi dalam melindungi tumbuhan dari hewan herbivora. Sklereid berada pada daun, batang, buah dan biji (Waluyo, 2006).

3.6.5 Parenkim

Menurut Ariadi (2012), parenkim adalah jaringan dasar yang ditemukan hampir pada semua bagian organ pada tumbuhan. Jaringan parenkim dikatakan sebagai jaringan dasar karena, (1) menyusun sebagian besar jaringan yang ada pada akar, batang, daun, dan buah. (2) ada di antara jaringan lain, misalnya diantara xilem dan floem. (3) dapat ditemui sebagai selubung berkas pengangkut.

Jaringan parenkim dapat dibedakan dengan jaringan lain karena memiliki ciri-ciri yaitu, sel-selnya merupakan sel hidup yang ukurannya besar dan tipis, dan pada umumnya berbentuk segi enam, memiliki banyak vakuola, letak inti sel mendekati dasar sel, dapat bersifat embrional atau merismatik karena dapat membelah diri, dan memiliki ruang antar sel yang banyak sehingga letaknya tidak rapat (Ariadi, 2012).

3.6.6 Xylem

Xylem adalah jaringan campuran yang disusun dari beberapa jenis sel yang diantaranya meliputi pembuluh xylem dan trakeid xylem. Pembuluh xylem memiliki dinding yang tebal dan memiliki pola berkas yang spiral. Apabila sudah

berkembang maka semua pembuluh xylem akan melart dan protoplasmanya akan mati. Sedangkan trakeid xylem tidak memiliki berkas spiral dan ujung ujungnya meruncing. Ujung ujungnya ini berfungsi sebagai penutup dan saling berhubungan dengan noktah noktah. Jaringan xylem berfungsi untuk mengalirkan air dan mineral dari akar ke daun (Kimball, 2003).

3.6.7 Floem

Floem adalah jaringan yang kompleks. Floem berfungsi membawa makanan yang berupa zat organik dari suatu bagian yang lain pada tumbuhan. Floem tersusun atas bulu tapis yang berupa elemen pipa yang mempunyai lapisan yang rata pada ujungnya dan sel pengiring (Waluyo, 2006).

3.6.8 Endodermis

Endodermis merupakan lapisan pada korteks akar dengan sel-sel tebal yang membatasi korteks dengan stele yang berfungsi sebagai pembatas selektif yang mengatur masuknya bahan-bahan dari larutan tanah ke dalam jaringan pembuluh di dalam stele (Malak, 2017).

3.7 Analisis Data

Data perhitungan sel dan pengukuran ketebalan lapisan sel (Rerata \pm SD) dianalisis ragam akar, *rhizome*, daun dan nilai perimeter akar, *rhizome*, daun. Selanjutnya dilakukan penarikan kesimpulan menggunakan *t-test* ($Pvalue < 0,05$) untuk membedakan struktur histologis yang diselidikan antara Lamun *Halodule uninervis* dan *Cymodocea serrulata*. Struktur histologis yang tidak dapat dikuaktifikasi, dianalisis secara deskriptif kualitatif. Setiap anomali histologis yang ditemukan dalam sampel-sampel Lamun yang terpapar logam berat (Pb), yang berbeda dari Lamun yang tidak terpapar logam berat (Pb) dan berbeda dari literature terdahulu, ditabulasi dan dianalisis satu per satu dalam kaitannya dengan karakter anomali terpapar logam berat (Pb) yang sedang dipelajari.