

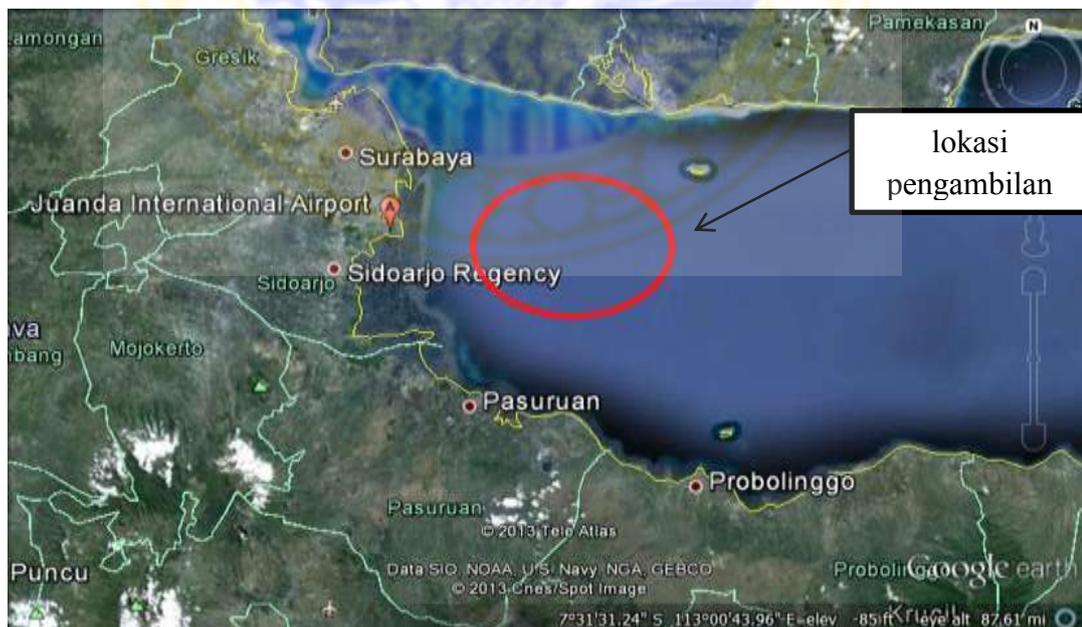
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1. Tempat dan waktu pengambilan sampel

Sampel *Phyllophorus dobsoni* yang berbentuk bulat (*spherical*) kadang-kadang memanjang dengan panjang antara 10-15 cm, tubuhnya bewarna coklat, kakinya pendek dan besar berbentuk tabung dan terdapat filamen (*papulae*) yang menutup tubuhnya (Anonimus, 2009) diambil dari daerah operasional nelayan mulai Pantai Timur Surabaya hingga kawasan Pasuruan (Gambar.3.1). Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Agustus, September, dan Oktober 2013.



Gambar 3.1. Lokasi pengambilan sampel *Phyllophorus dobsoni* Selat Madura (www.googleearth.com).

3.1.2. Tempat dan waktu pemrosesan sampel

Pemrosesan sampel dilaksanakan di Rumah Hewan Coba Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga sebagai tempat preparasi sampel, Laboratorium Histologi Hewan Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga sebagai tempat pembuatan sediaan histologi metode paraffin dan pengamatan histologi menggunakan mikroskop cahaya dan *Scanning Electron* Waktu penelitian dilakukan dari bulan Agustus 2013 sampai dengan bulan Desember 2014.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan penelitian:

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah sampel teripang *Phyllophorus dobsoni* segar sebanyak 51 individu, larutan fiksatif *neutral buffered formalin* (campuran 6,5 gr Na_2HPO_4 dan 4 gr NaH_2PO_4 dengan 900 ml akuades dan 100 ml formalin), akuades, etanol 70 %; etanol 80%, etanol 96%, etanol absolut, xylol, paraffin, pewarna hematoxylin dan pewarna eosin, kertas saring, kertas label, dan entellan.

3.2.2. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah botol vial tempat koleksi gonad, timbangan digital, penggaris, gelas ukur, gelas beaker, pipet, pinset, aspirator, mikrotom, mikroskop, kertas saring, aluminium foil, mikrofoto, jarum pentul, penggaris, silet, balok, kaset untuk tempat jaringan, *object glass*, *cover*

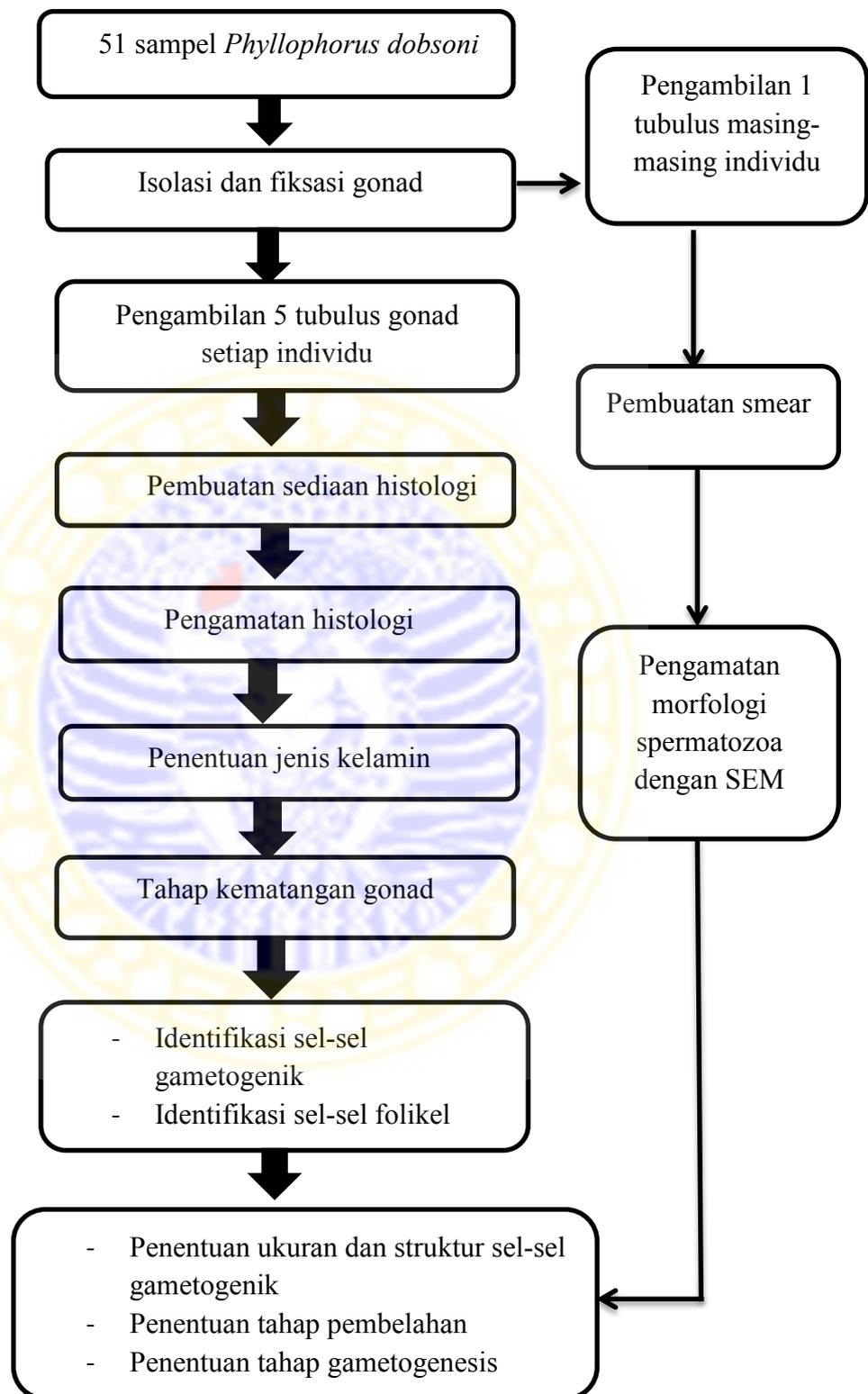
glass, ember, botol seri untuk etanol, botol seri untuk pewarnaan sediaan (*staining jar*), camera digital, *parafin bath*, holder, sarung tangan, nampan, alat bedah, gunting, oven, *Scanning Electron Microscope* Phenom (SEM).

3.3. Prosedur Penelitian

Skema prosedur penelitian akan digambarkan melalui kerangka operasional penelitian pada Gambar 3.2. Berikut ini penjelasan prosedur penelitian.

3.3.1. Tahap pengambilan sampel

Sampel diambil setiap sebulan sekali, selama bulan Agustus, September, Oktober 2013 tepatnya pada tanggal 21 Agustus 2013, 21 September 2013, dan 20 Oktober 2013. Pengambilan sampel dilakukan oleh nelayan di Laut Kenjeran dengan menggunakan alat dari besi seperti garpu yang ditenggelamkan ke dasar laut kemudian ditarik kembali. Setelah pengambilan sampel dilakukan pembedahan teripang untuk pengambilan gonad yang selanjutnya difiksasi dengan *neutral buffered formalin* sebelum dilakukan pembuatan sediaan gonad.



Gambar. 3.2. Kerangka operasional penelitian.

3.3.2. Tahap pembuatan sediaan gonad

Pembuatan sediaan gonad teripang *Phylloporus dobsoni* menggunakan metode paraffin dengan berbagai tahapan antara lain:

1. Tahap fiksasi

Gonad difiksasi menggunakan larutan fiksatif *neutral buffered formalin* dalam botol vial dengan kondisi terendam keseluruhan. Fiksasi dilakukan minimal 24 jam.

2. Tahap pencucian (*washing*)

Lima tubulus gonad yang telah difiksasi dalam botol vial dicuci dua kali menggunakan aquades selama 30 menit.

3. Tahap *processing*

Pada tahap ini gonad didehidrasi dengan perendaman etanol berseri yang terdiri atas 70% sebanyak 4 kali pengulangan, 4 kali selama 5 menit dengan pemberian eosin pada saat etanol 70% ulangan ke 3 dan ke 4 serta dimasukkan ke dalam aspirator, etanol 80% 2 kali, etanol 96 % 2 kali, etanol absolut selama 1 kali dimasukkan dalam aspirator, perendaman pada tiap larutan masing-masing selama 5 menit. Setelah dehidrasi selesai maka selanjutnya adalah proses penjernihan jaringan yang dilakukan dengan perendaman dalam xylol selama 2 kali masing-masing 15 menit.

4. Tahap infiltrasi

Pada tahapan ini tubulus yang dibungkus dalam kertas saring dan berada dalam kaset dimasukkan dalam *paraffin bath*. *Bath* pertama yang digunakan merupakan campuran parafin : xylol (1:1), jaringan direndam pada *bath* pertama

selama 15 menit. Selanjutnya jaringan direndam dalam parafin I, parafin II, dan parafin III masing-masing selama 30 menit.

5. Tahap penanaman (*embedding*)

Tahap ini jaringan yang telah selesai diinfiltrasi dikeluarkan dari kaset dan ditanam dalam cetakan yang berisi paraffin cair. Tubulus ditanam dalam paraffin dan ditata dengan tujuan pemotongan *cross section*. Blok paraffin didiamkan minimal 24 jam untuk pengerasan paraffin sehingga siap dipotong.

6. Tahap penempelan (*trimming*)

Blok paraffin ditempelkan pada *holder* yang telah disiapkan. Blok yang ditempel direkatkan dengan paraffin cair.

7. Tahap pemotongan (*sectioning*)

Sectioning dilakukan dengan mikrotom. Pita paraffin dipotong secara berseri sebanyak lima pita dengan ketebalan 4 μm dan jarak antar pita 40 μm . Pita ditempelkan pada *object glass* dengan *Mayer's albumin* sebagai perekat.

8. Tahap pewarnaan (*staining*)

Pewarnaan jaringan diawali dengan proses deparafinasi dalam xylol I dan II masing-masing 10 menit. Selanjutnya rehidrasi dengan etanol absolut, etanol 96%, etanol 80%, dan etanol 70% masing-masing 5 menit. Pewarnaan dalam hematoxylin selama 10 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan dimasukkan dalam etanol asam selama 30 detik. Setelah itu, pewarnaan dengan eosin selama 5 menit. Kemudian dehidrasi dengan etanol bertingkat dimulai dari etanol 70%, etanol 80%, etanol 96% dan etanol absolut masing-masing 5 menit,

dan dilanjutkan dalam xylol murni masing-masing selama 10 menit. Proses terakhir adalah penutupan dengan *cover glass* menggunakan perekat entellan.

Sementara itu, untuk pengamatan di *Scanning Electron Microscope* (SEM), pembuatan preparat dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

- a. Membuat smear di atas grid karbon.
- b. Preparat smear dikeringanginkan
- c. Diamati di bawah *Scanning Electron Microscope*.

3.3.3. Tahap pengamatan histologi gonad secara mikroskopis

Pengamatan sediaan histologi gonad dilakukan secara mikroskopis menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40, 100, 400, dan 1000 kali. Sediaan histologi yang diamati adalah sel oogenik dan spermatogenik yang terlihat jelas strukturnya. Pengamatan ini dilakukan untuk mengamati struktur sel gametogenik jantan maupun betina meliputi ukuran sel gamet, tebal tipisnya oolema, *granula yolk*, sel folikel, vesikel germinal, *jelly layer*, dan kromatin, untuk morfologi spermatozoa dan dinding tubulus diamati di bawah SEM sehingga dapat ditentukan tahap pembelahan dan tahap gametogenesis.

3.4. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasi analitik yang dilakukan dengan cara pengamatan langsung tanpa adanya perlakuan sampel. Sampel diambil di Selat Madura, selanjutnya dilakukan pengamatan histologi gonad teripang dan menganalisis dengan uji statistik.

3.5. Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diamati dalam penelitian ini adalah jenis kelamin, jenis sel gamet, ukuran dan struktur sel gamet, tahap pembelahan sel gamet dalam tubulus gonad..

3.6. Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif, analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menganalisis kisaran dan bentuk sel gametogenik dalam tiap tahap perkembangan sel gametogenik dan disajikan dalam bentuk grafik.
2. Menganalisis perubahan sel oogenik dan sel spermatogenik pada tiap tahap perkembangan dan menggunakannya untuk memprediksi gametogenesis di dalam tubulus.
3. Menganalisis perbedaan diameter sel, diameter inti, tebal jelly layer, dan diameter kromati setiap jenis oosit di berbagai tahap kematangan gonad dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui normalitas data dan untuk mengetahui homogenitas data maka dianalisis menggunakan *Homogeneity of Variances*. Data yang berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji Anova. Data yang berdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Brown Forsythe*. Hasil analisis Anova yang menunjukkan nilai $p < 0,05$, dilanjutkan dengan menggunakan uji *post hoc* yaitu *Duncan*.