

Pemanfaatan Asam Nitrat Sebagai Larutan Pelunak Organ Tumbuhan pada Metode Parafin

Arman Faluti^{1,*}, Vivi Mardawati¹, Fatmawilda²

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau, Kampus Binawidya Jl. HR. Soebrantas KM. 12,5 Pekanbaru 28293, Riau

²Prodi Biologi FKIP Universitas Riau, Kampus Binawidya, Jl. HR. Soebrantas KM. 12,5 Pekanbaru 28293, Riau

*Correspondence author: arman.faluti@staff.unri.ac.id

Submisi: 27 Oktober 2022; Penerimaan: 9 Desember 2022

ABSTRAK

Metode parafin merupakan cara pembuatan preparat permanen dengan menggunakan parafin sebagai media embedding pada organ yang relatif berukuran kecil dan lunak yang diiris dengan ketebalan kurang lebih 6-8 mikron. Sampel yang keras seperti ranting perlu dilakukan proses pelunakan terlebih dahulu agar bagian organ tersebut dapat dipotong dengan mikrotom putar. Asam nitrat sudah digunakan pada beberapa penelitian diantaranya untuk melunakkan tulang pipa tikus. Organ ranting Bougainvillea yang keras direndam dalam asam nitrat selama 24 jam pada berbagai konsentrasi. Tujuan penelitian menguji kemampuan asam nitrat pada berbagai konsentrasi dalam melunakkan organ ranting Bougainvillea serta mengevaluasi irisan dan hasil preparat. Tahapan dalam pembuatan preparat awetan metode parafin adalah: pengambilan organ, fiksasi, perlakuan perendaman asam nitrat selama 24 jam, pencucian (washing), dehidrasi, penjernihan (clearing), infiltrasi, embedding, pengirisan (sectioning), penempelan (affixing) dan pewarnaan (staining). Pita parafin pada perlakuan asam nitrat 0% hampir seluruh bagian preparat pecah, diikuti pada perlakuan 10% dan 15% masing-masing kurang dari setengah sampai seperempat bagian pecah, sedangkan pada perlakuan 20% preparat relatif utuh. Preparat yang sudah diwarnai dengan safranin 1% pada perlakuan perendaman asam nitrat 20% relatif utuh, hanya sebagian kecil (kurang dari 5%) pada bagian kulit kayu dan empulur tidak utuh. Kesimpulan dari penelitian ini penggunaan asam nitrat 20% dapat digunakan untuk melunakkan ranting Bougainvillea pada metode parafin

Kata kunci: asam nitrat; Bougainvillea; metode parafin; pelunakan

PENDAHULUAN

Mikroteknik merupakan teknik pembuatan preparat tumbuhan maupun hewan secara mikroskopis yang bertujuan mempermudah pengamatan bagian tumbuhan dan hewan dengan menggunakan mikroskop (Gunawan, 2019). Preparat berukuran kecil, tipis dan transparan sehingga dapat ditembus oleh cahaya. Untuk memperoleh preparat tersebut dapat dibuat dengan beberapa macam metode, salah satu

metode membuat preparat adalah metode parafin (Iriani dan Yusfiati, 2015). Metode parafin merupakan cara pembuatan preparat permanen dengan menggunakan parafin sebagai media embedding dan diris dengan ketebalan kurang lebih 6-8 mikron (Sudiana, 2005). Pembuatan preparat metode parafin melalui beberapa tahapan proses yaitu: fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi, deparafinisasi, pewarnaan mounting atau penutupan (Harijati et al, 2017)



Gambar 1. Pita parafin dengan penampang melintang organ yang pecah (tanda panah kuning : irisan organ yang pecah)

Adapun organ yang digunakan pada metode parafin, umumnya berukuran kecil dan lunak. Namun beberapa organ yang digunakan bersifat keras misal tulang hewan serta bersifat keras dan berkayu, misal organ ranting. Rakhmawati et al. (2019) menggunakan larutan ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) 10% (pH 7,4), EDTA 10% + TBD-1 dan asam nitrat 10% dalam proses dekalsifikasi os tibia domba Garut. Hasil penelitian menunjukkan larutan EDTA 10% (pH 7.4) merupakan larutan dekalsifikasi terbaik untuk condylus lateralis dari os tibia domba Garut. Selain itu penggunaan asam nitrat dalam proses dekalsifikasi tulang tikus telah dilakukan oleh Dewi et al. (2020). Jaringan tulang pipa tikus putih jantan dengan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) didekalsifikasi dengan larutan asam nitrat 3% dan 10%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa larutan asam nitrat 10% lebih cepat melunakkan jaringan tulang pipa tikus dibandingkan dengan asam nitrat 3%.

Beberapa penelitian pada organ tumbuhan terkendala dalam pembuatan preparat diantaranya pada organ ranting, ranting dan tangkai daun yang bersifat keras. Pada organ ranting yang dibuat dengan metode parafin, blok parafin pada saat pengirisan dengan mikrotom hasilnya tidak utuh dan pecah (Gambar 1).

Asam nitrat (HNO_3) merupakan suatu larutan yang bersifat korosif (Septiani et al, 2018), pada konsentrasi yang tinggi dapat menghancurkan benda padat termasuk besi. Asam nitrat

merupakan asam kuat, sangat larut dalam air dan merupakan oksidator yang kuat. Dikarenakan sifatnya sebagai pengoksidasi, HNO_3 tidak selalu bereaksi seperti asam pada umumnya. Berdasarkan penelitian Dewi et al. (2020) yang menggunakan asam nitrat untuk melunakkan tulang pipa tikus maka dilakukan penelitian penggunaan asam nitrat untuk melunakkan organ ranting *Bougainvillea*. Pemilihan organ ranting *Bougainvillea* dikarenakan tumbuhan ini mempunyai struktur batang berkayu keras (Sinaga, 2017). Adapun tujuan dari penelitian ini adalah menguji kemampuan asam nitrat pada berbagai konsentrasi dalam melunakkan organ ranting *Bougainvillea* dan mengevaluasi irisan dan hasil preparat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikroteknik Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau. Cara kerja pembuatan preparat awetan ini pada penelitian ini mengacu pada metode Johansen (1940).

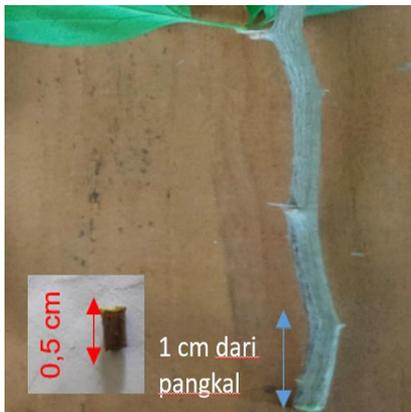
Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah mikrotom putar seri Microm HM 310 (Thermo scientific, USA), High Temperature Oil Bath Model WHB (Daihan, Korsel), drying oven Digitheat-TFT series, coplin's jar, mikroskop Olympus CX-23 (Olympus, Jepang), kamera OptiLab (Miconos,

Indonesia). Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah paraffin pastilles 56-58 histology (Merck), etanol (Merck), pewarna safranin 1% (Merck), xilol (Merck), alkohol 96% (Brataco), asam nitrat (Merck) 10%, 15%, 20%, dan ranting Bougainvillea.

Persiapan sampel

Sampel tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ranting bunga kertas (*Bougainvillea*). Ranting bunga kertas diambil 1 cm dari pangkal ranting (Gambar 2), kemudian dipotong menjadi 0,5 cm. Potongan ranting difiksasi dalam larutan FAA (formalin, asam asetat, alkohol) selama 24 jam. Cuci sampel dengan air mengalir selama 15 menit, lalu rendam didalam larutan HNO₃ dengan konsentrasi 0%, 10%, 15% dan 20% selama 24 jam.



Gambar 2. Sampel ranting ranting *Bougainvillea*

Proses dehidrasi, penjernihan (*clearing*)

Sampel direndam dalam alkohol bertingkat (konsentrasi 30%, 50%, 70%, 95% dan 100%) masing-masing selama 30 menit. Kemudian direndam dalam larutan alkohol : xilol dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3, selanjutnya dimasukkan kedalam (xilol 1 dan xilol 2) selama 30 menit.

Proses infiltrasi dan penanaman (*embedding*)

Sampel direndam (infiltrasi) dalam cairan campuran parafin : xilol dengan perbandingan 9:1 selama 24 jam. Kemudian campuran parafin : xilol diganti dengan parafin baru dalam *oil bath* suhu 58 °C selama 24 jam, kemudian diganti parafin baru, kemudian dilakukan proses penanaman (*embedding*) dengan cara memasukkan potongan sampel kedalam blok cetakan yang berisi cairan parafin dan biarkan parafin beku menjadi blok parafin.

Proses pemotongan (*sectioning*) dan penempelan (*affixing*)

Blok parafin dipotong melintang dengan ukuran ketebalan 6 mikron menggunakan mikrotom putar (*rotary microtome*). Potongan pita parafin yang dihasilkan ditempelkan pada kaca objek (*affixing*) dan di panaskan di dalam oven pada suhu 40 °C.

Proses pewarnaan (*staining*) dan proses *mounting*

Pewarna yang digunakan adalah safranin 1%. Sampel yang telah ditempelkan pada gelas objek direndam berturut-turut kedalam larutan xilol (xilol 1 dan xilol 2) selama 5 menit, alkohol bertingkat (100%, 95%, 70%, 50% dan 30%) selama 3 menit, aquadest 3 menit, pewarna safranin 45 menit, aquades 3 menit, alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 95% dan 100%) selama 3 menit, campuran alkohol: xilol 3:1, 1:1, 1:3, kemudian larutan xilol (Xilol I dan xilol II) selama 5 menit. Selanjutnya preparat ditetesi entelan dan ditutup dengan kaca penutup.

Pengamatan

Preparat awetan yang dihasilkan diamati dan difoto dengan mikroskop Olympus CX-23.

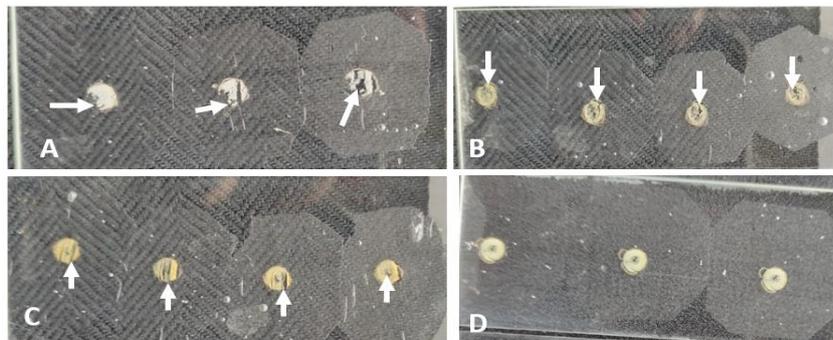
Analisis data

Data kualitas pelunakan organ ranting *Bougainvillea* dievaluasi dengan kriteria: pecah hampir seluruh bagian, pecah kurang dari setengah bagian, pecah kurang dari seperempat bagian, dan relatif utuh (Tabel 1). Selain itu juga dievaluasi proses pewarnaan dengan kriteria: lepasnya preparat pada proses pewarnaan (banyak dan sedikit yang lepas). Parameter yang diamati meliputi keutuhan irisan blok parafin, keutuhan struktur penampang melintang ranting *Bougainvillea* yang meliputi jaringan dermal, jaringan dasar dan jaringan pembuluh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perendaman ranting *Bougainvillea* dengan asam nitrat dilakukan selama 24 jam pada empat konsentrasi yang berbeda (0%, 10%, 15%, dan 20%) diperoleh hasil potongan parafin yang berbeda. Ranting

Bougainvillea yang tidak direndam dalam asam nitrat, hampir seluruh bagian irisan pecah (Gambar 3A). Hal ini diduga sampel ranting yang bersifat keras tidak sama kekerasannya dengan parafin dan prose infiltrasi parafin tidak maksimal, sehingga pada saat dipotong bagian organnya banyak yang pecah. Perendaman dalam asam nitrat konsentrasi 10% bagian yang pecah relatif berkurang, kurang dari setengah bagian pecah (Gambar 3B). Asam nitrat konsentrasi 10% dalam melunakkan ranting *Bougainvillea* mulai berperan. Ranting menjadi lebih lunak sehingga proses infiltrasi dengan parafin dapat berlangsung lebih baik jika dibandingkan dengan ranting tanpa perendaman dalam asam nitrat. Begitu pula jika konsentrasi asam nitrat ditingkatkan menjadi 15% (Gambar 3C) dan 20% (Gambar 3D). Irisan ranting yang direndam dalam asam nitrat 20% relatif lebih utuh jika dibandingkan dengan yang direndam dalam asam nitrat 15%.



Gambar 3. Pita parafin penampang melintang ranting *Bougainvillea* pada perendaman asam nitrat selama 24 jam pada konsentrasi A. 0%, B. 10%, C.15%, D. 20% (tanda panah putih: irisan organ yang pecah)

Tabel 1. Penilaian keutuhan irisan ranting *Bougainvillea* yang direndam dalam asam nitrat

Konsentrasi perendaman asam nitrat selama 24 jam	Keutuhan irisan
0%	Pecah hampir seluruh bagian
10%	Pecah kurang dari setengah bagian
15%	Pecah kurang dari seperempat bagian
20%	Relatif Utuh

Penggunaan asam nitrat sudah dilakukan untuk dekalsifikasi pada tulang pipa tikus. Menurut Dewi *et al.* (2020), kelunakan tulang pipa tikus menggunakan larutan dekalsifikasi asam nitrat 3% lebih rendah dibandingkan dengan asam nitrat 10%. Namun kualitas preparat jaringan tulang pipa tikus menggunakan larutan dekalsifikasi asam nitrat 3% lebih tinggi dibandingkan dengan asam nitrat 10%. Larutan asam nitrat 10% sudah melewati batas endopoin. Endopoin merupakan batas maksimal larutan melakukan proses dekalsifikasi. Adanya pelampauan batas endopoin menyebabkan jaringan disekitarnya menjadi tidak dapat diamati. Perendaman jaringan pada larutan asam nitrat 10% apabila melebihi waktu akan menyebabkan jaringan tulang menjadi rusak.

Penggunaan asam nitrat untuk melunakkan organ tumbuhan ternyata bisa juga dilakukan. Hal ini dapat dilihat bahwa pada perendaman ranting *Bougainvillea* pada konsentrasi 20% selama 24 jam irisan rantingnya relatif utuh jika dibandingkan konsentrasi 15% dan 10%. Konsentrasi asam nitrat dalam melunakkan ranting *Bougainvillea* berbeda dengan untuk melunakkan tulang pipa tikus. Konsentrasi asam nitrat 10% sudah mampu melunakkan tulang pipa tikus sampai batas endopoin. Tentunya struktur tulang pipa tikus berbeda dengan struktur ranting *Bougainvillea*. Struktur ranting *Bougainvillea* dengan sistem pembuluh yang tersusun atas xilem dengan komponen utamanya dinding sekunder yang tersusun atas unsur lignin. Lignin merupakan komponen utama penyusun dinding sel kayu, kedua terbanyak setelah selulosa. Lignin terdapat diantara sel-sel yang berfungsi sebagai perekat untuk mengikat sel-sel bersama-sama, dan didalam dinding sel yang seringkali

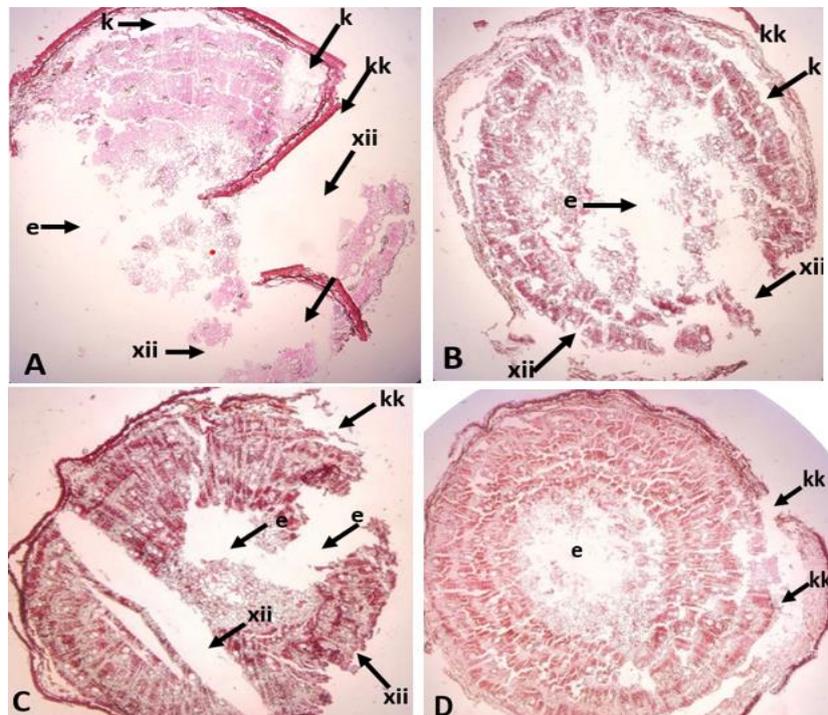
berasosiasi dengan selulosa untuk memberikan ketegaran pada sel. Menurut Lempang (2016), lignin pada kayu berperan sebagai pengikat antara individu sel kayu. Kadar lignin kayu (25-30%) yang terdapat di antara sel dan di dalam sel menyebabkan kayu menjadi keras dan kaku sehingga mampu menahan tekanan mekanis. Irisan ranting *Bougainvillea* yang direndam dalam asam nitrat 20% relatif lebih utuh dari pada konsentrasi asam nitrat yang lebih rendah (Gambar 3D, C, B, dan A).

Setelah dilakukan proses pewarnaan dengan safranin 1% dalam air, preparat yang direndam dengan asam nitrat 20% relatif utuh (Gambar 4D), walau ada beberapa bagian dari kulit kayu (kk) dan empulur (e) yang terpisah. Hal ini diduga pada saat *embedding*, pengaturan sampel pada media *embedding* menggunakan pinset sehingga kulit kayu yang sudah lunak menjadi terpisah dengan kayunya karena ada tekanan dari pinset pada saat pengaturan sampel pada media *embedding*. Hasil evaluasi bagian-bagian jaringan ranting *Bougainvillea* yang direndam dalam berbagai konsentrasi asam nitrat disajikan pada Tabel 2.

Hasil pengamatan pada ranting yang direndam dalam asam nitrat 15% pada saat proses pewarnaan banyak yang lepas dari gelas obyeknya, sedangkan pada perlakuan yang lain tidak. Diduga pada perlakuan ini komponen xilem sekunder lignin sulit menempel pada kaca obyek karena xilem sekunder komponen utamanya lignin yang bersifat keras. Pada perlakuan perendaman dengan asam nitrat pada konsentrasi 0%, 10%, 15% dan 20% tingkat keutuhan preparat semakin banyak (Tabel 2 dan Gambar 4C,B,A).

Tabel 2. Penilaian keutuhan irisan ranting *Bougainvillea* yang direndam dalam asam nitrat setelah diwarnai dengan safranin 1% dalam air

Konsentrasi perendaman asam nitrat selama 24 jam	Bagian-bagian jaringan yang tidak utuh
0%	Sebagian besar kulit kayu, korteks, xilem sekunder, dan empulur (>70%)
10%	Sebagian kulit kayu, korteks, xilem sekunder, dan empulur (<45%)
15%	Sebagian kulit kayu, korteks, xilem sekunder, dan empulur (<20%)
20%	Sebagian kecil kulit kayu dan empulur (<5%)



Keterangan: e=empulur; k=korteks ; kk=kulit kayu ; xii =xilem sekunder

Gambar 4. Penampang melintang ranting *Bougainvillea* yang berasal dari

- A. Ranting yang tidak direndam asam nitrat
- B. Ranting yang direndam dalam asam nitrat 10%
- C. Ranting yang direndam dalam asam nitrat 15%
- D. Ranting yang direndam dalam asam nitrat 20%

Hal ini sesuai dengan penelitian Dewi *et al.* (2020) kelunakan tulang pipa tikus menggunakan larutan dekalsifikasi asam nitrat 3% lebih rendah dibandingkan dengan asam nitrat 10%. Dengan meningkatnya konsentrasi asam nitrat kelunakan tulang pipa tikus semakin tinggi.

PENUTUP

Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah organ ranting *Bougainvillea* dapat dilunakkan dengan larutan asam nitrat 20% pada pembuatan preparat permanen dengan metode parafin. Dimana pada perendaman asam nitrat

20% preparat permanen yang dihasilkan relatif utuh.

Saran

Perlu dilakukan evaluasi lebih lanjut penggunaan pinset dalam proses *embedding* pada organ yang sudah dilunakkan dengan asam nitrat. Selain itu penggunaan asam nitrat dalam melunakkan ranting perlu diuji pada organ lain yang bersifat keras dan berkayu.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPMP Universitas Riau yang telah mendanai sepenuhnya penelitian ini melalui Hibah Penelitian Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) Program AKSI ADB.

DAFTAR PUSTAKA

- Dewi, Y.R. Nuroini, F. Iswara, A. 2020. Perbedaan kualitas jaringan tulang pipa tikus menggunakan larutan dekalsifikasi asam nitrat 3% dan asam nitrat 10% dengan pengecatan HE. *Jurnal Labora Medika* vol 4 hal. 6-11
- Gunawan, D.L.N. 2019. Kualitas Preparat Organ Tanaman apel (*Malus dosmetica*) dengan Pewarna Alami ekstrak pinang (*areca cateche* L.) Sebagai Sumber Belajar Biologi SMA. Skripsi, Universitas Muhammadiyah Malang
- Harijati, N. Samino, S. Indriyani, S. Soewondo, A. 2017. *Mikroteknik Dasar*, UB Press
- Iriani, D. dan Yusfiati. 2015. *Buku Ajar Mikroteknik*. UR Press
- Johansen D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc. New York dan London
- Lempang, M. 2016. Pemanfaatan Lignin Sebagai Bahan Perekat Kayu. *Info Teknis EBONI* Vol. 13 No. 2 : 139 – 150
- Rakhmawati. H. Situmeang, A. Nurhidayat, Lubis AMA, Murti H., Boediono A . 2019. Efektivitas Larutan Dekalsifikasi pada *Os tibia* Domba Garut (*Ovis aries*). *Jurnal Veteriner*. Vol. 20 No. 3 : 403-408
- Septiani, M. Santoso, K. Majid, A.R. Efektivitas Asam Nitrat (HNO₃) sebagai pelarut alternatif pada proses *acid wash* terhadap *plate electrolyzer* di PT. Kaltim Nitrate Indonesia. *Journal of Chemical Process Engineering*. 2018 Vol. 3, No. 2.
- Sinaga, S.D. 2017. Air Kelapa dan Perendaman Ekstrak Bawang Merah Berpengaruh Terhadap Pertumbuhan Stek Bunga Kertas (*Bougainvillea spectabilis*). Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
- Sudiana, K. I. 2005. *Teknologi Ilmu Jaringan dan Imunohistokimia*. Jakarta: CV.Sagung Seto