

## TEKNIK MENCAMPUR LARUTAN FIKSASI UNTUK HISTOLOGI

Mujimin dan Sri Suratmi

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut  
Jl. Br. Gondol Kec. Gerokgak Kab. Buleleng, Kotak Pos 140, Singaraja, Bali 81101

### ABSTRAK

Fiksasi merupakan salah satu bagian dalam metode histologi. Fiksasi adalah pemberian perlakuan tertentu terhadap elemen-elemen jaringan, terutama inti sel atau nukleusnya, sehingga dapat diawetkan dalam kondisi yang sedikit banyak mendekati keadaan aslinya. Tujuan percobaan ini adalah untuk mengetahui teknik mencampur larutan fiksasi yang digunakan untuk mengawetkan organ/jaringan ikan. Larutan fiksasi yang digunakan terdiri atas formalin 10% dalam air laut, *buffer* formalin, larutan *bouins*, formalin 5%. Sedangkan bahan yang dipakai adalah formalin 37%-40% sebagai bahan utama dalam membuat larutan fiksasi, air laut, *aquadest*, natrium difosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), natrium fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), *picric acid*, *glacial acetic acid*. Larutan dibuat dengan mencampur bahan-bahan tadi sesuai dengan larutan yang diinginkan. Dari hasil perlakuan fiksasi menunjukkan bahwa formalin 10% lebih baik untuk fiksasi gonad dan untuk dibawa *sampling* ke daerah karena lautan tersebut dapat dibuat di lokasi pengambilan sampel. Larutan *bouins* baik untuk fiksasi larva dan semua organ dikarenakan dalam melakukan pemblokkan dan pematangan sampel yang difiksasi dengan larutan *bouins* berwarna kuning dan lautan ini juga mengandung bahan asam sebagai bahan pelunak (dekalsifikasi) jaringan keras. Larutan *buffer* formalin baik digunakan untuk semua organ/jaringan. Sedangkan larutan formalin 5% baik digunakan untuk larva umur 1-10 hari, akan tetapi kurang baik digunakan untuk organ/jaringan dengan tujuan melihat perubahan histopatologisnya.

**KATA KUNCI:** histologi, larutan fiksasi, teknik

### PENDAHULUAN

Histologi adalah bidang biologi yang mempelajari tentang struktur jaringan secara detail menggunakan mikroskop pada sediaan jaringan yang dipotong tipis. Histologi dapat juga disebut sebagai ilmu anatomi mikroskopis. Proses/langkah pertama dalam menyiapkan materi segar untuk pembuatan sediaan histologi adalah fiksasi. Fiksasi merupakan langkah yang penting dalam pembuatan sediaan utuh maupun sayatan. Menurut Gunarsa (1989), fiksasi adalah memberikan perlakuan tertentu terhadap elemen-elemen jaringan, terutama inti sel atau nukleusnya, sehingga dapat diawetkan dalam kondisi yang sedikit banyak mendekati keadaan aslinya. Tujuan dari fiksasi adalah untuk mempertahankan elemen-elemen sel atau jaringan agar tetap pada tempatnya dan tidak mengalami perubahan bentuk maupun ukuran. Sedangkan fungsi dari fiksasi adalah untuk menghambat proses metabolisme dengan

cepat, mengawetkan elemen sitologis dan histologis, mengawetkan bentuk yang sebenarnya, serta mengeraskan atau memberi konsentrasi material yang lemah (Mahardika *et al.*, 2000).

Sampel yang diambil adalah sampel yang sakit tapi belum mati, merupakan contoh terbaik untuk diagnosa. Sampel yang sudah mati biasanya sudah terkontaminasi oleh mikroorganisme dan sulit untuk mengetahui parasit eksternal karena parasit tersebut biasanya sudah meninggalkan sampel tersebut dan jaringannya sudah rusak (autolisa). Oleh karena itu, sampel yang sudah mati tidak baik digunakan untuk pengamatan secara histologi (Sutarmat *et al.*, 2003).

Menurut Widiadnyana *et al.* (2004), formalin yang dinetralkan dapat memberikan pengawetan yang baik, terutama sampel-sampel yang bersifat penting. Namun sedikit memberikan efek negatif terhadap sel meskipun tidak merusak sel. Untuk itu, pembuatan

larutan formalin yang akan digunakan sebagai bahan pengawet harus tepat sebab kualitas formalin dapat memengaruhi ketahanan dan bentuk sel.

Dalam bidang perikanan, pengamatan secara histologi dipandang penting untuk mengamati perkembangan dan perubahan dari organ/jaringan/sel ikan, krustase, kekerangan, dan produk perikanan lainnya. Pada percobaan ini dilakukan pembuatan beberapa bahan fiksasi untuk mengawetkan organ/jaringan ikan dengan tujuan untuk mengetahui teknik mencampur larutan tersebut dan keuntungannya.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang dipakai dalam pembuatan larutan fiksasi terdiri atas:

- ❖ Formalin 37%-40% sebagai bahan utama dalam membuat larutan fiksasi
- ❖ Air laut
- ❖ Aquades
- ❖ Natrium difosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- ❖ Natrium fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- ❖ *Picric acid* (asam pikrat)
- ❖ *Glacial acetic acid*

### Metode

Pembuatan larutan fiksasi yang biasa digunakan untuk mengawetkan sampel terdiri atas:

#### Larutan Formalin 10% dalam Air Laut atau Aquades

Larutan ini digunakan untuk fiksasi gonad, organ dalam yang lunak dari yuwana ikan, larutan ini praktis mudah dibuat dalam keadaan mendesak. Sedangkan cara membuatnya adalah formalin 37%-40% sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan 10 mL air laut lalu ditambahkan 80 mL aquades dalam 100 mL.

#### Larutan *buffer* Formalin 10%

Pada prinsipnya kegunaannya hampir sama dengan formalin 10% tapi larutan ini berpenyanga fosfat yaitu untuk fiksasi gonad, organ-organ dalam yang lunak dari yuwana. Sampel atau jaringan dapat disimpan dalam larutan ini dalam jangka waktu yang lama, cara

pembuatan yaitu: timbang natrium difosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) sebanyak 4,0 g dan natrium fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) sebanyak 6,5 g; kemudian dimasukkan ke dalam *beacker glass* dan ditambah aquades sebanyak 400 mL, diaduk, dan dipanaskan dengan tujuan supaya cepat larut, lalu ditambahkan formalin 37%-40% sebanyak 100 mL; aquades sebanyak 500 mL. Larutan tersebut diaduk kembali agar homogen dan ditambahkan lagi aquades sampai volume 1 L.

#### Larutan Formalin 5% dalam Aquades atau Air Laut

Larutan ini digunakan untuk fiksasi larva dari D-0 sampai dengan D-10, hasilnya lebih baik bila dibandingkan dengan larutan fiksasi lain. Cara mencampur larutan adalah: formalin 37%-40% sebanyak 5 mL ditambahkan dengan aquades 80 mL, untuk formalin 5% air laut aquades-nya diganti dengan air laut.

#### Larutan *Bouins*

Larutan *bouins* ini berwarna kuning karena terdapat bahan kimia *picric acid*, digunakan untuk fiksasi gonad, insang, dan tulang. Larutan ini dapat juga digunakan untuk fiksasi larva. Untuk fiksasi larva umur 1-10 hari dengan lama perendaman selama 2 jam, kemudian larutan diganti dengan alkohol 50% selama 2 jam, alkohol 70% lamanya 2 jam, dan dipindahkan ke alkohol 90% selama 2 jam, serta terakhir ke *absolut* alkohol dan disimpan di dalam *freezer*. Menurut Panigoro *et al.* (2007), fiksasi *bouins* biasanya selama 24 jam, apabila sampelnya kecil dapat difiksasi dalam 2-3 jam kemudian dipindahkan ke alkohol 50% dengan tujuan untuk menghilangkan *picric acid* dan disimpan dalam alkohol 70%.

Cara pembuatan larutan: *picric acid* diencerkan dengan aquades agar warna larutan kuning bening (bahan *picric acid* sudah mengendap), kemudian diambil sebanyak 75 mL ditambahkan dengan formalin 37%-40% sebanyak 25 mL terakhir dicampurkan *glacial acetic acid* 5 mL. Apabila larutan *picric acid* terlalu pekat hasilnya kurang bagus, peng-uapan *picric acid* juga sangat berbahaya.

## HASIL DAN BAHASAN

Dari beberapa larutan fiksasi yang telah dijelaskan di atas, larutan formalin 10% yang paling sering digunakan dikarenakan bahannya mudah didapat dan campuran larutan ini sangat sederhana. Larutan ini biasanya dipakai

jika melakukan survei ke daerah yang jauh dengan jumlah sampel yang banyak. Larutan ini juga bisa dibuat di tempat lokasi kerja atau di tempat *sampling*.

Larutan *buffer* formalin 10% digunakan untuk memfiksasi semua jenis organ/jaringan. Larutan ini umum digunakan dan menjadi larutan fiksasi standar dalam bidang histologi maupun histopatologi. Hal tersebut dikarenakan larutan ini mengandung bahan penyangga sehingga lebih dapat memberikan efek fiksasi atau pengawet. Akan tetapi campuran larutan ini lebih banyak bahannya sehingga diperlukan tempat atau laboratorium untuk melakukannya. Oleh karena itu, larutan ini sering digunakan di laboratorium atau untuk dibawa ke tempat/daerah untuk *sampling* dalam jumlah/volume sedikit. Biasanya larutan ini digunakan untuk mengganti larutan formalin 10% yang dipakai bahan fiksasi sewaktu *sampling* ke daerah-daerah dengan tujuan untuk menyegarkan pengawetan (*refresh*) agar hasil histologinya lebih baik.

Larutan formalin 5% biasanya dipakai untuk fiksasi larva, bisa juga untuk fiksasi yang lain, larutan ini harus selalu tersedia di laboratorium. Apabila untuk fiksasi larva, hasil histologi *preparat* lebih baik dari fiksasi lain. Akan tetapi, larutan ini kurang baik digunakan untuk mengawetkan organ/jaringan dalam waktu lama terutama untuk tujuan melihat perubahan organ/jaringan (histopatologi). Selain itu, dalam melakukan pemotongan (*cutting*) dari blok *preparat* hasil fiksasi larva (D-1-D-10) dengan larutan ini harus lebih hati-hati karena sampel larva hampir tidak terlihat (transparan) dikarenakan warna sampel dengan parafin sama putihnya.

Larutan *bouins* merupakan larutan fiksasi yang sekaligus mengandung senyawa asam yang berfungsi untuk melunakkan (dekalsifikasi) jaringan keras seperti tulang, sirip, dan lainnya. Larutan ini lebih banyak digunakan untuk mengawetkan larva karena berwarna kekuning-kuningan, sehingga dalam proses histologi selanjutnya terutama proses pengeblokan dan pemotongan lebih mudah.

Dalam memfiksasi suatu organ/jaringan, perlu diperhatikan perbandingan antara larutan dengan organ sampel. Perbandingan larutan dan organ sampel yang baik adalah 1:10-20. Sampel yang berukuran besar atau yuwana sebelum dimasukkan ke dalam wadah larutan fiksasi bagian perut harus dibelah untuk memudahkan penetrasi atau masuknya

bahan pengawet. Ukuran organ untuk fiksasi akan lebih baik jika organ berukuran kecil dan dipotong tipis untuk memberi peluang bahan fiksasi dapat meresap ke semua bagian organ. Jika organ atau ikan utuh yang difiksasi memerlukan waktu yang lebih lama (> 1 minggu) dibandingkan dengan organ ukuran kecil atau dipotong kecil-kecil dan tipis. Pemotongan organ juga disesuaikan dengan cetakan *blocking* yang akan digunakan agar sesuai dan tidak kebesaran. Sebagai contoh sampel berupa gonad dipotong sesuai dengan cetakan, untuk sampel berukuran besar, potong bagian ikan yang bermanfaat untuk keperluan diagnosa seperti insang dan organ dalam.

Untuk mendapatkan sampel yang terfiksasi dengan baik perlu memperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- ❖ Untuk mencegah penguraian sel, jaringan segar atau ikan yang baru mati perlu difiksasi secepat mungkin.
- ❖ Volume untuk fiksasi sedikitnya 10-20 kali volume jaringan atau sampel dan diganti sedikitnya 2 kali selama dalam fiksasi.
- ❖ Untuk mempercepat penyerapan larutan fiksasi dalam jaringan perlu membuat sayatan-sayatan pada jaringan untuk ukuran ikan besar atau dibedah rongga perut ikan kecil apabila disimpan seluruh badan ikan.

## KESIMPULAN

1. Dalam mengawetkan sampel perlu fiksasi yang tepat, supaya hasilnya lebih baik
2. Semua larutan fiksasi apabila dalam mencampur dan pemakaian harus sesuai dengan sampel yang difiksasi.

## DAFTAR ACUAN

- Bambang, B.R., Philipus, H., & Widiatmoko, W. 2002. Teknik pengiriman sampel ikan, dalam seri budidaya laut, No. 12. Penanganan penyakit ikan budidaya laut. Balai Budidaya Laut. Lampung, hlm. 42-44.
- Mahardika, K., Roza, D., Koesharyani, I., Johnny, F., & Yuasa, K. 2000. Text book for the training gurse an fish disiosi diagnosis. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol, Bali, p. 63-70.
- Widiadnyana, N.N. & Wagey, G.A. 2004. Plankton produktivitas dan ekosistem perairan. Departemen Kelautan dan Perikanan, Pusat Riset Perikanan Tangkap dan LIPI. Jakarta, 33 hlm.

- Novita, P., Indri, A., Meliya, B., Prayudha, D.C., Salfira, & Wakita, K. 2007. Teknik dasar histologi dan atlas dasar-dasar histopatologi ikan. Balai Budidaya Air Tawar, Jambi. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Departemen Kelautan dan Perikanan bekerjasama dengan Japan International Cooperation Agency.
- Sutarmat, T., Ismi, S., Hanafi, A., & Kawahara, S. 2003. Petunjuk teknis budidaya kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) di keramba jaring apung. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol bekerja sama dengan JICA. Bali, 35 hlm.
- Gunarsa, W. 1989. Mikro teknik. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Universitas Ilmu Hayati IPB. Bogor, hlm. 19.