

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, dan formalin 5%. Bahan yang dipakai adalah formalin 37%-40% sebagai bahan utama dalam membuat larutan fiksasi, air laut, aquadest, natrium difosfat (NaH_2PO_4), natrium fosfat (NaH_2PO_4), picric acid, dan glacial acetic acid. Larutan dibuat dengan mencampur bahan-bahan tersebut sesuai dengan larutan yang diinginkan. Hasil percobaan menunjukkan bahwa formalin 10% lebih baik untuk fiksasi gonad dan untuk dibawa *sampling* ke daerah karena dapat dibuat di lokasi pengambilan sampel. Larutan bouins baik untuk fiksasi larva dan semua organ karena dalam melakukan pengeblokan dan pembedahan sampel yang difiksasi dengan larutan bouins berwarna kuning dan larutan 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 jika bertujuan untuk melihat perubahan histopatologisnya.

KATA KUNCI: histologi, larutan fiksasi, teknik

PENDAHULUAN

Histologi adalah bidang biologi yang mempelajari 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 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 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*). 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, meskipun tidak merusak sel, formalin sedikit memberikan efek negatif terhadap sel seperti

memengaruhi ketahanan dan bentuk sel. Untuk itu, pembuatan larutan formalin yang akan digunakan sebagai bahan pengawet harus tepat.

Dalam bidang perikanan, pengamatan secara histologi dipandang penting untuk mengamati perkembangan dan perubahan dari organ/jaringan/sel ikan, krustase, ke-kerangan, 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, serta keuntungan penggunaan beberapa bahan fiksasi tersebut.

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
- Aquadest
- Natrium difosfat
- Natrium fosfat
- 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 Aquadest

Larutan ini digunakan untuk fiksasi gonad dan organ dalam yang lunak dari yuwana ikan. Larutan ini praktis dan mudah dibuat dalam keadaan mendesak. Cara membuatnya adalah formalin 37%-40% sebanyak 10 mL ditambahkan dalam 10 mL air laut lalu ditambahkan 80 mL aquadest dalam 100 mL.

Larutan Buffer Formalin 10%

Pada prinsipnya, kegunaannya hampir sama dengan formalin 10% tapi larutan ini berpenyangga fosfat yaitu untuk fiksasi

gonad dan organ-organ dalam yang lunak dari yuwana. Sampel atau jaringan dapat disimpan dalam larutan ini dalam jangka waktu yang lama.

Cara pembuatan yaitu dengan menimbang bahan natrium difosfat sebanyak 4,0 g; dan natrium fosfat sebanyak 6,5 g

Kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* ditambah aquadest sebanyak 400 mL, diaduk dan dipanaskan dengan tujuan supaya cepat larut, lalu ditambahkan formalin 37%-40% sebanyak 100 mL dan aquadest sebanyak 500 mL. Larutan tersebut diaduk kembali agar homogen dan ditambahkan lagi aquadest sampai volume 1 L.

Larutan Formalin 5% dalam Aquadest atau Air Laut

Larutan ini lebih tepat digunakan untuk fiksasi larva dari umur 0 hari (D-0) sampai 10 hari (D-10) sehingga hasilnya lebih baik bila dibandingkan dengan larutan fiksasi lain.



Gambar 1. Larutan formalin 10% dalam air laut



Gambar 2. Larutan *buffer* formalin



Gambar 3. Larutan formalin 5%

Cara mencampur larutan adalah Formalin 37%-40% sebanyak 5 mL ditambahkan dengan aquadest 95 mL. Untuk formalin 5% air laut aquadest-nya diganti dengan air laut.

Larutan Bouins

Larutan bouins ini berwarna kuning karena terdapat bahan kimia picric acid. Larutan ini lebih tepat 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 dua jam, kemudian larutan diganti dengan alkohol 50% selama dua jam, alkohol 70% selama dua jam, dan dipindahkan ke alkohol 90% selama dua jam, serta terakhir ke alkohol absolut dan disimpan di dalam *freezer*. Menurut Panigoro *et al.* (2007), fiksasi bouins biasanya memerlukan waktu selama 24 jam, tetapi apabila sampelnya berukuran kecil dapat difiksasi selama 2-3 jam kemudian dipindahkan ke alkohol 50% dengan tujuan untuk menghilangkan picric acid dan disimpan dalam alkohol 70%.



Gambar 4. Larutan bouins

Cara pembuatan larutan bouins adalah picric acid diencerkan dengan aquadest 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, penguapan picric acid juga sangat berbahaya.

HASIL DAN BAHASAN

Dari beberapa larutan fiksasi digunakan, larutan formalin 10% adalah yang paling sering digunakan karena bahannya mudah didapat dan campuran larutan ini sangat sederhana. Larutan ini biasanya dipakai pada saat melakukan survai 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. Namun campuran larutan ini lebih banyak bahannya sehingga diperlukan tempat atau laboratorium untuk membuatnya. 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, tetapi bisa juga untuk fiksasi yang lain. Larutan ini harus selalu tersedia di laboratorium. Apabila untuk fiksasi larva hasil histologi, preparat lebih bagus dari fiksasi lain. Namun 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) karena warna sampel dan 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 pembedahan lebih mudah.

Dalam fiksasi suatu organ/jaringan, perlu diperhatikan perbandingan antara volume larutan dengan organ sampel. Perbandingan volume larutan dengan organ sampel yang baik adalah 1:10-20. 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. Sampel yang berukuran besar atau dewasa utuh bagian perutnya harus dibelah untuk memudahkan penetrasi atau masuknya bahan pengawet sebelum dimasukkan dalam wadah larutan fiksasi. Organ atau ikan utuh yang difiksasi memerlukan waktu yang lebih lama (> 1 minggu) dibandingkan dengan organ ukuran kecil atau dipotong kecil-kecil dan tipis. Pembedahan organ juga disesuaikan dengan cetakan blocking yang akan digunakan agar sesuai dan tidak terlalu besar. Sebagai contoh sampel berupa gonad harus dipotong sesuai dengan cetakan, sedangkan untuk sampel berukuran besar, harus dipotong bagian 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 dua 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

BAHAN ACUAN

- Mahardika, K., Roza, D., Koesharyani, I., Johnny, F., & Yuasa, K. 2000. Text book for the training gurse an fish diagnosis. hlm. 63-70.
- Widiadnyana, N., Gabriel, A., & Wagey, A. 2004. Plankton produktivitas dan ekosistem perairan. Departemen Kelautan Perikanan. Pusat Riset Perikanan Tangkap dan LIPI. Jakarta, 33 hlm.
- Panigoro, N., 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 Jendral Perikanan Budidaya Departemen Kelautan dan Perikanan dan Japan International Coperation 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. 35 hlm.
- Gunarsa, W. 1989. Mikro teknik. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Universitas Ilmu Hayati IPB. Bogor, 19 hlm.