

TEKNIK PEMBUATAN PREPARAT HISTOLOGI GONAD

Mujimin

Teknisi Litkayasa pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

PENDAHULUAN

Perkembangan gonad ikan menjadi perhatian para peneliti. Reproduksi dan tinjauannya dilakukan dari berbagai aspek termasuk proses-proses yang terjadi di dalam gonad baik terhadap individu maupun dalam populasi. Perkembangan gonad yang semakin matang merupakan bagian dari reproduksi ikan sebelum terjadi pemijahan (Effendie, 1997).

Untuk mengetahui perkembangan gonad ikan perlu dilakukan pengamatan tingkat/stadium kematangannya. Pengamatan ini akan sulit dilakukan apabila hanya dilihat dengan mata telanjang dan ciri-ciri morfologi luarnya. Demikian pula dalam hal penentuan jenis kelamin jantan dan betina. Dengan preparat histologi, jaringan gonad dapat diamati dengan bantuan mikroskop dan dapat ditentukan tingkatan kematangan gonad secara tepat.

Jaringan gonad dapat diambil dari ikan hidup maupun yang baru saja mati. Jaringan dimasukkan ke dalam larutan fiksasi dan diproses sesuai dengan urutan langkah kerja berikut ini yang diadopsi dari CSIRO (1996).

BAHAN DAN TATA CARA

Bahan: alkohol *absolute*, *xylol*, formalin, larutan *buffer*, larutan hematoxylin, larutan eosin, parafin, gelas ukur, gelas untuk *clearing*, *gelas staining*, *mikrotom*, *oven*, *water bath*, *hot plate*, *pinset*, dll.

Proses Pembuatan Preparat

Langkah-langkah dalam pembuatan preparat histologi gonad adalah:

Pengambilan Gonad Ikan

Ikan diukur panjang serta ditimbang beratnya, kemudian dibelah diambil gonadnya dan ditimbang terlebih dahulu selanjutnya gonad dimasukkan ke dalam larutan fiksasi (Gambar 1).

Fiksasi

Tujuan fiksasi adalah untuk mempertahankan sel-sel atau jaringan agar tidak mengalami perubahan bentuk maupun ukuran. Fungsi dari fiksasi adalah



Gambar 1. Gonad dimasukkan ke dalam larutan fiksasi

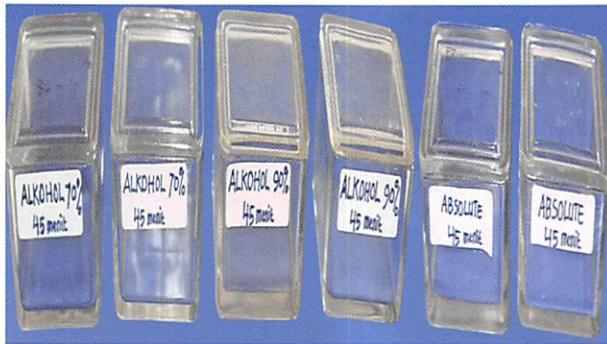
menghambat terjadinya metabolisme secara cepat, mengawetkan elemen dan bentuk yang sebenarnya juga mengeraskan sampel yang lunak. Fiksasi dilakukan dengan larutan formalin 10% atau buffer formalin 10%. Sampel gonad dipotong melintang besarnya disesuaikan dengan ukuran cetakan, kemudian dimasukkan ke dalam botol yang sudah berisi larutan fiksasi, dengan perbandingan antara sampel dan larutan 1:20. Selanjutnya sampel disimpan selama 24 jam. Usahakan sampel dalam botol fiksasi tidak terjepit karena bisa merusak jaringan. Setelah 24 jam kemudian sampel diambil dan dicuci dengan air selama 30 menit, untuk menghilangkan sisa-sisa formalin sebelum masuk ke proses selanjutnya.

Dehidrasi

Tujuan dehidrasi adalah untuk menarik molekul-molekul air dari dalam jaringan gonad. Sampel yang

sudah difiksasi selanjutnya dimasukkan ke dalam keranjang yang berisi 10 buah *tissue-tex* (kotak jaringan), kemudian kotak jaringan tersebut dimasukkan berturut-turut ke dalam larutan sebagai berikut:

Alkohol 70% I, Alkohol 70% II, Alkohol 90% I, Alkohol 90% II, Alkohol Absolut I, Alkohol Absolut II masing-masing selama 45 menit (Gambar 2). Kemudian keranjang sampel diangkat dan ditiriskan, dilanjutkan ke proses penjernihan.



Gambar 2. Larutan dehidrasi

Penjernihan (*Clearing*)

Tujuan dari proses penjernihan ini adalah menggantikan media alkohol dalam jaringan gonad yang telah mengalami proses dehidrasi. Sampel gonad dalam keranjang dari proses dehidrasi dimasukkan ke dalam larutan: Xylol I, Xylol II masing-masing selama 45 menit (Gambar 3).



Gambar 3. *Clearing* (penjernihan)

Setelah selesai sampel diangkat dan ditiriskan, kemudian masuk ke proses penanaman sampel dan pembuatan blok.

Penanaman Sampel (*Embedding*) dan pembuatan blok (*Blocking*)

Tujuan *embedding* dan *blocking* adalah untuk mengeraskan atau memadatkan jaringan agar memudahkan dalam proses pemotongan atau pengirisan.

Dalam proses *embedding* parafin, yang digunakan adalah parafin cair untuk mendapatkannya maka parafin dipanaskan dalam *oven* pada suhu 60°C. Setelah parafin cair dan kelihatan bening, keranjang yang berisi sampel dimasukkan ke dalam parafin cair yang telah dipersiapkan berulang 2 (dua) kali yaitu parafin I dan parafin II masing-masing selama 45 menit (Gambar 4). Kemudian dilanjutkan dengan proses *blocking* sebagai berikut:



Gambar 4. Panaskan parafin dalam *oven* dalam suhu 60°C

Persiapan *bloking*: gelas ukur 100 CC yang diisi parafin dimasukkan ke dalam *oven* dengan suhu 60°C, sampai parafin cair dan berwarna bening. Panaskan juga *hot plate* pada suhu 70°C—80°C.

Siapkan cetakan dan diatur di atas *hot plate* kemudian dituangi parafin cair. Keranjang berisi sampel dalam parafin cair dikeluarkan dari *oven*, *tissue tex* dipindahkan di atas panci berisi parafin yang sudah dipanasi di atas *hot plate*. *Tissue tex* dibuka, sampel diambil kemudian dimasukkan ke dalam cetakan, *tissue tex* berisi sampel kemudian ditaruh di atas cetakan (Gambar 5), selanjutnya dituangi parafin cair. Setelah beku hasil blok (Gambar 6) dimasukkan ke dalam lemari es untuk mempermudah membuka dari cetakan. Kemudian masuk ke proses selanjutnya.

Untuk mempermudah pemahaman dalam pembuatan preparat histologi, untuk proses kerja dari dehidrasi sampai *embedding* dapat dilihat pada Tabel 1.

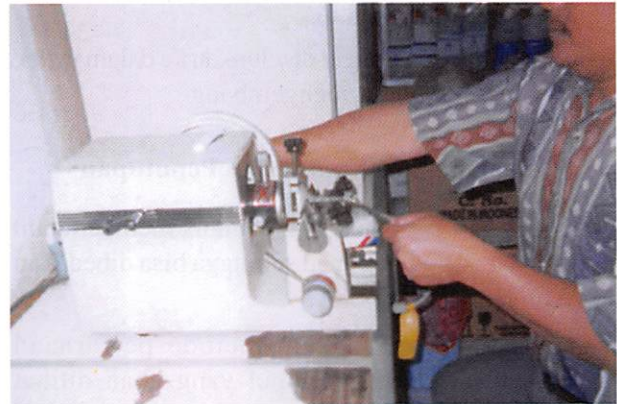
Cara kerjanya yaitu blok yang sudah didinginkan dipasang di mikrotom yang sudah diatur ketebalannya antara 4—6 mikron. Putarlah mikrotom dengan

Tabel 1. Proses kerja dari dehidrasi sampai dengan *embedding* sampel gonad untuk preparat histologi

Langkah	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Perlakuan	Alkohol 70%	Alkohol 70%	Alkohol 90%	Alkohol 90%	Alkohol Absolut	Alkohol Absolut	Xylol	Xylol	Wax (parafin)	Wax (parafin)
Waktu	45 menit	45 menit	45 menit	45 menit	45 menit	45 menit	45 menit	45 menit	45 menit	45 menit



Gambar 5. Proses *blocking*



Gambar 7. Pengirisan sampel menggunakan mikrotom



Gambar 6. Hasil *blocking*

Pengirisan (*Sectioning*) dan Peletakan pada Gelas Objek

Tujuan dari proses ini adalah untuk memperoleh jaringan tipis agar dapat dilihat strukturnya. Alat-alat yang diperlukan dalam proses pemotongan adalah *water bath* (pemanas air) dengan air yang bersuhu antara 40°C—50°C, baskom yang berisi air dingin, alat pemotong (mikrotom) dengan pisaunya, gelas objek, pinset, dan lain-lain.

putaran konstan, sampai blok yang berisi sampel gonad teriris (Gambar 7). Pilihlah irisan sampel gonad yang baik. Irisan selanjutnya dipindahkan ke dalam baskom yang berisi air dingin, lalu ditempelkan pada gelas objek yang telah diberi kode sama dengan blok yang diiris (Gambar 8), selanjutnya dicelupkan ke



Gambar 8. Pengambilan irisan, ditempelkan pada gelas objek

dalam air hangat dalam *water bath* agar irisan tadi mengembang dan ditiriskan (Gambar 9).



Gambar 9. Irisan sampel dicelupkan ke dalam *water bath* agar mengembang

Pewarnaan (*Staining*) dan Penutupan

Tujuan dari proses ini adalah untuk mempertajam pengamatan jaringan gonad sehingga bisa dibedakan tingkatannya.

Ada bermacam-macam metode pewarnaan (*staining*), tergantung sampel yang akan dilihat preparat histologi (jaringannya). Dalam tulisan ini akan dijelaskan satu dari sekian banyak metode yaitu metode Harris Hematoxylin–Eosin dari CSIRO yang umum digunakan.

Cara kerjanya yaitu objek gelas yang berisi potongan yang sudah kering ditempatkan dalam keranjang, kemudian dimasukkan secara berurutan ke dalam larutan pewarnaan (Gambar 10) sebagai berikut:

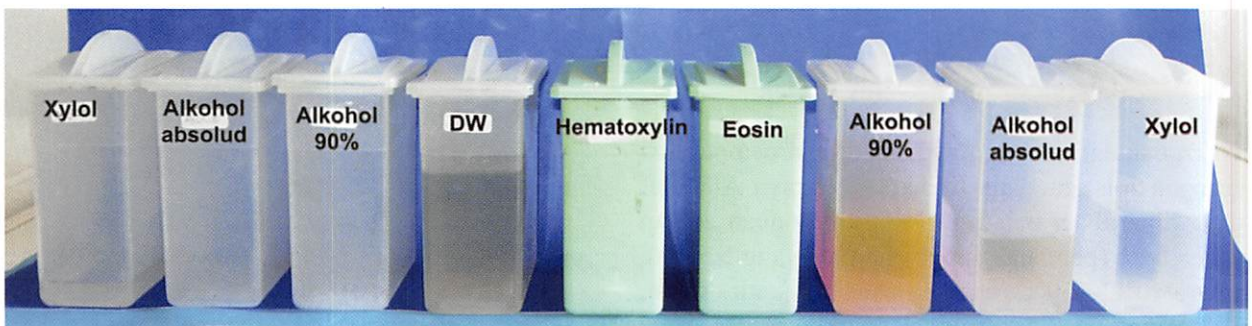
1. Xylol selama 5 menit
2. Alkohol Absolut selama 1 menit
3. Alkohol 90 % selama 1 menit

4. Aquades selama 1 menit
5. Hematoxylin selama 4 menit
6. Cuci dengan air mengalir selama 1 menit
7. Larutan Eosin selama 2 menit
8. Cuci dengan air mengalir selama 1 menit
9. Alkohol 90 % selama 1 menit
10. Alkohol Absolut selama 2 menit
11. Xylol selama 4 menit

Setelah selesai langkah 1 sampai 11, kemudian sampel diangkat dan dibersihkan dari zat warna atau kotoran yang ada pada gelas objek. Media perekat dipakai untuk menempelkan gelas penutup (*cover glasses*) dengan gelas objek adalah Entelan dengan keunggulan cepat kering, jernih, dan tidak menguning.

Penutupan harus dilakukan secara hati-hati, hindarkan pemberian perekat yang berlebihan. Gelas objek berisi sampel yang sudah jadi ditutup dengan gelas penutup secara sederhana dapat dilihat pada Gambar 11.

- Gelas objek yang sudah diwarnai dibersihkan dari kotoran dengan tisu, kemudian letakkan pada meja datar
- Tempelkan salah satu ujung gelas penutup pada ujung gelas objek dan tahan ujung lain dengan pinset
- Jika sudah menempel, salah satu ujung pinset yang digunakan sebagai penyangga gelas penutup dilepaskan dengan cara menarik secara pelan-pelan menjauhi gelas penutup ke arah ujung yang lain
- Gelas penutup diharapkan bersentuhan dengan media perekat dari satu sisi ke sisi yang lain secara perlahan
- Penutupan preparat harus dilakukan secara hati-hati jangan sampai gelas penutup dijatuhkan di atas media perekat secara tiba-tiba atau terburu-buru karena akan menimbulkan gelembung udara



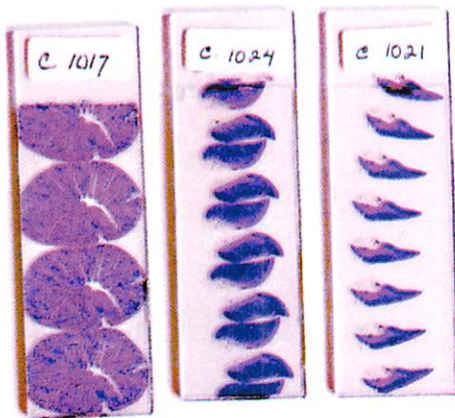
Gambar 10. Larutan untuk pewarnaan



Gambar 11. Pemberian cover (penutup) pada slide

HASIL PREPARAT HISTOLOGI

Sediaan histologi yang siap diamati di bawah mikroskop dapat dilihat pada Gambar 12



Gambar 12. Contoh hasil pembuatan preparat histologi gonad ikan kakap merah

Apabila slide tersebut diamati di bawah mikroskop akan terlihat kuning telur berwarna pink, oosit pada stage III-V berwarna merah, sedangkan oosit pada stage I-II berwarna biru pada pewarnaan metode Harris Hematoxylen – Eosin.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pembuatan preparat histologi agar hasilnya optimum, di antaranya adalah:

1. Larutan pewarnaan apabila sudah digunakan 3—4 kali harus segera diganti karena sudah menurun kualitasnya
2. Teknik pemotongan untuk menghasilkan slide yang bagus ditentukan oleh beberapa faktor meliputi: keahlian operator, pengetahuan, dan pengalaman, ketajaman pisau mikrotom, dan kelayakan alat mikrotom itu sendiri
3. Dalam pemberian penutup pada objek gelas perlu ketelitian dan kesabaran

KESIMPULAN

Pembuatan preparat histologi gonad ikan yang dilakukan dengan hati-hati dan mengikuti urutan yang benar akan dihasilkan slide yang bagus.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 1996. *Manual of Histological Staining Methods*. CSIRO Marine Research Laboratory, Cleaveland, Australia.
- Effendi. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusantara, 163 pp.