

DETEKSI CACAT TULANG BELAKANG PADA YUWANA KERAPU DENGAN TEKNIK PEWARNAAN (STAINING)

Ahmad Zailani^{*)}

^{*)} Teknisi Litkayasa pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

ABSTRAK

Tulisan ini mengutarakan beberapa contoh teknik pewarnaan tulang pada berbagai spesies ikan kerapu. Melalui pewarnaan (*staining*)/metode Potthoff tulang belakang, dapat diketahui tingkat abnormalitas pertumbuhan larva/yuwana kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*), kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*), kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*). Tahap-tahap pewarnaan (*staining*) meliputi lima tingkat, yakni: persiapan alat-alat pewarnaan, persiapan pembuatan larutan (*reagent*), proses pengambilan sampel (contoh), proses pewarnaan tulang (*staining*), dan pemeriksaan secara mikroskopis.

KATA KUNCI: deteksi, cacat tulang, yuwana kerapu, *staining*

PENDAHULUAN

Ikan kerapu merupakan salah satu komoditas perikanan dan mempunyai prospek baik di pasaran tingkat domestik maupun internasional. Menurut data dari Direktorat Jenderal Perikanan, terdapat 20 jenis kerapu dan hanya 12 di antaranya yang memiliki nilai komersial. Usaha budi daya ikan kerapu dilakukan untuk mengantisipasi terancamnya populasi di alam akibat penangkapan dan memenuhi permintaan pasar sekaligus sebagai salah satu upaya pelestarian lingkungan dengan menghindari pengrusakan terumbu karang yang merupakan habitat hidup ikan kerapu. Hancurnya terumbu karang di Indonesia antara lain disebabkan oleh penangkapan ikan karang dan ikan kerapu dengan cara menggunakan sianida dan bahan peledak.

Pertumbuhan ikan kerapu sangat berkaitan erat dengan pasok pakan yang diterimanya. Ikan yang tumbuh tidak sempurna biasanya mengalami kesulitan dalam mendapatkan makanan dalam wadah terbatas (kolam, tambak, dan sebagainya) apalagi harus bersaing dengan ikan-ikan yang lebih sehat fisik sempurna jika jumlah pakan terbatas.

Kondisi tubuh ikan tidak kuat dan kekurangan gizi, maka perkembangan tubuhnya tidak sempurna dan dapat mengalami keterlambatan dalam pertumbuhan (kerdil) dan mudah diserang penyakit (Kordi, 2004).

Ikan adalah hewan bertulang belakang (vertebrata) dan memiliki variasi dalam bentuk dan ukuran. Meskipun demikian, terdapat satu pola dasar yang sama yaitu 'kepala-badan-ekor' dan umumnya bilateral simetris. Dari strukturnya, tulang belakang ikan tidak sekompleks hewan vertebrata di darat (Lagner *et al.*, 1962). Meskipun demikian kerangka pada ikan memiliki fungsi yang hampir sama dengan golongan vertebrata lainnya, yakni untuk menegakkan tubuh, menunjang dan menyokong tubuh, melindungi organ-organ tubuh, dan berfungsi dalam pembentukan butir darah merah (Anonim, 1989). Bentuk tubuh ikan merupakan interaksi antara sistem rangka dan sistem otot serta evolusi dalam adaptasi kedua sistem tersebut terhadap lingkungannya. Sejalan dengan pertumbuhan ikan secara keseluruhan, tulang belakang ikan akan tumbuh seperti bagian-bagian tubuh lainnya (Effendie, 1979). Dari beberapa hasil penelitian menunjukkan keterkaitan antara pertumbuhan ikan dengan pertumbuhan tulang belakangnya, salah satu cara untuk mendeteksi pembentukan atau perubahan tulang pada beberapa spesies larva kerapu yaitu dengan metode pewarnaan tulang (*staining*). Pengalaman penulis dalam pelaksanaan pewarnaan tulang yuwana larva kerapu mulai dari persiapan pengambilan contoh, persiapan bahan larutan pewarnaan (*reagent staining*) sampai dengan teknik pewarnaan tulang dijelaskan dalam tulisan ini.

BAHAN DAN TATA CARA

Bahan utama adalah benih ikan (yuwana) kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*) umur 15 dan 30 hari (D15 dan D30), kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) umur 50 hari (D50), kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*) umur 40 hari (D40).

Untuk mengetahui jenis tulang rawan (*cartilage*) dan tulang sejati (*bone*), dilakukan tahapan proses pewarnaan tulang (*staining*) antara lain:

- I. Persiapan alat-alat pewarnaan
- II. Persiapan pembuatan larutan (*reagent*)
- III. Proses pengambilan sampel (contoh)
- IV. Proses pewarnaan tulang (*staining*)
- V. Pemeriksaan secara mikroskopis

Persiapan Alat-alat Pendukung

Alat-alat seperti beaker glass, pipet, glass ukur, dan lain-lain, yang digunakan dalam proses pewarnaan (Tabel 1) terlebih dahulu dicuci dengan menggunakan deterjen, HCL konsentrasi rendah (10 mg/L), dan dibilas dengan air bersih atau aquades. Setelah kering semua peralatan dibungkus dengan aluminium

foil dan disterilisasi pada suhu 140°C—160°C selama 30—40 menit.

Persiapan Pembuatan Larutan (*Reagent*)

Botol-botol *reagent* yang telah steril, diberi label sebelum pembuatan larutan. Contoh: larutan formalin 10%—15%:

Gunakan rumus: $V1N1=V2N2$

di mana:

- V1 = volume bahan yang akan dilarutkan
- N1 = konsentrasi bahan yang akan dilarutkan
- V2 = volume yang dikehendaki/yang akan dibuat
- N2 = konsentrasi larutan yang dikehendaki/yang akan dibuat

Bahan kimia yang digunakan dalam pewarnaan tulang (*staining*) tertera pada Tabel 2. Prosedur pembuatan beberapa larutan (*Reagent*) pewarnaan tulang (*staining*) terlihat pada bagan Gambar 1.

Proses Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel sebaiknya dilakukan di pagi hari dengan tujuan supaya larva yang dipelihara tidak stres. Pengambilan ini dilakukan secara acak dengan terlebih dahulu

Tabel 1. Peralatan yang digunakan dalam proses pewarnaan

Jenis peralatan	Fungsi
Botol sampel volume 10 mL dan 20 mL	Wadah sampel yuwana
<i>Beacker glass</i> volume 100 mL, 300 mL, dan 1.000 mL	Wadah membuat <i>reagent</i>
Gelas ukur 50 mL, 100 mL, dan 1.000 mL	sda
Pipet vol 5 mL dan 10 mL	sda
Pinset	Pemegang yuwana
<i>Cutter</i>	Penyiang sisik
Batu magnet	Pengaduk <i>reagent</i>
Thermolyne model No. SP131320-33	Pengaduk elektrik
Mikroskop merk Olympus SZH-ILLB dan kamera olympus C-35 AD-4	Pengamatan
Timbangan digital merk Denver Instrument	Menimbang bahan
Botol <i>Reagent</i> volume 500 mL	Tempat larutan
Kertas timbang	Wadah nimbang
Jarum	Alat penunjuk preparat
Ruang asam	Alat penghisap uap/asam
Kertas label tempel	Label jenis-jenis <i>reagent</i>
Petridish	Wadah objek yang diamati
Mikro <i>slide glass</i>	sda

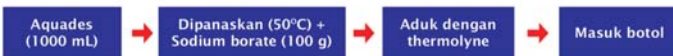
Tabel 2. Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam pewarnaan tulang (*staining*)

Bahan kimia	Fungsi
Formalin 10 % -15 %	Pengawet sampel
Ethanol Absolut 50 %	Dehidrasi
Alcian Blue	Pewarnaan tulang rawan
Sodium Borate	Penetralisir
Tripsin	Pencerahan
Alizarin Red S	Pewarnaan tulang keras
Acetic Acid	Pewarnaan tulang rawan
Kalium Hydroxid (KOH)	Pencerahan
Hydrogen Peroxide Solution (H ₂ O ₂)	Pencerahan
Aqua Bidestilata (H ₂ O)	Pencampur larutan

A. Larutan Alcian Blue (100 mL)



B. Larutan Sodium Borate Jenuh



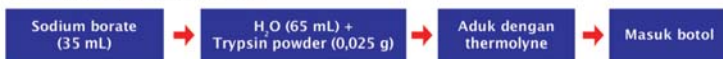
C. Larutan Kalium Hydroxid (KOH) 1%



D. Larutan Bleaching (100 mL)



E. Larutan Trypsin (100 mL)



F. Larutan Alizarin Red



G. Larutan Glycerin

Glycerin I



Glycerin II



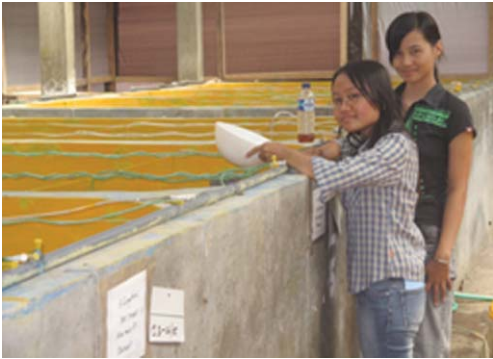
Glycerin III



Gambar 1. Bagan prosedur pembuatan larutan (*reagent*) pewarnaan tulang (*staining*)

mempersiapkan peralatan yang diperlukan, antara lain:

- Kertas label tahan air
- Botol sampel yang diisi larutan formalin 5%—15%
- Gayung dan serok halus untuk mengambil larva dari bak pemeliharaan
- Sampel diambil secara acak
- Sampel disimpan dalam botol sampel
- Sampel yang tersimpan dalam formalin dapat bertahan sampai dua bulan, sebelum proses ketahap pewarnaan (*staining*)



Gambar 2. Pengambilan sampel

Proses Pewarnaan Tulang (*Staining*)

Proses pewarnaan tulang (*staining*) dilakukan dengan menggunakan metode Potthoff (1984), sebagai berikut:

- Sampel sudah disiapkan, formalinnya diganti dengan aquabidestilata steril
- Sampel dibersihkan seluruh sisiknya dengan menggunakan alat penjepit (pinset) dan cutter, kemudian dibilas hingga bersih
- Sampel yang sudah bersih, direndam dalam larutan Alcian blue selama 1 hari, tergantung besar kecilnya ukuran dan umur sampel
- Sampel yang berpigmen kuat atau telah terbentuk tulang keras, biasanya memerlukan waktu perendaman agak lama (1—10 hari)
- Sampel dicuci dengan larutan sodium borate (1 hari)
- Sampel dipindah kedalam larutan Trypsin (2—3 hari) atau lebih, sambil terus dicek melalui pengamatan di mikroskop

- Setelah tahap Trypsin sampel dipindah atau disalin ke larutan alizarin red selama 1 hari atau lebih dan terus dipantau di mikroskop untuk memastikan bahwa pewarnaan sampel benar-benar melekat
- Tahap berikutnya sampel disalin kembali kedalam Trypsin selama 2—3 hari sampai pewarnaan sampel berwarna bening atau transparan
- Sampel masuk ketahap larutan: Glycerin I selama 1—3 hari, Glycerin II selama 1—3 hari dan Glycerin III dengan ditambah thymol untuk penyimpanan dalam jangka waktu lama.

Catatan:—Untuk ikan yang ukuran besar biasanya memerlukan waktu lebih lama dalam setiap tahapannya memakan waktu antara 1—2 bulan.

POKOK BAHASAN

Dengan perlakuan/metode *staining* dapat dilihat hasil deformitas (variasi kelainan) dari larva yang abnormal, setelah diperiksa di bawah mikroskop seperti terlihat pada Gambar 3.

KESIMPULAN

Melalui pewarnaan (*staining*)/metode Potthoff. Tulang belakang, dapat diketahui tingkat abnormalitas pertumbuhan larva/yuwana kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*), kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*), kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1989. Ikhtologi. Diklat. Institut Pertanian Bogor, Fakultas Perikanan Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan. Bogor, 2: 18—42.
- Effendie, M.I. 1979. Metode Biologi Perikanan. Yayasan Dewi Sri Bogor, 109 pp.
- Kordi, M.G.H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. PT Rineka Cipta dan PT Bina Adiaksara. Jakarta, 68 pp.
- Lagner, K.F., J.E. Bardach, and R.R. Miller. 1962. Ichthyology: The Study of Fishes. John Wiley & Sons Inc. New York, 545 pp.
- Potthoff, T. 1984. Clearing and Staining Techniques in Ontogeny and Systematic of Fishes (ed. by H.g. Moser *et al.*) Special Publication I, American Society of Ichthyologist and Herpetologists, p. 35—37.



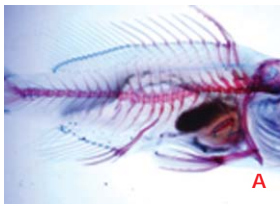
Kerapu Sunu D30



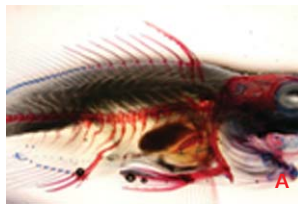
Kerapu Sunu D15



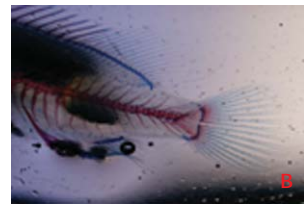
Kerapu Sunu D30



Kerapu Bebek D50



Kerapu Bebek D50



Kerapu Bebek D50



Kerapu Lumpur D40



Kerapu Lumpur D40



Kerapu Lumpur D40

- A **(Abnormal)** Segmen (ruas) tulang belakang terdapat deformitas (variasi kelainan). Dalam gambar terlihat ruas tulang bengkok. Jumlah ruas tulang dan jarak antar ruas ada perbedaan
- B **(Normal)** Perhitungan jumlah ruas (segmen) dan jarak antar ruas hasil pembentukan tulang sejati (bone) tidak terlalu jauh. Ruas tulang belakang lurus

Gambar 3. Contoh hasil pewarnaan tulang pada beberapa spesies larva/yuwana ikan kerapu yang *deformity* (A) dan susunan tulang belakang yang normal (B)