

Aplikasi Metode Emersi Fiksatif Berbeda terhadap Morfologi Histologi Testis dan Epididimis Kambing Lokal (*Capra sp.*)

(Application of different fixative emersi methods for histological morphology of testicular and epididymal local goats (*Capra sp.*))

Fitriani¹, Husmimi² dan Muslim Akmal¹

¹Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

²Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran, Universitas Syiah Kuala

ABSTRAK Penelitian ini bertujuan untuk melihat morfologi histologi testis dan epididimis kambing lokal (*Capra sp.*) dengan umur 1-1,5 tahun. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorik dengan menggunakan 6 testis dan 6 epididimis yang diambil secara acak dan masing-masing di fiksasi dalam fiksatif formalin dan *neutral buffered formaline* (NBF) 10% dengan waktu fiksasi 15 hari. Pembuatan dan pengamatan jaringan testis dan epididimis dilakukan di laboratorium histologi FKH Unsyiah. Pengamatan mikroskopis secara kualitatif yang diamati pada 10 tubulus testis dan epididimis. Hasil pengamatan dianalisis secara deskriptif. Secara mikroskopik, gambaran struktur jaringan testis dan epididimis kambing terlihat jelas. Ruang antar membran tubulus pada metode emersi fiksatif formalin masih

terlihat longgar, sedangkan pada metode emersi fiksatif NBF terlihat padat. Pengerutan sel sangat terlihat pada fiksatif formalin dibandingkan fiksatif NB, namun autolisis sel terlihat tidak nyata pada kedua fiksatif tersebut. Secara umum, kondisi membran tubulus terlihat utuh pada testis dan epididimis dengan fiksatif formalin dan NBF, namun sedikit terlihat degenerasi hidropis pada ruang antar sel dalam tubulus seminiferus. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa perbedaan hasil pada preparat testis dan epididimis dengan menggunakan fiksatif berbeda, kemungkinan dapat dipengaruhi oleh jenis bahan fiksatif, ukuran dan struktur yang berbeda pada kedua organ. Pemilihan metode emersi fiksatif pada jaringan testis dan epididimis sangat penting untuk mempermudah pengamatan morfologi histologi.

Kata Kunci: Morfologi histologi, testis, epididimis, kambing lokal, fiksatif

ABSTRACT This research was conducted to observe the histological morphology of testicular and epididymal tissues of local goats at the same age (1-1,5 years old). This research is laboratory experimental research using 6 testes and epididymis 6 taken randomly and each fixed in fixative neutral buffered formalin (nbf) and formaline 10% with a 15 day fixation time. Preparation and observation of the epididymis and testicle tissue is performed in the laboratory of histology FKH Unsyiah. Qualitative microscopic observations were observed in 10 testes and epididymal tubules. The observations analyzed descriptively. Microscopically, the picture of tissue structure of the testes and epididymis of kacang goats is

evident. The intermediate space of the tubules in the formalin fixation emersi method still looks loose, whereas in NBF fixative emersi method looks solid. Cell shrinking is highly visible in formalin fixation compared with NBF fixation, but cellular autolysis appears to be invisible in both fixation methods. Generally, tubular membrane conditions are seen intact on the testes and epididymis with formalin and nbf fixation. Differences in results on testicular and epididymal preparations using different fixative materials, may be affected by different types of fixation, size and structure in both organs. The selection of a fixative emersi method on testicular tissue and epididymis is essential to evaluate the histologic morphology.

Keywords: Histology morphology, testicular, epididymis, local goat, fixation

2018 Agripet: Vol (18) No. 1: 24-29

PENDAHULUAN

Penggunaan metode emersi pada kegiatan histoteknik sudah sangat umum

digunakan. Histoteknik adalah suatu rangkaian proses pembuatan organ atau jaringan sehingga dapat diamati secara mikroskopis. Fiksasi adalah proses penting pada metode emersi untuk mengawetkan, mempertahankan bentuk

Corresponding author: fitri_0880@yahoo.co.id

DOI: <https://doi.org/10.17969/agripet.v18i1.8848>

dan struktur jaringan, memudahkan proses pemotongan, dan memudahkan penyerapan zat warna pada proses pewarnaan sehingga pengamatan struktur jaringan histologi dapat diamati di bawah mikroskop (Hewitson *et al.*, 2010; Miranti, 2010; Ahmed dan Mohammed, 2011; Zanini *et al.*, 2012). Pembuatan jaringan yang baik dapat digunakan sebagai metode pembelajaran, penelitian, dan penegakan diagnostik (Jusuf, 2012).

Salah satu organ yang harus diperhatikan dalam proses fiksasi emersi adalah testis kambing. Testis adalah bagian dari organ penting reproduksi jantan yang aktif menghasilkan sel gamet jantan yang disebut spermatozoa. Testis merupakan jaringan yang sulit terfiksasi dengan baik, karena memiliki struktur histologi yang kompleks dengan 90% isi testis terdiri dari beratus meter tubulus yang sangat kecil yang disebut tubulus seminiferus dan berbagai macam sel di dalamnya dan 10% tersusun atas jaringan ikat (Feradis, 2010; Wang *et al.*, 2016). Kurang tepatnya pemilihan fiksatif akan menurunkan kualitas preparat organ testis yang akan diamati. Informasi ini penting untuk akuratnya hasil penelitian maupun untuk penegakan diagnostik yang berhubungan erat dengan reproduksi hewan jantan. Pernyataan tersebut didukung oleh Jusuf (2012), bahwa kualitas preparat histologi penting dalam memberikan informasi yang tepat dan akurat.

Berdasarkan paparan diatas, perlu dilakukan kajian tentang proses fiksasi pada metode emersi sebagai prinsip dasar histoteknik untuk menghasilkan gambaran mikroskopik yang berkualitas. Penelitian ini bertujuan mengaplikasikan metode emersi dengan fiksatif berbeda terhadap morfologi histologi testis dan epididimis, khususnya jaringan testis dan epididimis kambing lokal, sehingga nantinya dapat dijadikan sebagai bahan acuan standar histoteknik pada kegiatan pendidikan dan penelitian.

MATERI DAN METODE

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah botol sampel, botol dehidrasi, corong kaca, talenan, pisau, skalpel, pinset, kertas

saring, *tissue casset*, cetakan blok, oven, mesin *embedding* merek *Lee*, *microtom rotari* merek *Lee*, objek glass, *staining jar*, mikroskop biokuler, dan mikroskop CX41 foto digital DP12. Bahan utama yang digunakan adalah testis kambing yang di fiksasi dengan formalin, dan NBF. Bahan lainnya adalah ethanol, alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95%, *aquadest*, silol, parafin, larutan pewarna hematoxilin dan eosin, dan bahan perekat Entellan®.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorik dengan menggunakan 6 testis dan 6 epididimis yang selanjutnya difiksatif dalam formalin dan NBF dengan waktu fiksasi 15 hari (modifikasi metode Wang *et al.* (2016)). Pengamatan mikroskopis secara kualitatif yang diamati pada 10 tubulus testis dan epididimis. Hasil pengamatan akan dianalisis secara deskriptif.

Pemrosesan Jaringan

Setelah proses fiksasi (15 hari) dalam fiksatif berbeda, jaringan testis dipotong dengan ukuran 5x5 mm² dan dimasukkan dalam *casette tissue*, kemudian direndam dalam alkohol 70% untuk proses *stopping point* selama enam sampai tujuh jam. Proses berikutnya adalah proses dehidrasi, yaitu jaringan testis direndam dalam alkohol dengan konsentrasi bertingkat (80%, 90%, 95%, dan absolut) masing-masing selama dua jam. Penjernihan (*clearing*) dengan silol selama tiga puluh menit dengan tiga kali pengulangan, kemudian infiltrasi dalam parafin cair pada suhu 58-60°C sebanyak tiga kali pengulangan (Jusuf, 2009; Muntiha, 2001). Selanjutnya dilakukan penanaman (*embedding*) dalam parafin cair dan dicetak menjadi sampel blok parafin (*blocking*) dengan menggunakan alat *prosessing embedding*. Proses berikutnya adalah pemotongan (*sectioning*) dengan *microtome rotari* dengan ketebalan 3-5 µm, dan diletakkan di atas gelas objek, kemudian diwarnai dengan pewarnaan hematoxilin-eosin (HE).

Pewarnaan Haematoxilin Eosin (HE)

Proses pewarnaan HE diawali dengan deparafinisasi atau penghilangan parafin dengan menggunakan silol sebanyak tiga kali

pengulangan, masing-masing dua menit, dilanjutkan dengan rehidrasidengan alkohol bertingkat (absolut, 96%, 90%, 80%), masing-masing dua menit. Kemudian dilakukan pembilasan dengan air mengalir selama lima menit diikuti pembilasan dengan menggunakan akuades selama lima menit. Selanjutnya jaringan diwarnai dengan Hematoksilin selama lima menit (sambil dikontrol di bawah mikroskop biokuler) dan dibilas kembali dengan menggunakan air mengalir. Lalu jaringan diwarnai dengan pewarna eosin selama lima menit (sambil dikontrol di bawah mikroskop biokuler) dan diikuti proses dehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat. Proses penjernihan (*clearing*) dengan silol dan diakhiri dengan penutupan jaringan (*mounting*) menggunakan Entellan[®]. Jaringan diamati di bawah mikroskop dan difoto menggunakan mikroskop Olympus CX41 dengan foto digital DP12. Parameter pada penelitian ini yang akan diamati nantinya adalah struktur histologi jaringan testis dengan melihat bentuk (membran utuh, membran tidak utuh) dan kerapatan tubulus seminiferus.

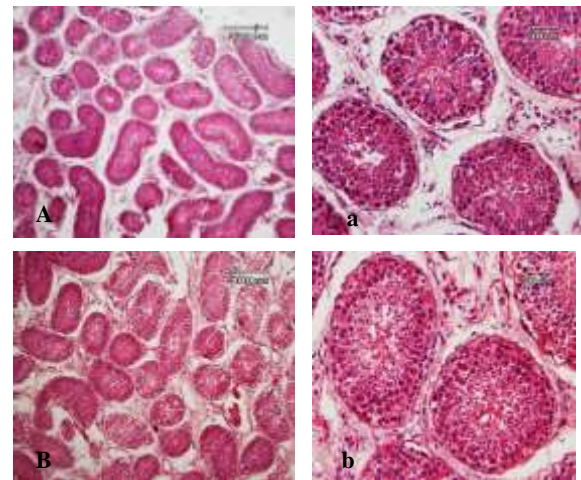
HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi Histologi Testis Kambing

Penggunaan fiksasi emersi formalin pada testis kambing dengan perendaman 15 hari, secara mikroskopis memperlihatkan gambaran yang kurang baik. Pada Gambar 1 memperlihatkan struktur tubulus yang longgar, adanya kerusakan tubulus, membran terlihat banyak yang tidak utuh dan sel-sel spermatogenik terlihat tidak kompak, sedangkan pada penggunaan fiksasi emersi (NBF) terlihat struktur tubulus longgar dengan penampakan struktur sel yang lebih jelas.

Pada Gambar1 menunjukkan adanya kerusakan pada daerah tubulus seminiferus testis. Kerusakan yang terjadi dapat dipengaruhi oleh fiksasi, hal ini seperti yang dikatakan oleh Jusuf (2009) dan Ahmed dan Mohammed (2011) bahwa teknik fiksasi merupakan tahap awal pada proses histoteknik. Kesalahan yang dilakukan pada tahap fiksasi tidak akan pernah dapat diperbaiki lagi pada tahapan selanjutnya. Oleh karena itu, hasil

akhir yang baik sangat tergantung pada cara melakukan fiksasi dengan baik. Selain menyebabkan kerusakan pada jaringan, dampak fiksatif juga terlihat pada pewarnaan, karena fiksatif mampu membentuk ruang pada membran sel sehingga makromolekul seperti zat warna mampu menembus masuk ke dalam dan membantu melekatnya zat warna pada sel (Maryland, 2001). Pada Gambar 1 memperlihatkan jaringan testis kambing dengan pewarnaan HE dalam penggunaan fiksatif formalin dan NBF.



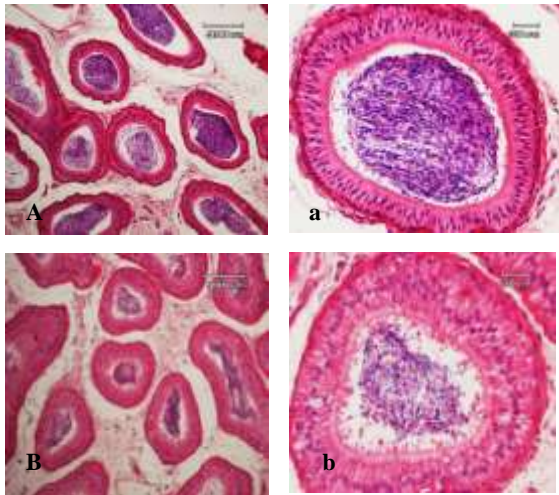
Gambar 1. Morfologi histologi testis kambing.(A dan b) menggunakan metode emersi fiksasi formalin 10%. (A) Struktur tubulus seminiferus (TS) dengan pembesaran 100×, (a) Struktur TS dengan pembesaran 400×. (B dan b) menggunakan metode emersi fiksasi NBF 10%. (B) struktur tubulus dengan pembesaran 100×, (b) struktur tubulus dengan pembesaran 400×.

Morfologi Histologi Epididimis Kambing

Fiksatif formalin 10% dan NBF 10% pada epididimis dengan durasi 15 hari menunjukkan perbedaan yang tidak jauh berbeda. Hal ini terlihat pada Gambar 2, dimana seperti halnya pada jaringan testis, penggunaan fiksatif NBF 10% pada epididimis lebih bagus dalam morfologi histologinya dari pada penggunaan fiksatif formalin 10%. Secara umum, kedua penggunaan fiksatif baik formalin maupun NBF menunjukkan gambaran mikroskopis yang nyata. Namun, untuk struktur sel dan jaringan lebih terlihat jelas pada penggunaan fiksatif NBF.

Hasil pengamatan memperlihatkan secara umum gambaran mikroskopis dengan menggunakan fiksatif NBF10% masih lebih baik dari 10%formalin. Hal ini sesuai dengan

teori yang menyatakan bahwa penggunaan fiksatif NBF lebih baik dari fiksatif formalin. Pada pemeriksaan patologi, NBF masih menjadi “gold standart” untuk fiksatif dalam beberapa dekade walaupun penggunaan fiksatif formalin masih banyak digunakan karena kemudahan dalam mendapatkan fiksatif tersebut (Moelans *et al.*, 2011; Thavarajah *et al.*, 2012).



Gambar 2. Morfologi histologi epididimis kambing.(A dan b) menggunakan metode emersi fiksasi formalin 10%. (A) Struktur tubulus dengan pembesaran 100×, (a) Struktur tubulus dengan pembesaran 400×. (B dan b) menggunakan metode emersi fiksasi NBF 10%. (B) Struktur tubulus dengan pembesaran 100×, (b) Struktur tubulus dengan pembesaran 400×.

Penggunaan durasi pada metode emersi fiksatif diperlukan dan disesuaikan pada bentuk dan jenis ukuran jaringan, dan biasanya untuk ukuran jaringan 1×1cm di fiksasi 4-24 jam (Hewitson *et al.*, 2010). Zulham dalam Suprianto (2014) menyatakan bahwa semakin lama jaringan dalam fiksatif semakin menjadikan organel sel luruh dan semakin banyak pengerutan inti yang terbentuk. Durasi 15 hari pada penelitian ini digunakan berdasarkan perkiraan ukuran jaringan kurang lebih 10 cm, dan pertimbangan daya fiksasi dari organ testis yang masih sulit, dibandingkan organ lainnya (Wang *et al.*, 2016). Sehingga penggunaan durasi 15 hari pada fiksatif formalin 10% dan NBF 10% menunjukkan bahwa jaringan testis terfiksasi dengan baik dan morfologi histologi testis

kambing dapat diidentifikasi seperti terbaca pada Tabel 1.

Tabel 1. Data Morfologi Histologi Testis dengan Fiksasi Formalin 10% dan NBF 10% dengan Durasi 15 hari

	Gambaran Umum	Struktur Umum	Ruang Antar Sel	Pengerutan Sel	Autolisis Sel	Membran Tubulus
Fiksatif Formalin						
Testis	Sesuai	T	L	T	KT	Udh
Epididimis	Sesuai	T	L	T	KT	U
Fiksatif NBF						
Testis	Sesuai	T	P	KT	KT	U
Epididimis	Sesuai	T	P	KT	KT	U

Keterangan:

T = Terlihat

KT = Kurang Terlihat

L = Longgar

P = Padat

U = Utuh

Udh = Utuh dengan degenerasi hidropis

Hasil pada Tabel 1 menunjukkan adanya perbedaan gambaran mikroskopis dengan emersi fiksatif formalin dengan NBF. Secara umum memperlihatkan gambaran histologi terlihat jelas tubulus semiferus dengan sel spermatogenik, sel Sertoli dan sel sel Leydig. Ruang antar sel pada fiksatif formalin masih terlihat longgar dibandingkan fiksatif NBF, begitupun dengan pengerutan sel yang masih terlihat pada fiksatif formalin, keadaan membran tubulus utuh pada fiksatif NBF, namun pada fiksatif formalin masih terlihat adanya degenerasi hidropis yang mendesak membran tubulus.

Berdasarkan hasil analisa pengamatan penilaian berbagai parameter pada testis kambing menggunakan metode emersi fiksatif formalin dan NBF dengan durasi 15 hari menunjukkan bahwa fiksatif NBF lebih jelas dalam menggambarkan morfologi histologi testis kambing dari pada fiksatif formalin. Hasil penelitian Trianto (2015) menyatakan bahwa penggunaan fiksatif formalin metode emersi belum menunjukkan hasil yang jelas terhadap gambaran mikroskopis dan kualitas pewarnaan.

Perbedaan hasil pada preparat testis dan epididimis dengan menggunakan fiksatif berbeda kemungkinan dipengaruhi oleh jenis bahan fiksatif, ukuran dan struktur yang berbeda pada kedua organ. Pemilihan metode fiksasi pada jaringan testis dan epididimis sangat penting untuk mempermudah pengamatan morfologi histologi. Hal tersebut juga dapat disebabkan oleh fiksasi yang juga

diperlambat oleh ukuran dan ketebalan spesimen jaringan.

KESIMPULAN

Dari hasil pengamatan morfologi histologi testis dan epididimis kambing lokal didapatkan bahwa, Penggunaan metode fiksasi emersi masih dapat memberikan gambaran mikroskopis yang jelas. Penggunaan fiksatif NBF masih jauh lebih jelas menampilkan gambaran morfologi testis dan epididimis dari pada fiksatif formalin yang masih menampilkan pengerutan sel dan membran tubulus. Pemilihan fiksatif dan waktu fiksasi pada metode emersi merupakan bagian yang penting untuk morfologi histologi testis dan epididimis kambing lokal, sehingga standarisasi penggunaannya dapat diaplikasikan dalam kegiatan histoteknik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Rektor Universitas Syiah Kuala, dan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Syiah Kuala yang telah mendanai penelitian ini melalui skim Penelitian Pranata Laboratorium Pendidikan dengan Nomor kontrak: 1447/UN11/SP/PNBP/2017 Tanggal 18 Mei 2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, H.G. and Mohammed, A.I.I., 2011. Acomparison study of histochemical staining of various tissue after Carnoy's versus after formalin fixation. *J. Cancer Sci Ther.* 3(4): 84-87.
- Feradis, 2010. *Reproduksi Ternak*. Alfabeta. Bandung.
- Hewitson, T.D., Wigg, B. and Becker, G.J., 2010. *Tissue Preparation for Histochemistry: Fixation, Embedding, and Antigen Retrieval for Light Microscopy. Chapter I*. In T.D. Hewitson and I.A. Darby, Jr (Eds). *Histology protocols*. Human Press. Australia. pp.3-11.
- Jusuf, A.A., 2009. *Histoteknik Dasar. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia*. Jakarta.
- Jusuf, A.A., 2012. *Teknik Histologi I. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*. Jakarta.
- Maryland., 2001. *Guidelines for hematoxylin and eosin staining*. National Society for Histotechnology; 1-11.
- Miranti, I.P., 2010. *Pengolahan jaringan untuk penelitian hewan coba*. *Media Medika Muda*, Januari, p:2.
- Muntiha, M., 2001. *Teknik Pembuatan Preparat Dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin*. Balai Penelitian Veteriner Bogor. Hal. 156-163.
- Moelans, C.B., Hoeve, N., Ginkel, J.W., Kate, F.J. and Diest, P.J., 2011. *Formaldehyde Substitute Fixatives. Analysis of Macroscopy, Morphologic Analysis, and Immunohistochemical Analysis*. *AM J Clin Pathol.* 136:548-556.
- Suprianto, A., 2014. *Perbandingan Efek Fiksasi Formalin Metode Intravital Dengan Metode Konvensional pada Kualitas Gambaran Histologis Hepar Tikus*. Skripsi. Universitas Tanjung Pura. Pontianak
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V.K., Elizabeth, J., Rao, U.K. and Ranganathan, K., 2012. *Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation*. *J. Oral Maxillofac Pathol.* 16(3): 400-405.
- Trianto, H.F., Ilmiawan, M.I., Pratiwi, S.E., Suprinto, A., 2015. *Perbandingan Kualitas Pewarnaan Histologis Jaringan Testis dan Hepar Menggunakan Fiksasi Formalin Metode Intravital dan Konvensional: sebuah Studi Eksperimental pada Tikus*. Universitas Tanjungpura. *Jurnal Mahasiswa PSPD.* 3(1).

Wang H., Yang, L.L., Ji, Y.L., Chen, Y.H., Hu, J., Zhang, C., 2016. Different fixative methods influence histological morphology and TUNEL staining in mouse testes. *Reproductive Toxicology Journal*. 60: 53-61.

Zanini C., Gerbaudo, E., Ercole, E., Vendramin, A. and Forni. M., 2012.

Evaluation of two commercial and three home-made fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible. *Environmental Health. Bio Med Central*. P.1-14.