

EKSPERIMENTASI SKELETON VERTEBRATA DENGAN METODE INOUE (ALIZARIN RED S DAN ALCIAN BLUE METHOD)

Dewi Puspita Sari, Suwarno, Harlita

Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Sebelas Maret
Jl. Ir Sutami No 36 A Kentingan Surakarta Jawa Tengah Indonesia
e-mail: dewipuspita@staff.uns.ac.id

ABSTRAK

Kegiatan pembelajaran secara kontekstual memberikan pengalaman lebih bermakna pada peserta didik. Salah satu kegiatan untuk menunjang pengalaman tersebut adalah dengan eksperimen pembuatan awetan basah dengan bahan dasar rangka hewan vertebrata. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memberikan pengalaman dan skill pada peserta didik untuk membuat preparat awetan basah rangka hewan dengan menggunakan metode inouye sehingga mampu menghasilkan preparat yang dapat digunakan sebagai suplemen pembelajaran. Metode penelitian yang digunakan untuk pembuatan preparat metode Inouye (Metode ARAB) dan diskripsi kualitatif untuk analisisnya. Metode ARAB menghasilkan tulang sejati akan terwarnai merah (alizarin red S) dan tulang rawan akan terwarnai biru (alcian blue). Preparat yang akan digunakan berasal dari lima kelas pada vertebrata. Kelompok pisces akan diwakili oleh ikan mas komet (*Carassius auratus*), amfibi dengan katak pohon (*Rhacophorus leucomystax*), kelompok reptil menggunakan cicak (*Cosymbotus platyurus*), kelompok aves menggunakan burung pipit (*Lonchura leucogastroides*), dan mamalia menggunakan sampel mencit (*Mus musculus*) usia 1 hari. Hasil eksperimentasi baik pada *Polypedates leucomystax* dan *Carassius auratus*, cukup baik pada *Cosymbotus platyurus* dan kurang baik pada *Lonchura leucogastroides* dan *Mus musculus*. Kondisi ini disebabkan karena banyak faktor diantaranya adalah pemahaman teori, keterampilan skill laboratorium, integritas dalam bekerja, dan interpretasi data yang diperoleh. Eksperimentasi pada skeleton vertebrata ini diharapkan membantu peserta didik untuk menghasilkan media pembelajaran secara mandiri dan melatih skill laboratorium sehingga menghasilkan produk preparat untuk meningkatkan pemahaman terhadap struktur anatomi tulang penyusun tubuh hewan

Kata kunci: Skeleton vertebrata, inouye, skill laboratorium, alizarin red S, alcian blue.

PENDAHULUAN

Pembelajaran yang bermakna menekankan pada prinsip *experiment* dan *experience*. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah memberikan pelatihan dan pengalaman secara langsung kepada mahasiswa. Metode Inouye adalah salah satu metode pewarnaan tulang menggunakan *double*

dyes dengan serangkaian protokol yang dikembangkan (Rudiyatmi, 2012). Hasil akhir mengindikasikan bahwa osteum akan berwarna merah dan kartilago berwarna biru. Alizarin red S mampu terserap oleh osteum (tulang keras) (Nugroho, 2011), bersifat asam, dan memberikan warna merah keunguan pada tulang karena perbedaan muatan

pada alizarin red dan osteum (Puspitasari, 2015). Alcian blue bersifat basa dan akan terikat pada Kartilago yang bersifat asam (Rudiyatmi, 2012).

Pemanfaatan Metode Inouye ini sangat beragam, mulai dari pengamatan jumlah, bentuk, ukuran skeleton yang bervariasi pada kelompok hewan tertentu riset dasar biodiversitas hewan, sampai dengan proses organogenesis yang terganggu karena zat teratogen yang sengaja diuji cobakan pada hewan uji. Manfaat penelitian ini adalah melatih skill dan membuka paradigma baru untuk mengembangkan riset berbasis ARAB (Alizarin red S-Alcian Blue) pada berbagai keperluan.

METODE PENELITIAN

Protokol atau langkah kerja yang digunakan adalah mengacu pada metode pewarnaan ganda *Allizarin red-s* dan *Alcian blue* menurut Inouye (1976) yang dimodifikasi. Langkah pertama, dilakukan mematikan hewan dengan eter. Melakukan exfoliation untuk hewan yang bersisik. fiksasi specimen ke dalam alkohol 95% selama \pm 3 hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode preparasi yang digunakan untuk membuat preparat skeleton adalah metode Alizarin Red S Alcian Blue (ARAB) Inouye. Kualitas preparat skeleton dipengaruhi oleh komposisi bahan, tahapan pelaksanaan protokol, dan skill laboratorium praktikan. Gambar 1 menunjukkan hasil akhir dari eksperimentasi skeleton vertebrata.

Preparat *Carassius auratus*

Hasil yang diperoleh cukup baik, skeleton dapat teramati meliputi bagian caput,ekstremitas berupa sirip dan tulang belakang. Pewarnaan

Viscerasi yaitu proses pembuangan kulit, jaringan lemak dan organ-organ dalam fetus. Proses ini dilakukan dengan sangat hati-hati agar specimen tidak rusak atau kedudukan anggota tubuh tidak berubah. Selanjutnya Specimen diwarnai pada dengan menggunakan pewarnaan ganda yaitu Allizarin red S dan Alcian blue selama 3 hari pada suhu 37 °C. Specimen dicuci dengan air mengalir beberapa kali sampai bersih. Specimen dijernihkan dengan larutan KOH 1% dalam air selama 2 hari sampai jaringan yang membungkus tubuh menjadi transparan dan yang berwarna merah atau biru hanya pada jaringan tulang. Specimen dipindahkan ke dalam larutan gliserin 20% dalam KOH 1% selama 1-4 hari. Specimen dimasukkan secara berturut-turut dalam larutan gliserin 50% dan 80% dalam KOH 1% masing-masing selama 1 jam, lalu disimpan dalam gliserin 100% untuk kemudian dilakukan pengamatan. Data hasil eksperimentasi dianalisis secara deskriptif kualitatif.

menggunakan ARAB pada pembuatan preparat ini menghasilkan warna merah pada semua bagian karena specimen memiliki pertulangan sejati. Pewarna yang mampu diserap baik oleh *C. auratus* adalah alizarin red S yang mampu diserap oleh tulang sejati. Warna ini muncul karena zat warna yang diberikan terikat oleh kalsium pada matriks tulang. (Soeminto, 2002). Tulang pada tulang dada *C. auratus* berjumlah 27 pasang hal ini sesuai dengan somasundaran (1986) yang menyatakan bahwa jumlah tulang dada pada *C. auratus* berjumlah sekitar 27-28 pasang. Hasil yang cukup baik dikarenakan proses perendaman pada KOH 1% dengan lama waktu yang sesuai dengan ketebalan otot *C. auratus*. (Bevalender, 1998). Volume gliserin

pada saat pengamatan sangat mempengaruhi dengan kualitas preparat, preparat skeleton *C. auratus* yang direndam dengan volume lebih banyak akan menghasilkan preparat yang dapat diamati dengan sempurna, berbeda dengan preparat

skeleton yang diamati dengan volume gliserin yang kurang akan menyebabkan warna tampak gelap dan tampak gelembung yang mengganggu pada saat proses pengamatan. (Karyadi, 2003)



a



b



c



d



e

Keterangan :

- a. Preparat *Carassius auratus*
- b. Preparat *Rhacophorus leucomystax*
- c. Preparat *Cosymbotus platyurus*
- d. Preparat *Lonchura leucogastroides*
- e. Preparat *Mus musculus*

Gambar 1. Hasil proses Inouye pada Vertebrata

Preparat *Rhacophorus leucomystax*

Hasil paling baik diantara kelompok hewan lainnya. Kondisi ini disebabkan karena sebelum di proses katak pohon mengalami eksfoliasi, pengikisan daging dan otot serta eliminasi rongga abdomen. Rangka segar diproses dengan inouye sehingga alizarin red S berhasil mewarnai osteum dan alcian blue mewarnai kartilago. Pada *R. leucomystax* ujung-ujung jari kaki maupun tangan tumpul dan melebar berbentuk bantalan seperti cakram. Jari- jari tangan ada 4 buah

sedangkan jari kaki 5 buah. Tungkai depan terdapat persatuan radius dan ulna, sedang tungkai belakang tibia bersatu dengan fibula, menurut Mc Farland dkk (1985) dalam Puniawati 1993 persatuan tulang membentuk segmen yang kuat untuk pergerakan. *R. Leucomystax* di ujung tulang jarinya berbentuk huruf Y yang akan mendukung bantalan berbentuk cakram dan secara bersama akan memberi kekuatan meningkatkan penekanan jari pada substrat (Puniawati, 1993) Menurut Berry (1975) dalam Puniawati

(1993) *R. leucomystax* memiliki kartilago intercalaris berupa segmen tambahan tulang kecil diantara phalanx I dan II. Menurut Hildebrand (1982) segmen tambahan di proximal phalanx I dapat berupa tulang rawan atau tulang.

Preparat *Cosymbotus platyurus*

Hasil yang didapatkan pada preparat skeleton cukup baik namun kurang sempurna, hal ini dikarenakan pada proses perendaman didalam larutan KOH 1% kurang begitu lama, padahal specimen memiliki daging yang lebih tebal dibandingkan bahan yang lainnya. Tidak dilakukan eksfoliasi dan vicerasi juga menjadi salah satu faktor. selain itu tidak sempurna morfologi umum ditandai hilangnya bagian ekor saat proses penangkapan membuat struktur menjadi tidak lengkap.

Menurut pendapat Rozikuliyeva (2012) dalam Syarifah (2012) , menyatakan bahwa pencucian yang tidak baik akan mengakibatkan organ tidak transparan ketika proses *clearing*. Larutan garam fisiologis yang bisa dipakai ialah NaCl 0.8-0.9%, Larutan Ringer (NaCl, CaCl, KCl, K₂CO₃, air untuk hewan berdarah panas dan NaCl, CaCl, KCl, Na₂CO₃, air untuk hewan berdarah dingin). NaCl merupakan larutan fisiologis yang umumnya digunakan, biasanya dalam waktu 15 menit. Ketika menggunakan larutan ini tidak diperbolehkan untuk mencuci dengan air agar jaringan tidak membengkak. (Rachman, 2004).

Preparat *Lonchura leucogastroides*

Preparat skeleton dari specimen *L. Leucogastroides* menunjukkan hasil yang cukup baik. Hasil menunjukkan skeleton dapat dilihat dan terwarnai.

Awetan transparan dengan proses vicerasi. Namun hasil masih jauh dari sempurna karena specimen tidak dihilangkan bagian otot dan kulit, dengan protokol yang identik preparat lain diduga proses pelunakan kurang lama sehingga warna dari alcian blue khususnya tidak terserap. Tahap akhir pada perendaman gliserin juga tidak dilakukan karena ketidakteitian dalam memahami protokol. Kondisi specimen yang tertinggal di KOH 1 % dengan waktu yang lama menyebabkan tekstur skeleton melunak dan rapuh. Perendaman KOH 1 % yang terlalu lama dapat menyebabkan hilang atau hancurnya organ-organ kecil pada hewan missal, ekor, sirip, dan sebagainya akibat pengelupasan kulit dan organ.

Preparat *Mus musculus*

Specimen diambil dari awetan basah yang sudah diawetkan cukup lama. Proses Eksfoliasi dari kulit mencit 1 hari tidak dilakukan karena ukuran yang kecil, hal ini diduga menyebabkan dyes tidak masuk secara optimal. Proses vicerasi juga tidak dilakukan sehingga specimen di proses utuh tanpa pembedahan. Perendaman dalam KOH 1% dalam waktu yang kurang optimal juga menyebabkan otot menjadi kurang transparan. Idealnya Alcian blue akan terserap sempurna karena yang digunakan adalah fetus mencit usia 1 hari. Kartilago umumnya dijumpai pada persendian dan tengkorak, namun pada specimen tidak dijumpai sama sekali. Justru bekaspotongan plasenta terwarnai hijau kebiruan. Secara umum struktur skeleton teramati, namun kurang jelas karena kurang jernih.



Gambar 2. Perbandingan Ekstremitas dari preparat Inouye. Kiri ke kanan: Digiti *R. Leucomystax*, Sayap *L leucogastroides*, tungkai *C platyurus*

Spesifikasi pada ekstremitas menunjukkan perbedaan pada ketiga kelas. Pada *R. Leucomystax* memiliki kartilago intercalaris berupa segmen tambahan tulang kecil diantara phalanx I dan II. (Ditunjukkan dengan panah). Pada pergelangan juga terwarnai alcian blue. Hal ini menunjukkan komposisi kartilago pada persendian yang menunjang untuk lokomosi serta meredam benturan antar tulang atau osteum.

Ekstremitas superior pada *L leucogastroides* menunjukkan ketidakhadiran warna alcian blue pada hubungan persendian. Kondisi ini disebabkan karena kurang presisinya komposisi bahan pewarna dan waktu perendaman.

Specimen *C platyurus* juga terlihat kurang sempurna. Pada beberapa segmen digiti mengalami kerusakan berupa amputasi dan hilang. Kondisi ini disebabkan karena pada tahap akhir specimen belum ditempatkan di gliserin murni sehingga masih ada kandungan KOH yang menyebabkan rangka menjadi rapuh.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Hasil eksperimen yang paling baik ditemukan pada *Rachopophorus leucomystax*, kemudian *Carassius auratus*, cukup baik pada *Cosymbotus platyurus* dan kurang baik pada *Lonchura leucogastroides* dan *Mus musculus*.

2. Eksperimentasi dengan hasil baik disebabkan karena protokol dilaksanakan dengan tepat, sedang hasil cukup dan kurang baik disebabkan karena ketidaktepatan proses eksfoliasi, vicerasi, perendaman dalam larutan KOH, lama waktu perendaman, staining dan clearing.
3. Hampir semua skeleton pada vertebrata teramati dan terwarnai merah pada osteum dan biru pada kartilago
4. Eksperimentasi sebaiknya dikembangkan lebih lanjut untuk penyederhanaan bahan dengan menggunakan dyes alami yang relatif murah dan terjangkau sehingga bisa diaplikasikan di level pendidikan dasar dan menengah.

DAFTAR PUSTAKA

- Bevalender. 1988. *Dasar - dasar Histologi*. Erlangga, Jakarta.
- Hildebrand, M. 1982. *Analysis of Vertebrate Structure*. John Willey and Son. New York
- Inouye, M. 1976. Differential staining of cartilago & bone in fetal mouse skeleton by Alcian Blue & Alizarin Red S. *Congenital Anomalies*. 161(3): 171-173

- Junqueira. 1995. *Basic Histology*. Appleton & Lange. New York.
- Karyadi. 2003. Pemberian Rasio Kalsium dan Fosfor Terhadap Osifikasi Tulang Embrio Puyuh. *Jurnal Penelitian UNIB* vol 6(7). pp. 47-59.
- Nugroho, A. E. 2011. *Evaluasi Pewarnaan Alcian blue Terhadap Sel Mast Jaringan Ikat Dari Preparat Beku Jaringan Kulit Kaki Tikus*. (<http://jurnal.ump.ac.id> . Diakses 30 Agustus 2016
- Puniawati, N. 1993. The Structure and Function of Tree Frog's Limb. *Biologi* Vol 1 no 6 pp 263- 272
- Puspitasari,D., Johanes D B., Gatot S. 2015 Kunyit (*Curcuma domestica* Val.) Sebagai Pewarna Alternatif Pewarnaan Tulang Embrio Ayam (*Gallus-gallus*) *BioEdu Berkala Ilmiah Pendidikan Biologi* Vol.4 No.1 pp 827-831
- Setyawati, S., Yulihastuti, D.A. 2011. Penampilan Reproduksi dan Perkembangan Skeleton Fetus Mencit Setelah Pemberian Ekstrak Buah Nanas Muda. *Jurnal Veteriner* Vol. 12(3). pp. 192-199
- Rachman, Abdul dan M. J, Luthfi (2004). Studi histokimia Kalsifikasi Skeleton Regenerat Ekor Cicak (*Hemidactylus* sp). *Berkala Ilmiah Biologi* 2004, III(4)
- Rudiyatmi, Eli. (2012). *Bahan Ajar Mikroteknik*. Semarang : Jurusan Biologi FMIPA UNNES
- Soeminto. 2002. *Embriologi Vertebrata* . Fakultas Biologi UNSOED. Purwokerto.
- Somasundaran, P., Fu, E. 1986. Alizarin Red S as a Flotation of Modyfing Agent in Calcitat-Apatite System. *International Journal of Mineral Processing*, Vol. 18. pp. 287-296.
- Syarifah, Azkiya .Z. (2012). *Kalsifikasi Skeleton Aksial dan Segmentasi Muscular Regenerat Ekor Tokek (Gekko Gecko Linnaeus, 1758)*. Skripsi Thesis, Perpustakaan Uin Sunan Kalijaga. (Tidak dipublikasi)