

Teknik Pembuatan Sediaan Mikroskop Elektron

Oleh: Daryanto

Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Daryanto — *Technique of preparing tissues for electron microscopy*

This article describe a practical method in making preparation of animal tissues for electron microscopy. This method has been carried out on rat tissue in the Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

Problems in fixation, dehydration, infiltration, embedding, sectioning and cutting, and staining are discussed. The author emphasized the needs for doing tissue work with an electron microscope in tune with the development of histology in Indonesia.

Key Words: electron microscope — practical methods in eletron microscopy — histochemistry — sectioning — fixation

PENDAHULUAN

Penulisan naskah ini merupakan hasil laporan sementara sebagian penelitian kami yang dikerjakan di Mahidol University, Bangkok, pada bulan Juni sampai dengan bulan Juli 1979. Tulisan ini dimaksud sebagai sumbangan dasar pengetahuan tentang cara membuat sediaan mikroskop elektron, yang mungkin diperlukan oleh para peneliti yang akan membuat sediaan mikroskop elektron, juga berkenaan akan segera datangnya mikroskop elektron baru di Universitas Gadjah Mada.

Tujuan pemeriksaan dan observasi dengan mempergunakan mikroskop elektron ini ialah untuk memperoleh data yang paling lengkap tentang struktur sel serta perubahan-perubahan yang terjadi. Dasar tahap pembuatan sediaan untuk mikroskop elektron ini sama dengan untuk mikroskop cahaya, tetapi ada beberapa zat kimia saja yang berbeda. Juga ada sedikit perbedaan antara cara pembuatan sediaan ini untuk jaringan binatang dengan tumbuh-tumbuhan. Untuk hal ini akan diuraikan saja teknik pembuatan sediaan jaringan binatang.

CARA DAN BAHAN PERCOBAAN

Pokok-pokok pembuatan sediaan ini dapat dibagi menjadi tahap:

- I. Tahap pengambilan jaringan
- II. Tahap fiksasi
- III. Tahap dehidrasi dan infiltrasi
- IV. Tahap *embedding*
- V. Tahap *sectioning/cutting* = pengirisan

VI. Tahap *staining* = pewarnaan

VII. Tahap *mounting*.

Tahap VII ini hanya pada pembuatan sediaan mikroskop cahaya, sedangkan untuk mikroskop elektron *tidak*.

I. Tahap pengambilan jaringan/specimen

Specimen, baik dari jaringan/atau organ binatang atau manusia yang akan dibuat sediaan (preparat) diambil dari tubuh binatang atau manusia yang baru. Maksudnya binatang percobaan dibunuh dan dengan segera diambil jaringan atau organ yang dimaksud. Jaringan yang diambil segera dimasukkan ke dalam zat fiksatif.

II. Tahap fiksasi

Pertama-tama harus diperhatikan bahwa larutan fiksasi ini selama dipergunakan maupun selama penyimpanan selalu pada temperatur 4°C. Selama dipergunakan, tuangkan larutan fiksasi ini ke dalam vial kecil-kecil dan vial-vial tersebut ditempatkan dalam bak-bak plastik yang berisi es. Potonglah specimen tersebut menjadi potongan kecil-kecil, sebesar kepala jarum, dengan mempergunakan pisau silet yang baru dan tajam. Pisau silet (*razor blade*) yang tumpul akan menyebabkan kurang baiknya hasil yang akan diperoleh.

Macam: Larutan fiksasi yang dipergunakan ada dua macam:

1. Fiksatif pertama: 2,5% glutaraldehyde dalam 0,1 M buffer fosfat
2. Fiksatif-lanjut : 1% osmium tetroxide (OsO_4) dalam 0,1 M buffer fosfat.

Cara pembuatan larutan fiksatif:

ad 1: 2,5% glutaraldehyde dalam 0,1 M buffer fosfat. Campuran:

– 25% glutaraldehyde (<i>stock solution</i>)	10 ml
– Aqua dest.	40 ml
– 0,2 M buffer fosfat pH 7,4	50 ml

Simpan larutan ini dalam almari es dengan temperatur 4°C.

Pembuatan larutan buffer fosfat 0,2 M. Ambil dan campurkan:

– <i>Monobasic Sodium Phosphat</i> ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	27,6 gram
Yang dilarutkan dalam aqua dest. sampai volume	1 000 ml. (1)
– <i>Dibasic Sodium Phosphate</i> ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	53,6 gram
yang dilarutkan dalam aqua dest. sampai volume	1 000 ml. (2)

Campurkan *larutan 1* sebanyak 19 ml dengan *larutan 2* sebanyak 81 ml. Ukur pH supaya mencapai 7,4 dengan mempergunakan pH-meter.

ad 2: 1% osmium tetroxide dalam 0,1 M buffer fosfat

Diambilkan dari larutan persediaan (*stock solution*) 2% OsO_4 .

Campurkan sama banyak larutan 2% osmium tetroxide dengan larutan buffer fosfat 0,2 M, dan pH 7,4.

Catatan: Agar diperhatikan pada pemakaian OsO_4 ini:

1. Uap osmium tetroxide ini sangat merangsang dan berbahaya bagi membran mukus dan kulit, terutama membran mukus saluran nafas dan mata.
2. Larutan ini akan rusak oleh adanya kontaminasi. Pembuatan larutan ini pada tempat sebersih mungkin, bebas debu dan dikerjakan dalam almari asam dengan penyedot udara.

Volume: volume larutan fiksatif ini kurang lebih 2—3 ml.

Waktu: baik untuk glutaraldehyde maupun osmium tetroxide masing-masing selama $1\frac{1}{2}$ jam.

Proses: fiksasi ini dikerjakan dalam larutan glutaraldehyde, kemudian dicuci sebentar dengan larutan buffer fosfat, dilanjutkan dengan fiksasi dengan larutan osmium tetroxide, dicuci kembali dengan larutan buffer fosfat.

Temperatur: tetap diatur supaya tetap 4°C .

Terus masuk tahap berikutnya, yaitu dehidrasi.

III. Dehidrasi

Proses ini pelaksanaannya bertahap, mempergunakan alkohol mulai dengan konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi.

Cara: Tuangkan pada botol specimen berturut-turut:

1. alkohol 50% selama 5 menit,
2. alkohol 70% selama 5 menit,
3. alkohol 80% selama 5 menit,
4. alkohol 90% selama 5 menit;

semua tahap dehidrasi dengan alkohol tersebut di atas dikerjakan dengan alkohol bertemperatur 4°C . Cara itu dimungkinkan dengan menaruh semua botol alkohol dalam almari es, sedangkan botol specimen yang sudah diberi alkohol tersebut segera ditempatkan dalam almari es.

Tahap berikut dikerjakan pada temperatur kamar:

5. alkohol 95% selama 5 menit,
6. alkohol 100% selama 10 menit,
7. alkohol 100% selama 10 menit.

Infiltrasi

Dipergunakan 2 macam larutan:

1. larutan campuran antara propylene oxide (P. O.): plastic = 2:1
2. larutan campuran antara propylene oxide (P. O.): plastic = 1:2

Waktu: dalam larutan 1, selama 1 jam, sedangkan dalam larutan 2 selama 1 malam.

Cara: infiltrasi ini mempergunakan *beam-capsule*, bukan pada *vial*/botol lagi. Memindahkan specimennya dengan pertolongan tusuk gigi atau lidi.

Untuk mempermudah pengambilan specimen tersebut, buang larutan dehidrasinya sehingga tinggal specimen saja yang tertinggal.

IV. *Embedding*

Tempat untuk *embedding* ini ada beberapa macam, antara lain dapat disebutkan di sini:

- a. *beam capsule*,
- b. *plastic pill bottle tops*,
- c. *flat plastic embedding molds*.

Dalam percobaan ini dipakai *flat plastic embedding molds*.

Bahan: *plastic*.

Cara pembuatan bahan: — campurkan larutan-larutan tersebut di bawah ini:

1. Araldite 502 27 ml
2. DDSA (Dodeceny succinic anhydride) 20 ml (sebagai pengeras)
3. DMP-30 (Tridimethyl amino methyl phenol) 1 ml (sebagai accelerator).

Larutan ini disimpan dalam tabung suntikan plastik (*disposable*) kapasitas 50 ml dan selalu disimpan dalam almari es.

Cara *embedding*:

1. berilah tanda atau nomer pada setiap lekukan *flat plastic embedding molds* dengan cara menaruh sepotong kertas kecil bernomor,
 2. tuangkan bahan *plastic* tersebut ke dalam setiap lekukan sampai hampir penuh,
 3. pindahkan specimen tersebut dari *beam capsule* ke dalam lekukan-lekukan, dengan pertolongan tusuk gigi. Pada setiap lekukan ada satu specimen saja,
 4. arahkan atau tempatkan specimen tersebut pada ujung lekukan.
- Tempatkan dan biarkan *flat plastic embedding molds* ini pada temperatur 30°C selama 1 hari.
- Kemudian pindahkan *flat plastic embedding molds* ini dalam *incubator* dengan temperatur 45°C selama 2 hari,
- Pindahkan lagi ke dalam *incubator* bertemperatur 60°C selama 2 hari.
- Specimen dalam blok-blok *plastic* keras siap untuk dipotong atau diiris.

V. *Sectioning*

Macam alat: untuk pengirisan (*sectioning*) blok-blok *plastic* ini dipergunakan *ultra-microtome* merk Sorval "Porter-Blum", Model MT-2.

Cara: dua tahap pengirisan (*sectioning*):

- a. irisan semi-tipis (*semi-thin section*), 600 — 800Å.
- b. irisan tipis, 150 — 300Å.

Pisau yang dipakai ialah pisau-gelas, yang diperoleh dengan memotong lembar gelas dengan alat *LKB Knife Maker Model 7800*. Pisau gelas dengan bentuk segitiga siku-siku di bagian sebelah atas diselubungi *tape*, kemudian diisi air (aqua dest.), sehingga irisan-irisan ini akan mengapung di air.

- a. Irisan semi-tipis ini pertama-tama diambil dan diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan pewarnaan methylen biru, untuk mengetahui apakah sediaan tersebut sudah betul.
- b. Irisan tipis ini di dalam refraksi cahaya yang dilihat pada mikroskop pada *ultramicrotome* tersebut sederetan warna-warna. Warna preparat yang tipis atau cukup tipis ialah abu-abu atau perak.

Irisan diambil dengan cara menyaring irisan tipis tersebut pada *grid*. Keringkan *grid* yang berisi irisan pada kertas filter. Kemudian diwarnai.

VI. Staining

Bahan pulas yang dipergunakan ada 2 macam: 1. *Uranyl acetate*
2. *Lead citrate*.

ad 1. *Uranyl acetate*

Cara pembuatan larutan: Larutan *uranyl acetate* dalam alkohol atau methanol absolut sampai jenuh.

Cara pewarnaan: Taruhkan beberapa tetes larutan ini dalam *petri dish*, yang dasarnya dilapisi parafin. Taruhkan *grid* tengkurap pada setiap tetes larutan, satu *grid* pada setiap tetes dan tutuplah *petri dish*nya.

Lama pewarnaan: 25 -- 30 menit.

Cuci *grid* tersebut dengan methanol *absolute*.

Keringkan *grid* tersebut pada kertas filter

ad 2. *Lead citrate*

Cara pembuatan larutan: 0,2 gram *lead citrate* ditambahkan aqua dest.; aqua dest. harus baru. Larutannya ditempatkan pada tabung-tabung *centrifuge* serta hindarkan atau keluarkan gelembung-gelembung CO_2 . Tambahkan larutan 10 N NaOH sebanyak 0,1 ml. tutup erat-erat dan gojog.

Cara pewarnaan: Cara seperti tersebut di atas ad 1. Tambahkan pada sekeliling setiap tetes *lead citrate* butir-butir NaOH, yang gunanya untuk mengisap atau mengabsorpsi CO_2 serta untuk mencegah terjadinya pengendapan PbCO_3 .

Simpan larutan ini dalam botol tertutup erat di dalam almari es.

Lama pewarnaan: diwarnai dengan *lead citrate* ini selama 20 menit.

Kemudian cuci berturut-turut:

1. dengan larutan 0,01 N NaOH
2. aqua dest.

Keringkan *grid* tersebut di atas kertas filter.

Dari *grid* ini siap untuk diperiksa di bawah mikroskop elektron.

KEPUSTAKAAN

- Glauert, Audrey M. 1977 *Practical Methods in Electron Microscopy*, vol. 1-6. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Hayat, M. A. 1970 *Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Application*, vol. 1-3. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Koeller, James K. 1978 *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy II Specified Ultrastructural Probes*. Springer Verlag, Berlin.
- Meek, Geoffrey 1970 *Practical Electron Microscopy for Biologist*. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons Ltd., London.
- Pease, Daniel C. 1960 *Histological Techniques for Electron Microscopy*. Academic Press, New York.
-