

Pengaruh lama perendaman alizarin red terhadap kadar warna rangka fetus mencit (*Mus musculus* L) untuk bahan praktikum dan penelitian di laboratorium

Ali Bakri, Endang Pujilingsih, Mohamad Hambali, Mohammad Kanedi

Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung

Bandar Lampung, Indonesia

EMAIL: alibakri92@gmail.com

Abstract—Pewarna yang lazim digunakan pada pewarnaan tulang keras fetus umumnya adalah alizarin red. Masalahnya, seringkali warna rangka fetus yang dihasilkan kurang kontras dan kurang tajam. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama perendaman dengan alizarin red terhadap kekontrasan warna rangka fetus mencit. Penelitian ini menggunakan enam kelompok mencit masing-masing terdiri atas empat ulangan. Lama perendaman yang diterapkan pada setiap kelompok secara berurutan adalah 30, 60, 90, 120, 150, 180 menit. Hasil penelitian yaitu pada perendaman 30 dan 60 menit, bagian costae dan cauda spinalis belum terwarnai dengan sempurna sehingga tidak tampak jelas. Sedangkan pada perendaman 90, 120, 150, dan 180 menit bagian costae dan cauda spinalis telah terwarnai dengan baik dan dapat dilihat dengan jelas. Kesimpulan, waktu perendaman fetus dengan alizarin red 0,6% yang menghasilkan ketajaman dan kekontrasan warna tulang paling baik adalah 90 menit.

Keywords—alizarin red, pewarnaan fetus, lama perendaman, mencit

I. PENDAHULUAN

Embriogenesis merupakan proses perkembangan bentuk zigot, dari bentuk sederhana satu sel akan berkembang bentuk multiseluler karena terjadi pembentukan organ tubuh (organogenesis) [1]. Salah satu proses yang terjadi saat organogenesis adalah osifikasi. Osifikasi adalah proses pembentukan tulang. Proses osifikasi terjadi pada masa perkembangan fetus (prenatal) dan setelah individu lahir (postnatal). Tulang merupakan bagian tubuh yang memiliki fungsi utama sebagai pembentuk rangka dan alat gerak tubuh, pelindung organ organ internal, serta tempat penyimpanan mineral (kalsium-fosfat) [2].

Pewarnaan tulang adalah suatu cara untuk mengetahui perkembangan penulangan (osifikasi) pada tulang embrio mulai dari awal perkembangan hingga menjadi sempurna (Puspitasari, 2015). Pewarnaan tulang fetus merupakan bagian penting dari pengamatan bidang embriologi dan struktur

perkembangan hewan. Preparat hasil pewarnaan ini yang selanjutnya digunakan sebagai media pembelajaran saat praktikum mahasiswa dan atau penelitian-penelitian yang berhubungan dengan pembentukan tulang.

Pewarnaan tulang dibagi menjadi dua, yaitu pewarnaan tulang rawan dan pewarnaan tulang keras. Pewarna yang digunakan pada pewarnaan tulang keras umumnya adalah alizarin red. Alizarin red berguna sebagai pendeteksi adanya proses kalsifikasi di daerah tulang yang terwarnai. Alizarin Red mampu terserap oleh osteum (tulang keras), bersifat asam memberikan warna merah keunguan pada tulang. Hal ini dikarenakan adalah perbedaan muatan pada alizarin red sebagai pewarna dan osteum sehingga osteum dapat terwarnai [3].

Di Laboratorium Zoologi FMIPA UNILA, pewarnaan tulang sering dilakukan saat penelitian dibidang embriologi untuk mengetahui pertumbuhan embrio dan teratologi untuk mengetahui adanya malformasi atau cacat pada embrio. Beberapa penelitian dalam mengamati tulang fetus mencit setelah pemberian perlakuan, menemui permasalahan yaitu kualitas warna preparat fetus yang dihasilkan masih rendah.

Ada beberapa masalah yang sering terjadi pada hasil pewarnaan antara lain adalah warna preparat yang tampak gelap, tampak gelembung yang mengganggu pada saat proses pengamatan, organ yang tidak transparan, tekstur skeleton terlalu melunak atau rapuh, kurang jernih dan zat warna yang tidak terserap.

Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas warna hasil pewarnaan dengan alizarin red adalah lama perendaman. Saat ini belum diketahui lama perendaman fetus mencit dengan menggunakan alizarin red yang tepat. Kualitas warna preparat fetus yang rendah dapat menimbulkan kesulitan atau bahkan kesalahan dalam pembacaan hasil penelitian. Perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan lama perendaman fetus mencit dengan menggunakan alizarin red yang optimal [4].

Mencit merupakan hewan yang sering digunakan sebagai hewan laboratorium. Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium karena

memiliki kelebihan seperti siklus hidup relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah ditangani, serta struktur anatomi dan fisiologinya yang mempunyai kemiripan dengan manusia. Mencit sering kali digunakan untuk penelitian yang berkaitan dengan embriologi dan secara luas digunakan sebagai model perkembangan embrio bagi mamalia secara umum. Di samping masa kehamilannya cepat 18-21 hari, mencit punya anakan yang banyak sekitar 6-12 ekor [5].

Sudah diketahui bahwa salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas warna hasil pewarnaan dengan alizarin red adalah lama perendaman [3]. Hanya saja belum diketahui pasti berapa lama perendaman fetus mencit dengan menggunakan alizarin red yang tepat.

Untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh lama perendaman alizarin red terhadap kualitas warna kerangka fetus mencit (*Mus musculus*). Manfaat penelitian ini adalah menghasilkan preparat embriologis yang dapat digunakan dalam praktikum mengamati struktur tulang keras pada fetus.

II. BAHAN DAN METODE

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama 5 bulan, dari bulan Juli sampai November 2020. dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Kandang Hewan Coba Jurusan Biologi FMIPA UNILA. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

B. Hewan Coba dan Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan pola percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam perlakuan dengan empat kali ulangan per perlakuan sesuai hasil perhitungan dengan rumus Federer. Prosedur penelitian ini adalah sebagai berikut:

Dua puluh ekor mencit (*Mus musculus L.*) betina, belum pernah kawin, usia tiga sampai empat bulan, dengan berat 25-30 gram, daur birahi/siklus estrus teratur 4-5 hari, diadaptasikan selama satu minggu (aklimatisasi). Disiapkan juga 20 ekor mencit jantan untuk mengawini mencit betina, usia 3-4 bulan, dengan berat 25-30 gram [6].

Mencit dipelihara di kandang hewan Laboratorium Zoologi, FMIPA UNILA. Mencit diaklimatisasi selama 7 hari dengan kondisi kandang dan pakan komersial berupa BR2. Air minum yang diberikan merupakan akuades secara *ad libitum*. Mencit dipelihara dalam kandang beralaskan sekam dalam suhu ruang 21,11-22,22°C dengan kelembaban udara 45-55% [7].

Sinkronisasi siklus estrus dilakukan secara alami dengan metode Efek Whitten. Mencit yang akan disinkronisasi ditempatkan dalam kandang bersekat untuk memisahkan mencit betina dari mencit jantan (umur 2-3 bulan). Jumlah mencit yang ditempatkan dalam masing-masing kandang adalah empat ekor betina dan satu ekor jantan. Sinkronisasi dengan

menggunakan metode Efek Whitten dilakukan selama tiga hari. Pada hari keempat masing-masing mencit betina dilakukan pemeriksaan siklus estrus dengan melihat hasil apus vagina dengan pewarnaan Giemsa [6].

Mencit yang estrus dipindahkan ke dalam kandang individu untuk dikawinkan dengan mencit jantan dengan perbandingan jantan dan betina 1:1 (*single mating*). Pemeriksaan sumbat vagina dilakukan pada pagi hari berikutnya untuk memastikan mencit tersebut telah kawin. Mencit betina dengan sumbat vagina positif dipisahkan dari mencit jantan dan ditempatkan dalam kandang individu. Hari terlihat adanya sumbat vagina ditandai sebagai hari kebuntingan pertama (H-0) [8].

Pada kebuntingan hari ke-18 (sehari sebelum kelahiran normal) mencit dimasukkan ke dalam wadah tertutup kemudian diberi kapas yang telah dibasahi eter agar terbius dan dikorbkan nyawanya kemudian dibedah untuk pemeriksaan fetus [6].

C. Pelaksanaan Pewarnaan

Embrio pada tikus bunting berumur 18 hari dibedah bagian perut dan uterusnya. Kemudian fetus diambil dan diletakkan dalam gelas ukur. Fetus direndam dalam larutan fiksatif alkohol 96% selama 2x24 jam. Larutan Alkohol 96% diganti dengan larutan KOH 1% selama 90 menit. Larutan KOH 1% dibuang dan diganti akuades [7].

Selanjutnya diganti larutan Alizarin Red 0,6%. Lama perendaman alizarin red masing-masing perlakuan dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 1. Lama perendaman fetus dalam alizarin red menurut kelompok

Kelompok	Waktu perendaman
1	30 menit
2	60 menit
3	90 menit
4	120 menit
5	150 menit
6	180 menit

Setelah perlakuan dengan Alizarin red selesai selanjutnya fetus dilakukan pembenihan dengan larutan KOH 2% selama 24 jam sampai badan fetus terlihat bening (Purwatiningsih dkk., 2019). Penjernihan bertingkat KOH: gliserin yaitu 3:1, 1:1, dan 1:3. Terakhir disimpan dalam gliserin murni agar tulang menjadi awet [9].

Metode pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara pengamatan langsung menggunakan mikroskop stereo, dari pengamatan langsung tersebut kemudian fetus yang telah terwarnai difoto dengan menggunakan kamera Nikon D 500. Selanjutnya diadakan pengamatan terhadap struktur tulang fetus mencit. Faktor yang diamati adalah kejelasan tulang dan kontras warna tulang [10].

Indikator kejelasan tulang fetus yang diamati adalah seperti disajikan pada Table 2.

Tabel 2. Indikator ketajaman/kejelasan tulang fetus

No	Kriteria	Indikator
1	Sangat jelas	Apabila dapat mewarnai struktur tulang dengan sangat jelas, sehingga dapat dibedakan antara tulang dengan jaringan tubuh fetus yang lain.
2	Jelas	Apabila dapat mewarnai struktur tulang dengan jelas, sehingga dapat dibedakan antara tulang dengan jaringan tubuh fetus yang lain.
3	Tidak jelas	Apabila struktur tulang tidak dapat dibedakan dengan jaringan tubuh fetus yang lain

Indikator kekontrasan warna tulang fetus yang diamati disajikan pada Table 3.

Tabel 3. Indikator kekontrasan warna tulang fetus

No	Kriteria	Indikator
1	Sangat Kontras	Apabila warna dapat terikat sangat kuat pada tulang atau tidak mewarnai jaringan tubuh yang lain
2	Kontras	Apabila warna dapat terikat kuat pada tulang atau tidak mewarnai jaringan tubuh yang lain
3	Tidak kontras	Apabila warna tidak dapat terikat pada tulang atau jaringan tubuh yang lain ikut terwarnai

D. Teknik Analisis Data

Proses analisis data disajikan dengan cara deskriptif kualitatif terkait kriteria kejelasan tulang dan kekontrasan warna tulang.

III. HASIL DAN DISKUSI

Hasil penilaian ketajaman warna tulang disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Deskripsi ketajaman warna tulang fetus

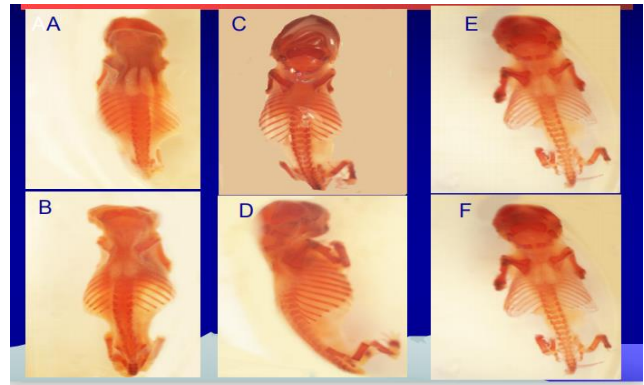
Kelompok	Ketajaman
1	Tidak jelas
2	Tidak jelas
3	Jelas
4	Jelas
5	Jelas
6	Sangat Jelas

Hasil penilaian kekontrasan warna tulang fetus disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Deskripsi ketajaman warna tulang fetus

Kelompok	Kekontrasan
1	Tidak kontras
2	Tidak kontras
3	Kontras
4	Kontras
5	Kontras
6	Sangat kontras

Tampilan visual hasil pewarnaan dengan alizarin red dengan waktu perendaman berbeda yang kualitas ketajaman dan kekontrasan tulangnya telah disajikan pada Tabel 4 dan 5 di atas, disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Tampilan rangka fetus mencit yang direndam dalam alizarin red dengan waktu perendaman berbeda. A) 30 menit; B) 60 menit; C) 90 menit; D) 120 menit; E) 150 menit; F) 180 menit

Foto pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pada perlakuan 1 dan perlakuan 2, bagian *costae* dan *cauda spinalis* belum terwarnai dengan sempurna sehingga tidak tampak jelas. Sedangkan pada perlakuan 3, 4, 5 dan 6 bagian *costae* dan *cauda spinalis* telah terwarnai dengan baik dan dapat dilihat dengan jelas.

Berdasarkan indikator kejelasan tulang fetus dan kekontrasan warna tulang fetus didapatkan hasil bahwa waktu perendaman alizarin red 0,6% yang paling optimal yaitu perlakuan 3 dengan waktu rendam 90 menit, dapat menghasilkan fetus mencit yang terwarnai alizarin red dengan jelas dan kontras. Perlakuan 3 dengan waktu 90 menit dipilih sebagai waktu perendaman yang optimal dikarenakan efisiensi waktu dan untuk menghindari kerusakan organ. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin lama perendaman akan menyebabkan tingkat kejelasan dan kekontrasan warna pada tulang fetus mencit.

Mencit dilakukan adaptasi atau diaklimatisasi selama 7 hari dengan kondisi kandang dan pakan komersial berupa BR2. Air minum yang diberikan merupakan akuades secara *ad libitum*. Mencit dipelihara dalam kandang beralaskan sekam dalam suhu ruang. Hal ini sesuai dengan penelitian Purwatiningsih dkk. (2019) [7].

Mencit diaklimatisasi selama 7 hari dengan kondisi kandang dan pakan komersial berupa BR2. Air minum yang diberikan merupakan akuades secara *ad libitum*. Pada saat aklimatisasi sebaiknya mencit dipelihara

dalam kandang beralaskan sekam dalam suhu ruang 21,11-22,22°C dengan kelembaban udara 45-55%. [5]. Dengan aklimatisasi hewan uji beradaptasi dengan lingkungan baru dan meminimalkan efek stres yang dapat mempengaruhi metabolisme dan mengganggu penelitian [11].

Sinkronisasi siklus estrus dilakukan secara alami dengan metode Efek Whitten. Mencit yang akan disinkronisasi ditempatkan dalam kandang bersekat untuk memisahkan mencit betina dari mencit jantan (umur 2-3 bulan). Induksi dan sinkronisasi estrus dilakukan dengan whitten effect yaitu meletakkan kandang sekelompok mencit betina dihadapkan dengan mencit jantan. Feromon yang terlibat dalam efek Whitten diekskresikan dalam urin jantan dewasa utuh dan produksinya bergantung pada androgen. Zat aktif kemih dapat menimbulkan berbagai respons endokrin pada tikus betina. Zat yang berasal dari jantan ini merupakan dua unsur volatil urin tikus jantan yaitu 2-(sec-butyl) -4,5-dihydrothiazole dan dehydro-exo-brevicomin, yang memiliki kemampuan untuk menginduksi siklus estrus pada mencit betina [12].

Hasil pewarnaan apus vagina didapatkan sel-sel epitel yang sudah mengalami kornifikasi, tidak memiliki inti inti dan dengan pewarnaan Giemsa berwarna biru. Ini menandakan mencit betina dalam keadaan estrus. Fase estrus memperlihatkan sel-sel epitel yang sudah mengalami kornifikasi, tanpa inti dan dengan pewarnaan Giemsa berwarna biru pucat [13].

Mencit yang dalam fase estrus digabungkan dalam satu kandang dengan mencit jantan pada sore hari, sehingga dapat kawin pada malam hari. Lalu pada pagi hari diamati adanya sumbat vagina pada mencit. Adanya sumbat vagina menandakan telah terjadi perkawinan dan dihitung sebagai hari kebuntingan ke-0. Hal ini sesuai dengan metode yang digunakan oleh Novriyanti dkk. yaitu penempatan mencit jantan dan betina dilakukan pada pukul 16.00 WIB. Keesokan paginya, diamati sumbat vaginanya sebagai tanda telah kawin. Jika tidak ditemukan sumbat vagina maka dilakukan pengambilan apusan vagina untuk melihat keberadaan sperma. Sperma yang terdapat pada apusan vagina menandakan mencit telah kawin. Kemudian, mencit yang telah kawin dipisahkan dan dipelihara sampai berumur 18 hari kebuntingan [14].

Pada kebuntingan hari ke-18 mencit di euthanasia dan dilakukan pembedahan serta koleksi fetus. Rata-rata panjang fetus mencit adalah 2,54±0,14 cm dan rata-rata berat fetus mencit adalah 1,26±0,07 cm. Mencit dibedah pada hari kebuntingan ke 18 dikarenakan masa kebuntingan mencit cukup pendek yaitu antara 18-21 hari [15].

Berdasarkan indikator kejelasan tulang fetus dan kekontrasan warna tulang fetus didapatkan hasil bahwa waktu perendaman alizarin red 0,6% yang paling optimal yaitu perlakuan 3 dengan waktu rendam 90 menit, dapat menghasilkan fetus mencit yang terwarnai alizarin red dengan jelas dan kontras. Waktu perendaman ini lebih singkat dari pada metode pewarnaan fetus mencit dengan alizarin red adalah

selama ±8 jam. Waktu perendaman yang lebih lama juga juga dimungkinkan yaitu spesimen direndam dalam larutan pewarna Alizarin Red S 0,01% dalam KOH 1% selama 24 jam sampai rangkanya tampak berwarna merah [16, 17].

Umumnya, prosedur pewarnaan ini meliputi fiksasi jaringan dalam formalin atau etanol, perendaman dalam kalium hidroksida (KOH) untuk menghilangkan jaringan lunak di sekitar tulang, pewarnaan dengan alizarin red S, dan pembersihan dalam konsentrasi gliserol yang bertingkat. Berbagai penulis telah memodifikasi protokol dengan menambahkan atau menghilangkan satu atau lebih dari langkah-langkah ini, tetapi prosedur utamanya tetap sama [18].

Alizarin merah digunakan untuk mengidentifikasi kalsium pada bagian jaringan dan sel yang dikultur secara in vitro karena membentuk *Alizarin Red S-calcium complex* dalam proses chelation dan produk akhirnya adalah warna merah cerah. Reaksi tidak hanya spesifik untuk kalsium, tetapi elemen ini biasanya tidak terjadi dalam konsentrasi yang cukup untuk mengganggu pewarnaan, sehingga cocok untuk mengidentifikasi deferensiasi kalsium yang terdeposit [19].

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan indikator kejelasan tulang fetus dan kekontrasan warna tulang fetus disimpulkan bahwa waktu perendaman alizarin red 0,6% yang paling optimal adalah 90 menit.

UCAPAN TERIMAKASIH

Para penulis mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada Direktorat Sumber Daya, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Republik Indonesia, atas hibah penelitian yang kami terima.

KONFLIK KEPENTINGAN

Para penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dalam publikasi ini

REFERENSI

1. Soenardirahardjo, B. P. 2017. *Teratologi Pada Hewan Dan Ternak*. Surabaya: Airlangga University Press.
2. Dewi, P., M. Sabri, E. Rahmi, M. Jalaluddin, N. Asmilia, dan A. Azhar. 2017. Density of lumbal vertebrae bone ovariectomized rat (*rattus norvegicus*) given the extract sipatah-patah (*cissus quadrangularis* salisb). *Jurnal Medika Veterinaria*. 11(1):39–44.
3. Puspitasari, D. 2015. Kunyit (*curcuma domestica* val.) sebagai pewarna alternatif pewarnaan tulang embrio ayam (*gallus-gallus*). *Berkala Ilmiah Pendidikan Biologi*. 4(1):827–831.

4. Sari, D. P., Suwarno, dan Harlita. 2018. Eksperimentasi Skeleton Vertebrata dengan Metode Inouye (Alizarin Red S dan Alcian Blue Method). 2018. 929–934.
5. Nugroho, R. A. 2018. *Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium*. Samarinda: Mulawarman University Press.
6. Setyawati, I. dan D. A. Yulihastuti. 2011. Penampilan reproduksi dan perkembangan skeleton fetus mencit setelah pemberian ekstrak buah nanas muda. *Jurnal Veteriner*. 12(3):192–199.
7. Purwatiningsih, W., D. E. Aryani, D. Vidiastuti, Y. Oktanella, dan A. Firmawati. 2019. Pengaruh triponil sulfat pada perkembangan fetus dan kelainan plasenta dalam menginduksi preeklamsia hewan model tikus *rattus norvegicus*. *Veterinary Biomedical & Clinical Journal*. 1(1):41–46.
8. Maria, V., K. Mohamad, dan A. Boediono. 2014. Pemaparan gelombang elektromagnetik telepon genggam pada mencit (*mus musculus albinus*) periode awal kebuntingan. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 2(1):36–41.
9. Sipriyadi, F. Lestari, A. Sundaryono, dan A. Ruyani. 2013. Uji teratogenisitas ekstrak kulit batang karas (*aquilaria malacensis*) pada fetus mencit (*mus musculus*). *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*. 321–325.
10. Wahyuni, S. 2015. Identifikasi preparat gosok tulang (bone) berdasarkan teknis pewarnaan. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi 2015*. 657–666.
11. Evennia. 2012. Efek Pemberian Susu Kacang Kedelai (*Glycine Max* (L.) Merr.) Terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Putih Jantan Galur DdY Yang Dibebani Glukosa. *Skripsi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
12. Jemiolo, B., S. Harvey, dan M. Novotny. 1986. Promotion of the whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83(12):4576–4579.
13. Sitasiwi, A. J. dan S. M. Mardiaty. 2016. Efek antifertilitas ekstrak air dari biji carica papaya terhadap keteraturan siklus estrus mencit (*mus musculus l.*). *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 1(1):68.
14. Novriyanti, E., R. Sumarmin, N. Zayani, dan S. A. Ramadhani. 2014. Pengaruh ekstrak biji kapas (*gossypium hirsutum l.*) terhadap reproduksi mencit betina (*mus musculus l., swiss webster*). *Jurnal Sainstek*. 6(1):16.
15. Muliani, H. 2011. Pertumbuhan mencit (*mus musculus l.*) setelah pemberian biji jarak pagar (*jatropha curcas l.*). *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 19(1):44–54.
16. Setyawati, I. 2009. Morfologi fetus mencit (*mus musculus l.*) setelah pemberian ekstrak daun sambiloto (*andrographis paniculata nees*). *Jurnal Biologi*. 13(2):41–44.
17. Tuwuh, P., M. S. Lucia, dan Riyanto. 2016. Efek teratogenik ekstrak ciplukan (*physalis minima linn.*) terhadap fetus mencit (*mus musculus*) galur sub swiss webster. *Jurnal Pembelajaran Biologi*. 3(1):8–21.
18. Liao, Y.-J., P.-C. Tang, L.-R. Chen, dan J.-R. Yang. 2020. A protocol for differential staining of cartilages and ossified bones in fetal and adult mouse skeletons using alcian blue and alizarin red s. *Journal of Histotechnology*. 1–6.
19. Lim, J. W. 2018. HBNP Incorporated, Aligned Nanofiber Scaffolds for Osteogenesis. *Tesis*. Seoul: Seoul National University.