

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Sediaan

Sediaan preparat merupakan salah satu upaya teknis laboratorium untuk dapat mengidentifikasi atau mengenali dan mengetahui morfologi parasit yang mengganggu manusia. Saat ini parasit yang masih banyak menginfeksi manusia adalah *Ctenocephalides felis* atau yang di sebut pinjal kucing (Iswara & Nuroini, 2017). Ketidaklayakan sediaan permanen bisa karena adanya kesalahan pada tahap proses pembuatan preparat. Pembuatan preparat tidak hanya melalui satu tahapan sehingga kesalahan pembuatan preparat tersebut dapat terjadi , kesalahan inilah yang membuat preparat kurang bagus diamati dan terlihat rusak. Kerusakan dapat meliputi preparat tidak terlihat jelas atau bagian tubuh parasit menjadi buram, preparat menjadi tidak utuh atau ada bagian-bagian dari tubuh spesimen yang rusak atau hilang, serta preparat tidak bertahan dalam jangka waktu yang lama (Widiyanti,2013).

Menurut (Latifa, 2015). Preparat adalah sampel spesimen yang di letakkan atau di oleskan pada permukaan objek glass atau slides dengan pewarnaan atau tanpa pewarnaan, yang selanjutnya dapat diamati di bawah mikroskop dan dapat di bedakan menjadi beberapa macam preparat yaitu: **Preparat sementara** (tidak tahan lama, mediumnya air atau bahan kimia yang mudah menguap). **Preparat semipermanen** (medianya gliserin atau pekan). **Preparat awetan** (jika telah di proses secara histologis kemudian diawetkan dengan *Canada balsam*).

Macam preparat berdasarkan metode pembuatan yaitu :

1. Whole mount

Membuat sediaan secara utuh. Contoh : sel tumbuhan atau hewan. Pembuatan preparat : sampel di potong setipis mungkin menggunakan micrtome kemudian di rendam dalam larutan Naoh 5% dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya di lakukan penjernihan dengan menggunakan pemutih komersial sebagai *clearing agent* dengan konsentrasi sebesar 50%. Perendaman dalam *clearing agent* ini dilakukan selama 1 jam dengan tujuan agar sampel menjadi jernih (transparan). Proses selanjutnya adalah dehidrasi bertingkat menggunakan alkohol mulai dari konsentrasi rendah hingga konsentrasi tinggi. Sampel di rendam dalam alkohol 30%,50%,70%,80%, masing-masing selama 10 menit. Kemudian di masukkan ke dalam alkohol untuk mengeraskan kembali bagian yang telah di clearing. Setelah proses *clearing* selesai, sampel di letakkan di atas objek glass yang berisi *Hoyer*, selanjutnya di tutup dengan cover glass, dan dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop (Harjati, Chairiyah, Kartika, & Handayani, 2009).

2. Smear (ulas)

Dengan cara mengulaskan atau menggoreskan di atas obyek glass sehingga mendapatkan selaput tipis. Contoh : darah, pollen.

pembuatan preparat : dengan mengambil sampel darah pada ujung jari kiri bagian tengah disiapkan dengan dikipas-kipaskan kearah kaki kemudian diurut dengan tangan kanan kearah ujung jari. Kemudian ujung jari dan jarum blood lancet disterilkan dengan alkohol 70% lalu ujung jari ditusuk dengan jarum dengan bantuan blood lancet pen dan darah dikeluarkan. Tetesan darah pertama diusap dengan kapas beralkohol dan tetesan berikutnya ditetaskan pada gelas benda A yang bebas lemak pada posisi 0,5 cm dari tepi kanan gelas benda A (3 menit), selanjutnya gelas benda B yang sisi pendeknya rata diambil dan ditegakkan di sebelah kiri tetesan

darah dengan kemiringan gelas benda B sebesar 45° lalu gelas benda B ditarik dengan hati-hati ke arah tetesan darah (ke kanan) sehingga terjadi kapilaritas dan tetesan darah merata di ujung sisi pendek gelas benda B. Selanjutnya gelas benda B didorong ke arah kiri gelas benda A dengan kuat dan kecepatan yang konstan, sehingga terbentuk film darah yang baik (tipis dan rata) (3 menit), lalu film darah dikeringanginkan pada rak pewarnaan yang datar dan bersih (5 menit). Setelah film darah kering selanjutnya semua permukaan film darah difiksasi dengan fiksatif metil alkohol lalu dikeringanginkan sampai kering (5 menit), kemudian semua permukaan film darah diwarnai dengan ditetesi zat warna giemsa 3% dan dikeringanginkan sampai kering (40 menit) lalu film darah dicuci dengan aquades dingin yang sebelumnya telah dididihkan (1 menit). Label dilekatkan pada ujung kanan gelas benda dengan posisi memanjang kemudian diamati pada mikroskop (E A setyobudi,2015).

3. Squash

Pembuatan preparat dengan cara di tekan dengan gelas penutup. Contoh : mitosis ujung akar bawang Merah.

Pembuatan preparat : bahan sampel yang digunakan antara lain ujung akar bawang merah (*Allium cepa*), larutan FAA, HCL, aquadest, pewarna safranin, xylol dan entelan. Prosedur pembuatan pertama dengan memecahkan akar bawang merah (*Allium cepa*) di dalam gelas plastik yang berisi air dengan cara menusuk bagian tengah bawang merah secara horizontal sedemikian rupa sehingga hanya bagian akarnya menyentuh air dan ditunggu selama kurang dari 1 minggu dengan asumsi bahwa akar bawang sudah muncul. Setelah selama kurang lebih 1 minggu, akar bawang merah (*Allium cepa*) telah muncul. Proses selanjutnya memotong akar bawang merah (*Allium cepa*) dengan panjang potongan 1 cm. Potongan akar bawang merah (*Allium cepa*) kemudian di fiksasi dengan larutan FAA kedalam botol flakon selama 24 jam. Fiksasi ini ditujukan agar kondisi fisiologis potongan akar bawang merah (*Allium cepa*) stabil

untuk jangka waktu tertentu sama dengan kondisi saat dipotong. Setelah proses fiksasi selesai potongan akar di pindahkan ke dalam beaker glass dan ditetesi HCL dan aquadest dengan perbandingan 1:10 kemudian di rebus sampai mendidih di atas hotplate sampai lunak. Hal ini bertujuan untuk melunakkan jaringan agar mudah di pejet di kaca objek glass. Langkah selanjutnya ialah memindahkan akar bawang merah (*Allium cepa*) ke dalam gelas arloji dan kemudian di cuci menggunakan aquadest selama 5 menit. Setelah proses pencucian selesai akar bawang merah di beri pewarna safranin selama 1 jam. Setelah proses pewarnaan selesai langkah berikutnya yaitu memindahkan akar bawang merah di atas kaca benda dan memejet akar bawang merah menggunakan jarum pentul sampai sel-sel terpisah kemudian akar yang sudah di pejet di tetesi xylol murni yang berfungsi sebagai zat untuk menjernihkan atau clearing suatu spesimen atau preparat sehingga memudahkan dalam pengamatan. Langkah terakhir adalah menambahkan enetelan dan menutup dengan kaca penutup kemudian di lakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan melihat mitosis yang terjadi pada akar bawang merah (*Allium cepa*) (M I B ulum).

4. Section

Pembuatan preparat dengan cara fiksasi (tergantung bahan) tumbuhan lebih lama butuh waktu efektif : kurang lebih 3 hari. Alat dan Bahan : Alat-alat yang digunakan dalam percobaan adalah botol flakon, kaca benda, kaca penutup, gelas arloji, silet, *cutter* mikroskop, oven, jarum ose, skapel, camera, dan inkubator sedangkan bahan-bahannya yaitu akar dan batang tumbuhan cabe, FAA, alkohol 30%, 50%, 70%, 80%, 100%, xylol, parafin, aquades, safranin dan enthelan.

Prosedur kerja pembuatan preparat section :

- 1) Mengambil tumbuhan cabe bagian akar dan batang yang masih muda.
- 2) Memotong akar dan batang 2 cm dimasukkan pada botol flakon.
- 3) Kemudian difiksasi dengan FAA selama 24 jam.
- 4) Dehidrasi dengan alkohol 50%, 70%, 80%, 100%, masing-masing 30 menit.
- 5) Tetesi alkohol : xylol, 3:1, 1:1, 1:3, masing-masing 30 menit.
- 6) Tetesi xylol murni 1 selama 30 menit.
- 7) Tetesi xylol murni 2 selama 20 menit dan 10 menit dalam inkubator (Hidayati A).

5. Maserasi

Pembuatan preparat dengan proses pemisahan serat dari pohon kayu yang keras.

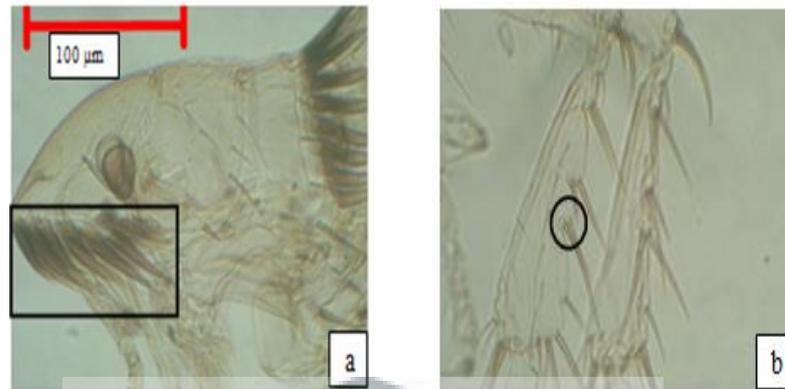
Pembuatan preparat : Metode ini dilakukan untuk pengukuran panjang dan lebar sel-sel serat, trakeid, diakukan dengan merujuk pada Sass(1958). Batang rotan dipotong-potong kecil setebal 3 mm. Potongan batang di masukkan dalam tabung reaksi berisi KOH 20% dan direbus hingga mendidih selama 2-5 menit. Bahan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit, lalu dimasukkan dalam campuran 20% asam kromat dan 20% asam nitrat dengan perbandingan 1:1 selama 2-3 jam (hingga bahan menjadi lunak). Bahan yang telah lunak dicuci dengan air selama 20 menit, lalu di dehidrasi dengan seri alkohol 30% hingga 100%, kemudian di masukkan ke dalam xylol murni dan diganti sebanyak 2 kali. Pewarnaan dilakukan dengan safranin 1% dalam alkohol 50% selama 16 jam. Bahan yang telah terwarnai dengan baik di pisah-pisahkan di atas objek, ditetesi canada balsam, dan ditutup dengan kaca pentup preparat siap diamati (Tellu, 2005).

Pembuatan preparat permanen *Ctenocephalides felis* ini menggunakan metode *whole mount*. *Whole mount* merupakan metode yang di gunakan adalah sampel utuh (Auliyawati. E,2013). Preparat ini digunakan hanya untuk pengamatan morfologi dan struktur *Ctenocephalides felis* secara umum saja.

B. *Ctenocephalides felis*

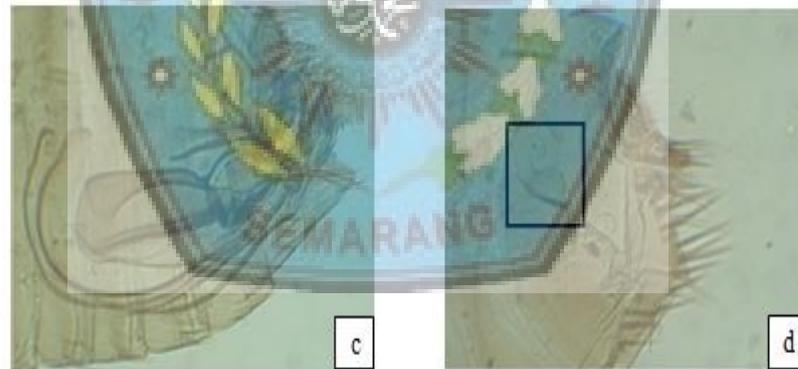
Ctenocephalides felis adalah salah satu pinjal yang mempunyai peranan penting dalam penularan penyakit, karena sebagai vektor berbagai penyakit pada hewan (*zoonosis*) maupun manusia. Sebagai ektoparasit, pinjal sering memberikan gangguan karena gigitannya dapat menyebabkan iritasi kulit. Spesies *Ctenocephalides felis* yang mempunyai ciri ciri morfologi sebagai berikut : ciri morfologi pinjal yang di temukan berdasarkan kunci identifikasi Wall & Shearer.(2001) merupakan spesies *Ctenocephalides felis* memiliki sisir pronotal dan sisir gena. Sisir gena terdiri atas delapan atau sembilan duri yang tersusun secara horisontal. Bagian depan kepala memiliki bentuk miring dan memanjang. Tibia pada tungkai bagian belakang memiliki enam bantalan seta. Ciri morfologi *Ctenocephalides felis* dalam Smit(1957), bahwa duri pertama pada sisir gena memiliki ukuran lebih pendek di bandingkan pada duri kedua. *Ctenocephalides felis* menurut Hadi dan Soviana,(2010) terbagi menjadi pinjal jantan dan betina. Pinjal jantan memiliki *aedeagus* atau *penis berkhitin* berbentuk seperti per melingkar yang terletak di antara segmen enam sampai segmen delapan bagian abdomen. Pinjal betina pada segmen yang sama memiliki kantung *spermateka* untuk menyimpan sperma sementara.

Berikut gambar morfologi *Ctenocephalides felis* :



Gambar 1. Morfologi *Ctenocephalides felis*.

Keterangan : 1a. Kepala pinjal *Ctenocephalides felis*, 1b. Tibia (tungkai) bagian belakang



Gambar 2. Morfologi *Ctenocephalides felis*.

Keterangan : 2c. aedeagus pada pinjal jantan, 2d. spermatheca pada pinjal betina.

(Basohofi, Soviana, & Ridwan, 2015).

C. Proses pembuatan preparat

Tahapan proses pembuatan preparat awetan *Ctenocephalides felis* diantaranya proses fiksasi, dehidrasi, clearing, infiltrasi parafin. Perlakuan pertama yaitu *Ctenocephalides felis* direndam dalam larutan KOH 10% selama 24 jam, kemudian dibilas dengan aquadest. Proses selanjutnya dengan perendaman ke dalam larutan alkohol 30% selama 15 menit sebanyak 3 kali. *Ctenocephalides felis* ditekan dengan 2 objek glass untuk mengeluarkan cairan dari dalam tubuhnya. Selanjutnya tubuh *Ctenocephalides felis* dimasukkan ke dalam larutan alkohol 5% dan 9% masing masing selama 15 menit dan diulang sebanyak 3 kali. Tahap selanjutnya *Ctenocephalides felis* dimasukkan kedalam larutan alkohol absolut selama 15 menit, kemudian dilanjutkan proses clearing dengan merendam dalam larutan xylol dengan variasi waktu. Proses clearing di lakukan sebanyak 2 kali, selanjutnya *Ctenocephalides felis* yang sudah melewati tahapan tersebut kemudian di tutup dengan deck glass yang sudah dikasih entelan sebagai perekatnya. Kemudian preparat siap diamati dengan mikroskop perbesaran 4 kali (Iswara & Wahyuni, 2017).

D. Clearing

Clearing adalah proses perendaman dengan larutan xylol selama 15 menit. Proses ini bertujuan untuk menjadikan struktur *Ctenocephalides felis* terlihat jernih dan transparan (Iswara & Wahyuni, 2017). Pada umumnya clearing menggunakan bahan xylol, akan tetapi bahan lain juga dapat di gunakan pada proses clearing antara lain dengan bahan toluen, benzol, aceton dan minyak cengkeh. Yang berfungsi menjadikan struktur morfologi *Ctenocephalides felis* terlihat terang dan jernih (Lael, Santosa, & Aryadi, 2018). Maka dari itu perlu di lakukan percobaan clearing dengan bahan lain sehingga dapat memungkinkan bahan tersebut lebih baik dari bahan sebelumnya.

E.Larutan toluen

Clearing adalah proses perendaman dengan larutan xylol selama 15 menit. Proses ini bertujuan untuk menjadikan struktur *Ctenocephalides felis* terlihat jernih dan transparan (Iswara & Wahyuni, 2017). Pada umumnya clearing menggunakan bahan xylol, akan tetapi bahan lain juga dapat di gunakan pada proses clearing antara lain dengan bahan toluen, benzol, acetone dan minyak cengkeh. Toluene memiliki keunggulan yaitu sedikit lebih ramah lingkungan karena terbuat dari minyak bumi mentah yang berasal dari pohon tolu, harganya lebih terjangkau, dan hasil pembuatan lebih jernih (Lael, Santosa, & Aryadi, 2018). Toluene diproduksi dalam bentuk cair dan digunakan sebagai bahan baku TNT, pelarut, pewarna, pembuat resin, juga untuk bahan parfum, pembuat plasticizer dan obat-obatan. Sumber/kegunaan: toluene merupakan bahan kimia yang paling banyak di produksi di AS. Dihasilkan dari penyulingan minyak mentah dan merupakan pelarut yang baik untuk cat, pernis, thinner, dan bahan perekat. Dalam paparan karat akan mengakibatkan penipisan benda dan menjadikan transparan (Warsito A.2007).

Adapun sifat-sifat kimia toluene sebagai berikut:

Rumus kimia :	$C_6H_5CH_3$
Bentuk :	Padat
	Dalam cairan
	Tidak berwarna
	Aroma seperti benzene
Berat molekul :	92,14
Densitas :	0,866 gram/cm ³
Titik beku :	-94,5°C

(Mahardika, 2011)

F. Larutan Xylol

Keuntungan dari penggunaan xylol adalah proses cepat dan mudah untuk di dapatkan dan terlalu mahal untuk kisaran harga. Namun syarat dari penggunaan zat ini adalah jaringan atau pinjal yang di pindahkan sebelum proses clearing harus berasal dari larutan alkohol absolute. Kerugian dari penggunaan zat ini adalah setelah di lakukan clearing jaringan tidak begitu transparan, sehingga sulit di tentukan apakah penejernihan sudah sempurna atau belum. Waktu jaringan atau pinjal di dalam cairan maksimal 120 menit. Jika dibiarkan terlalu lama akan mengakibatkan jaringan rapuh dan rusak (Prahanendra galang,2015). Xylol memiliki rumus atom $C_6H_4(CH_3)_2$ berat molekul 106,17 gram/mol dengan komposisi karbon (C) sebesar 90,5% dan hidrogen (H) 9,5% dan bersifat menjernihkan.

Oleh karena faktor keunggulan larutan toluen perlu dilakukan sebagai bahan proses untuk clearing dengan menggunakan variasi waktu yang berbeda.

G. Variasi waktu

Variasi waktu adalah proses yang digunakan untuk merendamkan spesiemen kedalam larutan clearing (toluen) sehingga mendapatkan hasil yang maksimal serta tidak menunggu terlalu lama. Hasil perendaman over night dapat memperlihatkan struktur tubuh *Ctenocephalides felis* yang lebih jelas, jernih, dan transparan, lamanya waktu yang dibutuhkan masih kurang efektif sehingga perlu dilakukan penggunaan waktu yang lebih singkat (Iswara A dan Wahyuni T,2017).

H. Sumber kesalahan

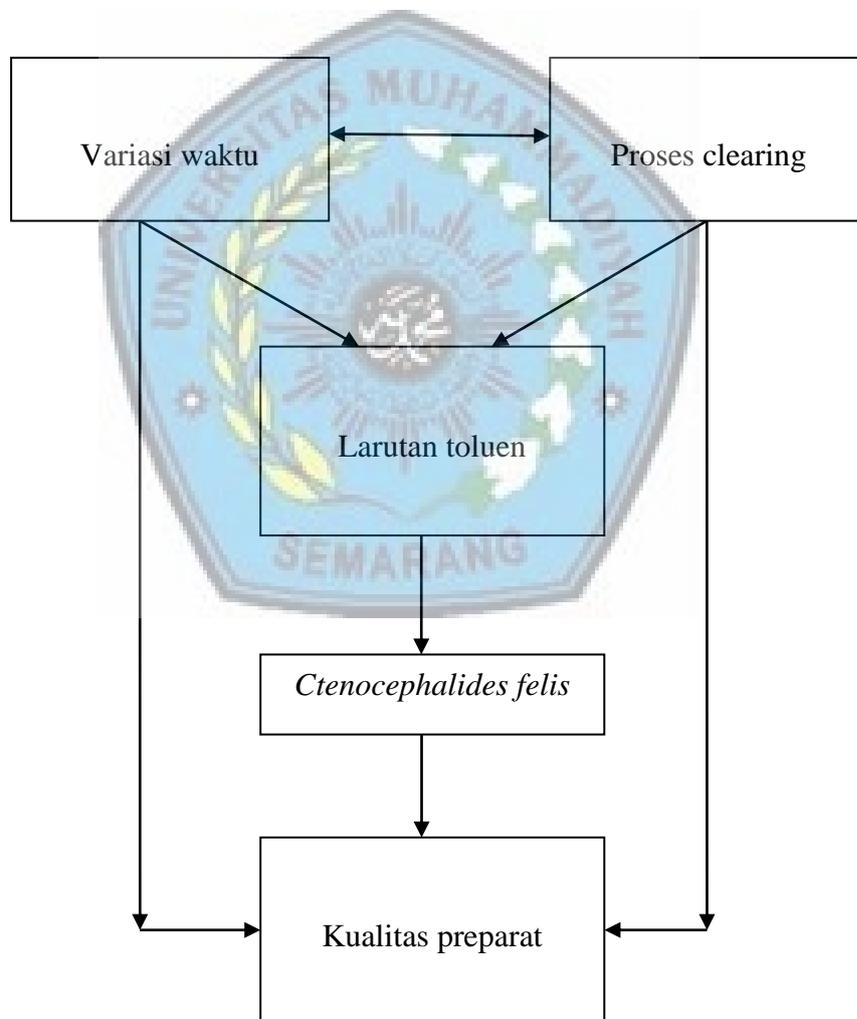
Ada beberapa sumber kesalahan yang dapat mengakibatkan hasil preparat permanen *Ctenocephalides felis* tidak maksimal dan sulit untuk di amati di antaranya :

a. Pada proses pengambilan sampel *Ctenocephalides felis* menggunakan alat bantu seperti pinset sehingga memungkinkan untuk merusak bagian tubuh *Ctenocephalides felis*.

b. Tidak memperhatikan umur *Ctenocephalides felis* memungkinkan ada beda pada ketebalan eksoskeleton, sehingga dapat memberi perbedaan pada proses penipisan.

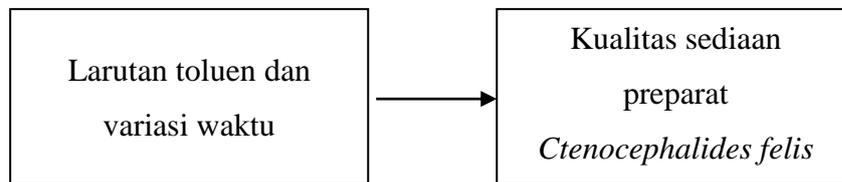
c. Pada saat melakukan proses clearing tidak dilakukan secara maksimal atau kurang waktu yang di tentukan. Sehingga dapat memberikan struktur *Ctenocephalides felis* kurang jelas dan kurang maksimal saat dilihat pada mikroskop.

I. Kerangka teori



Gambar 3. Kerangka teori

J. Kerangka konsep



Gambar 4. Kerangka konsep.

K. Hipotesis

Ada pengaruh clearing menggunakan larutan toluen dengan variasi waktu yang berbeda terhadap kualitas sediaan preparat *Ctenocephalides felis*.

