

TEKNIK PEMBUATAN PREPARAT UTUH TUNGAU EKTOPARASIT PADA CICAK DAN PREPARAT HISTOLOGI INTEGUMEN CICAK

oleh:

Taruni Sri Prawasti

PENDAHULUAN

Banyak spesies cicak yang diparasit oleh tungau genus *Geckobia* (Montgomery 1966). Tungau ini berukuran sangat kecil, kurang dari 0,5 mm (Rivera *et al* 2003). Ciri *Geckobia* dewasa terdapat "spur" pada ruas kaki dan palpinya. Gnatosoma adalah bagian seperti kepala yang terdiri dari kelisera, palpi, stigmata, peritrema dan alat sensori (Lawrence 1936). Penelitian tungau ektoparasit pada cicak memerlukan proses tertentu supaya tungau dapat diidentifikasi dan dihitung prevalensinya.

Tungau ektoparasit memiliki ketebalan kitin yang berbeda pada setiap kelompok takson (Woolley 1988) sehingga pembuatan preparat untuk identifikasi juga berbeda. Pada dasarnya preparat utuh tungau harus transparan, sehingga bagian-bagian tubuh terlihat jelas. Menurut Krantz (1978), bagian tubuh tungau yang diperlukan untuk identifikasi antara lain adalah bentuk tubuh, gnatosoma, jenis seta pada kelisera, palpus, tungkai, skutum dorsal serta bagian-bagian tubuh lainnya.

Pola perlekatan tungau pada tubuh cicak perlu diamati untuk melihat kedalaman hipostom menancap pada integumen cicak. Menurut Roell (2009, komunikasi pribadi), pada bagian tubuh cicak yang bergranula, tungau menancap hampir vertikal, yaitu tertancap pada epidermis lewat hipostomnya. Pola menancapnya hipostom pada integumen cicak mungkin dapat dilihat dari sayatan melintang integumen. Peradangan pada integumen kadal liar *Uta stansbuliana* akibat adanya tungau Trombiculidae dapat dilihat dari struktur histologi penampang melintang integumen (Goldberg dan Bursey 1991).

Integumen cicak terdiri atas lapisan periderm, *shading complex*, *oberhautchen* (lapisan mikrospinula). Menurut Alibardi (2009), integumen cicak berturut-turut terdiri dari epidermis, lapisan bergranula, *oberhautchen*, lapisan β -keratin, lapisan suprabasal dan lapisan basal.

Goldberg dan Bursey (1991) membuat sayatan integumen kadal liar *Uta stansbuliana* dengan fiksatif *neutral buffer formol* 10%, blok dengan parafin, tebal sayatan 5 μm dan diwarnai dengan pewarna ganda hematoxylen-eosin.

Ukuran tungau yang sangat kecil (<500 μm) menyulitkan proses pembuatan preparat utuh. Terjadi kehilangan spesimen $\pm 5\%$ pada tiap langkah pembuatan preparat. Perlu sayatan seri penampang melintang integumen cicak untuk melihat pola penusukan hipostom pada integumen.

Tujuan penelitian

1. Mencari metode baru pembuatan preparat utuh tungau pada cicak, yang cepat, murah dengan tingkat kehilangan spesimen yang rendah.
2. Membuat preparat seri penampang lintang integumen cicak untuk menganalisis pola perlekatan tungau pada cicak.

Hasil yang diharapkan

Mendapat metode baru penanganan spesimen tungau pada cicak dan mendapat metode pembuatan seri sayatan integumen cicak yang bisa menunjukkan perlekatan tungau.

BAHAN DAN METODE

a. Pengumpulan dan penyimpanan spesimen cicak dan tungau ektoparasit

Pengumpulan dan penyimpanan spesimen cicak dilaksanakan berdasar metode yang diterangkan oleh Sidik dan Mumpuni (1999). Cicak ditangkap secara langsung dengan tangan atau menggunakan alat, seperti ketapel atau pistol plastik. Cicak kemudian dibius dengan eter dan posisi tubuh diatur sebelum menjadi kaku. Cicak diberi label dengan kertas kalkir yang digantungkan langsung pada spesimen. Label berisi catatan nomor spesimen, lokasi asal spesimen, habitat, tanggal, bulan dan tahun koleksi, dan keterangan lainnya. Selanjutnya spesimen disimpan dalam alkohol 70%.

Pengumpulan dan penyimpanan spesimen tungau ektoparasit dilakukan menurut cara yang diterangkan oleh Saim dan Hartini (1999). Ektoparasit dikumpulkan langsung dari inangnya dengan menggunakan jarum preparat.

Selanjutnya spesimen tungau disimpan dalam botol berisi alkohol 70% berdasar lokasi penempelannya. Botol spesimen diberi catatan mencakup tanggal koleksi, nomor koleksi inang, lokasi penempelan, dan habitat inang.

b. Pembuatan preparat utuh tungau

Secara umum, pembuatan preparat utuh tungau diawali dengan fiksasi menggunakan alkohol 70%. Selanjutnya lapisan kitin pada tungau ditipiskan dengan larutan KOH dan dijernihkan menggunakan laktofenol atau xylol atau minyak cengkih. Setelah dehidrasi dengan alkohol bertingkat (30, 50, 70, 80, 95, 100%), selanjutnya tungau direkatkan pada gelas obyek dengan perekat polivinil alkohol (PVA) atau polivinil laktofenol (PVL) atau entelan.

Dalam penelitian ini dilakukan berbagai variasi teknik pembuatan preparat utuh tungau seperti tertera dalam Tabel 1.

Tabel 1. Variasi dalam pembuatan preparat utuh tungau¹

| Metode | KOH | Lakt | PVL | PVA | Alkohol | Dehid | MC | Xilol | Entl |
|--------|--------|-------------|-----|-----|-------------|-------|------------|-------------|------|
| A | 10 men | - | - | - | - | √ | √ 5 men | √ 10 men | √ |
| B | - | √ 24 jam | - | - | √ 10 men | - | - | √ 10 men | √ |
| C | - | √ 24 jam | √ | - | - | - | - | - | - |
| D | - | √ 24 jam | - | √ | - | - | - | - | - |
| E | - | - | √ | - | - | - | - | - | - |

Keterangan:

¹ Tungau sudah difiksasi dengan alkohol 70% sebelum diproses.

KOH = direndam dalam KOH 10%

Lakt = laktofenol, berfungsi sebagai penjernih

PVL = polivinil laktofenol, berfungsi sebagai perekat

PVA = polivinil alkohol, berfungsi sebagai perekat

Alkohol = alkohol absolut (100%)

Dehid = dehidrasi dengan alkohol bertingkat (30, 50, 70, 80, 95, 100%) masing-masing 10 menit

MC = minyak cengkih, berfungsi sebagai penjernih

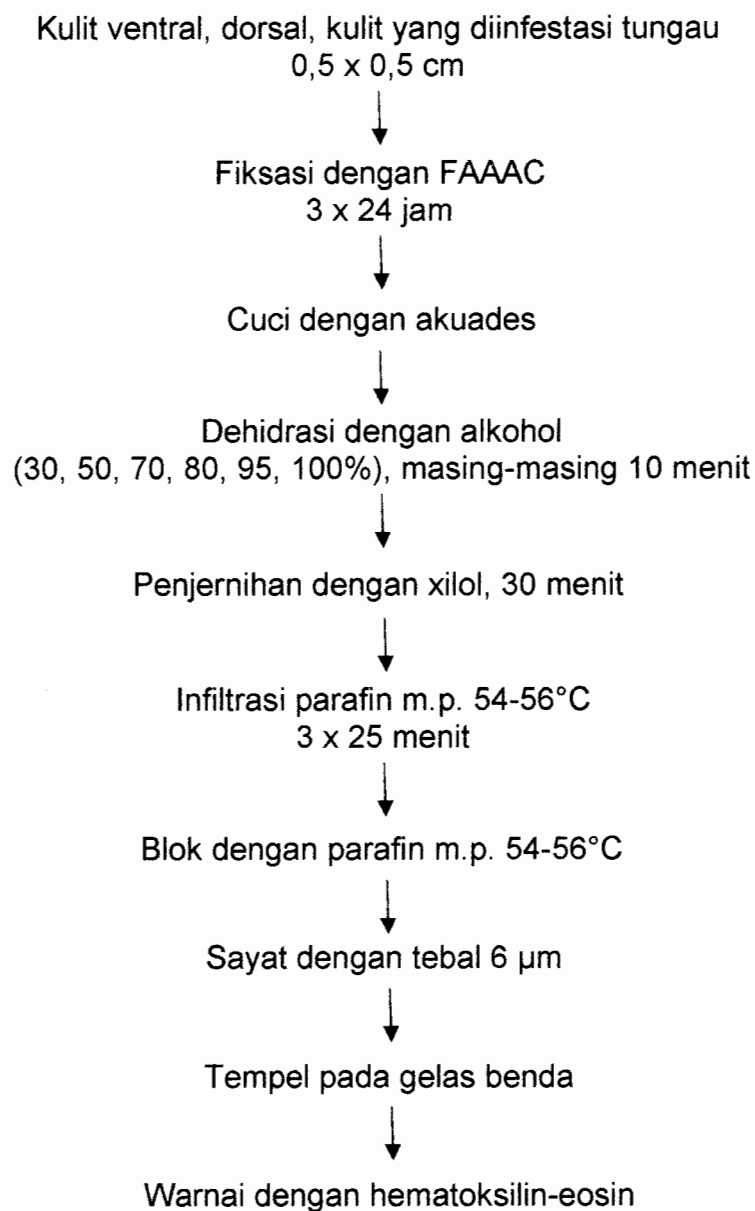
Entl = entelan, berfungsi sebagai perekat

Pada penyiapan preparat dengan metode A pengamatan bisa dilakukan pada hari pertama dan keseluruhannya memerlukan 10 langkah, yang masing-masing melibatkan pemindahan spesimen dan penuangan larutan. Metode B melibatkan 4

langkah dan hasilnya dapat diamati pada hari pertama. Pengamatan preparat pada metode C dapat dilakukan setelah 5 hari, tetapi metode ini melibatkan 2 langkah. Metode D melibatkan 2 langkah dan memerlukan 8 hari untuk dapat diamati. Metode E melibatkan 1 langkah tetapi lama waktu tunggu untuk pengamatan tidak dapat ditentukan.

c. Preparat histologi sayatan melintang integumen cicak

Preparat histologi integumen cicak dibuat berdasar modifikasi metode Gordon dan Bradbury (1990) seperti pada Gambar 1.














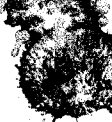
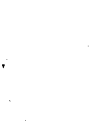






Gambar 1. Bagan alir pembuatan preparat histologi integumen cicak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Preparat utuh tungau

Pembuatan preparat utuh tungau dengan lima metode yang berbeda menghasilkan metode yang paling sesuai dengan tujuan pembuatan preparat. Gambar 2 memperlihatkan kenampakan preparat yang disiapkan dengan lima metode seperti dalam Tabel 1. Sedangkan Tabel 2 merangkum kualitas preparat yang dihasilkan, terkait lamanya waktu tunggu sebelum preparat dapat diamati, kejernihan preparat, dan kehilangan spesimen.

| Metode | Kenampakan preparat di bawah mikroskop | | | |
|--------|--|--|---|--|
| A |  hari ke-4 |  hari ke-6 |  hari ke-7 | |
| B |  hari ke-1 |  hari ke-5 |  hari ke-7 |  hari ke-8 |
| C |  hari ke-1 |  hari ke-5 |  hari ke-7 |  hari ke-8 |
| D |  hari ke-1 |  hari ke-5 |  hari ke-7 |  hari ke-8 |
| E |  hari ke-1 |  hari ke-5 |  hari ke-7 |  hari ke-8 |

Gambar 2. Foto mikroskopik preparat utuh tungau yang dibuat dengan lima metode seperti pada Tabel 1.

Tabel 2. Karakteristik preparat dan kehilangan spesimen tungau pada berbagai metode pembuatan preparat utuh.

| Metode | Waktu tunggu pengamatan | Kejernihan preparat | Kehilangan spesimen |
|--------|-------------------------|----------------------------|---------------------|
| A | segera | sangat baik | tinggi |
| B | segera | baik, kurang bersih | cukup tinggi |
| C | hari ke-5 | baik, banyak noda | rendah |
| D | hari ke-8 | kurang jernih, banyak noda | rendah |
| E | sesudah hari ke-8 | tidak cukup jernih | rendah |

Preparat utuh dengan metode A menghasilkan preparat yang sangat baik, bersih dan bagian-bagiannya terlihat jelas. Hal ini karena proses pembuatan dilakukan pada tabung dan kotoran tercuci selama dehidrasi. Kelemahan metode ini adalah langkah kerjanya sangat banyak sehingga tingkat kehilangan spesimen meningkat seiring dengan banyaknya langkah kerja. Metode ini cocok untuk membuat preparat koleksi dan tidak cocok untuk penghitungan prevalensi tungau. Preparat bisa diamati segera setelah proses pembuatan selesai.

Preparat utuh dengan metode B menghasilkan preparat yang cukup baik tetapi kurang bersih. Tingkat kehilangan spesimen masih cukup tinggi. Kerja laktofenol berhenti setelah preparat dicuci dengan alkohol 100%, sehingga preparat kurang transparan. Krantz (1978) menyatakan, bahwa laktofenol berperan untuk menipiskan dan menjernihkan kutikula.

Preparat utuh dengan metode C menghasilkan preparat yang jernih dan jelas bagian-bagiannya. Preparat mulai bisa diamati pada hari ke-5 setelah dibuat. Pembuatan preparat dengan metode ini menghasilkan tingkat kehilangan yang sangat rendah karena hanya diperlukan dua langkah kerja (penjernihan dengan laktofenol dan polivinil laktofenol [PVL]). Metode ini cocok untuk penelitian prevalensi karena resiko kehilangan spesimen sangat kecil. Laktofenol bersifat korosif (Krantz 1978), sehingga proses penjernihan masih berlangsung sampai radikal fenol habis. Akibatnya preparat menjadi sangat transparan dan sulit untuk diamati.

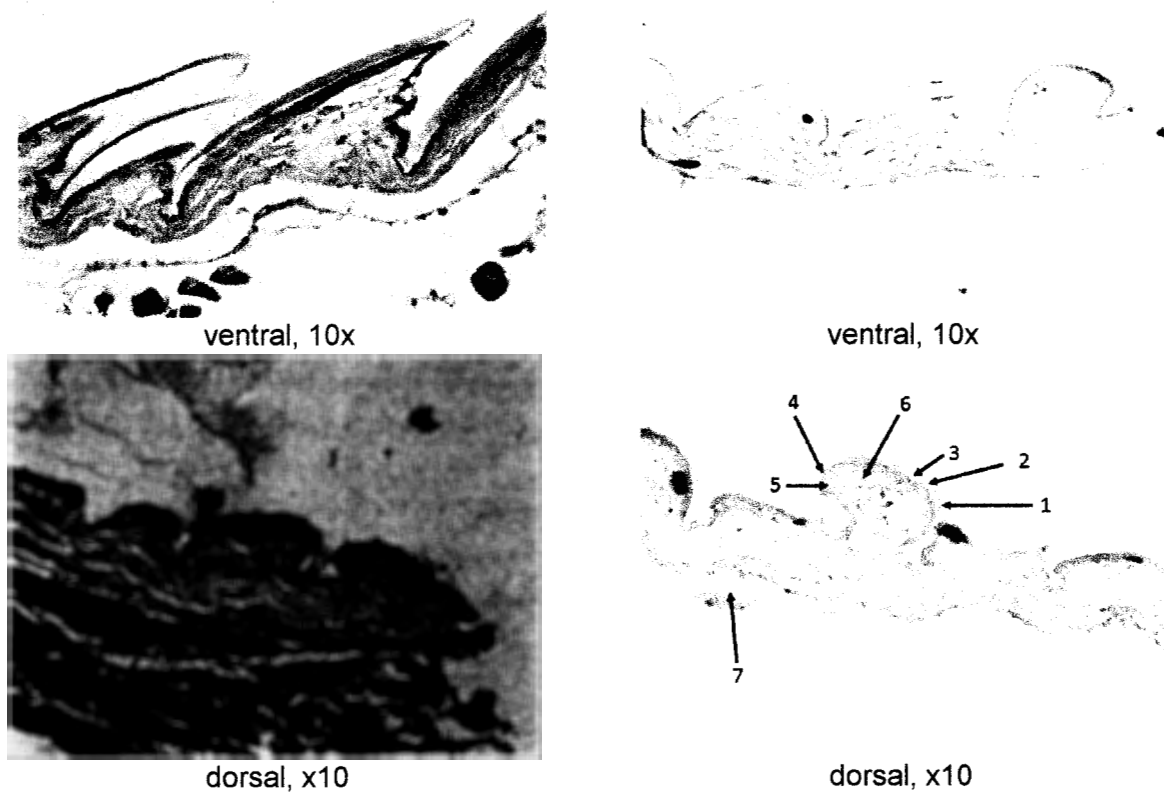
Preparat utuh dengan metode D menghasilkan preparat yang kurang jernih. Dalam metode ini tungau diperlakukan dengan penjernih laktofenol seperti pada metode C, tetapi perekat yang digunakan adalah polivinil alkohol (PVA). PVA akan menghambat kerja laktofenol sehingga proses penjernihan terhenti. Terhentinya kerja laktofenol menyebabkan timbulnya noda-noda merah dan kitin tungau tidak menipis sehingga preparat menjadi kurang jernih. Tingkat kejernihan preparat tidak

berubah secara bermakna hingga hari ke-8. Selain itu, seperti disampaikan oleh Baker (1952), yang menyatakan bahwa PVA sebagai *mountant* bersifat mengerutkan, metode D ini tidak cocok untuk pembuatan preparat permanen koleksi.

Pada metode E preparat dibuat tanpa proses penjernihan dan preparat langsung direkat dengan polivinil laktofenol (PVL). Hasilnya, sampai hari ke-8 preparat tidak cukup jernih untuk diamati. Hal ini menunjukkan bahwa laktofenol sangat berperan dalam penipisan kitin dan penjernihan spesimen.

b. Preparat sayatan melintang integumen cicak

Pembuatan preparat sayatan melintang integumen cicak dengan metode Gordon dan Bradbury (1990) yang dimodifikasi menghasilkan preparat yang baik, seperti tampak pada Gambar 2.



Gambar 2. Penampang lintang integumen ventral dan dorsal cicak. Keterangan: (1) periderm, (2) lapisan bergranula, (3) *oberhautchen*, (4) lapisan β -keratin, (5) lapisan suprabasal, (6) lapisan basal, (7) otot.

Modifikasi metode parafin berdasar Gordon dan Bradbury (1990) cukup bagus untuk membuat preparat penampang lintang integumen cicak. Penyayatan blok parafin setebal 6 μm menghasilkan kenampakan sel-sel yang jelas dan tidak hancur. Fiksasi dilakukan pada cicak secara utuh dan setelah 24 jam integumen dipotong dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm supaya integumen tidak menggulung. Cara tersebut menghasilkan potongan integumen yang lurus sehingga diperoleh sayatan integumen yang lurus dan tidak bertumpuk.

Goldberg dan Bursey (1991) membuat preparat penampang lintang integumen kadal *Uta stansbuliana* dengan metode parafin tebal sayatan 5 μm dan pewarnaan hematoksilin-eosin. Alibardi dan Gill (2007) menggunakan resin untuk blok dan penyayatan setebal 1-3 μm diikuti dengan pewarnaan *toluidin blue*. Preparat yang dihasilkan dari kedua metode tersebut tidak terlalu berbeda dengan hasil modifikasi metode Gordon dan Bradbury (1990).

Proses pembuatan sayatan integumen cicak memerlukan banyak tahapan. Proses yang panjang ini menyebabkan tungau lepas dari integumen. Sehingga tidak diperoleh sayatan seri yang menggambarkan perlekatan tungau pada integumen. Perlu dicari metode yang bisa mempertahankan posisi tungau pada integumen yang diproses.

KESIMPULAN

Metode laktofenol-PVL cocok untuk identifikasi dan penghitungan prevalensi serangan tungau pada inang. Metode KOH-dehidrasi-penjernihan-entelan sangat bagus untuk koleksi. Metode parafin dengan fiksasi spesimen cicak utuh menghasilkan sayatan integumen yang lurus dan sel-selnya tidak bertumpuk. Perlu dicari metode untuk mendapatkan sayatan seri yang menunjukkan pola perlekatan tungau pada integumen.

DAFTAR PUSTAKA

Alibardi, I. 2009. Embryonic keratinization in vertebrates in relation to land colonization. *Acta Zoologica* 90:1-17.

- Alibardi L, Gill BJ. 2007. Epidermal differentiation in embryos of the tuatara *Sphenodon punctatus* (Reptilia, Sphenodontidae) in comparison with epidermis of other reptiles. *J. Anat.* 211:92-103.
- Baker EW, Wharton GW. 1952. *An Introduction to Acarology*. New York: MacMillan Company.
- Goldberg SR, Bursley CR. 1991. Integumental lesions caused by ectoparasites in a wild population of the side-blotched lizard (*Uta stansburiana*). *J Wildlife Diseases* 27:68-73.
- Gordon KC, Bradbury P. 1990. *Microtomy and Paraffin Section*. Di dalam Bancroft JD, Steven A, editor. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Ed ke -3. London: Churchil & Livingstone.
- Krantz GW. 1978. *A Manual of Acarology*. Ed. ke-2. Covallis: Oregon University.
- Lawrence, RF. 1935. The prostigmatic mites of South African lizard. *Parasitology* 28:1-39.
- Montgomery, DF. 1966. *A Taxonomic Study of the Lizard Mites (Pterygosomidae) Occuring in the Gulf of California Area* (Thesis). Lubbock, Texas: Texas Technological College.
- Rivera CCM, Negron AG, Bertrand M, Acosta J. 2003. *Hemidactylus mabouia* (Sauria: Gekkonidae), host of *Geckobia hemidactyli* (Actinedida: Pterygosomatidae), throughout the Caribbean and South America. *Caribbean J Sci* 39:321-326.
- Saim A, Hartini S. 1999. Koleksi dan pengelolaan spesimen parasit. Di dalam: Suhardjono YR, editor. *Buku Pegangan Pengelolaan Koleksi Spesimen Zoologi*. Bogor. CV Riza Graha Jaya. Hlm 175-193.
- Sidik I, Mumpuni. 1999. Koleksi herpetologi. Di dalam: Suhardjono YR, editor. *Buku Pegangan Pengelolaan Koleksi Spesimen Zoologi*. Bogor. CV Riza Graha Jaya. Hlm 67-79.
- Woolley TA. 1988. *Acarology: Mites and Human Welfare*. New York: John Wiley & Sons. Inc.

GLOSARI

Fiksasi: Usaha untuk mengeraskan dan mempertahankan elemen sel atau jaringan agar tetap pada tempatnya dan tidak mengalami perubahan bentuk atau ukuran.

Dehidrasi: Proses penarikan air dari jaringan dengan menggunakan bahan kimia tertentu.

Penjernihan: Proses untuk membuat jaringan menjadi transparan.

Infiltrasi parafin: Proses penyusupan parafin ke dalam jaringan.

Blok parafin: Penanaman spesimen di dalam parafin.

Mountan: Media yang dipakai untuk merekatkan spesimen dengan gelas benda dan gelas penutup.

Gnatosoma: Kapitulum (kepala kecil / kaput) yang terdapat mulut dan alat mulut seperti kelisera dan pedipalpi.

Kelisera: Sepasang organ sensori pada gnatosoma yang terletak di antara dua palpus, fungsi untuk menusuk dan mengisap makanan dari inang.

Palpi: Sepasang organ sensori pada gnatosoma yang berfungsi untuk mencapit mangsa.

Hipostom: Alat untuk menancap pada kulit hospes.

Komposisi larutan yang digunakan

FAAAC: *Formaldehyde Acetic Acid Aquadest CaCl₂*.

Komposisi FAAAC

| | |
|--|--------|
| Formalin 38% | 100 ml |
| Asam asetat glasial | 50 ml |
| Akuades | 850 ml |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 13 g |

Laktofenol: Larutan penjernih.

Komposisi laktofenol

| | |
|---------------------|----------|
| Fenol kristal | 1 bagian |
| Asam laktat | 1 bagian |
| Akuades | 1 bagian |
| Gliserin | 2 bagian |

Polivinil laktofenol: Perekat

Komposisi polivinil laktofenol

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Larutan polivinil alkohol 15% | 56 ml |
| Asam laktat | 22 ml |
| Larutan fenol jenuh | 22 ml |