

PETUNJUK PRAKTIKUM

MIKROTEKNIK



Disusun Oleh:

Dra. Zuhrotus Salamah, M.Si

Agung Budiantoro, M.Si

Haris Setiawan, M.Sc.

LABORATORIUM BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI TERAPAN

UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN

LATIHAN I

SQUASH

BAHAN : Ujung akar bawang merah, bawang putih, dan bawang bombay,
3 mm dari ujung. Pengambilan jam 08.00-09.00

PREPARAT : Pembelahan mitosis.

ACARA PRAKTIKUM:

FIKSASI Dipakai larutan 45% asam asetat:
Akuades..... 55 cc
Asam asetat glasial..... 45 cc
Selama 15 menit dalam freezer setelah itu diamkan selama 10
menit di luar freezer

PENCUCIAN Dengan akuades 3 kali. Masing-masing selama 10 menit

HIDROLISA Dengan menggunakan HCl 1 N
(Campurkan 5 cc HCl pekat dengan 55 cc akuades). Panaskan
pada temperatur 60°C selama 2 menit. Didiamkan sampai dingin

PEWARNAAN Pewarnaan dengan acetoorcein/acetocarmin selama 2 jam

SQUASH dan MOUNTING Dengan gliserin
Ambil 1 ujung akar, letakkan di atas gelas benda kemudian
ditetesi dengan gliserin dan ditutup dengan gelas penutup. Tekan
gelas penutup (tepat di bawahnya ada ujung akar) dengan gagang
pensil/kuas hingga ujung akarnya hancur.

Amati di bawah mikroskop, jika hasilnya sudah bagus maka
bagian tepi gelas penutup di beri kutek

Diberi label pada bagian tepi kiri

Pengamatan terhadap tahap-tahap pembelahan mitosisnya
dilakukan dengan menggunakan optilab, difoto, dan dibahas.

LATIHAN II

PREPARAT POLLEN

BAHAN : Antera
PREPARAT : Pollen tumbuhan Dicotyledoneae/Monocotyledoneae
METODE : Acetolysis

ACARA PRAKTIKUM:

- Hari ke-1 : FIKSASI:
Pollen-pollen yang diambil dari antera, dikumpulkan dalam botol flakon yang sudah diisi dengan asam asetat glasial.
Bahan tersebut dibiarkan selama 24 jam.
- Hari ke -2 : Bahan dipindahkan dalam tabung sentrifus.
Lalu disentrifus selama 10 menit, 1700 rpm. Setelah itu cairan dibuang dan diganti dengan campuran dari asam asetat glasial dengan asam sulfat pekat dengan perbandingan 9:1 (Ingat dalam membuat campuran ini asam sulfat pekat selalu ditambahkan setetes demi setetes ke dalam asam asetat glasial).
- Kemudian tabung-tabung itu dipanaskan dalam waterbath selama 5-10 menit.
 - Setelah itu pemanasan dihentikan dan tabung diambil dan didiamkan selama \pm 10 menit.
 - Kemudian disentrifus dan setelah itu cairan dibuang dan diganti dengan akuades
 - Kemudian disentrifus
 - Kemudian cairan dibuang dan endapannya dicuci dengan akuades 3 kali, dimana setiap pencucian harus difortex dan disentrifus lagi masing-masing Selama 10 menit
 - Pewarnaan dengan safranin 0,01% , kemudian difortex dan disentrifus
 - Safranin dibuang dan dicuci dengan akuades setiap pencucian harus disentrifus lagi

- Akhirnya akuades dibuang dan diganti dengan gliserin jeli
- Dengan menggunakan batang gelas, bahan diambil dan ditaruh pada gelas benda kemudian ditutup dengan gelas penutup, pada sudut-sudut dari gelas penutup diberi potongan parafin, dilalukan di atas api agar paraffin meleleh.
- Diamati dengan menggunakan optilab, diukur panjang dan lebar pollennya, tipe ornamentasi eksinnya.

LATIHAN III
PREPARAT PENAMPANG TANPA “EMBEDDING”

BAHAN : Kayu
PREPARAT : Penampang melintang
METODE :

ACARA PRAKTIKUM:

Hari ke-1 : FIKSASI: dipakai salah satu dari larutan berikut:

1. Larutan FAA

Alkohol 70%90 bagian) selama

Asm asetat glasial..... 5 bagian) 24

Formalin5 bagian) jam

2. Alkohol 70%

Hari ke-2 : PENGIRISAN

Dibuat irisan-irisan melintang dengan mikrotom.

Irisan-irisan tersebut ditampung di dalam Petridish yang diberi alkohol 70%

PEWARNAAN

Pewarnaan dengan safranin 1% dalam alkohol 70% selama 24 jam

Hari ke-3 : Safranin 1 % dalam alkohol 70% dibuang, lalu diganti berturut-turut dengan:

Alkohol 70 %..... 30 menit

Alkohol 80%30 menit

Alkohol 95%30 menit

Alkohol 100% I30 menit

Alkohol 100% II..... 30 menit

DEALKOHOLISASI: alkohol dibuang dan diganti berturut-turut dengan campuran:

Alkohol/xilol 3:1..... 10 menit

Alkohol/xilol 1:1..... 10 menit

Alkohol/xilol 1:3..... 10 menit

Xilol I..... 30 menit

Xilol II..... 30 menit

PENUTUPAN: Irisan diatur dalam gelas benda

Kemudian diberi balsam Kanada dan ditutup dengan gelas penutup.

Preparat dikeringkan di atas hotplate dengan temperatur 45°C hingga balsam Kanada cukup kering.

PEMBERIAN NAMA: Di sebelah kiri gelas penutup dilekatkan etiket dengan diberi keterangan: nama species, organ, penampang, dsb.

Pengamatan struktur anatomi batang dilakukan dengan menggunakan optilab, difoto dan dibahas.

LATIHAN IV

MIKROMETRI

TUJUAN : Mengukur panjang/lebar sel atau bagian sel

PREPARAT : Daun

ACARA PRAKTIKUM:

I. PERSIAPAN : Mikroskop disiapkan dengan diberi okuler-mikrometer pada okulernya. Juga disiapkan obyek-mikrometer serta preparat yang akan diatur.

II. MENCARI NILAI SKALA OKULER MIKROMETER

1. Mata ditempelkan di atas lensa okuler, dilihat apakah bayangan skala-skala okuler mikrometer sudah jelas. Pada okuler tertentu, lensa atas okuler dapat disetel sedemikian rupa, hingga bayangan skala-skala tersebut jelas.
2. Obyek mikrometer ditempatkan di bawah obyektif, dicari bayangan yang jelas dari skala-skala obyekmikrometer tersebut, bersama-sama dengan bayangan skala-skala okuler mikrometer.
3. Kedua bayangan skala tersebut dibuat sejajar dengan memutar okuler dalam tabungnya. Titik-titik 0 dari kedua skala tersebut diletakkan sama tinggi dengan menggerakkan obyek mikrometer.
4. Dicari bayangan garis skala kedua mikrometer tersebut yang berimpit (sama tinggi). Dihitung jumlah bagian skala pada masing-masing mikrometer dihitung dari titik 0 sampai garis skala yang berimpit tadi.
5. Jarak sesungguhnya antara 2 garis skala obyek mikrometer diketahui (tertulis pada obyek mikrometer), jadi nilai skala okuler mikrometer dapat dihitung.

III. MENGUKUR PANJANG/LEBAR SEL ATAU BAGIAN SEL

1. Obyek mikrometer diambil, diganti dengan preparat. Bayangan preparat dicari. Kombinasi obyektif, okuler, serta panjang tubus sama dengan waktu mencari nilai skala okuler mikrometer.
2. Bayangan skala okuler mikrometer ditempatkan pada bayangan preparat sedemikian, hingga arah bayangan skala itu sesuai dengan arah panjang/lebar sel atau bagian sel yang diukur. Jumlah bagian skala dikalikan dengan nilai skala adalah panjang/lebar yang dicari.

IV. Penggunaan optilab

Lensa okuler pada mikroskop diambil, kemudian diganti dengan optilab yang dihubungkan dengan laptop. Dilakukan kalibrasi dengan memasang obyektif micrometer sesuai panduan.

LATIHAN V

SIFAT ANATOMIS

TUJUAN : Melihat berbagai sifat anatomis (palisade ratio, indeks stomata, jumlah stomata per satuan luas) dalam suatu species.

PREPARAT : Epidermis atas/bawah daun berikut jaringan palisaden.

ACARA PRAKTIKUM :

Dibuat potongan-potongan segi empat dari daun tumbuhan yang bersangkutan dengan sisi-sisi ± 5 mm dan dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan khloralhidrat dalam air (5 bagian khloralhidrat dan 2 bagian air). Tabung dipanasi dalam air mendidih (waterbath) selama $\pm 10-15$ menit hingga potongan daun tersebut menjadi transparan.

I. PALISADE RATIO

1. Potongan daun diletakkan di atas gelas benda dalam larutan khloralhidrat. Permukaan yang berdekatan dengan jaringan palisaden (pada umumnya permukaan atas, pada daun isobilateral permukaan atas dan bawah) diletakkan di sebelah atas. Dapat pula cukup menggunakan irisan epidermis berikut jaringan palisaden, ditaruh dalam air diatas gelas benda. Kemudian ditutup dengan gelas penutup. Untuk menghindarkan pengeringan, diberi setetes gliserin pada salah satu tepi gelas penutup.
2. Preparat diperiksa dengan optilab yang telah dihubungkan dengan mikroskop. Ditentukan 4 sel epidermis yang berdekatan dan diamati sel-sel palisade yang ada di bawahnya.
3. Sel-sel epidermis (4 buah) diamati, kemudian sel-sel palisade yang ada di sebelah dalamnya (bawahnya) diamati pula, jika tampak jelas kemudian di foto, jumlah sel-sel palisade tersebut dihitung.
4. Pekerjaan 2 dan 3 diulang pada bagian lain dari preparat hingga seluruhnya 5 kali. Hasil akhir adalah rata-rata dari kelima pengamatan tersebut di atas.

II. INDEKS STOMATA DAN JUMLAH STOMATA PER SATUAN LUAS EPIDERMIS.

1. Potongan daun diletakkan dalam larutan khloralhidrat pada gelas benda. Permukaan yang ada stomatanya diletakkan di sebelah atas, kemudian

ditutup dengan gelas penutup. Sebaiknya dibubuhi gliserin pada tepi gelas penutup supaya preparat tidak cepat kering.

2. Dengan menggunakan optilab dibuat gambar segi empat (luasnya yang dapat diketahui). Preparat diamati pada 10 bagian daerah yang berlainan dan menghindari adanya pengamatan lebih dari satu kali pada daerah yang sama.
3. Tiap sel epidermis (E) ditandai dengan (x), tiap stoma (S) ditandai dengan (o).
4. Indeks stomata besarnya $\frac{S}{S+E} \times 100$
Jumlah stomata (S) per mm² dapat dihitung.
5. Hasil akhir adalah rata-rata dari 10 buah pengamatan.

PEMBUATAN PREPARAT DENGAN METODE PARAFIN

A. Persiapan:

1. Kotak paraffin
2. Silet
3. Alat bedah (*dissecting set*)
4. Kertas label
5. Kloroform
6. Hewan (ikan)
7. Fiksatif (Larutan Bouin)
8. Larutan garam fisiologis
9. Kapas
10. Botol flakon

Alur kerja Metode Parafin:

1. Narkose
2. Pengambilan organ
3. Fiksasi
4. Pencucian (*Washing*)
5. Dehidrasi
6. Clearing/dealkoholisasi
7. Embedding
8. Sectioning
9. Afiksing
10. Staining
11. Mounting
12. Labeling
13. Pengamatan mikroskopis

B. Pelaksanaan

1. Narkose:

Dengan kloroform, bisa digunakan cara dislokasi, atau dengan di beri es untuk ikan.

2. Pengambilan organ:

Hewan dibedah ambil organ dipotong, tebal 3-5 mm, luas $\pm 1 \text{ cm}^2$

3. Labeling:

Bila preparat dalam 1 botol (flakon) lebih dari 2 macam preparat ditempel label. Tapi bila dalam botol flakon hanya 1 organ cukup flakon yang ditempel label.

4. Fiksasi:

Sebelum masuk fiksasi bila preparat berlumuran darah (kotor) cuci dulu dengan Lar. garam fisiologis masuk fiksatif: 3-12 jam.

5. Pencucian (Washing):

Bila menggunakan fiksatif Bouin pencucian dengan alkohol 70% berkali-kali sampai warna kuning menjadi hilang/jernih.

6. Dehidrasi:

Dilakukan dengan menggunakan alkohol 70%, 80%, dst sampai dengan alkohol absolut.

alkohol 70%	4 x 30 menit
alkohol 80%	2 x 30 menit
alkohol 90%	2 x 30 menit
alkohol 96%	1 x 30 menit
alkohol absolut	1 x 30 menit

7. Clearing (dealkoholisasi):

Clearing penarikan alkohol dari jaringan (dealkoholisasi) dengan Toluol (Toluen). Caranya: dari alkohol absolut preparat diletakkan dulu pada kertas penghisap masukkan Toluol. Secukupnya (tergantung jenis preparatnya).

8. Infiltrasi:

Dalam oven (incubator), temperatur $55^\circ - 60^\circ\text{C}$.

Campuran Toluol parafin (1 : 1)	30 menit
Parafin I	50 menit
Parafin II	50 menit
Parafin III	50 menit

9. Embedding:

Menanam jaringan dalam parafin padat.

- a. Buat kotak-kotak kecil dari karton.
- b. Tuang parafin murni cair ke dalam kotak tersebut.
- c. Dengan cepat pindahkan jaringan yang telah diinfiltrasi tadi kedalam kotak yang berisi parafin cair tersebut.
- d. Atur letak preparat menurut rencana arah potongan: melintang, atau membujur.
- e. Setiap blok harus diberi label yang berisi nama, organ/jaringan.

10. Sectioning:

- a. Iris blok parafin dengan scalpel à permukaan yang akan diiris dengan pisau mikrotom berbentuk segi empat teratur, semua sisi sejajar letak preparat/jaringan di tengah coupes (irisan tipis), \pm 3-5 mm dari tepi.
- b. Letakkan blok parafin pada holder kayu (melekat erat)
- c. Pasang holder dengan blok parafin tersebut pada “*Rotary Microtome*”, eratkan.
- d. Siapkan:
 - 1) Kotak tempat pita preparat (Coupes)
 - 2) Kuas untuk mengambil Coupes dari pisau mikrotom
 - 3) Pisau scalpel
 - 4) Kapas dicelup xylool untuk membersihkan pisau mikrotom.
- e. Sebelum mulai section atur tebal irisan (Coupes) 6 mikron.
- f. Bila sudah lengkap mulai section.

11. Afiksing:

Penempelen Coupes pada gelas benda, bebas lemak, dengan Mayer albumin.

Caranya:

- a. Kaca benda yang telah dioles Mayer' albumin, ditetesi aquadest secukupnya.
- b. Letakkan sejumlah Coupes di atas aquadest tersebut.

- c. Kaca benda kemudian diletakkan diatas *hot plate* dengan suhu 40°C - 45°C.
- d. Letak Coupes diatur, juga rentangan parafin, sisa aquadest dihisap dengan pipet atau kertas penghisap.
- e. Biarkan sampai kering. Baru disimpan dalam map preparat. Pewarnaan dilaksanakan sebaiknya sesudah 24 jam.

12. Staining:

- a. Deparafinasi Celup kaca benda yang telah ada Coupes tersebut dalam xylol selama 10 menit (minimal).
- b. Pewarnaan: dapat tunggal, atau majemuk.

1) **EHRlich HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)**

- a) Setelah dihilangkan parafinnya, Coupes dihisap xylolnya dengan kertas filter celupkan kee dalam alkohol 96%, 90%, dst sampai dengan aquadest masukkan Ehrlich hematoxylin selama 3 – 7 detik.
- b) Cuci dengan air mengalir selama 10 menit, amati terlebih dahulu.
- c) Celup ke dalam akuade, alkohol 30%, dst sampai dengan 70%, beberapa celupan masuk kedalam Eosin Y 1-2% dalam alkohol 70% selama 1-2 menit.
- d) Cuci dengan alkohol 70%, amati.
- e) Celupkan ke alkohol 70% sampai dengan 96% beberapa celupan, pel di antara kertas filter masukkan ke :
- f) Xylol, minimal 10 menit.

2) **MALLORY ACID FUCHSIN**

- a) Deparafinasi pel dengan kertas filter, celup kedalam alkohol 96% sampai dengan aquadest.
- b) Masuk Larutan Acid Fuchsin 0,1% selama 3 menit.Cuci aquadest, amati dibawah mikroskop.
- c) Masuk Larutan PMA (= Phospho Molybdic Acid) 1% selama 5 menit.
- d) Cuci aquadest.

- e) Masuk Larutan Mallory selama 2 menit.
- f) Cuci dengan aquadest, amati di bawah mikroskop, celup alkohol 30% sampai dengan 96%, pel di antara kertas filter.
Masuk ke:
- g) Xylol minimal 10 menit.

13. MOUNTING:

Sediaan yang basah xylol ditetesi Canada balsam secukupnya ditutup dengan gelas penutup untuk menghilangkan gelembung udara yang mungkin muncul selama proses penutupan sediaan diletakkan diatas *hot plate*.

14. Labelling:

Tulis data lengkap pada label misal nama organ/jaringan, tebal irisan, arah potongan, metode pewarnaan, tanggal pembuatan.

15. Pengamatan mikroskopis.

PEMBUATAN PREPARAT TULANG DAUN

Alat : kompor listrik, beaker 1000 ml, kertas saring, nampan plastik, kuas

Bahan : daun sirsak, daun jambu biji, daun nangka, daun , serbuk Na_2CO_3 , bayclin, aquadest

Metode :

1. Timbang serbuk Na_2CO_3 sebanyak 30 gram larutkan dalam 600 ml aquadest (perbandingan serbuk Na_2CO_3 : aquadest = 1 : 20)
2. Masukkan semua daun ke dalam beaker yang berisi larutan Na_2CO_3
3. Masak selama 30 menit atau sampai warna daun kecoklatan
4. Biarkan daun dan cairan menjadi dingin
5. Angkat daun dari atas beaker secara pelan pelan dan letakkan dalam nampan berisi air
6. Bersihkan secara pelan dengan menggunakan kuas. Gosoklah searah searah (jangan bolak-balik). Penggosokkan dilakukan di dalam air pada nampan sehingga sisa-sisa daging daun dapat hilang sepenuhnya.
7. Buat larutan penjernih dengan mencampurkan 50 ml larutan bayclin dengan 100 ml aquadest (perbandingan bayclin : aquadest = 1 : 2), rendam dalam selama 15 menit
8. Ambil daun dan letakkan dalam nampan yang telah dialasi kertas saring
9. Biarkan sampai kering

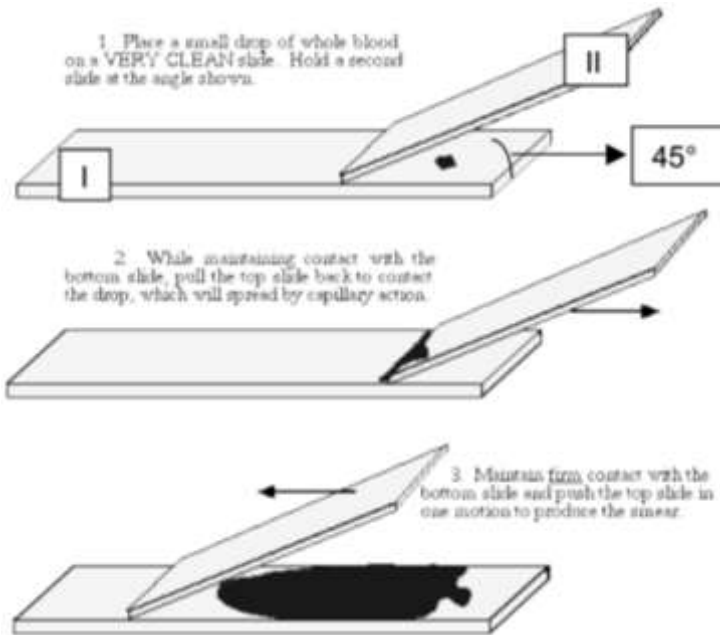
Gambar pembuatan preparat tulang daun



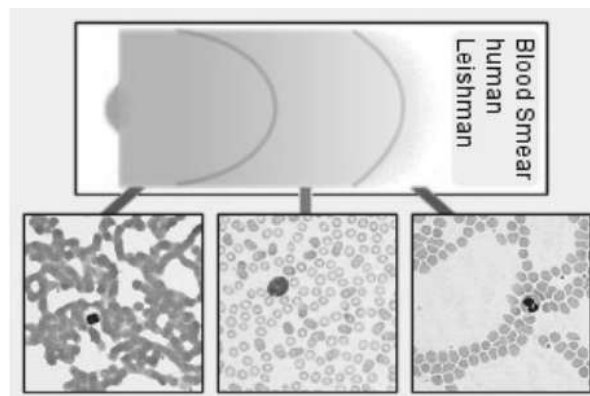
PROTOCOL PREPARAT APUS

Pembuatan preparat apus darah sesuai metode Gray (1952), Suntoro (1983), dan Houwen (2000) dengan modifikasi sebagai berikut:

1. Sampel darah manusia diambil dari jari tangan nomor dua, tiga, atau empat. Jari tangan yang akan diambil darahnya disterilkan dengan etanol (alkohol) 70%.
2. Penutup jarum lancet *disposable* dibuka dan jarum lancet ditusukkan pada jari tangan sampai darah keluar.
3. Beberapa tetes darah pertama (kedua atau ketiga) dihapus dengan tisu. Tetes darah berikutnya digunakan dalam pembuatan preparat apus. Darah tersebut ditetaskan di atas kaca benda I dengan diameter $\pm 3 - 5$ mm (diletakkan sekitar 1 cm dari salah satu ujung kaca benda tersebut).
4. Kaca benda II diletakkan di depan tetes darah yang akan diapus (Gambar 1.), kemudian ditarik ke belakang sedikit, sampai timbul kapilaritas antara kaca benda I dengan kaca benda II. Sudut di antara kedua kaca benda sebaiknya $\pm 45^\circ$. Apabila sudut yang terbentuk terlalu besar atau kecil, maka film darah yang terbentuk akan terlalu tebal/tipis (tidak merata).
5. Selanjutnya kaca benda II didorong maju dengan kekuatan dan kecepatan konstan supaya menghasilkan film darah yang tipis dan sama rata. Tebal/tipis apusan darah tergantung dari arah mendorong, kekuatan/kecepatan mendorong, dan sudut antara kedua kaca benda (Gambar 2. dan 3.). Panjang apusan yang ideal antara 2,5 – 4 cm.



Gambar 1. Cara pengapusan darah yang benar dalam pembuatan preparat apus (Caprette, 2012)



Gambar 2. Preparat apus darah manusia, Leishman *smear* (Slomianka, 2009)



Gambar 3. Preparat apus darah manusia. Pewarnaan May-Grunwald(Dok. pribadi, 2014)

Keterangan: hasil apusan preparat di atas tidak maksimal

6. Sampel darah yang telah diapus dikeringanginkan dan difiksasi menggunakan metanol selama tiga sampai lima menit apabila akan diwarnai dengan Giemsa. Apabila memakai metode pewarnaan May-Grunwald dan Pappenheim maka tidak perlu difiksasi terlebih dahulu.

7. Selanjutnya apusan darah tersebut diwarnai sesuai prosedur berdasarkan metode pewarnaan yang dipilih (cara kerja seperti yang tercantum di bawah ini).
8. Biasanya preparat apus tidak perlu *dimounting*. Namun apabila preparat akan disimpan dalam waktu lama maka dapat *dimounting* menggunakan Canada balsam/entelan.

Pewarnaan Sediaan Apus:

A. Metode May-Grunwald

Metode pewarnaan ini menggunakan larutan A/ pewarna May-Grunwald (campuran dari eosin-*methylene blue* dalam metanol) serta larutan B (hasil pengenceran larutan A dengan akuades (perbandingan 1 : 1)).

Prosedur:

1. Sediaan apus yang telah dikeringanginkan selanjutnya diletakkan di atas bejana rak dan ditetesi larutan A secara merata ke seluruh bagian apusan (misal sepuluh tetes) dan didiamkan selama tiga sampai lima menit.
2. Kemudian sediaan tersebut ditetesi dengan larutan B secara merata (misal sepuluh tetes) dan didiamkan selama lima sampai sepuluh menit.
3. Sediaan apus yang telah diwarnai selanjutnya dicuci dengan akuades didih yang telah didinginkan dengan cara disemprotkan ke sediaan apus secara perlahan.
4. Selanjutnya sediaan apus diletakkan di antara kertas saring/tisu, ditekan perlahan, dikeringanginkan, dan disimpan dalam map preparat/kotak preparat.
5. Sediaan apus tersebut diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran obyektif lemah kemudian diamati dengan perbesaran obyektif 100X menggunakan minyak emersi.

B. Metode Giemsa

Metode pewarnaan ini menggunakan pewarna Giemsa 3%.

Prosedur:

1. Sediaan apus yang telah dikeringanginkan selanjutnya diletakkan dalam *staining jar* vertikal berisi metanol untuk difiksasi selama tiga sampai lima menit.

2. Selanjutnya sediaan apus diletakkan di atas bejana rak dan ditetesi larutan Giemsa 3% secara merata ke seluruh bagian apusan (misal sepuluh tetes) dan didiamkan selama 30 – 45 menit.
3. Selanjutnya sediaan apus diletakkan di antara kertas saring/tisu, ditekan perlahan, dikeringanginkan, dan disimpan dalam map preparat/kotak preparat.
4. Sediaan apus tersebut diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran obyektif lemah kemudian diamati dengan perbesaran obyektif 100X menggunakan minyak emersi.

C. Metode Pappenheim

Metode ini merupakan gabungan dari metode pewarnaan May-Grunwald dan Giemsa.

Prosedur:

1. Sediaan apus yang telah dikeringanginkan selanjutnya diletakkan di atas bejana rak dan ditetesi larutan A secara merata ke seluruh bagian apusan (misal sepuluh tetes) dan didiamkan selama tiga sampai lima menit.
2. Kemudian sediaan tersebut ditetesi dengan larutan B secara merata (misal sepuluh tetes) dan didiamkan selama lima sampai sepuluh menit.
3. Sediaan apus tersebut selanjutnya ditetesi dengan larutan Giemsa 3% (misal sepuluh tetes) dan didiamkan selama 15 – 20 menit.
4. Sediaan apus yang telah diwarnai selanjutnya dicuci dengan akuades didih yang telah didinginkan dengan cara disemprotkan ke sediaan apus secara perlahan.
5. Selanjutnya sediaan apus diletakkan di antara kertas saring/tisu, ditekan perlahan, dikeringanginkan, dan disimpan dalam map preparat/kotak preparat.
6. Sediaan apus tersebut diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran obyektif lemah kemudian diamati dengan perbesaran obyektif 100X menggunakan minyak emersi.

WHOLE MOUNT EMBRIO AYAM

Protokol

Metode ini merupakan modifikasi dari metode yang dilakukan oleh Gray (1952).

1. Telur ayam berembrio diinkubasi dalam inkubator yang sudah diatur suhunya (39-40°C). Telur tersebut dapat diinkubasi selama 24 – 48 jam.
2. Setelah masa inkubasi selesai, telur diteropong dengan menggunakan alat peneropong telur. Pada bagian tempat embrio akan dibuka dilingkari menggunakan pensil.
3. Sebelum telur dibuka, terlebih dahulu disiapkan bejana berisi larutan garam fisiologis hangat. Telur dimasukkan ke dalam bejana tersebut sampai tenggelam.
4. Bagian tumpul (tempat rongga udara) dari telur tersebut ditusuk pelan sampai gelembung udara yang terdapat di dalam telur dapat keluar. Keluarnya gelembung udara tersebut akan menyebabkan vitelus turun, sehingga tidak melekat pada kulit kapur. Hal ini akan memudahkan kita saat membuka kulit kapur dan tidak mengenai vitelus.
5. Selanjutnya pada bagian yang telah ditandai menggunakan pensil tadi ditusuk pelan dan kulit kapur digunting menggunakan gunting kecil bengkok.
6. Arah pengguntingan dilakukan mengikuti tanda lingkaran yang telah dibuat dengan pensil tadi. Sesudah tergunting semua, kulit kapur diangkat menggunakan pinset dan akan tampak tempat embrio berada.
7. Membrana vitelina digunting menggunakan gunting kecil bengkok. Bagian yang digunting adalah area embrional, di luar sinus terminalis, juga di bawah blastoderm, supaya lepas dari vitellus.
8. Setelah semua bagian digunting maka blastoderm ditarik dengan hati-hati menggunakan pinset.
9. Blastoderm diambil dan diletakkan di atas gelas arloji, dicuci dengan disemprot pelan-pelan dengan garam fisiologis hangat menggunakan pipet tetes, dan direntangkan secara hati-hati untuk mengatur posisi embrio.
10. Cairan garam fisiologis yang tersisa disekitar blastoderm dihisap pelan-pelan menggunakan pipet tetes. Blastoderm dan daerah ekstraembrional diusahakan tidak melipat. Apabila perlekatannya kurang rata maka proses ini diulang.

11. Selanjutnya disiapkan kertas saring berbentuk lingkaran. Bagian tengah kertas saring tersebut dibuat lubang berbentuk lingkaran dengan ukuran yang lebih besar dari ukuran embrio. Pada kertas saring tersebut dapat diberi tulisan berupa umur embrio, tanggal, dan nama pembuat. Kemudian kertas saring dibasahi sedikit menggunakan garam fisiologis dan ditempelkan pelan-pelan di atas blastoderm yang terletak di gelas arloji tadi. Embrio harus diletakkan tepat di bagian tengah lubang. Diusahakan jangan sampai ada gelembung udara. Kertas saring harus melekat kuat dengan blastoderm supaya kertas saring tidak terlepas pada proses selanjutnya.
12. Blastoderm difiksasi dengan larutan Bouin menggunakan pipet tetes. Penetesan dilakukan dengan hati-hati dan disemprotkan sedemikian rupa sehingga akhirnya blastoderm tidak melekat pada gelas arloji.
13. Kertas saring dijepit bagian tepinya menggunakan pinset dan dipindah ke dalam cawan petri besar berisi larutan Bouin. Proses fiksasi dilakukan selama 30 – 60 menit, tergantung ukuran embrio.
14. Embrio dicuci menggunakan etanol (alkohol) 70% sampai warna kuning berkurang.
15. Proses pewarnaan dilakukan menggunakan Ehrlich hematoxylin, eosin-Y 1 – 2%, atau campuran Ehrlich hematoxylin dan eosin Y.

Prosedur pewarnaan menggunakan Ehrlich hematoxylin, eosin-Y 1 – 2%, atau campuran Ehrlich hematoxylin dan eosin Y adalah sebagai berikut:

A. Ehrlich hematoksilin

1. Setelah proses pencucian, kertas saring yang telah menempel pada blastoderm dijepit menggunakan pinset pada bagian tepinya dan dihidrasi.
2. Proses hidrasi dilakukan sebagai berikut: embrio direndam berturut-turut dalam etanol (alkohol) 60, 50, 40, 30%, dan akuades masing-masing selama lima menit.
3. Embrio direndam dalam Ehrlich hematoksilin selama 10 – 20 detik atau sesuai dengan besar kecilnya embrio.
4. Embrio yang telah diwarnai diletakkan pada cawan petri kecil dan ditutup menggunakan kain kasa yang diikat dengan karet gelang,

Kemudian cawan petri tersebut dimasukkan ke dalam staining jar horizontal dan dicuci dengan air mengalir selama sepuluh menit.

5. Setelah itu embrio didehidrasi dengan cara direndam berturut-turut dalam akuades, etanol (alkohol) 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96%, dan absolut masing-masing selama lima menit. Kemudian embrio diletakkan sebentar di atas kertas saring.
6. Selanjutnya embrio didealkoholisasi/diclearing. Embrio direndam dalam cawan petri berisi toluol selama sepuluh menit. Kemudian embrio direndam dalam cawan petri berisi xilol minimal selama 30 menit.
7. Selanjutnya embrio *dimounting* menggunakan Canada balsam/entelan.

B. Eosin Y 1 – 2%

1. Setelah proses pencucian, kertas saring yang telah menempel pada blastoderm dijepit menggunakan pinset pada bagian tepinya dan diwarnai menggunakan eosin Y 1 – 2% selama satu sampai dua menit.
2. Embrio dicuci menggunakan alkohol 70%.
3. Setelah itu embrio direndam berturut-turut dalam etanol (alkohol) 70, 80, 90, 96%, dan absolut masing-masing selama lima menit. Kemudian embrio diletakkan sebentar di atas kertas saring.
4. Selanjutnya embrio didealkoholisasi/diclearing. Embrio direndam dalam cawan petri berisi toluol selama sepuluh menit. Kemudian embrio direndam dalam cawan petri berisi xilol minimal selama 30 menit.
5. Selanjutnya embrio *dimounting* menggunakan Canada balsam/entelan.

C. Campuran Ehrlich hematoksilin-eosin Y

1. Setelah proses pencucian, kertas saring yang telah menempel pada blastoderm dijepit menggunakan pinset pada bagian tepinya dan dihidrasi.
2. Proses hidrasi dilakukan sebagai berikut: embrio direndam berturut-turut dalam etanol (alkohol) 60, 50, 40, 30%, dan akuades masing-masing selama lima menit.
3. Embrio direndam dalam Ehrlich hematoksilin selama 10 – 20 detik atau sesuai dengan besar kecilnya embrio maupun kualitas zat warna yang digunakan.

4. Embrio yang telah diwarnai diletakkan pada cawan petri kecil dan ditutup menggunakan kain kasa yang diikat dengan karet gelang, Kemudian cawan petri tersebut dimasukkan ke dalam staining jar horizontal dan dicuci dengan air mengalir selama sepuluh menit.
5. Setelah itu embrio didehidrasi dengan cara direndam berturut-turut dalam akuades, etanol (alkohol) 30, 40, 50, 60, dan 70% masing-masing selama lima menit.
6. Embrio diwarnai menggunakan Eosin Y 1 – 2% selama satu sampai dua menit.
7. Embrio direndam berturut-turut dalam etanol (alkohol) 70, 80, 90, 90%, dan absolut masing-masing selama lima menit. Kemudian embrio diletakkan sebentar di atas kertas saring.
8. Selanjutnya embrio didealkoholisasi/diclearing. Embrio direndam dalam cawan petri berisi toluol selama sepuluh menit. Kemudian embrio direndam dalam cawan petri berisi xilol minimal selama 30 menit.
9. Selanjutnya embrio *dimounting* menggunakan Canada balsam/entelan.

16. *Mounting*

- a. Disiapkan kaca benda bersih dan bebas lemak.
- b. Kertas saring berembrio diletakkan di atas kaca benda.
- c. Kertas saring tersebut dilepaskan dari embrio secara hati-hati. Dapat menggunakan bantuan pinset, skalpel, jarum preparat, atau silet.
- d. Canada balsam/entelan diteteskan di sekitar embrio secukupnya dan ditutup secara hati-hati dengan kaca penutup.
- e. *Slide* diberi label yang berisi umur embrio, metode pewarnaan, tanggal, dan nama pembuat.
- f. Apabila ditutup menggunakan Canada balsam maka *slide* dikeringkan di atas *shot plate* namun bila menggunakan entelan maka *slide* dapat dikeringkan di suhu ruang.

VAGINAL SMEAR

A. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah gelas objek beserta penutupnya, *cotton bud*, *tissue*, bak preparat, dan mikroskop cahaya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah mencit betina (*Mus musculus* ♀) masak kelamin dan tidak sedang hamil, larutan alkohol 70%, larutan NaCl 0,9%, dan pewarna *methylen blue* 1%.

B. Metode

1. Mencit betina yang akan diperiksa dipegang dengan tangan kanan, dengan cara menelentangnya di atas telapak tangan sementara tengkuk dijepit oleh ibu jari dan telunjuk. Ekor dijepit diantara telapak tangan dan jari kelingking.
2. Ujung *cotton bud* dibasahi dengan larutan NaCl 0,9 % kemudian secara perlahan dimasukkan ke dalam vagina mencit sedalam ± 5 mm dan diputar searah secara perlahan-lahan dua hingga tiga kali.
3. Objek glass dibersihkan dengan alkohol 70% dan dikering udarkan. Ujung *cotton bud* yang sudah dioleskan pada vagina tersebut dioleskan memanjang dua atau tiga baris olesan dengan arah yang sama pada gelas objek.
4. Olesan vagina tersebut ditetesi dengan larutan *methylen blue* 1 % sambil sesekali dimiringkan agar pewarna merata pada permukaan ulasan dan ditunggu selama kurang lebih 5 menit. Pewarna yang berlebihan dibersihkan dengan membilas menggunakan akuades atau air mengalir kemudian ditutup dengan gelas penutup.
5. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lemah kemudian perbesaran kuat. Diperhatikan tipe dan proporsi sel dalam preparat apusan. Digambar sel-sel yang ditemukan dalam sediaan tersebut dan tentukan fasenya.