

**LAPORAN PRAKTEK LABORATORIUM HISTOTEKNIK
TISSUE PROCESSING DAN PEWARNAAN**

Nama : Yulia Fitri Djaribun
NIM : 127008005
Tanggal : 22 September 2012

A. Tujuan Praktikum :

1. Agar mahasiswa mampu melakukan proses fiksasi jaringan
2. Agar mahasiswa mampu melakukan pewarnaan Haematoksilin Eosin
3. Agar mahasiswa mampu menganalisa hasil spesimen mikroskopik

B. Pendahuluan

Teknik histoteknik adalah salah satu teknik laboratorium yang dipergunakan dalam kegiatan eksperimental, laboratorium histopatologi dalam bidang ilmu patologi anatomi untuk mendiagnosa suatu tumor atau kelainan tubuh yang didapat dengan cara biopsi atau operasi dan diperiksa di Laboratorium dengan mikroskop cahaya.

Hasil pemeriksaan dari teknik ini adalah berupa spesimen mikroskopik setelah dilakukan pewarnaan sesuai dengan yang dibutuhkan , salah satunya adalah pewarnaan Haematoksilin – Eosin (HE).

C. ALAT DAN BAHAN

Microtom	Tabung kaca bertutup	Formalin 10 %	Waterbath
Specimen	Objek gelas	Alcohol 70%, 80%,90%,100%	hematoxilin
Pisau bisturi	Leuchart	Cyolol	Eosin
Pengalas	Lembaran logam	parafin	Air keran
Pinset anatomis	Spatula	albumin	Canada lem
Histoplate	Piringan logam	gliserin	Oven

D. CARA KERJA

1. Fiksasi

a. Definisi

Fiksasi adalah tindakan merendam bahan pemeriksaan yang berasal dari jaringan hewan atau manusia, didapat dari biopsi , operasi ataupun autopsi kedalam cairan fiksasi yang mempunyai volume cukup dan emakai cairan fiksasi yang benar.

Fiksasi harus dilakukan dengan baik dengan menggunakan cairan fiksasi yang cukup dan sempurna karena kerusakan yang diakibatkan oleh kesalahan fiksasi terhadap jaringan tersebut merupakan kesalahan yang tidak dapat diperbaiki kembali.

b. Tujuan Fiksasi

1. Mencegah terjadinya proses autolisis yaitu larutnya sel yang diakibatkan oleh proses – proses yang dipengaruhi enzim dari dalam sel itu sendiri.
2. Mencegah proses pembusukan yaitu proses penghancuran jaringan yang diakibatkan oleh aktifitas bakteri dan biasanya disertai dengan pembentukan gas.
3. Memadatkan dan mengeraskan agar mudah untuk dipotong. Untuk jaringan yang lunak seperti jaringan otak akan sulit dipotong jika tanpa dilakukan oleh cairan fiksasi.
4. Memadatkan cairan koloid, mengubah konsistensi dari bahan seperti cairan yang terdapat didalam jaringan menjadi konsistensi lebih padat.
5. Mencegah kerusakan struktur jaringan. Dengan proses masuknya cairan fiksasi kedalam sel lewat membran sel yang bersifat semipermeabel secara osmosis/penyerapan.

c. Syarat – syarat cairan

Cairan fiksasi yang digunakan mempunyai syarat – syarat tertentu agar jaringan yang difiksasi tidak mengalami kerusakan yaitu :

1. Mempunyai daya tembus yang kuat
2. Menembus jaringan secara merata
3. Dapat memfiksasi secara keseluruhan
4. Mempunyai daya tembus terus menerus
5. Tidak berakibat yang terlalu membahayakan terhadap lingkungan
6. Dengan cairan fiksasi tersebut, jaringan dapat diwarnai dengan berbagai macam tehnik dan jaringan tersebut dapat disimpan untuk waktu yang lama

d. Langkah -langkah :

1. Ambil jaringan yang akan difiksasi dan potong sampai ketebalan maksimal 1 cm (untuk mempermudah penyerapan dari 2 sisi)
2. Masukkan kedalam larutan pengawet (formalin). Seluruh jaringan harus terendam dalam larutan pengawet (volume minimal larutan 20 x jaringan).
3. Diamkan selama 24 jam

2. Dehidrasi

Bertujuan untuk menyerap air yang masih ada dalam jaringan. Jaringan dimasukkan kedalam larutan alcohol dari konsentrasi rendah ke tinggi agar dehidrasi terjadi bertahap, sehingga jaringan lemaknya tidak lepas (terkikis) yang dapat menjadi artefak dan menyulitkan pengamatan akhir.

- a. Masukkan jaringan kedalam alcohol 70% selama 12 jam
- b. Masukkan jaringan kedalam alcohol 80% selama 12 jam
- c. Masukkan jaringan kedalam alcohol 96% selama 12 jam
- d. Masukkan jaringan kedalam alcohol absolute selama 12 jam

3. Pembeningan

Bertujuan untuk membersihkan jaringan dari alcohol dengan menggunakan larutan cytol yang menyebabkan cytoplasma kosong (hanya terdiri dari jaringan murni) dan mempersiapkan jaringan untuk proses pembedahan.

- a. Masukkan kelarutan cytol wadah 1 selama 30 menit
- b. Masukkan kelarutan cytol wadah 2 selama 30 menit

4. Pembedahan

Merupakan proses pengeluaran cairan pembedah (*clearing agent*) dari jaringan dan menggantikannya dengan paraffin. Dilakukan dengan menggunakan *paraffin oven*. *Clearing agent* yang tersisa dapat mengkristal dalam jaringan sehingga saat dipotong dengan mikrotom jaringan akan robek.

- a. Paraffin/ paraplast I selama 2 jam;
- b. Paraffin/ paraplast II selama 1 jam;
- c. Paraffin/ paraplast III selama 2 jam.

5. Pengecoran

- a. Besi potongan berbentuk L (Leuckhart)
- b. Susun 2 buah potongan besi si atas lembaran logam sehingga membentuk ruang kubus;
- d. Tuangkan sedikit paraffin cair di bagian pinggir agar paraffin tercetak dengan merata
- e. Letakkan jaringan sesuai dengan keinginan saat jaringan diiris dengan bagian yang ingin dilihat menghadap kebawah (mempermudah pengamatan)
- f. Tuangkan paraffin secukupnya agar menutupi jaringan seluruhnya;
- g. Hindarkan terbentuknya *air bubble*.
- h. *Histoplate* dari plastik (*casette*) dan piringan logam (*mold*).
- i. Spatula untuk melekatkan blok paraffin.
- j. Beri label identitas jaringan saat *blocking*.
- k. Diamkan selama 24 jam.

6. Pemotongan jaringan

Memotong specimen yang berada dalam lapisan lilin sehingga dapat dilanjutkan untuk proses selanjutnya. pada proses pemotongan ini pisau pemotong harus rata dan tajam untuk menghasilkan potongan jaringan yang baik sehingga untuk membersihkan pisaunya digunakan kuas khusus.

- a. Atur ketebalan $\pm 5 - 10 \mu\text{m}$ (d disesuaikan kebutuhan)

- b. Atur jarak preparat yang dipegang oleh *holder* ke arah pisau sedekat mungkin;
- c. Gerakkan rotor (putaran) pada mikrotom secara ritmis,
- d. Buang pita-pita paraffin awal yang tanpa jaringan;
- e. Setelah potongan mengenai jaringan, potong blok preparat secara hati-hati;
- f. pindahkan secara hati-hati dengan sengkeli ke atas air di dalam *waterbath* yang diatur pada suhu 55°C;
- g. siapkan objek gelas yang telah dibubuhi gliserin dan albumin (putih telur) yang telah diratakan dan letakkan diatas hot plate dipinggiran *waterbath*.
- h. Setelah pita paraffin terkembang dengan baik, tempelkan paraffin ke kaca objek dengan cara mencelupkan objek gelas yang telah dibubuhigliseri dan albumin tadi kedalam air didekat paraffin yang telah terkembang dengan baik,lengketkan dan angkat;
- i. Masukkan kedalam wadah minimal 12 jam
- j. Kemudian masukan ke 2(dua) wadah cylol masing-masing 5 (Lima) menit untuk menghilangkan paraffin
- k. Untuk rehidrasi yang bertujuan untuk memberikan air kembali kejaringan untuk menyerap pewarnaan, Masukkan dengan cara dicelupkan kecairan alcohol dengan kosentrasi dari tinggi kerendah masing2 selama 2 menit dengan 2 wadah cairan yang memiliki kosentrasi yang sama yaitu ;
 - 1.1 alkohol absolute 2 menit masing-masing 2 wadah
 - 1.2 alkohol 95 % 2 menit masing-masing 2 wadah
 - 1.3 alkohol 80 % 2 menit masing-masing 2 wadah
 - 1.4 alkohol 70 % 2 menit masing-masing 2 wadah
 - 1.5 cuci dengan air keran

7. Pewarnaan

- a. Inkubasi dalam larutan hematoxylin Mayer selama 5 menit yang bertujuan untuk mewarnai bagian inti sel menjadi warna biru,kecuali cytoplasma
- b. Cuci dalam air mengalir selama 5 menit;
- c. Masukkan dalam larutan *eosin working solution* selama 3 menit dan bilas dengan air.
- d. Dehidrasi dalam serial alkohol dengan gradasi meningkat dengan cara dicelupkan (70%,80%,90%,100%)
- e. Inkubasi dalam xylol 2x2 menit untuk menghilangkan air
- f. Dilap dengan tissue kering dengan hati hati. Jangan sampai mengenai jaringannya.

8. Perekatan (mounting)

Perekatan selain berfungsi untuk melengketkan,juga berfungsi untuk mengawetkan jaringan (dapat bertahan bertahun-tahun).

- a. Teteskan balsem Canada diatas objek gelas yang bersih

- b. Ambil objek gelas yang berisi jaringan dan tutup dengan objek gelas yang berisi balsem Canada ratakan. Penutupan ini juga berfungsi untuk memberikan retraksi sehingga terlihat jelas saat pengamatan.
- c. Observasi di bawah mikroskop, *Counterstaining*
hasil observasi : inti berwarna ungu, sitoplasma berwarna kemerahan

9. Beri labeling

E. Kesimpulan

- 1) *Tissue processing* merupakan suatu teknik yang cukup mudah dilakukan dan cukup akurat penilaian ada tidaknya kelainan dalam jaringan.
- 2) Membutuhkan ketelitian dalam mengikuti prosedur pembuatan preparat jaringan
- 3) Jaringan yang sudah melewati prosedur *tissue processing* sangat awet, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama.
- 4) Membutuhkan waktu yang lama dan harus tepat waktu dalam setiap prosesnya sehingga butuh waktu untuk membantu sebagai alat penunjang diagnose.
- 5) Membutuhkan ruangan khusus, alat dan bahan kimia tertentu sehingga membutuhkan persiapan khusus untuk melakukannya.

F. Saran

Untuk selanjutnya praktikum histoteknik sebaiknya di ditambahkan waktu sehingga setiap mahasiswa punya kesempatan untuk mempraktekkan langkah demi langkah satu persatu secara mandiri.