

NAMA : HENNY ERINA SAURMAULI OMPUSUNGGU

TANDA TANGAN :

JUDUL : **TISSUE PROCESSING (HISTOTEKNIK)**

TUJUAN :

Latihan membuat preparat histologi jaringan masing-masing yang dapat dianalisa lanjut dengan mikroskop

PENDAHULUAN:

Histoteknik adalah metoda membuat sajian dari spesimen tertentu melalui suatu rangkaian proses hingga menjadi preparat histologi yang baik dan siap untuk dianalisis. Spesimen dapat berasal dari manusia dan hewan. Preparat yang baik dapat digunakan untuk mempelajari peran sel/jaringan dalam keadaan fisiologis atau patologis, mempelajari perubahan sel/jaringan akibat suatu perlakuan pada penelitian, dan alat bantu diagnosis penyakit. Preparat yang baik dapat memberikan hasil yang akurat untuk menjawab pertanyaan riset. Untuk mencapai tujuan tersebut, preparat harus dapat memberikan gambaran tentang bentuk, besar, dan susunan sebagaimana sel/jaringan tersebut hidup.

ALAT DAN BAHAN :

1. Jaringan yang akan dibuat menjadi preparat
2. Formalin 10%
3. Alkohol 70%, 80%, 90%, 100%
4. Xylol
5. Parafin
6. Wadah cetakan (kayu segi empat)
7. Microtome knife
8. Waterbath (suhu diatur 45-50°C)
9. Kaca Objek
10. Albumin (putih telur + gliserin)
11. Larutan Hematoxylin
12. Larutan Eosin
13. Canada Balsem
14. Deck Glass
15. Label

CARA KERJA :

1. Persiapan jaringan
 - Siapkan jaringan yang akan dijadikan preparat
 - Potong jaringan sekitar 1cm x 1cm untuk memudahkan fiksasi, sehingga cairan fiksasi dapat menyerap sampai ke seluruh jaringan.
2. Tahap Fiksasi/ Pengawetan
 - Rendam jaringan yang sudah dipersiapkan tadi ke dalam cairan Formalin 10% selama 24 jam
 - Hal yang harus diperhatikan dalam proses fiksasi jaringan histologi:
 - a. Tebal irisan : jangan terlalu tebal (1cm x 1cm) supaya mempermudah penyerapan cairan fiksatif merata ke seluruh jaringan
 - b. Volume cairan fiksatif : harus sampai dapat merendam seluruh bagian jaringan
 - c. Jenis cairan fiksatif yang digunakan
 - Pasca fiksasi, jaringan yang keras mendapat perlakuan khusus, yaitu :
 - a. Tulang: dekalsifikasi dengan formic acid 8%

- b. Kulit: teknik lendrum → cuci dengan air kran mengalir atau alkohol 90% atau Fenol 4% dalam akuades selama 1 -3 hari.

Jenis Cairan Fiksatif:

c. Formalin

- Yg digunakan adalah bentuk monomer: dibuat dengan menetralkan/alkalis larutan
- Mengakibatkan crosslink protein
- Dapat berupa: Formal saline, formal calcium, 10% neutral buffered formalin, buffer formalin sukrosa

d. Bouin

- Mengandung asam pikrat, meledak kalau kering
- Mudah dikenali saat pemotongan → warna kuning
- Mempunyai daya penetrasi yang cepat dan merata
- Jaringan mengalami pengerutan

e. Zenker Formol (Cairan Helly)

- Mengandung merkuri klorida
- Daya fiksasinya cepat dan kuat, tetapi kecepatan penetrasinya berkurang setelah meresap sejauh beberapa milimeter pertama dan potongan jaringan yang melebihi ketebalan 5 mm pada umumnya cenderung untuk menjadi keras (rapuh), *overfixed* di bagian pinggir sementara di bagian tengah menjadi lunak karena *underfixed*
- Fiksatif ini sangat baik untuk fiksasi sumsum tulang dan limpa, mitokondria.

f. Etanol

- Untuk *Cytological fixatives*
- Yang biasa digunakan: Etanol 95%
- Digunakan untuk Pap test, swab
- Mempertahankan antigenisitas → cocok IHC

g. Larutan Carnoy

- Mengawetkan substansi Nissl dan glikogen
- Daya penetrasi yang cepat
- Fiksasi ini sering digunakan apabila suatu diagnosis perlu ditegakkan dengan cepat, misalnya untuk diagnosis kanker pada saat pembedahan. Fiksasi umumnya selesai setelah 1-2 jam, sedangkan potongan kecil selesai difiksasi dalam 15 menit.
- Efek pengerutan: kuat

3. Tahap Dehidrasi

- Rendam Jaringan yang sudah difiksasi ke dalam larutan Alkohol secara bertahap :
 - Larutan Alkohol 70 % → Larutan Alkohol 80% → Larutan Alkohol 90% masing-masing 1 hari
 - Larutan Alkohol 95% 2 hari (2xganti)
 - Larutan Alkohol 100% 2 hari (2xganti)
- Dilakukan bertahap dari konsentrasi Alkohol yang rendah ke konsentrasi Alkohol yang tinggi agar stroma tidak terlepas dari jaringan, dimana stroma yang lepas dapat menjadi *artefact* pada saat kita mengamati preparat bila telah jadi.
- Efek minimal dehidrasi sudah mulai terjadi setelah 10 menit jaringan terendam dalam Larutan Alkohol.

4. Tahap Pembeningan/ Clearing

- Rendam Jaringan yang sudah melalui tahap dehidrasi ke dalam cairan Xylol yang diletakkan dalam wadah kaca (karena wadah plastik bisa larut bila terkena Xylol)
- Dilakukan 2 kali (Xylol I dan Xylol II) masing-masing selama 15 menit.
- Tujuan dilakukan clearing adalah untuk menarik sisa alkohol dari jaringan sebagai persiapan jaringan memasuki tahap pembedahan.
- Xylol menyebabkan sitoplasma menjadi kosong (menjadi jaringan murni)

Bahan yang digunakan :

- a. Cedar wood oil
 - Sifat *clearing*-nya paling baik.
 - Tidak mengeraskan jaringan
 - Jaringan yang halus sangat baik.
 - Kadang digunakan untuk jaringan keras (kulit dan jaringan ikat padat)
 - Dapat disimpan dalam waktu lama (berbulan-bulan)
 - Mahal
- b. Chloroform
 - Keuntungan :
 - Paling sering dipakai
 - Bersifat toleran (dapat disimpan semalaman tanpa menjadi keras)
 - Kerugian
 - Titik akhir tak dapat dilihat dengan mata
 - Saat menjadi bening dan transparan tak jelas
 - Cara mengatasi : waktu pembenangan diperpanjang
 - Lebih mahal dari xylene dan benzene tetapi lebih murah dari *cedar wood oil*.
- c. Benzyl benzoat
 - Metode :
 - Benzyl benzoat I selama 24 jam hingga jaringan tenggelam. Jaringan menjadi bening dan transparan.
 - Benzyl benzoat II selama 2-3 jam.
 - Benzol-Paraffin selama ½ - 1 jam. Campuran benzol dan paraffin cair dengan perbandingan sama.
 - Masukkan ke dalam paraffin cair.
- d. Methyl benzoat
 - Metode :
 - Methyl benzoat I sampai jaringan tenggelam.
 - Daya penetrasi lebih cepat dari benzol benzoat
 - Jaringan mudah rapuh
 - Methyl benzoat II selama 1-2 jam.
 - Benzol-Paraffin. Campuran benzol dan paraffin dengan perbandingan sama.
 - Masukkan ke dalam paraffin cair.
- e. Benzene dan Xylene/Xylol
 - Keuntungan:
 - Waktu *clearing* cepat : ½ - 1 jam.
 - Benzene lebih lambat dari xylene tetapi kerapuhan jaringan lebih berkurang dibanding xylene
 - Kerugian: Karsinogenik
 - Metode:
 - Direndam dalam xylol 2 x 15 menit hingga bening dan transparan
 - Volume 50 – 1000 kali volume jaringan
 - Setelah itu masukkan ke dalam paraffin cair
- f. Toluene
 - Sama dgn xylene tetapi lebih lambat
 - Menimbulkan sedikit pengerasan dan distorsi jaringan
 - Mudah menguap

5. Tahap Pembenaan/ Impregnation

- Agar jaringan mudah dipotong maka jaringan harus dipadatkan menggunakan paraffin
- Impregnasi adalah proses pengeluaran cairan pembening (*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.

Teknik Pembenaman:

- Paraffin/ parplast I selama 1 jam;
- Paraffin/ parplast II selama 1 jam;
- Paraffin/ parplast III selama 1 jam.
- Setelah pembenaman, proses dilanjutkan dengan pengecoran (*blocking*).

6. Tahap Pengecoran/ Blocking

Alat Cetak :

- Kayu/ besi potongan berbentuk L (Leuckhart). Susun 2 buah potongan kayu/ besi di atas lembaran logam sehingga membentuk ruang kubus
- *Histoplate* dari plastik (*casette*) dan piringan logam (*modal*).

Teknik Pengecoran:

- Tuangkan sedikit paraffin cair di bagian pinggir agar tidak bocor
- Letakkan jaringan sesuai dengan keinginan saat jaringan diiris (potongan jaringan yang ingin diamati di bawah mikroskop diletakkan di dasar agar permukaannya rata)
- Tuangkan paraffin secukupnya agar menutupi jaringan seluruhnya
- Hindarkan terbentuknya *air bubble*
- Diamkan semalaman (12 jam)

7. Tahap Pemotongan Jaringan

Persiapan:

- Microtome knife vs Microtome blade (disposable)*
- Siapkan coated slides: Albumin (putih telur + gliserin)
- Waterbath* berisi air hangat 55°C
- Sengkelit

Teknik Pemotongan:

- Letakkan pisau pada mikrotom dengan sudut tertentu.
- Rekatkan blok paraffin yang akan dipotong pada *holder* dengan menggunakan spatula atau *scalpel blade* yang panas.
- Letakkan *holder* berikut blok preparat pada tempatnya di mikrotom.
- Ketebalan irisan $\pm 5 - 10 \mu\text{m}$ (d disesuaikan kebutuhan)
- Atur jarak preparat yang dipegang oleh *holder* ke arah pisau sedekat mungkin
- Gerakkan rotor (putaran) pada mikrotom secara ritmis
- Buang pita-pita paraffin awal yang tanpa jaringan,
- Setelah potongan mengenai jaringan, potong blok preparat secara hati-hati,
- Pindahkan secara hati-hati dengan sengkelit ke atas air di dalam *waterbath* yang diatur pada suhu 55°C, tujuannya agar lembaran/ pita paraffin terkembang dengan baik.
- Setelah pita paraffin terkembang dengan baik, tempelkan paraffin ke kaca objek yang telah terlebih dahulu diolesi dengan albumin, dengan cara mencelupkan kaca objek tegak lurus ke dalam *waterbath*, perkirakan agar potongan jaringan yang akan diamati menempel di tengah kaca objek.
- Simpan kaca objek berisi potongan paraffin dan jaringan selama semalaman (12 jam) agar benar-benar kering.

8. Tahap Pewarnaan

Jenis-jenis pewarnaan:

- Hematoxylin & Eosin (Rutin)
Paling banyak digunakan → rutin
HE dapat menunjukkan sebagian besar struktur histologi
- Khusus :
 - PAS, PTAH, Impregnasi perak
 - Sudan → lipid

- Sitologik :
 - a. *Pap test*
 - b. *Blood smear*
 - c. *Swab mukosa*
- Imunohistokimia

Metode:

- Deparafinisasi dengan Xylol 2 x 2 menit
 - Rehidrasi dengan alkohol 100% (2x2 menit) – 95% (2 menit) - 90%(2 menit) – 80% (2 menit) – 70% (2 menit) – air kran 3 menit
 - Rendam dalam larutan Hematoxylin Mayer selama 5-10 menit
 - Bilas dalam air mengalir selama 15-20 menit
 - Observasi di bawah mikroskop: Hematoxylin mewarnai sitoplasma menjadi berwarna pink (eosinofilik)
 - Bila warna preparat terlalu biru, untuk mengurangi warna biru hematoxyllin (*to differentiate nuclear staining*) lakukan “Acid Alkohol Rinse” menggunakan 0.25 % acid rinse: Akuades 975 ml + HCl 25 ml
 - Bila warna preparat kurang biru lakukan “Blueing” menggunakan air kran (yang alkalis) dengan pH 7,8 atau Lithium carbonate (*Lithium carbonate* 0,5 gr + Akuades 1000 ml campurkan dengan baik)
 - Lalu *counterstaining* dengan *eosin working solution* selama 3 menit.
 - Dehidrasi dalam serial alkohol dengan gradasi meningkat: 70% (2x2 menit) – 80% (2x2menit) – 90% (2x2menit) – 100% (2x2 menit)
 - Rendam kembali dalam Xylol 2 x 2 menit.
9. Tahap Perekatan/ Mounting
- Perekatan/ mounting menggunakan Canada Balsem
 - Letakkan 1 tetes Canada balsam diatas *deck glass*, lalu tutupkan ke atas kaca objek jangan sampai ada gelembung udara
 - Observasi di bawah mikroskop
10. Tahap Labelling
- Tahap akhir dengan memberikan label nama pada preparat jaringan yang telah selesai dibuat.

Penilai

(Dr. Esther R. D. Sitorus, Sp.PA)
NIP:197112082003122001