

LAPORAN PRAKTIKUM HISTOTEKNIK

Disusun oleh:

Jekson Martiar Siahaan

I. Tujuan:

1. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan teknik – teknik histoteknik yang digunakan dalam pembuatan preparat jaringan
2. Mahasiswa mampu memahami dan membuat preparat dari jaringan
3. Mahasiswa mampu menganalisa dari preparat jaringan dengan menggunakan mikroskop

II. PENDAHULUAN

Histoteknik adalah suatu metode membuat sajian histologi dari spesimen tertentu melalui rangkaian proses hingga menjadi sajian yang siap untuk dianalisis. Sumber Specimen dapat diperoleh dari hewan maupun manusia. Histoteknik ini dapat dilakukan oleh staf pengajar, peneliti atau teknisi laboratorium. Rangkaian proses pembuatan sajian histologi terdiri atas :

a. Fiksasi (Fixation)

Dasar dari pembuatan sajian histologi yang baik adalah melakukan fiksasi yang benar. Kesalahan yang dilakukan pada tahap fiksasi tidak akan pernah dapat diperbaiki lagi pada tahapan selanjutnya. Jadi hasil akhir sajian histologi yang baik sangat tergantung pada cara melakukan fiksasi dengan baik. Tujuan dari fiksasi adalah untuk :

- Mengawetkan jaringan
- Mengeraskan jaringan

Efek fiksasi terhadap jaringan yang diproses adalah

- Menghambat proses pembusukan dan autolisis
- Pengawetan
- Pengerasan
- Pematatan koloid
- Differensiasi optik
- Pengaruh terhadap pewarnaan

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam pembuatan jaringan histologis adalah:

1. **Tebal irisan jaringan 3-5mm** sehingga cairan fiksasi dapat dengan cepat memfiksasi seluruh jaringan. Bila irisannya terlalu tebal maka permukaan luarnya saja yang difiksasi dengan cukup baik, sedangkan bagian tengah jaringan sudah keburu membusuk sebelum cairan fiksasi sempat merembes ke sana.
2. **Volume cairan fiksasi sekurang-kurangnya harus 15-20x volume jaringan yang akan difiksasi.** Besarnya volume jaringan menentukan volume fiksasi yang diperlukan sedangkan tebal jaringan menentukan kecepatan fiksasi. Panjang dan lebar jaringan umumnya ditentukan oleh jenis mikrotom yang akan digunakan.
3. **Jenis cairan fiksasi** yang akan digunakan bergantung kepada unsur jaringan yang akan didemonstrasikan dan kepada jenis pewarnaan yang akan digunakan.

Bahan yang dapat digunakan untuk Larutan fiksatif adalah :

- Larutan Formalin 10% (Idealnya Formalin Buffer)
- Larutan bouin

- Larutan zenker formol (cairan helly)
- Larutan ethyl alkohol
- Larutan asam asetat-alkohol-formalin (tellyesniczky)
- Larutan carnoy

b. Dehidrasi (Dehydration)

Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Caranya adalah dengan merendam jaringan yang telah difiksasi dengan Alkohol dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi (70% → 80% → 96% atau Alkohol Absolut)

c. Pembeningan (Clearing)

Tujuannya adalah :

- Menghilangkan alkohol dari jaringan
- Mempersiapkan jaringan ke pembedaan

Pembuangan alkohol dari jaringan sangat penting oleh karena alkohol dan parafin tidak dapat saling melarutkan dan apabila alkohol tertinggal dalam jaringan akan menyebabkan jaringan sulit dipotong. Pembeningan dilakukan dengan Larutan Xylol I dan Larutan Xylol II selama 30 menit. Larutan Xylol II digunakan untuk mengeluarkan alkohol setelah pembeningan dengan larutan Xylol I. Bila Clearing dilakukan terlalu lama akan menyebabkan jaringan menghitam. Xylol akan menyebabkan Sitoplasma kosong oleh karena Xylol menarik liquid dari jaringan.

d. Pembedaan (Impregnasi/Embedding)

Setelah cairan ditarik oleh Xylol maka jaringan akan tinggal bagian padatnya sehingga susah dipotong, untuk mengisi bagian yang kosong itu dilakukanlah pembedaan dengan Parafin sehingga jaringan dapat dengan mudah dipotong. Pembedaan memakai 3 wadah parafin yang ditempatkan di dalam oven. Jaringan direndam selama 1 jam setiap wadah. Tujuan dilakukannya 3 wadah adalah agar ada resting dan praktikan tetap terjaga ataupun tidak bosan menunggu 3 jam.

e. Pengecoran (Blocking)

Pengecoran merupakan pembuatan blok preparat menggunakan potongan besi berbentuk L (Leuckhart). 2 buah potongan besi disusun diatas lembaran logam hingga rapat dan membentuk ruang seperti kubus. Di Laboratorium dengan fasilitas lebih memadai pengecoran sudah memakai kaset.

f. Pemotongan jaringan (Sectioning)

Pemotongan blok preparat dilakukan dengan mikrotom. Sebaiknya dibuatkan beberapa slide, untuk menghindari hilangnya jaringan saat deparafinisasi.

g. Pewarnaan (Staining)

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat dikenali / diamati dengan mikroskop. Pewarnaan yang dilakukan adalah pewarnaan HE untuk mewarnai inti menjadi biru dan pewarnaan Eosin untuk mewarnai Sitoplasma menjadi siopilic (Merah)

h. Perekatan (Mounting)

Kegunaan Mounting adalah :

- Pengawet

- Refraksi untuk jaringan tersebut sehingga lebih jelas dilihat batas antar selnya

i. Pelabelan (Labelling)

Labelling penting untuk memudahkan dalam pengenalan preparat.

III. ALAT DAN BAHAN

- Jaringan dari Hewan
- Formalin 10%
- Alkohol 70%, 80%, 96%, Alcohol Absolut
- Xylol
- Besi potongan berbentuk L (Leuckhart)
- Oven
- Parafin
- Microtom
- Waterbath
- Albumin (Putih telur + Gliserin)
- Objek Glass
- Pewarna HE
- Eosin
- Balsam Kanada

IV. Cara Kerja

a. Fiksasi (Fixation)

- Jaringan diambil dari hewan
- Dicuci untuk menghilangkan darahnya
- Potong jaringan Max 1 x 1 cm agar peresapan dari alkohol lebih maksimal (Usahakan pemotongan jaringan berbentuk petak agar preparat terlihat dengan baik)
- Difiksasi dengan Formalin 10% dengan cara jaringan direndam dengan formalin 10% sampai seluruh jaringan terendam selama 24 jam

b. Dehidrasi (Dehydration)

- Rendam jaringan samapi seluruh bagian jaringan terendam dengan Alkohol. Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan alkohol dari konsentrasi rendah ke tinggi (70%, 80%, 96% atau Alkohol Absolut) masing – masing minimal 12 jam
- Dapat dilakukan dengan aseton dengan waktu 3 x 20 namun aseton jarang dijual karena merupakan bahan pembuat Narkoba

c. Pembeningan (Clearing)

- Masukkan jaringan ke dalam larutan Xylol I selama 30 menit
- Masukkan kembali ke dalam larutan Xylol II selama 30 menit.
- Dengan pembeningan maka jaringan akan bening dan transparan

d. Pembenaman (Impregnasi/Embedding)

- Siapkan 3 wadah yang berisi parafin di dalam oven
- Jaringan direndam ke dalam oven yang sudah ada wadah parafin I selama 1 jam
- Kemudian masukkan aringan ke wadah 2 selama 1 jam
- Selanjutnya masukkan jaringan ke wadah 3 selama 1 jam

e. Pengecoran (Blocking)

- Siapkan potongan besi berbentuk L (Leuckhart) untuk pembuatan blok preparat
- 2 buah potongan besi disusun diatas lembaran logam hingga rapat dan membentuk ruang seperti kubus
- Letakkan potongan besi yang disusun berbentuk kubus, dimana jaringan yang akan dilihat diletakkan dibagian bawah agar rata
- Tuangkan parafin ke dalam potongan besi berbentuk kubus
- Tunggu sampe 12 jam sampai Parafin membeku

f. Pemotongan jaringan (Sectioning)

- Potong Blok parafin yang berisi jaringan dengan memakai microtom
- Usahakan potongan slidanya tidak berlipat dengan cara microtomnya agak dihentakkan agar slide yang terbentuk baik
- Buatlah beberapa slide
- Slide dimasukkan ke dalam waterbath untuk deparafinisasi untuk menghilangkan parafinnya, suhu airnya 45 – 50 oC
- Olesin kaca objek dengan albumin kemudian dengan perlahan – lahan tempelkan specimen ke kaca objek
- Diamkan selama 12 jam
- Rendam preparat dengan larutan Xylol I selama 5 menit untuk menarik parafin lalu rendam dengan larutan Xylol II selama 5 menit
- Lakukan rehidrasi dengan alkohol dari konsentrasi tinggi ke rendah agar jaringan berisi air sehingga dapat diwarnai
- Celupkan (Deeping) kaca objek yang berisi jaringan kedalam :
 - o Alkohol Absolut selama 2 menit
 - o Alkohol Absolut selama 2 menit
 - o Alkohol 90% selama 2 menit
 - o Alkohol 90% selama 2 menit
 - o Alkohol 80% selama 2 menit
 - o Alkohol 80% selama 2 menit
 - o Alkohol 70% selama 2 menit
 - o Alkohol 70% selama 2 menit

g. Pewarnaan (Staining)

- Masukkan kaca objek yang berisi jaringan kedalam Larutan haematoxylin 5 – 10 menit
- Bilas dengan air mengalir 2 – 3 menit
- Masukkan ke dalam larutan Eosin
- Cuci dengan air mengalir
- Lakukan dehidrasi dari alkohol yang konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi, masing – masing 2 menit
 - o Alkohol 70%
 - o Alkohol 70%
 - o Alkohol 80%
 - o Alkohol 80%
 - o Alkohol 90%
 - o Alkohol 90%
 - o Alkohol Absolut
 - o Alkohol Absolut

- Kemudian dimasukkan ke larutan Xylol, masing – masing 2 menit :
 - o Xylol I
 - o Xylol II

h. Perekatan (Mounting)

- Teteskan 1 tetes Canada Balsam pada deck glasskemudian tutupkan pada Objek glass yang ada jaringannya
- Tekan – tekan agar tidak ada bubble

i. Pelabelan (Labelling)

- Berilah label pada preparat
- Preparat sudah dapat diamati dengan mikroskop

V. Kesimpulan

- Histoteknik merupakan suatu cara untuk membuat preparat histologis melalui berbagai proses sehingga mejadi suatu preparat yang siap untu dianalisis
- Sajian histologis dapat digunakan sebagai riset, untuk dapat mengetahui struktur sel baik yang normal maupun yang patologis
- Pengerjaan histoteknik membutuhkan waktu yang lama

VI. Saran

- Diharapkan ada praktikum histoteknik selanjutnya
- Mahasiswa diberitahu cara pengambilan sampel dari penderita serta mahasiswa diperbolehkan mengambil sampel dari penderita

Penilai,

Dr. Esther R. D. Sitorus, Sp.PA
Nip. 197112082003122001