

LAPORAN PRAKTIKUM BIOMEDIK III

Nama : Aditya Candra

Tgl Praktikum : 24 Oktober 2013

Judul Praktikum : Histoteknik

Tujuan Praktikum :

1. Melihat demonstrasi pembuatan preparat histologi mulai dari fiksasi jaringan hingga pemberian label pada preparat yang telah selesai
2. Latihan teknik dasar dalam pembuatan preparat jaringan dengan cara histoteknik
3. Latihan menggunakan mikroskop yang digunakan untuk melihat preparat histologi yang telah dibuat.

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 yang digunakan

Jaringan yang akan dibuat menjadi preparat	Wadah cetakan (kayu segi empat)	Larutan Hematoxylin Mayer
Formalin 10%	Microtome knife	Larutan Eosin
Alkohol 70%, 80%, 90%, 100%	Waterbath (suhu diatur 45-500C)	Canada Balsem
Xylol	Kaca Objek	Deck Glass
Parafin	Albumin (putih telur + gliserin)	Label

Cara Kerja :

Rangkaian proses histoteknik antara lain:

Fixation (pengawetan), Dehydration (dehidrasi), Clearing (pembeningan), Infiltration/ Impregnation/Embedding(pembenaman),Blockig/Casting(pengecoran),Sectioning(pengirisan jaringan),Staining(pewarnaan),Mounting(perekatan),Labelling (pelabelan).

1. Fixation (pengawetan)

Cara melakukan pengawetan jaringan ada 2 macam, yaitu supravital/intravital atau merendam dalam larutan pengawet. Merendam dalam larutan pengawet adalah yang paling sederhana dan sering dilakukan.

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam fiksasi jaringan histologi adalah: tebal irisan, volume larutan pengawet dan jenis larutan pengawet.

Jenis-jenis cairan fiksasi yang digunakan: Formalin, Muller, Bouin, Zenker Formal (Cairan Helly), Alkohol (etanol).

Pemrosesan Jaringan

Setelah jaringan diawetkan, jaringan harus diproses menjadi bentuk yang dapat diiris dengan mikrotom. Biasanya pengirisan dikerjakan dengan parafin (suatu jenis lilin). Langkah utama pemrosesan jaringan adalah dehidrasi dan pembeningan. Jaringan tertentu memiliki struktur yang berbeda dengan kebanyakan jaringan lainnya. Jaringan yang mengandung kalsium (tulang) atau jaringan yang keras (kulit) akan menjalani proses tertentu sebelum proses dehidrasi.

2. Dehidrasi (Dehydration)

Dehidrasi adalah proses pengeluaran air dari jaringan agar jaringan tersebut dapat diisi oleh parafin sehingga jaringan dapat diiris tipis. Cairan dehidrasi (dehidran) dapat berupa alkohol dengan kadar yang meningkat, metanol, sukrosa, dan aseton. Alkohol dan aseton adalah yang paling sering digunakan.

- Alkohol : Alkohol 70%, 80%, 90%, masing-masing 1 hari; alkohol 95% 2 hari (2x ganti); alkohol 100 % 2 hari (2x ganti)
- Aseton : 3 x 20 menit.

3. Pembeningan (Clearing)

Clearing adalah upaya untuk mengeluarkan zat penarik air (dehidran) dan menggantinya dengan bahan kimia yang dapat bercampur dengan dehidran maupun parafin. Bahan kimia yang dapat digunakan sebagai clearing agent yaitu kloroform, benzena (benzol), xylena (xylol), cedar wood oil, benzyl benzoate, atau methyl benzoate.

Xylol adalah bahan yang sering digunakan sebagai clearing agent. Meski karsinogenik, bahan ini memberikan waktu clearing yang cepat yakni sekitar $\frac{1}{2}$ - 1 jam. Pembeningan dilakukan dengan merendam jaringan dalam xylol 2 kali 15 menit hingga jaringan menjadi bening dan transparan. Pada organ yang banyak mengandung darah, organ akan tampak menghitam. Volume xylol adalah 20 kali volume jaringan. Setelah bening, jaringan dimasukkan ke dalam parafin cair panas dalam oven parafin.

4. Pembenaman (Infiltration/Impregnation/Embedding)

Impregnasi adalah proses pengeluaran clearing agent dari jaringan dan menggantikannya dengan parafin. Ada banyak jenis parafin yang digunakan untuk pembenaman. Parafin tersebut dapat berbeda dalam hal titik cair (melting point), untuk beragam kekerasan dan cara pemotongan. Untuk tujuan rutin, yang digunakan adalah parafin yang mencair pada suhu 56 – 59

°C. Pembenaman dilakukan dengan merendam jaringan dalam parafin cair di oven bersuhu 60 °C selama 3 x 1 jam.

Hal yang perlu diperhatikan adalah clearing agent yang tersisa dapat mengkristal dalam jaringan sehingga saat dipotong dengan mikrotom, jaringan akan robek.

5. Pengecoran (Blocking/Casting)

Pengecoran adalah proses pembuatan blok parafin agar dapat dipotong dengan mikrotom, agar mudah diiris, jaringan dibentuk dan dikeraskan dengan parafin.

Alat pencetak dapat berupa besi berbentuk L (Leuckhart), atau cetakan (mold). Tuangkan parafin secukupnya pada cetakan dan letakkan jaringan pada dasar cetakan sesuai dengan keinginan saat jaringan diiris. Hindarkan terbentuknya gelembung udara (air bubble). Berilah label identitas jaringan.

6. Sectioning (pengirisan jaringan)

Sectioning adalah pengirisan blok parafin dengan mikrotom. Untuk merekatkan irisan, harus dipersiapkan perekat pada kaca benda. Zat perekat dapat berupa albumin dari putih telur. Perekat ini dibuat dengan menambahkan 50 ml albumin dengan 50 ml gliserin, lalu diaduk dan ditambahkan sedikit timol. Simpan dalam 4 °C (refrigerator). Coated slides dapat dipergunakan segera.

7. Staining (pewarnaan)

Pewarnaan Haematoxylin dan Eosin

Untuk menganalisis struktur jaringan yang telah diiris, preparat harus diwarnai. Pewarnaan rutin yang sering dikerjakan adalah haematoxylin-eosin (HE). Haematoxylin akan mewarnai nukleus sedangkan eosin mewarnai sitoplasma.

Mewarnai Preparat

- Deparafinisasi dengan xylol (2 x 2 menit);
- Hidrasi dengan alkohol 100% (2x2 menit) – 95% (2 menit) – 90% (2 menit) – 80% (2 menit) – 70% (2 menit) – air kran (3 menit);
- Inkubasi dalam larutan haematoxylin Mayer selama beberapa menit;
- Cuci dalam air kran mengalir selama 15-20 menit;
- Observasi di bawah mikroskop, bila masih terlalu biru cuci lagi di air mengalir selama beberapa menit. Bila sudah cukup warnanya, lanjutkan dengan tahap selanjutnya;
- Counterstaining dengan eosin working solution selama beberapa menit. Lama inkubasi bergantung pada umur eosin dan kedalaman warna yang diinginkan.
- Dehidrasi dalam serial alkohol dengan gradasi meningkat perlahan mulai 70% hingga 100% masing-masing selama 2 menit.
- Inkubasi dalam xylol 2x2 menit.
- Tutup (mounting) dengan balsam Kanada dan cover glass
- Beri label pada sajian tersebut dan biarkan hingga entelan mengering

Hasil

- Nukleus berwarna biru.
- Sitoplasma berwarna kemerahan dengan adanya beberapa variasi warna pada komponen tertentu.

Hasil praktikum :

1. Proses fiksasi / pengawetan : larutan yang digunakan adalah buffered formalin yang dilakukan dengan merendam jaringan / organ mencit yang akan digunakan. Proses ini telah dibuat minimal 24 jam sebelumnya.
2. Pemotongan : dilakukan setipis mungkin ($\pm 1\text{mm}$)
3. Dehidrasi : dengan menggunakan Alkohol 70% selama 3x1 jam, Alkohol 80% selama 3x 1 jam, Alkohol 90% selama 3x1 jam ,Alkohol 100% selama 3x1 jam.
4. Clearing : xilol selama 2 X 15-20 menit.
5. Impregnasi : digunakan paraffin yang sudah dicairkan.
6. Blocking : dengan menggunakan besi potongan L (Leuckhart), susun 2 buah potong besi diatas lembaran logam sehingga membentuk ruang kubus. Tuang sedikit parafin cair, letakkan jaringan yang sudah diiris sesuai dengan letak bagian mana yang kita inginkan tuangkan paraffin secukupnya agar menutupi jaringan seluruhnya, hindarkan gelembung udara.
7. Sectioning : mengiris block paraffin dengan menggunakan mikrotom, tebal irisan diatur 5- 7 μm , masukkan dengan hati-hati potongan paraffin ke dalam air dengan suhu 40-50⁰C, biarkan sampai pita mengembang (tidak mengkerut).
8. Siapkan kaca object yang telah diberi perekat putih telur, lalu letakkan potongan paraffin tersebut ke kaca object, biarkan mengering dengan suhu kamar.
9. Staining / Pewarnaan HE (Hematoxylin dan Eosin) : sebelumnya dilakukan deparafinisasi dengan xylol 2 X 5 menit, kemudian dehidrasi dengan alkohol 100%, alkohol 80 %, alkohol 70% masing-masing 2x2 menit, kemudian cuci dengan air keran atau aquadest selama 3 menit, lalu masukkan kedalam larutan haematoxylin selama 7 menit, cuci dengan air keran atau aquades selama 3 menit, celupkan lagi kedalam larutan Eosin selama 3 menit, lalu cuci kembali dengan air keran, dehidrasi kembali dengan alkohol 70%,alkohol 80%, alkohol 100% masing-masing sebanyak 2 x.
10. Mounting : preparat diberi balsam kanada dan tutup dengan deck glass. beri label.
11. Preparat diamati dibawah mikroskop.

Kelebihan histoteknik :

1. Jika terjadi kesalahan atau kerusakan pada preparat saat kita melakukan pengirisan dengan mikrotome maka masih bisa diulang dengan meggunakan sisa dari block paraffin.
2. Tekniknya sederhana karena dapat dipelajari dengan cepat dan mudah dipraktekkan serta dapat disimpan dalam waktu yang lama.

Kekurangan histoteknik :

1. Membutuh waktu yang lama, sehingga kurang efisien.
2. Dilakukan dengan hati-hati sesuai dengan bahan , jaringan dan waktu yang digunakan.

Saran :

1. Dibutuhkan waktu yang lebih untuk dapat menyelesaikan praktikum histoteknik yang sempurna.
2. Bahan pewarnaan disiapkan yang baru agar hasil pewarnaannya lebih bagus.
3. Dibutuhkan ruangan yang dilengkapi dengan keran air.