

Laporan Praktikum Histoteknik

Oleh: Jimmy

Sabtu, 15 September 20011

08.00 – 11.00

Tujuan Praktikum:

- Melihat demo teknik-teknik Histoteknik, mulai dari pemotongan jaringan organ tikus sampai blocking, pemotongan, pewarnaan, mempersiapkan sampel dan penggunaan mikroskop
- Latihan membuat preparat histologi dari jaringan organ tikus dan kemudian melihat preparat tersebut dengan menggunakan mikroskop

Pendahuluan

Adalah suatu metoda untuk membuat sajian histologi dari suatu spesimen tertentu melalui suatu rangkaian proses hingga menjadi suatu sajian yang siap dianalisis.

Rangkaian proses histoteknik antara lain:

- Fiksasi
- Dehidrasi
- Pembeningan
- Pemotongan
- Pengecoran
- Pembenaman
- Pewarnaan
- Perekatan
- Pelabelan

Mengawetkan Jaringan

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:

1. Tebal irisan.
2. Volume larutan pengawet.

3. Jenis larutan pengawet.

Jenis-jenis cairan fiksasi yang digunakan:

- FORMALIN
- MULLER
- BOUIN
- CARNOY
- ZENKER FORMAL (CAIRAN HELLY)
- ETANOL
- ASAM ASETAT-ALKOHOL-FORMALIN (TELLYESNICZKY)

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..

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.

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), xylene (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 ½ - 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.

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. Pembenaan 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.

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 ubble*). Berilah label identitas jaringan.

Mengiris Blok Parafin

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.

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

1. Deparafinisasi dengan xylol (2 x 2 menit);
2. Hidrasi dengan alkohol 100% (2x2 menit) – 95% (2 menit) – 90% (2 menit) – 80% (2 menit) – 70% (2 menit) – air kran (3 menit);
3. Inkubasi dalam larutan *haematoxylin* Mayer selama beberapa menit;
4. Cuci dalam air kran mengalir selama 15-20 menit;
5. Observasi di bawah mikroskop, bila masih terlalu biru cuci lagi di air mengalir selama beberapa menit. Bila sudah cukup warnanya, lanjutkan dengan tahap selanjutnya;
6. *Counterstaining* dengan *eosin working solution* selama beberapa menit. Lama inkubasi bergantung pada umur eosin dan kedalaman warna yang diinginkan.
7. Dehidrasi dalam serial alkohol dengan gradasi meningkat perlahan mulai 70% hingga 100% masing-masing selama 2 menit.
8. Inkubasi dalam xylol 2x2 menit.
9. Tutup (*mounting*) dengan entellan□/balsam Kanada dan *cover glass*
10. 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.

Laporan hasil Kerja:

1. Organ atau jaringan yang akan dibuat terlebih dahulu harus melewati proses fiksasi. Proses fiksasi dilakukan dengan cara merendam organ atau jaringan didalam larutan fiksatif. Salah satu larutan fiksatif yang bisa digunakan adalah formalin. Organ atau jaringan direndam dalam larutan formaldehid selama 24 jam. Pada praktikum proses ini tidak dilakukan. Sudah disediakan organ yang sudah difiksasi

2. Setelah proses fiksasi, dilakukan pemotongan jaringan. Yaitu bagian mana dari organ yang ingin dianalisa, dipotong sesuai penampang yang diinginkan. Pada praktikum jaringan yang dipotong adalah hepar tikus
3. Tahap selanjutnya adalah Dehidrasi. Tujuan proses dehidrasi ini untuk menghilangkan air yang terdapat didalam sel. Dilakukan dengan menggunakan alkohol dari konsentrasi yang rendah ke konsentrasi yang tinggi. Jaringan direndam di dalam alkohol 70% selama 1 jam, kemudian dipindahkan lagi ke alkohol 70 % selama 1 jam sampai sebanyak 3 kali. Hal yang sama dilakukan pada alkohol 80 % dan alkohol 100%
4. Jaringan tersebut kemudian direndam ke dalam larutan xylol. Tahap ini disebut *Clearing* yang bertujuan untuk menjernihkan preparat, sehingga tampak lebih transparan. Dilakukan perendaman di larutan xylol selama 15-20 menit sebanyak 2 kali pada larutan dan konsentrasi yang sama
5. Tahap berikutnya *Impregnasi* yaitu proses pengeluaran cairan pembening (xylol) dari dalam sel dan menggantikannya dengan parafin. Hal ini dilakukan agar mudah dalam pemotongan dengan menggunakan mikrotom. Jaringan yang sudah melewati tahap *clearing* kemudian direndam kedalam parafin yang sudah dicairkan dalam suhu 56°C . Direndam didalam 3 wadah yang berisi parafin cair, dimana pada setiap wadah dilakukan perendaman masing-masing 1 jam. Seluruh proses tersebut diatas dilakukan di dalalam oven dengan suhu 56°C
6. Jaringan kemudian ditanam didalam block parafin dan diletakkan sesuai dengan proyeksi yang diinginkan. Kemudian dibiarkan selama 24 jam
7. Block parafin yang sudah mengeras kemudian dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ukuran $5-7\ \mu\text{m}$
8. Setelah itu *slice* yang sudah terpotong direndam didalam water bath dengan suhu $40-50^{\circ}\text{C}$
9. *Slice* tersebut diambil dari *waterbath* dengan menggunakan objek glass yang telah dioleskan albumin secara tegak lurus terhadap permukaan air. Albumin berfungsi untuk melekatkan *slice* ke objek glass.
10. Preparat yang tersebut direndam ke dalam xylol selama 5 menit dan dilakukan sebanyak 2 kali. Gunanya untuk menghilangkan parafin
11. Preparat dicuci dengan alkohol, mulai dari konsentrasi yang paling tinggi ke konsentrasi yang rendah. Masing-masing dilakukan sebanyak dua kali

12. Dilakukan pewarnaan dengan hematoksin selama 5 menit kemudian cuci dibawah air mengalir
13. Pewarnaan berikutnya dengan menggunakan eosin selama 3 menit dan kemudian cuci dibawah air mengalir
14. Setelah pewarnaan preparat dicuci lagi dengan menggunakan alkohol, mulai dari alkohol berkonsentrasi rendah ke alkohol berkonsentrasi tinggi. Dilakukan masing-masing 2 kali
15. Keringkan preparat, kemudian berikan balsem di atasnya kemudian tutup dengan *deck glass*
16. Letakkan label pada objek glass untuk penamaan
17. Lihat dibawah mikroskop, mulai dari pembesaran terendah

Kekuatan Histoteknik :

1. Prosedur pembuatan preparat ini tidak terlalu rumit, sehingga mudah untuk melakukannya.
2. Preparat yang dibuat sesuai dengan prosedur yang baik akan dengan jelas memperlihatkan struktur suatu jaringan berupa gambaran tentang bentuk, ukuran, dan susunan dari jaringan tersebut.

Kelemahan Histoteknik :

1. Membutuhkan waktu yang lama untuk membuat satu buah preparat histologi yang baik,
2. Setiap proses harus benar-benar dilakukan dengan baik dan teliti untuk mendapat preparat yang bagus

Saran:

1. Langkah-langkah dalam praktikum histoteknik membutuhkan waktu yang panjang, sebaiknya waktu untuk praktikum bisa ditambah. Sehingga setiap langkah dapat dilakukan
2. Setiap mahasiswa harus mencoba setiap langkah praktikum ini sehingga dapat diaplikasikan untuk selanjutnya