

BAHAN AJAR
TEKNOLOGI LABORATORIUM
MEDIS (TLM)

SITOHISTOTEKNOLOGI

Erick Khristian
Dewi Inderiati





**PUSAT PENDIDIKAN SUMBER DAYA MANUSIA KESEHATAN
BADAN PENGEMBANGAN DAN PEMBERDAYAAN
SUMBER DAYA MANUSIA KESEHATAN
EDISI TAHUN 2017**

**BAHAN AJAR
TEKNOLOGI LABORATORIUM
MEDIS (TLM)**

SITOHISTOTEKNOLOGI

Erick Khristian
Dewi Inderiati

Hak Cipta dan Hak Penerbitan dilindungi Undang-undang

Cetakan pertama, Oktober 2017

Penulis : 1. Erick Khristian, M.Si.
2. Dewi Inderiati, S.Si., M.Biomed.

Pengembang Desain Instruksional : Dra. Lis Setiawati, M.Pd.

Desain oleh Tim P2M2 :

Kover & Ilustrasi : Nurul Fitriana, S.Ds.

Tata Letak : Heru Junianto, S.Kom.

Jumlah Halaman : 235

DAFTAR ISI

BAB I. LABORATORIUM PATOLOGI ANATOMIK DAN SISTEM ADMINISTRASI	1
Topik 1. Laboratorium Patologi Anatomi.....	3
Latihan.....	6
Ringkasan.....	6
Tes 1.....	7
Topik 2. Sistem Administrasi Laboratorium Patologi Anatomi.....	9
Latihan.....	18
Ringkasan.....	18
Tes 2.....	19
Kunci jawaban Tes.....	22
Daftar Pustaka.....	23
BAB II. KESELAMATAN DAN KESEHATAN KERJA (K3) LABORATORIUM PATOLOGI ANATOMI	24
Topik 1. Manajemen Resiko.....	26
Latihan.....	34
Ringkasan.....	36
Tes 1.....	37
Topik 2. Limbah Laboratorium Patologi Anatomi.....	39
Latihan.....	42
Ringkasan.....	44
Tes 2.....	45
Kunci jawaban Tes.....	46
Daftar Pustaka.....	47
BAB III. MIKROSKOPTEKNIK PENGGUNAAN DAN PERAWATAN	48
Topik 1. Jenis Mikroskop.....	50
Latihan.....	55

Ringkasan.....	56
Tes 1.....	57
Topik 2. Penggunaan Dan Pemeliharaan Mikroskop.....	58
Latihan.....	62
Ringkasan.....	64
Tes 2.....	65
Kunci jawaban Tes.....	67
Daftar Pustaka.....	68
BAB IV. FIKSASITEORI DAN PRAKTIK	69
Topik 1. Teori Fiksasi.....	70
Latihan.....	82
Ringkasan.....	82
Tes 1.....	83
Topik 2. Teknik Fiksasi Sediaan Histologik.....	85
Latihan.....	89
Ringkasan.....	89
Tes 2.....	90
Topik 3. Teknik Fiksasi Sediaan Sitologik.....	92
Latihan.....	98
Ringkasan.....	99
Tes 3.....	100
Kunci jawaban Tes.....	102
Daftar Pustaka.....	103
BAB V. DEKALSIFIKASI	104
Topik 1. Tulang.....	106
Ringkasan.....	112
Tes 1.....	113

Topik 2. Larutan Dekalsifikasi.....	115
Latihan.....	123
Ringkasan.....	124
Tes 2.....	125
Kunci jawaban Tes.....	127
Daftar Pustaka.....	128
BAB VI. PEMATANGAN JARINGAN	129
Topik 1. Pematangan Jaringan.....	131
Latihan.....	134
Ringkasan.....	136
Tes 1.....	137
Topik 2. Tahap-Tahap Pematangan Jaringan.....	139
Ringkasan.....	147
Tes 2.....	148
Topik 3. Teknik Penanaman Jaringan.....	150
Latihan.....	152
Ringkasan.....	152
Tes 3.....	153
Kunci jawaban Tes.....	155
Daftar Pustaka.....	156
BAB VII. MIKROTOMI	157
Topik 1. Jenis Mikrotom.....	159
Latihan.....	163
Ringkasan.....	164
Tes 1.....	165
Topik 2. Teknik Pemotongan.....	166

Topik 3. Penggunaan, Dan Pemeliharaan Mikrotom.....	170
Latihan.....	173
Ringkasan.....	174
Tes 3.....	175
Kunci jawaban Tes.....	176
Daftar Pustaka.....	177
BAB VIII. PEMBUATAN SEDIAAN SITOLOGIK	178
Topik 1. Pengumpulan Spesimen Sitologik.....	180
Ringkasan.....	193
Topik 2. Pembuatan Sediaan Sitologik.....	194
BAB IX. PEWARNAAN	208
Topik 1. Dasar Hematoxylin Dan Eosin.....	209
Latihan.....	217
Ringkasan.....	218
Tes 1.....	219
Topik 2. Kontrol Kualitas Pewarnaan.....	221
Latihan.....	225
Ringkasan.....	225
Tes 2.....	226
Kunci jawaban Tes.....	228
Daftar Pustaka.....	229

BAB I

LABORATORIUM PATOLOGI ANATOMIK DAN SISTEM ADMINISTRASI

Erick Khristian, M.Si.

PENDAHULUAN

Pengertian kesehatan memiliki arti yang bermacam-macam. Salah satu pengertian dari kesehatan adalah keadaan sejahtera dari badan, jiwa, dan sosial yang memungkinkan setiap orang hidup dan produktif secara sosial serta ekonomis. Upaya kesehatan merupakan segala kegiatan untuk memelihara dan meningkatkan kesehatan masyarakat baik yang dilakukan pemerintah dan atau masyarakat.

Dalam melaksanakan upaya kesehatan maka perlu suatu fasilitas yang memadai serta sumber daya yang berkualitas yang mendukung satu dan



(Sumber : <http://www.anatomybox.com>)

lainnya.

Fasilitas yang dimaksud merupakan fasilitas umum yang diperuntukkan menjaga kondisi kesehatan secara umum dan fasilitas untuk mengetahui kondisi secara umum. Lain halnya sumber daya manusia yang berkualitas, dimana sumber daya manusia yang berkualitas ini sangatlah penting, salah satunya dalam mendiagnosis dan membantu dalam hal pemeriksaan kesehatan. Salah satu fasilitas dan SDM yang dapat membantu menjaga kesehatan masyarakat adalah laboratorium klinik dan pekerjanya.

Laboratorium klinik atau laboratorium kesehatan merupakan suatu tempat yang dapat disebut laboratorium dan di tempat itu dilakukan berbagai macam pemeriksaan pada spesimen biologis yang didapat dari berbagai sumber biologis untuk mendapatkan segala informasi tentang kesehatan pasien dan lingkungannya. Pekerja laboratorium merupakan bagian dari laboratorium yang melakukan pemeriksaan tersebut guna menyediakan informasi bagi dokter maupun bagi konsumen sehingga dapat digunakan untuk diagnosis ataupun informasi tentang kesehatan pasien tersebut. Pekerja laboratorium saat ini dikenal dengan sebutan atau istilah baku yaitu tenaga kesehatan.

Tenaga kesehatan adalah orang yang mengabdikan dirinya dalam bidang kesehatan yang memiliki pengetahuan dan atau keterampilan tertentu melalui pendidikan di bidang kesehatan. Pendidikan kesehatan memberikan kewenangan tertentu untuk melakukan upaya kesehatan sesuai dengan kompetensi yang terujikan. Salah satu kompetensi dari seorang tenaga kesehatan adalah mengenal alur kerja pemeriksaan di dalam laboratorium hingga pelaporannya. Di dalam bab ini akan dijelaskan tentang laboratorium, jenis spesimen, kewenangan dan alur kerja di dalam laboratorium khususnya laboratorium patologi anatomi.

🔪 ■ Sitohistoteknologi 🔪 ■

Setelah Anda mempelajari dan menerapkan teori-teori bab ini, Anda diharapkan dapat:

1. menjelaskan jenis-jenis laboratorium kesehatan,
2. menjelaskan kewenangan laboratorium dalam pengolahan specimen,
3. menerapkan alur kerja yang benar di laboratorium patologi anatomi.

Topik 1

Laboratorium Patologi Anatomi

A. PENGERTIAN DAN JENIS LABORATORIUM

Kamus Besar Bahasa Indonesia menyebutkan bahwa “laboratorium merupakan suatu tempat atau kamar dan sebagainya tertentu yang dilengkapi dengan peralatan untuk percobaan (penyelidikan dan sebagainya)”. Jika kita gabungkan laboratorium dan kesehatan maka dapat dikatakan bahwa laboratorium kesehatan merupakan suatu tempat atau ruangan yang digunakan untuk melakukan pemeriksaan/penyelidikan terhadap suatu bahan yang diambil dari suatu individu. Pemeriksaan ini digunakan untuk membantu individu tersebut atau tenaga kesehatan guna menentukan langkah selanjutnya untuk mempertahankan atau meningkatkan kesehatannya.

Laboratorium kesehatan yang mengerjakan spesimen dari tubuh manusia lebih dikenal dengan laboratorium klinik. Fungsi secara keseluruhan dari laboratorium klinik yang ada di Indonesia diantaranya memberikan pelayanan, pelatihan, pendidikan dan penelitian di bidang laboratorium klinik seperti di bidang hematologi, kimia klinik, mikrobiologi klinik, imunologi, histopatologi, sitopatologi, urinalisis dan analisis cairan tubuh lainnya. Kegiatan tersebut digunakan baik untuk keperluan laboratorium klinik itu sendiri (pasien) maupun dapat bersama dengan bidang lainnya terutama di bidang kesehatan/klinik (lembaga pendidikan).

Dalam menjalankan aktivitasnya, maka perlu suatu sumber daya manusia yang disebut dengan “*Tenaga Analis Kesehatan*”. Tenaga analis kesehatan sangat berperan penting dalam menjalankan segala kegiatan yang ada di Laboratorium Klinik tersebut. Tenaga Analis kesehatan adalah seseorang yang mengabdikan diri di dalam bidang laboratorium klinik yang memiliki pengetahuan dan keterampilan melalui pendidikan di bidang laboratorium kesehatan untuk jenis tertentu. Dengan pengetahuan dan keterampilan yang Anda miliki, Anda akan mendapatkan kewenangan untuk melakukan upaya kesehatan khususnya di laboratorium klinik. Tenaga Analis kesehatan dalam menjalankan segala kegiatan yang ada di dalam Laboratorium Klinik dimulai dari proses pra-analitik, analitik hingga post analitik. Hampir semua aktivitas yang dilakukan oleh tenaga analis kesehatan di laboratorium masih bersifat manual. Dengan banyaknya kegiatan yang bersifat manual, maka perlu suatu keterampilan yang teruji dari masing-masing bidang yang digelutinya.

Menurut peraturan menteri kesehatan nomor 411/MENKES/PER/III/2010 yang dimaksud dengan Laboratorium Klinik adalah laboratorium kesehatan yang melaksanakan pelayanan pemeriksaan spesimen klinik untuk mendapatkan informasi tentang kesehatan perorangan terutama untuk menunjang upaya diagnosis penyakit, penyembuhan penyakit, dan pemulihan kesehatan. Sedangkan Spesimen klinik adalah bahan yang berasal dan/atau diambil dari tubuh manusia untuk tujuan diagnostik, penelitian, pengembangan, pendidikan, dan/atau analisis lainnya, termasuk new-emerging dan re-emerging, dan penyakit infeksi berpotensi pandemik.

Pada pasal lainnya laboratorium klinik dibagi menjadi 2 dalam hal jenis pelayanannya yaitu laboratorium klinik umum dan laboratorium klinik khusus. Yang dimaksud dengan laboratorium umum merupakan suatu laboratorium yang melaksanakan pelayanan pemeriksaan spesimen klinik seperti spesimen di bidang hematologi, kimia klinik, mikrobiologi klinik, parasitologi klinik dan imunologi klinik. Sedangkan laboratorium khusus merupakan laboratorium yang melaksanakan pelayanan pemeriksaan spesimen klinik pada satu bidang pemeriksaan khusus yang memiliki kekhususan tertentu. Laboratorium khusus ini antara lain adalah laboratorium mikrobiologi klinik, parasitologi klinik, dan patologi anatomik.

Jika kita melihat adanya perbedaan antara laboratorium klinik umum dan khusus, maka kita pun harus dapat mengetahui kompetensi seorang teknisi atau analis seperti apa saja yang dapat melakukan unjuk kerja di masing-masing laboratorium. Di dalam undang-undang yang sama jika kita melihat dalam sisi tugas dan tanggung jawab yang harus dimiliki oleh seorang tenaga analis kesehatan (pranata laboratorium) adalah : (a) melaksanakan pengambilan dan penanganan bahan pemeriksaan laboratorium sesuai standar pelayanan dan standar operasional prosedur; (b) melaksanakan kegiatan pemantapan mutu, pencatatan dan pelaporan; (c) melaksanakan kegiatan keamanan dan keselamatan kerja laboratorium; dan (d) melakukan konsultasi dengan penanggung jawab teknis laboratorium atau tenaga teknis lainnya.

B. LABORATORIUM KHUSUS PATOLOGI ANATOMIK

Menurut PERMENKES RI Nomor 411/MENKES/PER/III/2010 menyebutkan bahwa Laboratorium patologi anatomik merupakan laboratorium yang melaksanakan pembuatan preparat histopatologi, pulasan khusus sederhana, pembuatan preparat sitologi, dan pembuatan preparat dengan teknik potong beku. Pelayanan laboratorium Patologi Anatomik menerima spesimen berupa jaringan dan/atau cairan tubuh yang didapat dari tubuh pasien dan bermakna klinis bagi diagnosis suatu penyakit. Pelayanan laboratorium patologi anatomik berperan sebagai baku emas dalam penegakkan diagnosis yang berbasis perubahan morfologi sel dan jaringan sampai pemeriksaan imunologik dan molekuler khusus yang bersumber dari sel maupun jaringan. Patologi anatomik berperan dalam mendeteksi kelainan akibat perubahan pada jaringan tubuh dan melakukan penapisan dari suatu penyakit. Peran laboratorium Patologi Anatomik semakin meluas mencakup penentuan pilihan terapi dan prediksi prognosis yang sejalan dengan perkembangan ilmu dan teknologi.

Di dalam laboratorium patologi anatomik kita mengenal dua komponen besar dalam pelayanan laboratorium. Dua komponen besar tersebut adalah laboratorium histopatologi dan laboratorium sitopatologi. Laboratorium histopatologi merupakan laboratorium yang menangani spesimen berupa jaringan sedangkan laboratorium sitopatologi menangani spesimen berupa cairan atau bentukan lain yang mengandung sel-sel untuk dilakukan diagnosis. Namun kadangkala kedua laboratorium tersebut dapat berkolaborasi menjadi satu ketika spesimen berupa materi mengandung sel namun diperlakukan seperti sebuah jaringan atau organ (cytoblock/sitoblok).

🔍 ■ Sitohistoteknologi 🔍 ■

Spesimen yang diterima untuk pemeriksaan spesimen sitologik maupun spesimen histopatologi tercantum dalam Tabel 1.1 Spesimen sitologik diambil dengan tujuan jaringan memeriksa pada tingkat sel. Spesimen sitologik didapat dari sel yang terlepas (exfoliatif) atau sel yang terlepas dari jaringan. Jenis spesimen yang paling umum yang diterima di laboratorium patologi anatomik adalah spesimen cervical Pap Smear, hal ini dikarenakan Pap Smear merupakan salah satu program pemerintah dalam menurunkan angka kanker servik. Selain itu spesimen yang diterima di laboratorium sitologi adalah spesimen sitologi aspirasi jarum halus (FNA (Fine Needle Aspiration), dimana sel didapatkan dari jarum yang sangat tipis yang dimasukkan ke sebuah lesi berbentuk cairan (misalnya kista tiroid). Selain itu spesimen dapat berasal dari urin, dahak, cairan cerebrospinal, cairan berasal dari bilasandan lain sebagainya yang mengandung materi sel. Lain halnya dengan spesimen untuk laboratorium histopatologi, dimana spesimen untuk laboratorium histopatologi adalah seluruh organ yang diambil dari pasien baik berukuran kecil maupun berukuran besar.

Tabel 1.1 Spesimen Umum Laboratorium Sitologi dan Histologi

No	Sitologi	Histologi
1	Goresan Sel	Biopsi Jarum
2	Aspirasi Sel	Biopsi Endoskopi
3	Cairan Tubuh Dan lain-lain	Biopsi Eksisi Dan lain-lain

Spesimen yang didapatkan di laboratorium patologi anatomik (baik sitopatologi dan histopatologi) akan diolah dan menghasilkan suatu sediaan mikroskopis yang menjadikan dasar pelaporan untuk keperluan diagnosis ataupun yang lainnya. Setelah hasil diterima oleh pemohon baik dalam bentuk kertas atau digital, maka fungsi lanjutan seorang tenaga laboratorium patologi anatomik adalah sebagai berikut.

1. Menjaga Sediaan hingga 10 tahun kedepan dan dapat dijadikan untuk referensi, pengajaran atau penelitian.
2. Menjaga formulir permintaan atau memindahkannya dalam bentuk digital dan menyimpannya selama kurun waktu minimal 10 tahun.
3. Spesimen yang tersisa dapat dilakukan sebagai berikut :
 - a. memisahkan untuk keperluan penyimpanan, pengajaran, penelitian bahkan museum,
 - b. menjadikan referensi hingga 1 tahun ke depan,
 - c. membuang sisa spesimen jika dianggap tidak perlu.

Latihan

Setelah Anda mempelajari teori-teori di atas, mari kita mencoba untuk mengerjakan latihan berikut ini. Lakukan pendataan jenis spesimen, jenis permohonan dan keterangan lainnya. Isi sesuai dengan Tabel 1.2 berikut ini.

Tabel 1.2
Tabel Penerimaan Spesimen

No	Jenis Spesimen	Permohonan	Keperluan Lainnya
1	A	B	C
2			
3			
4			

Petunjuk pengerjaan

- 1) Pada kolom A silahkan Anda tuliskan jenis spesimen yang didapatkan. Adapun contoh yang dapat Anda tuliskan antara lain : sitologi urin, sitologi dahak, apusan servikal, biopsi payudara dan lain-lain
- 2) Pada kolom B silahkan Anda tuliskan permohonan yang diminta oleh dokter pengirim. Pilihan jawaban yang bisa Anda tulis adalah : pewarnaan dasar (HE), pewarnaan lanjutan (PAS, Trichrome, Giemsa dan lain-lain)
- 3) Pada kolom C silahkan Anda tuliskan keperluannya seperti diagnosis atau penelitian.

Ringkasan

Laboratorium merupakan suatu organisasi atau setidaknya suatu ruangan yang memiliki peran didalam pengolahan spesimen untuk keperluan penyelidikan baik dipergunakan untuk diagnostik penyakit ataupun penelitian. Secara khusus laboratorium patologi anatomik merupakan bagian dari laboratorium klinik khusus yang menangani spesimen berupa jaringan dari biospsi dan proses lainnya yang menghasilkan bentukan tertentu atau spesimen berupa cairan dan apusan yang mengandung komponen sel.

Secara garis besar laboratorium patologi anatomik digolongkan menjadi dua yaitu laboratorium sitologi dan laboratorium histologi. Laboratorium sitologi menerima spesimen berupa sel yang terlepas baik yang digores atau terkandung di dalam cairan seperti bilasan, urin, dahak dan cairan tubuh lainnya. Sedangkan laboratorium histologi menerima spesimen berupa jaringan tubuh yang didapat dari biopsi pasien atau cairan yang mengandung banyak sel sehingga diperlakukan sebagai suatu kumpulan sel membentuk seperti jaringan.

Tes 1

- 1) Sebuah spesimen berbentuk cairan bening disinyalir mengandung sel yang perlu didiagnosis. Ke laboratorium manakah seorang analis mendiagnosis spesimen itu?
- 2) Sebutkan 4 tugas mendasar dari seorang tenaga kesehatan yang mengolah spesimen sitologik maupun histologik
- 3) Disebut apakah bagian dari tubuh yang diambil dari proses pembendahan?
- 4) Disebut apakah bagian sel yang terlepas dari suatu organ atau kelompok jaringannya?
- 5) Apakah istilah spesimen yang didapat dengan menggunakan jarum halus?
- 6) Ketika sediaan sudah dijadikan laporan suatu diagnostik, berapa tahun sediaan itu harus disimpan ?
- 7) Dapat dijadikan apa saja sediaan yang sudah selesai dilaporkan?
- 8) Berapa tahun masa maksimal referensi yang didapat dari spesimen sisa pengolahan?
- 9) Sebutkan UU yang memberlakukan laboratorium masuk ke dalam laboratorium khusus?
- 10) Disebut apakah bagian dari sitologi yang diberlakukan selayaknya jaringan?

✎ ■ Sitohistoteknologi ✎ ■

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1 yang terdapat di bagian akhir bab ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi yang terdapat di bab 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan:	90 - 100%	= baik sekali
	80 - 89%	= baik
	70 - 79%	= cukup
	< 70%	= kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan mempelajari materi di topik 1. **Bagus!** Jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi bab 7, terutama bagian yang belum Anda kuasai.

Topik 2

Sistem Administrasi Laboratorium Patologi Anatomi

A. ALUR KERJA LABORATORIUM

Penyedia layanan kesehatan pada umumnya tidak terbiasa dengan cara kerja laboratorium patologi anatomi. Pengiriman spesimen ke laboratorium patologi anatomi dimulai dari rangkaian peristiwa yang kompleks dan diakhiri dengan diagnosis/ interpretasi patologis untuk penunjang diagnosis. Bagian berikut ini akan mengulas alur kerja di laboratorium patologi anatomi dan pentingnya evaluasi patologis sel dan jaringan.

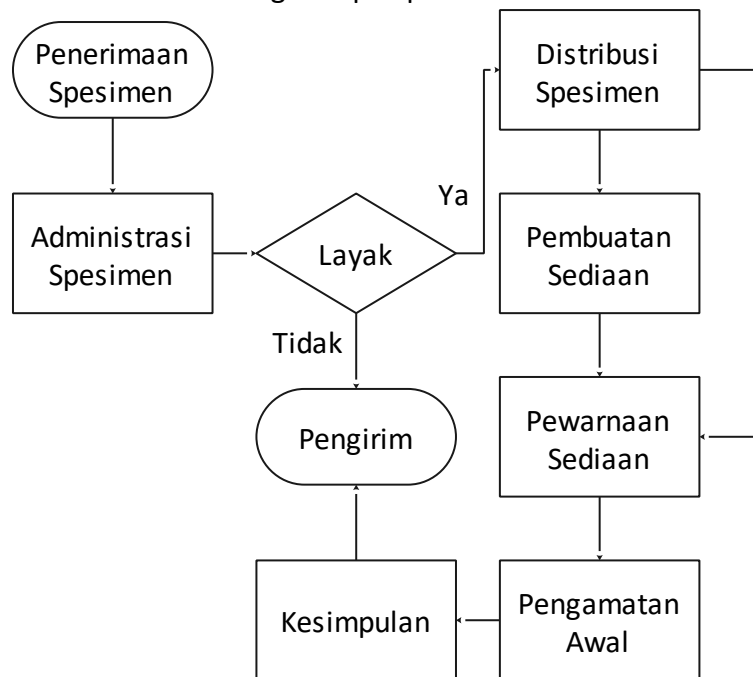
Diagnosis kanker tidak dapat didiagnosis dengan meyakinkan jika tidak ada diagnosis dari suatu jaringan atau sel. Kebijakan yang mendukung praktik ini ditulis dalam peraturan perundang-undangan rumah sakit dan dipantau secara teratur oleh komite jaringan tubuh di rumah sakit tersebut dan juga lembaga akreditasi.

Tujuan pemeriksaan patologi jaringan adalah untuk memberikan diagnosis yang akurat, spesifik dan cukup komprehensif untuk memungkinkan dokter melakukan tindakan perawatan dan pengobatan. Ada ratusan varietas tumor, sebagian besar terdeskripsikan dengan jelas dari komponen biologinya. Hal inilah yang digunakan oleh dokter spesialis untuk menghasilkan diagnosis yang akurat. Data penanda dengan prognostik dan prediktif juga secara rutin dimasukkan ke dalam laporan patologi, yang memungkinkan rencana pengobatan individual untuk pasien. Mendapatkan jaringan yang memadai sangatlah penting untuk untuk diagnosis keganasan yang spesifik. Namun kadangkala untuk banyak keganasan, jaringan tambahan diperlukan untuk studi tambahan prognostik dan prediktif. Bahkan beberapa orang telah mengembangkan teknik histopatologi dan sitopatologi ke arah gen/mutasi yang disebabkan oleh tumor (misalnya, karsinoma PIK3CA yang bermutasi dan diluar kanker ovarium atau kanker payudara). Data tersebut terkumpulkan dari gambaran histologik, morfologi dan lokasi sumber penyakit.

Komponen yang terdapat di laboratorium patologi anatomi berbeda dengan laboratorium klinik. Di laboratorium patologi anatomi, kita akan mengenal yang namanya dokter spesialis patologi anatomi (dr.Sp.PA.) atau ahli patologi, asisten ahli patologi, sitoteknologis dan histoteknologis, sedangkan untuk di laboratorium patologi klinik kita telah mengenal yang namanya dokter spesialis patologi klinik (dr.Sp.PK.), teknisi laboratorium kesehatan dan plebotomis. Ahli patologi atau dokter spesialis patologi anatomi (dr.Sp.PA.) merupakan seorang dokter dengan keahlian khusus dalam diagnosis dan deteksi penyakit khususnya di bidang histopatologi dan sitopatologi. Asisten ahli patologi adalah seorang yang membantu ahli patologi dengan kompetensi untuk menggambarkan secara kasar terhadap hasil pembedahan dan biopsi, yang diawasi dan dibimbing oleh ahli patologi. Asisten ahli patologi juga dapat membantu dalam aspek teknis penilaian intraoperatif seperti bagian beku dan pemilihan jaringan untuk penelitian dan uji klinis. Ahli sitoteknologi adalah Orang-orang yang ahli dalam teknik pembuatan sediaan sitologik dan dapat pula membantu dalam skrining spesimen yang terdiri dari spesimen sel kecil, misalnya spesimen Pap smear (sitoskriner).

Setelah dilakukan skrining dan menandai sel untuk diagnostik dalam kaca objek, ahli sitologi merujuk kasus tersebut pada ahli patologi untuk ditinjau secara makna patologis. Sedangkan ahli histologik adalah orang-orang yang mengelola pemrosesan jaringan di laboratorium dan melakukan penilaian komponen teknis dalam membuat sediaan histologik untuk dievaluasi oleh ahli patologi. Komponen-komponen kompetensi dari ahli histologik meliputi proses fiksasi jaringan, pematangan jaringan ke parafin, pematangan jaringan hingga pewarnaan jaringan pada kaca objek.

Dalam pengelolaan laboratorium patologi anatomi khususnya di dalam sistem administrasi sedikit berbeda antara laboratorium sitologi dan laboratorium histologi. Spesimen yang diterima oleh laboratorium sitologi maupun histologi memiliki alur yang sedikit berbeda. Adapun alur kerja di laboratorium sitologi pada umumnya dapat dilihat Gambar 1.1 dan alur kerja di laboratorium histologi tampak pada Gambar 1.3.



Gambar 1.1 Alur Kerja Laboratorium Sitologi

(Sumber: dokumen pribadi)

Gambar 1.1 menunjukkan spesimen yang diterima oleh laboratorium sitologi dapat berupa spesimen yang belum diolah maupun yang sudah dalam bentuk sediaan sitologik yang kurang dilakukan pewarnaan. Hal itu bisa saja didapatkan dari laboratorium yang melakukan pembuatan sediaan tanpa melakukan pewarnaan terlebih dahulu (contoh: cervical smear, aspirasi biopsi jarum halus (FNA), dan lain sebagainya). Setelah spesimen diterima maka bagian administrasi melakukan pendataan dari spesimen tersebut. Pada saat pendataan, seorang administrasi wajib mengetahui kelayakan dari suatu spesimen. Spesimen yang telah layak untuk dilakukan pembuatan sediaan sitologik kemudian dikirim ke bagian pembuatan sediaan dan dilakukan pewarnaan. Pada laboratorium tertentu dilakukan skrining awal oleh asisten ahli patologi untuk melihat gambaran secara teknis dan gambaran umum sel yang

ditemukan serta memisahkan antara sediaan yang patologis dan normal. Hasil skrining dilaporkan kepada ahli patologi (dr. Sp. PA), kemudian dokter pengirim menyerahkan kepada pasien.

Laboratorium patologi anatomi kadang melakukan pengambilan spesimen baik spesimen ginekolog (pap smear) maupun non ginekolog (FNAC). Adapun hal-hal yang harus minimal harus diisikan oleh seorang pasien secara umum adalah namapasien, no rekam medis, no pendaftaran, usia pasien, jenis kelamin pasien, dokter pengirim. Sedangkan untuk jenis pemeriksaan baik ginekolog maupun non-ginekolog adalah sebagai berikut.

1. Pemeriksaan Pasien Ginekolog

a. Persiapan pasien

- Pemeriksaan dilakukan idealnya 2 minggu setelah hari pertama menstruasi terakhir. Sebaiknya hindari pemeriksaan selama menstruasi karena darah dapat mengaburkan temuan. Jika terjadi pengaburan temuan (temuan tidak jelas) karena sesuatu, tetap harus dituliskan/dicatat agar teknisi mengetahui cara memperlakukan spesimen.
- Jangan menggunakan obat vagina, alat kontrasepsi vagina, atau “douching” (pencucian vagina menggunakan alat khusus) selama 48 jam sebelum pengambilan spesimen.
- Tidak dianjurkan berhubungan badan sehari sebelum pengambilan spesimen.

b. Sumber spesimen

Sumber atau letak pengambilan spesimen (vagina, endoservik, gabungan atau bagian servik) menjadi sangat penting untuk diperhatikan. Hal ini berkaitan dengan sel minimal yang ditemukan untuk menilai kelayakan suatu sediaan.

c. Status hormonal

Status hormonal yang dimaksud di sini adalah seorang administrasi wajib menanyakan status pasien, apakah dalam masa subur, menstruasi, atau menopause.

2. Pasien pemeriksaan non-ginekolog

Pada pemeriksaan non ginekolog hal yang harus didapat dalam administrasi tidak sebanyak dari yang pemeriksaan ginekolog. Namun hal yang menjadi penting dalam pemeriksaan akhir baik penentuan patologis ataupun kemungkinan artifak yang muncul dalam sediaan. Adapun data yang harus didapatkan adalah sumber sediaan, waktu pengambilan, teknik pengambilan dan fiksasi tambahan.

3. Spesimen berupa bentuk sediaan siap warna

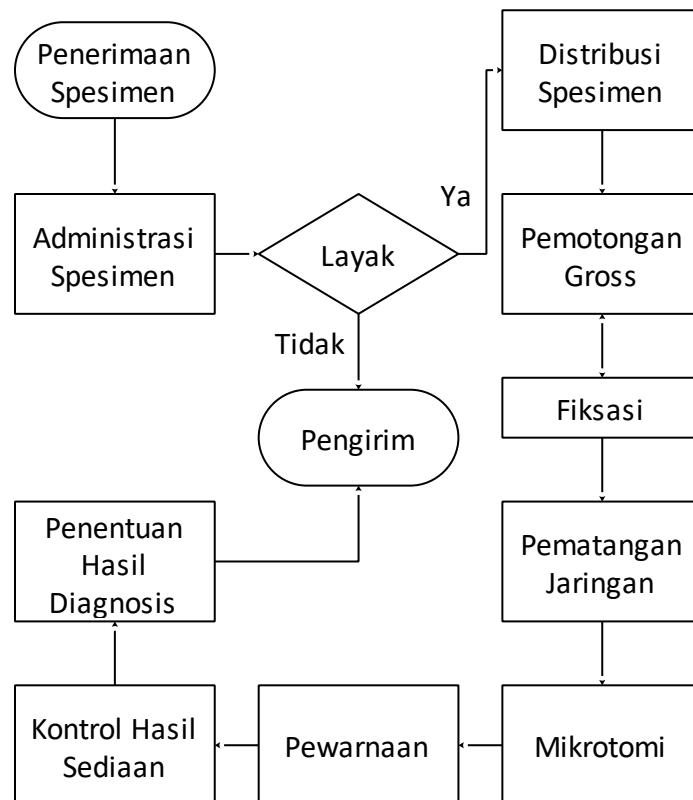
Jika spesimen dikirimkan ke laboratorium dalam bentuk sediaan, maka hal-hal yang harus diperhatikan seorang administrasi adalah jenis fiksasi yang digunakan (fiksasi basah atau kering), waktu pengambilan spesimen dan formulir dasar (poin 1). Kesalahan yang sering terjadi pada saat pengiriman dalam bentuk sediaan siap warna adalah sediaan tersebut gagal dalam fiksasi kering maupun basah, debu dan kotoran menempel pada sediaan. Hal tersebut dapat menyebabkan nilai negatif palsu dari hasil pemeriksaan.



Gambar 1.2 Artifak debu pada sediaan sitologik. Artifak ini sering terjadi ketika spesimen yang datang berupa sediaan siap warna

(Sumber: *Cytological Artifacts Masquerading Interpretation*, 2013)

Sistem administrasi yang ada di laboratorium patologi anatomi khususnya histologi sedikit berbeda dengan laboratorium sitopatologi, walaupun adakalanya kedua laboratorium itu disatukan. Skema dasar dari sistem laboratorium khusus histologi adalah sebagai berikut.



Gambar 1.3 Alur Kerja Laboratorium Histologi.

(Sumber : dokumentasi pribadi)

Pada Gambar 1.3 di atas, spesimen yang diterima akan dilakukan pemeriksaan awal untuk melihat kelayakan suatu sediaan histologik. Hal ini kadangkala disebabkan karena spesimen yang didapatkan kurang layak untuk dibuat sediaan karena satu dan lain hal. Pengoleksian spesimen dan transportasi spesimen yang benar untuk pemeriksaan histopatologis penting untuk dilakukan karena sejumlah alasan berikut ini.

- Kesalahan identifikasi dan pelabelan pada spesimen pasien yang salah dapat menyebabkan dikeluarkannya laporan yang keliru.
- Arsitektur jaringan dan khususnya detail dari sel dapat menjadi sulit diidentifikasi ketika pengirim memberikan spesimen yang telah dimasukkan larutan fiksasi yang tidak semestinya, sehingga diagnosis jaringan yang tepat hampir tidak mungkin. Hal ini terkadang menyebabkan kebutuhan pada biopsi ulang.
- Orientasi spesimen yang salah dari pengiriman, kurangnya identifikasi yang sesuai dalam formulir permintaan, atau kekurangan margin yang jelas (misalnya mesorektum). Hal ini dapat mempersulit ahli patologi dalam mengomentari margin eksisi bedah.
- Hasil pemeriksaan tambahan mungkin diperlukan untuk membuat diagnosis histopatologis yang akurat seperti radiologi, laboratorium klinik dan lain-lain.
- Jika laporan sangat dibutuhkan dalam waktu dekat, harus ditunjukkan dalam formulir permintaan dengan identifikasi khusus (warna formulir atau tulisan CITO). Dalam praktik histopatologis, mungkin ada penundaan dalam pengambilan spesimen, pengolahan atau pelaporan.
- Beberapa jenis spesimen mungkin memerlukan fiksatif khusus, atau perlu dikirim dalam kondisi tidak terfiksasi untuk penyelidikan tertentu.
- Mungkin perlu menginformasikan laboratorium sebelum mengirim spesimen untuk penyelidikan khusus atau mendesak (misalnya potong beku).

Dari alasan-alasan di atas maka rincian yang harus ada dalam formulir permintaan adalah sebagai berikut.

- Jenis dan lokasi specimen.
- Rincian identifikasi pasien (serupa dengan yang ada pada wadah spesimen).
- Rincian klinis yang relevan (temuan radiologi untuk tumor tulang, tes fungsi hati untuk biopsi hati, tes fungsi ginjal untuk biopsi ginjal, kadar PSA untuk prostat biopsi dan lain-lain) dan bila tersedia ditambahkan diagnosis klinis sebagai pembanding.
- Nomor referensi dan diagnosis laporan aspirasi jarum halus yang relevan sebelumnya (FNA) atau histologik sebelumnya, jika ada.
- Jika jahitan orientasi ditempatkan, margin yang diwakilinya harus ditunjukkan dengan jelas.
- Sebuah indikasi jika laporan tersebut sangat dibutuhkan.

Sebuah formulir dapat saja berbeda dari tiap laboratorium, namun tetap harus dipertimbangkan nilai-nilai yang wajib terisi sebagai penunjang diagnosis dan lain sebagainya.

■ Sitohistoteknologi ■


Berikut adalah sebuah contoh formulir dari laboratorium yang digunakan. Berikut ini adalah contoh formulir penerimaan spesimen jaringan.

CONTOH FORMULIR PENERIMAAN SPESIMEN JARINGAN		
Nama Lengkap Pasien		Tanggal Lahir
Alamat Lengkap Pasien		Jenis Kelamin
Dokter Pengirim		Dugaan Awal. (di isi oleh ahli patologi / dr spesialis PA)
Rumah Sakit / Klinik Pengirim		
Tanggal Penerimaan Spesimen	Waktu Penerimaan Spesimen	Permohonan Sediaan : HE / Giemsa / PAS dll


Gambaran Makroskopis / Gross
(diisi oleh ahli patologi / dokter spesialis PA. / asisten ahli Patologi)

Contoh :
Diterima spesimen dari organ ginjal dengan bentuk yang sudah tidak beraturan dengan panjang = 10 cm, lebar = 6 cm dan tebal = 5 cm. Konsistensi keras dan terlihat ada benjolan-benjolan di luar dari organ ginjal. Ditemukan massa tumor sebanyak 5 massa. Dari 5 massa diambil 2 massa tumor dan dimasukkan ke dalam 1 kaset (A) (2 kup). Dari bagian kortek diambil bagian yang diduga mengalami kelainan dan diambil sebanyak 2 kaset di bagian apikal (B) dan posterior (C).

Kode Kaset :
A.123.ABC-2
B.234.ABC
C.345.ABC



Tampak Samping



Tampak Atas

Terlihat Area yang rusak dengan warna putih

Gambar 1.4 Contoh Formulir Penerimaan Spesimen Jaringan.

(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

■ Sitohistoteknologi ■

Adapun contoh formulir penerimaan spesimen sitologik adalah sebagai berikut.

CONTOH FORMULIR PENERIMAAN SPESIMEN SITOLOGIK			
Nama Lengkap Pasien		Tanggal Lahir	Jenis Kelamin
Alamat Lengkap Pasien		Dugaan Awal. (di isi oleh ahli patologi / dr spesialis PA)	
Dokter Pengirim	Rumah Sakit / Klinik Pengirim		
Tanggal Penerimaan Spesimen	Waktu Penerimaan Spesimen	Permohonan Sediaan : Papanicolaou / Giemsa / lainnya	
Bentuk Spesimen	<input type="checkbox"/> Cairan	<input type="checkbox"/> Sitoblok	<input type="checkbox"/> Slide
Spesimen Ginekolog			
Area Spesimen	<input type="checkbox"/> Servik	<input type="checkbox"/> Vulva	<input type="checkbox"/> Vagina
Teknik Pengambilan	<input type="checkbox"/> Spatula	<input type="checkbox"/> Sikat Endometrium	<input type="checkbox"/> Lainnya
Spesimen Kolposopi	<input type="checkbox"/> Tidak	<input type="checkbox"/> Iya	
Hari Terakhir Menstruasi :hari / bulan			
Menopause	<input type="checkbox"/> Tidak	<input type="checkbox"/> Iya	
Histerektomi	<input type="checkbox"/> Tidak	<input type="checkbox"/> Iya	<input type="checkbox"/> Total <input type="checkbox"/> Sub Total
Status Kehamilan	<input type="checkbox"/> Tidak	<input type="checkbox"/> Iya	Post Partum <input type="checkbox"/> Tidak <input type="checkbox"/> Iya
Terapi	<input type="checkbox"/> IUD	<input type="checkbox"/> Hormon	<input type="checkbox"/> Radiasi <input type="checkbox"/> Kemoterapi
Pendarahan	<input type="checkbox"/> Tidak	<input type="checkbox"/> Iya	
Riwayat Pemeriksaan	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Tidak Normal	
Kecurigaan Lesi	<input type="checkbox"/> Tidak	<input type="checkbox"/> Iya	
Gambaran Lesi (Jika ada kecurigaan lesi) (diisi oleh ahli patologi / dokter spesialis PA. / asisten ahli Patologi / Pengambil Spesimen)			

Gambar 1.5 Contoh Formulir Penerimaan Spesimen Sitologik Khusus Ginekolog

(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

■ Sitohistoteknologi ■

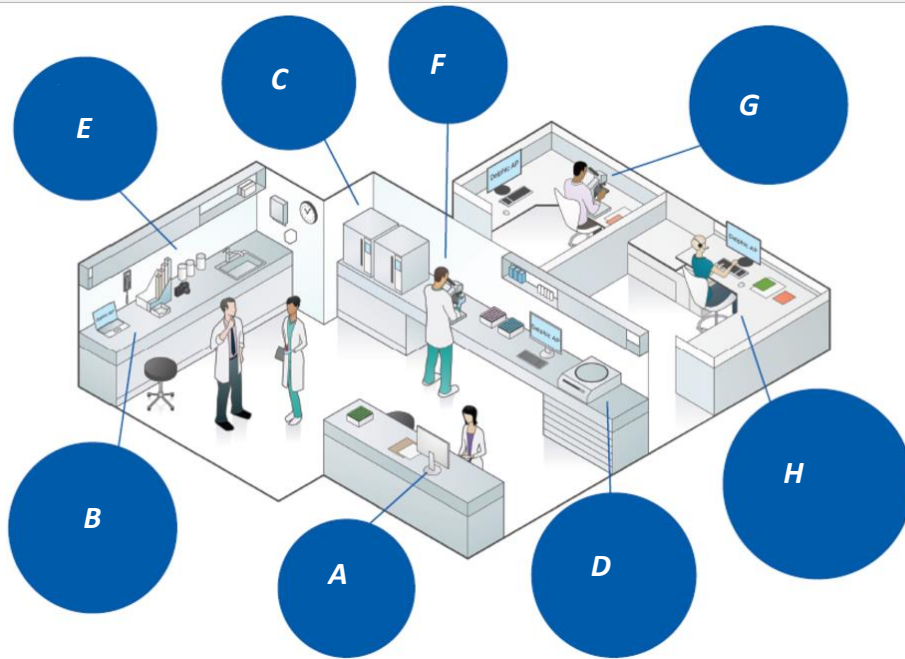
Sedangkan untuk formulir sediaan sitologik non ginekolog adalah sebagai berikut.

CONTOH FORMULIR PENERIMAAN SPESIMEN SITOLOGIK NON GINEKOLOG			
Nama Lengkap Pasien		Tanggal Lahir	Jenis Kelamin
Alamat Lengkap Pasien		Dugaan Awal. (di isi oleh ahli patologi / dr spesialis PA)	
Dokter Pengirim	Rumah Sakit / Klinik Pengirim		
Tanggal Penerimaan Spesimen	Waktu Penerimaan Spesimen	Permohonan Sediaan : Papanicolaou / Giemsa / lainnya	
Bentuk Spesimen	<input type="checkbox"/> Cairan	<input type="checkbox"/> Sitoblok	<input type="checkbox"/> Slide
Sputum	<input type="checkbox"/> Servik	<input type="checkbox"/> Vulva	<input type="checkbox"/> Vagina
Urin	<input type="checkbox"/> First Voided	<input type="checkbox"/> Mid Stream	<input type="checkbox"/> Kateter
	<input type="checkbox"/> Cystoscopy	<input type="checkbox"/> Lainnya : (tuliskan)	
Bronkial	<input type="checkbox"/> Washing	<input type="checkbox"/> Brushing	
	<input type="checkbox"/> Bronko alveolar		
Cairan Tubuh Lain	<input type="checkbox"/> Pleura	<input type="checkbox"/> Peritonium / Ascites	<input type="checkbox"/> Perikardium
	<input type="checkbox"/> CSF	<input type="checkbox"/> Lainnya : (tuliskan)	
FNAC	Tuliskan posisi pengambilan		
Lainnya	Tuliskan :		
Gambaran Spesimen : (diisi oleh penerima sampel) Contoh : Diterima sebuah spesimen dengan volume kurang lebih 30 ml dengan warna kuning keruh.			

Gambar 1.6 Contoh formulir Penerimaan Spesimen Non-ginekolog

(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Setelah spesimen diterima, maka alur pengolahan spesimen-pun harus berjalan dengan baik mulai dari penerimaan spesimen hingga pelaporan hasil. Berikut ini contoh alur perpindahan spesimen di laboratorium patologi anatomik adalah sebagai berikut.



Gambar 1.7 Alur Kerja laboratorium Patologi Anatomi

Sumber: <http://www.sysmex.co.nz>

Ket :

- A. Penerimaan Spesimen
- B. Potong Gross
- C. Pematangan Jaringan
- D. Pematangan Mikrotomi
- E. Pewarnaan Sediaan
- F. Kontrol Kualitas Sediaan / skrining
- G. Ahli Patologi / Dokter Spesialis PA.
- H. Sistem Pelaporan

Latihan

Setelah anda telah mempelajari tentang pengertian dan alur kerja di laboratorium Patologi Anatomi, sekarang saatnya Anda berlatih bagaimana alur kerja di laboratorium Anda. Silahkan Anda pelajari salah satu laboratorium di tempat Anda berkerja/Praktek Klinik. Sebutkan bagaimana alur penerimaan spesimen, pengolahan, pengecekan kontrol kualitas hingga laporan masuk ke pasien serta ke database rumah sakit. Anda dapat menggunakan bantuan Tabel 1.3 berikut ini.

Tabel 1.3 Alur Penerimaan Spesimen Hingga Laporan Akhir

No	Nama Kegiatan	Pelaksana	Sistem Pendataan
1	Spesimen Diterima	Admin	Berbasis Kertas/ Komputer/Kombinasi
2			
3			
4			
	Dst	Dst	dst

Petunjuk Jawaban Latihan

Untuk mengerjakan latihan tersebut, gunakan pengalaman sehari-hari Anda dalam melakukan penerimaan spesimen hingga pelaporan. Anda dapat bertanya ke bagian yang termasuk ke dalam komponen alur kerja di laboratorium. Untuk mengisi tabel di atas, Anda dapat mempelajari kembali topik 1 atau dapat melakukan teknik wawancara.

Ringkasan

Laboratorium Patologi Anatomi merupakan bagian dari laboratorium kesehatan dan tergolong ke dalam laboratorium khusus. Salah satu fungsi dan kewenangan dari laboratorium Patologi Anatomi adalah mengolah spesimen yang berasal dari makhluk hidup (manusia atau hewan) guna kepentingan diagnosis, penelitian, pengajaran hingga museum. Untuk mendapatkan kesimpulan dari suatu pengamatan yang baik maka diperlukan suatu manajemen laboratorium yang baik mulai dari proses praanalitik, analitik hingga pasca analitik. Proses pra analitik menjadi salah satu kompetensi seorang adminitrasi yang tidak bisa lepas dari keilmuan di laboratorium Patologi Anatomi. Kompetensi itu salah satunya adalah bagaimana mendeskripsikan spesimen yang layak maupun yang tidak layak untuk diteruskan di dalam proses pengolahan. Adapun secara garis besarnya alur di Laboratorium Patologi Anatomi setidaknya mencakup (1) sistem penerimaan spesimen, (2) sistem pemotongan gross, (3) Sistem pengolahan spesimen (pematangan, pemotongan dan pewarnaan, (4) sistem pelaporan hasil pengolahan spesimen.

Tes 2

Sebelum Anda melanjutkan mempelajari topik 2, kerjakanlah soal-soal berikut ini. Hasil atau jawaban Anda menunjukkan pemahaman Anda terhadap materi Topik 1. Pilihlah jawaban yang paling tepat dari soal-soal berikut dengan melingkari atau membubuhkan tanda silang pada A, B, C, D, atau E.

- 1) Seorang wanita mengalami keluhan keluarnya darah dan cairan bening dari saluran reproduksinya. Wanita tersebut hendak melakukan pemeriksaan *Pap Smear*, namun sayangnya wanita itu baru saja selesai menstruasi. Apa yang harus dilakukan seorang administrasi ?
 - A. Menolak wanita itu
 - B. Meminta untuk datang kembali 2 minggu kedepan
 - C. Meminta surat permohonan dari dokter klinik
 - D. Meminta wanita itu untuk melakukan pemeriksaan ke spesialis obgyn
 - E. Tetap melakukan pemeriksaan kepada wanita tersebut

- 2) Seorang wanita mendapatkan diskon pemeriksaan *Pap Smear*. Ketika hendak melakukan pemeriksaan pap smear ternyata wanita tersebut sedang menstruasi, sedangkan diskon yang diberikan berlaku hanya untuk hari itu. Apa yang harus dilakukan oleh seorang administrator?
 - A. Menolak wanita itu dengan alasan sedang menstruasi
 - B. Menjelaskan kepada wanita itu jika pengambilan dilakukan akan menghasilkan diagnosis palsu
 - C. Tetap melakukan pemeriksaan
 - D. Melakukan pencucian vagina terlebih dahulu kemudian diperiksa
 - E. Menolak wanita itu dengan menjelaskan syarat-syarat melakukan pemeriksaan Pap smear pada wanita yang sehat.

- 3) Berapa lama waktu yang diperlukan oleh seorang wanita jika ingin melakukan pemeriksaan Pap smear namun baru 1 hari melakukan “douching” ?
 - A. 1 hari kemudian
 - B. 2 hari kemudian
 - C. 14 hari kemudian
 - D. 1 bulan kemudian
 - E. Tidak perlu menunggu

🗑️ ■ Sitohistoteknologi 🗑️ ■

- 4) Berapa lama waktu yang diperlukan oleh seorang wanita jika ingin melakukan pemeriksaan Pap smear namun baru semalam wanita tersebut telah melakukan “hubungan badan” dengan suami ?
- A. 1 hari kemudian
 - B. 2 hari kemudian
 - C. 14 hari kemudian
 - D. 1 bulan kemudian
 - E. Tidak perlu menunggu
- 5) Berapa lama waktu yang diperlukan oleh seorang wanita jika ingin melakukan pemeriksaan Pap smear namun wanita tersebut baru selesai menstruasi?
- A. 1 hari kemudian
 - B. 2 hari kemudian
 - C. 14 hari kemudian
 - D. 1 bulan kemudian
 - E. Tidak perlu menunggu
- 6) Siapakah yang berwenang untuk melakukan pembuatan sediaan sitologi ?
- A. Dokter spesialis patologi anatomi
 - B. Ahli sitologi
 - C. Ahli histologi
 - D. Asistem ahli patologi
 - E. Skriner
- 7) Siapakah yang berwenang untuk melakukan pemeriksaan kualitas sediaan sitologik ?
- A. Dokter spesialis patologi anatomi
 - B. Ahli sitologi
 - C. Ahli histologi
 - D. Asistem ahli patologi
 - E. Skriner
- 8) Sebuah paket dari rumah sakit rujukan datang ke laboratorium patologi anatomi yang berisi sediaan siap warna. Di dalam formulir tertulis nama pasien dan nomor rekam medis. Apa yang harus dilakukan oleh seorang admin. sebagai penerima paket?
- A. Mengembalikan paket tersebut
 - B. Tetap diwarnai
 - C. Dilaporkan bahwa sediaan tidak layak terima
 - D. Melakukan konfirmasi ulang ke rumah sakit rujukan dan spesimen disimpan pada ruang yang layak
 - E. Melakukan konfirmasi ulang ke rumah sakit rujukan dan spesimen tetap berjalan

✎ ■ Sitohistoteknologi ✎ ■

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1 yang terdapat di bagian akhir topik ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi yang terdapat di topik 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 90 - 100% = baik sekali
 80 - 89% = baik
 70 - 79% = cukup
 < 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan mempelajari materi di topik 1. **Bagus!** Jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi topik 7, terutama bagian yang belum Anda kuasai.

Kunci Jawaban Tes

Tes 1

1. Sitopatologi/sitologi
2. a) melaksanakan pengambilan dan penanganan bahan pemeriksaan laboratorium sesuai standar pelayanan dan standar operasional prosedur;
b) melaksanakan kegiatan pemantapan mutu, pencatatan dan pelaporan;
c) melaksanakan kegiatan keamanan dan keselamatan kerja laboratorium; dan
d) melakukan konsultasi dengan penanggung jawab teknis laboratorium atau tenaga teknis lainnya
3. Biopsi
4. Sel exfoliatif
5. Fine Needles Aspiration atau Biopsi Jarum Halus (BJAH)
6. tahun
7. Referensi diagnosis, pengajaran atau penelitian
8. tahun
9. PERMENKES RI Nomor 411/MENKES/PER/III/2010
10. Sitoblok

Tes 2

1. C
2. E
3. A
4. A
5. C
6. B
7. D
8. E

Daftar Pustaka

Giuseppe Lippi and Gian Cesare Guid. (2011). The Preanalytical Phase in Quality assurance in Quality Assurance in the Pathology Laboratory. Taylor and Francis Group, LLC. CRC Press.

<http://www.sysmex.co.nz/download/delphic-ap-designer-software-for-your-pathology-workflow>

Sahay, et.al, (2013). Cytological artifacts masquerading interpretation. Journal Cytology, 30(4):241-6

Supriya Nikita Kapila, Karen Boaz, Srikant Natarajan. (2016). The post-analytical phase of histopathology practice: Storage, retention and use of human tissue spesimens. International Journal Applied Basic Medical Research. 6(1): 3-7

Zioga, Christina and Chariklia Destouni, (2015) Cytology ABCDE: A Practical ABCDE Algorithm for Cytology Diagnosis. The Diagnostic pathology Journal, 1:11

BAB II

KESELAMATAN DAN KESEHATAN KERJA (K3) LABORATORIUM PATOLOGI ANATOMI

Dewi Inderiati, S.Si., M.Biomed

PENDAHULUAN



Seperti yang telah dibahas di topik 1, bahwa Laboratorium patologi anatomi adalah suatu tempat dimana dilakukan kegiatan berupa menerima, mengolah hingga mendiagnosis spesimen berupa sel atau jaringan yang berasal dari tubuh manusia ataupun hewan uji untuk keperluan pengobatan maupun penelitian. Oleh karena itu pemakaian dan pemanfaatan alat-alat laboratorium selalu dilakukan tiap harinya (<http://kesker.fk.uqm.ac.id>).

Dengan banyaknya peralatan dan komponen perlengkapannya, maka laboratorium patologi anatomi memiliki potensi yang menimbulkan bahaya kepada orang-orang yang berkecimpung di laboratorium tersebut.

Beberapa penelitian menunjukkan telah terjadi kecelakaan kerja dengan intensitas yang tinggi di tiap harinya khusus di laboratorium patologi Anatomi ini. Dengan tingginya kecelakaan kerja di laboratorium patologi anatomi maka perlu yang namanya tindakan pencegahan yang dirangkung dalam kegiatan Keselamatan dan kesehatan Kerja (K3) atau laboratory safety.

Studi prospektif pada kecelakaan yang terjadi di laboratorium Patologi Rumah Sakit kecelakaan pada laboratorium histologi mencapai angka 40%, dan laboratorium sitologi mencapai 7%. Kecelakaan yang terjadi antara lain teriris oleh benda tajam sebesar 47% diikuti oleh percikan oleh bahan cairan seperti darah atau bahan kimia sebesar 27%. Dari keseluruhan kecelakaan di laboratorium rumah sakit, 67% berasal dari kecelakaan yang melibatkan teknisi laboratorium kesehatan, 20% dari petugas dan sisanya adalah petugas kesehatan dan teknisi laboratorium junior. Meskipun kecelakaan yang dilaporkan terbilang sepele, sangat penting untuk mendokumentasikan kejadian itu dan menjadikan perhatian bagia semua pihak di laboratorium. Hal ini dilakukan guna mencegah kecelakaan besar yang mungkin terjadi dan juga karena implikasi hukum kesehatan. Peran Komite Keselamatan Laboratorium tidak dapat terlalu diandalkan karena hanya perubahan sikap dari pegawai yang sangat penting untuk perubahan tersebut.

Penerapan Keselamatan dan kesehatan Kerja (K3) di laboratorium atau laboratory safety khususnya di laboratorium kesehatan memerlukan perhatian khusus. Keselamatan dan kesehatan kerja (K3) merupakan suatu tindakan perlindungan terhadap tenaga kerja dari segala aspek yang berpotensi membahayakan. Aspek yang dimaksud membahayakan dalam

bab ini adalah sumber yang berpotensi menimbulkan kecelakaan akibat penggunaan peralatan kerja, penyakit yang bersumber dari spesimen yang diterima dan dibuang hingga karakteristik rekan kerja atau orang-orang yang berada di ruang lingkup laboratorium.

Penerapan praktik K3 seharusnya melekat pada seluruh kegiatan di laboratorium. Ada banyak bahaya di tempat kerja khususnya di laboratorium sito-histologik. Setiap negara telah dirancang untuk memperbaiki kesalahan-kesalahan yang mungkin terjadi di laboratorium sito-histologik. Rancangan yang dibentuk sangatlah bervariasi dari satu negara ke negara namun memiliki dasar yang bersifat universal. Salah satu upaya penerapan K3 adalah dengan mengetahui berbagai sumber dari kecelakaan kerja. Tahapan awal dari identifikasi sumber kecelakaan adalah dengan melakukan analisa manajemen resiko.

Manajemen risiko tidak hanya berkaitan dengan kesehatan dan keselamatan pribadi, namun juga terhadap kesehatan dan keselamatan lingkungan. Laboratorium rumah sakit telah mengalami perbaikan yang signifikan dalam kondisi di tempat kerja, namun tetap menjadi kontributor pencemaran lingkungan. Ada beberapa hal yang menjadi perhatian di laboratorium patologi anatomi, antara lain : 1. teknisi sering tidak mengenali bahaya kimia yang ada di lingkungan kerja mereka; 2. Formaldehid dan xilol adalah bahaya umum di histologi dan patologi laboratorium sehingga teknisi perlu mengetahui efek kesehatan yang mungkin timbul dari paparan bahan kimia ini; 3. Meskipun xylene tidak memiliki persyaratan pengawasan kesehatan/kesehatan yang ditetapkan, evaluasi kesehatan karyawan yang terpapar xilol harus diperhatikan dengan baik; 4. Teknisi laboratorium patologi anatomi yang terpapar Formaldehid memerlukan pengawasan kesehatan/kesehatan.

Pelaksanaan implementasi Keselamatan dan Kesehatan Kerja (K3) di laboratorium secara umum dapat dilaksanakan dengan tahapan berikut:

1. Pengetahuan tentang K3 dari masing-masing personil laboratorium
2. Kondisi laboratorium yang kondusif dan sesuai dengan standar minimum untuk bekerja aman di laboratorium
3. Penataan bahan kimia yang menjadi sumber bahaya yang sering muncul
4. Tersedianya alat perlindungan diri (APD) yang lengkap serta jaminan keselamatan dan kesehatan kerja di laboratorium

Setelah Anda mempelajari dan menerapkan pengetahuan dalam bab ini, Anda diharapkan dapat:

1. menjelaskan tentang pengertian keamanan, kesehatan dan keselamatan (K3) di laboratorium patologi anatomi,
2. menerapkan prosedur K3 dengan benar,
3. menerapkan prosedur pengolahan limbah dengan benar.

Kemampuan Anda dalam menerapkan aturan K3 sangatlah penting, selain untuk menjaga keselamatan dan kesehatan kerja Anda ataupun rekan kerja dan juga lingkungan. Penerapan K3 yang baik juga menjamin keselamatan dan kesehatan Anda baik untuk saat ini maupun masa depan.

Topik 1

Manajemen Resiko

A. TAHAPAN MANAJEMEN RESIKO

Dalam menjalankan kegiatan di laboratorium, banyak sekali kemungkinan-kemungkinan seorang pekerja terpapar dengan spesimen yang berkemungkinan infeksius. Selain spesimen yang infeksius, pekerja dapat juga terpapar dengan instrumen ataupun pelengkap dari instrumen yang berhubungan dengan pengolahan spesimen itu. Ketika di dalam laboratorium sering terpapar suatu yang dapat menyebabkan kecelakaan dan mengganggu kesehatan pekerja. Untuk itu diperlukan suatu tindakan pencegahan. Dalam mencegah kecelakaan dan menjaga kesehatan petugas dalam bekerja, ada beberapa tahapan yang harus dilakukan. Berikut ini tahapan tersebut.

1. Identifikasi Dan Evaluasi Bahaya

Langkah pertama dalam manajemen risiko adalah mengidentifikasi sumber bahaya dari tempat kerja. Jika ini tidak pernah dilakukan, mungkin ini adalah tugas yang berat bagi Anda, terutama jika ada reagen atau bahan kimia yang telah lama di dalam wadah dengan label yang sudah mulai menghilang. Apapun yang tidak dapat diidentifikasi atau dipertanyakan maka harus harus disisihkan untuk dibuang. Identifikasi sumber bahaya dimulai ketika membuat suatu persediaan bahan kimia, dan ini adalah bagian penting dari upaya tersebut. Selain bahaya bahan kimia bahaya listrik, mekanik dan biologis harus juga disertakan. Pada tahap identifikasi awal ini, sertakan sifat bahaya dengan istilahnya, lokasi dan prosedur yang terkait terhadap penggunaannya. Jika tidak ada penemuan tentang penggunaan pada saat ini, maka buang barang tersebut.

Untuk bahan kimia berbahaya, lembar data inventaris dan pengelolaan telah banyak tersedia baik secara nasional maupun tersedia dari database di Internet. File lembar data harus disimpan di lokasi yang aman dan karyawan harus diberi akses yang mudah dan terjangkau. Sebaiknya simpan file ganda yang mudah untuk diakses di laboratorium jika dalam kondisi darurat. Beberapa lembaran data inventaris mungkin tidak dapat ditemukan untuk reagen sudah usang di area penyimpanan. Ketika Anda menemukan hal ini akan muncul masalah tanpa solusi, hal ini dikarenakan pembuangan yang sah tetap membutuhkan lembar data. Namun jika hal tersebut terjadi maka Anda harus membuatnya ulang, atau menyewa perusahaan yang berkualifikasi untuk melakukan hal itu.

Setiap laboratorium memerlukan evaluasi dalam antisipasi tingkat resiko. Evaluasi tingkat keparahan masing-masing bahaya yang ada. Berapakah volume atau besarnya barang berbahaya itu? Berapa banyak yang digunakan per hari atau beberapa unit yang digunakan dalam periode waktu tertentu?

Sekarang Anda letakkan informasi itu dalam lembar data dalam skala penggunaan di laboratorium. Evaluasi ini harus mencakup risiko yang terkait dengan penggunaan, penghilangan (tumpahan dan penguapan) dan pembuangan secara normal. Anda dilarang

meremehkan resiko, tapi tetap perhitungan antara skala besar dan skala penggunaan oleh teknisi. Contohnya seperti ini, ketika seorang teknisi menggunakan formalin setiap hari sebanyak 200 ml selama 30 hari berturut-turut dapat melebihi kadar berbahayanya ketika Anda melakukan pembuangan secara besar-besaran dengan total volume yang sama namun hanya dilakukan sesaat.

2. Perencanaan Meminimalkan Risiko

Ketika sumber bahaya telah terdaftar dan dievaluasi, putuskan bagaimana mengurangi risiko. Setiap item harus diteliti, bukan hanya yang menawarkan bahaya terbesar. Lihatkan skala prioritas. Tujuan dari perencanaan ini adalah untuk mengurangi risiko pada tingkat yang dapat diterima. Namun sebaiknya melalui rangkaian pilihan yang semakin lama semakin memberatkan dan beresiko. Kontrol praktik kerja adalah cara terbaik untuk mengatasi masalah. Kontrol praktik kerja melibatkan penghapusan, pengurangan dan daur ulang segala sesuatu yang mungkin terjadi. Jika tidak berhasil, kontrol teknik harus diimplementasikan. Hal-hal yang berhubungan dengan kontrol teknik ini melibatkan sistem ventilasi, perangkat proteksi kebakaran dan perubahan lainnya yang berhubungan dengan fasilitas ini. Jika semua tindakan ini gagal atau tidak mungkin tercapai, alat peraga pribadi (APD) harus digunakan sebagai upaya terakhir. APD tidak boleh menjadi pilihan pertama, meski mungkin ini cara yang paling jelas untuk melindungi pekerja.

Ada beberapa cara untuk mengurangi risiko, yang pertama harus dilakukan adalah bagaimana menghilangkan bahaya secara bersamaan. Daftar bahan kimia usang di laboratorium Anda segera diinventaris, berapa banyak laboratorium Anda masih menggunakan? Contoh: masihkah Anda menggunakan benzen dan dioxane? Maka jangan heran dalam beberapa tahun lagi histolog dan ilmuwan biokesehatan tidak lagi akan menggunakan xylene, toluene, chloroform, methacrylate, picric acid, uranyl nitrat dan formaldehida.

Secara praktis setiap bahan kimia berbahaya dapat diganti dengan pengganti yang lebih aman dan lebih unggul secara teknis. Jika menghilangkan sumber bahaya tidak dimungkinkan, pertimbangkan bagaimana cara pengurangannya. Ketika ini dilakukan maka akan melibatkan perubahan prosedural, jadi pastikan untuk memperhitungkan segala resiko manajemen sebelum mengimplementasikan pengurangan untuk waktu ke depan. Salah satu gagasan umum untuk pengurangan faktor resiko dari sumber bahaya adalah dengan menggunakan wadah spesimen yang lebih kecil untuk fiksasi, melakukan daur ulang larutan fiksasi yang disaring dengan filter, mengurangi volume dan waktu paparan bahan kimia.

Ketika dilakukan perencanaan maka Anda harus memasukkan justifikasi kepada para manajer. Alasan untuk perubahan seharusnya tidak hanya bergantung pada peningkatan keamanan. Pertimbangan keuangan yang bisa menjadi menjadi argumen kuat Anda untuk perubahan. Pada awalnya perubahan akan menghabiskan lebih banyak biaya, namun keuntungan jangka panjang biasanya mudah dihitung pula. Contoh, bahan pengganti formalin dapat lebih mahal daripada formalin yang biasa digunakan, namun penggunaannya akan menjadi penghematan yang signifikan nantinya, baik dari sisi teknis laboratorium atau biaya-

biaya yang harus dikeluarkan dalam menanggung keselamatan dan kesehatan kerja. Hal ini diperlukan untuk mendapatkan tenaga kerja yang lebih sehat. Ketika larutan fiksasi tergantung, maka tempat kerja setiap personil tidak perlu lagi untuk dipantau dari uap yang berbahaya, dan biaya pembuangan biasanya dapat dihilangkan.

3. Terapkan Rencananya

Memiliki rencana tidak akan ada gunanya jika tidak diimplementasikan. Prioritaskan perubahan yang dijelaskan dan terukur dalam rencana. Lakukan perubahan yang mudah ditangani dengan segera, jangan menunda resiko yang membawa dampak negatif bagi kesehatan atau lingkungan.

B. KOMPONEN INVENTARISASI BAHAN BERBAHAYA

Dalam menjalankan ketiga tahap di atas, diperlukan beberapa pengetahuan tentang tentang unsur utama dalam manajemen resiko yakni: identifikasi, perencanaan, dan pelaksanaan. Untuk itu Anda perlu membekali diri dengan teori-teori yang mendukung ketiga unsur tersebut. Berikut ini adalah teori-teori yang diperlukan.

1. Indeks paparan biologis

Ketika saat ini Anda sudah bekerja di laboratorium kesehatan, dapatkah Anda menentukan apakah tubuh Anda sudah mengapami perubahan akibat pemaparan yang telah terjadi selama ini? Dapatkah zat kimia yang terpapar ke dalam tubuh Anda dapat terdeteksi dengan tes klinis? Dalam beberapa kasus, jawabannya adalah 'ya'. Beberapa senyawa kimia telah ditetapkan kadar Biological Exposure Indices (BEIs[®]) sebagai nilai maksimum analit yang ditentukan dari uji klinis terhadap udara, urin atau darah untuk berbagai bahan kimia berbahaya, namun hanya empat yang sesuai dengan laboratorium patologi anatomi, yaitu: N-dimetilformamida, metanol, Fenol dan Xilol.

Xilol digunakan secara merata di dalam laboratorium patologi anatomi, dan begitu banyak ahli yang peduli dengan pengaruhnya. Mekanisme pengukuran paparan xilol pada tubuh adalah dengan mengukur Isomer Xilol yang dimetabolisme menjadi asam methylhippuric. Asam methylhippuric dapat diukur pada urin pekerja yang terpapar dengan xilol ditiap harinya. Kadar yang masih diperkenankan dalam tubuh seseorang untuk xilol adalah 1,5 g asam methylhippuric per g kreatinin.

Biological Exposure Indices tidak dimaksudkan untuk digunakan dalam mendiagnosis suatu penyakit akibat kerja di laboratorium tertentu yang selalu terpapar bahan kimia. Nilai-nilai tersebut bukan nilai maksimum yang masih diperkenankan. Sebaliknya, Biological Exposure Indices merupakan indikator bahwa pekerja dapat terkena paparan zat berbahaya. Hal ini akan terkonfirmasi jika seseorang atau sekelompok pekerja berulang kali menunjukkan nilai analit diatas batas ambang Biological Exposure Indices. Untuk penggunaan xilol di laboratorium patologi anatomi haruslah yang berventilasi baik. Dan ketika terdapat asam etil-

hippurik yang tinggi dalam urin maka kemungkinan menunjukkan paparan xilol yang tinggi pada kulit.

2. Jenis bahaya

Sistem pengklasifikasian sifat berbahaya bahan kimia dimulai dari pictographs sederhana dengan penilaian numerik hingga daftar lengkap istilah yang didefinisikan secara formal. Bahkan di dalam satu negara pun, instansi laboratorium baik pemerintah maupun swasta mungkin dapat berbeda dalam bagaimana mendefinisikan bahaya. Meskipun tidak ada sistem yang seragam yang cukup memadai di seluruh dunia, istilah-istilah berikut memiliki arti yang hampir seragam dan dapat disajikan secara praktis untuk menggambarkan bahaya yang dihadapi di dalam laboratorium patologi anatomi. Tingkat bahaya yang pertama terbagi menjadi dua kategori besar yaitu bahaya bagi kesehatan dan dan bahaya bagi fisik tubuh pekerja.

Adapun sumber bahaya yang ada di dalam laboratorium patologi anatomi adalah sebagai berikut.

a. Agen Biologis

Bahaya biologis bisa berasal dari spesimen itu sendiri atau komponen penyertanya (larutan, media dan lain-lain). Apa pun yang memungkinkan spesimen dapat menyebabkan penyakit pada manusia, terlepas dari sumbernya ataupun penyebarannya makasemua spesimen itu dianggap sebagai agen biologis yang berbahaya, bahkan jika penyakit bearasal dari hewan (pada hewan uji lain atau hewan lainnya). Di berbagai negara, bahan biologis berbahaya diberi label khusus dan dilakukan pembuangannya dengan sangat ketat.

b. Agen Iritan

Iritan adalah bahan kimia yang dapat menyebabkan efek peradangan reversibel pada daerah yang terjadi kontak langsung dengan jaringan hidup. Kontak langsung bahan iritan yang paling sering adalah bagian mata, kulit dan saluran pernafasan. Hampir semua bahan kimia dapat menimbulkan iritasi karena jaringan terpapar dengan bahan kimia.

c. Agen Korosif

Bahan kimia korosif dapat menyebabkan bahaya secara fisik maupun kesehatan tubuh. Bila agen korosif terkena jaringan hidup maka akan terjadi kerusakan langsung atau terjadi perubahan ireversibel. Ketika agen korosif kontak dengan permukaan tak bernyawa tertentu (umumnya logam), maka agen korosif ini akan merusak material yang terpaparnya. Bahan kimia mungkin korosif terhadap jaringan tapi tidak pada baja, atau sebaliknya. Sedikit bahan kimia yang memiliki sifat korosif untuk kedua materi (hidup ataupun tidak hidup).

d. Agen Alergen

Agen alergen merupakan agen yang dapat menyebabkan reaksi alergi pada sebagian besar subjek yang terpajan. Hampir semua bahan kimia dapat menyebabkan reaksi alergi pada

individu yang hipersensitif. Ketika terdapat agen allergen terlihat muncul, maka akan ada upaya mengetahui prevalensi reaksi pada populasi yang terpapar. Dengan adanya deteksi agen allergen dan prevalensinya, maka sejatinya agen tersebut merupakan agen yang memiliki tingkat bahaya yang serius, karena alergi akan berlangsung seumur hidup dan semakin memburuk dengan pemaparan berikutnya. Reaksi alergi pada senyawa kimia ketika menyerang seseorang dapat terjadi pada kondisi paparan dengan konsentrasi yang tinggi, dan dapat terulang bahkan ketika kondisi konsentrasi rendah baik diluar ataupun di dalam pekerjaan. Salah satu contoh senyawa kimia yang dapat menjadi agen allergen adalah formaldehid.

e. Agen Karsinogen

Karsinogen merupakan suatu materi yang dapat memicu terjadinya pembentukan sel kanker. Banyak zat menginduksi tumor pada hewan percobaan yang dipaparkan dengan dosis yang sangat tidak realistic ketika dikorelasikan dengan lingkungan yang ada di sekitar manusia. Agen karsinogen yang diakui secara resmi harus menunjukkan risiko khusus pada manusia. Kriteria untuk penunjukan karsinogenik sedikit berbeda antar agen, namun pada akhirnya, bahan kimia karsinogenik yang digunakan di dalam laboratorium, patologi anatomi telah diakui secara umum. Agen karsinogen yang diakui antara lain kloroform, asam kromat, dioksan, formaldehida, nikel klorida, dan kalium dikromat. Selain itu, sejumlah zat warna yang dikategorikan karsinogen antara lain Auramin O (CI 41000), basic fuchsin (pararosaniline hydrochloride, CI 42500), ponceau 2R (ponceau de xylidine, CI 16150) dan zat warna apapun yang berasal dari benzidin (termasuk Congo Red, CI 22120; Diaminobenzidin dan Chlorazol Black E, CI 30235).

Bahan beracun yang terdapat di laboratorium patologi anatomi dapat menyebabkan kematian baik karena tertelan, kontak dengan kulit atau terhirup dengan konsentrasi tertentu. Bahan kimia beracun menimbulkan risiko langsung lebih besar daripada bahaya yang sebelumnya disebutkan, bahkan beberapa dapat menjadi sangat berbahaya sehingga perlu diberi penandaan yang sangat beracun. Contoh senyawa kimia yang bersifat sangat beracun antara lain Metanol, Asam kromat, osmium tetroxide dan uranyl nitrat. Gunakan sangat hati-hati saat menggunakan zat beracun. Hindari yang sangat beracun jika memungkinkan.

Bahan kimia yang berada di dalam laboratorium patologi anatomi dapat pula menyebabkan sistem fisiologis dan anatomi tubuh yang biasa disebut dengan "*target organ effect*". Bahan kimia ini sangatlah berbahaya karena pengaruhnya bersifat langsung namun bersifat kumulatif dan sering tidak dapat dipulihkan lagi. Ada banyak contoh bahan kimia ini yang terdapat di laboratorium patologi anatomi seperti xylol dan toluene yang mempengaruhi system persyarafan dan benzena yang mempengaruhi sel darah. Untuk bahan kimia berbahaya yang kemungkinan dapat menyebabkan kerusakan atau keracunan pada system reproduksi antara lain Prevalent (kloroform, metanol, metil metakrilat, merkuri klorida, xilol dan toluena, untuk beberapa nama lainnya) dan mungkin memerlukan pertimbangan khusus berdasarkan peraturan keselamatan kerja di beberapa negara.

Kelompok berbahaya lainnya yang berkaitan dengan risiko fisik adalah senyawa kimia yang bersifat mudah terbakar. Bahan kimia yang mengandung minyak dapat memiliki titik nyala pada atau di atas suhu yang ditentukan. Titik nyala adalah kondisi dimana uap yang dihasilkan akan menghasilkan sumber api dan membutuhkan alat khusus untuk memadamkannya. Hal ini dilakukan sebagai panduan untuk senyawa kimia yang menghasilkan uap yang mungkin menyala di bawah kondisi di tempat kerja yang sebenarnya. Titik nyala yang dicantumkan di dalam laboratorium patologi anatomi bukanlah suhu di mana zat akan menyala secara spontan namun tetap saja membutuhkan pemicu. Contoh bahan kimia yang harus dipertimbangkan dalam titik nyala adalah agen pembeningan yang sering digunakan di laboratorium patologi anatomi.

Bahan kimia yang mudah terbakar dimana memiliki titik nyala di bawah suhu yang ditentukan perlu menjadi perhatian yang lebih besar. Uap yang dihasilkan harus dikontrol dengan hati-hati untuk mencegah penumpukan di sekitar perangkat listrik yang menyala dan tentunya akan memicu terjadinya kebakaran. Ruang penyimpanan, lemari dan wadah bahan kimia yang menyimpan bahan mudah terbakar harus dirancang khusus. Volume yang tersimpan di dalamnya juga harus dibatasi. Wadah dari produsen bahan kimia tersebut disarankan tidak diganti, dan sebaiknya tidak melebihi 4-5 liter tiap bahan kimia tersebut.

Selain dari bahan yang mudah terbakar ada juga bahan kimia yang menjadi sumber bahan kimia peledak, walaupun sangat jarang ditemukan di laboratorium patologi anatomi. Bahan kimia yang dapat menjadi bahan peledak salah satunya adalah asam picric (larutan fiksasi Bouin). Penyebab asam pikrat berubah menjadi peledak ketika bergabung dengan perak tertentu (penggunaan pewarnaan khusus seperti Von Kossa) atau ketika terjadi guncangan maka asam pikratpun dapat menjadi bahan peledak. Oleh karena itu kedua unsur bahan kimia tersebut tidak boleh disimpan setelah digunakan. Asam pikratpundapat membentuk garam berbahaya dengan logam tertentu dan berpotensi meledak bahkan saat dalam kondisi larutan cair.

Reaksi oksidator di laboratorium patologi anatomi dapat menjadi pemicu terbakarnya bahan kimia lain. Ketika reaksi oksidasi terjadi, al itu tidak berbahaya bagi bahan kimia itu sendiri, namun mungkin saja reaksinya dapat menimbulkan risiko kebakaran saat bereaksi dengan zat yang sesuai. Bahan kimia yang dapat menghasilkan reaksi oksidasi adalah Natrium Iodate, dimana Natrium Iodate ini merupakan zat pengoksidasi yang ringan dan mungkin dapat menimbulkan risiko kecil. Lain halnya dengan Mercuric oxide dan asam chromic, dimana kedua bahan kimia tersebut adalah sumber oksiganyang lebih serius.

Dari berbagai bahan kimia dan pemicu kecelakaan di laboratorium patologi anatomi maka ada beberapa hal yang harus Anda perhatikan. Hal-hal yang harus diperhatikan di dalam laboratorium patologi anatomi tersebut adalah sebagai berikut.

1. Sebagian besar peralatan dalam laboratorium ini berfungsi 24x7 atau setidaknya 6x24 jam. Sambungan listrik harus diperiksa ketika datang dan meninggalkan laboratorium setiap hari.
2. Banyak bahan kimia yang mudah terbakar, maka perawatan harus terus dilakukan untuk menghindari bahaya kebakaran.

3. Alat pemadam kebakaran harus selalu tersedia dan pastikan sumber api yang mungkin terjadi sehingga kecocokan antara pemadam dan sumber api tidak tertukar.
4. Zat yang mudah terbakar seminimal mungkin digunakan di laboratorium. Zat seperti lilin, alkohol, xylene, aseton harus disimpan di tempat yang terpisah dan hanya diambil ketika diperlukan.
5. Beberapa bahan kimia bersifat karsinogenik atau berbahaya bagi kulit. Oleh karena itu setiap kegiatan baik pematangan dan pewarnaan harus menggunakan alat pelindung diri berupa sarung tangan.

C. PERATURAN-PERATURAN UMUM LABORATORIUM PATOLOGI ANATOMI

Adapun peraturan-peraturan keselamatan dan keamanan kerja di laboratorium patologi anatomi adalah sebagai berikut.

1. Tempat laboratorium
 - a. Tempat umum harus rapi dan bebas dari penghalang.
 - b. Bangunan harus bersih.
 - c. Ada tidak boleh ada cacat struktural di lantai, tangga, dinding dan atap.
 - d. Lantai dan tangga harus seragam dan tahan slip.
 - e. Seharusnya tidak ada pegangan tangan pada sisi tangga
2. Fasilitas penyimpanan
 - a. Fasilitas penyimpanan, rak, dan lain-lain harus diatur sehingga aman terhadap pergeseran dan jatuh.
 - b. Fasilitas penyimpanan harus dijaga dari penumpukan sampah, bahan yang tidak diinginkan dan benda yang dapat menimbulkan bahaya dan hama seperti tikus bahkan semut sekalipun.
3. Pemanasan dan ventilasi
 - a. Ruang harus menghasilkan suhu ruang yang nyaman.
 - b. Harus memiliki tirai jendela agar tidak terkena sinar matahari langsung.
 - c. Ventilasi harus cukup minimal terjadi perubahan udara sebanyak 6 kali per jam, terutama di ruang yang memiliki ventilasi mekanis.
4. Sanitasi dan staf fasilitas
 - a. Ruang harus dipertahankan dalam kondisi bersih, tertib dan sanitasi yang baik.
 - b. Terdapat air minum.
 - c. Ruang untuk membersihkan diri dan toilet (WC) serta fasilitas cuci harus disediakan untuk laki-laki dan perempuan secara terpisah.
 - d. Air panas dan dingin, sabun dan handuk harus tersedia.
 - e. Ruang ganti untuk laki-laki dan perempuan harus terpisah.
 - f. Harus ada akomodasi (misalnya loker) yang digunakan secara individual untuk pakaian bebas.
5. Penerangan
 - a. Penerangan umum harus memadai (kurang lebih 300-400 lux).

- b. Pencahayaan lokal harus tersedia di meja kerja (embedding dan lain-lain) yang dianggap perlu.
- c. Warna lampu harus seimbang dari setiap titik penerangan.
6. Penyimpanan bahan mudah terbakar
 - a. Fasilitas penyimpanan untuk bahan kimia yang mudah terbakar harus dipisahkan dari bangunan utama.
 - b. Bahan kimia harus diberi label yang jelas sebagai sumber bahaya.
 - c. Saklar untuk penerangan harus ditutup atau ditempatkan di luar gedung.
 - d. Dudukan lampu harus disegel untuk melindungi terhadap uap yang dapat menyebabkan kebakaran.
 - e. Bahan kimia yang mudah terbakar harus disimpan dalam wadah yang tepat, berventilasi dan terbuat dari bahan yang tidak mudah terbakar.
7. Bahaya listrik
 - a. Semua instalasi listrik yang baru atau perbaikan harus dipelihara sesuai dengan kode pengaman listrik.
 - b. Kabel interior harus disambungkan dengan *Ground* (pembumian).
 - c. Saklar harus dipasang untuk semua sirkuit laboratorium.
 - d. Semua peralatan listrik harus memiliki pengujian.
8. Pencegahan kebakaran.
 - a. Harus ada sistem alarm kebakaran.
 - b. Semua pintu keluar tidak boleh terhalang dan atau terkunci ketika sedang dalam kondisi bekerja.
 - c. Sistem deteksi kebakaran harus dalam keadaan baik dan dilakukan pengujian secara teratur.
 - d. Pintu-pintu darurat harus dalam keadaan baik.
 - e. Semua pintu keluar harus mengarah ke ruang terbuka.
 - f. Semua pintu keluar harus ditandai dengan penanda khusus dan dapat berpedar ketika gelap.
9. Alat pelindung diri
 - a. Pakaian pelindung harus desain sesuai dengan ukuran masing-masing pekerja misalnya jas lab, baju, celemek, sarung tangan dan lain-lain
 - b. Kacamata keselamatan, goggles dan masker pelindung harus disediakan.
 - c. Harus tersedia tempat pencuci mata.
 - d. Harus ada kamar mandi darurat.
 - e. Respirator harus tersedia, rutin dibersihkan, didesinfeksi, diperiksa dan disimpan dalam kondisi bersih dan sanitasi yang terjaga.
10. Peralatan laboratorium.
 - a. Semua peralatan harus disertifikasi dan aman untuk digunakan.
 - b. Prosedur harus tersedia untuk dekontaminasi peralatan sebelum digunakan dan dilakukan perawatan.
 - c. *Biosafety cabinet* dan *fumehood* harus secara teratur diuji dan layak.

- d. Otoklaf dan pengetur tekanan harus diperiksa secara teratur.
- e. Centrifuge dan rotor harus secara teratur diperiksa.
- f. Jarum hipodermik harus digunakan sebagai pengganti pipet.
- g. Barang yang retak dan pecah atau terkelupas harus dibuang dan tidak boleh digunakan kembali.
- h. Harus ada wadah yang aman untuk pecahan kaca.
- i. Plastik harus digunakan sebagai pengganti kaca.
- j. Spesimen harus diterima dalam kondisi aman.
- k. Spesimen harus dibongkar dengan hati-hati dan memperhatikan kemungkinan kerusakan dan kebocoran.
- l. Sarung tangan harus dikenakan untuk membongkar spesimen.
- m. Bangku Kerja harus tetap bersih dan rapi.
- n. Desinfektan yang sesuai harus digunakan secara benar.

Latihan

Setelah Anda membaca dengan seksama tentang bagaimana Anda dapat bekerja dengan selamat dan aman, maka perlu diperhatikan mulai dari diri sendiri hingga lingkungan yang memungkinkan terjadinya kecelakaan kerja. Untuk memperkuat pengetahuan Anda, aplikasikan teori ini dengan mengerjakan soal-soal latihan berikut ini. Isilah formulir di bawah ini dari dengan hasil analisis Anda terhadap kegiatan-kegiatan atau bahan-bahan pendukung yang ada di laboratorium Anda. Analisis dapat berupa analisis resiko hingga pencegahan. Adapun form analisisnya adalah sebagai berikut.

Tabel 2.1. Analisa Resiko Laboratorium Patologi Anatomi

NO	Nama Reagen/ instrumen	Resiko Bahaya			Resiko Toksik			Resiko Terbakar			Resiko Karsinogen			Penanganan
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														

Petunjuk pengerjaan

- 1) Tuliskan 10 bahan kimia atau instrumen non kimiawi yang ada di lingkungan Anda
- 2) Ceklis di kolom resiko bahaya, toksik terbakar dan karsinogen di salah satu kolom (1, 2 atau 3). Jika tidak berbahaya maka ceklis di kolom 1, agak berbahaya di kolom 2 dan berbahaya di kolom 3.
- 3) Setelah mendapatkan tingkat bahaya, tuliskan bagaimana penanganan dalam menghindari tingkat resiko
- 4) Diskusikan sesama rekan dengan menggunakan fasilitas yang ada dan juga tutor, pengajar atau staf ahli di sana.

Ringkasan

Setiap laboratorium kesehatan, tentu ada fasilitas yang berfungsi untuk penanganan suatu spesimen yang didapat dari pasien. Spesimen yang didapat bisa saja memiliki tingkat resiko baik langsung maupun tidak langsung. Hal serupa ketika spesimen itu diolah untuk dapat dijadikan dasar diagnostik pasti suatu penyakit pasien, tentu ada instrumentasi, bahan pelengkap (kimia atau fisik) dan metode-metode yang memungkinkan terjadinya kecelakaan kerja. Untuk dapat menghindari dari segala kecelakaan kerja, seorang teknisi staf laboratorium mulai dari admin hingga level tertinggi wajib mengetahui resiko kecelakaan. Untuk mengetahui resiko kecelakaan itu maka setiap orang yang terhubung dengan laboratorium wajib mengetahui bagaimana cara mengidentifikasi dan megevaluasi faktor resiko. Setelah mengetahui faktor resiko maka perlu perencanaan untuk meminimalkan bahkan menghilangkan faktor resiko tersebut. Perencanaan tidak akan terlihat baik jika tidak diikuti dengan penerapannya. Maka dari itu terapkan apa yang ditulis dan tulis apa yang telah akan kemungkinan yang akan terjadi serta antisipasi penanggulangannya.

Tes 1

Kerjakan soal-soal berikut ini dengan melingkari atau memberi tanda silang pada A, B, C, D, atau E yang merupakan jawaban yang tepat.

- 1) Berikut ini tahapan yang benar tentang pelaksanaan K3.
 - A. Identifikasi – rencana – penerapan – evaluasi - identifikasi
 - B. Identifikasi – evaluasi – perencanaan – penerapan – evaluasi
 - C. Evaluasi – identifikasi - penerapan – evaluasi – identifikasi
 - D. Perencanaan - penerapan – evaluasi – identifikasi
 - E. Evaluasi – identifikasi - evaluasi – penerapan

- 2) Yang bukan bagian dari sanitasi yang baik bagi staf laboratorium adalah ?
 - A. Ruangan harus dipertahankan dalam kondisi bersih, tertib dan sanitasi yang baik.
 - B. Ruangan untuk membersihkan diri dan toilet (WC) serta fasilitas cuci harus disediakan untuk laki-laki dan perempuan tanpa harus dipisahkan.
 - C. Air panas dan dingin, sabun dan handuk harus tersedia.
 - D. Ruang ganti untuk laki-laki dan perempuan harus terpisah.
 - E. Harus ada akomodasi (misalnya loker) yang digunakan secara individual untuk pakaian bebasada akomodasi (misalnya loker) yang digunakan secara individual untuk pakaian bebas

- 3) Berikut ini yang bukan kelayakan bagi laboratorium:
 - A. Tempat umum harus rapi dan bebas dari penghalang.
 - B. Bangunan harus bersih.
 - C. Ada tidak boleh ada cacat struktural di lantai, tangga, dinding dan atap.
 - D. Lantai dan tangga harus seragam dan tahan slip.
 - E. Harus ada pegangan tangan pada sisi tangga

- 4) Berikut ini yang bukan bagian dari pencegahan Kebakaran adalah
 - A. Semua pintu keluar tidak boleh terhalang dan atau terkunci ketika sedang dalam kondisi bekerja.
 - B. Sistem deteksi kebakaran harus dalam keadaan baik dan dilakukan pengujian secara teratur.
 - C. Pintu-pintu darurat harus dalam keadaan baik.
 - D. Semua pintu keluar harus selalu terbuka.
 - E. Semua pintu keluar harus ditandai dengan penanda khusus dan dapat berpedar ketika gelap.

- 5) Berikut ini yang bukan bagian dari Alat Pelindung Diri adalah ?
 - A. Pakaian pelindung harus desain sesuai dengan ukuran masing-masing pekerja misalnya jas lab, baju, celemek, sarung tangan dan lain-lain
 - B. Kacamata keselamatan, goggles dan masker pelindung harus disediakan.

✂ ■ Sitohistoteknologi ✂ ■

- C. Harus tersedia tempat pencuci mata.
- D. Harus ada kamar mandi darurat.
- E. Respirator tidak mesti harus tersedia, rutin dibersihkan, didesinfeksi, diperiksa dan disimpan dalam kondisi bersih dan sanitasi yang terjaga.

Topik 2

Limbah Laboratorium Patologi Anatomi

A. PENGOLAHAN LIMBAH

Seperti yang telah kita ketahui, bahwa laboratorium patologi anatomi merupakan salah satu bagian dari fasilitas kesehatan guna mendukung tenaga kesehatan untuk menentukan diagnostik pasti dari suatu penyakit seperti kanker. Fasilitas perawatan kesehatan dibangun guna mencegah dan mengobati penyakit, sayangnya dibalik itu fasilitas itu, instansi ini merupakan kontributor penghasil limbah lingkungan. Limbah lingkungan yang dikeluarkan oleh laboratorium ini pada umumnya adalah bahan kimia. Limbah patologis adalah jenis yang sangat umum yang berasal dari limbah yang dihasilkan oleh berbagai fasilitas kesehatan dan penelitian serta pengujian instrumen yang ada di fasilitas kesehatan. Limbah laboratorium patologi anatomi dapat berasal dari tubuh manusia ataupun hewan. Limbah yang berasal dari laboratorium patologi anatomi masuk ke dalam subkategori dari limbah biohazardous. Sumber limbah biasanya berasal dari pembedahan atau penelitian yang melibatkan pengambilan organ, jaringan atau bagian tubuh lainnya serta bahan-bahan pengolahan pembuatan sediaan histologik maupun sitologi.

Tiga reagen dengan volume tertinggi yang dibuang oleh laboratorium patologi anatomi adalah formalin, alkohol dan larutan pembenihan (xilol). Ketiga bahan kimia itu dapat pula dilakukan daur ulang, namun tetap menghasilkan dampak lain ke lingkungan. Pada dasarnya formalin dapat diganti dengan fiksatif berbasis glyoxal yang efektif yang dapat dibuang dimana saja karena biodegradabilitasnya yang tinggi dan toksisitas air yang rendah, namun kembali lagi bahwa mekanisme tersebut membutuhkan biaya yang tinggi. Pembuangan inilah yang biasa kita sebut dengan limbah patologis.

Pilihan untuk pembuangan limbah bahan kimia berbahaya sangat bergantung pada peraturan nasional dan lokal, namun rekomendasi berikut harus berlaku di manapun. Pertama, simpanlah aliran limbah yang terpisah; Jangan mencampur bahan kimia yang berbeda bersama kecuali disuruh melakukannya oleh petugas limbah yang memenuhi syarat. Kedua, mengetahui bahaya dari limbah. Apakah mudah terbakar? Larut air? Racun? Masing-masing faktor ini mempengaruhi pilihan metode pembuangan. Pilihan terbaik untuk pembuangan adalah menuangkan limbah ke saluran pembuangan sanitasi, dari situ bisa dilakukan pengolahan terlebih dahulu sebelum memasuki lingkungan. Limbah seperti itu, bagaimanapun, tidak boleh membahayakan proses biologis yang dilakukan oleh fasilitas pengolahan limbah; Juga tidak harus melewati sistem yang tidak diolah. Contoh yang pertama adalah formaldehid dengan kekuatannya dan kuantitas yang cukup untuk membunuh bakteri pada proses pengolahan.

Bahan limbah berupa formaldehida mudah terurai secara hayati. Hampir semua organisme memiliki enzim, formaldehida dehidrogenase akan menguraikan zat kimia ini. Caranya adalah dengan mengalirkan ke dalam sistem pengolahan dengan aliran yang cukup

lambat sehingga akan diencerkan di bawah konsentrasi racun oleh aliran air yang normal. Jangan sekali-kali mencairkan bahan beracun sebelum menuangkannya ke saluran pembuangan, atau memasukkannya ke pembuangan dengan 'pembilasan menggunakan jumlah air yang berlebihan'. Tindakan ini akan meningkatkan volume yang melewati pengolahan dan akan memperpendek waktu tinggal dan dapat merusak biodegradasi.

Bekerjalah dengan otoritas pengolahan air limbah di lingkungan Anda, beritahu mereka tentang sifat limbah (komposisi kimia dan karakteristik berbahaya), dan tawarkan lembaran data keselamatan bahan buangan. Usulkan rencana pembuangan yang meliputi volume limbah, jangka waktu pembuangannya, dan frekuensi pembuangan. Misalnya, Anda mungkin ingin membuang sejumlah besar formalin limbah yang mengandung formaldehida 3,7% atau 37.000 ppm selama periode 1 jam setiap hari kerja. Hal ini bisa dilakukan dengan bak pembuangan yang dilengkapi dengan pengaturan keran yang disesuaikan sehingga butuh waktu tertentu untuk menjadi kosong. Tidak akan ada resiko ketika buangan formalin dialirkan dengan laju aliran 2 ml / detik. Jangan membuang sejumlah besar sampah sekaligus karena tidak baik. Hal ini dikarenakan sampah tersebut cenderung melakukan perjalanan dengan lambat dan mungkin gagal untuk diencerkan di pengolahan limbah.

Beberapa limbah dapat dianggap diterima untuk pembuangan. Asam dan basa dapat dinetralkan dan formalin dapat didetoksifikasi dengan produk komersial. Pastikan proses pretreatment aman, efektif dan dapat diterima. Jangan pernah mencoba mendetoksifikasi formalin dengan mencampur dengan pemutih (sodium hipoklorit) atau amonia. Kedua reaksi bersifat eksotermik dan dengan cepat bisa lepas kendali, menghasilkan uap dan cairan panas ke seluruh laboratorium. Ketahuilah dengan pasti produk reaksinya, dan pastikan kadar toksisitasnya hingga konsentrasi yang sangat rendah. Pelarut yang tidak larut dalam air tidak pernah dialirkan satu kali, bahkan jika larutan tersebut mudah terbiodegradasi. Jika bahan kimia mudah terbakar dengan nilai kalori yang cukup tinggi, bahan kimia tersebut mungkin harus dicampur terlebih dahulu dengan bahan bakar dalam sistem pembakaran. Kandidat yang baik untuk pilihan ini adalah agen pembeningan kecuali kloroform pelarut halogen, trikloroetana dan turunannya. Perhatikan bahwa bahan kimia yang memiliki metode ini tidak boleh membakar limbahnya dalam insinerator. Perbedaannya memang sangatlah tipis tapi penting untuk diperhatikan. Insinerator ada untuk tujuan menghancurkan limbah.

Jika Anda tidak bisa membuang limbah dengan pembuangan atau pembakaran, Anda harus menggunakan pihak ketiga. Di beberapa negara, bertanggung jawab atas limbah yang diambil orang lain dan seharusnya ditangani dengan benar, sehingga siapapun pihak ketiga tersebut, Anda tetap bertanggung jawab atas hasil buangan limbah yang sebelum diolah maupun yang sudah di olah. Jika Anda menghasilkan limbah yang harus dikeluarkan dari tempat dan dilakukan penguburan atau insinerasi, Anda harus melakukan segala kemungkinan untuk menghilangkan zat kimia itu dari laobratorium Anda. Pengolahan limbah harus diperhatikan dari perspektif finansial, kesehatan, dan lingkungan.

B. TIP PENGURANGAN LIMBAH

Berikut ini adalah tabel untuk membantu Anda dalam mengidentifikasi atau mengganti bahkan menghilangkan bahan kimia yang berbahaya. Hal ini yang akan menjadikan panduan bagi Anda untuk berinovasi mencari bahan-bahan pengganti.

Tabel 2.2. Tip Meminimalkan Penggunaan Bahan Kimia

Bahan Kimia	Penggunaan	Tip Pengurangan Atau penghilangan
Aseton	Pelarut	<ul style="list-style-type: none"> - Lakukan pengetesan dengan melarutkannya dengan volume serendah mungkin dan diujikan dengan spesimen seminimal mungkin - Pastikan bahwa limbah aseton yang dikelola sebagai limbah kimia berbahaya. Aseton tidak perlu untuk sialiri air terus menerus
Khloroform	<ul style="list-style-type: none"> - Pembiusan hewan uji - Pelarut ekstraksi 	<ul style="list-style-type: none"> - Gunakan larutan alternatif atau metode alternatif - Bahan kimia berbahaya, pastikan manajemen pembuangan limbah
Formalin dan Metanol	Larutan fiksasi	<ul style="list-style-type: none"> - Gunakan untuk beberapa pemakaian - Mencari pengganti lain - Gunakan wadah yang kecil bagian mulutnya (jerigen untuk penyimpanan) - Gunakan seminimal mungkin - Bahan kimia berbahaya dalam pengolahan limbah

		<ul style="list-style-type: none"> - Cek pihak pengolah atau pihak ketiga dalam pengolahannya
Xilol	Pelarut	<ul style="list-style-type: none"> - Usahakan cari bahan penggantinya - Gunakan Xilol berulang-ulang atau kembali dimurnikan - Pastikan pengolahannya masuk ke dalam limbah berbahaya

Tips Lain Untuk Pengurangan Kimia Berbahaya Di Laboratorium

1. Larutan Pewarna
Larutan pewarna biasanya banyak mengandung alkohol sebagai pelarutnya. Beberapa, seperti diaminobenzidin (DAB) dan bahan karsinogen lainnya cukup dikenal di laboratorium Patologi Anatomi. Bahan pewarna harus diatur dalam penggunaan dan pengolahan limbahnya. Pewarna ini harus dikategorikan ke dalam limbah berbahaya.
2. Teknik Pewarnaan
Gunakan metode tes jika diperlukan, karena akan mengurangi jumlah limbah pewarna. Namun pastikan kembali untuk membuang kelebihan bahan pewarna harus memiliki tempat penampungan.
3. Bahan kimia pastikan telah dilabel dengan kode tertentu, tepat penyimpanan dan pembuangan.
4. Gunakan bahan disinfektan dengan benar dan tepat. Hal ini dikarenakan tidak semua bahan disinfektak baik untuk semua kasus.
5. Kurangi bahan-bahan yang menghasilkan aerosol. Kebanyakan bahan yang menghasilkan aerosol mudah terbakar. Gunakan semprotan yang jauh lebih mudah, lebih aman dan lebih murah. Gunakan botol pompa semprot isi ulang.

Latihan

Setelah Anda selesai melanjutkan dari topik 1 ke topik 2, silakan Anda kembali mengerjakan latihan untuk memantapkan kembali penerapan Anda di materi ini. Isilah tabel berikut ini sesuai dengan yang ada di tempat kerja Anda.

Tabel Penerapan Alur Pembuangan Limbah

No	Nama Bahan Kimia/Instrumen	Metode Pembuangan	Media Pembuangan
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Petunjuk pengerjaan

- 1) Tuliskan 15 bahan kimia atau instrumen non kimiawi yang ada di lingkungan Anda
- 2) Tuliskan metode pembuangannya. Langsung jika Anda mengeluarkannya langsung ke luar dari laboratorium dan isikan pasangannya dengan alur pembuangan. Contoh : formalin --> langsung --> wastafel dan seterusnya
- 3) Diskusikan sesama rekan, tutor, pengajar atau staf ahli di sana apakah akhir dari pembuangan telah diolah dengan teknik yang sesuai atau tidak.

Ringkasan

Laboratorium pengolahan spesimen yang berasal dari pasien tentu dapat bersifat membahayakan. Spesimen yang datang dan diolah menggunakan bahan kimia atau instrumen tentu akan menghasilkan limbah tersendiri baik infeksius, karsinogen hingga toksisitas yang tinggi. Limbah tersebut dapat tersimpan sementara atau langsung dikeluarkan dari laboratorium. Ketika pengolahan limbah tidak baik, maka dampaknya akan mengenai pekerja di laboratorium itu bahkan ke lingkungan sekitar. Oleh karena itu pengolahan limbah sangatlah penting dipahami mulai dari sumber yang mengolah bakal limbah hingga yang akan mengolah limbah menjadi bahan yang siap dikeluarkan ke lingkungan dalam kondisi yang tidak merusak. Limbah yang telah dikeluarkanpun harus tetap dikontrol oleh penghasil limbah karena itu menjadi tanggung jawab utuk dari hulu ke hilir. Salah satu upaya mengurangi limbah adalah dengan mengurangi volume pemakaian hingga mencari substitusi yang sebanding dengan materi tersebut.

Tes 2

- 1) Kecepatan alir optimum suatu limbah formalin agar tidak menimbulkan masalah adalah ...
 - A. 1 ml/detik
 - B. 2 ml/detik
 - C. 3 ml/detik
 - D. 5 ml/detik
 - E. 10 ml/detik

- 2) Berikut ini yang bukan langkah mengurangi limbah adalah
 - A. mengurangi volume
 - B. mencari pengganti
 - C. alirkan dengan cepat
 - D. kurangi penggunaan wadah
 - E. menggunakan diinfektan

- 3) Reagen yang relatif lebih aman dibuang di lingkungan adalah
 - A. formalin
 - B. formaldehid
 - C. xilol
 - D. zat Warna
 - E. alkohol

- 4) Senyawa yang mudah terurai adalah
 - A. biodegradasi
 - B. biopori
 - C. biopartikel
 - D. karsinogen
 - E. biokatalisator

- 5) Formalin yang dibuang ke lingkungan sebaiknya
 - A. bebas tidak teratur
 - B. slambat di alirkan
 - C. sangat cepat dialirkan
 - D. tidak boleh dibuang
 - E. diatur kecepatan penguapan dan penguraian

Kunci Jawaban Tes

Tes 1.

1. B. Identifikasi – evaluasi – perencanaan – penerapan – evaluasi
2. B. Ruang untuk membersihkan diri dan toilet (WC) serta fasilitas cuci harus disediakan untuk laki-laki dan perempuan tanpa harus dipisahkan
3. E. Harus ada pegangan tangan pada sisi tangga
4. D. Semua pintu keluar harus selalu terbuka
5. E. Respirator tidak mesti harus tersedia, rutin dibersihkan, didesinfeksi, diperiksa dan disimpan dalam kondisi bersih dan sanitasi yang terjaga

Tes 2.

1. B
2. C
3. E
4. A
5. E

Daftar Pustaka

Bancroft, J.D. Gamble, M, (2013). Teory and practice of histological technique, Philadelphia: Elseiver

Carson, F.L., Hadik, C., 2009, Histotechnology: A self-instructional text. 3rd Edition. Hongkong: American Society for Clinical Pathology Press.

Health Information and Quality Authority. (2011). General practice messaging standard version 2.0 (GMPS 2.0).

Leeftink, A.G. (2014). From rapid diagnostics to a rapid diagnosis, UMC Utrecht histopathology laboratory.

Wiener HG, Klinkhamer P, Schenck U, et al. (2007). *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for cytology laboratories*. *Cytopathology*; 18:67–78

BAB III

MIKROSKOPTEKNIK PENGGUNAAN DAN PERAWATAN

Dewi Inderiati, S.Si., M.Biomed.

PENDAHULUAN



(Sumber :<https://www.thinglink.com>)

Saat ini, telah banyak dikembangkan pemeriksaan jaringan dan cairan tubuh untuk menilai kondisi kesehatan seseorang. Bahkan beberapa penyakit sangat memerlukan penegakkan diagnosis melalui pengamatan pada bagian sel, jaringan atau organ tertentu secara langsung. Untuk mengamati komponen sel atau jaringan sering kali tidak cukup dilakukan dengan kasat mata begitu saja, diperlukan suatu instrument khusus yang dapat mendukung proses pengamatan tersebut, mengingat komponen yang diamati memiliki ukuran yang sangat kecil (μm). salah satu instrument yang digunakan untuk melakukan pengamatan tersebut adalah mikroskop.

Mikroskop merupakan alat yang sangat penting di laboratorium histologi, terutama berhubungan dengan kontrol kualitas sediaan. Sediaan yang diproses di laboratorium diperiksa secara mikroskopis sebagai pemeriksaan rutin standar. Sediaan tersebut diperiksa untuk memantau kualitas pematangan jaringan, pembedahan, dan pewarnaan rutin maupun khusus. Mikroskop juga digunakan untuk mempelajari karakteristik histologi potongan jaringan dan mengenali perbedaan jenis jaringan.

Dari hal diatas dapat diketahui bahwa menjadi penting untuk mempelajari teknik penggunaan mikroskop yang benar dan baik. Teknik penggunaan yang salah dapat menyebabkan beberapa bagian preparat yang seolah hilang atau tidak teramati dengan baik. Teknik yang salah juga dapat menyebabkan pecahnya preparat, padahal pembuatan preparat mikroskopis memerlukan serangkaian proses pengolahan yang kompleks dan memakan waktu. Pada beberapa sediaan proses tersebut bahkan tidak dapat diulang kembali, seperti pembuatan sediaan potong beku.

Setelah mempelajari bab ini Anda diharapkan dapat :

1. Mengetahui jenis-jenis mikroskop
2. Menjelaskan bagian dan fungsi mikroskop
3. Menjelaskan prosedur penggunaan mikroskop
4. Menerapkan teknik perawatan mikroskop

🔪 ■ Sitohistoteknologi 🔪 ■

Kemampuan dalam menggunakan, merawat dan mengetahui teknik dasar memperbaiki mikroskop sangatlah penting, mengingat pemeriksaan akhir dari kinerja teknisi laboratorium patologi anatomi dilakukan secara mikroskopik.

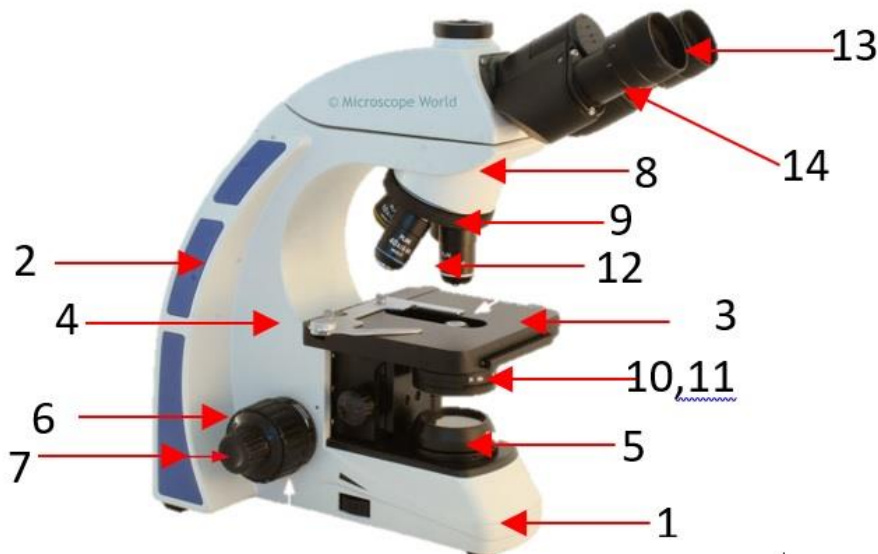
Topik 1 Jenis Mikroskop

Mikroskop merupakan penemuan yang berjasa dalam mengembangkan multidisiplin ilmu. Sejarah mikroskop dimulai dari penemuan lensa oleh Thonius Philips Van Leewenhoek (1632-1732) dan komponen mikroskop oleh Robert Hooke (1635–1703) yang kemudian berkembang terus menerus hingga kini ditemukan berbagai jenis mikroskop dengan kegunaanya masing-masing. Pada topik ini akan dibahas beberapa jenis mikroskop diantaranya ialah mikroskop cahaya, mikroskop flourosen, dan mikroskop digital. Disertakan pula cara perawatan mikroskop.

A. MIKROSKOP CAHAYA

Mikroskop yang umum digunakan di kalangan adalah mikroskop cahaya, baik cahaya yang berasal dari sinar matahari atau lampu listrik yang ditempatkan pada badan mikroskop tersebut sebagai sumber cahaya. Jenis ini tergolong sederhana dengan lensa okuler/lensa pengamat tunggal (**mikroskop monokuler**) maupun yang memiliki lensa okuler ganda (**mikroskop binokuler**). Mikroskop jenis ini hanya dapat memberikan bayangan objek yang bersifat dua dimensi, yakni hanya tampak panjang dan lebarnya saja. Oleh karenanya, perlu diperhatikan bahwa objek yang akan diamati harus berukuran kecil dan tipis, agar dapat ditembus oleh cahaya.

Mikroskop terdiri dari bebrapa bagian penyusunnya. Terdiri dari bagian mekanik yang ditunjukkan pada nomor 1-9 dan bagian optik yang ditunjukkan pada nomor 10-12. Bagian-bagian dan fungsi setiap bagian tersebut dapat terlihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 3.1. Mikroskop cahaya

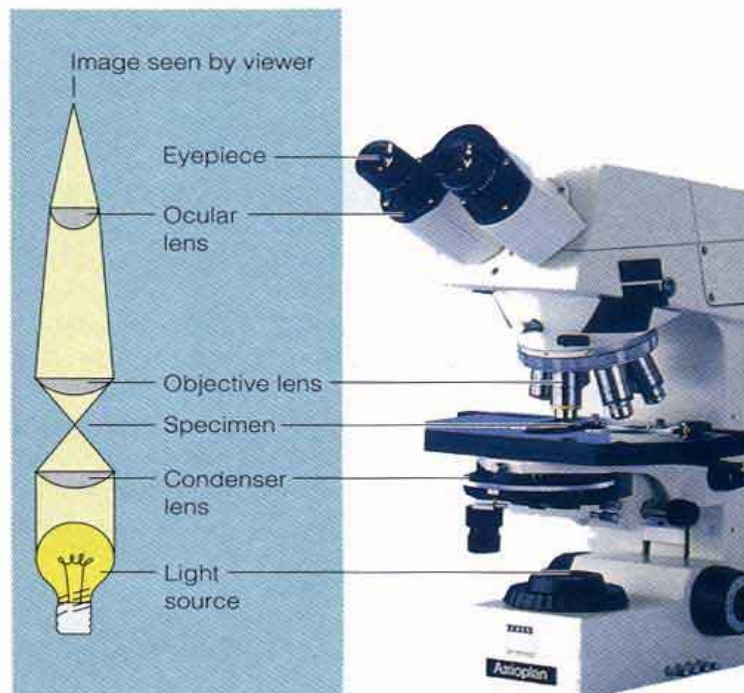
(Sumber : <http://blog.microscopeworld.com/2015/05/how-does-light-microscope-work.html>)

Keterangan :

1. Kaki mikroskop, berfungsi sebagai penopang mikroskop sehingga berdiri tegak
2. Lengan mikroskop, berfungsi sebagai pegangan mikroskop.
3. Meja sediaan, berfungsi sebagai tempat meletakkan sediaan yang akan diamai, dilengkapi dengan lubang tempat keluarnya cahaya yang akan melewati sediaan dan lensa.
4. Penjepit sediaan, berfungsi untuk memastikan sediaan pada posisi stabil dan memudahkan pergerakan sediaan.
5. Cermin (cekung/datar) atau lampu, berfungsi untuk memantulkan cahaya. Bila cahaya cukup digunakan cermin datar, jika cahaya kurang memadai digunakan cermin cekung. Namun saat ini telah banyak digunakan lampu listrik sebagai pengganti sumber cahaya.
6. Makrometer, berfungsi sebagai pengatur fokus kasar.
7. Mikrometer, berfungsi sebagai pengatur fokus halus.
8. Tabung mikroskop, berfungsi sebagai penghubung antara lensa okuler, lensa objektif dan cahaya yang masuk.
9. Resolver, sebagai tempat melekatnya lensa objektif.
10. Kondensor, berfungsi memfokuskan sinar yang masuk dan melewati sediaan yang diamati
11. Diafragma, berfungsi mengatur banyaknya cahaya yang akan masuk dan melewati sediaan.
12. Lensa objektif, berfungsi untuk memperbesar dan memperjelas resolusi bayangan sediaan. Terdapat dalam beberapa jenis dan ukuran perbesaran; lensa *scanning* (2,5x - 4x), lensa perbesaran menengah (10x, 20x), lensa perbesaran tinggi (40x, 45x), dan lensa yang menggunakan oli imersi (90x, 100x).
13. Lensa okuler, merupakan bagian yang dekat dengan mata yang berfungsi untuk memperbesar bayangan sediaan. Terdapat dalam ukuran perbesaran 5x, 10x, dan 15x
14. Dioptering, bagian yang berfungsi untuk mengatur kekuatan lensa agar dapat menyesuaikan kondisi mata kiri dengan mata kanan.

Prinsip kerja dari mikroskop ini adalah, cermin atau sumber cahaya akan masuk ke melalui diafragma dan kondensor. Diafragma akan mengatur jumlah cahaya yang masuk, kemudian kondensor akan memfokuskan cahaya tersebut untuk masuk dan melewati sediaan. Cahaya tersebut kemudian akan diteruskan melewati lensa objektif. Lensa objektif akan mengoreksi cahaya yang masuk, memperbesar bayangan dan memfokuskan bayangan. Proses memfokuskan bayangan ini dibantu dengan memutar makrometer dan mikrometer. Kemudian bayangan tersebut akan diperbesar kembali oleh lensa okuler, sehingga diperoleh bayangan dari sediaan yang berukuran lebih besar. Perbesaran pada mikroskop diperoleh dari hasil perkalian antara ukuran perbesaran lensa objektif dan lensa okuler, contohnya jika perbesaran lensa objektif adalah 40x dan lensa okuler 10x maka diperoleh hasil perbesaran 400x.

Lensa pada mikroskop berfungsi untuk mengoreksi pecahan cahaya yang masuk. Ketika cahaya putih melewati lensa, cahaya tersebut akan terbagi menjadi warna spectrum cahaya yang dapat terlihat (biru dan merah) atau disebut sebagai aberasi kromatis. Warna-warna tersebut membelok pada sudut yang berbeda dan akan memberikan titik fokus yang berbeda pula, sehingga akan menghasilkan bayangan yang tidak fokus dan dikelilingi banyak warna. Lensa objektif kemudian akan memperbaiki aberasi kromatis, kemudian lensa okuler akan memperbesar bayangan sehingga dapat dihasilkan bayangan dengan kualitas yang baik.



Gambar 3.2. Bagan prinsip kerja mikroskop cahaya
(Sumber : Campbell et al., 1999)

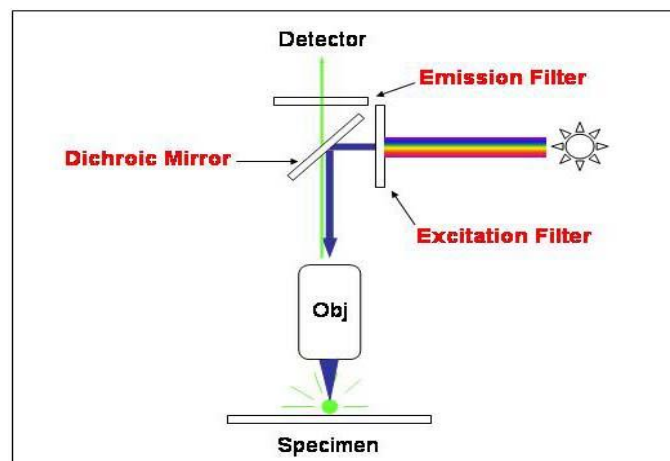
Beberapa hal yang perlu diperhatikan saat menggunakan mikroskop antara lain:

1. Pastikan kondensor berada di tengah dan pada posisi yang tepat.
2. Pastikan lensa objektif telah berada pada posisi yang benar dan lensa okuler telah dipasang sesuai dengan perbesaran yang diinginkan.
3. Pastikan bagian optik dalam keadaan bersih, bebas lemak dan debu.
4. Sesuaikan jumlah cahaya yang masuk dengan mengatur diafragma dan kondensor.
5. Pastikan memberihkan lensa yang telah terkena oli imersi dengan tissue lensa.
6. Sebelum mengganti sediaan, pastikan menurunkan meja mikroskop terlebih dahulu untuk meminimalisir kerusakan pada lensa dan sediaan.

B. MIKROSKOP FLOUROSEN

Fluorosensi merupakan bagia dari suatu substansi yang ketika diterangi dnegan cahaya pada panjang gelombang tertentu akan memancarkan kembali cahaya pada panjang gelombang yang lebih panjang. Pada mikroskop fluoresen, substansi tersebut ditembak dengan sinar dengan panjang gelombang pendek seperti sinar ultraviolet (UV), violet, *blue range* atau sinar tampak yang telah diemisikan.

Lampu merkuri atau halogen biasanya digunakan sebagai sumber cahaya untuk pemeriksaan ini. Semua panjang gelombang dari sinar yang dipancarkan sumber cahaya akan melewati filter penyerap panas menuju filter kedua yang akan membuang sinar merah, kemudian cahaya melewati celah filter yang hanya membiarkan sinar dengan panjang gelombang yang tertentu yang melewatinya. Saat melewati spesimen lensa objektif akan mengumpulkan sinar yang tereksitasi dan panjang gelombang fluoresen. Filter pelindung diletakan antara lensa okuler untuk menyerap semua sinar UV dan membiarkan sinar tampak diteruskan. Filter pelindung ini melindungi mata dari efek kerusakan sinar UV dan mengurangi fluoresensi yang tidak spesifik, sehingga objek yang berfluorosensi akan terlihat sebagai objek yang bercahaya diatas latar belakang yang gelap.



Gambar 3.3. Bagian optic mikroskop fluorosensi dan alur sinar untuk memeruskan fluoresensi.

(Sumber : <https://serc.carleton.edu>)

Fluorosensi yang berasal dari substansi itu sendiri disebut sebagai fluoresensi primer, seperti halnya pada vitamin A, porpirin, dan klorofil. Zat warna, senyawa kimia dan antibiotik yang ditambahkan ke dalam substansi akan menghasilkan fluoresensi sekunder pada stuktur dan disebut fluorokrom. Hal ini sering digunakan pada mikroskop fluorsen dan fluorokrom ini akan dihasilkan hanya dengan pemancaran sinar biru. Sinar yang diteruskan ini lah yang kemudian akan diamati. Penggunaan mikkroskop fluoresens ini juga dapat digunakan untuk pemeriksaan kuantiatif dan kualitatif.

C. MIKROSKOP DIGITAL

Mikroskop digital merupakan gabungan mikroskop dengan kamera digital. Kamera digital berfungsi sebagai detector. Gambar yang teramati akan ditampilkan pada layar atau monitor, sehingga pengamatan dapat dilakukan pada komputer. Penggunaan mikroskop digital ini mempermudah proses pengamatan dan proses pengolahan citra digital untuk mengamati berbagai jaringan dengan berbagai jenis pewarnaan.

Untuk dapat mengoperasikan mikroskop ini diperlukan suatu perangkat lunak. Perangkat lunak ini akan membantu pengguna dalam banyak hal, seperti menampilkan dan menganalisis data 2D dan 3D dari jaringan, menyimpan semua detil gambar hasil pengamatan dengan berbagai parameter, serta dapat membuat laporan yang kompleks dari suatu pengamatan.

Beberapa mikroskop digital juga dilengkapi dengan fungsi pemutaran pada sudut tertentu. Fungsi ini memudahkan pemakainya untuk mengamati preparat dari berbagai sudut pandang dan juga dapat membantu pemeriksaan struktur kompleks. Selain itu mikroskop ini dilengkapi dengan fungsi perekam video. Dengan berbagai fitur ini dapat mempermudah dan mempercepat pengguna dalam mengamati suatu objek mikroskopis.



Gambar 3.4. Mikroskop digital
(Sumber : <http://bestmicroscopecentral.com>)

Latihan

Setelah Anda memperelajari secara teori prinsip dasar dari mikroskop, silahkan coba Anda kerjakan latihan berikut. Ambilah sebuah mikroskop dan sebuah sediaan di tempat Anda, kemudian amatilah sediaan dan isi tabel kegiatan 1 di bawah ini :

Tabel 3.1 Kegiatan Pembelajaran

No	Kegiatan	Hasil
1	<p>Amati sediaan dengan perbesaran berbeda. Tutup salah satu mata Anda secara bergantian dan amati secara seksama.</p> <p style="margin-left: 40px;">a. Mata Kanan terbuka dan mata kiri tertutup</p> <ul style="list-style-type: none"> - 4x - 10x - 40x - 100x <p style="margin-left: 40px;">b. Mata kiri terbuka dan mata kanan tertutup</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10x - 40x - 100x 	<ul style="list-style-type: none"> - Jelas / Tidak - Jelas / Tidak - Jelas / Tidak - Jelas / Tidak - Jelas / Tidak - Jelas / Tidak - Jelas / Tidak - Jelas / Tidak
2	<p>Kegiatan yang dilakukan jika ada jawaban yang berisi “tidak jelas”</p> <ul style="list-style-type: none"> - - - - 	<ul style="list-style-type: none">

Petunjuk Mengerjakan Latihan

Coret salah satu dari jawaban yang tersedia, jika gambar yang dihasilkan jelas maka coretlah kata “Tidak” disampingnya dan begitu juga sebaliknya. Kemudian tuliskan apa yang Anda lakukan hingga semua hasil pengamatan menjadi jelas. Jika Anda telah berusaha namun tetap ada jawaban yang masih “tidak jelas”, lanjutkan dengan membaca topik selanjutnya.

Ringkasan

Mikroskop merupakan salah satu alat optik yang digunakan untuk mengamati benda-benda mikroskopis. Mikroskop sangatlah penting dalam suatu kegiatan di laboratorium kesehatan khususnya patologi anatomi. Setiap mikroskop memiliki kelebihan dan kekurangan satu dengan lainnya. Salah satu kekurangan yang dimiliki antara mikroskop satu dengan yang lainnya adalah daya pisah yang berbeda-beda. Daya pisah ini merupakan kemampuan dalam membedakan dua titik yang berdekatan hingga dapat dibedakan satu dengan lainnya. Perbesaran akan menjadi hal yang sia-sia jika daya pisah dari mikroskop tersebut tidak baik.

Tes 1

Tuliskan bagian-bagian mikroskop yang digambarkan di bawah ini.



LEMBAR JAWABAN

- A.
- B.
- C.
- D.
- E.
- F.
- G.
- H.
- I.
- J.

Topik 2

Penggunaan Dan Pemeliharaan Mikroskop

A. PENGGUNAAN MIKROSKOP

Mikroskop merupakan instrumen optik canggih yang menjadi salah satu asset di dalam laboratorium. Penggunaan mikroskop yang benar sangatlah penting bagi seorang yang bergerak dibidang kesehatan. Hasil dari penggunaan mikroskop yang baik akan menghasilkan gambaran yang baik apakah itu kekontrasan, intensitas konsentrasi dalam sel hingga batas tegas dari bagian satu dengan bagian lainnya.

Berikut ini adalah cara penggunaan mikroskop yang benar.

1. Persiapan penggunaan mikroskop
 - a. Letakkan mikroskop pada permukaan yang stabil dan rata dan hindarkan dari sinar matahari secara langsung.
 - b. Pastikan penguat daya lampu mikroskop pada kondisi terendah
 - c. Pastikan sambungan sumber listrik terpasang dengan benar dan kuat
 - d. Hubungkan stop kontak dengan sumber tenaga listrik
 - e. Tekan tombol "ON"
2. Pengamatan menggunakan mikroskop
 - a. Atur kekuatan cahaya lampu dengan memutar pengatur intensitas cahaya sesuai dengan perbesaran, makin besar kekuatan lensa makin besar intensitas cahaya yang diberikan.
 - b. Tempatkan sediaan yang akan dilihat pada meja sediaan tepat di tengah lubang cahaya.
 - c. Putar Revolving lensa objektif pada perbesaran objektif 10x lalu putar.
 - d. Lihat dengan dua mata terbuka sambil memutar makrometer/pemutar kasar sehingga meja sediaan kearah atas.
 - e. Fokuskan dengan memutar micrometer.
 - f. Pembesaran mikroskop dapat diubah dengan cara memutar revolver lensa objektif (khusus untuk perubahan dari 10x ke 40x lensa objektif).
 - g. Jika lensa objektif di ubah maka focus diperjelaskan kembali dengan mengatur micrometer.
 - h. Khusus untuk perbesaran 10/100x, tambahkan minyak imersi dengan meneteskan di sediaan.
 - i. Untuk perbesaran 10x100 kali, tempelkan terlebih dahulu lensa objektif hingga menyentuh sediaan, kemudian turunkan meja sediaan dengan memutar micrometer.

3. Mengakhiri penggunaan mikroskop
 - a. Setelah mikroskop selesai digunakan bersihkan kembali lensa obyektif pembesaran 100x dengan kertas lensa yang dibasahi larutan pembersih setelah digunakan (gunakan xilol jika terpaksa).
 - b. Kecilkan intensitas sumber cahaya seminimal mungkin.
 - c. Putar revolver pada posisi perbesaran 4x ada ditengah-tengah.
 - d. Turunkan meja sediaan hingga batas paling bawah.
 - e. Matikan sumber cahaya dan cabut kabel *power* dari stop kontak.

B. PEMELIHARAAN MIKROSKOP

Mikroskop memerlukan perawatan berkala dan pembersihan untuk menjamin produksi kontras gambar yang tinggi. Perawatan dalam penggunaan mikroskop antara lain menjaga kualitas komponen optik, elektronik, dan mekanik. Ketika perawatan mikroskop diabaikan oleh paparan debu, serat, serbuk sari, dan kotoran, kegagalan untuk menghilangkan minyak imersi pada waktu yang tepat, atau karena suatu penempatan yang salah, kinerja optik dapat mengalami penurunan yang serius yang berdampak terhadap kerusakan yang berlanjut.

Setiap peralatan yang digunakan harus selalu berada dalam kondisi optimal ketika akan digunakan, untuk memperoleh hasil tersebut tentu saja diperlukan perlakuan dan perawatan khusus untuk menjamin kinerja instrumen tersebut, termasuk mikroskop. Oleh karenanya, menjadi penting untuk melakukan beberapa langkah perawatan dibawah ini sebagai bagian dari program pemantauan kualitas rutin setiap harinya.

Langkah-langkah perawatan mikroskop adalah sebagai berikut.

1. Simpan mikroskop dalam keadaan bersih dan tertutup jika tidak digunakan.
2. Jangan membuka lensa objektif.
3. Hindari menyentuh permukaan lensa.
4. Bersihkan lensa secara berkala menggunakan tissue lensa. Hindari penggunaan tissue jenis lain, karena dapat menggores lensa.
5. Segera bersihkan sisa minyak imersi setelah digunakan.
6. Saat menggunakan minyak imersi, pastikan tidak menyeret lensa objektif yg kering kedalam minyak imersi.
7. Kurangi cahaya menjadi minimum, atau matikan lampu jika tidak mikroskop digunakan.
8. Pastikan tidak ada sediaan yang tertinggal di meja mikroskop jika mikroskop tidak digunakan.
9. Gerakan meja mikroskop ke arah atas saat mencari focus, jangan ke arah bawah. Terutama saat menggunakan lensa dengan perbesaran tinggi.
10. Penggunakn xylol hanya sebagai pilihan terakhir, gunakan dalam jumlah yang sedikit mungkin dan segera bersihkan setelah diaplikasikan.

1. TROUBLESHOOTING MIKROSKOP

Pada saat penggunaan mikroskop seing kali ditemukan berbagai permasalahan yang mengganggu proses pemeriksaan mikroskopis. Oleh karenanya menjadi penting untuk mengetahui beberapa permasalahan dan cara mengatasi permasalahan yang berkaitan dengan mikroskop dan penggunaannya. Tabel berikut menyajikan beberapa masalah terkait penggunaan mikroskop dan cara mengatasinya

Tabel 3.2 Masalah Penggunaan Mikroskop dan Solusinya

Kesulitan	Sebab	Memperbaiki
Tidak ada cahaya	Tidak tersambung dengan sumber listrik	Hubungkan dengan arus listrik
	Lampu mati	Ganti dengan lampu baru
Lampu berkedip	Lampu tidak terpasang dengan benar pada soket	Atur ulang posisi bohlam pastikan tertanam dengan benar pada soket
	Lampu sudah habis maka gunanya	Ganti dengan lampu baru
Bohlam menyala, tapi gambar tidak bisa dilihat atau gelap	Diafragma masih tertutup, atau tidak terbuka sempurna sesuai kebutuhan	Buka diafragma dan atur cahaya yang masuk
	Objektif tidak sesuai untuk spesimen yang digunakan	Putar objektif ke perbesaran yang sesuai
Gambar tidak focus pada preparat yang diamati dengan minyak imersi	Terdapat sisa minyak imersi pada lensa objektif	Bersihkan dengan tisu lensa sampai bersih
	Preparat terbalik	Bersihkan preparat dan pasang kembali pada posisi yang benar
Gambar tidak jelas, buram atau kontras tidak mencukupi.	Objektif atau okuler kotor, atau berlemak	Usap dengan tissue lensa hingga bersih
	Oli imersi terkontaminasi terlihat dengan botol yang berawan	Ganti oli imersi dengan yang baru
	Tidak menggunakan minyak imersi pada perbesaran 100x	Gunakan minyak imersi
	Lubang Kondensor terlalu lebar atau terlalu sempit	Atur ulang lebar lubang kondensor
Gambar sebagian tersamar atau tidak rata diterangi.	Tujuannya tidak dimasukkan ke jalur cahaya dengan benar.	Putar nosepiece bergulir Sampai klik.
	Objektif tidak diputar ke jalur cahaya dengan benar.	Putar kubus ke jalur cahaya dengan benar.

Terdapat partikel pengotor pada lapang pandang	Terdapat pengotor pada lensa okuler, lensa objektif, kondensor, atau preparat	Bersihkan bagian yang terdapat pengotor hingga bersih
Ada dua bagian terpisah atau tampak buram	Skala dioptering tidak sesuai	Atur ulang skala dioptering
Mata lelah	Pengaturan diopter kanan dan kiri tidak sesuai	Atur ulang focus diopter

2. ERGONOMI PEMAKAIN MIKROSKOP

Disamping penggunaan dan perawatan dari mikroskop, perlu kiranya Anda dapat memposisikan tubuh Anda secara ergonomis. Hal ini dikarenakan kerusakan tubuh seseorang dapat disebabkan karena posisi yang tidak baik dalam bekerja khususnya penggunaan mikroskop.

Studi kedokteran kerja menunjukkan bahwa tempat kerja dengan instrumen optik secara khusus akan membutuhkan tulang belakang, tangan dan mata. Mikroskop akan membuat ketegangan pada otot mata jauh lebih tinggi pada penggunaan layar komputer. Hal ini menjadi hal yang banyak perhatiannya dari publik. Kombinasi duduk dalam penggunaan mikroskop dalam posisi tetap dan gerakan tangan berulang-ulang membawa risiko otot leher dan bagian tubuh atas lebih berat kinerjanya. Beberapa aspek yang diperhatikan untuk menunjang ergonomi yang baik ialah penataan kursi, meja, dan postur saat menggunakan mikroskop.

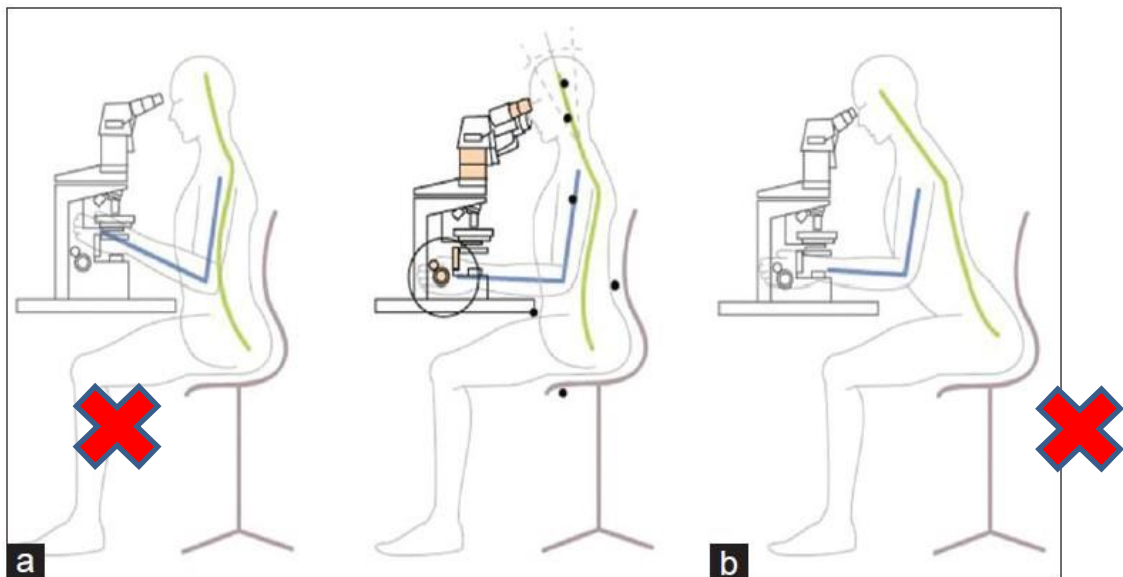
Kursi yang dirancang dengan baik dan disesuaikan dengan tepat merupakan elemen penting dari area kerja yang aman dan produktif. Kursi yang baik memberikan dukungan yang diperlukan pada punggung, kaki, bokong dan lengan, sekaligus mengurangi postur canggung, stres kontak dan pengerahan tenaga. Tinggi kursi yang digunakan harus memungkinkan paha horizontal, kaki bagian bawah vertikal, kaki rata di lantai atau di pijakan kaki. Tinggi kursi juga harus memungkinkan sudut 90 ° pada siku untuk mengetik. Kursi juga harus memiliki lebar yang cukup, dengan tepi yang membulat, dan material yang cukup empuk. Kursi juga harus mempermudah pergerakan penggunanya.

Meja kerja harus dirancang untuk dapat mempertahankan postur tubuh yang benar dan nyaman. Bekerja di meja dengan ketinggian yang salah menyebabkan banyak faktor risiko leher, bahu dan punggung. Pengaturan ketinggian meja kerja yang mendukung penurunan resiko cedera berdasarkan jenis pekerjaan yang dilakukannya antara lain:

- Pekerjaan presisi – meja kerja harus berada di atas tinggi siku
- Pekerjaan ringan - meja kerja harus berada tepat di bawah ketinggian siku
- Pekerjaan berat - meja kerja harus 4-5 inci di bawah tinggi siku
- Catatan: Tinggi siku adalah jarak dari lantai ke siku.

Selain hal itu, perlu diperhatikan postur tubuh saat melakukan pengamatan karena pekerja yang menggunakan mikroskop berisiko mengalami cedera pada ekstremitas atas, leher dan punggung. Mikroskop dan pekerja laboratorium berdiri untuk jangka waktu lama, melakukan tugas dengan sikap canggung, melihat ke bawah sambil melakukan tugas yang melelahkan untuk jangka waktu lama dan melakukan aktivitas manipulasi yang memerlukan penggunaan otot fleksor dan ekstensor pada jari dan pergelangan tangan. Penyesuaian mikroskop yang lebih nyaman akan membantu mengurangi masalah ini.

Untuk memungkinkan postur kerja yang lebih netral, jalur optik (jarak dari lensa okular ke spesimen yang dilihat) harus berkisar antara 45 dan 55 cm. Lensa mata harus tidak lebih dari 30° di atas bidang horizontal desktop. Postu tubuh berada posisi yang tegak dengan lengan sejajar dengan meja kerja, dan jarak tubuh dengan meja kerja tidak terlalu jauh. Gambar 3.5 memperlihatkan contoh posisi pengamatan mikroskop yang baik untuk mengurangi resiko cedera.



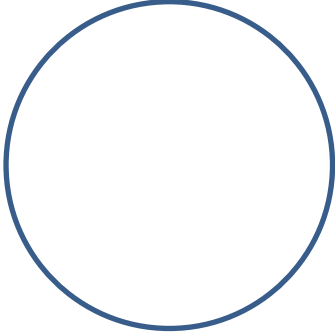
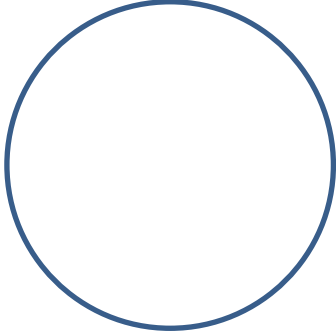
Gambar 3.5 Postur tubuh yang ideal untuk melihat mikroskop: Sikap tegak lurus dengan punggung dan lengan operator sejajar dengan benar untuk periode pengamatan yang panjang (tengah). Adaptasi postur tubuh yang tidak ergonomis saat ketinggian pengamatan terlalu tinggi (a) atau rendah (b)

(Sumber: Sundaragiri,2014)

Latihan

Setelah Anda menyelesaikan kegiatan belajar kedua ini, silahkan Anda melakukan kegiatan di bawah ini. Ambilah sebuah sediaan hati, amatilah pada sediaan 40x dan 100x kemudian isilah tabel kegiatan belajar dua ini.

Tabel 3.3 Kegiatan Belajar 2

No	Hasil Gambar	Jumlah Sel yang Ditemukan
1	 <p data-bbox="518 810 722 840">Perbesaran 400x</p>	
2	 <p data-bbox="502 1216 721 1245">Perbesaran 1000x</p>	
3	<p data-bbox="284 1272 630 1301">Peningkatan Kekuatan Lensa</p> <p data-bbox="331 1323 805 1375">a. $Kekuatan\ Lensa = \frac{1000x}{400x} = 2.5\ x$</p> <p data-bbox="284 1395 571 1424">Peningkatan Jumlah Sel</p> <p data-bbox="284 1444 721 1552">a. $Peningkatan\ Jumlah = \frac{Jumlah\ Sel\ pada\ kekuatan\ 1000x}{Jumlah\ Sel\ pada\ kekuatan\ 400x} =$</p> <p data-bbox="384 1637 619 1653">.....</p>	<p data-bbox="901 1272 1054 1301">Apakah hasil</p> <p data-bbox="842 1323 1118 1570">peningkatan jumlah sel memiliki nilai yang sama dengan peningkatan kekuatan sel ?</p> <p data-bbox="834 1648 962 1677">Iya / Tidak</p>

Petunjuk Mengerjakan Latihan

- 1) Hasil yang telah Anda Amati silahkan gambarkan sesuai dengan hasil yang tertampil pada lapang pandang yang terlihat. Fokus penggambaran lakukan pada sisi lapang pandang dan tengah lapang pandang. Anda tidak perlu harus menggambar seluruh sel yang terlihat cukup batasannya saja pada titik yang ditulis sebelumnya. Hal ini untuk memastikan batasan nyata ketika perbesaran lensa dipindahkan dari 400x menjadi 1000x perbesaran total.
- 2) Hasil hitung jumlah sel silahkan ditulis untuk memastikan bahwa setiap mikroskop dapat saja memiliki perbesaran yang berbeda secara nyatanya jika dilakukan langsung dengan jumlah sel yang teramati. Hal inilah yang nanti menjadi acuan dalam melakukan perbaikan mikroskop.

Ringkasan

Mikroskop merupakan instrument yang sangat penting dalam histologi mengingat pemeriksaan histologi dilakukan secara mikroskopis untuk mendiagnosis suatu kelainan. Terdapat beberapa jenis mikroskop, diantaranya adalah mikroskop cahaya untuk pemeriksaan rutin, mikroskop fluoresen untuk pengamatan preparat khusus yang menghasilkan suatu fluoresensi dan mikroskop yang dilengkapi dengan kamera digital dan perangkat lunak untuk mempermudah pengamatan struktur yang lebih kompleks. Dalam penggunaannya juga perlu diperhatikan cara penggunaan hingga perawatan yang benar untuk menjaga kinerja mikroskop tetap optimal.

Tes 2

Kerjakan soal-soal berikut ini dengan melingkari opsi jawaban A, B, C, D, atau E.

- 1) Bagian dari mikroskop yang berfungsi sebagai pembesar bayangan pertama adalah :
 - A. Lensa okuler
 - B. Lensa objektif
 - C. Filter
 - D. Revolver
 - E. Prisma

- 2) Bagian mikroskop yang dapat memindahkan posisi lensa objektif dalam berbagai perbesaran disebut dengan :
 - A. Lensa Okuler
 - B. Lensa objektif
 - C. Filter
 - D. Revolver
 - E. Prisma

- 3) Bagian tambahan dari mikroskop yang berfungsi merubah kesan pada latar belakang objek pengamatan adalah :
 - A. Lensa Okuler
 - B. Lensa objektif
 - C. Filter
 - D. Diafragma
 - E. Mikrometer

- 4) Berikut ini yang tidak berhubungan dengan intensitas cahaya pada mikroskop adalah :
 - A. Diafragma
 - B. Pengatur tegangan lampu
 - C. Kondensor
 - D. Filter
 - E. Makrometer

- 5) Hal-hal berikut yang benar dalam penggunaan/perawatan dari mikroskop adalah , kecuali :
 - A. Pegang mikroskop dengan satu tangan
 - B. Bersihkan lensa setelah menggunakan minyak imersi
 - C. Posisikan lampu pada kondisi redup ketika hendak mematikan
 - D. Posisikan meja objek pada posisi paling rendah
 - E. Gunakan kertas lensa dalam membersihkan lensa

- 6) Bagian dari mikroskop yang berperan dalam pembacaan sediaan yang memiliki ketebalan besar adalah ?
- A. Filter
 - B. Revolver
 - C. Diafragma
 - D. Diopter ring
 - E. Lensa okuler
- 7) Bagian dari mikroskop yang berperan dalam memfokuskan lapang pandang adalah ?
- A. Mikrometer
 - B. Makrometer
 - C. Diafragma
 - D. Diopter ring
 - E. Lensa okuler
- 8) Bagian dari mikroskop yang berfungsi mencari lapang pandang pada perbesaran 400x adalah ?
- A. Mikrometer
 - B. Makrometer
 - C. Diafragma
 - D. Diopter ring
 - E. Lensa okuler
- 9) Bagian dari mikroskop yang berfungsi mencari lapang pandang pada perbesaran 1000x adalah?
- A. Mikrometer
 - B. Makrometer
 - C. Diafragma
 - D. Diopter ring
 - E. Lensa okuler
- 10) Hal-hal yang paling sering merusak lensa mikroskop adalah ?
- A. Bakteri
 - B. Virus
 - C. Jamur
 - D. Getaran
 - E. Kelembaban

Kunci Jawaban Tes

Tes 1

1. Lensa Okuler
2. Lensa Objektif
3. Meja sediaan
4. Diafragma
5. Sumber Cahaya
6. Tubus/ Batang Mikroskop
7. Penjepit Sediaan
8. Mikrometer / Pemutar Halus
9. Makrometer / Pemutar Kasar
10. Dasar Mikroskop

Tes 2

1. B
2. D
3. C
4. E
5. A
6. E
7. A
8. A
9. B
10. C

Daftar Pustaka

Bancroft, JD. Gamble, M, 2013, *Teory and practice of histological technique*, Philadelphia: Elseiver

Carson, F.L., Hadik, C., 2009, *Histotechnology : A self-instructional text*. 3rd Edition. Hongkong: American Society for Clinical Pathology Press.

Scientia, 101 Steps to better Histology. Leica Microsystems' Education Series

Sireesha, S.K., et al, 2014, Ergonomics in an oral pathology laboratory: Back to basics in microscopy, JOMFP, Volume: 18

BAB IV FIKSASITEORI DAN PRAKTIK

Dewi Inderiati, S.Si., M.Biomed.

PENDAHULUAN



(Sumber :<https://cancerdiagnostics.com>)

Objek sediaan atau yang biasa kita sebut dengan preparat merupakan suatu hal yang selalu kita dapati tiap harinya. Pembuatan sediaan merupakan suatu hal yang dapat dikatakan mudah hingga sangat sulit tergantung dari bagian tubuh yang akan diamati secara mikroskopis. Sediaan yang baik adalah suatu sediaan yang mampu menggambarkan kondisi sel atau jaringan layaknya ketika sel atau jaringan itu masih di dalam tubuh. Sayangnya ketika sel atau jaringan itu terlepas dari tubuh baik sengaja atau tidak sengaja maka sel atau jaringan itu akan mengalami

kematian hingga kerusakan. Untuk menghindari atau memperkecil kerusakan sel dan jaringan ketika terlepas dari tubuh maka perlu dilakukan suatu tindakan yang membuatnya tidak berubah. Tindakan tersebut kita sebut dengan “fiksasi”

Fiksasi merupakan suatu hal yang menjadi salah satu factor keberhasilan dalam suatu pembuatan sediaan. Ketika terjadi kesalahan dalam proses fiksasi maka proses selanjutnya menjadi sia-sia karena akan menghasilkan sediaan yang tidak baik, lebih gawatnya lagi sel atau jaringan yang akan diamati menjadi rusak keseluruhannya dan tidak dapat diambil kembali. Dikarenakan fiksasi merupakan hal yang sangat penting dalam pembuatan sediaan, untuk itu Anda diharapkan dapat benar-benar mempelajari bab ini

Pada bab ini Anda akan mempelajari dan menerapkan hal-hal yang berhubungan dengan teknik-teknik fiksasi baik pada sel atau pada jaringan. Pembahasan dari bab ini dimulai dari prinsip fiksasi baik sel atau jaringan tahapan dari proses tersebut dan juga formula-formula dari pembuatan larutan fiksasi.

Setelah Anda mempelajari dan menerapkan bab ini, Anda diharapkan dapat:

1. Menjelaskan tentang prinsip kerja fiksasi sel dan jaringan
2. Menerapkan prosedur fiksasi dengan benar
3. Menerapkan larutan-larutan fiksasi di laboratorium
4. Menerapkan control kualitas pada sediaan dengan factor fiksasi

Kemampuan Anda dalam melakukan proses fiksasi sel dan jaringan serta memilih larutan sangatlah penting, selain untuk meningkatkan kinerja di laboratorium, diagnosis pasti menjadi hal yang utama dalam hasil kerja Anda.

Topik 1

Teori Fiksasi

A. TINJAUAN UMUM FIKSASI

Struktur sel dan jaringan ditentukan oleh bentuk dan ukuran makromolekul di dalam dan sekitar sel. Makromolekul utama di dalam sel adalah protein dan asam nukleat. Pada hewan vertebrata, makromolekul di permukaan luar sel dan di ruang ekstraselular adalah glikoprotein dan proteoglikan, di mana banyak bahan karbohidrat secara kovalen bergabung dengan molekul protein. Karbohidrat pada sel bersifat hidrofilik, dimana karbohidrat ini akan menyimpan banyak air di ruang ekstraselular yang dikatan dengan ikatan hidrogen. Selain kandungan tersebut, tentu saja tubuh kita ini terbentuk dari komponen besar air. Air setidaknya menyumbang sekitar 60% dari berat tubuh manusia. Dengan adanya kandungan protein, air dan karbohidrat tersebut, dapat menyebabkan kerusakan/kematian dari sel baik yang disebabkan dari factor internal maupun factor eksternal.

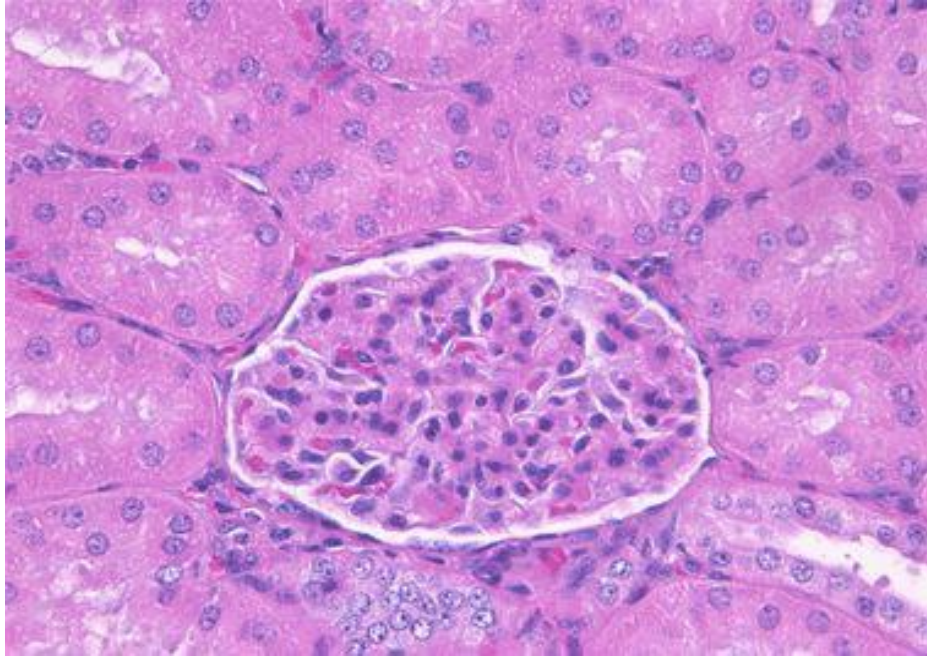
Sedangkan untuk membuat suatu sediaan yang baik, sel dan jaringan yang akan diamati diharapkan sangat mirip dengan kondisi ketika masih hidup. Oleh karena itu bagian penting dari pada teknik pembuatan sediaan histologik dan sitologik adalah bagaimana caranya agar sel dan jaringan dapat tetap terjaga secara alami. Untuk mencapai hal ini, maka jaringan yang diambil dari tubuh atau sel yang dibuat dengan teknik apusan harus segera diawetkan pada suatu cairan yang disebut dengan teknik fiksasi. Walaupun pada kasus-kasus apusan, teknik fiksasi dapat dilakukan dengan mengeringkan di suhu ruang atau dengan pemanasan. Menurut definisi, fiksatif mengubah komposisi kimia dan fisik asli dari jaringan. Selain mengubah sifat kimia sel dan jaringan yang digunakan, fiksasi dapat juga menyebabkan perubahan fisik pada komponen seluler dan ekstraselular. Mekanisme kerja dari fiksasi pada dasarnya adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk ketika masih di tubuh. Dengan pemberian cairan fiksasi, maka akan mengubah komposisi jaringan secara kimiawi ataupun secara fisik.

Fiksasi dapat dianggap sebagai "serangkaian kejadian kimiawi yang kompleks". Meskipun sekarang kita dapat mendefinisikan beberapa mekanisme fiksasi ini, pemahaman kita tentang banyak hal yang terjadi selama fiksasi masih banyak yang harus dicari. Pada sel atau jaringan yang akan difiksasi tersusun atas sel dan komponen ekstraselular. Sel dan komponen ekstraselular terdiri dari elemen peptida dan protein, lipid dan fosfolipid (membran), karbohidrat dan kompleks karbohidrat, berbagai jenis RNA dan DNA dan sebagainya. Elemen-elemen ini akan bereaksi selama proses fiksasi dan akan tergantung pada jenis fiksasi yang digunakan, baik itu akan dihilangkan atau dipertahankan. Beberapa elemen tersebut akan bereaksi secara kimia dengan fiksatif, distabilisasi oleh mekanisme "cross-linking" sehingga dapat. Ada pula elemen yang tidak terpengaruh oleh larutan fiksasi namun "terjebak" dalam sel atau jaringan akibat terbentuknya elemen baru.

Tujuan umum dari fiksasi jaringan adalah menjaga komponen sel dan jaringan seperti ketika sel itu masih dalam kondisi hidup. Dalam proses fiksasi dan langkah-langkah selanjutnya dalam pembuatan sediaan jaringan tentu ada perubahan substansial pada komposisi dan tampilan komponen sel dan jaringan. Dan ini kadangkala proses ini menghasilkan sediaan yang cukup jauh dari keadaan yang ideal. Namun jika dilakukan dengan hati-hati, kita diharapkan dapat menghasilkan sediaan yang secara karakteristik kimia maupun struktur yang baik sehingga memungkinkan pengamatan menghasilkan nilai yang maksimal.

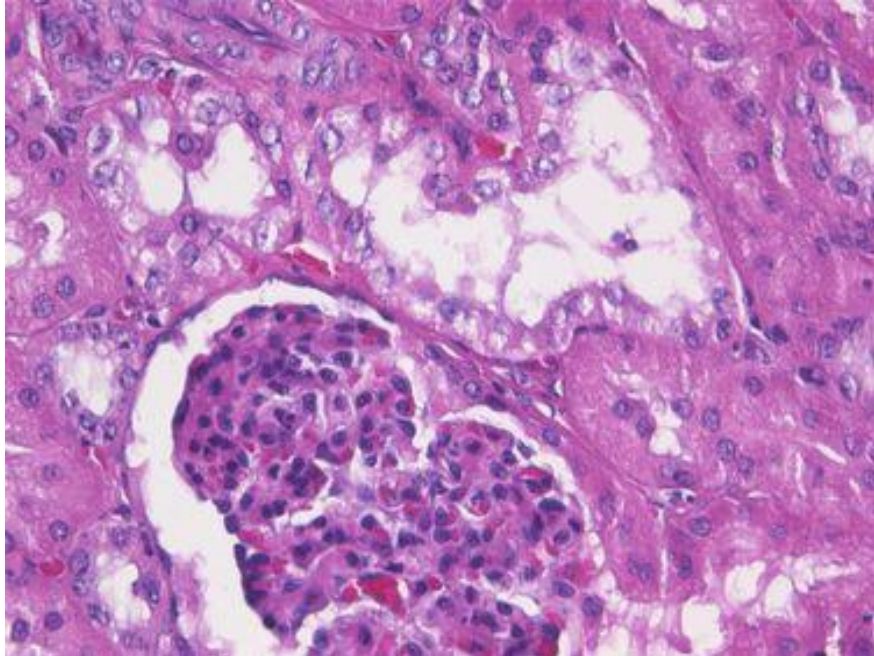
Secara teknis fiksasi bertujuan untuk mencegah atau menahan proses degeneratif yang dimulai segera setelah jaringan lepas dari kontrol tubuh dan kehilangan pasokan darahnya. Proses degeneratif ini kadangkala disebut dengan proses penurunan metabolisme atau penghentian metabolisme yang berujung terhadap kematian sel dan penghancuran sel. Selain dari proses degeneratif, kehilangan dan difusi zat terlarut di dalam sel harus dihindari semaksimal mungkin dengan mekanisme pengendapan atau koagulasi komponen ini dengan mekanisme "cross linked" dengan komponen struktural lain yang tidak dapat larut. Jaringan harus dilindungi dari kerusakan akibat proses pematangan jaringan termasuk infiltrasi pada suhu tinggi di dalam parafin cair. Selain dari kerusakan struktural, hal yang paling penting lainnya adalah mempertahankan jaringan dari kerusakan yang dapat menghilangkan (negatif palsu) atau memunculkan reaktivitas (positif palsu) terhadap pewarnaan dan reagen lainnya termasuk antibodi dan probe asam nukleat.

Penting untuk disadari bahwa pada awal fiksatif akan menghasilkan sejumlah perubahan pada jaringan. Perubahan ini termasuk penyusutan, pembengkakan dan pengerasan berbagai komponen. Namun perubahan akan terjadi kembali ketika jaringan dilakukan proses selanjutnya. Misalnya ketika jaringan dimasukkan ke dalam larutan fiksasi formalin 10%, maka jaringan akan mengalami sedikit namun ketika jaringan masuk ke dalam pematangan jaringan, maka spesimen kemungkinan akan menyusut kembali hingga 20% - 30% dari volumenya. Proses fiksatif yang dilakukan pada jaringan tertentu dapat juga mempengaruhi elemen yang akan diwarnai dengan berbagai reagen histokimia dan immuno-histokimia. Dari berbagai peran dan efek fiksasi, maka perlu diperhatikan tujuan akhir dari jaringan yang akan dipotong dan diwarnai apakah struktur atau komponen kimiawi.



Gambar 4.1. Pada gambar di atas menunjukkan sediaan ginjal yang terfiksasi dengan baik. Dimana terlihat morfologi tubulus dan glomerulus yang baik tanpa ada pengerutan. Selain itu warna dari inti maupun sitoplasma terlihat kekontrasan yang baik.

(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)



Gambar 4.2. Kerusakan Ginjal. Pada gambar berikut terlihat morfologi struktur ginjal yang tidak beraturan dan terjadi penyusutan pada glomerulus. Pada sel penyusun tubulus terlihat vakuolasi yang disebabkan karena buruknya fiksasi dan pada glomerulus terbentuk celah yang lebih besar.

(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)

B. TUJUAN DARI FIKSASI INI ADALAH

Tahapan fiksasi secara umum dapat dituliskan beberapa tujuan sebagai berikut :

1. **Menjaga Struktur dan Komponen Kimiawi.**
Menjaga secara struktur dan komponen kimiawi dari sel atau jaringan seperti semula ketika bagian tersebut masih dalam kondisi “hidup”, sehingga pemeriksaan struktur normal atau patologi dan senyawa histokimia dapat dilanjutkan semaksimal mungkin.
2. **Pencegahan Kerusakan dan Kematian.**
Untuk mencegah perubahan postmortem seperti autolisis dan pembusukan. Autolisis merupakan suatu aktivitas menghancurkan diri sendiri. Autolisis dilakukan pada mekanisme pencernaan jaringan yang dilakukan oleh enzim intraselular yang dilepaskan saat membran organel lisosom pecah. Pembusukan dapat juga terjadi akibat organisme mikro yang mungkin sudah ada dalam spesimen. Ciri yang menunjukkan adanya keberadaan mikroorganisme adalah dengan ditunjukkannya pembentukan gas pada wadah spesimen.
3. **Mengeraskan Sel dan Jaringan.**
Pengerasan pada dasarnya bukan tujuan utama dari fiksasi ini, namun pengerasan menjadi efek fiksasi yang menguntungkan dari proses ini, sehingga efek pengerasan memungkinkan adanya pemotongan makroskopis yang lebih mudah khususnya jaringan yang lunak seperti otak, usus dan lain sebagainya.
4. **Pemadatan.**
Dengan adanya reaksi kimiawi dari larutan fiksasi, maka komponen di dalam sel atau jaringan mengalami pemadatan cairan dari konsistensi setengah cair (gel) menjadi konsistensi semipadat hingga padat.
5. **Opticaldiferensiasi.**
Proses fiksasi ternyata tidak hanya sebagai penjaga sel dari kerusakan namun dampak lain dari larutan fiksasi itu dapat mengubah indeks bias dari berbagai komponen sel dan jaringan sehingga komponen yang terfiksasi dengan baik lebih mudah divisualisasikan.
6. **Efek pewarnaan.**
Pada kasus-kasus tertentu, pemberian larutan fiksasi dapat meningkatkan intensitas dari warna pada sel dan jaringan. Fiksatif tertentu seperti formalin dapat mengintensifkan karakter pewarnaan jaringan terutama ketika diwarnai dengan hematoksilin, lain halnya ketika sediaan hendak diwarnai dengan masson trichrome, maka fiksasi yang digunakan adalah larutan fiksasi Bouin yang dapat membuat warna menjadi lebih kontras.
7. **Menempelkan sel.**
Pada kasus pembuatan sediaan sitologik, larutan fiksasi dapat juga digunakan sebagai factor merekatkan sel dengan kaca objek. Sel yang difiksasi dapat melekat sempurna ketika difiksasi oleh larutan fiksasi atau dengan fiksasi kering. Fungsi ini digunakan pada apusan sel atau apusan bakteri pada kaca sediaan.

C. PRINSIP-PRINSIP DASAR FIKSASI

Untuk dapat menghasilkan efek fiksasi dengan baik, ada beberapa factor yang harus dipenuhi oleh suatu proses fiksasi, antara lain:

1. Koagulasi

Koagulasi adalah proses penggumpalan partikel koloid di dalam sel karena adanya penambahan bahan kimia atau pemberian perlakuan fisik sehingga partikel-partikel tersebut bersifat netral dan membentuk endapan. Koagulasi pada proses fiksasi dapat terjadi pada protein yang ada di dalam sel atau kandungan lainnya yang dianggap perlu dipertahankan akibat degrasi yang terus berlangsung.

Secara kimiawi, protein di dalam sel diubah secara fungsional maupun structural. Perubahan tersebut dapat dilakukan dengan cara koagulasi dan atau membentuk senyawa aditif baru. Senyawa aditif terbentuk dengan cara ikatan silang antara dua makromolekul yang berbeda, yakni komponen di larutan fiksatif dan protein di dalam sel. Dengan adanya ikatan silang tersebut akan menyebabkan sel tahan terhadap gerakan air dan juga cairan-cairan lainnya yang mempengaruhi sel itu. Dengan adanya koagulasi tersebut struktur sel menjadi lebih stabil. Prinsip lainnya adalah menginaktivasi enzim yang ada di dalam sel, sehingga aktivitas metabolisme sel tidak terjadi dan menghentikan proses autolisis sel.

Secara fisik, mekanisme fiksasi terjadi akibat pori-pori membran sel membesar ketika dimasukkan ke dalam larutan fiksasi. Hal ini terjadi karena sifat sel yang hidrofilik. Dengan membesarnya pori-pori membrane sel menyebabkan makromolekul memasuki sel. Dengan membesarnya pori-pori ini pula keuntungan dari fiksasi didapatkan, yaitu mempermudah proses parafinasi (sediaan histologik) dan pewarnaan menjadi lebih baik.

Pada penggunaan metode koagulasi untuk melakukan teknik fiksasi tidak semua zat dapat atau harus dikoagulasikan, contohnya penggunaan asam asetat sebagai komponen utama larutan fiksasi. Asam asetat dapat mengkoagulasikan kromatin namun tidak untuk protein. Metode ini memberi keuntungan ketika digunakan dalam pembuatan sediaan metode parafinasi dan pemeriksaan antibodi. Dengan metode ini dapat meningkatkan sensitifitas pengukuran akibat banyaknya paparan sel terhadap antigen. Namun ketika metode koagulasi dikombinasikan maka efek dari fiksasi akan memberikan efek lainnya pada sel seperti pengontrolan tekanan osmotik sel, mengontrol kadar keasaman, dan mengembalikan kembali volume sel yang membesar ataupun menyusut akibat pemberian zat lain.

2. Presipitasi.

Secara umum pengertian dari presipitasi adalah pengendapan yang terjadi akibat koagulasi yang terjadi sebelumnya. Presipitasi yang diharapkan ketika proses fiksasi adalah presipitasi protein, yang mana protein inilah yang menjadi salah satu factor utama pembusukan.

Presipitasi protein adalah pengendapan yang terjadi secara intrasel akibat penggumpalan yang parsial. Presipitasi ini disebabkan oleh berkurangnya tingkat kelarutan protein yang terjadi akibat adanya penambahan senyawa kimia yang berdampak terhadap perubahan senyawa kimia baru. Seperti halnya koagulasi, presipitasi juga terjadi karena faktor kimia dan fisika. Dengan adanya presipitasi protein ini maka akan menyebabkan berkurangnya tingkat kelarutan suatu protein yang berdampak terhadap kekuatan sel dari kerusakan baik secara internal maupun eksternal.

D. FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI FIKSASI

Adapun sejumlah faktor yang akan mempengaruhi tingkat efektivitas dan kecepatan fiksasi jaringan adalah sebagai berikut:

1. Suhu/Temperatur

Meningkatkan suhu atau memanaskan larutan fiksasi akan berbanding lurus terhadap meningkatkan kecepatan penetrasi larutan fiksatif ke dalam jaringan. Peningkatan suhu dapat juga mempercepat kecepatan reaksi kimia antara unsur fiksatif dengan sel atau jaringan. Dampak peningkatan suhu pada larutan fiksatif berpotensi meningkatkan laju degenerasi jaringan di area yang tidak sulit untuk dihentikan. Fiksasi yang menggunakan teknik pemanasan disarankan dimulai dari suhu kamar yang ditingkatkan secara perlahan hingga suhu mencapai 45 °C. Suhu ini merupakan suhu yang dapat diterima dengan baik untuk menjaga morfologi sel dan jaringan dengan kualitas yang baik. Peningkatan suhu pada larutan fiksasi dapat juga dilakukan dengan suhu yang lebih tinggi, sampai 65 ° C, namun perlu diperhatikan jika waktu yang digunakan harus lebih singkat.

2. Penetrasi Larutan.

a. Waktu penetrasi

Waktu penetrasi optimal untuk proses fiksasi bermacam-macam diantara jenis-jenis larutan fiksatif yang ada dan juga jenis sel yang ada di larutannya. Perhitungan waktu penetrasi larutan fiksatif menjadi pertimbangan dalam “mengejar” waktu autolysis dari sel atau jaringan yang terdapat di pusat terdalam suatu jaringan tersebut. Waktu penetrasi diharuskan mencapai titik pusat terdalam sebelum proses autolysis berjalan. Pertimbangan waktu penetrasi selain mengejar waktu autolysis adalah tingkat sirkulasi penerimaan dan pelaporan spesimen serta keterbatasan instrument. Ketika bagian dalam dari jaringan tidak sempat terfiksasi maka akan ada kemungkinan gambaran sediaan mikroskopis yang terdistorsi sebagian.

b. Tingkat penetrasi

Tingkat penetrasi zat pengikat tergantung pada karakteristik difusi dan variasi dari materi satu ke materi lainnya. Penetrasi larutan fiksasi dapat dirumuskan sebagai berikut :

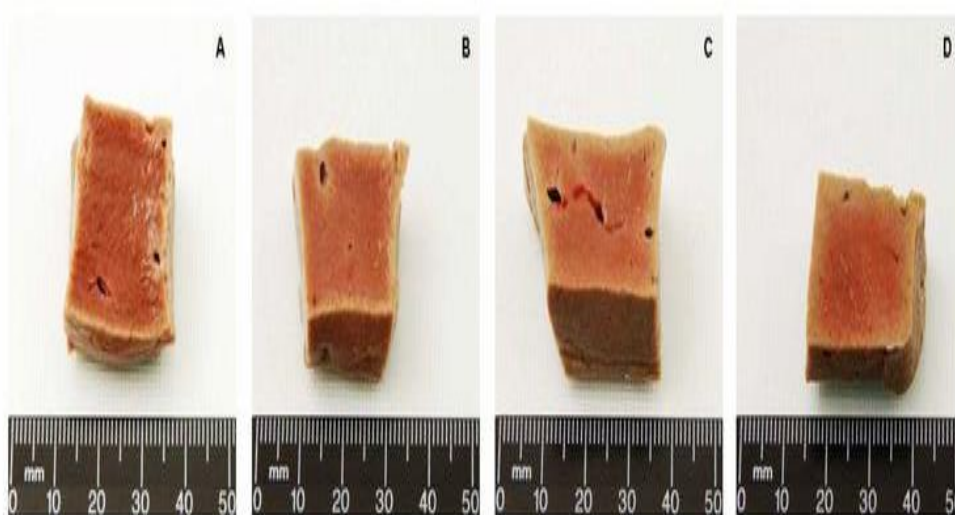
$$d = \sqrt{Kt} \dots\dots\dots [Rumus 1]$$

d = jarak penetrasi

K = koefisien difusi (bervariasi tergantung jenis larutan),

t = waktu.

Secara praktis, koefisien difusi (K) adalah jarak (milimeter) yang dapat ditempuh oleh suatu larutan dalam waktu satu jam. Sebagai contoh kita akan hitung nilai untuk formalin dengan konsentrasi 10% yang memiliki nilai K = 0,79. Hal itu berarti bahwa ketika Anda menggunakan larutan fiksatif berupa formalin 10%, maka larutan fiksasi itu hanya akan masuk ke dalam jaringan sedalam 1 mm selama 1 jam, dan jika jaringan itu memiliki ketebalan 10 mm, maka waktu yang dibutuhkan adalah 25 jam. Perlu diperhatikan perhitungan ini berdasarkan satu arah yang diberikan perlakuan.



Gambar 4.3. Perjalan Fiksasi Dalam Jaringan

(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)

Contoh foto yang menunjukkan tingkat penetrasi menggunakan larutan netral buffer formalin 10% yang dapat menembus ke dalam jaringan hati berbentuk kubus setebal 25 mm. Terlihat pada gambar kiri ke kanan menunjukkan waktu yang berbeda, makin ke kanan makin lama waktu fiksasinya. A: satu jam (sekitar 0,8 mm terpenetrasi), B: dua jam (sekitar 1,2 mm terpenetrasi), C: empat jam (sekitar 1,6 mm terpenetrasi) dan D: delapan jam (sekitar 2,2 mm terpenetrasi). Jika kita perhatikan pada jaringan hati setebal 25 mm, dengan waktu 8 jam saja masih belum sempurna suatu jaringan tersebut terfiksasi

3. Dimensi spesimen

Dimensi spesimen merupakan salah satu hal yang harus diperhatikan. Hal ini berhubungan dengan waktu optimal jaringan terfiksasi dari seluruh sisi dan juga proses difusi dari larutan yang digunakan dalam pematangan jaringan. Selain itu, kita mengetahui bahwa ukuran ketebalan dari kaset jaringan adalah 5 mm. Jaringan diharapkan dapat bergerak bebas

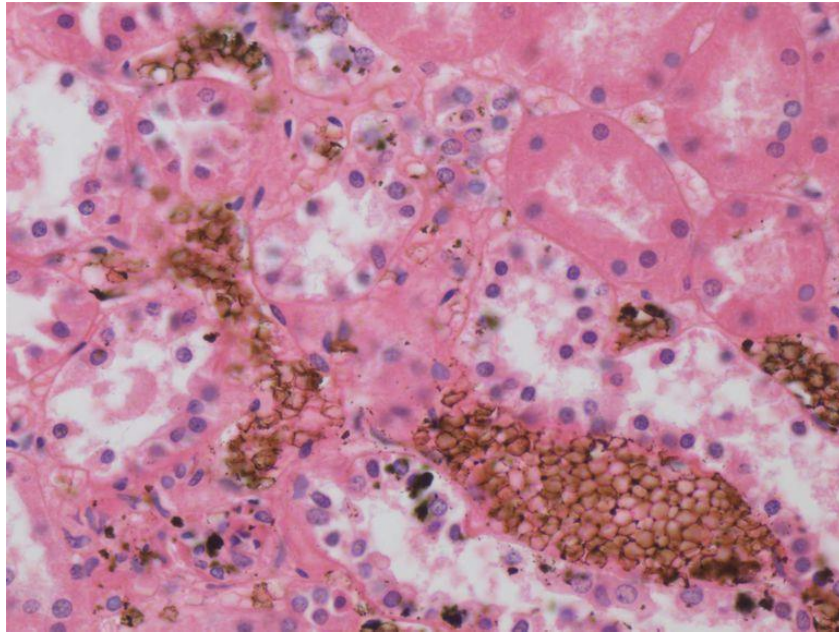
di dalam kaset dan tidak ada kontak antara jaringan dan kaset itu sendiri. Ketika jaringan itu menempel dengan kaset, maka proses fiksasi dan pematang jaringan akan menjadi lama karena dimensi spesimen menjadi berkurang.

4. Rasio volume terhadap spesimen:

Rasio antara volume larutan fiksasi terhadap spesimen menjadi hal yang harus diperhatikan. Hal ini berhubungan dengan penurunan konsentrasi larutan fiksasi dan kecepatan penetrasi. Makin sedikit larutan fiksasi yang digunakan, maka konsentrasi akhir ketika terjadi kondisi isotonic akan menurun dengan drastis, dan tentunya akan mengurangi kecepatan penetrasi. Lain halnya ketika larutan fiksasi besar perbandingannya terdapat spesimen, maka konsentrasi akhir ketika isotonic tidak begitu bermakna dan kecepatan penetrasi terjaga. Perbandingan yang telah teruji adalah 1 : 20 untuk spesimen : larutan fiksasi. Namun jika Anda ingin fiksasi menjadi lebih baik dilihat dari waktu dan kualitas, maka rasio yang disarankan adalah 1:50.

5. Tingkat Keasaman (pH)

Tingkat keasaman suatu larutan (pH) dapat menjadi penting ketika larutan yang digunakan dalam fiksasi mengandung formaldehid. pH yang diberikan diharapkan sesuai dengan pH sel yaitu 6,8-7,2. Ketika kondisi larutan fiksasi mengandung formaldehid akan membentuk asam format dan menghasilkan larutan asam yang akan bereaksi dengan hemoglobin dan menghasilkan pigmen artefak (asam Hematin Formaldehid). Namun ketika larutan fiksasi memiliki pH basa, maka kemungkinan yang terjadi adalah sel yang mengalami pembengkakan. Pada kasus tertentu asam kadang-kala diperlukan seperti penggunaan asam asetat maupun asam pikrat (Bouin). Hal ini biasa dilakukan ketika waktu fiksasi diharapkan lebih cepat dibanding penggunaan formalin atau karena penggunaan lainnya seperti peningkatan kekontrasan, namun perlu diperhatikan ketika pemberian larutan yang bersifat asam dalam waktu yang lama, akan membuat sel mengkerut dan lebih rentan terhadap kerusakan fisik.



Gambar 4.4. Bagian ginjal yang difiksasi oleh larutan formalin bersifat asam. Pada gambar menunjukkan deposisi asam hematin formaldehida (pigmen formalin) yang berhubungan dengan sel darah merah. Pigmennya menunjukkan berwarna coklat sampai hitam warnanya dan akan berwarna terang ketika diamati pada mikroskop polarisasi.

(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)

E. PROSEDUR PRAKTIS UNTUK MENGOPTIMALKAN KUALITAS

Dengan mengikuti prinsip dari setiap faktor yang berhubungan dengan proses fiksasi, hasil fiksasi yang konsisten dan optimal dapat dicapai. Berikut adalah tiga hal penting untuk fiksasi yang baik dan dua puluh peraturan yang harus diikuti untuk memastikan pencapaiannya.

1. Kondisi Ketika Jaringan segar

- a. Masukkan jaringan secepat mungkin.
Ingat bahwa degenerasi sel dimulai segera setelah sel kekurangan suplai darah dan koordinasi persyarafan tubuh.
- b. Hentikan metabolisme dengan pendinginan.
Jika fiksasi tidak dapat segera mungkin untuk dilakukan, maka jaringan segera didinginkan namun jangan sampai jaringan membeku. Suhu yang diperkenankan adalah 4°C. Pembekuan jaringan yang lambat akan menghasilkan kerusakan yang cukup besar akibat terbentuknya kristal es.
- c. Jaringan segar dapat bersifat infeksius.
Pertimbangkan jaringan yang segar ketika Anda terima. Ketika jaringan segar atau tidak lengkap terfiksasi maka akan berpotensi menularkan sumber infeksius kepada Anda dan pekerja lainnya.

- d. Jangan biarkan spesimen mengering.
Pemotongan jaringan segar akan membuat permukaan spesimen dapat mengalami kerusakan permanen dan bisa menutupi perubahan sel akibat faktor patologis sehingga menyebabkan negatif palsu. Spesimen endoskopik yang kecil sangat rentan terhadap kerusakan jenis ini.
- e. Jangan mendistorsi jaringan.
Lakukan dengan lembut jaringan yang segar. Distorsi atau kerusakan mekanis lainnya akan menyebabkan perubahan morfologis permanen yang dapat membuat interpretasi menjadi sulit.
- f. Beri label secara lengkap dan akurat.
Identifikasi merupakan hal yang mutlak penting untuk bahan diagnostik dan penelitian.

2. Penentuan Larutan Fiksasi Yang Tepat

- a. Fixative harus menembus dari semua sisi.
Selalu tempatkan spesimen ke dalam wadah yang sudah mengandung fiksatif. Hindari menempelnya jaringan dengan wadah dikarenakan dapat mengurangi sisi penetrasi larutan. Masukkan terlebih dahulu larutan fiksasi ke dalam wadah kemudian masukkan jaringannya.
- b. Rongga harus terbuka.
Bila mungkin organ berongga atau spesimen dengan rongga alami harus dibuka untuk memungkinkan akses fiksatif langsung. Jika tidak memungkinkan seperti organ paru-paru, maka bungkus dengan kertas saring atau lakukan dengan aspirator untuk menarik udara keluar dan tergantikan dengan cairan fiksasi.
- c. Perfusi beberapa spesimen.
Fiksasi oleh perfusi melalui sistem vaskular pada organ yang masih utuh atau pada hewan percobaan kecil akan menghasilkan hasil yang sangat baik.
- d. Ketebalan organ (maksimal 4mm).
Ketebalan spesimen atau potongan jaringan tidak boleh melebihi 4 mm jika menginginkan proses fiksasi berjalan dengan optimal.



Gambar4.5. Pada gambar tersebut, organ dilakukan tahapan pemotongan tipis guna membuat larutan fiksasi masuk dari segala sisi.

(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)

- e. Lakukan agitasi pada proses.
Jika memungkinkan lakukan agitasi dengan lembut pada jaringan yang akan difiksasi dengan cara spesimen digoyang-goyang atau diputar-putar dengan perlahan selama beberapa menit atau hingga larutan fiksasi terpenetrasi sempurna.
- f. Rasio Volume : rasio jaringan.
Volume larutan fiksasi menjadi penting dikarenakan konsentrasi akan berkurang seiring dengan jumlah jaringan yang dimasukkan ke dalam wadah fiksasi.



Gambar 4.6. Volume Fiksasi. Pada gambar kiri menunjukkan rasio jaringan dan larutan yang tidak baik, sedangkan gambar kanan menunjukkan rasio yang sesuai untuk proses fiksasi.

(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)

- g. Berikan waktu yang cukup.
Waktu untuk proses fiksasi harus dapat dipastikan bahwa larutan fiksasi dapat menembus bagian terpusat dari spesimen dan sepenuhnya reaksi kimia oleh larutan fiksasi.
- h. Penggunaan suhu.
Suhu fiksasi yang baik ketika awal pemberian akan baik jika dilakukan pada suhu kamar (20 ° C), namun untuk kasus tertentu suhu dapat ditingkatkan hingga 45°C namun perlu diperhatikan waktu fiksasinya agar tidak merusak jaringan.

3. Pilihan Yang Tepat Dari Larutan Fiksasi

- a. Larutan fixatives harus dibuat dengan hati-hati dari reagen dengan kualitas yang sesuai dan segar.
Reagen dengan kualitas buruk dapat menghasilkan kualitas fiksasi yang buruk pula. Beberapa formulasi harus dibuat dari larutan stok sesaat sebelum digunakan, hal ini dikarenakan larutan fiksasi itu tidak stabil ketika diberikan larutan pengencer yang (misalnya cairan Helly).
- b. Pergantian Larutan Fiksasi
Spesimen yang diterima dan telah difiksasi harus diperiksa dan diganti larutan fiksatifnya jika memang dianggap perlu, dan jika meragukan segera ganti dengan larutan fiksasi yang baru yang sebelumnya jaringan dicuci pada air mengalir.
- c. Frekuensi Penggunaan Larutan Fixatives.
Larutan fiksasi yang telah digunakan disarankan tidak digunakan kembali meskipun rasio yang digunakan pada jaringan sebelumnya sangatlah tinggi. Hal ini dilakukan agar tidak terjadi kontaminasi dengan jaringan sebelumnya.
- d. Hindari tutup Wadah yang Bersifat logam.
Ketika menggunakan wadah untuk melakukan proses fiksasi, gunakan wadah yang bebas dari sifat logam. Hal ini dikarenakan beberapa larutan fiksatif sangat korosif (misalnya garam merkuri).
- e. Perlakuan Setelah Pemberian Larutan Fiksasi.
Beberapa larutan fiksasi mengharuskan spesimen dicuci di air sebelum masuk ke tahap pematangan jaringan (misalnya Zenker atau Helly) atau beberapa persyaratan lainnya.
- f. Semua fiksatif bersifat toksik dan korosif.
Perlakukan larutan fiksasi sebagai larutan yang beracun dan korosif, meskipun jumlahnya bervariasi. Namun jika Anda kontak dengan larutan fiksatif maka harus waspada terhadap potensi bahaya (lihat topik K3).

Latihan

Setelah Anda membaca beberapa teori yang disebutkan di atas, mari kita mencoba untuk mengerjakan latihan ini. Ambil contoh hati, kemudian potonglah hati tersebut dengan ukuran kurang lebih 0,5x0,5x0,5 cm sebanyak 4 buah. Dari 4 buah potongan potongan hati tersebut, lakukan tahap fiksasi dengan waktu yang berbeda seperti yang diberikan pada tabel di bawah ini.

Tabel 4.1. Kegiatan Belajar Fiksasi

No	Proses Fiksasi	Keterangan Hasil
1	Waktu 1 jam
2	Waktu 2 jam
3	Waktu 4 jam
4	Waktu semalam

Petunjuk pengerjaan.

Setelah tiap tahapan (waktu) tela selesai , kemudian belah menjadi dua bagian yang relatif sama dan isilah titik-titik di atas dengan hasil kegiatan. Keterangan yang diisikan berupa :

1. perubahan bentuk (Tetap/berubah)
2. Konsistensi (sangat Lunak/Sedikit Lunak/ Keras)
3. Jarak jaringan terpenetrasi dengan melihat batas warna yang jelas (hitung dengan penggaris)

Ringkasan

Fiksasi merupakan suatu tahapan yang wajib dilalui baik untuk sediaan histologik maupun sitologi. Fungsi dari fiksasi antara lain adalah menjaga sel dari kerusakan struktural maupun kimiawi, pencegahan kematian sel akibat postmortem ataupun autolisis, mengeraskan jaringan, memadatkan komponen sel, peningkatan intensitas optical, peningkatan intensitas warna pada saat proses pewarnaan dan pada kasus-kasus tertentu dapat membantu merekatkan sel ke kaca sediaan. Adapun faktor-faktor yang dapat mempercepat namun dapat juga merusak (jika kelebihan waktu fiksasi) antara lain suhu, waktu penetrasi, jenis sel, dimensi spesimen, rasio larutan fiksasi berbanding ukuran spesimen dan tingkat keasaman larutan fiksasi.

Tes 1

- 1) Berikut ini yang bukan tindakan yang mampu mempercepat fiksasi adalah :
 - A. Menambah suhu larutan fiksasi
 - B. Memperkecil spesimen
 - C. Melakukan tindakan “gangguan” dengan cara mengerak-gerakan
 - D. Memperkecil volume larutan fiksasi
 - E. Menambah tingkat keasaman

- 2) Berikut ini hubungan yang benar antara faktor fiksasi dengan waktu fiksasi:
 - A. Makin tinggi suhu yang diberikan makin cepat proses fiksasi
 - B. Makin besar ukuran spesimen makin cepat waktu fiksasi
 - C. Makin cepat agitasi diberikan makin lambat waktu fiksasi
 - D. Makin mendekati volume spesimen makin cepat proses fiksasi
 - E. Makin basa larutan fiksasi makin cepat terpenetrasi

- 3) Teknik yang dilakukan pada jaringan berongga yang mengandung udara adalah ?
 - A. Infiltrasi
 - B. Difusi
 - C. Aspirasi
 - D. Perfusi
 - E. Dehidrasi

- 4) Berikut ini yang dapat mempengaruhi ketidak layakan suatu sediaan akibat fiksasi adalah ?
 - A. Memasukkan spesimen dengan cepat
 - B. Meningkatkan suhu fiksasi
 - C. Meningkatkan pH menjadi lebih asam hingga 2
 - D. Melakukan teknik mengaduk
 - E. Menggunakan kertas saring

- 5) Yang dimaksud dengan agitasi adalah ?
 - A. Pemanasan
 - B. Penggetaran
 - C. Pemangkasan
 - D. Pemuaian
 - E. Perbandingan

- 6) Masuknya suatu larutan fiksasi ke dalam jaringan disebut dengan ?
 - A. Penetrasi
 - B. Difusi

- C. Osmosis
 - D. Agitasi
 - E. Pemanasan
- 7) Perbandingan antara larutan fiksasi dengan jaringan akan mempengaruhi kecepatan masuknya larutan tersebut ke dalam jaringan. Faktor apa yang mempengaruhi?
- A. Konsentrasi
 - B. Agitasi
 - C. Pengenceran
 - D. Pemanasan
 - E. Penetrasi
- 8) Berapa pH optimum untuk larutan fiksasi
- A. Asam
 - B. Basa
 - C. 6 - 8
 - D. 5 - 9
 - E. 6.8 – 7.2

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1. Kunci jawaban ada di akhir dari topik ini. Setelah Anda menghitung jumlah jawaban yang benar, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan:

- 100% = baik sekali
- 80% = baik
- 60% = cukup
- <60% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, masuk ke dalam materi selanjutnya dan jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda tetap dapat melanjutkan topik selanjutnya namun dengan syarat Anda tetap membaca dan mempelajari kembali topik ini.

Topik 2

Teknik Fiksasi Sediaan Histologik

A. FIKSASI SEDIAAN HISTOLOGIK

Seperti yang Anda telah ketahui, bahwa spesimen yang masuk ke dalam laboratorium Patologi Anatomi pada umumnya terbagi menjadi dua yaitu spesimen jaringan dan spesimen sel. Dalam sub topik ini, pembahasan hanya berkisar tentang fiksasi jaringan. Pada dasarnya materi di sub topik sebelumnya hampir seluruhnya mendukung tentang fiksasi jaringan.

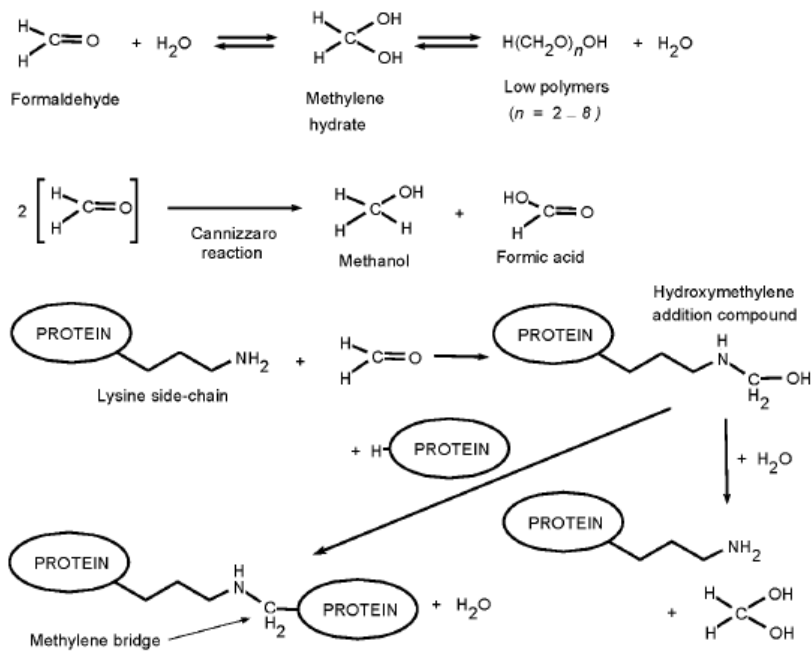
Adapun prosedur untuk fiksasi jaringan adalah sebagai berikut :

1. Potong spesimen jaringan/organ dengan ukuran kurang lebih 4 mm
2. Rendam dengan larutan fiksasi sesuai dengan tujuan pewarnaan atau komponen target
3. Tunggu hingga tahap fiksasi selesai sempurna
4. Cuci dengan air mengalir atau aquades (jika diperlukan)
5. Lakukan tahap selanjutnya.

Mengingat target dari jaringan berbeda-beda seperti jenis sel yang ditemukan atau komponen lainnya (kimiawi atau imunologi) maka berikut ini akan dibahas tentang jenis-jenis larutan fiksasi untuk jaringan.

1. Formalin

Formalin merupakan nama dagang dari suatu larutan yang mengandung 40% b/v (= 40% b/b) formaldehida (yang merupakan gas) di dalam air. Sebagian besar formaldehida hadir sebagai polimer larut, yang dipolimerisasi pada suatu larutan. Formalin mengandung sekitar 10% metanol, yang ditambahkan oleh produsen untuk menghambat pembentukan polimer yang lebih tinggi, yang menghasilkan suatu larutan yang biasa disebut dengan paraformaldehida. Ketika penyimpanan formalin di tempat yang dingin, maka akan terdapat endapan bubuk putih. Formaldehid dalam larutan dapat melakukan reaksi dengan sendirinya (reaksi Cannizzaro) dan berubah menjadi metanol dan asam formiat. Monomer formaldehida hampir seluruhnya mengandung metilen hidrat, senyawa lain yang dibentuk akibat reaksi yang reversibel dengan air. Formaldehida itu sendiri adalah senyawa yang bereaksi dengan protein dan ada pada konsentrasi yang sangat rendah yaitu 4% formaldehida dalam larutan. Struktur kimia formaldehida terlihat dalam Gambar x.



Gambar 4.7. Struktur Kimia Formalin dan reaksinya dengan protein.

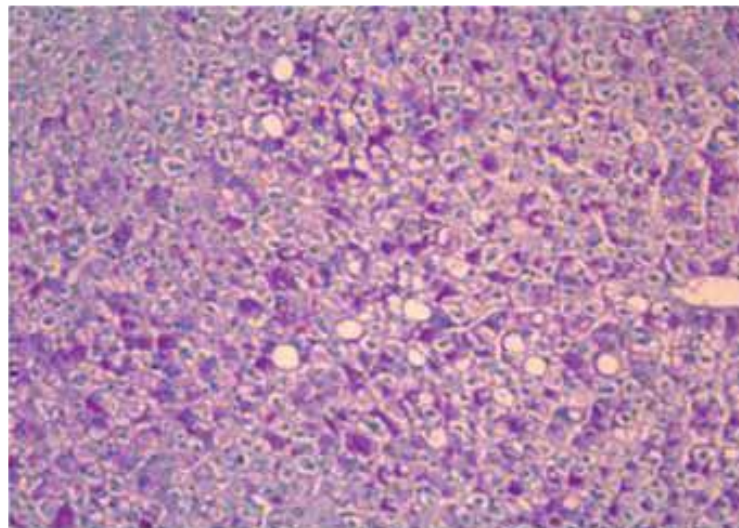
(Sumber : Dako, 2009)

Larutan fiksatif yang paling umum digunakan untuk histopatologi adalah larutan 4% formaldehid yang biasa disebut dengan formalin 10%. Penggunaan larutan ini telah 50 tahun digunakan, hal ini dikarenakan larutan fiksatif dapat mempertahankan pH netral dan memiliki tekanan osmotik yang sama dengan cairan ekstraseluler. Untuk memastikan bahwa penggunaan formalin mencapai pH yang netral maka dilakukan dengan menambah garam sehingga disebut dengan netral buffered formalin, atau NBF. Larutan NBF melakukan kerjanya sebagai agen fiksasi bukan dengan koagulasi, tetapi dengan menambahkan ke sisi-rantai dasar asam amino, terutama lisin, dan ikatan peptida dari atom amida nitrogen. Ikatan silang menghubungkan metilen terbentuk dari dua sisi formaldehida yang saling mengikat bersama-sama. Dengan ikatan ini, maka NBF dapat menurunkan permeabilitas untuk makromolekul tetapi struktur molekul protein begitu berubah. Dengan ukuran yang kecil dari molekul metilen glikol dan formaldehida memungkinkan penetrasi menjadi cepat, dan dengan akibatnya fiksatif ini cocok untuk spesimen dengan ukuran yang besar atau kecil.

Sayangnya, meskipun penetrasi menggunakan formalin memiliki penetrasi yang cepat pada jaringan, reaksi antara formaldehida dengan protein jaringan untuk menjadi ikatan metilen tetap terjadi secara perlahan-lahan. Inilah kesalahan yang sering terjadi biasa ketika menggunakan formalin sebagai larutan fiksasi. Untuk ukuran jaringan yang kecil ($10 \times 10 \times 3$ mm) ketika difiksasi menggunakan NBF selama 12-24 jam pada umumnya akan menunjukkan kondisi sitoplasma dan inti yang baik dan rinci. Penggunaan formaldehida sebagian besar akan sempurna terfiksasi dalam waktu 24 jam, tetapi reaksi silang ini akan terus berlanjut selama hingga kurang lebih dua minggu. Untuk spesimen yang lunak seperti otak manusia secara keseluruhan membutuhkan waktu 2-6 minggu ketika difiksasi di NBF hingga menjadi cukup

kuat untuk dipotong-potong. Dengan adanya variasi waktu dan kondisi fiksasi maka akan menyebabkan sebagian besar masalah di sediaan ketika dilakukan pewarnaan histokimia.

Fiksasi sangat mempengaruhi hasil suatu pewarnaan sediaan histologik dan imunohistokimia. Seorang teknisi patologi anatomi, patolog maupun peneliti harus dapat memutuskan metode yang paling tepat dalam hal fiksasi ini. Aspek yang perlu dipertimbangkan adalah suhu, ukuran wadah penyimpanan, rasio volume, konsentrasi garam buffer, ph dan waktu inkubasi. Fiksasi formalin biasanya dilakukan pada suhu kamar, menggunakan wadah spesimen rendah dan lebar untuk memungkinkan penetrasi yang optimal dan kemudahan dalam pengambilan spesimen oleh teknisi. Pilihan terbaik untuk rasio volume adalah 1:20, dan dimensi jaringan sebesar 3-4 mm. Untuk mencegah pembengkakan atau menyusut dari sel-sel maka larutan dibuat isotonik dengan ph 7,2-7,4 dianjurkan, dan juga untuk mempertahankan ultrastruktur sel serta meminimalkan distorsi sel. Semakin pendek waktu jeda pengambilan jaringan dari tubuh terhadap waktu perendaman dalam larutan fiksatif membuat hasil semakin baik. Waktu paparan fiksatifpun harus dioptimalkan untuk setiap jenis spesimen. Sebagai contoh, target dari glikogen di hati dapat dijadikan subjek dari artefak fiksasi. NBF akan menembus secara perlahan melalui membran hepatosit, dengan waktu penetrasi pada sel hepatosit ini glikogen yang berhubungan dengan matriks protein sitoplasma akan berpindah ke satu sisi dari sel. Hasil ini disebut sebagai polarisasi dan dianggap bagian dari morfologi ketika membedakan hasil dari pewarnaan (Gambar 4.8: polarisasi glikogen). Sediaan ini adalah contoh yang bagus untuk dijadikan kontrol dari spesimen yang telah lama direndam dalam larutan fiksatif yang mengandung formalin. Perubahan tersebut menunjukkan terjadi perubahan morfologi yang ekstrim.



Gambar 4.8.Sediaan histologik yang difiksasi dengan larutan formalin dan diwarnai dengan pewarna Periodic Acid Schiff. Terlihat posisi glikogen yang terpolarisasi di sisi sel yang berwarna magenta dengan inti ditengah berwarna biru.

(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)

2. Larutan Bouin

Pol André Bouin (1870-1962) menemukan beberapa campuran fiksatif di tahun-tahun 1895-1900. Larutan fiksasi yang paling sering dikaitkan dengan namanya adalah larutan Bouin yang pertama kali dilaporkan pada tahun 1897. Larutan Bouin sendiri berisi 10% formaldehida (25% formalin), asam asetat 0.9 M dan 0.04 M asam pikrat yang dilarutkan di dalam air. Asam pikrat menembus jaringan agak lambat, mengentalkan protein dan dapat menyebabkan beberapa penyusutan. Selain penggunaan asam pikrat akan menyebabkan jaringan menjadi berwarna kuning. Larutan Bouin ini memiliki pH berkisar 1,5 – 2. Penetrasi menggunakan larutan Bouin ini lebih cepat daripada penggunaan NBF. Efek komplementer dari ketiga komponen penyusun larutan Bouin ini bekerja baik untuk mempertahankan morfologi sel. Spesimen biasanya direndam dalam larutan Bouin selama 24 jam. Namun ketika penyimpanan terlalu lama di dalam campuran ini dapat menyebabkan hidrolisis dan hilangnya DNA dan RNA. Hal ini mengharuskan jaringan yang difiksasi dengan larutan Bouin harus dilakukan pencucian terlebih dahulu sebelum di proses lebih lanjut. Penggunaan larutan Bouin ini sangat cocok ketika sediaan hendak dilakukan pewarnaan menggunakan pewarnaan Trichrome. Pewarnaan Trichrome menggunakan kombinasi tiga pewarna dengan tambahan asam phosphotungstic atau phosphomolibdic sebagai bagian dari peningkatan warna sitoplasma, serat kolagen dan komponen lainnya dari jaringan.

Adapun larutan-larutan yang sering digunakan sebagai larutan fiksasi adalah sebagai berikut :

a. Netral Bufer Formalin 10%

- | | | |
|----|-------------------------------|----------|
| 1. | Aquades | 900 ml |
| 2. | Formalin (37% formaldehide) | 100 ml |
| 3. | Natrium diHidrogen Phospat | |
| 4. | (NaH_2PO_4) | 4 gram |
| 5. | DiNatrium Hidrogen Phospat | |
| 6. | (Na_2HPO_4) | 6.5 gram |

Campurkan semua komponen menjadi satu, dan ukur hingga pH campuran sebesar 7.2 – 7,4. Ketika pH belum mencapai yang diharapkan maka tambahkan dengan perbandingan NaH_2PO_4 dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 1:1,625$ hingga pH sesuai, namun kita pH terlalu basa maka bisa ditambahkan dengan asam asetat sedikit demi sedikit hingga pH turun sesuai dengan yang diharapkan.

b. Larutan Bouin

- | | | |
|----|--------------------------------|---------|
| 1. | Asam pikrat 2,1% dalam aquades | 1500 ml |
| 2. | Formalin (37% formaldehide) | 500 ml |
| 3. | Asam Asetat Glasial | 100 ml |

Efek dari penggunaan larutan fiksasi ini akan menghasilkan warna kuning. Warna kuning ini dapat dihilangkan dengan perendaman di alkohol 70%, lithium karbonat atau pewarna asam yang dibarengi atau secara terpisah pemberiannya ketika proses pewarnaan.

Latihan

Setelah Anda membaca beberapa tentang jenis-jenis fiksasi untuk sediaan jaringan, mari kita mencoba untuk mengerjakan latihan ini. Ambil contoh hati, kemudian potonglah hati tersebut dengan ukuran kurang lebih 0,5x0,5x0,5 cm sebanyak 2 buah. Dari 2 buah potongan potongan hati tersebut, lakukan tahap fiksasi dengan larutan yang berbeda seperti yang diberikan pada tabel di bawah ini.

Tabel 4.2. Kegiatan Belajar Dekalsifikasi

No	Proses Fiksasi	Waktu Fiksasi	Keterangan Hasil
1	Larutan NBF	4 jam
2	Larutan Bouin	4 jam
3	Larutan NBF	Semalam
4	Larutan Bouin	semalam

Petunjuk pengerjaan.

Setelah tiap tahapan (waktu) telah selesai , kemudian belah menjadi dua bagian yang relatif sama dan isilah titik-titik di atas dengan hasil kegiatan. Keterangan yang diisikan berupa :

- 1) perubahan bentuk (Tetap/berubah),
- 2) Konsistensi (sangat Lunak/Sedikit Lunak/ Keras)
- 3) Jarak jaringan terpenetrasi dengan melihat batas warna yang jelas (hitung dengan penggaris)

Ringkasan

Teknik fiksasi pada jaringan sangatlah penting diketahui oleh seorang teknisi laboratorium patologi anatomi. Pemilihan larutan fiksasi akan mempengaruhi hasil dari sediaan histologik ketika diamati secara mikroskopis. Kesalahan dalam pemilihan jenis larutan fiksasi jaringan dapat menghasilkan nilai yang positif atau negatif palsu. Larutan netral bufer formalin merupakan larutan fiksasi yang paling sering/umum digunakan di laboratorium patologi anatomi, namun jika memungkinkan jenis larutan fiksasi dibuat di laboratorium patologi anatomi maka akan menghasilkan efektifitas pembacaan sediaan lebih tinggi. Contoh

ketika pewarnaan menargetkan serat kolagen atau struktur/pola dari kromatin sel reproduksi, maka larutan fiksasi yang disarankan adalah larutan fiksasi Bouin.

Tes 2

- 1) Berikut ini spesimen yang membutuhkan larutan fiksasi Bouin untuk meningkatkan efektifitas sediaan adalah ?
 - A. Sistem reproduksi (testis)
 - B. Otot
 - C. Hati yang diwarnai hematoxylin eosin
 - D. Kelenjar lymphoma
 - E. Tulang

- 2) Berikut ini hal-hal yang harus dilakukan oleh seorang teknisi laboratorium patologi anatomi ketika membuat larutan NBF:
 - A. pH harus mencapai 6,8 -7,2
 - B. Ketika pH masih asam, tambahkan aquades hingga pH mencapai target
 - C. Ketika pH dalam kondisi basa tambahkan H₂SO₄
 - D. Ketika pH masih asam, tambahkan formalin hingga pH mencapai target
 - E. Ketika pH dalam kondisi basa tambahkan Asam Asetat

- 3) Berikut ini hubungan antara tingkat keasaman dengan struktur sel yang benar ?
 - A. Makin asam maka struktur sel akan mengalami pembengkakan
 - B. Makin asam maka struktur sel akan mengalami penyusutan
 - C. Makin basa maka struktur sel akan mengalami penyusutan
 - D. Tidak ada hubungan antara keasaman dengan struktur
 - E. Makin asam maka makin kuat struktur sel

- 4) Jaringan yang terlalu lama dalam larutan formalin dapat menyebabkan gambaran berbeda secara mikroskopik yaitu ?
 - A. glikogen yang terpolarisasi
 - B. Formalin hematin
 - C. Jaringan menyusut
 - D. Sel menyusut
 - E. Jaringan membengkak

- 5) Perbandingan ideal untuk larutan fiksasi adalah ?
- A. 1:10
 - B. 1:15
 - C. 1:20
 - D. 1:25
 - E. 1:30

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 2. Kunci jawaban ada di akhir dari topik ini. Setelah Anda menghitung jumlah jawaban yang benar, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 100% = baik sekali

80% = baik

60% = cukup

<60% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, masuk ke dalam materi selanjutnya dan jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda tetap dapat melanjutkan topik selanjutnya namun dengan syarat Anda tetap membaca dan mempelajari kembali topik ini.

Topik 3

Teknik Fiksasi Sediaan Sitologik

A. FIKSASI SEDIAAN SITOLOGIK

Layaknya spesimen jaringan, spesimen sel pun harus melalui yang namanya fiksasi. Fiksasi spesimen sitologi yang sempurna adalah prasyarat untuk diagnosis sitologi dengan benar. Jika fiksasi jaringan seperti yang disebutkan pada topik di atas hanya dilakukan dengan tahap perendaman, berbeda dengan fiksasi pada sediaan sitologik terbagi menjadi beberapa bagian yaitu fiksasi kering, fiksasi lembab dan fiksasi basah. Pada jenis fiksasi basah, sediaan sitologik harus direndam dalam larutan fiksasi terpilih segera setelah pengambilan spesimen sitologi masih dalam kondisi yang lembab. Fiksasi spesimen sitologi yang dilakukan dengan segera dilakukan guna mencegah pengeringan dan perubahan bentuk sel akibat faktor luar. Hasil dari fiksasi tersebut akan memungkinkan pewarnaan menjadi jelas dan tentunya menghasilkan diagnosis yang benar. Lain halnya ketika fiksasi sitologi dilakukan dengan teknik pengeringan, metode ini dilakukan untuk sel-sel yang relatif kuat dari faktor lingkungan dan digunakan untuk jenis pewarnaan yang memiliki prinsip sederhana.

Idealnya fiksasi yang dilakukan pada sediaan sitologik hampir sama kriteria dengan fiksasi yang dilakukan pada sediaan jaringan. Kriteria-kriteria yang harus diperhatikan dalam fiksasi sediaan sitologik adalah :

- a. Mempenetrasi sel dengan cepat
- b. Minimal menjaga sel dari kerusakan atau kehilangan komponen sel layaknya ketika sel masih dalam kondisi hidup.
- c. Menjaga secara struktur sel maupun komponen sel (kimiawi, enzimatik, imunologi)
- d. Menghentikan proses metabolisme autolisis
- e. Menghentikan pertumbuhan selular dan mikroorganisme.
- f. Meningkatkan diferensiasi optik dan meningkatkan pewarnaan struktur dan komponen sel.

Seperti yang telah disebutkan di atas, fiksasi dari sediaan sitologik terbagi menjadi beberapa bagian yaitu :

1. Fiksasi basah

Fiksasi basah merupakan tindakan fiksasi dimana sediaan sitologik masih dalam kondisi basah atau lembab. Metode ini adalah metode yang ideal untuk menjaga suatu sediaan sitologik baik sitologi ginekologi ataupun sitologi non-ginekologi. Larutan fiksasi basah dapat terdiri dari :

- a. Alkohol 95-96%.

Larutan ini merupakan larutan fiksatif yang ideal yang dianjurkan di sebagian besar laboratorium sitologi. Hasil dari fiksasi ini menghasilkan karakteristik inti

yang ideal. Alkohol 95-96 ini adalah larutan dehidrasi dan dapat menyebabkan penyusutan sel karena akan menggantikan air di dalam sel. Penggunaan ethanol absolutpun sebenarnya dapat dilakukan, namun biaya yang dikeluarkan relatif lebih besar. Dalam teori lain menyebutkan bahwa dengan pemberian alkohol 95-96% ini akan membuat sel menjadi lebih kuat merekat dengan kaca sediaan dibandingkan ketika sediaan basah dimasukkan ke dalam konsentrasi yang lebih rendah.

b. Methanol absolut.

Methanol absolut ini merupakan larutan fiksasi yang digunakan untuk sediaan berbasis cairan seperti *Thin prep*, *Sure prep* dan lain sebagainya. Penggunaan larutan ini sebenarnya baik karena menghasilkan sediaan yang tidak begitu menyusut jika dibanding dengan alkohol 95-96%.

c. Eter: alkohol 95%

Fiksasi basah menggunakan campuran eter : alkohol 95% = 1:1 merupakan fiksasi awal yang digunakan untuk fiksasi sediaan pap smear. Hasil dari fiksasi menggunakan campuran ini menghasilkan sediaan yang lebih baik dibanding dengan alkohol 95-96%. Namun eter yang digunakan memiliki sifat yang berbahaya, berbau dan mudah mengikat air di sekitar (higroskopis).

d. Propanol dan isopropanol 80%

Propanol dan isopropanol menyebabkan penyusutan sel lebih sedikit dari eter-etanol atau metanol. Dengan menggunakan persentase lebih rendah dari alkohol ini penyusutan diseimbangi oleh efek pembengkakan akibat air yang ada dalam larutan fiksasi. Oleh karena itu 80% propanol atau isopropanol merupakan pengganti etanol 95-96% yang direkomendasikan.

e. Denaturasi alkohol

Denaturasi alkohol ini merupakan etanol yang telah diubah dengan penambahan aditif sehingga tidak cocok untuk dikonsumsi oleh manusia. Ada banyak formula yang berbeda untuk denaturasi alkohol. Namun dari semua denaturasi alkohol, pada dasarnya semua mengandung etanol sebagai bahan utama, dan karenanya ini dapat digunakan pada konsentrasi 95% atau 100%. Salah satu formulasi yang telah digunakan adalah campuran dari 90 bagian etanol 95% + 5 bagian 100% methanol + 5 bagian 100% isopropanol.

f. Formalin Based

Formalin Based yang digunakan untuk sediaan sitologik yang ditargetkan pada pemeriksaan imunologi

2. Fiksasi "Coating"

Fiksatif Coating merupakan fiksasi yang dilakukan untuk pengganti fiksatif basah. Fiksasi ini dilakukan dengan memberikan aerosol (penyemprotan) pada spesimen sitologi yang dibuat secara konvensional maupun dengan metode berbasis cairan. Fiksasi ini terdiri dari alkohol dan polietilen glicol yang berfungsi sebagai pelapis dari sediaan sitologik. Fiksasi dengan

menyemprotkan lapisan diaphine (Hairspray) dengan kandungan alkohol yang tinggi dan minimal lanolin atau minyak dapat juga menjadikannya fiksatif yang efektif.

Sebagian besar agen-agen ini memiliki aksi ganda dalam fungsinya yaitu dengan menjaga sel dari kerusakan (fiksasi) dan pada saat kering akan membentuk lapisan tipis sebagai pelindung di atas sediaan sitologik itu. Fiksatif ini sangatlah praktis untuk situasi di mana sediaan sitologik harus dikirim ke laboratorium sitologi yang berjarak jauh dari tempat pengambilan spesimen. Namun metode ini tidak dianjurkan untuk sediaan berbasis cairan dan jika tempat pengambilan spesimen tidak berjarak jauh dengan laboratorium sitologi. Jarak semprot antara sediaan dengan larutan fiksatif aerosol akan mempengaruhi hasil dari sediaan sitologik. Jarak yang ideal dalam penyemprotan adalah 10 sampai 12 inci (25-30 cm). Fiksasi “**coating**” ini tidak dianjurkan untuk sediaan sitologik yang banyak mengandung darah, hal ini dikarenakan akan terjadi penggumpalan eritrosit. Lilin dan minyak dari larutan fiksasi itu harus dibuang ketika hendak diwarnai dengan dengan cara perendaman di larutan alkohol 95% selama semalam.

3. Fiksasi Kering

Fiksasi kering merupakan fiksasi yang dilakukan pada sediaan sitologik yang dilakukan dengan mengeringkan sediaan tersebut di udara terbuka (udara kering) atau dengan bantuan pemanasan hingga kering (penggunaan hotplate dengan suhu maksimum 50°C). Sediaan sitologik harus diproses dan dikeringkan dengan segera untuk menghindari munculnya artefak. Salah satu keuntungan dari fiksasi ini adalah pembuatan dan pewarnaan yang cepat (2-3 menit). Pewarnaan cepat berguna dalam penilaian awal dari kelayakan spesimen sebelum pasien diperkenankan untuk meninggalkan ruang pengambilan spesimen. Untuk sediaan yang menargetkan koloid, mucin, butiran sitoplasma endokrin dan lain-lain akan lebih baik jika dilakukan fiksasi kering. Hal ini juga berguna pada pasien dengan indikasi keganasan hematologi seperti limfoma atau leukemia.

4. Fiksasi Khusus

a. Fiksasi Carnoy

Fiksasi ini adalah fiksasi yang dikhususnya untuk spesimen yang hemoragik. Asam asetat dalam larutan fiksatif ini akan melisiskan sel darah merah. Fiksasi ini sangat baik untuk melihat detail dari inti serta pengawet untuk glikogen. Namun fiksasi ini akan menghasilkan penyusutan pada sel dan cenderung menghasilkan pewarnaan yang lebih di hematoxylin. Kelebihan waktu dalam fiksasi inipun akan menyebabkan kerusakan pada materi kromatin.

Ketika fiksasi ini digunakan, sediaan yang dibuat harus dalam kondisi segar dan segera dibuang ketika selesai pengamatan. Hal ini dikarenakan nilai efektivitasnya akan berkurang dan dapat menyebabkan negatif palsu dan selain itu dapat pula menghasilkan reaksi pembentukan asam hidroklorit dari khloroform yang digunakan.

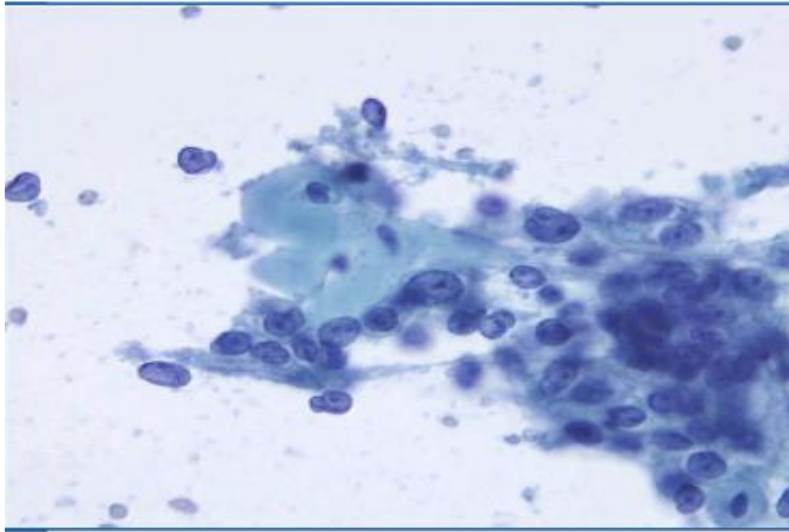
b. Fiksasi Cair (FAA)

Fiksasi ini merupakan fiksasi yang baik ketika akan membuat “cell block” ataupun dalam pengamatan sel dalam kondisi segar (penggunaan di parasit, mikologi dan lain sebagainya).

Adapun perbedaan dari fiksasi basah dan kering adalah sebagai berikut :

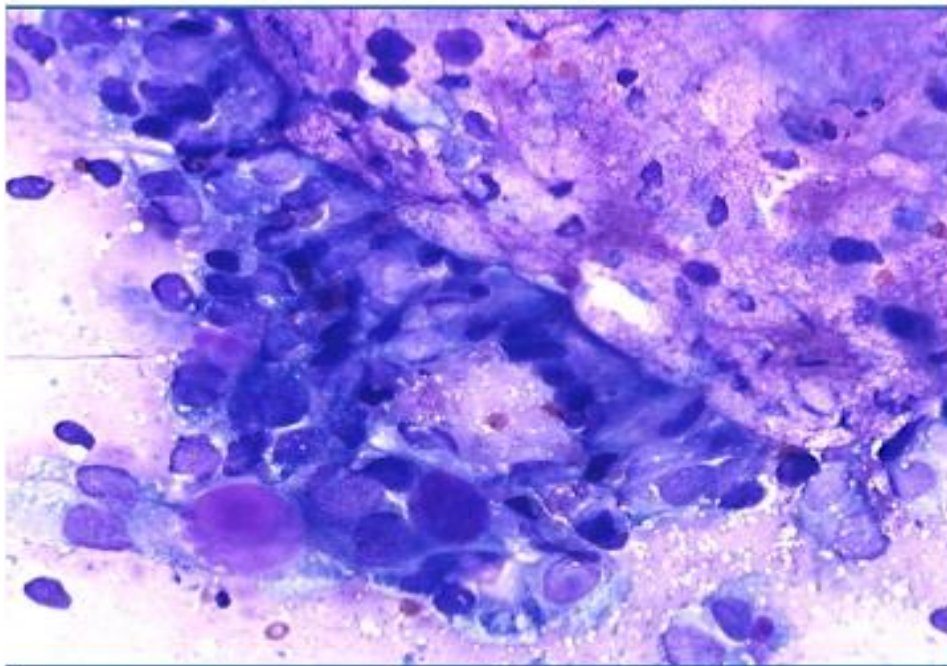
Tabel 4.1. Perbedaan Penggunaan Teknik Fiksasi Sitologik

Kriteria	Fiksasi Basah	Fiksasi Kering
Pewarnaan	Papanicolaou	Wright atau Giemsa
Detail Komponen Sel	<ul style="list-style-type: none"> • Inti • Anak Inti • Perbedaan kematangan sitoplasma dan keratin • Oncocyte • Badan plasmoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Sitoplasma • Stroma • Mucin dan koloid • Butiran sekret • Inti bipolar telanjang
Lymphoid	<ul style="list-style-type: none"> • Batas inti • Pola kromatin • Anak inti 	<ul style="list-style-type: none"> • Badan lymphoglandular • Basophilia sitoplasma • Vakuola lipid



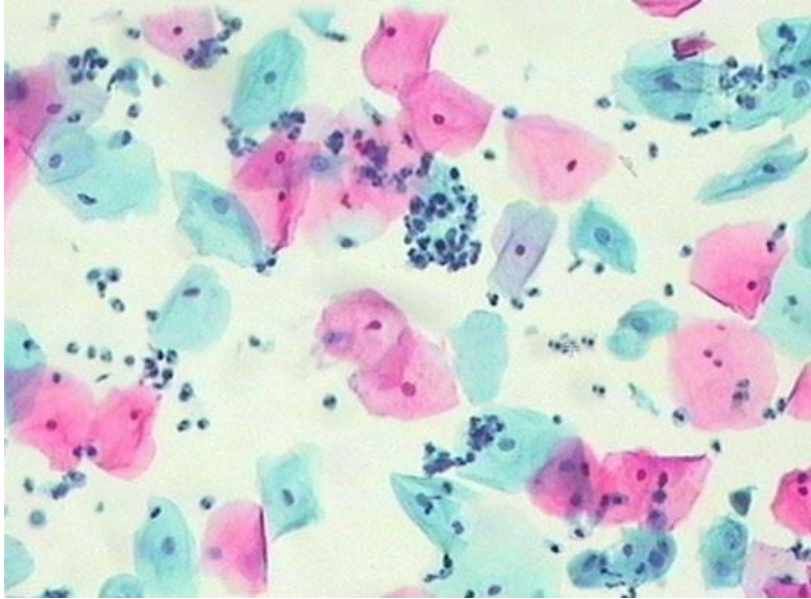
Gambar 4.9. hasil dari sediaan sitologik yang difiksasi dengan fiksasi basah, dimana terlihat komponen inti yang jelas.

(Sumber : Rupinder, 2013)



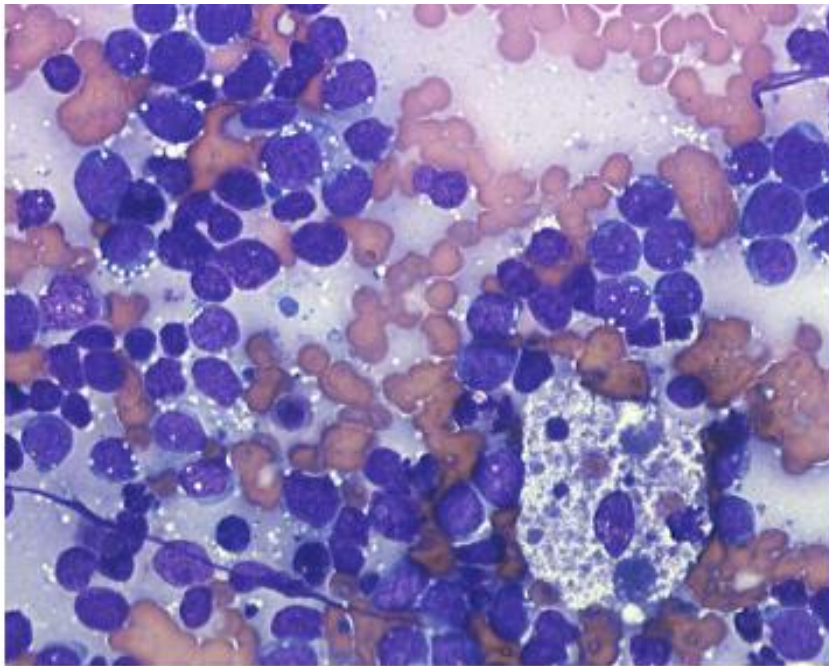
Gambar 4.10. Hasil dari fiksasi kering yang menunjukkan tidak jelasnya inti dari sel. Namun pada fiksasi ini yang menjadi target adalah produksi mucin.

(Sumber : Rupinder, 2013)



Gambar 4.11. Sediaan sitologik servik yang menunjukkan tingkatan kematangan sel dilihat dari komponen sitoplasmanya. Fiksasi sediaan dilakukan dengan fiksasi basah

(Sumber : Rupinder, 2013)



Gambar 4.12. Sediaan sitologik yang menunjukkan vakuola lipid dengan warna yang bening. Fiksasi sediaan dilakukan dengan fiksasi kering.

(Sumber : Rupinder, 2013)

Latihan

Setelah Anda membaca beberapa tentang jenis-jenis fiksasi untuk sediaan sitologik, mari kita mencoba untuk mengerjakan latihan ini. Ambil contoh urin pagi yang pertama kali keluar (First Voided) kurang lebih 10 cc. Homogenkan urin tersebut dan bagi menjadi 2 buah bagian yang sama besar. Pada wadah 1 berikan larutan alkohol 95% dengan perbandingan 1:4 (total 20 cc) dan pada wadah 2 tidak diberikan apapun. Diamkan wadah 1 dan 2 selama semalam. Ketika melewati semalam pada wadah 1 buang kurang lebih 15 cc dari wadah (jangan dihomogenkan). Setelah dibuang homogenkan wadah 1 dan wadah 2 kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Buat apusan sitologi (baca topik pembuatan sediaan sitologik) masing-masing wadah sebanyak 3 sediaan. Kemudian amati menggunakan mikroskop.

Tabel 4.3. Kegiatan Belajar Dekalsifikasi

No	Proses Fiksasi	Jumlah Sel yang Ditemukan
1	Sediaan 1 dari wadah 1	Tidak ada/sedikit/banyak
2	Sediaan 2 dari wadah 1	Tidak ada/sedikit/banyak
3	Sediaan 1 dari wadah 1	Tidak ada/sedikit/banyak
4	Sediaan 2 dari wadah 1	Tidak ada/sedikit/banyak

Petunjuk pengerjaan.

Pada saat pengamatan menggunakan mikroskop, gunakan lapang pandang 100x (okuler 10x dan objektif 10x). Baca secara sekilas seluruh lapang pandang dari sisi kiri sediaan sitologik hingga sisi kanan sediaan secara zig-zag. Kemudian coret bagian yang tidak sesuai. Contoh jika ditemukan sel banyak maka coret bagian yang tidak ada dan sedikit.

Ringkasan

Teknik fiksasi pada sediaan sitologik pada dasarnya hampir sama dengan sediaan jaringan. Tahap inipun sangatlah penting diketahui oleh seorang teknisi laboratorium patologi anatomi. Pemilihan larutan fiksasi tentu tergantung dari target diagnosis, jarak tempuh dari tempat pengambilan spesimen dengan laboratorium sitologi hingga waktu yang diperlukan untuk mempercepat penentuan diagnosis. Adapun jenis-jenis fiksasi yang umum digunakan di laboratorium sitologi adalah fiksasi basah yang digunakan untuk pewarnaan papanicolaou dan fiksasi kering untuk pewarnaan Giemsa. Namun jika jarak pengambilan spesimen jauh dengan laboratorium sitologi (tempat pewarnaan dan pengamatan) maka fiksasi yang digunakan adalah fiksasi “coating” menggunakan “spray”.

Tes 3

- 1) Berikut ini spesimen yang membutuhkan teknik fiksasi basah adalah ?
 - A. Pap smear
 - B. Mucin
 - C. Vakuolasi lipid
 - D. bakteri
 - E. urin

- 2) Berikut ini hal-hal yang harus diperhatikan ketika menggunakan fiksasi “Coating”, adalah:
 - A. Jarak tempuh
 - B. Jenis spesimen
 - C. Jenis pewarnaan
 - D. Jumlah pasien
 - E. Jumlah spesimen

- 3) Ketika seorang dokter spesialis ingin mengamati vakuolasi lipid, maka sediaan sitologik yang didapat harus dilakukan dengan teknik ?
 - A. Fiksasi basah
 - B. Fiksasi kering
 - C. Fiksasi “coating”
 - D. Fiksasi Khusus (FAA)
 - E. Fiksasi Khusus (Carnoy)

- 4) Fiksasi yang paling ideal untuk media transport adalah ?
 - A. Fiksasi basah
 - B. Fiksasi kering
 - C. Fiksasi “coating”
 - D. Fiksasi Khusus (FAA)
 - E. Fiksasi Khusus (Carnoy)

- 5) Jenis larutan fiksasi yang baik untuk membuat sediaan yang segar adalah ?
 - A. Fiksasi basah
 - B. Fiksasi kering
 - C. Fiksasi “coating”
 - D. Fiksasi Khusus (FAA)
 - E. Fiksasi Khusus (Carnoy)

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 2. Kunci jawaban ada di akhir dari topik ini. Setelah Anda menghitung jumlah jawaban yang benar, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 100% = baik sekali

80% = baik

60% = cukup

<60% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, masuk ke dalam materi selanjutny dan jjiika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda tetap dapat melanjutkan topik selanjutnya namun dengan syarat Anda tetap membaca dan mempelajari kembali topik ini.

Kunci Jawaban Tes

Tes 1

1. D
2. A
3. C
4. C
5. B
6. A
7. C
8. E

Tes 2

1. A
2. E
3. B
4. A

Tes 3

1. A.
2. A.
3. B.
4. C
5. D

Daftar Pustaka

Bancroft, JD. Gamble, M, (2013) *Teory and practice of histological technique*, Philadelphia: Elseiver

Carson, F.L., Hadik, C., (2009) *Histotechnology : A self-instructional text*. 3rd Edition. Hongkong: American Society for Clinical Pathology Press.

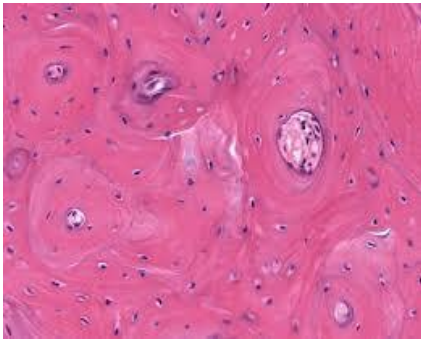
Rupinder, Shubra and Kanwal. (2013). Rehydration of Air-Dried Smears versus Wet Fixation: A Cross-Sectional Study. *Acta Cytol.* 57(4):364-8

Scientia, 101 Steps to better Histology. Leica Microsystems' Education Series

BAB V DEKALSIFIKASI

Erick Khristian, M.Si.

PENDAHULUAN



Sumber :<http://keywordsuggest.org>

Sistem kerangka pada manusia dewasa terdiri dari 206 tulang. Selain tulang utama terdapat pulan tulang rawan, tendon, ligamen serta gigi. Sistem rangka pada manusia dan hewan berfungsi sebagai pendukung bagi tubuh manusia, dan memberikan sebagai penyokong dalam mempertahankan struktur disekitarnya seperti jaringan ikat dan lain sebagainya. Selain sebagai penyokong, sistem kerangka berfungsi sebagai pelindung organ-organ vital seperti otak, jantung, paru-paru, ginjal, sumsum tulang belakang, hati dan tempat-

tempat lainnya. Namun ada juga fungsi dari tulang yang bertindak sebagai reservoir mineral, seperti kalsium dan fosfor yang diedarkan ke berbagai bagian dari tubuh melalui system peredaran darah.

Dalam dunia histoteknologi, tulang mendapatkan peran tertentu dalam suatu diagnosis penyakit. Penyakit yang menyerang jaringan tulang salah satunya adalah osteosarcoma atau yang biasa disebut dengan tumor tulang. Untuk mendiagnosis seseorang dikatakan osteosarcoma maka perlu dilakukan suatu pemeriksaan mikroskopis tulang. Biopsi salah satu merupakan cara yang terbaik untuk mengetahui penyakit osteosarkoma dan dapat juga membedakannya dari jenis kanker lainnya.

Dilema yang dialami oleh seorang teknisi laboratorium patologi anatomi dalam pembuatan sediaan tulang atau sediaan yang mengandung garam kalsium yang tinggi seperti pada necrotic Tuberculosis adalah kondisi yang sangat keras dalam melakukan pematangan dan juga pemotongan jaringan tersebut hingga tidak jarang kegagalan dalam proses pembuatan jaringan mengalami kegagalan hingga rusaknya pisau mikrotom. Namun teknik-teknik dalam pelunakan jaringan akibat adanya garam kalsium ditemukan sejak berpuluh-puluh tahun lamanya sehingga teknisi laboratorium patologi anatomi terbantu dengan penemuan itu, namun tetap saja hal-hal yang harus diperhatikan dalam pembuatan sediaan yang mengandung garam mineral kalsium tetap harus diperhatikan secara seksama. Untuk dapat mengatasi kekerasan pada jaringan karena adanya garam kalsium maka diperlukan teknik khusus yang disebut dengan dekalsifikasi. Untuk dapat memahami mekanisme dekalsifikasi, Anda perlu mempelajari, menerapkan dan memahami isi dari bab ini.

Pada bab ini Anda akan mempelajari dan menerapkan hal-hal yang berhubungan dengan teknik-teknik dekalsifikasi pada jaringan yang mengandung garam kalsium. Pembahasan dari bab ini dimulai dari prinsip kerja dekalsifikasi jaringan mengandung kalsium dan dilanjutkan dengan larutan apa saja yang dapat digunakan dalam proses tersebut. Dalam bab ini pula

✂ ■ Sitohistoteknologi ✂ ■

struktur dasar tulang akan dijelaskan dan pilihan metode untuk mempersiapkan pembuatan sediaan. Selain itu pula prosedur untuk dekalsifikasi, pemilihan larutan dan control kualitas untuk melihat keberhasilan proses dekalsifikasi akan dibahas dalam bab ini.

Setelah Anda mempelajari dan menerapkan bab ini, Anda diharapkan dapat :

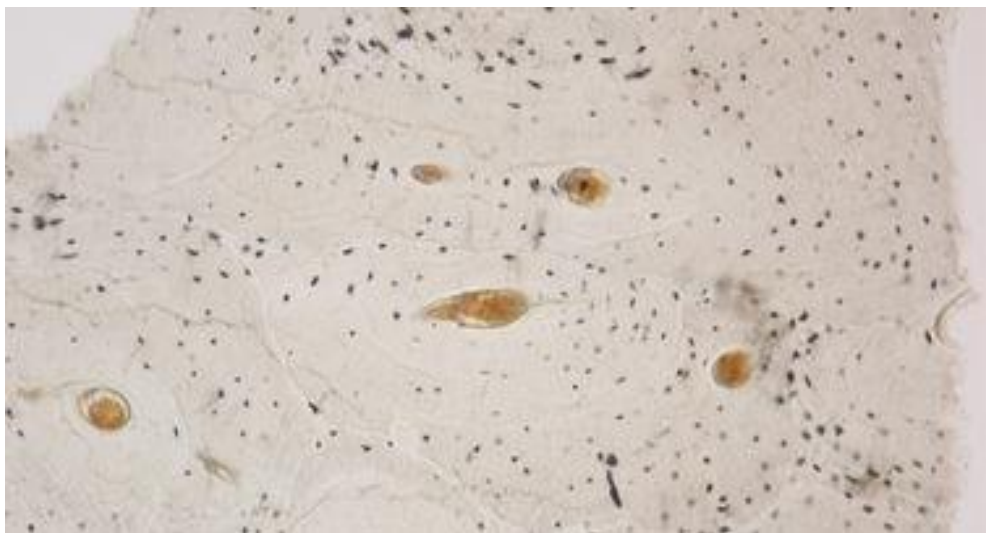
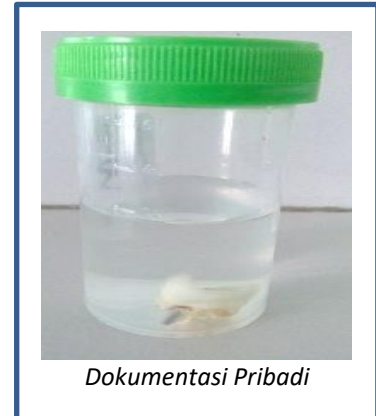
1. Menjelaskan tentang prinsip kerja pelunakan jaringan
2. Menerapkan prosedur pelunakan jaringan
3. Menerapkan larutan-larutan pelunakan jaringan di laboratorium
4. Menerapkan control kualitas dalam proses dekalsifikasi

Kemampuan Anda dalam melakukan proses dekalsifikasi jaringan dan memilih larutan sangatlah penting, selain untuk meningkatkan kinerja di laboratorium, diagnosis pasti menjadi hal yang utama dalam hasil kerja Anda.

Topik 1 Tulang

A. PRINSIP KERJA DEKALSIFIKASI

Ada beberapa pilihan yang diperlukan ketika seorang teknisi laboratorium patologi anatomi hendak menghasilkan sediaan yang berasal dari tulang atau jaringan tubuh lainnya yang mengandung garam kalsium. Dalam memilih teknik dan pengolahan metode, Anda harus pertimbangan jenis diagnosis apa yang diminta oleh dokter spesialis. Sebagai contoh jika penyakit tulang metabolik yang sedang diselidiki dan perlu untuk membedakan tulang yang termineralisasi dari osteoid (Gambar 5.1), atau jika pengukuran morfometrik yang diperlukan, mungkin perlu untuk mempertahankan dan menunjukkan kandungan mineral dari bagian tulang yang tidak ter-dekalsifikasi. Jika perlu dipertahankan kandungan mineral (Gambar 5.2) dari sediaan tersebut maka teknik yang digunakan adalah menanam jaringan tersebut pada resin atau acrylic sehingga penyokong jaringan tersebut memiliki kekerasan yang sama dengan tulang ketika dilakukan pemotongan tipis.

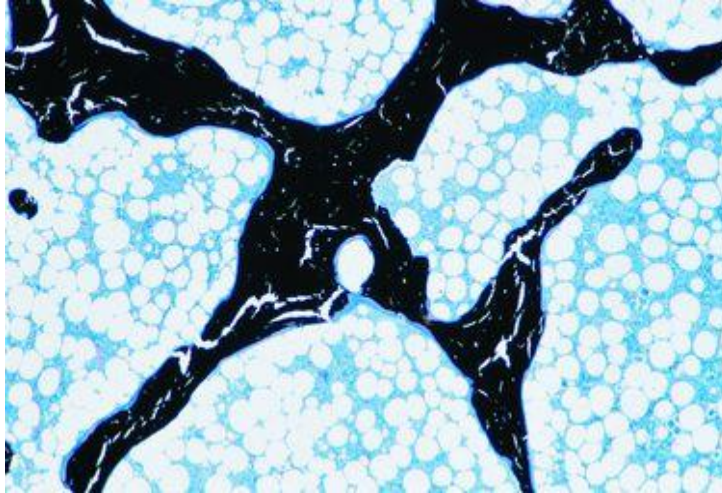


Gambar 5.1. Deposit pada Tulang

Sumber (<http://www.leicabiosystems.com>)

Pada Gambar 5.1. di atas terlihat sebuah substansi dasar yang mengandung komponen tulang yang padat. Sejumlah osteons (sistem Havers) terlihat ketika tulang dipotong secara melintang. Osteons terdiri dari lapisan konsentris tulang (lamela) yang mengelilingi saluran

Havers yang mengandung pembuluh darah. Dalam lamelaterdapatruang kosong yang dapat mengandung osteosit. Di bagian substansi dasar akan muncul struktur berwarna hitam karena adanya partikel yang abrasif atau udara yang terperangkap di dalamnya.



Gambar 5.2. Deposit Kalsium pada Tulang Tanpa Dekalsifikasi

Sumber (<http://www.leicabiosystems.com>)

Pada Gambar 5.2 di atas terlihat sediaan tulang yang tidak dilakukan dekalsifikasi (pewarnaan Von Kossa). Tulang difiksasi dengan formalin dan diproses serta ditaman di dalam resin. Kalsium dalam tulang akan berwarna hitam dan batasan dari osteoid pada permukaan berwarna biru bernoda seperti komponen dari sumsum tulang. Meskipun jaringan diproses dengan polimer resin, keretakan tetap akan terjadi akibat proses pematangan jaringan.

Namun Anda perlu perhatikan, bahwa tidak semua jenis microtome mampu memotong tulang dan Anda memerlukan pisau khusus untuk memotongnya. Lain halnya ketika Anda diminta untuk menyediakan sediaan yang berasal dari tulang atau jaringan keras yang mengandung garam kalsium tanpa harus mempertahankan garam kalsiumnya, maka Anda perlu melakukan teknik dekalsifikasi.

Dekalsifikasi adalah prosedur rutin dengan tujuan membuat jaringan yang mengandung garam mineral tanpa harus mempertahankan garam mineral tersebut. Dekalsifikasi dapat juga dikatakan teknik untuk menghilangkan mineral dari tulang atau jaringan yang mengandung garam kalsium lain sehingga seorang teknisi laboratorium patologi mampu membuat sediaan yang baik tanpa adanya kerusakan akibat jaringan yang keras.

Dekalsifikasi dilakukan mengingat jaringan yang mengandung garam mineral tersebut harus dapat kompatibel dengan media penanaman. Tingkat kompatibilitas jaringan dengan media penanam penting dalam memotong *block* untuk menghasilkan pita jaringan dan proses pewarnaan selanjutnya. Media penanaman yang paling umum dalam pembuatan sediaan histologi adalah parafin atau paraplast. Proses dekalsifikasi harus dapat menyesuaikan substansi keras tulang dengan kelembutan media penanam. Selain itu juga metode dekalsifikasi tergantung pada kekuatan, suhu dan volume dan konsentrasi larutan

dekalsifikasi, konsistensi jaringan sekitarnya dan jenis pemeriksaan yang akan ditargetkan sebagai bahan diagnostik.

Garam kalsium biasanya terdapat pada tulang dan gigi atau dalam kondisi patologis. Ada dua jenis kalsifikasi patologis. Bentuk pertama disebut kalsifikasi distrofi dimana garam kalsium disimpan di dalam sel atau jaringan di sekitarnya yang telah rusak atau terluka oleh penyakit, misalnya pada penyakit TBC atau perubahan akibat kanker. Bentuk kalsifikasi kedua terlihat di bagian lesi dan mungkin terjadi sebagai hasil proses patologis. Kondisi ini disebut sebagai endapan metastatic, contohnya pada hipertiroidisme dimana ada perubahan metabolisme kalsium yang menyebabkan peningkatan kadar kalsium dalam darah.

Prinsip dekalsifikasi didasarkan pada penghilangan kation kalsium melalui mekanisme anion. Anion berasal dari larutan dekalsifikasi yang biasanya berupa larutan asam. Larutan dekalsifikasi yang baik harus dapat menghilangkan semua kalsium tanpa memberikan efek buruk pada sel atau serat jaringan dan tanpa gangguan impregnasi atau pewarnaan berikutnya. Selain larutan asam, larutan penyangga dengan pH 4.4-4.5 dan zat pengelat yang baik seperti asam etilen diamina tetra-asetat, dapat dijadikan larutan dekalsifikasi yang baik. Semua larutan dekalsifikasi asam akan merusak dari senyawa organik yang berada pada substansi dasar tulang dan jaringan lain.

Sebelum jaringan dilakukan proses dekalsifikasi, jaringan tersebut harus dilakukan proses fiksasi terlebih dahulu. Jaringan keras yang tidak terfiksasi dengan baik, maka akan menyebabkan kerusakan pada jaringan lunak disekitarnya akibat agen dekalsifikasi. Fiksasi itulah yang nantinya akan melindungi jaringan lunak baik keseluruhannya atau setidaknya ada bagian kecil yang dapat dipertahankan. Teknik inilah yang disebut dengan teknik **fiksasi-potong makros-dekalsifikasi**. Namun ada juga teknik lainnya yang dilakukan dengan tahap **potong makros-fiksasi-dekalsifikasi**. Teknik yang sering digunakan dari kedua teknik tersebut adalah teknik **potong makros-fiksasi-dekalsifikasi**, meskipun banyak terjadi penyimpangan dari prosedur yang seharusnya. Namun Anda harus perhatikan bahwa tidak semuanya dapat dilakukan dengan teknik tersebut. Seperti halnya pasien yang didiagnosis tuberkulosis atau AIDS atau jaringan mengandung virus infeksius, maka pilihan teknik yang harus dilakukan adalah **fiksasi-potong makros-dekalsifikasi**, bahkan dengan teknik pematangan yang dipercepat.

Adapun terdapat berbagai langkah-langkah dasar dari dekalsifikasi yang disertai dengan fiksasi adalah sebagai berikut :

1. Metode potong makros – fiksasi - dekalsifikasi

- a. Potong jaringan yang mengandung garam kalsium dengan ketebalan 4-5 mm. Hal ini dilakukan untuk memastikan tahap fiksasi tercapai dan proses penghilangan garam kalsium tercapai. Jaringan yang terdekalsifikasi dengan ukuran ini diharapkan akan tercapai 2-3 jam. Untuk memastikan dekalsifikasi lengkap diperlukan untuk memeriksa setelah 2-3 jam tersebut.
- b. Ketika larutan fiksasi yang dipilih untuk tulang atau sumsum tulang adalah larutan Zenker atau Bouin, maka resiko jaringan rusak akan 4 kali lebih besar selama dekalsifikasi dari jaringan yang seharusnya dijaga.

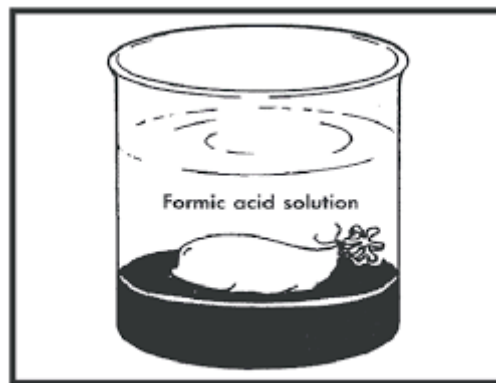
2. Metode fiksasi - potong makros - dekalsifikasi

- a. Jaringan yang berukuran tertentu direndam dalam larutan fiksasi (pastikan Anda pertimbangkan tujuan dari pembuatan sediaan sehingga larutan fiksatif dapat dipilih dengan baik)(lihat bab fiksasi)
- b. Setelah terfiksasi sempurna, jaringan dipotong dengan ketebalan kurang lebih 5 mm
- c. Rendam jaringan dengan larutan dekalsifikasi yang dibutuhkan selama 2-3 jam

B. PROSES DEKALSIFIKASI

Adapun proses dekalsifikasi secara umum adalah sebagai berikut:

1. Dengan menggunakan jaringan yang telah terparafinasi, blok dimasukkan kedalam larutan dekalsifikasi dengan perbandingan volume sekitar 50-100 kali dari blok jaringannya. Larutan dekalsifikasi dapat juga dicapai dengan menggunakan menghubungkan berupa kasa sehingga blok jaringan dapat berada pada dasar larutan, atau sedikit di bawah atau tengah-tengah jaringan bagian tengah cairan (Gambar 3).
2. Cairan harus diganti satu atau dua kali sehari sampai decalcification selesai. Hal ini sangatlah penting mengingat perkembangan proses dekalsifikasi dan kesempurnaan hasil.
3. Pada saat penyelesaian dekalsifikasi, jaringan langsung dipindahkan ke alkohol 70% selama 10 jam dengan beberapa kali pergantian larutan alcohol dengan konsentrasi yang sama.
4. Setelah 10 jam selesai dilakukan, maka jaringan dilanjutkan dengan proses pematangan jaringan.



Gambar 5.3. Pemberian kasa pada jaringan yang akan didekalsifikasi (Nagpal, 2016)

C. PRINSIP DASAR YANG DALAM TAHAP DEKALSIFIKASI.

Dalam melakukan proses dekalsifikasi, ada beberapa prinsip yang harus dijadikan acuan. Prinsip dari dekalsifikasi akan menentukan sejauh manaproses berlangsung dan tingkat keberhasilannya. Adapun prinsip dasar dekalsifikasi adalah sebagai berikut :

1. Pengurangan/penghilangan garam kalsium oleh larutan asam lemah
2. Pengurangan/penghilangan garam kalsium oleh penggunaan larutan mineral lemah yang dibarengi dengan pertukaran ion resin untuk menjaga larutan dekalsifikan bebas dari kalsium bebas.
3. Menggunakan *Chelating* agen EDTA.
4. Pengurangan/penghilangan garam kalsium yang menggunakan prinsip perubahan kalsium menjadi ion elektrolit dengan menggunakan listrik arus.

D. FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI DEKALSIFIKASI

Untuk memastikan waktu dekalsifikasi agar tidak terlalu lama ataupun terlalu cepat, maka ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam proses ini. Salah satunya adalah faktor-faktor yang mempengaruhi, antara lain :

1. Ketebalan tulang

Ketebalan tulang menjadi factor penting di dalam percepatan dekalsifikasi. Makin besar tulang yang diproses maka makin lama proses dekalsifikasi diperlukan. Untuk itulah Anda harus benar-benar mencari posisi mana yang diperlukan untuk pemeriksaan sehingga tidak bergitu banyak mengambil jaringan yang akan didekalsifikasi.

2. Kerapatan/densitas tulang

Kerapatan atau densitas dari tulang menjadi factor percepatan lainnya, dimana tulang yang banyak mengandung kalsium tentu akan membutuhkan waktu yang lama jika dibanding dengan tulang yang sedikit mengandung kalsium.

3. Suhu

Suhu merupakan salah satu factor yang dapat mempercepat proses dekalsifikasi, meskipun dengan penambahan suhu di dalam proses dapat meningkatkan derajat desktritif dari larutan asal yang digunakan khususnya ketika suhu yang digunakan sebesar 60 derajat celcius. Suhu yang tinggi bila diterapkan pada proses ini dapat mempengaruhi kualitas pewarnaan inti (intensitas menjadi berkurang), mengurangi keefektifan warna Masson Trichrome, Van Gieson dan juga pewarnaan *Periodic Acid Schiff* (PAS). Oleh karena itu suhu yang tinggi tidak dapat digunakan terutama pada daerah yang memiliki iklim tropis yang hangat.

4. Agitasi

Agitasi di dalam proses ini merupakan suatu kegiatan yang diberikan secara mekanik guna mempersepat proses dekalsifikasi. Agitasi jaringan akibat perendaman di larutan asam diminimalisir sekecil mungkin bahkan diharapkan tidak ada efek pada proses dekalsifikasi. Pengaruh agitasi pada dekalsifikasi masih kontroversial meskipun secara umum agitasi secara mekanik sudah dapat diterima di berbagai tempat, dimana dengan pemberian agitasi akan mempengaruhi pertukaran cairan di sekitar jaringan dengan reagen di sekitarnya.

5. Tekanan / Vakum

Pemberian vakum sebagai tindakan tambahan kadangkala dilakukan untuk menghilangkan gelembung dalam rongga-rongga tulang, namun ketika dibarengi dengan proses dekalsifikasi maka kerusakan jaringan sekitar harus dapat diminimalisir bahkan diharapkan tidak ada sama sekali. Pemberian vakum ini memiliki prinsip ketika tekanan dikurangi, maka kecepatan perpindahan larutan atau proses pelepasan kalsium akan lebih mudah tanpa ada pengaruh dari tekanan luar yang menghambat.

6. Volume Larutan

Pada dasarnya waktu dekalsifikasi akan menjadi cepat ketika kecepatan reaksi antara garam kalsium dengan larutan dekalsifikasi berjalan dengan baik. Ketika volume suatu larutan dekalsifikasi dinaikkan maka perbedaan tekanan antara jaringan yang akan didekalsifikasi dengan larutan dekalsifikasi tersebut akan meningkat dan berdampak terhadap percepatan dekalsifikasi.

Setelah Anda membaca beberapa teori yang disebutkan di atas, mari kita mencoba untuk mengerjakan latihan ini. Ambil contoh tulang yang memiliki bentuk relative sama, Anda dapat menggunakan tulang dari hewan. Kemudian potonglah tulang tersebut dengan alat bantu potong tulang atau gergaji kecil dengan ukuran kurang lebih 0,5x0,5x0,5 cm sebanyak 4 buah. Dari 4 buah potongan tulang tersebut, lakukan tahap dekalsifikasi dengan teknik yang berbeda seperti yang diberikan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1. Kegiatan Belajar Dekalsifikasi

No	Proses Dekalsifikasi	Waktu Proses	Keterangan Hasil
1	Normal pada suhu ruang	5 jam
2	Dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60 derajat celcius	5 jam
3	Disimpan di atas rotator	5 jam
4	Divakum menggunakan alat aspirator.	5 jam

Petunjuk pengerjaan. Isilah titik-titik di atas dengan hasil kegiatan berupa perubahan bentuk (Tetap/berubah), tekstur tulang (sangat Lunak/Sedikit Lunak/Masih Keras) dan kondisi larutan (Masih jernih/Terdapat endapan/keruh)

Ringkasan

Dekalsifikasi merupakan proses pengurangan atau penghilangan garam kalsium dalam jaringan yang mengandung banyak garam kalsium baik secara normal maupun patologis. Hal-hal yang harus diperhatikan dalam proses dekalsifikasi adalah : 1. Target utama pembuatan sediaan (pastikan penggunaan larutan dekalsifikasi tidak merusak jaringan/sel target); 2. Pemotongan ukuran yang berhubungan dengan jumlah larutan dan waktu pengerjaan; 3. Bantuan percepatan dekalsifikasi (suhu, agitas dan tekanan)

Tes 1

- 1) Berikut ini yang tidak mempengaruhi percepatan dekalsifikasi adalah ?
 - A. Suhu
 - B. Tekanan
 - C. Volume larutan
 - D. Agitas
 - E. Bentuk jaringan

- 2) Metode yang umum dilakukan dalam proses dekalsifikasi adalah :
 - A. Menggunakan asam lemah
 - B. Menggunakan kelistrikan
 - C. Menggunakan EDTA
 - D. Menggunakan ion transfer resin
 - E. Menggunakan larutan asam kuat

- 3) Setelah dilakukan dekalsifikasi, secara idealnya jaringan dimasukkan de dalam ?
 - A. Aquades
 - B. Formalin
 - C. Alcohol 70%
 - D. EDTA
 - E. Air mengalir

- 4) Berapa ukuran ideal jaringan yang akan didekalsifikasi
 - A. 2-3 mm
 - B. 4-5 mm
 - C. 1 cm
 - D. bebas
 - E. bisa lebih dari 1 cm

- 5) Hal-hal yang tidak perlu diperhatikan dalam proses dekalsifikasi
 - A. Sumber organ
 - B. Ukuran jaringan
 - C. Target pemeriksaan
 - D. Target waktu diagnosis
 - E. Jenis pewarnaan

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1. Kunci jawaban ada di akhir dari topik ini. Setelah Anda menghitung jumlah jawaban yang benar, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 100% = baik sekali

80% = baik

60% = cukup

<60% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, masuk ke dalam materi selanjutnya dan jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda tetap dapat melanjutkan topik selanjutnya namun dengan syarat Anda tetap membaca dan mempelajari kembali topik ini.

Topik 2 Larutan Dekalsifikasi

Pemilihan larutan dekalsifikasi atau yang disebut dengan agen dekalsifikasi sangatlah penting, mengingat tujuan dari dekalsifikasi. Seperti yang telah disebutkan di kegiatan belajar 1 ketika jaringan sekitar harus dipertahankan semaksimal mungkin, maka jenis larutan fiksasi hingga larutan dekalsifikasi mesti menjadi pertimbangan. Selain dari sel-sel yang harus dipertahankan dalam suatu pembuatan sediaan, waktu dekalsifikasipun mesti diperhatikan. Materi di atas menyebutkan waktu dekalsifikasi dapat mencapai 2-3 jam, namun pastikan kembali apa yang menjadi target pemeriksaan, ukuran dan jenis larutan fiksasi. Namun dibalik semua materi yang ada, kenyataannya waktu yang diperlukan untuk melakukan dekalsifikasi dapat menghabiskan waktu hingga hitungan hari bahkan mencapai minggu. Hal ini pula yang harus diperhatikan dalam proses dekalsifikasi mengingat pengobatan dan terapi yang diberikan pasien tergantung dari hasil sediaan yang dihasilkan.

Kriteria dari larutan dekalsifikasi yang baik adalah sebagai berikut :

1. Dapat menghilangkan garam kalsium dengan sempurna.
2. Tidak menyebabkan kerusakan sel-sel, jaringan atau serat yang ada disekitar area yang mengandung garam kalsium.
3. Tidak mempengaruhi pewarnaan yang dilakukan.
4. Waktu yang dibutuhkan sesingkat mungkin.

A. PEMBAGIAN LARUTAN DEKALSIFIKASI

Adapun larutan dekalsifikasi terbagi menjadi 3 bagian utama yaitu :

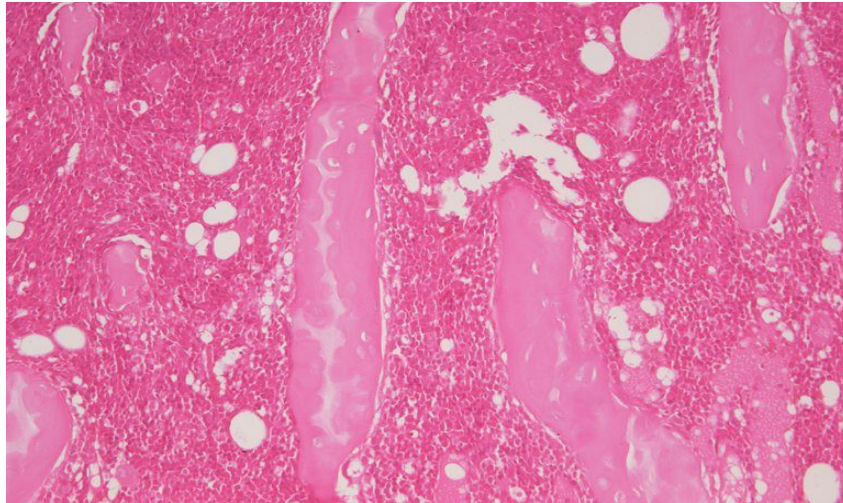
1. Yang didasarkan pada asam mineral kuat

Asam kuat seperti asam klorida atau nitrat pada konsentrasi hingga 10% merupakan larutan dekalsifikasi yang paling cepat dalam proses dekalsifikasi. Namun jika penggunaan larutan ini menggunakan waktu yang berlebihan akan menyebabkan hilangnya pewarnaan inti dan dapat menyebabkan jaringan menjadi lebih basah sehingga sulit untuk dilakukan pematangan jaringan. Larutan asam kuat ini merupakan larutan yang di klaim cepat dalam pengerjaannya. Asam kuat yang paling sering digunakan adalah asam klorida. Penggunaan asam klorida dalam dekalsifikasi harus digunakan secara konservatif dengan memperhatikan petunjuk yang disediakan untuk menghasilkan sediaan yang baik. Gambar 4 menunjukkan konsekuensi dari dekalsifikasi jangka panjang dengan penggunaan asam kuat di luar waktu yang tepat.

Berikut ini adalah larutan yang termasuk ke dalam asam kuat dan dijadikan sebagai larutan dekalsifikasi.

Tabel 5.2. Larutan Dekalsifikasi Berdasarkan Asam Kuat

No	Larutan Dekalsifikasi	Formula	Keterangan
1	Asam Nitrit	5% dalam aquades	Cepat dalam proses dekalsifikasi, dan jika melebihi batas waktu akan mengurangi kualitas dari pewarnaan inti
2	Parenyi's	10% asam nitrat sebanyak 40 ml 0,5% asam kromat sebanyak 30ml Alkohol Absolut 30ml	Sebuah larutan dekalsifikasi tradisional membutuhkan waktu lebih lambat dari asam nitrat encer. Cukup baik dalam proses dekalsifikasi, namun jika melebihi endpoint tetap akan akan mengganggu pewarnaan.
3	Asam Klorida (HCl)	5-10% dalam aquades	sebelum menggunakan larutan ini, Formalin harus dicuci terlebih dahulu dari spesimen sebelum menempatkan di HCl untuk menghindari pembentukan bis-klorometil eter (karsinogen). Cepat dalam proses dekalsifikasi, dan jika melebihi endpoint akan mengganggu pewarnaan.
4	Larutan Von Ebner's	Natrium klorida jenuh sebanyak 50 ml Aquades 42 ml 8 ml asam klorida	Cepat di dalam proses dekalsifikasi, jika melebihi waktu dekalsifikasi akan mengganggu pewarnaan



Gambar 5.4. Sediaan Tulang yang Telah di Dekalsifikasi

(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)

Pada Gambar 5.4. di atas bagian dari tulang yang dilakukan dekalsifikasi dan diwarnai dengan Hematoxilin Eosin. Spesimen ini didekalsifikasi dengan asam klorida untuk waktu yang berlebihan tanpa menggunakan tes endpoint yang tepat. Meskipun elemen jaringan masih terlihat dengan baik namun hasil pewarnaan menunjukkan adanya inti yang sangat buruk sehingga sulit dibedakan dengan pewarnaan eosin.

2. Yang didasarkan pada asam organik lemah

Asam lemah yang sering digunakan sebagai larutan dekalsifikasi adalah asam format. Asam format dapat digunakan secara sederhana dengan konsentrasi sebesar 10% atau dikombinasikan dengan formalin atau dengan larutan penyangga. Meskipun lebih lambat dibandingkan dengan larutan asam kuat, namun hasil yang diperoleh jauh lebih baik dan cenderung tidak mengganggu pewarnaan nuklir. Larutan asam format yang diberikan bersamaan dengan formalin diklaim sangat baik dalam proses dekalsifikasi serta tidak mempengaruhi di dalam hasil pewarnaan. Larutan asam lemah lainnya yang digunakan adalah asam trichloroacetic (TCA) dan juga asam pikrat.

Berikut ini adalah formula larutan dekalsifikasi yang menggunakan asam lemah sebagai komponen utamanya.

Tabel 5.3. Formula Larutan Dekalsifikasi Asam Lemah

No	Larutan Dekalsifikasi	Formula	Keterangan
1	Asam Format	10 % dalam aquades	Larutan dekalsifikasi yang sederhana dan baik dalam hasilnya

					namun memiliki waktu pengerjaan yang lebih lama
2	Evans and Krajian	Asam format sebanyak 25 ml Natrium Sitrat 10 gram Aquades 75 ml			Larutan dekalsifikasi menggunakan asam format yang efektif yang bersifat penyangga dengan penambahan sitrat. Hasil lebih baik karena tidak mempengaruhi pewarnaan namun waktu yang digunakan lebih lama
3	Kristensen	Asam format sebanyak 18 ml Natrium format 3.5g Aquades sebanyak 82 ml			Larutan dekalsifikasi menggunakan asam format yang efektif yang bersifat penyangga dengan penambahan natrium format. Hasil lebih baik karena tidak mempengaruhi pewarnaan namun waktu yang digunakan lebih lama

4	Gooding and Stewart	asam format sebanyak 5-25ml 40% formaldehida sebanyak 5ml Aquades sebanyak 75ml	Larutan dekalsifikasi yang didampingi dengan proses fiksasi dengan formalin. Hasil lebih baik karena tidak mempengaruhi pewarnaan namun waktu yang digunakan lebih lama
---	---------------------	---	---

3. Larutan chelating

Larutan *Chelating* seperti asam ethylenediaminetetracetic (EDTA), bekerja dengan menangkap ion kalsium dari permukaan kristal apatit, dan secara perlahan-lahan mengurangi ukurannya. Proses ini sangat lambat tapi akan menghasilkan sediaan yang maksimal bahkan dapat membutuhkan waktu hingga beberapa hari atau minggu tergantung dari ukuran dan kerapatan kalsium dalam tulang. Larutan dekalsifikasi ini tidak ini tidak cocok untuk spesimen yang mendesak tetapi lebih tepat jika diaplikasikan di dalam penelitian. Hasil dari penggunaan larutan dekalsifikasi akan menghasilkan kualitas morfologi yang sangat baik jika elemen tertentu di dalam jaringan masih diperlukan. Penggunaan EDTA ini dilakukan jika pewarnaan menggunakan pewarnaan khusus seperti pewarnaan imunohistokimia, FISH (Flourosens Insitu Hibridisasi) atau PCR. Larutan ini menggunakan konsentrasi sekitar 14% sebagai larutan yang dikondisikan netral. Rata-rata EDTA akanmeng-dekalsifikasi tulang tergantung akan pH yang dikondisikan. Larutan EDTA sebagai dekalsifikasi yang umum digunakan ada pada pH berkisar 7. Larutan ini akanbekerja lebih cepat jika dikondisikan pada pH 10 namun perlu diperhatikan adanya beberapa elemen jaringan yang rusak pada pH basa.

Berikut ini adalah tabel formula dari larutan EDTA sebagai larutan dekalsifikasi.

Tabel 5.4. Formula larutan dekalsifikasi EDTA

No	Larutan Dekalsifikasi	Formula	Keterangan
1	Netral EDTA	Garam dinatrium EDTA 250g Aquades 1750ml Kondisikan ke pH 7,0	Larutan dekalsifikasi yang baik tanpa atau sedikit mengalami kerusakan jaringan

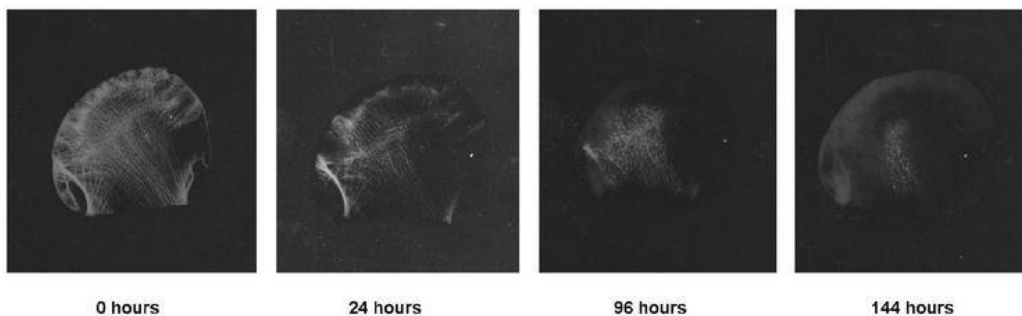
menambahkan	sekitarnya,	namun
natrium hidroksida	waktu	yang
(sekitar 25g).	diperlukan	sangat
	lama	

B. PENENTUAN WAKTU ENDPON DEKALSIFIKASI.

Didalam suatu proses dekalsifikasi, hasil yang berkualitas tinggi dan optimal menjadi suatu parameter yang penting. Untuk memperoleh hasil yang optimal tersebut, maka Anda perlu mengetahui *endpoin* atau titik maksimal suatu larutan sempurna melakukan tugasnya. *Endpoin* penting dalam dekalsifikasi karena dengan mengetahui *endpoin*, maka Anda akan mengetahui bahwa semua kalsium telah hilang namun tidak merusak terlalu besar pada jaringan di sekitarnya, bahkan jika proses dekalsifikasi mengalami kelebihan waktu dikhawatirkan kerusakan jaringan disekitarnya atau target sel menjadi hilang. Kelebihan dekalsifikasi sering terjadi pada penggunaan asam kuat sehingga merusak komponen pewarnaan yang bersifat basophilic seperti inti sel. Dalam beberapa keadaan kelebihan dekalsifikasi dapat menyebabkan maserasi pada elemen jaringan lunak. Adapun beberapa metode untuk melihat kualitas dekalsifikasi adalah sebagai berikut :

1. Metode X-ray

Metode ini merupakan metode terbaik dalam melihat kualitas dekalsifikasi, terutama ketika spesimen berukuran besar. Pemeriksaan menggunakan metode X-ray akan menunjukkan kerapatan dari sisa kalsium. Metode ini merupakan metode yang tepat jika ditujukan untuk mengikuti proses dekalsifikasi untuk spesimen yang besar (lihat Gambar 5.5).



Gambar 5.5: Hasil dari pemeriksaan menggunakan metode X-ray. Gambar menunjukkan proses dekalsifikasi menggunakan asam format / sitrat. Gambaran awal menunjukkan kadar garam kalsium yang tinggi, dan makin lama proses dekalsifikasi makin rendah intensitas warna yang muncul.

(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)

2. Pengujian Reaksi Kimiawi

Sebuah reaksi kimia sederhana dapat diterapkan ketika larutan dekalsifikasi menggunakan larutan bersifat asam terutama asam format. Adapun pengujian untuk dekalsifikasi menggunakan reaksi sederhana adalah sebagai berikut.

- a. Hapus 5 ml cairan dekalsifikasi bekas dari kapal pengolahan jaringan
- b. Menambahkan amonium hidroksida tetes demi tetes sampai pH larutan netral untuk kertas pH.
- c. Tambahkan 5 ml jenuh amonium oksalat dan kocok
- d. Memungkinkan untuk didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit.

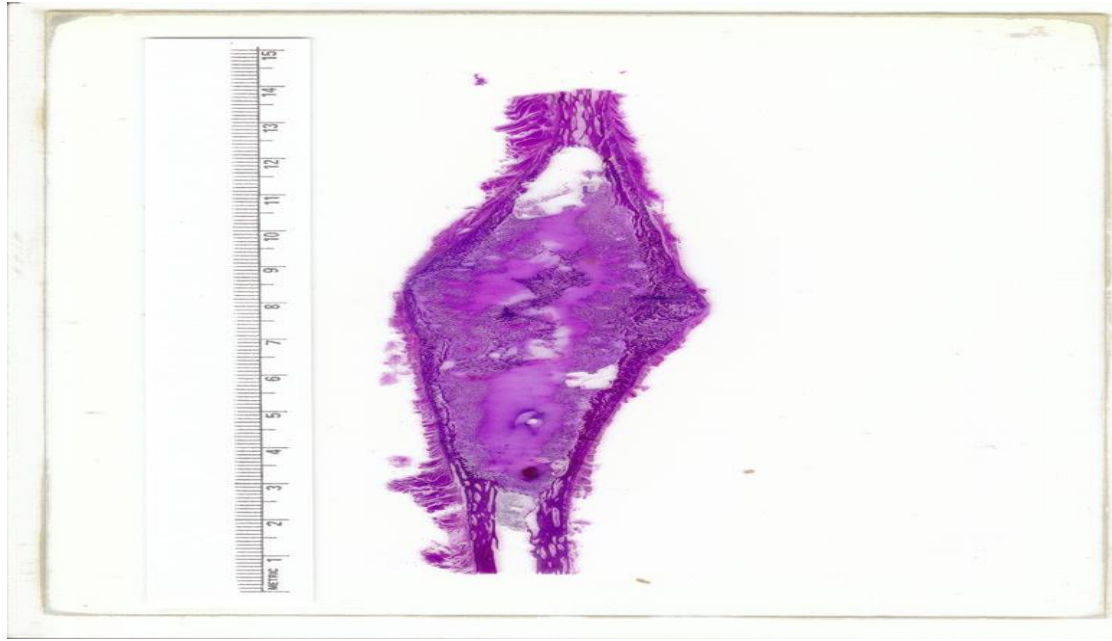
Interpretasi Hasil dari uji reaksi kimia sederhana

Pembentukan endapan (kalsium hidroksida) setelah penambahan amonium hidroksida menunjukkan adanya sejumlah besar kalsium yang terendapkan. Jika pembentukan endapan terjadi setelah penambahan amonium oksalat, maka larutan dekalsifikasi harus diganti dan jaringan dilanjutkan proses dekalsifikasi. Namun jika larutan tetap jernih selama 30 menit setelah penambahan oksalat maka jaringan telah selesai diproses kalsifikasi.

3. Tes Fisik

Tes fisik pada tahap dekalsifikasi membutuhkan beberapa tindakan manipulasi, membengkokkan tulang atau pengambilan sebagian kecil dari spesimen untuk “merasakan” sisa proses dekalsifikasi. Penggunaan metode ini mungkin bisa diaplikasikan oleh orang yang berpengalaman. Kerusakan mekanis dapat terjadi selama membengkokkan atau mengambil sebagian kecil dari spesimen. Metode ini akan berdampak jika spesimen yang didekalsifikasi sangat kecil, namun bias diaplikasikan pada spesimen yang berukuran besar. Hal ini dikarenakan tes fisik bias saja dilakukan berkali-kali hingga proses dekalsifikasi dikatakan selesai.

Waktu untuk proses dekalsifikasi kadang kala membutuhkan waktu yang lama, dan kesulitan yang sering dialami seorang teknisi adalah ketika waktu dekalsifikasi melewati akhir pekan. Alternatif untuk memperlambat proses dekalsifikasi adalah dengan mendinginkan spesimen di suhu 4 derajat Celcius untuk memperlambat proses dekalsifikasi tersebut.



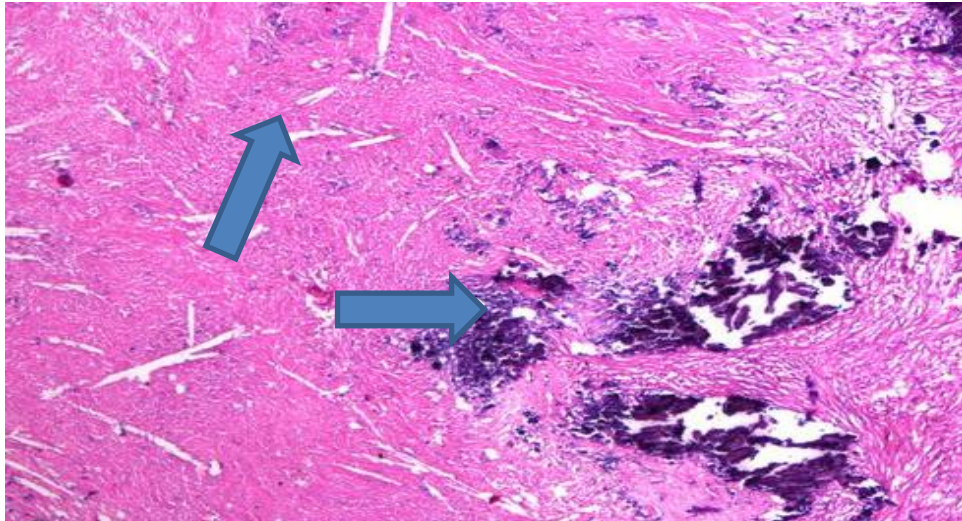
Gambar 5.6: Pada gambar menunjukkan sediaan fibula (Pewarnaan H&E) yang didekalsifikasi menggunakan asam format. Kontrol proses dilakukan dengan menggunakan reaksi kimia sederhana dimana terlihat ukuran tulang yang besar. Spesimen didapat dari seorang laki-laki berusia 13 tahun yang menderita fraktur. Hasil dari X-ray sebelum dilakukan proses pembuatan sediaan jaringan menunjukkan pembesaran tulang pada pertengahan poros dari fibula.

(Sumber :<http://www.leicabiosystems.com>)

C. TAHAP PEMBERSIHAN.

Setelah dilakukan proses dekalsifikasi, maka akan menyebabkan berbagai kondisi. Kondisi yang dimaksud di sini salah satunya adalah tersimpannya sisa larutan dekalsifikasi pada jaringan. Untuk menghilangkan sisa dari larutan dekalsifikasi, berbagai metode untuk menetralkan sisa asam pada yang tersisakan pada jaringan. Salah satu metode yang sering digunakan adalah dengan mencuci jaringan tersebut menggunakan air keran yang dialiri atau pemberian larutan basa. Metode yang terbaik dari keduanya adalah dengan mengaliri air keran, hal ini disebabkan dengan mengaliri air sisa asam akan terhapus dan kontaminasi yang ada dalam jaringan.

Ketika pencucian sisa asam dalam jaringan tidak dilakukan maka akan menyebabkan berbagai kendala khususnya ketika pewarnaan. Kendala yang terjadi bias saja pewarnaan menjadi tidak merata atau terdapat bercak hitam di dalam jaringan akibat sisa kalsium yang tidak terbuang (Gambar 7). Namun jika terdapat kendala seperti itu, kadangkala penghilangan kotoran tersebut dapat dilakukan ketika proses pewarnaan dengan mencuci di air mengalir lebih lama dan kemudian diberikan larutan basa sebelum diwarnai.



Gambar 5.7 Bagian dari spesimen sediaan granuloma di mana terdapat deposit kalsium yang tidak diharapkan (panah). Untuk itulah control dari proses dekalsifikasi menjadi hal yang penting dari pembuatan sediaan yang mengandung garam kalsium.
(Sumber : <http://www.leicabiosystems.com>)

Latihan

Setelah Anda membaca jenis-jenis larutan dekalsifikasi, silahkan Anda mencoba mengerjakan latihan. Siapkan kembali 3 buah potongan tulang dengan ukuran 5x5x3 mm. Kemudian siapkan 3 buah wadah yang masing-masing dimasukkan 3 jenis larutan dekalsifikasi yang berbeda dengan volume minimal sebanyak 50 ml. Larutan dekalsifikasi harus berbeda satu-sama lainnya dalam prinsip dekalsifikasi (Asam lemah, asam kuat dan EDTA). Masukkan potongan tulang tersebut ke masing-masing wadah dan lakukan control proses dengan menggunakan reaksi sederhana. Kemudian isi tabel kegiatan ini.

Tabel 5.5. Lembar Kegiatan

No	Larutan Dekalsifikasi	Waktu Proses	Terdapat endapan
1	Asam Lemah	30 Menit
		60 menit
		120 menit
2	Asam Kuat	30 Menit
		60 menit
		120 menit
3	EDTA	30 Menit
		60 menit
		120 menit

Petunjuk pengerjaan.

Pada setiap tahapan dekalsifikasi siapkan tabung reaksi sebanyak 9 buah. Setiap waktu yang telah ditentukan di atas ambil 5 ml untuk dilakukan pengetesan dengan menggunakan reaksi sederhana. Diamkan tabung reaksi selama kurang lebih 30 menit. Amati hasil reaksi kimia dan catat pada kolom “terdapat endapan” dengan isian : ada endapan atau tidak ada endapan

Ringkasan

Dekalsifikasi adalah suatu proses yang dilakukan secara langsung dan menjadi hal yang sangat penting mengingat kandungan garam kalsium dapat mempersulit diagnosis ataupun pembuatan sediaan secara teknis. Untuk menjadikan tahap dekalsifikasi ini sempurna maka dibutuhkan hal-hal sebagai berikut : (1) Sebuah penilaian awal dari spesimen dengan baik (mengandung kadar garam kalsium yang sedikit atau banyak); (2) Jaringan yang dibuat sediaan harus terfiksasi sempurna; (3) Persiapan potong makros (gross) haruslah wajar; (4) Pemilihan larutan dekalsifikasi harus sesuai dengan tujuan pembuatan sediaan (5) volume larutan dekalsifikasi harus memadai dan sering dilakukan pergantian secara teratur; (5)Pengecekan batas *endpoin* harus diperhatikan

Tes 2

Sebelum Anda masuk ke topik selanjutnya, kerjakanlah soal-soal berikut ini. Tingkat pemahaman Anda akan terlihat jika Anda mengerjakan soal ini tanpa membaca kembali materi di atas. Pilihlah jawaban yang paling tepat dari pilihan A, B, C, D dan E

- 1) Sebuah laboratorium patologi anatomi menerima sebuah spesimen yang diambil dari kaki seorang diabetes mellitus yang di amputasi. Dokter menduga ada kelainan lain yang diderita pasien itu selain diabetes mellitus. Untuk itu dokter ingin melihat sejauh mana perubahan morfologi sel di area yang mengalami perubahan makroskopis. Untuk mempermudah pemotongan tanpa mengalami kerusakan sel yang berarti maka larutan dekalsifikasi yang digunakan adalah ?
 - A. Asam format
 - B. EDTA
 - C. Asam Asetat
 - D. Asam Klorida
 - E. Asam Pospat

- 2) Seorang dokter mengirimkan spesimen berupa tulang ke teknisi laboratorium patologi anatomi. Dokter menginginkan hasil sediaan dapat beres maksimal 3 hari. Target dari dokter tersebut adalah sel yang terdapat di bagian dari matrik tulang. Maka larutan yang digunakan oleh seorang teknisi patologi anatomi adalah ?
 - A. Asam format
 - B. EDTA
 - C. Asam Asetat
 - D. Asam Klorida
 - E. Asam Pospat

- 3) Seorang teknisi patologi anatomi mengalami suatu masalah ketika hendak melakukan dekalsifikasi. Kesulitan yang dialaminya adalah tidak adanya amonium oksalat yang akan digunakan untuk control proses dekalsifikasi, dan tulang yang didapat sangatlah banyak. Pilihan yang dapat dilakukan oleh seorang teknisi patologi adalah ?
 - A. Tidak perlu dilakukan control, namun direndam dengan waktu yang lama
 - B. Dilakukan control dengan menggunakan X-Ray
 - C. Dilakukan control tanpa diberikan ammonium oksalat, namun cukup dengan ammonium hidroksida
 - D. Dilakukan control dengan cara tes fisik
 - E. Spesimen dikembalikan kembali ke pengirim

- 4) Seorang teknisi patologi anatomi mendapatkan hasil sedian dengan bitnik-bintik hitam yang tersebar akibat endapan kalsium pada jaringan. Spesimen yang dimiliki sudah menjadi blok jaringan. Hal terbaik apa yang dilakukan oleh seorang teknisi laboratorium patologi anatomi ?
- A. Membuat sediaan ulang dimulai dari dekalsifikasi
 - B. Membuat mengambil sisa spesimen dari jaringan yang ada di larutan dekalsifikasi
 - C. Merendam blok jaringan dengan larutan basa
 - D. Merendam pita jaringan yang telah selesai dipotong dengan larutan basa
 - E. Melakukan pemotongan lebih dalam dari blok yang sudah ada
- 5) Seorang teknisi laboratorium mendapatkan kesulitan ketika memotong blok jaringan. Kesulitan yang dialami adalah jaringan ternyata mengandung banyak garam kalsium yang menyebabkan pita jaringan selalu pecah dan pisau selalu rusak. Hal terbaik apa yang harus dilakukan oleh seorang teknisi laboratorium patologi anatomi ?
- A. Membuat ulang sediaan dengan memulainya dari dekalsifikasi
 - B. Membuat sediaan seadanya
 - C. Merendam blok jaringan dengan EDTA
 - D. Merendam jaringan dengan asam lemah
 - E. Memotong dengan cara yang lebih lembut

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1. Kunci jawaban ada di akhir dari topik ini. Setelah Anda menghitung jumlah jawaban yang benar, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 100% = baik sekali

80% = baik

60% = cukup

<60% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, masuk ke dalam materi selanjutnya dan jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda tetap dapat melanjutkan topik selanjutnya namun dengan syarat Anda tetap membaca dan mempelajari kembali topik ini.

Kunci Jawaban Tes

Tes 1

1. E. Bentuk jaringan
2. C. Menggunakan EDTA
3. C. Alcohol 70%
4. B. 4-5 mm
5. A. Sumber Organ

Tes 2

1. B (EDTA)
2. D (asam klorida)
3. D (Dilakukan control dengan cara tes fisik)
4. D (Merendam pita jaringan yang telah selesai dipotong dengan larutan basa)
5. A (Membuat ulang sediaan dengan memulainya dari dekalsifikasi)

Daftar Pustaka

Bancroft, JD. Gamble, M, (2013) Teory and practice of histological technique, Philadelphia: Elseiver

Carson, F.L., Hadik, C., (2009) Histotechnology : A self-instructional text. 3rd Edition. Hongkong: American Society for Clinical Pathology Press.

Charles Mangham¹ and Nicholas A. Athanasou. (2011). Guidelines for histopathological spesimen examination and diagnostic reporting of primary bone tumours. Journal of Clinical Sarcoma Research; 1:6

Geoffrey Rolls. An Introduction to Decalcification. <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-decalcification/>

BAB VI PEMATANGAN JARINGAN

Erick Khristian, M.Si.

PENDAHULUAN



Sumber : <https://www.imperial.ac.uk>

Menurut WHO, kanker merupakan salah satu penyakit yang mematikan di dunia, lebih dari 8 juta orang meninggal karena kanker pada tahun 2015. Data dari WHO menyatakan bahwa kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker trakea, bronkus, paru-paru pada pria dan kanker payudara pada wanita. Oleh karena itu, pada era sekarang ini diperlukan pemeriksaan untuk menunjang diagnosis kanker guna menekan angka kematian akibat kanker. Salah satu pemeriksaan yang dapat dilakukan adalah pemeriksaan dengan melakukan pengamatan jaringan secara mikroskopis.

Pemeriksaan jaringan secara mikroskopis bisa dilakukan dengan metode pengerasan jaringan teknik parafinisasi atau potong beku. Namun pada bab ini, akan dibahas secara khusus tentang teknik parafinisasi. Pengerasan jaringan dengan teknik parafinisasi adalah proses memasukan parafin ke dalam jaringan. Agar parafin bisa masuk ke dalam jaringan, maka harus dilakukan tahap-tahap pematangan jaringan. Prinsip dasar pematangan jaringan sangat sederhana, yaitu proses mengeluarkan air dan zat fiksatif yang ada di dalam jaringan dan menggantinya dengan media yang dapat mengerasakan jaringan, salah satunya yaitu parafin. Namun, air tersebut tidak bisa langsung digantikan oleh parafin, melainkan harus melalui tahapan perantara. Adapun tahapan perantara di dalam pematangan jaringan yaitu proses dehidrasi dan pembeningan.

Hasil akhir dari pematangan jaringan adalah berupa potongan jaringan yang tipis sehingga dapat dibaca di bawah mikroskop. Proses pematangan jaringan yang dilakukan dengan baik akan menghasilkan sediaan jaringan tipis yang berkualitas baik dan tidak terjadi artifak di dalamnya. Sediaan tersebut selanjutnya akan menunjang diagnosis penyakit dan tindak lanjut pengobatan terhadap pasien.

Pada bab ini, Anda akan mempelajari serangkaian teknik pematangan jaringan. Pembahasan diawali dengan prinsip pematangan jaringan, kemudian pembahasan selanjutnya tentang dehidrasi, pembeningan, infiltrasi dan teknik penanaman jaringan.

Setelah mempelajari bab ini Anda diharapkan dapat :

1. Mengetahui prinsip pematangan jaringan
2. Mengetahui prinsip dehidrasi dan reagen yang digunakan untuk dehidrasi
3. Mengetahui prinsip pembeningan dan reagen yang digunakan untuk pembeningan
4. Mengetahui prinsip infiltrasi dan reagen yang digunakan untuk infiltrasi
5. Mengetahui teknik penanaman jaringan yang benar dan baik

✍ ■ Sitohistoteknologi ✍ ■

Kemampuan-kemampuan tersebut sangat penting dikuasai oleh seorang Teknisi Laboratorium Patologi Anatomi. Mudah-mudahan Anda dapat memahami dengan jelas materi bab ini sehingga dapat melakukan teknik pematangan jaringan dengan baik.

Topik 1

Pematangan Jaringan

A. PRINSIP PEMATANGAN JARINGAN

Pematangan jaringan adalah proses pengeluaran air dan larutan fiksatif yang ada di dalam jaringan, kemudian digantikan dengan media yang membuat jaringan menjadi kaku sehingga bisa dilakukan pemotongan terhadap jaringan dengan ketebalan yang sangat tipis. Di dalam histologi rutin, paraffin adalah media paling sering digunakan untuk menanam jaringan. Air di dalam jaringan tidak bisa langsung digantikan oleh paraffin, harus melalui tahapan perantara terlebih dahulu. Adapun tahapan perantara di dalam proses pematangan jaringan yaitu proses dehidrasi dan pembeningan seperti terlihat pada ilustrasi gambar berikut ini:



Gambar 6.1 Pematangan Jaringan

(Sumber : dokumentasi pribadi)

Pada ilustrasi berikut, terlihat bahwa di dalam jaringan terdapat air dan atau larutan fiksatif. Parafin tidak bisa masuk ke dalam jaringan jika di dalam jaringan tersebut masih terdapat air, sehingga diperlukan proses dehidrasi menggunakan dehidran bertujuan untuk menghilangkan air dan larutan fiksatif yang ada di dalam jaringan. Proses selanjutnya adalah proses pembeningan menggunakan agen pembeningan, hal ini bertujuan untuk menghilangkan dehidran dari dalam jaringan dan mempermudah parafin masuk ke dalam jaringan. setelah melalui proses perantara, maka parafin bisa masuk ke dalam jaringan, proses ini dinamakan infiltrasi. Jaringan kemudian ditanam di blok jaringan. Blok jaringan selanjutnya akan dipotong secara kasar (trimming) dan halus (cutting) oleh mikrotom. Hasil akhir dari tahap pembeningan berupa sediaan jaringan tipis yang siap diwarnai dan diamati secara mikroskopis.

B. FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI TINGKAT PEMATANGAN JARINGAN

Terjadi pertukaran antara cairan yang ada di dalam jaringan dengan cairan yang ada di sekitarnya ketika proses pematangan jaringan. Tingkat pertukaran cairan tergantung pada permukaan jaringan yang bersentuhan dengan reagen yang digunakan untuk pematangan jaringan. Beberapa faktor yang mempengaruhi tingkat pertukaran yang terjadi yaitu agitasi, panas, viskositas, vakum, jenis jaringan, ukuran jaringan dan lain sebagainya yang berhubungan dengan perpindahan suatu larutan.

1. Agitasi

Agitasi di dalam dunia histoteknologi merupakan suatu dorongan yang terjadi ketika dua buah larutan yang berbeda jenis maupun konsentrasi dijadikan satu. Dengan adanya agitasi ini, maka akan terjadi peningkatan aliran larutan di sekitar jaringan. Perpindahan aliran inilah yang berpengaruh di dalam proses percepatan suatu proses pematangan jaringan. Pada alat pematangan otomatis, proses agitasi dapat dilakukan dengan menggabungkan pergerakan vertikal atau berputar, perubahan bertekanan dan penggantian cairan pada interval waktunya. Mekanisme agitasi yang efisien dapat mengurangi keseluruhan waktu pematangan jaringan hingga 30%.

2. Suhu

Suhu merupakan suatu faktor lingkungan yang berhubungan dengan kecepatan proses perpindahan cairan. Suhu berpengaruh di dalam pelebaran celah membrane sel yang berdampak terhadap meningkatkan laju penetrasi dan pertukaran cairan. Suhu yang digunakan harus diatur sedemikian rupa untuk mengurangi kemungkinan jaringan menyusut, terjadi pengerasan atau kerapuhan pada spesimen jaringan. Suhu yang dapat digunakan dibatasi sampai 45°C. Hal itu dikarenakan suhu yang lebih tinggi dapat merusak komponen imunohistokimia dan tentunya akan menghasilkan nilai negative palsu pada pemeriksaan imunohistokimia.

3. Viskositas

Viskositas adalah sifat ketahanan terhadap aliran dari suatu fluida. Semakin kecil molekul dalam larutan, semakin cepat laju penetrasi cairan (viskositas rendah). Sebaliknya, jika ukuran molekul lebih besar, laju pertukaran lebih lambat (viskositas tinggi). Sebagian besar larutan yang digunakan dalam pematangan jaringan, dehidrasi dan pembenjing, memiliki viskositas yang serupa. Media infiltrasi memiliki berbagai viskositas. Parafin memiliki viskositas lebih rendah dalam keadaan cair (meleleh), hal ini dapat meningkatkan kecepatan masuknya paraffin tersebut ke dalam sel.

4. Vakum

Pengertian vakum di dalam topik ini adalah kondisi dimana tekanan didalam suatu alat pematangan jaringan dibuat dengan kondisi yang tinggi. Dengan tekanan yang tinggi diharapkan akan meningkatkan laju perpindahan cairan satu dengan lainnya sehingga dapat mengurangi waktu yang diperlukan untuk menyelesaikan setiap langkah dalam pematangan spesimen jaringan. Vakum akan menghilangkan reagen dari jaringan, tetapi jika reagen tersebut lebih mudah menguap daripada reagen yang akan menggantikannya. Vakum yang digunakan pada alat pematangan otomatis sebaiknya tidak melebihi 50,79 kPa untuk mencegah kerusakan pada jaringan. Vakum juga bisa membantu menghilangkan udara yang terperangkap di pori-pori jaringan. Dengan penambahan mekanisme vakum, maka proses pematangan dapat berkurang khususnya pada jaringan padat dan berlemak.

5. Jenis jaringan

Jenis jaringan yang diproses dapat juga mempengaruhi proses pematangan jaringan. Dimana jenis jaringan ditentukan juga oleh jenis sel yang menyusunnya. Beberapa jenis jaringan yang ada di dalam tubuh antara lain :

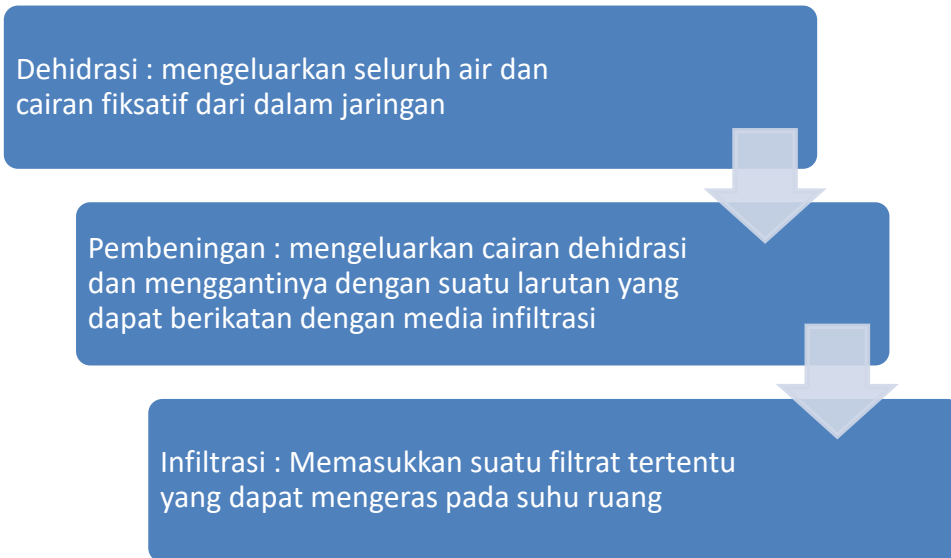
- a. Jaringan yang terdiri dari sel yang banyak mengandung air, contohnya adalah mata, hepar, ginjal dan lain sebagainya.
- b. Jaringan yang terdiri dari sel yang sedikit mengandung air, contohnya adalah tulang.
- c. Jaringan yang mengandung lemak, contohnya adalah jaringan mammae.

6. Ukuran Jaringan

Ukuran, kerapatan, dan ketebalan jaringan menentukan kecepatan penetrasi larutan pada proses pematangan jaringan. Jaringan yang berukuran tipis seperti usus akan lebih cepat penetrasinya dibandingkan jaringan hati yang lebih tebal. Jaringan yang padat seperti uterus dan tulang akan memakan waktu proses pematangan yang lebih lama. Jaringan dipotong tidak lebih dari $2,5 \times 2,0 \times 0,4$ cm, agar penetrasi larutan berjalan dengan optimal. Potongan jaringan disimpan di dalam kaset tidak boleh sampai berdesakan, karena akan mengganggu proses penetrasi larutan ke dalam jaringan.

C. LANGKAH-LANGKAH PEMATANGAN JARINGAN

Seperti yang telah disinggung pada skema pematangan jaringan di atas, maka langkah-langkah utama dalam proses pematangan jaringan adalah sebagai berikut:



Gambar 6.2. Proses Pematangan Jaringan

(Sumber : Dokumen Pribadi)

Latihan

Setelah anda membaca topik di atas, mari kita melakukan latihan untuk mengetahui kedalaman dari praktek di dalam topik ini, silahkan Anda lakukan kegiatan di bawah ini :

- 1) Ambil 12 buah tabung reaksi dan bagi menjadi 4 kelompok, sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 3 tabung reaksi.
- 2) Setiap kelompok masukkan larutan yang digunakan untuk prinsip pematangan jaringan dengan aturan sebagai berikut :
 - A. Kelompok 1 isi dengan air (A1, A2, A3)
 - B. Kelompok 2 isi dengan alcohol absolut (B1, B2, B3)
 - C. Kelompok 3 isi dengan xilol (C1, C2, C3)
 - D. Kelompok 4 isi dengan paraffin cair dan tempatkan di dalam oven dengan suhu 58°C (D1, D2, D3)
- 3) Silangkan satu sama lainnya dan perhatikan hasil dari penggabungan dari keduanya. Hasil dari penggabungan masukkan ke dalam tabel berikut.

Tabel 6.1. Latihan Topik Mekanisme Perpindahan Cairan

No	Penggabungan Tabung	Hasil
1	A1 + B1	tercampur / tidak tercampur
2	A2 + C1	tercampur / tidak tercampur
3	A3 + D1	tercampur / tidak tercampur
4	B2 + C2	tercampur / tidak tercampur

■ Sitohistoteknologi ■

5	B3 + D2	tercampur / tidak tercampur
6	C3 + D3	tercampur / tidak tercampur

Petunjuk pengerjaan.

Silahkan Anda perhatikan kembali topik tentang prinsip pematangan jaringan. Setelah Anda mencoba langkah-langkah di atas, catat hasil penggabungannya di kolom hasil dengan mencoret salah satu yang salah. Jika hasilnya bergabung (larut/satu fase) maka coret hasil yang tidak tercampur.

Ringkasan

Proses pematang jaringan adalah suatu istilah yang digunakan oleh seorang teknisi laboratorium patologi anatomi. Pematangan jaringan pada dasarnya adalah proses memasukkan materi paraffin/paraplast yang dapat mengeraskan jaringan sehingga bisa dilakukan pemotongan terhadap jaringan dengan ketebalan yang sangat tipis. Di dalam histologi rutin, paraffin adalah media paling sering digunakan untuk menanam jaringan. Air di dalam jaringan tidak bisa langsung digantikan oleh parafin, harus melalui tahapan perantara terlebih dahulu. Adapun tahapan perantara di dalam proses pematangan jaringan yaitu proses dehidrasi dan pembeningan. Baik atau tidaknya suatu proses pematangan didasari dari tergantikannya larutan satu secara sempurna dengan larutan lainnya hingga materi paraffin/paraplast. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pematangan jaringan yaitu agitasi, suhu, viskositas, vakum, dan jenis jaringan.

Test 1

Untuk mengetahui sejauh mana anda paham dengan topik ini silahkan anda berusaha mengerjakan soal-soal berikut ini :

- 1) Waktu pada proses pematang jaringan TIDAK dipengaruhi oleh :
 - A. Jenis Jaringan
 - B. Ukuran Jaringan
 - C. Bentuk jaringan
 - D. Kerapatan sel di jaringan
 - E. Suhu

- 2) Pematangan jaringan adalah proses mengeluarkan air dan larutan fiksatif yang ada di dalam jaringan, kemudian air tersebut digantikan dengan parafin. Namun air tidak bisa langsung diganti dengan parafin, harus terlebih dahulu melalui tahap perantara. Tahap perantara tersebut adalah?
 - A. Dehidrasidanpembeningan
 - B. Fiksasidandehidrasi
 - C. Fiksasidanpemebeningan
 - D. Infiltrasidanpembeningan
 - E. Infiltrasidandehidrasi

- 3) Pematanganjaringanharusdilakukansecaraberurutan. Bagaimanaurutanprosespematanganjaringan yang benar?
 - A. Infiltrasi, Pembeningan, Dehidrasi
 - B. Pembeningan, Dehidrasi, Infiltrasi
 - C. Dehidrasi, Infiltrasi, Pembeningan
 - D. Dehidrasi, Pembeningan, Infiltrasi
 - E. Pembeningan, Infiltrasi, Dehidrasi

- 4) Organ yang memerlukan waktu lama untuk proses pematangan jaringan karena organ tersebut mengandung banyak lemak. Apakah jenis organ tersebut?
 - A. Hati
 - B. Mamae
 - C. Uterus
 - D. Mata
 - E. Tulang

- 5) Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi proses pematangan jaringan adalah suatu dorongan yang terjadi ketika dua buah larutan yang berbeda jenis maupun konsentrasi dijadikan satu. Faktor tersebut adalah...
- A. Agitasi
 - B. Suhu
 - C. Viskositas
 - D. Vakum
 - E. Jenis Jaringan

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1 yang terdapat di bagian akhir topik ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Belajar 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 90 - 100% = baik sekali

80 - 89% = baik

70 - 79% = cukup

< 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan mempelajari materi di topik 2. Bagus! Jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi topik1, terutama bagian yang belum Anda kuasai.

Topik 2

Tahap-Tahap Pematangan Jaringan

Setelah mempelajari topik 1, Anda mengetahui bahwa tahap-tahap pematangan jaringan adalah dehidrasi, pembeningan dan infiltrasi. Pembahasan pada topik 2 ini yaitu tentang pengertian dasar dehidrasi, pembeningan maupun infiltrasi, reagen yang bisa digunakan, serta waktu yang dibutuhkan untuk setiap proses pematangan jaringan tersebut.

A. DEHIDRASI

1. Pengertian Dasar Dehidrasi

Tahap pertama pematangan jaringan adalah dehidrasi. Dehidrasi adalah proses menghilangkan air dan zat fiksatif dari komponen jaringan. Reagen dehidrasi bersifat hidrofilik (suka air), memiliki kutub yang kuat berinteraksi dengan molekul air dengan cara mengikat hidrogen. Dehidrasi harus dilakukan secara perlahan. Jika gradien konsentrasi reagen terlalu berlebihan, maka arus difusi melintasi membran sel dapat meningkatkan kemungkinan terjadi kerusakan pada sel. Oleh karena itu, spesimen diproses menggunakan reagen dengan konsentrasi meningkat. Dehidrasi berlebihan dapat menyebabkan jaringan menjadi keras, rapuh dan kusut. Dehidrasi yang tidak sempurna akan mengganggu penetrasi reagen pembening ke dalam jaringan, sehingga spesimennya lunak dan tidak bisa dilakukan proses infiltrasi. Hal yang penting lainnya yaitu, sebelum dilakukan proses ini, jaringan harus dipastikan sudah difiksasi dengan baik sehingga tidak terjadi artifak oleh karena terjadi fiksasi alkohol.

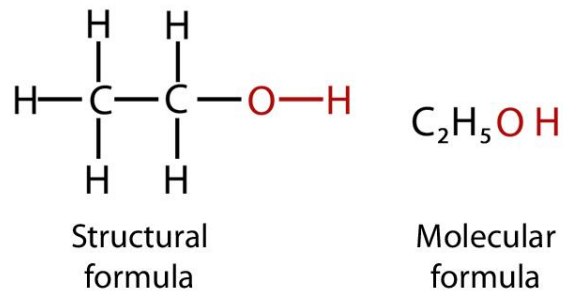
2. Macam-Macam Cairan Dehidrasi

Reagen yang dapat digunakan untuk dehidrasi adalah Etanol, Etanol Aseton, Metanol, Isoprofil, Butanol, Glikol dan Alkohol terdenaturasi. Selanjutnya akan dijelaskan secara lebih rinci mengenai reagen-reagen tersebut.

a. Ethanol (C_2H_5OH)

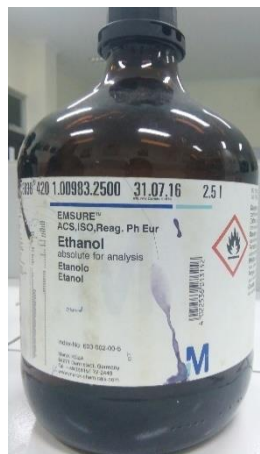
Pemilihan yang sering dilakukan untuk larutan dehidrasi adalah etanol. Hal ini dikarenakan etanol bisa memastikan dehidrasi terjadi secara total. Etanol bersifat bening, tidak berwarna, mudah terbakar. Etanol bersifat hidrofilik, tercampur dengan air dan pelarut organik lainnya, bekerja cepat dan stabil. Konsentrasi etanol yang digunakan untuk dehidrasi dilakukan secara berdegradasi (meningkat konsentrasinya). Dehidrasi pertama yang sering dilakukan dengan cara merendam jaringan di dalam 70% etanol, kemudian dilanjutkan ke larutan 95% dan 100% (Absolut). Namun untuk kasus-kasus tertentu awal dari tahap dehidrasi dapat dilakukan dengan menaikkan atau menurunkan konsentrasi larutan etanol. Untuk jaringan keras dapat dimulai dari alkohol 95 sedangkan untuk jaringan halus dianjurkan agar pengolahannya mulai dari etanol 30%.

Ethanol



Gambar 6.3 Struktur kimia Ethanol

(Sumber : <http://www.nutrientsreview.com>)

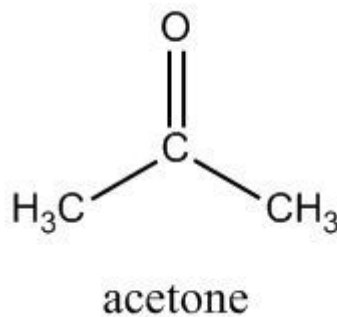


Gambar 6.4 Ethanol absolut

(Sumber: dokumen pribadi)

b. Aseton (CH_3COCH_3)

Aseton merupakan pilihan kedua dari larutan dehidrasi. Aseton bersifat bening, tidak berwarna, dan mudah terbakar. Aseton dapat bercampur dengan air, etanol dan juga sebagian pelarut organik. Aseton cepat bereaksi, namun memiliki penetrasi yang buruk dan menyebabkan kerapuhan dalam jaringan jika penggunaannya terlalu lama. Aseton menghilangkan lipid dari jaringan selama proses dehidrasi.

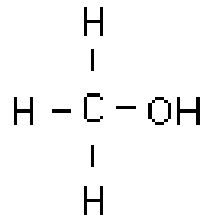


Gambar 6.5 Struktur kimia Aseton

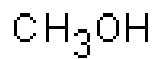
(Sumber : <https://brainly.co.id>)

c. Metanol (CH₃OH)

Metanol adalah cairan yang bening, tidak berwarna dan mudah terbakar. Metanol dapat bercampur dengan air, etanol dan sebagian pelarut organik. metanol sangat toksik, tetapi dapat diganti dengan etanol sebagai dehidran.



Metanol

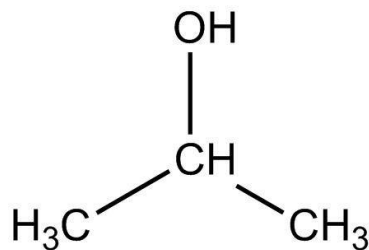


Gambar 6.6 Struktur kimia Metanol

(Sumber : <http://www.nordicgnosticunity.org>)

d. Isopropil alkohol (CH₃CHOHCH₃)

Isopropil alkohol dapat larut dengan air, etanol dan sebagian pelarut organik. Reagen ini digunakan jika pemrosesan menggunakan *microwave*. Isopropil alkohol tidak menyebabkan penyusutan jaringan.



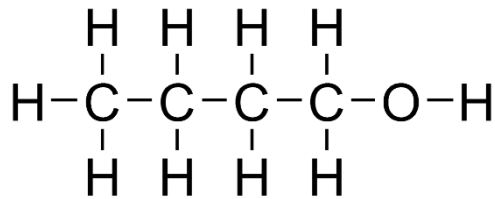
isopropyl alcohol

Gambar 6.7 Struktur kimia Isopropil Alkohol

(Sumber : <https://brainly.co.id>)

e. Butil alkohol (butanol) (C₄H₉OH)

Digunakan terutama untuk histologi tanaman dan hewan. Butil alkohol adalah dehidran yang lambat sehingga menyebabkan penyusutan dan pengerasan jaringan lebih sedikit.



Gambar 6.8 Struktur Kimia Butanol

(Sumber : <https://id.wikipedia.org>)

f. Alkohol terdenaturasi

Cairan ini memiliki sifat fisik yang sama seperti etanol. Alkohol terdenaturasi terdiri dari etanol, dengan penambahan metanol (sekitar 1%), isopropil alkohol atau kombinasi alkohol. Untuk keperluan pengolahan jaringan digunakan dengan cara yang sama seperti etanol.

Larutan-larutan di atas tersebut, pada dasarnya dapat digunakan pada proses dehidrasi, namun perlu diingat bahwa setiap larutan dehidran memiliki berbagai kekurangan maupun kelebihan seperti menghasilkan jaringan yang keras, waktu yang digunakan lebih lama hingga tingkat toksisitas yang tinggi dari tiap-tiap larutan dehidran. Namun dibalik berbagai jenis larutan dehidran, ada beberapa tanda bahwa dehidrasi telah berhasil dilakukan, antara lain :

1. Tidak terlihatnya lagi aliran perpindahan larutan ketika dimasukkan ke dalam larutan dehidrasi terakhir
2. Warna yang dihasilkan dari jaringan tersebut terlihat berwarna abu-abu atau pucat
3. Tekstur lunak dan rapuh

Gunakan satu hingga tiga buah kaset sebagai control, dimana disetiap tahap, kontrol dipotong menjadi dua untuk melihat keberhasilan proses tersebut hingga ke tangan jaringan.

B. PEMBENINGAN

1. Pengertian Dasar Pembeningan

Reagen pembeningan bertindak sebagai perantara antara larutan dehidrasi dan infiltrasi. Reagen pembeningan larut dalam dua larutan tersebut dan kebanyakan berupa hidrokarbon dengan indeks bias yang mirip dengan protein. Jika agen dehidrasi telah digantikan semua dengan agen pembeningan, maka jaringan tersebut akan memiliki penampilan yang bening dan tembus cahaya. Agen pembeningan harus memiliki kemampuan penetrasi jaringan yang cepat, penghapusan agen dehidrasi cepat, mudah digantikan oleh agen infiltrasi, menimbulkan kerusakan jaringan yang minimal, sifat mudah terbakar yang rendah, toksisitas rendah dan murah.

Sebagian besar agen pembeningan adalah cairan yang mudah terbakar, sehingga dalam penggunaannya harus berhati-hati. Agen pembeningan memiliki titik didih yang rendah sehingga umumnya lebih mudah digantikan dengan lelehan parafin. Pemaparan agen

pembeningan yang terlalu lama dapat menyebabkan jaringan menjadi rapuh. Oleh karena itu, harus dilakukan pemantauan terhadap waktu saat berlangsungnya proses pembeningan.

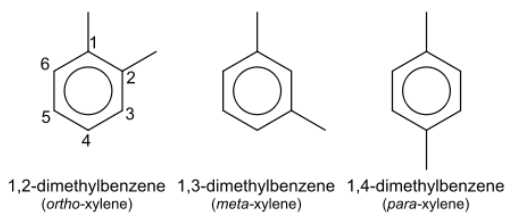


Gambar 6.9 Pembeningan pada jaringan hati mencit
(Sumber: dokumen pribadi)

2. Macam-Macam Agen Pembeningan yang Rutin digunakan

a. Xilol

Xilol adalah cairan yang mudah terbakar dan tidak berwarna dengan aroma khas minyak bumi, larut dengan sebagian pelarut organik dan lilin parafin. Cocok digunakan untuk dijadikan cairan pembening pada blok dengan ketebalan kurang dari 5 mm dan cepat menggantikan alkohol dari jaringan. Xilol dapat mengeraskan jaringan. Xilol paling sering digunakan di laboratorium histologi rutin.



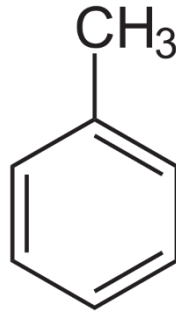
Gambar 6.10 Struktur Kimia Xilol
(Sumber : <https://id.wikipedia.org>)



Gambar 6.11. Xylene untuk laboratorium
(Sumber: dokumen pribadi)

b. Toluene

Toluene memiliki sifat yang mirip dengan xilol, tetapi jaringan tidak rusak meskipun waktu perendaman jaringan berlangsung lama. Toluene lebih mudah terbakar dan mudah menguap daripada xilol.



Gambar 6.12 Struktur Kimia Toluene

(Sumber : <https://id.wikipedia.org>)

c. Kloroform

Kloroform lebih lambat beraksi daripada xilol dan menyebabkan kerapuhan yang kurang. Jaringan yang ketebalannya lebih dari 1 mm bisa diolah. Kloroform tidak membuat jaringan menjadi bening dan tembus cahaya. Kloroform tidak mudah terbakar tapi mempunyai toksisitas yang tinggi dan menghasilkan gas fosgen beracun ketika dipanaskan. Kloroform biasanya paling sering digunakan untuk mengolah spesimen system saraf pusat.

d. Xilol Substitusi

Xilol Substitusi adalah hidrokarbon alifatik yang ada dalam bentuk rantai panjang dan rantai pendek. Dibedakan dalam jumlah atom karbon dalam rantai karbonnya. Alifatik rantai pendek memiliki sifat penguapan yang sama seperti xilol, dan tidak memiliki afinitas terhadap air. Alifatik rantai panjang tidak menguap dengan cepat dan dapat menyebabkan kontaminasi terhadap lilin parafin pada pematangan jaringan.

e. *Citrus Fruit Oil* (Reagen Limonene)

Reagen limonene adalah ekstrak dari kulit jeruk dan lemon. Reagen ini tidak beracun dan mudah bercampur dengan air. Kelemahan reagen ini adalah memiliki bau tajam yang menyebabkan sakit kepala dan juga endapan mineral kecil seperti tembaga atau kalsium dapat larut dan terlepas dari jaringan. Reagen limonene ini sangat berminyak dan tidak bisa didaur ulang.

C. INFILTRASI

1. Pengertian dasar Infiltrasi

Infiltrasi merupakan suatu proses memasukkan materi/filtrat ke dalam jaringan sehingga jaringan tersebut dapat mengeras akibat filtrat tersebut di suhu ruang. Mekanisme masuknya filtrate ini kedalam sel adalah dengan menggantikan cairan pembeningan dengan tingkat kelarutannya. Parafin adalah filtrate yang paling banyak digunakan untuk infiltrasi dan embedding. Parafin yang digunakan tersedia dalam berbagai bentuk dengan berbagai suhu lelehnya dan zat penambahnya untuk bisa menghasilkan potongan jaringan yang berkualitas. Beberapa praktisi menganjurkan menggunakan parafin yang mempunyai titik leleh yang rendah dalam mempercepat proses infiltrasi. Reagen Infiltrasi mempertahankan fungsi dari sel dan komponen ultrastruktural selama proses pemotongan.

2. Reagen Infiltrasi

Lilin parafin adalah media yang paling sering digunakan untuk infiltrasi dan penanaman jaringan di laboratorium histopatologi. Lilin parafin adalah campuran hidrokarbon berantai panjang yang diproduksi dari pemecahan minyak mineral. Sifatnya bervariasi tergantung dari titik lebur yang digunakan, berkisar antara 47 sampai 64°C. Lilin parafin meresapi jaringan dalam bentuk cair dan membeku dengan cepat saat didinginkan. Jaringan dibenamkan dalam parafin, kemudian membentuk matriks, hal ini mencegah kerusakan struktur jaringan selama pemotongan. Lilin parafin yang mempunyai titik leleh lebih tinggi baik digunakan untuk jaringan yang lebih keras misalnya Tulang, dapat memungkinkan pemotongan yang lebih tipis, namun kesulitan pada saat proses pembuatan pita. Lilin parafin yang mempunyai titik leleh yang rendah akan lebih lembut namun tidak dapat mendukung untuk jaringan yang keras. Lebih sulit mendapatkan pemotongan yang tipis namun lebih mudah membuat pita. Parafin murah, mendukung kualitas potongan, dan mudah beradaptasi untuk semua kegunaan. Parafin cocok digunakan untuk pewarnaan rutin, khusus dan imunohistokimia.

Lilin parafin yang mengandung plasticizers atau aditif resin lainnya tersedia secara komersial, memberikan pilihan yang sesuai untuk kebanyakan laboratorium. Zat aditif ini membuat parafin lebih mudah ditanamkan jaringan. Jumlah zat aditif akan mempengaruhi laju infiltrasi. Zat yang ditambahkan ke lilin parafin pada zaman dulu diantaranya lilin lebah, karet, ceresin, polimer plastik dan dietilena glikol distearat. Banyak dari zat aditif ini memiliki titik lebur yang lebih tinggi daripada lilin parafin, akibatnya membuat jaringan lebih rapuh.

Adapun waktu yang diberikan pada proses pematangan jaringan (dehidrasi hingga infiltrasi) pada dasarnya tidak ditentukan dengan pasti, namun sebagai acuan, ada beberapa referensi yang dapat digunakan. Antara lain sebagai berikut:

Tabel 6.1. Waktu Pematangan Pada Jaringan Manusia

No	Tahapan	Larutan	Waktu Proses	
			2 Jam	8 Jam
1	Dehidrasi	alkohol 95%	1 menit	20 menit
2	Dehidrasi	alkohol 95%	1 menit	20 menit
3	Dehidrasi	alkohol Absolut	1 menit	20 menit
4	Dehidrasi	alkohol Absolut	11 menit	40 menit
5	Dehidrasi	alkohol Absolut	30 menit	60 menit
6	Pembeningan	Xilol	1 menit	30 menit
7	Pembeningan	Xilol	11 menit	30 menit
8	Pembeningan	Xilol	25 menit	60 menit
9	Infiltrasi	Parafin/paraplast	3 menit	40 menit
10	Infiltrasi	Parafin/paraplast	5 menit	40 menit
11	Infiltrasi	Parafin/paraplast	15 menit	60 menit

Tabel 6.2. Waktu Pematangan Pada Jaringan Hewan

No	Tahapan	Larutan	Waktu Proses			
			2 Jam	4 Jam	6 Jam	8 Jam
1	Dehidrasi	alkohol 70%	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
2	Dehidrasi	alkohol 95%	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
3	Dehidrasi	alkohol 95%	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
4	Dehidrasi	alkohol Absolut	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
5	Dehidrasi	alkohol Absolut	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
6	Pembeningan	Xilol	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
7	Pembeningan	Xilol	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
8	Pembeningan	Xilol	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
9	Pembeningan	Xilol	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
10	Infiltrasi	Parafin/paraplast	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
11	Infiltrasi	Parafin/paraplast	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit
12	Infiltrasi	Parafin/paraplast	10 menit	20 menit	30 menit	40 menit

Silahkan Anda pelajari salah satu topik di atas, Silahkan Anda mencoba latihan melakukan teknik pematang jaringan. Anda dapat gunakan bantuan dalam tabel 6.3. berikut.

Tabel 6.3. Latihan Pematangan Jaringan

Jenis>Nama Jaringan	Ukuran Jaringan	Tahapan Pematangan	Waktu Tahapan	Keterangan
.....(a)(a1)	Dehidrasi(a2)(a3)
.....(b)(b1)	Pembeningan(b2)(b3)
.....(c)(c1)	Infiltrasi(c2)(c3)

Petunjuk menggunakan latihan di atas

Isilah mulai dari a, a1, a2 hingga c3 dengan nama jaringan yang dijadikan latihan Anda, dan catat yang diperlukan oleh tabel di atas. Pengisian keterangan antara lain adalah terjadinya penyusutan atau tidak, terjadi perubahan warna dari apa menjadi apa, tekstur dari jaringan apa dan lain-lain. Contoh pengerjaan sebagai berikut :

Tabel 6.4. Contoh Cara Pengerjaan

Jenis>Nama Jaringan	Ukuran Jaringan	Tahapan Pematangan	Waktu Tahapan	Keterangan
Hati	4x2x0.5 (cm)	Dehidrasi	2 jam	<ul style="list-style-type: none"> - Perubahan Warna merah menjadi abu - Terjadi sedikit penyusutan - Tesktur lunak

Ringkasan

Tahapan pematang jaringan yaitu dehidrasi, pembeningan dan infiltrasi. Dehidrasi adalah proses menghilangkan air dan zat fiksatif dari komponen jaringan. Reagen dehidrasi bersifat hidrofilik (suka air), memiliki kutub yang kuat berinteraksi dengan molekul air dengan cara mengikat hydrogen. Reagen yang dapat digunakan pada proses dehidrasi diantaranya ethanol, aseton, methanol, isoprofil alkohol, butil alkohol, dan alkohol terdenaturasi. Tanda-tanda berhasilnya proses dehidrasi adalah tidak terlihatnya lagi aliran perpindahan larutan ketika dimasukkan ke dalam larutan dehidrasi terakhir, warna yang dihasilkan dari jaringan tersebut terlihat berwarna abu-abu atau pucat, tekstur lunak dan rapuh. Pembeningan

bertindak sebagai perantara antara larutan dehidrasi dan infiltrasi, Jika agen dehidrasi telah digantikan semua dengan agen pembeningan, maka jaringan tersebut akan memiliki penampilan yang bening dan tembus cahaya, agen pembeningan juga mempermudah parafin memasuki jaringan. agen pembeningan diantaranya adalah xilol, toluen, kloroform, xilol substitusi, *citrus fruit oil*. Infiltrasi merupakan suatu proses memasukkan materi/filtrat ke dalam jaringan sehingga jaringan tersebut dapat mengeras akibat fiktrat tersebut di suhu ruang. Reagen yang umum digunakan untuk infiltrasi adalah lilin parafin.

Test 2

Untuk mengetahui sejauh mana anda paham dengan topik ini silahkan anda berusaha mengerjakan soal-soal berikut ini :

- 1) Tanda-tanda proses dehidrasi dikatakan berhasil adalah :
 - A. warna berubah menjadi putih untuk jaringan hati
 - B. tekstur menjadi sangat keras
 - C. warna berubah menjadi abu keputatan
 - D. ukuran mengembang
 - E. jaringan menjadi sangat lunak

- 2) Berikut ini adalah reagen yang dapat digunakan untuk dehidrasi, kecuali...
 - A. Ethanol
 - B. Metanol
 - C. Xilol
 - D. Isoprofil alkohol
 - E. Butanol

- 3) Tanda-tanda bahwa pembeningan dikatakan berhasil adalah:
 - A. Jaringan bening dan tembus cahaya
 - B. Jaringan rapuh
 - C. Jaringan keras
 - D. Jaringan berwarna putih
 - E. Terdapat air pada jaringan

- 4) Agen pembeningan diusahakan harus mempunyai toksisitas yang rendah, murah dan tidak mudah terbakar. Agen pembeningan yang sering dipakai di laboratorium adalah:
 - A. Ethanol
 - B. Metanol
 - C. Xilol
 - D. Isoprofil alkohol
 - E. Butanol

- 5) Proses memasukkan materi/filtrat ke dalam jaringan sehingga jaringan tersebut dapat mengeras akibat filtrat tersebut di suhu ruang. Mekanisme masuknya filtrate ini kedalam sel adalah dengan menggantikan cairan pembeningan dengan tingkat kelarutannya. Parafin adalah filtrat yang banyak digunakan pada proses ini. Apakah nama proses tersebut?
- A. Fiksasi
 - B. Dehidrasi
 - C. Pembeningan
 - D. Infiltrasi
 - E. Penanaman jaringan

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 2 yang terdapat di bagian akhir topik ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Belajar 2.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan: 90 - 100% = baik sekali

80 - 89% = baik

70 - 79% = cukup

< 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan mempelajari materi di topik2. Bagus! Jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi topik6, terutama bagian yang belum Anda kuasai.

Topik 3

Teknik Penanaman Jaringan

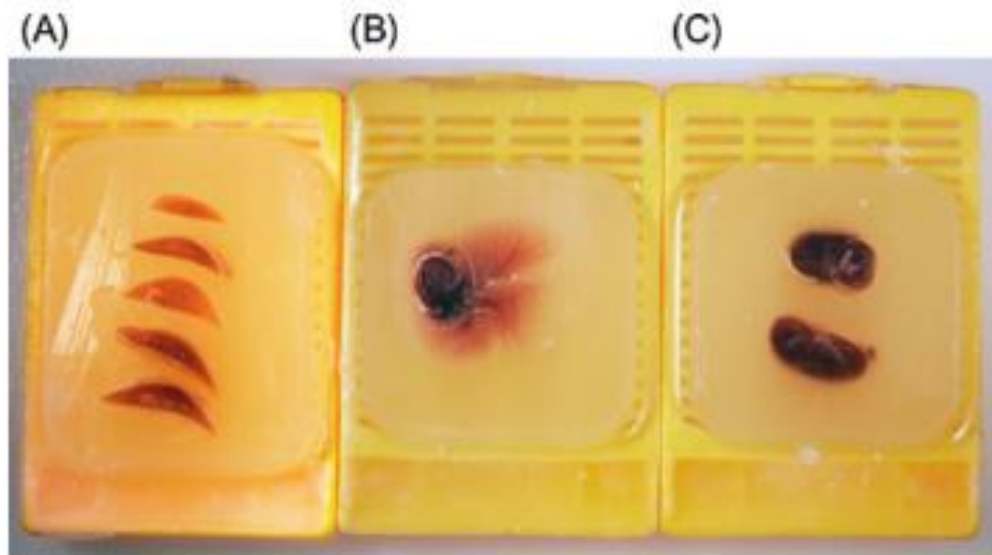
Setelah proses infiltrasi dengan paraffin cair (proses pematangan jaringan), maka selanjutnya adalah tahap penanaman jaringan pada *base mold*. Jaringan diambil dari kaset dan ditempatkan pada *base mold*, kemudian dituangkan paraffin cair yang sejenis dengan paraffin yang digunakan pada proses infiltrasi. Tahap yang penting di dalam proses ini adalah mengorientasikan jaringan secara baik sehingga dapat mempermudah proses pemotongan jaringan. Jaringan dapat diorientasikan di tepi, di ujung atau di permukaan, tergantung pada jenis jaringan yang ditanam.

Secara idealnya tahapan dari penanaman jaringan adalah sebagai berikut:

1. Tuangkan paraffin cair secukupnya ke dalam base mold
2. Posisikan jaringan sesuai dengan yang diharapkan
3. Dinginkan dasar dari base mold sehingga posisi tidak terjadi perubahan
4. Tutup dengan kaset jaringan
5. Tuangkan paraffin cair kembali hingga batas maksimal
6. Dinginkan dengan kondisi alas basemold dingin

Beberapa hal yang harus diperhatikan:

1. Perhatikan jaringan yang hendak ditanam, cek terlebih dahulu berapa buah jaringan yang hendak ditanam pada keterangan di formulir atau di kaset
2. Pastikan sebelum menutup base mold dengan kaset, posisi jaringan benar-benar kuat
3. Pastikan kaset yang hendak digunakan untuk tutup base mold dalam kondisi panas sehingga paraffin dipastikan mengalir melalui seluruh celah
4. Lakukan teknik penanaman jaringan secara cepat sehingga paraffin tidak membeku



Gambar 6.13 Blok jaringan dengan posisi jaringan yang baik. Hati mencit (A) jantung dan paru-paru (B) ginjal (C). blok jaringan tersebut menunjukkan jarak yang tepat dan posisi yang benar untuk dilakukan pemotongan

(Sumber: Treuting P.M, Dintzis S.M. 2012. *Comparative Anatomy and Histology*. United States of America: Elsvier)

Posisi yang benar untuk beberapa spesimen jaringan adalah sebagai berikut:

1. Struktur tubular: penampang dinding dan lumen harus terlihat; Arteri, vena, tuba fallopi dan spesimen vas deferens.
2. Biopsi kulit; eksisi, penampang epidermis, dermis dan lapisan subkutan harus terlihat.
3. Usus, kandung empedu, dan biopsi epitel lainnya: memotong bidang pada sudut kanan ke permukaan, dan diposisikan sehingga permukaan epitel dipotong terakhir, meminimalkan kompresi dan distorsi lapisan epitel.
4. Biopsi otot: potongan harus berisi bidang melintang dan longitudinal.
5. Beberapa potongan jaringan diposisikan berdampingan dengan permukaan epitel menghadap ke arah yang sama

Latihan

Setelah Anda membaca topik ini, silahkan Anda coba untuk mencoba teknik-teknik penanaman. Ikuti langkah-langkah berikut ini :

- 1) Penanaman umum
 - a. Masukkan paraffin cair ke dalam base mold dengan volume minimal setengah dari base mold tersebut. Tempatkan jaringan dengan posisi bekas pisau potong makros (gross) menggunakan pinset yang memiliki suhu berkisar 56-60 °C.
 - b. Tahan jaringan dengan pinset dan dinginkan alas base mold hingga terlihat warna putih di alas base mold.
 - c. Tutup dengan kaset yang dipanaskan terlebih dahulu dengan suhu kurang lebih 60°C.
 - d. Diamkan dalam suhu kamar atau di cold plate hingga mudah untuk dilepas

- 2) Penanaman 2 buah jaringan
 - a. Masukkan paraffin cair ke dalam base mold dengan volume minimal setengah dari base mold tersebut. Tempatkan jaringan dengan posisi bekas pisau potong makros (gross) menggunakan pinset yang memiliki suhu berkisar 56-60 °C.
 - b. Tahan jaringan dengan pinset dan dinginkan alas base mold hingga terlihat warna putih di alas base mold.
 - c. Kemudian lanjutkan dengan sangat cepat pada jaringan kedua, tekan agak ke dalam jika alas sudah mulai tampak, namun diperhatikan supaya lapisan putih tersebut belum benar-benar keras.
 - d. Tutup dengan kaset yang dipanaskan terlebih dahulu dengan suhu kurang lebih 60°C.
 - e. Diamkan dalam suhu kamar atau di cold plate hingga mudah untuk dilepas

Ringkasan

Setelah proses infiltrasi dengan paraffin cair (proses pematangan jaringan), maka selanjutnya adalah tahap penanaman jaringan pada *base mold*. Hal yang paling penting dalam penanaman jaringan adalah mengorientasikan jaringan secara tepat. Jaringan dapat diorientasikan di tepi, di ujung atau di permukaan, tergantung pada jenis jaringan yang ditanam. Kesalahan yang terjadi ketika tahap penanaman adalah kesalahan dalam diagnosis. Untuk memperbaiki kesalahan tersebut dapat dilakukan potong dalam atau tanam ulang.

Test 3

Untuk mengetahui sejauh mana anda paham dengan topik ini silahkan anda berusaha mengerjakan soal-soal berikut ini :

- 1) Setelah proses infiltrasi, maka tahapan penting selanjutnya adalah:
 - A. Dehidrasi
 - B. Pembeningan
 - C. Fiksasi
 - D. Pemotongan
 - E. Penanaman Jaringan

- 2) Cetakan yang biasa digunakan dalam penanaman jaringan disebut...
 - A. Base mold
 - B. Kaset jaringan
 - C. Vertikal staining Jar
 - D. Horizontal staining jar
 - E. Beaker glass

- 3) Tahapan penanaman jaringan adalah mulai dari menuangkan cairan parafin ke base mold, maka langkah selanjutnya adalah...
 - A. Tuangkan paraffin cair kembali hingga batas maksimal
 - B. Dinginkan dasar dari base mold sehingga posisi tidak terjadi perubahan
 - C. Tutup dengan kaset jaringan
 - D. Posisikan jaringan sesuai dengan yang diharapkan
 - E. Dinginkan dengan kondisi alas basemold dingin

- 4) Penanaman jaringan biopsi kulit yang baik harus memperlihatkan...
 - A. Lapisan subkutan
 - B. Arteri
 - C. Vena
 - D. Sel darah merah
 - E. Lemak

- 5) Beberapa hal yang perlu diperhatikan saat penanaman jaringan adalah sebagai berikut, kecuali...
 - A. Perhatikan jaringan yang hendak ditanam, cek terlebih dahulu berapa buah jaringan yang hendak ditanam pada keterangan di formulir atau di kaset
 - B. Pastikan kaset yang hendak digunakan untuk tutup base mold dalam kondisi panas sehingga paraffin dipastikan mengalir melalui seluruh celah
 - C. Pastikan sebelum menutup base mold dengan kaset, posisi jaringan benar-benar kuat

■ Sitohistoteknologi ■

- D. Parafin diperbolehkan dingin saat proses penanaman jaringan berlangsung
- E. Lakukan penanaman jaringan secara cepat sehingga parafin tidak membeku

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 3 yang terdapat di bagian akhir topik ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Belajar 3.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan:

- 90 - 100% = baik sekali
- 80 - 89% = baik
- 70 - 79% = cukup
- < 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan mempelajari materi di topik 7. Bagus! Jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi topik 3, terutama bagian yang belum Anda kuasai.

Kunci Jawaban Tes

Tes 1

1. C
2. A
3. D
4. B
5. A

Tes 2

1. A
2. C
3. A
4. C
5. D

Tes 3

1. E
2. A
3. D
4. A
5. D

Daftar Pustaka

Bancroft J.D, Gamble M. (2008).*Theory and Practice of Histological Techniques*. Philadelphia: Elsevier

Treuting P.M, Dintzis S.M. (2012).*Comparative Anatomy and Histology*. United States of America: Elsevier

BAB VII MIKROTOMI

Erick Khristian, M.Si.

PENDAHULUAN



Saat ini seringkali diperlukan adanya pemeriksaan pada potongan jaringan atau organ untuk menegakkan diagnosis suatu penyakit. Jaringan tersebut haruslah diolah melalui serangkaian proses untuk dapat diamati secara mikroskopis. Untuk pengamatan mikroskopis sediaan jaringan harus dipotong dengan ketebalan tertentu menggunakan suatu teknik dan instrument khusus untuk memperoleh suatu sediaan jaringan yang representatif. Instrument yang digunakan untuk memperoleh hasil potongan jaringan yang tipis dan dapat teramati secara mikroskopis adalah mikrotom. Namun sangat disayangkan seringkali proses ini tidak diperhatikan dengan baik. Padahal pada proses ini dapat terjadi banyak kesalahan penggunaan yang menyebabkan sediaan seolah mengalami banyak kelainan dan kerusakan akibat melainkan dari kurangnya ketelitian pada saat pemotongan. Kesalahan proses pemotongan dengan mikrotom ini juga dapat menyulitkan proses pengamatan sediaan nantinya, yang pada akhirnya berimbas pada kesalahan interpretasi sediaan. Oleh karenanya menjadi penting untuk mengenali lebih mendalam mengenai mikrotom ini.

✂ ■ Sitohistoteknologi ✂ ■

Setelah mempelajari bab ini Anda diharapkan dapat :

1. Mengetahui jenis-jenis mikrotom
2. Menjelaskan bagian dan fungsi mikrotom
3. Menjelaskan prosedur penggunaan mikrotom
4. Menjelaskan teknik perawatan mikrotom

Kemampuan dalam menggunakan dan merawat mikrotom sangatlah penting, mengingat untuk dapat melakukan pemeriksaan akhir dari kinerja teknisi laboratorium patologi anatomi diperlukan preparat jaringan yang representatif.

Topik 1 Jenis Mikrotom

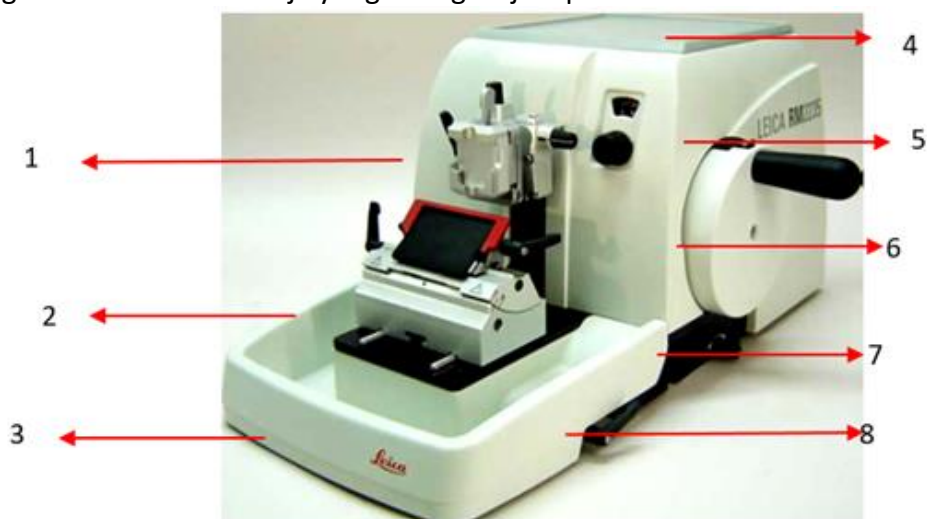
Mikrotomi merupakan bagian dari jaringan yang dipotong dan ditempelkan pada suatu kaca objek yang kemudian akan diproses sehingga menghasilkan suatu sediaan yang dapat teramati secara mikroskopis. Umumnya mikrotomi ini diperoleh dari jaringan yang ditanam dalam paraffin, sehingga didapat blok jaringan yang bersifat padat dan keras. Untuk memotong jaringan ini diperlukan mikrotom. Mikrotom akan memotong jaringan tersebut menggunakan pisau khusus secara vertikal, sehingga didapatkan pita jaringan dengan ketebalan tertentu.

Mikrotom terdiri dari berbagai macam jenis, diantaranya adalah:

A. ROTARY MICROTOME

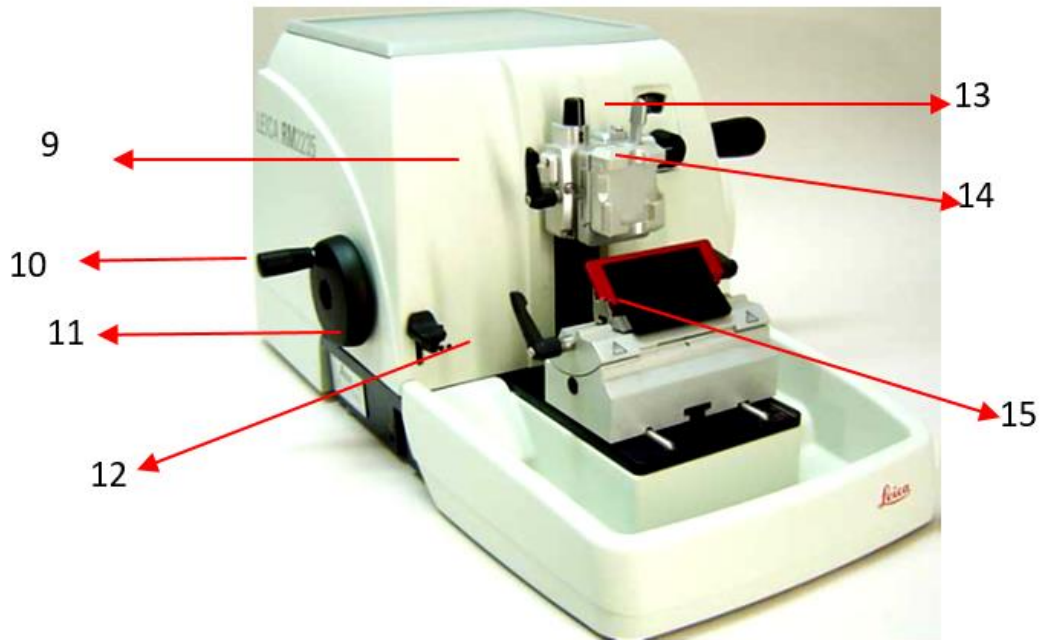
Rotary microtome atau mikrotom putar, bekerja menggunakan suatu tuas pemutar 360° yang dapat menggerakkan blok jaringan secara vertical ke atas atau ke bawah serta dapat mengubah posisi blok ke arah depan dan belakang. Mikrotom ini dilengkapi dengan pisau khusus yang dapat memotong blok paraffin dengan ketebalan mencapai 2-3 μm dan mudah digunakan pada hampir semua jenis potongan jaringan, baik jaringan yang bersifat keras, rapuh, ataupun berlemak

Mikrotom ini terdapat dalam beberapa jenis, mulai dari jenis manual yang mengharuskan semua pergerakan mikrotom diatur oleh operator, jenis semi otomatis yang memiliki satu motor penggerak otomatis juga tuas pemutar manual, hingga jenis otomatis yang dilengkapi dua motor penggerak dan tuas dengan fungsi lebih. Proses otomasi pada mikrotom ini dapat mengurangi kesalahan pada proses pemotongan berulang serta mengurangi efek kecelakaan kerja yang sering terjadi pada mikrotom manual.



Gambar 7.1. Rotary microtome

(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)



Gambar 7.2. Rotary microtome

(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)

Keterangan :

1. Penjepit kaset
2. Penjepit pisau
3. Bak limbah potongan jaringan
4. Rak penyimpanan
5. Pengunci roda pemutar
6. Roda pemutar halus
7. Tuas untuk mengaktifkan rem tangan
8. Tuas pengunci penjepit pisau
9. Tuas pengarah posisi penjepit kaset
10. Roda pemutar kasar
11. Tuas untuk mengaktifkan mekanisme pemotong kasar
12. Tuas penguncing untuk pengarah posisi penjepit pisau
13. Skala ketebalan potongan
14. Knop tambahan untuk mengatur ketebalan potongan
15. Pengunci pisau

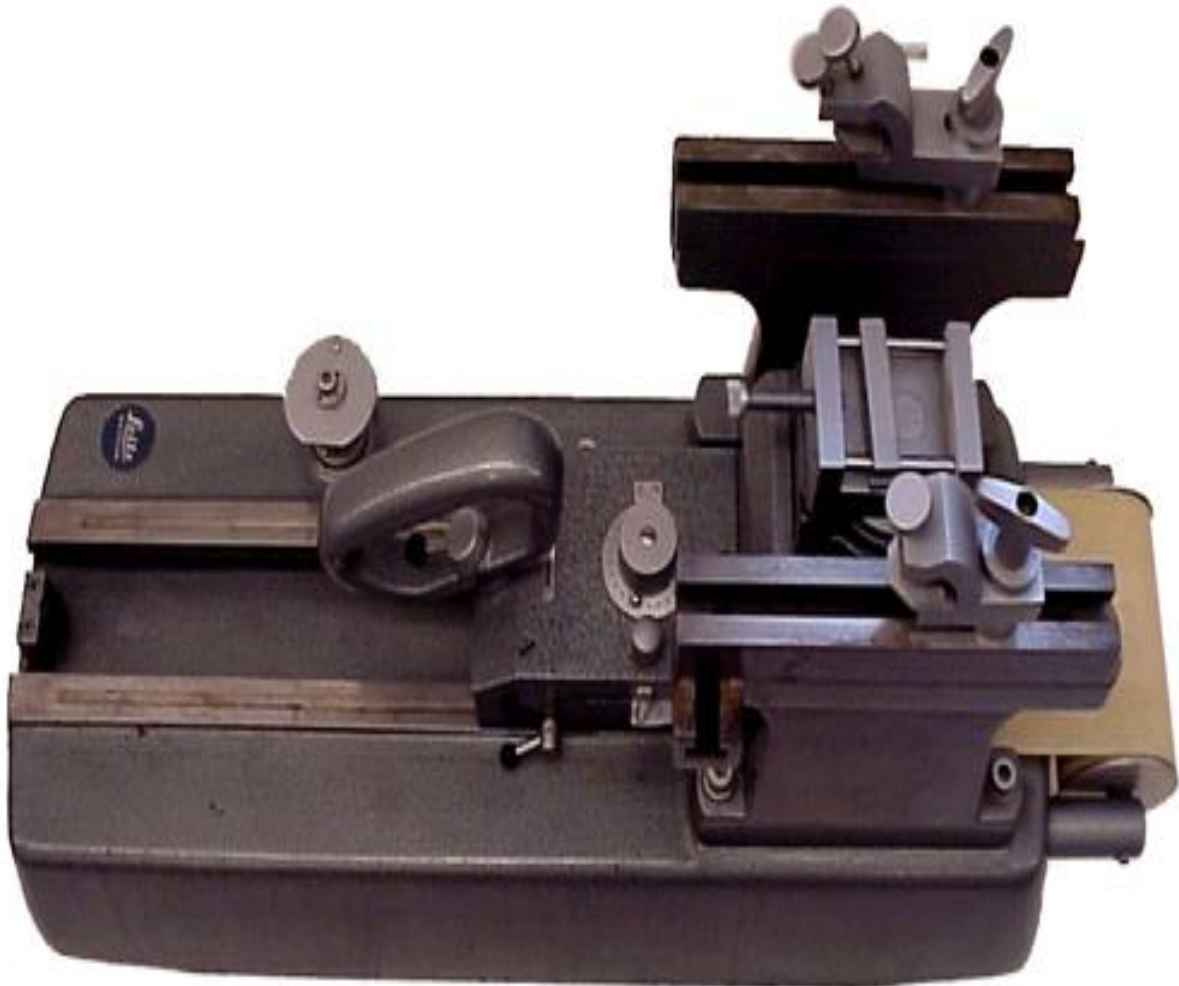
Untuk menjaga kondisi mikrotom jenis ini tetap dalam kondisi baik, perlu dilakukan perawatan rutin sebagai berikut:

1. Membersihkan mikrotom secara menyeluruh setelah selesai digunakan setiap harinya secara dengan membuang semua sisa paraffin menggunakan kuas halus atau kain halus yang dibasahi xylol kemudian dikeringkan secara menyeluruh.

2. Jika memungkinkan, gunakan minyak mikrotom atau oli khusus pada semua bagian pergerakan.
3. Mendokumentasikan setiap perawatan, perbaikan, dan perawatan rutin lainnya oleh teknisi yang menjamin mikrotom berada dalam kondisi baik dalam hal konsistensi hasil pemotongan dan keamanan kerja.
4. Menutup mikrotom jika tidak digunakan

B. SLIDING MICROTOME

Pisau pada mikrotom jenis ini berada pada satu posisi tetap, kemudian blok paraffin digeserkan pada mata pisau sehingga didapatkan pita jaringan yang diinginkan. Pada jenis lain, blok paraffin yang berada pada posisi diam dan mata pisau yang bergerak memotong blok. Mikrotom jenis ini digunakan untuk memotong blok jaringan seloidin dan blok paraffin berukuran besar.



Gambar 7.3. Sliding Microtome

(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)

C. ROTARY ROCKING MICROTOME

Umumnya digunakan dalam kriostat, bagian retraksi menggerakkan blok jaringan menjauhi pisau pada bagian atas, sehingga menghasilkan permukaan datar pada blok jaringan.



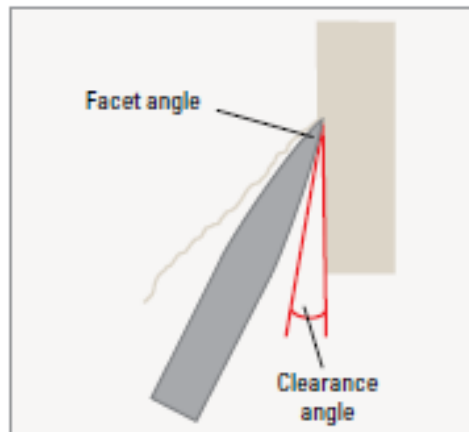
Gambar 7.4. Rotary rocking microtome

(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)

Salah satu kunci utama pada proses pemotongan dengan mikrotom adalah pisau yang digunakan. Saat ini digunakan dua jenis pisau, pisau stainless steel sekali pakai, pisau gelas, dan pisau berlian. Untuk pemotongan rutin dan kriotomi digunakan pisau stainless steel sekali pakai sedangkan dua jenis pisau lainnya digunakan untuk sediaan yang diamati dengan mikroskop electron dan menggunakan blok plastik resin.

Pisau yang tajam akan menghasilkan potongan halus dengan ketebalan 2-4 μm . Terdapat pula pisau yang dilapisi dengan polytetrafluoroethylene (PTFE) yang dapat mempermudah dan mengurangi factor penghambat proses pemotongan. Beberapa hal yang perlu diperhatikan pada penggunaan pisau mikrotom antara lain:

1. Pastikan pisau dalam keadaan bersih dan tajam. Hindari pemakaian satu pisau dalam jangka waktu yang terlalu panjang.
2. Posisi pemotongan harus disesuaikan sedikit demi sedikit untuk mengurangi masalah yang terjadi ada saat pembuatan pita jaringan.



Gambar 4. Sudut kemiringan pisau

(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)

3. Mengencangkan pisau sekali pakai terlalu kuat dapat menyebabkan munculnya artefak seperti bagian yang tebal dan tipis tidak sama rata.
4. Jaringan yang sangat keras akan sulit dipotong menggunakan pisau sekali pakai.
5. Perangkat penjepit pisau dan blok harus bersih dan bebas cacat.
6. Selama proses pemotongan tuas pemutar harus diputar perlahan.

Latihan

Setelah Anda mempelajari dari modul ini, mari kita mencoba melakukan beberapa latihan sederhana. Ikuti langkah-langkah dari perintah di bawah ini dan masukkan hasil dari setiap langkah pada tabel di bawahnya.

1. Siapkan kuas, kapas dan tissue
2. Bersihkan seluruh permukaan microtome dengan kuas bersih
3. Kemudian teteskan kapas dengan xilol hingga basah tapi tidak menetes
4. Bersihkan semua permukaan mikrotom yang berhubungan langsung dengan paraffin. Caranya dengan menggosoknya menggunakan kapas yang sudah diberikan xilol
5. Tunggu beberapa saat (1-3 menit)
6. Bersihkan dengan tisu kering
7. Setelah semua sudah bersih lanjutkan dengan tabel di bawah ini :

Tabel 7.1. Teknik Membersihkan Mikrotom

No	Langkah-Langkah Uji	Hasil Kerja
1	Gunakan tisu halus kemudian geserkan kepada penjepit pisau mikrotom	<input type="checkbox"/> Tisu tidak berubah <input type="checkbox"/> Tisu ada yang terkoyak
2	Gunakan tisu halus kemudian geserkan di belakang penjepit pisau mikrotom	<input type="checkbox"/> Tisu tidak berubah <input type="checkbox"/> Tisu ada yang terkoyak
3	Putar handle rotary mikrotom	
	1. Arah ke depan	Maju / Mundur
	2. Arah ke belakang	Maju / Mundur
4	Putar handle penggeser block holder	
	1. Arah ke depan	Maju / Mundur
	2. Arah ke belakang	Maju / Mundur

Petunjuk pengerjaan :

Setiap langkah yang Anda lakukan sesuai dengan instruksi yang di tabel, ceklis yang sesuai dengan hasil kerja Anda pada no 1 dan 2, dan coret yang tidak sesuai pada no 3 dan 4.

Ringkasan

Mikrotom merupakan salah satu instrument yang wajib dimiliki oleh laboratorium patologi anatomi. Karena dengan mikrotom ini Anda dapat melakukan pemotongan jaringan dengan sangat tipis hingga 2 μ m. Namun perlu Anda kerjakan semua langkah-langkah penggunaan mikrotom dengan benar mulai dari persiapan hingga perawatan. Dengan perawatan yang baik maka Anda akan mudah melakukan pemotongan dan tentunya akan menghasilkan sediaan yang baik pula.

Tes 1

1. Instrumen yang mampu memotong jaringan dengan sangat tipis adalah ?
2. Larutan yang digunakan untuk membersihkan mikrotom adalah ?
3. Jenis mikrotom yang sering digunakan adalah ?
4. Pisau mikrotom yang digunakan untuk memotong jaringan yang kecil dan lunak adalah tipe ?
5. Pisau mikrotom yang digunakan untuk memotong jaringan yang besar dan keras seperti myometrium adalah tipe ?

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1 yang terdapat di bagian akhir topik ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Belajar 2.

$$\text{Tingkat Penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang benar}}{\text{Jumlah seluruh soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan:	90 - 100% = baik sekali
	80 - 89% = baik
	70 - 79% = cukup
	< 70% = kurang

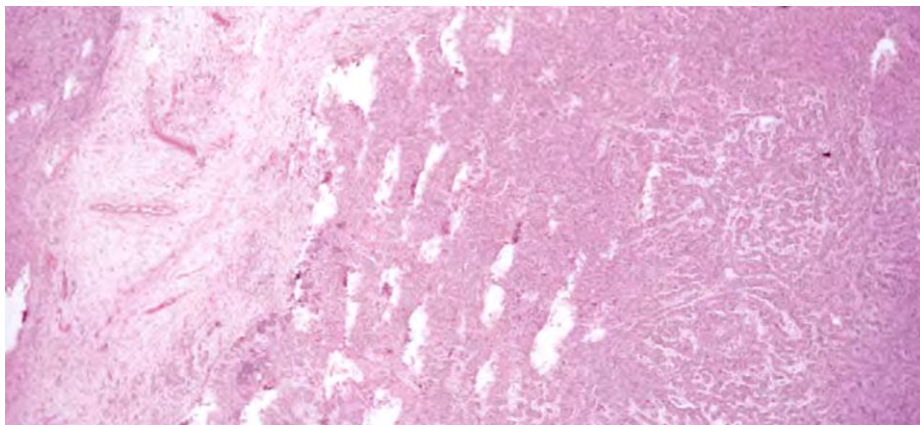
Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan mempelajari materi di topikselanjutnya. Bagus! Jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi topikini, terutama bagian yang belum Anda kuasai.

Topik 2 Teknik Pemotongan

Untuk mendapatkan pita jaringan yang baik harus melalui dua tahap pemotongan yang harus dilakukan secara berurutan. Tahap tersebut ialah, tahap potong kasar dan potong halus. Kedua tahap ini harus dilakukan secara teliti jika tidak dapat menyebabkan artefak pada pita jaringan yang dapat mempersulit proses pengamatan.

A. POTONG KASAR

Proses potong kasar atau trimming merupakan proses awal pemotongan blok jaringan yang bertujuan untuk membuang kelebihan paraffin yang menutupi jaringan sehingga permukaan jaringan dapat terbuka dan bisa dihasilkan pita jaringan yang utuh. Dikatakan potong kasar, dikarenakan pada proses ini mikrometer diatur pada ketebalan yang cukup tinggi yaitu pada 15-30 μ m. Pada proses ini perlu dilakukan dengan teliti karena jika tidak dapat mengakibatkan artefak pada pita jaringan. Pastikan blok jaringan sudah diseting di belakang pisau sehingga blok tidak langsung terpotong tebal, karena dapat menyebabkan blok pecah dan merusak jaringan di dalamnya.



Gambar 7.5. Hasil pemotongan yang terlalu kasar pada awal pemotongan sehingga menimbulkan banyak lubang pada jaringan
(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)

B. POTONG HALUS

Proses potong halus ini bertujuan untuk menghasilkan pita jaringan dengan ketebalan tertentu. Blok jaringan yang akan dipotong harus didinginkan terlebih dahulu untuk memberikan suhu yang stabil pada blok paraffin dan jaringan. Ketebalan pita jaringan untuk jaringan hasil pembedahan rutin ialah 3-4 μ m.

Idealnya hasil pemotongan yang baik akan saling menempel satu sama lain membentuk pita dengan ketebalan yang sama. Namun pita yang terbentuk dapat memiliki ketebalan yang

bervariasi meskipun dipotong pada skala yang sama. Variasi ketebalan pita jaringan ini dipengaruhi banyak factor seperti suhu, sudut penempatan pisau, dan kecepatan pemotongan, juga pengalaman teknisi. Perlu dilakukan pelatihan berulang-ulang untuk dapat konsisten menghasilkan pita jaringan yang baik secara dan efisien. Berikut merupakan beberapa permasalahan yang sering terjadi dan langkah untuk mengatasinya :

Tabel 7. 2. Penyebab kegagalan proses pemotongan dan solusinya

PENYEBAB	SOLUSI
Pita/potongan paralel menggulung	
1. Potongan tidak tersambung	1. Potong blok hingga paralel
2. Pisau tumpul	2. Ganti pisau atau geser pada bagian yang berbeda
3. Kelebihan paraffin	3. Potong kasar kelebihan parafin
4. Adanya listrik statis pada pita sehingga pita menggulung ke atas	4. Lembabkan udara disekitar area pemotongan, hindari penyebab listrik statis, tempatkan lembaran pengering dekat mikrotom.
Potongan yang tebal dan tipis	
1. Paraffin terlalu lembek untuk jaringan	1. Dinginkan blok atau tanam ulang jaringan pada paraffin yang lebih keras (paraplastin)
2. Sudut pemotongan kurang tepat	2. Atur ulang sudut pemotongan
3. Pisau atau blok longgar saat dijepit	3. Perkuat penjepit
4. Kegagalan mekanisme mikrotom	4. Lakukan perawatan, lumasi dan kalibrasi ulang mikrotom
Potongan tidak akan membentuk pita	
1. Paraffin terlalu keras untuk dipotong	1. Tanam ulang pada titik leleh paraffin yang lebih rendah
2. Robek ditengah pita	2. Bersihan pisau dari sisa paraffin dengan kain yang diberi sedikit xylol
3. Sudut pemotongan kurang tepat	3. Atur ulang sudut pemotongan
Jaringan tidak terpotong sempurna	
1. Proses impregnasi jaringan dengan paraffin tidak sempurna	1. Ulangi proses blocking

- | | |
|--|--|
| 2. Jaringan ditanam pada posisi yang salah | 2. Ulangi proses penanaman, posisikan jaringan dengan tepat. |
| 3. Jaringan hanya terpotong dipermukaan | 3. Posisikan ulang blok, potong lebih dalam |

Potongan yang tebal dan tipis

- | | |
|---|--|
| 1. Paraffin terlalu lembek untuk jaringan | 1. Dinginkan blok atau tanam ulang jaringan pada paraffin yang lebih keras (paraplastin) |
| 2. Sudut pemotongan kurang tepat | 2. Atur ulang sudut pemotongan |
| 3. Pisau atau blok longgar saat dijepit | 3. Perkuat penjepit |
| 4. Kegagalan mekanisme mikrotom | 4. Lakukan perawatan, lumasi dan kalibrasi ulang mikrotom |

Jaringan tidak terpotong sempurna

- | | |
|--|--|
| 1. Proses impregnasi jaringan dengan paraffin tidak sempurna | 1. Ulangi proses blocking |
| 2. Jaringan ditanam pada posisi yang salah | 2. Ulangi proses penanaman, posisikan jaringan dengan tepat. |
| 3. Jaringan hanya terpotong dipermukaan | 3. Posisikan ulang blok, potong lebih dalam |

Potongan lebih sering menggulung dibanding menjadi pita yang datar

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1. Pisau tumpul | 1. Gunakan pisau yang baru |
| 2. Sudut pemotongan tidak tepat | 2. Atur ulang posisi pisau |
| 3. Potongan terlalu tebal | 3. Kurangi ketebalan pemotongan |

Pita/potongan paralel menggulung

- | | |
|---|---|
| 1. Potongan tidak tersambung | 1. Potong blok hingga paralel |
| 2. Pisau tumpul | 2. Ganti pisau atau geser pada bagian yang berbeda |
| 3. Kelebihan paraffin | 3. Potong kasar kelebihan parafin |
| 4. Adanya listrik statis pada pita sehingga pita menggulung ke atas | 4. Lembabkan udara disekitar area pemotongan, hindari penyebab listrik statis, tempatkan lembaran pengering dekat mikrotom. |

Pemotongan jaringan yang keras seringkali sulit dilakukan. Hal ini dapat terjadi karena proses fiksasi yang kurang baik atau karena proses yang terlalu lama atau berlebihan. Hal ini dapat diatasi dengan mengganti pisau mikrotom, merendam blok dalam air mengalir selama 30 menit, dan mengubah sedikit sudut pisau. Jika masih sulit dilakukan, gunakan sedikit softening agent pada permukaan blok.

Hal yang harus diperhatikan selanjutnya setelah didapatkan pita jaringan yang sesuai adalah proses floating atau penempatan pita jaringan pada air hangat sebelum ditempelkan pada kaca objek. Proses ini bertujuan untuk membantu mengurangi lipatan pada pita jaringan. Pada proses ini pastikan air yang digunakan bersih, suhu air tidak terlalu panas dan tidak terlalu lama dibiarkan mengambang diatas air karena dapat menimbulkan artefak pada jaringan.

Setelah pita menempel pada kaca objek, hal yang selanjutnya dilakukan adalah mengeringkan sediaan untuk menghilangkan sisa air yang masih terperangkap dibawah pita jaringan. Proses pengeringan bias dilakukan didalam oven atau diatas hotplate. Suhu pemanasan harus dijaga tidak terlalu panas, cukup pada titik leleh paraffin. Suhu yang terlalu panas dapat menyebabkan adanya perubahan struktur pada jaringan. Pengeringan untuk berbagai jaringan juga dianjurkan dilakukan pada 37°C selama satu malam. Sediaan yang telah benar-benar kering dapat dilanjutkan dengan pewarnaan sesuai dengan kebutuhannya masing-masing.

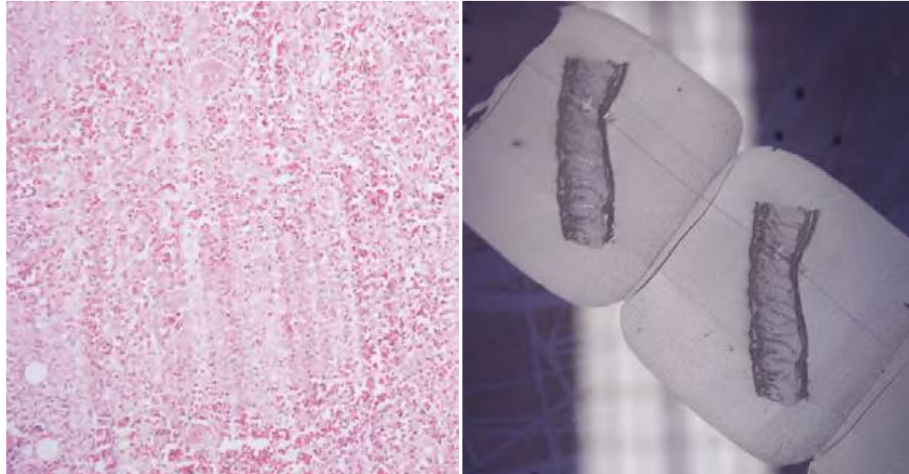
Topik 3

Penggunaan, dan Pemeliharaan Mikrotom

A. PERSIAPAN SEBELUM PEMOTONGAN

Sebelum memulai proses pemotongan perlu diperhatikan beberapa hal berikut:

1. Pastikan fiksasi dilakukan dengan tepat.
Proses fiksasi merupakan proses paling penting untuk dapat menghasilkan detail morfologi jaringan yang baik. Proses fiksasi yang kurang sempurna dapat menimbulkan kesulitan proses pemotongan dan akan menghasilkan kelainan morfologi.
2. Pastikan proses jaringan dilakukan dengan tepat.
Hasil proses jaringan yang tidak baik (terlalu cepat atau terlalu lama) akan menimbulkan kesulitan pemotongan jaringan.
3. Letakkan mikrotom dan *waterbath* pada posisi yang sesuai.
Posisikan mikrotom pada permukaan yang datar, stabil, tidak licin, terlindung dari aliran udara berlebih, jauh dari tempat lalu-lalang orang, diletakkan pada posisi yang ergonomis dan minim menimbulkan kecelakaan kerja.
4. Gunakan fitur pengaman dengan benar.
Hati-hati saat memasang atau mengatur pisau. Gunakan pinset atau kuas untuk mengambil pita jaringan dari pisau atau blok jaringan. Pastikan semua penjepit pada posisi yang baik dan kunci pengaman pada posisi yang benar.
5. Atur sudut pemotongan pisau
Pisau yang dipakai harus tajam dan bersih serta harus diposisikan pada sudut optimum, berkisar pada 35°. Sudut yang tepat dapat mengurangi kegagalan dan artefak pada pita jaringan.

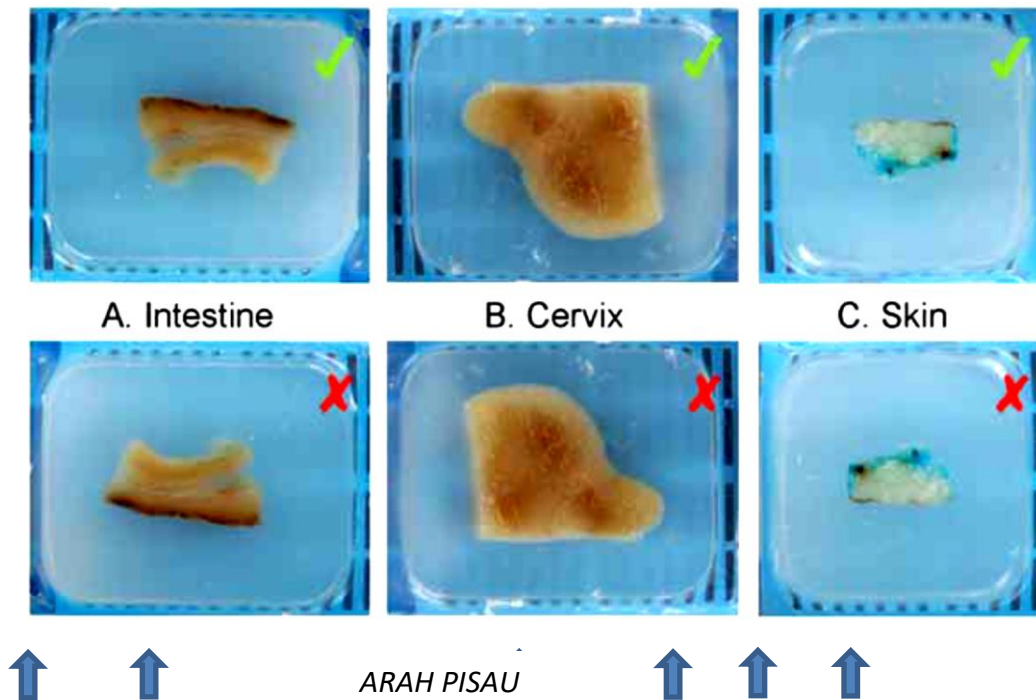


Gambar 7.6. Hasil pemotongan dengan pisau yang kotor dan kurang tajam, tampak garis-garis hasil pemotongan pada pita jaringan
(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)



Gambar 7.7. Pita jaringan yang pendek dan tidak sempurna karena sudut pemotongan yang kurang tepat
(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)

6. Maksimalkan usia pemakaian pisau
Bersihkan pisau secara berkala, dan gunakan setiap bagian pisau dari satu ujung ke ujung lainnya. Hindari kontak dengan benda keras seperti pinset dan kuas.
7. Tempatkan kaset jaringan pada posisi yang tepat.
Posisikan jaringan pada posisi yang dapat meminimalisir terbentuknya lipatan.



Gambar 7.8. Contoh penempatan jaringan pada saat pemotongan

(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)

8. *Water bath* yang digunakan untuk meletakkan pita jaringan hasil pemotongan dan akan ditempelkan pada kaca objek harus dijaga suhu airnya. Suhu air harus berkisar pada 10°C dibawah titik leleh paraffin. Air yang digunakan harus bersih dan bebas gelembung.
9. Pastikan blok jaringan dalam keadaan dingin.
Blok yang dingin akan mengerasan blok dan mempermudah untuk menghasilkan pita jaringan yang tipis. Sedikit air akan masuk kedalam jaringan, membuat jaringan sedikit membengkak dan lebih mudah dipotong.
10. Penjepit harus terpasang kuat, namun tidak terlalu kencang karena dapat menimbulkan artefak pada pita jaringan.
11. Pastikan mikrotom dank aca objek yang digunakan dalam keadaan bersih.

C. LANGKAH-LANGKAH PEMOTONGAN

1. Pasang dan jepit kaset jaringan, pastikan roda pemutar dalam keadaan terkunci
2. Pasang dan atur sudut kemiringan pisau, kencangkan.
3. Potong kasar:
 - Tempatkan blok jaringan pada posisi yang tepat dengan mengatur tuas pemotong kasar.
 - Buka pengunci tuas pemutar.

- Gerakan roda pemutar secara perlahan sampai blok jaringan sedikit mengenai permukaan pisau.
 - Tekan tuas pemotong kasar
 - Mulai proses pemotongan dengan memutar roda pemutar searah jarum jam.
 - Hentikan proses pemotongan ketika permukaan jaringan sudah terbuka.
 - Lepaskan tuas pemotong kasar.
4. Potong halus
- Atur ketebalan jaringan yang diinginkan dengan memutar knob pengatur ketebalan dan memperhatikan skala ketebalan.
 - Gunakan sisi pisau yang berbeda untuk proses potong kasar dan potong halus dengan menggeser posisi pisau, pastikan pisau sudah terpasang dengan kuat.
 - Mulai proses pemotongan dengan memutar roda pemutar searah jarum jam.
 - Ambil pita jaringan yang terbentuk dengan pinset sesuai kebutuhan dan pindahkan ke atas waterbath untuk selanjutnya ditempelkan pada kaca objek.
 - Posisikan kembali blok jaringan ke belakang pisau, kunci tuas pemutar.
 - Lepaskan blok jaringan dari penjepit, jangan anti dengan blok lain yang akan dipotong.

D. PERAWATAN MIKROTOM

Untuk menghasilkan pita jaringan yang baik harus dilakukan perawatan berkala agar mikrotom dapat terus bekerja dengan baik. Beberapa diantaranya adalah:

1. Lepaskan blok jaringan dari penjepit blok, pastikan tuas dalam keadaan terkunci sebelum hal ini dilakukan.
2. Lepaskan dan bersihkan pisau yang telah digunakan dari sisa jaringan yang masih tertinggal, simpan pada kotak pisau.
3. Bersihkan bak penampung sisa jaringan.
4. Bersihkan mikrotom dengan lap kering dan halus.
5. Tutup mikrotom dengan kain atau plastic agar tidak terkena debu.
6. Lumasi bagian gerak mikrotom secara berkala.
7. Lakukan pemeriksaan berkala minimal satu tahun sekali oleh teknisi.

Latihan

Setelah anda membaca topik 2 dari topik mikrotom ini, silahkan anda lakukan latihan berikut. Ambil sebuah blok jaringan yang mengandung banyak darah dan sel (semisal hati/limp/endometrium). Kemudian lakukan pemotongan dan tuliskan hasilnya di dalam tabel ini.

Tabel Latihan Penggunaan Mikrotom

No	Kegiatan	Hasil
1	Lakukan pemotongan kasar (trimming) dengan ketebalan 20-30 mikron dengan rotasi yang kuat, kemudian dilanjut dengan potong halus dengan ketebalan 5 mikron. Ambil pita 1-5 dan amati	
2	Lakukan pewarnaan dari tahap no 1 dan gambarkan hasil dari sediaan tersebut secara makroskopis	
3	Lakukan pemotongan halus dengan ketebalan 5 mikron. Hentikan pemotongan ketika posisi pisau ditengah jaringan, tunggu 2 detik kemudian lanjutkan potong. Gambarkan hasil secara makroskopis	
4	Lakukan pewarnaan pada sediaan hasil dari no 3 dan gambarkan hasilnya secara mikroskopis	

Petunjuk Jawaban Latihan

Untuk membantu Anda dalam mengerjakan soal latihan tersebut silakan pelajari kembali materi tentang

- 1) Teknik pemotongan kasar
- 2) Teknik pemotongan halus

Ringkasan

Mikrotom merupakan suatu instrumen untuk menghasilkan suatu pita jaringan yang selanjutnya akan diproses sehingga menghasilkan suatu preparat histologi yang diamati secara mikroskopis. Mikrotom terdiri dari banyak jenis, diantaranya rotary microtome, sliding microtome, dan rotary rocking microtome. Proses pemotongan mikrotom dilakukan dalam dua tahap yaitu potong kasar dan potong halus. Potong kasar bertujuan untuk membuang kelebihan paraffin dan membuka permukaan jaringan yang akan dipotong. Sedangkan potong halus bertujuan untuk dapat menghasilkan suatu pita jaringan dengan ketebalan tertentu dan didapatkan suatu preparat histologi yang representatif. Semua proses tersebut harus dilakukan dengan cermat dan teliti agar tidak terjadi berbagai kelainan dan artefak jaringan. selain itu

perlu dilakukan perawatan secara berkala untuk menjaga mikrotom tetap bekerja dengan baik setiap akan digunakan.

Tes 2

- 1) Bagaimana solusi yang tepat agar pita tidak menggulung akibat adanya listrik statis ?
- 2) Bagaimana solusi yang harus dilakukan seorang teknisi ketika pita yang dihasilkan terlalu lembek ?
- 3) Bagaimana solusi yang harus dilakukan ketika pita robek ?
- 4) Bagaimana solusi yang harus dilakukan ketika jumlah jaringan yang ada sebanyak 3 buah namun hasil sediaan mikroskopis hanya dua yang muncul ?

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 2 yang terdapat di bagian akhir topik ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Kegiatan Belajar 2.

$$\text{Tingkat Penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang benar}}{\text{Jumlah seluruh soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan:	90 - 100% = baik sekali
	80 - 89% = baik
	70 - 79% = cukup
	< 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan mempelajari materi di topik ini. Bagus! Jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi topik6, terutama bagian yang belum Anda kuasai.

Kunci Jawaban Tes

Tes Formatif 1

1. Mikrotom
2. Xilol
3. Rotary microtome
4. Low profile knife
5. Hard profile knife

Tes Formatif 2

1. Melembabkan area penjepit pisau
2. Dinginkan kembali ke lemari pendingin atau coldplate
3. Ganti pisau atau geser pisau dengan yang masih baru
4. Potong kasar/trimming ulang.

Daftar Pustaka

Bancroft, JD. Gamble, M, 2013, Teory and practice of histological technique, Philadelphia: Elseiver

Carson, F.L., Hadik, C., 2009, Histotechnology : A self-instructional text. 3rd Edition. Hongkong: American Society for Clinical Pathology Press.

Scientia, 101 Steps to better Histology. Leica Microsystems' Education Series

Scientia, Microtomy and Paraffin Section Preparation. Leica Microsystems' Education Series

Scietia, Leica RM 2235, Rotary Microtome. Leica Microsystems' Education Series

BAB VIII PEMBUATAN SEDIAAN SITOLOGIK

Dewi Inderiati, S.Si., M.Biomed.

PENDAHULUAN



Sitologi merupakan salah satu bidang yang berkaitan dengan ilmu yang mempelajari tentang morfologi sel-sel secara individual atau sel yang berasal dari fragmen jaringan yang diamati secara mikroskopis. Sedangkan sitopatologi merupakan cabang sitologi yang khusus mempelajari tentang kelainan morfologi akibat jejas atau faktor lainnya (mikroorganisma atau kanker). Benar atau tidaknya suatu diagnosis tergantung dari kualitas hasil sediaan sitologik yang

dihasilkan. Sedangkan untuk menghasilkan sediaan sitologik yang baik maka kualitas persiapan materi untuk dijadikan sediaan wajib diketahui dengan benar.

Diagnostik atau sitologi klinis adalah studi tentang penilai normal dan kelainan pada sel yang diperoleh dari berbagai situs tubuh (deteksi karakteristik morfologi abnormal yang dipisahkan dari tubuh manusia).

Sediaan sitologik dapat dibuat dari berbagai sumber dalam tubuh (urin, puting, dahak, vagina, sinus, dll), kerokan diperoleh (mukosa bukal, lambung, saluran pernapasan), dan dari cairan yang terkumpul di dalam tubuh (pleura, peritoneal, perikardial) bahkan dari aspirasi benjolan tubuh yang terlihat atau teraba.

Seorang sitoteknologis wajib mengetahui teknik-teknik pembuatan sediaan sitologik. Laboratorium sitologi yang mengolah spesimen sitologik melakukan kegiatan mulai dari menerima spesimen hingga mengeluarkan hasil yang maksimal. Dalam mengolah spesimen sitologik, maka seorang tenaga sitologis harus mampu mempertahankan kondisi sel sebaik mungkin. Setelah sediaan telah didapatkan, maka seorang sitologis harus mampu mengidentifikasi secara teknik sediaan yang telah dibuatnya sehingga menjadi sediaan yang layak untuk dijadikan diagnosis atau yang biasa disebut sitologik diagnostik. Keuntungan dari sitologi diagnostik adalah sifatnya yang non-invasif, prosedurnya sederhana, membantu dalam pelaporan yang cepat, relatif murah, diterima oleh masyarakat dan memfasilitasi skrining penyakit tertentu di lapangan seperti kanker servik.

Akurasi pemeriksaan sitologi dari bagian-bagian tubuh sangat tergantung pada kualitas sediaan, persiapan, pewarnaan dan interpretasi dari sediaan itu. Kekurangan dalam setiap langkah-langkah ini akan mempengaruhi kualitas sediaan sitologik. Akurasi dan presisi dalam sitologi diagnostik merupakan isu utama dalam praktek sitologi. Selama bertahun-tahun banyak tindakan pengendalian mutu telah diperkenalkan untuk memastikan standar yang tinggi dalam sediaan sitologik. Peningkatan kualitas sediaan sitologik dilakukan dengan peningkatan pendidikan berkelanjutan, sertifikasi dan akreditasi laboratorium untuk otoritas

nasional, pengenalan jaminan kualitas dan tindakan pengendalian mutu, komputerisasi, pengenalan terminologi yang diterima secara internasional, perbaikan teknik persiapan spesimen, teknik kuantitatif dan analitik sediaan sitologik serta penggunaan teknologi canggih termasuk otomatisasi sediaan. Interpretasi yang akurat dari spesimen sitologik tergantung pada faktor-faktor berikut:

- Metode pengumpulan spesimen.
- Fiksasi dan fiksatif (bab 4)
- Teknik Pembuatan Sediaan Sitologik.
- Pewarnaan (bab 9) dan penutupan sediaan sitologik

Kekuatan besar sitologi diagnostik terletak pada prinsip dan pendekatannya. Inti dari sitoteknisi adalah mencari, dan sedapat mungkin mengklasifikasikan sel neoplastik dalam spesimen klinis. Sayangnya, sebagian besar spesimen yang didapatkan untuk penilaian sitologi mengandung lebih banyak sel normal dan bahan yang tidak relevan daripada sel neoplastik yang diprediksikan. Oleh karena itu seorang sitoteknisi harus menemukan cara untuk memusatkan beberapa sel neoplastik yang mungkin ada pada daerah yang relatif kecil dari spesimen bahkan sediaan sitologik.

Pada bab ini Anda hanya akan dikenalkan dengan tahap awal dalam pembuatan sediaan sitologik. Tahap awal yang akan diajarkan kepada Anda adalah proses-proses dalam laboratorium sitologi mulai mengolah spesimen menjadi sediaan yang siap diwarnai, mewarnai sediaan sitologik dan melakukan penilaian mikroskopik secara teknik untuk disimpulkan apakah sediaan sitologik tersebut layak untuk dijadikan dasar diagnosis atau tidak. Bab ini akan membahas pula secara rinci teknik persiapan spesimen yang telah ada dan diuji yang oleh sitoteknologis selama beberapa dekade terakhir. Banyak teknik yang sangat sederhana dan mudah, sedangkan metode lain akan lebih menantang secara teknis dan menuntut tingkat keterampilan yang tinggi. Namun untuk itu Anda perlu mengandalkan teknologi modern semi otomatis untuk mengatasi beberapa kesulitan yang akan dihadapi dalam menangani berbagai spesimen yang diterima di laboratorium.

Setelah Anda mempelajari dan menerapkan bab ini, Anda diharapkan dapat :

- Menjelaskan tentang sumber-sumber spesimen sitologik
- Menerapkan tentang teknik pembuatan sediaan sitologik
- Menerapkan control kualitas pada sediaan sitologik

Kemampuan Anda dalam melakukan membuat sediaan sitologik yang baik menjadi hal yang utama dalam hasil kerja Anda. Untuk itu pelajari dengan seksama materi-materi yang berada di dalam bab ini dan praktekan dengan benar.

Topik 1

Pengumpulan Spesimen Sitologik

Diagnostik atau sitologi klinis adalah studi tentang morfologi normal atau perubahan sitologik akibat penyakit yang diderita oleh suatu individu dan diperoleh dari berbagai bagian dari tubuh individu tersebut. Namun sitologik klinik bukan merupakan baku standar dari pemeriksaan penyakit tersebut yang mana teknik histopatologi tetap menjadi teknik standar emas dalam patologi diagnostik. Interpretasi dari perubahan morfologi seluler berdasarkan pengamatan individu dan sering tidak dapat dipaksa akibat adanya kriteria yang kaku. Dengan demikian, dalam banyak kasus sitologi klinis yang tidak bisa menjadi kesimpulan suatu penyakit dan tetap dibutuhkan konfirmasi histopatologi untuk alasan berikut :

- Seringkali sifat lesi tidak begitu jelas seperti di sediaan histologik.
- Lokasi lesi sulit untuk merujuk dengan gambaran sitologik. Misalnya sel kanker skuamosa yang ditemukan dalam spesimen sitologik sputum mungkin berasal dari mukosa bukal, faring, laring atau bronkus.
- Ukuran lesi tidak dapat dibandingkan dengan gambaran sitologi.
- Jenis dari lesi yang belum pasti. Misalnya pada karsinoma in situ jika dibandingkan dengan invasi awal lebih sulit untuk menilai karena hubungan dari sel stroma di sekitarnya tidak dapat ditentukan oleh gambaran sitologi.

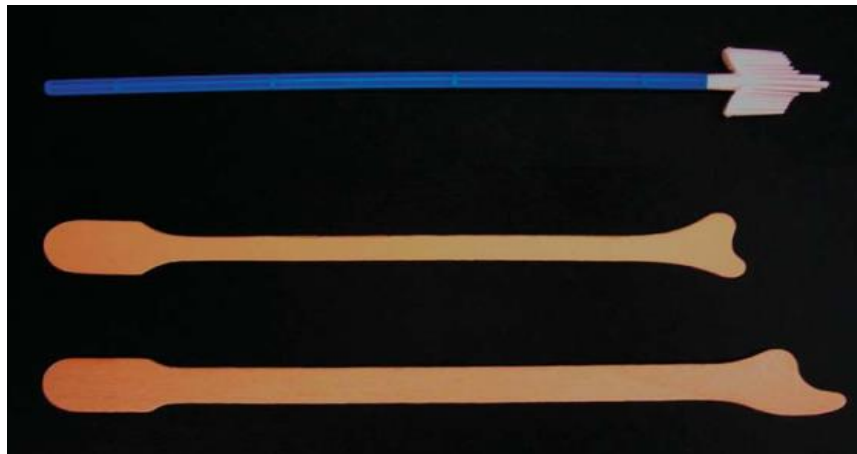
Namun dengan keterbatasan demikian, sediaan sitologik dapat menjadikan skrining untuk pencegahan suatu penyakit. Adapun secara umum terdapat teknik dasar dalam pengambilan spesimen sitologik yaitu teknik eksfoliatif (spontan dan mekanik) dan aspirasi benang halus (FNA).

1. SITOLOGIK EKSFOLIATIF

Sitologik eksfoliatif merupakan prosedur cepat dan sederhana. Teknik ini merupakan metode alternatif dari biopsi untuk situasi tertentu. Dalam sitologik eksfoliatif, sel-sel didapatkan dari permukaan tubuh yang banyak mengandung sel, seperti bagian dalam mulut, saluran reproduksi wanita dan lainnya. Sitologik eksfoliatif berbeda dengan pengambilan spesimen sitologik seperti biopsi jarum halus. Metode mengumpulkan spesimen hanya untuk menganalisis kehadiran sel-sel abnormal atau atipikal, atau dengan menunjukkan adanya sel-sel ganas. Teknik ini juga hanya berguna untuk pemeriksaan sel permukaan dan sering memerlukan analisis sitologi tambahan untuk mengkonfirmasi hasil. Contoh, ketika seorang wanita memiliki hasil *Pap smear* yang menunjukkan sel-sel atipikal dan hasil ini merupakan hasil pertama dari tes sitologik eksfoliatif, maka biasanya pap smear diulang dalam waktu enam sampai dua belas bulan. Jika hasil pengulangan menunjukkan kemunculan sel atipikal kembali maka tes lebih lanjut dapat dilakukan untuk menentukan apakah terdapat kehadiran sel-sel kanker. Metode sitologik eksfoliatif ini dapat juga digunakan untuk dokter dalam memeriksa adanya kanker di mulut atau tenggorokan. Pengambilan spesimen dengan cara

mengambil kerokan kulit mulut dalam dengan jumlah sedikit dan untuk melihat apakah ada sel atipikal atau keganasan.

Dalam metode ini, sel-sel dikumpulkan setelah sel-sel itu secara spontan terlepas oleh tubuh (“pengelupasan spontan”) atau secara manual digores dari permukaan dalam tubuh (“pengelupasan mekanik”). Contoh pengelupasan spontan adalah ketika sel-sel dari rongga pleura atau rongga peritoneum terlepas ke dalam cairan pleura atau peritoneum. Cairan ini dapat dikumpulkan melalui berbagai metode untuk kemudian diproses. Sedangkan contoh pengelupasan sitologi secara mekanik yang sering dilakukan adalah sediaan sitologik servikal *Pap smear*. Pada sediaan sitologik servikal *Pap smear*, sel-sel dikorek dari leher rahim dengan menggunakan spatula ayre atau sikat servik (Gambar 8.1). Selain servikal *Pap Smear*, brushings bronkial merupakan spesimen yang sel-selnya dilepas secara mekanik, di mana bronkoskop dimasukkan ke dalam trakea dan digunakan untuk mengevaluasi lesi terlihat kemudian menyikat sel dari permukaan dilakukan proses selanjutnya. Dari teknik pengumpulan spesimen yang berasal dari sel-sel yang terlepas (melibatkan penggosokan, penyikatan atau pencucian rongga tubuh), teknik yang paling sederhana adalah teknik pengumpulan spesimen yang sel-selnya berasal dari sel yang terlepas secara spontan.



Gambar 8.1. Sikat Servikal dan Spatula Ayre yang digunakan untuk mendapatkan spesimen sel eksfoliatif spontan

Sumber (Cytopathology, Shambayati)

2. Spesimen Sel Eksfoliatif Spontan

Spesimen Sel Eksfoliatif Spontan seperti yang telah disebutkan di atas, merupakan spesimen yang berisi sel-sel yang terlepas dengan sendirinya akibat mekanisme tubuh atau periode sel tersebut. Jenis-jenis spesimen sel eksfoliatif spontan adalah cairan peritoneal, cairan pleura, cairan perikardium, urin, kista, pencucian (peritoneal, kantung kemih).

Cairan spesimen dikumpulkan ke dalam wadah yang bersih, kering, tidak perlu steril, dan dikirim ke laboratorium sesegera mungkin. Jika cairan tidak dapat dikirim segera mungkin, maka harus disimpan dalam lemari es pada 4°C dan tidak boleh membeku. Cairan spesimen tidak perlu ditambahkan cairan fiksasi atau antikoagulan tertentu. Spesimen yang didapatkan kadang-kadang dengan mata telanjang menunjukkan penyebab efusi dan sifat dari sel yang

terkandungnya. Oleh karena itu, untuk setiap spesimen yang diterima oleh laboratorium harus dicatat besaran volume, warna, kejernihan, dan fitur fisik lain yang tidak biasa, seperti bau tak sedap, opasifikasi, atau viskositas (kekentalan) yang tinggi. Dua contoh lain adalah sitologi urin dan sitologi sputum, yang keduanya merupakan contoh paling awal dalam penerapan sitologi diagnosis pada penyakit manusia.

a. Pengumpulan Sitologik Urin

Urine telah lama digunakan sebagai alat skrining untuk kanker kandung kemih. Sitologik urin merupakan suatu teknik sederhana non-invasif yang digunakan untuk skrining kanker kandung kemih. Sitologik urin memiliki nilai sensitifitas yang tinggi untuk mendeteksi karsinoma in-situ dan lesi sistem urinaria tingkat tinggi, namun, sensitivitasnya akan menjadi lebih rendah dalam mengidentifikasi tumor tingkat rendah. Saat ini teknologi pembuatan sediaan sitologik urin terus dikembangkan untuk memahami bagaimana teknik pengumpulan dan teknik fiksasi yang baik untuk meningkatkan sensitifitas pemeriksaan sitologik urin. Faktor lain yang dapat menyebabkan hasil negatif pada sitologik urin adalah alur kerja tradisional laboratorium. Sebagian besar spesimen urin yang dikumpulkan baik di rumah sakit atau di laboratorium dibagi ke beberapa departemen laboratorium. Proses yang biasa dilakukan adalah spesimen urin akan diproses pertama kali untuk pemeriksaan kimia urin rutin. Hal itulah yang menjadi salah satu faktor terjadinya perubahan pada spesimen baik ukuran ataupun kerusakan dari sel-sel yang ada dalam urin tersebut.

Pasien yang memiliki kemungkinan kanker kandung kemih memiliki kemungkinan urin yang keluar sebanyak 150 ml setiap keluar. Untuk mencapai hasil yang maksimal, wadah spesimen dipisahkan antara wadah yang kosong dengan wadah yang berisi larutan fiksasi, sehingga pasien atau tenaga laboratorium dapat mengukur volume urin yang didapatkan dan kemudian disatukan dengan larutan fiksasi dengan perbandingan 1:1. Ketika urin sudah disatukan dengan larutan fiksasi, maka urin dapat disimpan hingga 3 hari tanpa mengalami perubahan morfologi dan jumlah sel. Spesimen urin untuk pemeriksaan sitologik perlu diperhatikan bahwa urin yang diambil adalah urin yang pertama keluar (first voided) yang berbeda dengan urin untuk pemeriksaan urin rutin yaitu urin kedua (mid stream).



Gambar 8.2. Wadah spesimen urin, dimana terdapat dua wadah, satu wadah untuk menampung urin pasien, dan wadah kedua berisi larutan fiksasi untuk dicampurkan ketika urin sudah didapatkan dengan perbandingan 1:1.

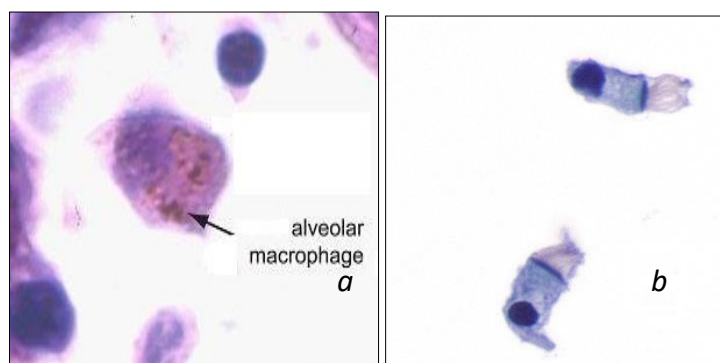
(Sumber : anonymous, Urine for Cytology)

b. Pengumpulan Sitologik Sputum

Kanker paru-paru adalah salah satu penyebab utama kematian di dunia. Hampir satu juta orang meninggal setiap tahun karena penyakit fatal ini. Deteksi dini adalah satu-satunya cara ketika suatu penyakit dapat disembuhkan dengan reseksi sebelum terjadinya metastasis lokal atau jauh. Ada banyak teknik skrining dalam mendeteksi kanker paru-paru dini seperti sitologi sputum, X-Ray dan bronkoskopi fiberoptik yang biasa digunakan untuk diagnosis dini kanker paru-paru.

Sitologik sputum telah berhasil dalam sejumlah besar kasus dalam diagnosis karsinoma bronkogenik. Sputum dapat dikumpulkan secara spontan atau bisa diinduksi menggunakan metode aerosol. Spesimen sputum dianggap memadai jika makrofag alveolar atau sel epitel bronkial terlihat di dalam sediaan sitologik. Hal itu dikarenakan sel makrofag alveolar atau sel epitel bronkial menunjukkan bahwa spesimen benar-benar berasal dari dalam paru-paru dan bukan sekresi ludah. Selain itu setidaknya terdapat 5 - 150 makrofag dalam spesimen untuk dapat dikatakan spesimen layak untuk dinilai. Ada sejumlah faktor yang terlibat dalam keberhasilan skrining sitologik sputum, namun yang paling penting adalah mendapatkan spesimen yang layak. Faktor lain yang terlibat adalah jumlah spesimen yang sangat kecil, spesimen kering, spesimen hanya berisi cairan saliva atau cairan hidung dan tentunya semua itu akan mengganggu hasil pemeriksaan.

Spesimen yang baik untuk dilakukan pemeriksaan adalah sputum pagi. Spesimen sputum pagi merupakan sputum hasil dari akumulasi sekresi dalam waktu semalam. Spesimen sputum diambil selama tiga sampai lima hari berturut-turut untuk memastikan akurasi diagnosis yang maksimum. Spesimen sputum yang segar tanpa melewati larutan fiksasi akan menghasilkan nilai yang lebih baik dibandingkan spesimen yang dicampur dengan etil alkohol 70% - 90 % atau larutan fiksasi seperti *carbomax* atau *sarcomano*. Sputum harus diperiksa secara hati-hati dengan menuangkan spesimen ke dalam cawan petri dan memeriksanya pada alas petri yang berlatar belakang gelap. Pilih bagian yang berdarah, berubah warna atau padat.



Gambar 8.3. Gambaran sitologik sel alveolar makrofag (a) dan sel bronkial (b).

(Sumber :Kunihiko Hiraiwa and Stephan F. van Eeden , 2013)

3. Spesimen Sel Eksfoliatif Mekanik

Spesimen sel eksfoliatif mekanik merupakan suatu spesimen yang didapat dari mekanisme mekanik. Mekanisme mekanik yang dimaksud adalah sikatan, penyemprotan dan kerokan. Spesimen sel eksfoliatif mekanik antara lain adalah servikal *Pap smear*, brushings (bronkial, lambung, empedu, mulut, dan lain-lain).

a. Servikal Pap Smear

Servikal pap smear merupakan spesimen sitologik yang termasuk ke dalam saluran reproduksi wanita servikal smear, vagina smear, dan endometrium smear. Servikal pap smear ini merupakan salah satu sediaan yang diperuntukkan skrining dari kanker servik. Hal ini dikarenakan kanker serviks uterus merupakan kanker yang paling banyak diderita pada area tersebut. Hampir semua kanker serviks invasif didahului oleh fase preinvasif, yang dapat terlihat secara mikroskopis melalui peristiwa perubahan sitologik. Perubahan tersebut diawali dengan serviks intraepithelial neoplasia (CIN) kelas I hingga III termasuk karsinoma in-situ. Adapun keuntungan dari pap smear ini adalah :

- Sederhana dan tidak menyakitkan
- Tidak menyebabkan terjadinya pendarahan
- Tidak diperlukan anastesi
- Dapat mendeteksi adanya prakanker hingga kanker
- Dapat mendeteksi inflamasi tidak spesifik hingga spesifik
- Dapat dilakukan tanpa memerlukan rawat inap

Pengalaman orang yang melakukan pengambilan bahan sediaan smear sangatlah penting. Hal ini berhubungan dengan komposisi selular yang memadai untuk dilakukan pemeriksaan. Servik harus tervisualisasikan dengan jelas dari seluruh zona transformasi yang akan dikerok. Hal ini menjadi tanggung jawab pengambil spesimen dan bidang penjamin mutu untuk memantau kualitas spesimen, sehingga dapat meminimalkan / menghindari spesimen yang tidak memadai atau terjadinya artefak fiksasi.

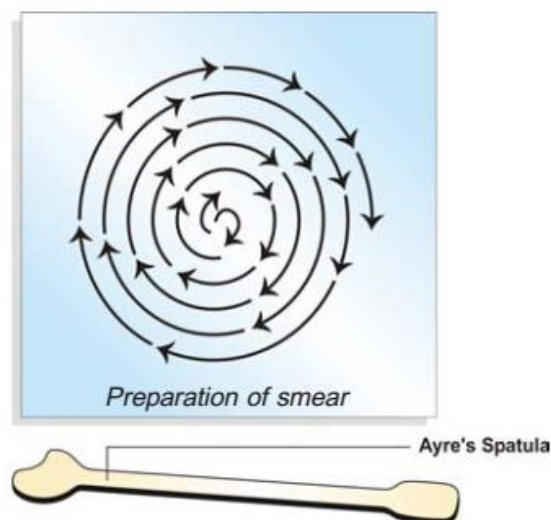
Perangkat yang digunakan dalam pengumpulan spesimen berperan penting dalam kecukupan spesimen sediaan. Bentuk, permukaan, tekstur dan material dari alat dapat menentukan berapa banyak sel yang tergores pada kaca objek dan jumlah sel untuk dilakukan skrining dan kesimpulan diagnosis. Beberapa metode dan alat pengambilan spesimen sediaan untuk memperoleh bahan sitologik servikal yang maksimal terus berkembang. Perkembangan alat pengambilan spesimen dimulai dari kapas hingga sikat servik, namun, penggunaan kapas untuk pengambilan servikal smear sudah mulai ditinggalkan mengingat artefak pengeringan dan hilangnya sel-sel sering terjadi ketika menggunakan metode ini. Adapun teknik pengambilan servikal smear terbagi menjadi dua bagian besar yang umum dilakukan saat ini, yaitu teknik konvensional dan teknik berbasis cairan.

1) Konvensional

Konvensional smear diperoleh dengan menggunakan kombinasi spatula. Spatula yang ada digunakan di laboratorium terbagi menjadi spatula kayu dan spatula

■ Sitohistoteknologi ■

plastik. Meskipun spatula kayu atau plastik dapat diterima namun spatula plastik lebih dianjurkan karena ketika menggunakan spatula kayu dapat menyebabkan artifak berupa serat kayu dalam sediaan. Prosedur pengambilan spesimen sitologik servikal adalah dengan memutar spatula diputar setidaknya 360 derajat (Gambar 8.4.). Setelah dilakukan pengambilan spesimen, spatula yang mengandung komponen sel-sel servikal kemudian dioleskan ke kaca objek dengan putaran yang terbalik dari pengambilan spesimen, walaupun teknik pengambilan spesimen dapat juga berbeda tergantung dari keperluan diagnostik.



Gambar 8.4. Metode Pengambilan Spesimen Sitologik Servikal.
(Sumber : Manual for Cytology, 2005)

Ada dua pilihan fiksasi untuk servikal smear. Yang pertama adalah fiksasi yang mengandung alkohol dan polietilen glikol, dimana campuran itu diberikan ke kaca objek yang telah berisi komponen sel dengan menyemprotkan menggunakan "spray" atau dengan menuang dari wadah yang sudah menjadi bagian dari kit pembuatan sediaan servikal smear secara konvensional. Metode fiksasi yang kedua merupakan metode yang umum yaitu dengan mencelupkannya ke dalam wadah yang berisi etanol 95%. Adapun teknik lengkap fiksasi dibahas di topik 2.

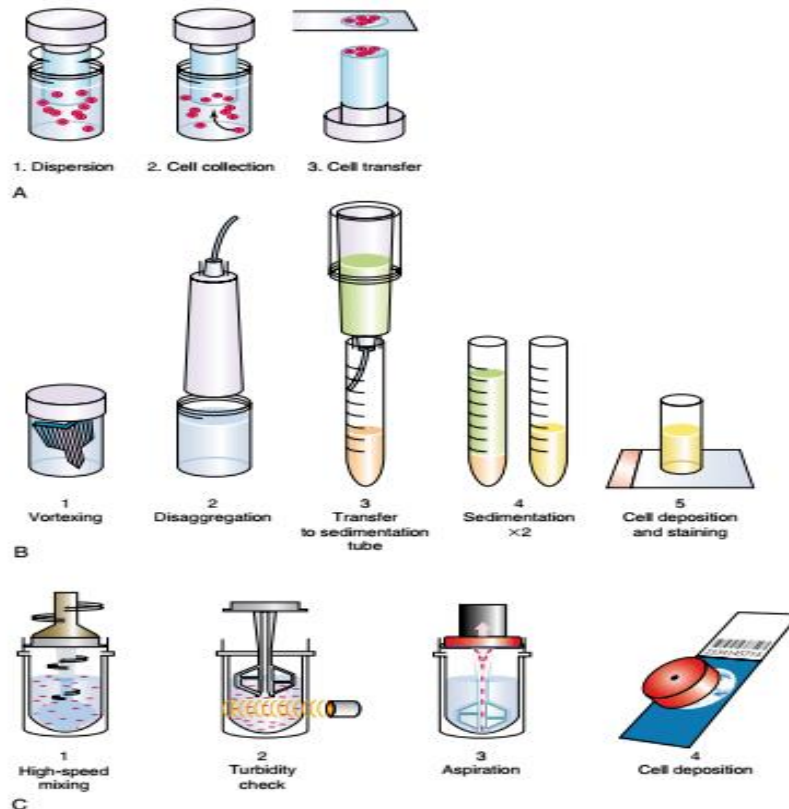
2) Berbasis Cairan

Pengambilan spesimen servikal smear berbasis cairan merupakan suatu pengembangan metode yang ditujukan untuk mengurangi atau menghilangkan kekurangan-kekurangan yang terjadi ketika pembuatan sediaan konvensional dilakukan. Pembuatan sediaan berbasis cairan ini merupakan langkah penting dalam pengembangan perangkat skrining untuk alat otomatis. Sediaan yang dibuat berbasis cairan saat ini diperlukan untuk meminimalkan adanya sel yang saling tumpang tindih sehingga akan lebih mudah untuk melakukan skrining sel

■ Sitohistoteknologi ■

abnormal. Namun diluar dari sisi baiknya pengumpulan spesimen metode berbasis cairan ternyata dengan metode ini menghasilkan nilai yang sedikit berbeda dengan konvensional. Perbedaan terjadi dengan adanya peningkatan deteksi lesi intraepitel skuamosa tingkat rendah (LSIL) atau lesi intraepitel skuamosa tingkat tinggi (HSIL). Meskipun demikian, metode ini menawarkan beberapa keuntungan dari pemeriksaan konvensional yaitu dapat membuat sediaan sitologik secara duplo bahkan membuat blok sel dari sisa spesimen. Selain itu sediaan sitologik yang dihasilkan dapat lebih tipis daripada metode konvensional yang memungkinkan skriner dan dokter patologi tidak mengalami kelelahan dan kesulitan dalam deteksi sediaan.

Metode ini memiliki berbagai prinsip kerja dalam pembuatan sediaan yaitu: ThinPrep, SurePrep dan MonoPrep. Adapun metode ketiga pembuatan sediaan terlihat pada Gambar 8.5.



Gambar 8.5. Pembuatan Sediaan Sitologik Berbasis Cairan

(Sumber : Cytology : Diagnostic Principles & Clinical Correlation, 2009)

Pada Gambar 8.5. diatas merupakan metode persiapan sediaan sitologik berbasis cairan. A, metode ThinPrep: 1. Botol spesimen ditempatkan dengan silinder plastik berongga yang memiliki filter polikarbonat berdiameter 20 mm yang terikat pada permukaan bawahnya.

Silinder diputar selama beberapa detik untuk menghomogenkan sel. 2. Silinder kemudian dibuat vakum sehingga sel tertarik pada filter. 3. Dengan perlakuan vakum yang terus menerus, silinder akan penuh dengan sel dan kemudian filter ditekan ke kaca sediaan. Kemudian fiksasi kaca sediaan dengan fiksasi basah. B, metode SurePath: 1. Spesimen dilakukan agitasi agar semua sel lepas dari sikat servik. 2. Spesimen yang menumpuk dipisahkan dengan teknik penyedotan menggunakan selang bersaluran kecil. 3. Spesimen dituangkan ke dalam tabung sentrifugal yang telah diisi dengan reagen gradien. 4. Sedimentasi dilakukan dalam teknik sentrifugasi. Endapan yang diperoleh disaring dan dilakukan sedimentasi ulang dengan teknik sentrifugasi kembali. 5. Sel yang ada di dalam tabung dibiarkan mengendap dengan bantuan gravitasi ke kaca sediaan yang berlapis polarektrik kationik. Kemudian lakukan teknik fiksasi. C, Metode MonoPrep: 1. Pengaduk terpadu mencampur spesimen secara singkat untuk melarutkan lendir dan agregat. 2. Spesimen disedot ke pengaduk berongga dan teknologi dual-flow dengan menangkap spesimen yang representatif pada filter. 3. Filter ditekan ke kaca sediaan untuk mentransfer sel ke area lingkaran berdiameter 20 mm. 4. Setelah transfer sel selesai lakukan teknik fiksasi basah.

a. Brushing

Sitologi bronkial adalah metode diagnosis awal kanker paru yang sederhana dan telah banyak menarik peneliti untuk melakukan teknik-teknik pemeriksaan. Penggunaan teknik radiologi dan bronkoskop serat optik yang fleksibel memungkinkan pemeriksaan hingga ke cabang bronkial memasuki area parenkim paru. Hal tersebut meningkatkan variasi spesimen diagnostik yang dapat diperoleh dan memperluas cakupan sitologi. Diagnosis karsinoma bronkogenik sering terlihat dari gambaran klinis dan pemeriksaan radiologis, tetapi diagnosis akhir harus ditetapkan dengan pemeriksaan spesimen sediaan sitologi atau histopatologis.

Penggunaan sikat sitologi, bronkoskopi endobronkial digunakan untuk mengumpulkan sel dari saluran untuk memungkinkan diagnosis penyebaran suatu penyakit, kelainan mukosa saluran napas, lesi perifer atau infiltrat paru perifer. Pencucian bronkial juga dapat digunakan untuk mengungkapkan kanker, radang dan infeksi. Spesimen untuk pemeriksaan sitologi bronkial pada umumnya didapatkan dari pencucian area bronkial. Hasil pencucian pada area bronkial dikumpulkan menggunakan bronkoskopi (dengan anestesi atau lokal) di ruang operasi di bawah tindakan aseptik dan antiseptik yang ketat. Dalam mencuci area bronkial, cairan yang digunakan adalah larutan garam isotonik yang steril menggunakan bronkoskop. Serat optik bronchoscope yang fleksibel dimasukkan melalui mulut atau lubang hidung dan perlahan-lahan turun ke trakea dan bronkus. Sikat nilon diperpanjang melampaui ujung bronkoskop untuk melakukan penyikatan pada area yang mengalami lesi.

Sikat sel dilakukan dengan gerakan bolak-balik sepanjang mukosa, dengan atau tanpa rotasi, untuk mengumpulkan lendir saluran pernapasan yang mungkin berisi campuran organisme dan sel-sel epitel. Ketika proses menyikat selesai, sikat ditarik ke dalam sarungnya dan ditarik keluar dari saluran masuknya ke tubuh pasien. Setelah sel-sel secara aman dilepaskan, sel-sel yang diperoleh kemudian dianalisis secara mikroskopis dan prosedur ini dapat diulang beberapa kali.



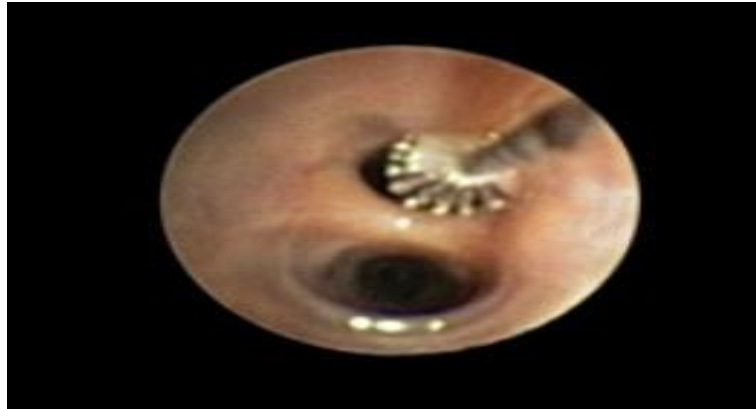
Gambar 8.6. Alat Bronkoscope yang fleksibel dalam pengambilan spesimen sitologi metode pencucian

(Sumber :<https://www.olympus-europa.com>)



Gambar 8.7. Area cabang bronkial yang dilakukan penyikatan untuk mengambil kerokan lesi atau lapisan teratas dari epitel.

(Sumber :<https://www.olympus-europa.com>)



Gambar 8.7. Teknik penyikatan area saluran pernafasan atau pencernaan.

Sumber : <https://www.olympus-europa.com>

4. Sitologi Aspirasi Jarum

Sitologi Needle Aspiration (NA) atau disebut dengan biopsi jarum adalah teknik yang mudah digunakan, membutuhkan peralatan minimal dan bisa menghasilkan sejumlah besar informasi. Biopsi jarum dapat dilakukan pada massapadat atau cair yang terlihat, teraba, atau dapat dicitrakan dengan CT scan atau USG. Ada beberapa teknik untuk mendapatkan spesimenbiopsi jarum yaitu biopsi jarum halus atau yang biasa disebut dengan Biopsi Aspirasi Jarum Halus (BAJAH) / *Fine Needle Aspiration Biopsy* (FNAB) dan jarum besar atau yang biasa disebut dengan biopsi inti atau *Core Biopsy*.

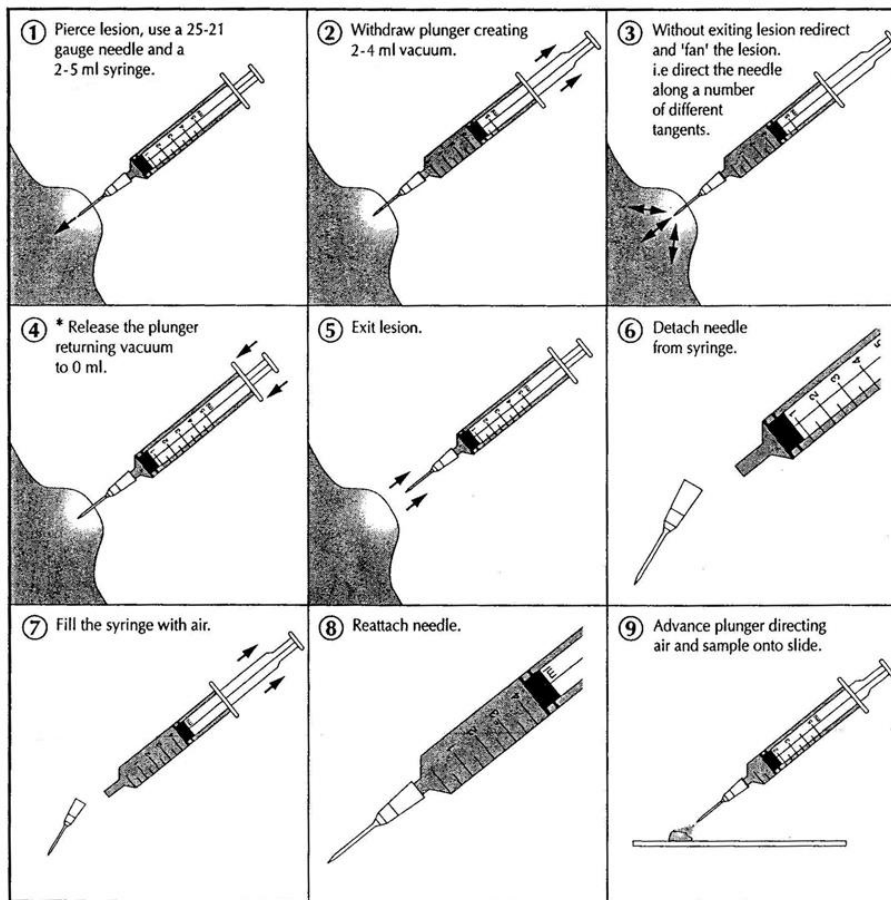
Biopsy aspirasi jarum halus (BJAH) merupakan suatu metode untuk mendiagnosis sel dari suatu jaringan dengna cara mengambil sebagian kecil sel dalam benjolan yang dianggap mencurigakan. Metode biopsi aspirasi jarum halus memiliki waktu yang lebih cepat dan kurang invasif jika dibandingkan dengan biopsi inti. Penggunaan biopsi jarum halus aspirasi tidak banyak memerlukan anestesi lokal jika seperti ketika dilakukan biopsi inti. Ketika suatu massa tidak terlihat atau teraba, maka gabungan teknik USG atau CT Scan diberikan untuk menentukan posisi dari massa tersebut. Semua tumor umumnya dapat dilakukan biopsi aspirasi jarum, baik yang letaknya superfisial (*palpable*) maupun yang terletak di dalam tubuh (*unpalpable*). Perlakuan dengan aspirasi jarum dilakukan dengan indikasi sebagai berikut :

- Preoperatif biopsi aspirasi jarum pada suatu massa yang dianggap sebagai tumor jinak *operable*. Hasil dari gambaran sediaan dilakukan untuk melakukan diagnosis suatu penyakit dan untuk menentukan tindakan bedah selanjutnya.
- Tumor jinak *inoperable*. Tindakan biopsi aspirasi dilakukan untuk konfirmasi suatu diagnosis.
- Konfirmasi diagnosis suatu tumor "rekuren" dan pola metastasis.
- Membedakan antara kista, tumor yang bersifat padat atau inflamasi.
- Pengambilan sebagian kecil sel dari suatu massa untuk dilakukan kultur baik maupun penelitian

■ Sitohistoteknologi ■

Penggunaan biopsi aspirasi jarum dalam mendiagnosis suatu massa yang diduga tumor mempunyai manfaat baik dari sisi manajemen tumor hingga pelayanan pasien. Namun ada beberapa kekurangan yang ada pada metode pemeriksaan menggunakan sediaan sitologik biopsi aspirasi jarum. Salah satunya adalah luasnya invasi tumor tidak dapat diketahui dengan pasti, jenis kanker dan subtipe yang sulit atau bahkan tidak dapat diidentifikasi, dan kemungkinan besar adanya hasil negatif palsu. Diagnosis sitologik dengan menggunakan biopsi aspirasi mempunyai beberapa hasil pemeriksaan yaitu :

1. Hasil positif pemeriksaan sitologik tumor/kanker. Nilai positif dilakukan sebagai petunjuk dalam melakukan tindakan lanjut seperti metastasis, penentuan stadium tumor, pemilihan instrumen diagnostik dan penentuan pola pengobatan.
2. Hasil negatif pemeriksaan sitologi negatif atau perubahan sel abnormal belum menunjukkan kategori kanker. Hasil dari pemeriksaan ini dapat juga dikarenakan hasil negatif palsu. Hasil negatif palsu kemungkinan terjadi karena kesalahan secara teknis baik dalam pengumpulan spesimen hingga teknik pembuatan sediaan. Negatif palsu yang ternilai disebabkan tidak terlihatnya sel tumor/kanker pada sediaan mikroskopis. Ketika hasil negatif palsu terjadi dan hasil tersebut berbeda dengan gejala maupun data hasil pemeriksaan klinik, maka perlu dilakukan pemeriksaan biopsi bedah. Namun jika sediaan menunjukkan hasil negatif dan sesuai dengan hasil klinik, maka tindakan selanjutnya dapat ditentukan untuk pengobatan pasien.
3. Hasil sitologik mencurigakan / *suspect*. Jika hasil menunjukkan nilai yang mencurigakan atau adanya dugaan *suspect*, hal ini akan memerlukan pemeriksaan lain seperti sitologi imprint atau tindakan lainnya sebelum dilakukan tindakan pengobatan kepada pasien.
4. Hasil tidak dapat diinterpretasikan. Jika hasil sediaan menunjukkan hasil yang tidak dapat diinterpretasikan, hal ini disebabkan karena kesalahan teknik pengumpulan atau pembuatan sediaan sitologik biopsi jarum. Selain itu dapat juga dikarenakan bentuk atau sifat dari massa tersebut seperti banyaknya darah yang muncul, reaksi parut pada massa atau massa terlalu kecil, sehingga sulit memperoleh spesimen.



Gambar 8.9. Metode biopsi jarum halus (BJAH)
 (sumber : <http://www.cytopath.co.uk>)

Seorang tenaga laboratorium yang bertugas dalam pembuatan sediaan sitologik wajib mengetahui dasar dari sumber spesimen seperti yang telah disebutkan di atas. Hal ini menunjukkan bagaimana sediaan tersebut layak untuk dibaca atau kemungkinan adanya artifak dalam pembuatan sediaan. Setelah mempelajari materi di atas, mari kita mencoba untuk melakukan latihan dalam pengolahan spesimen sitologik.

Ambilah wadah penampung urin sebanyak 2 buah. Untuk wadah urin tandai pada luar wadah dengan penanda permanen hingga menunjukkan ukuran volume sekitar 80 ml. Ambillah urin dipagi hari dimana urin yang pertama keluar (first voided) langsung ditampung pada wadah pertama hingga batas yang ditandai, sedangkan urin selanjutnya (mid stream) ditampung di wadah kedua hingga batas yang ditandai pula. Pastikan wadah ditandai mana yang urin pertama dan mana yang urin kedua. Kemudian Anda dapat menggunakan tabel dibawah ini.

Tabel. Latihan Pengolahan Spesimen Sitologik

No	Parameter	Wadah 1 (First Voided)	Wadah 2 (Mid Stream)
1	Kekeruhan		
2	Warna		
3	Endapan		

Petunjuk Menjawab Tabel Latihan

Untuk mengerjakan latihan tersebut, gunakan pengamatan Anda dalam pengolahan spesimen. Untuk mengisi tabel di kanan parameter ada beberapa pilihan yang Anda bisa masukkan. Untuk kekeruhan Anda bisa tuliskan (-) atau(+) atau (++) atau (+++). Hasil (-) ketika urin yang tertampung tidak menunjukkan adanya kekeruhan. Nilai (+) diberikan jika ada sedikit kekeruhan dan nilai (+) akan bertambah jumlahnya ketika kekeruhan semakin terlihat. Untuk parameter warna Anda dapat tuliskan berupa :**“bening tanpa warna”** atau **“kuning terang”** atau **“kuning pekat”** atau warna lain seperti **“merah muda”** hingga **“merah bening”**. Sedangkan untuk parameter endapan, silahkan Anda diamkan urin yang ditampung selama 30 menit dan tidak boleh ada gangguan berupa goyangan atau getaran. Setelah 30 menit silahkan ada lihat kembali dan Anda bisa menjawab dengan **“Ada”** atau **“Tidak”** dengan melihat dasar dari wadah urin.

Ringkasan

Sediaan sitologik merupakan sediaan yang berisi sel-sel yang dapat menunjukkan morfologi normal atau morfologi patologis baik oleh mekanisme tumor hingga kanker bahkan oleh mikroorganisme atau jejas tertentu. Hasil yang baik yang dapat dijadikan diagnosis suatu penyakit tentu sangatlah diharapkan. Hasil sediaan sitologik yang baik salah satunya ditentukan ketika proses pengolahan atau pengambilan spesimen diperhatikan dengan seksama. Pengolahan yang baik dapat dilakukan dengan pemberian larutan fiksasi yang cocok dengan sumber spesimen hingga teknik pengolahannya.

Topik 2

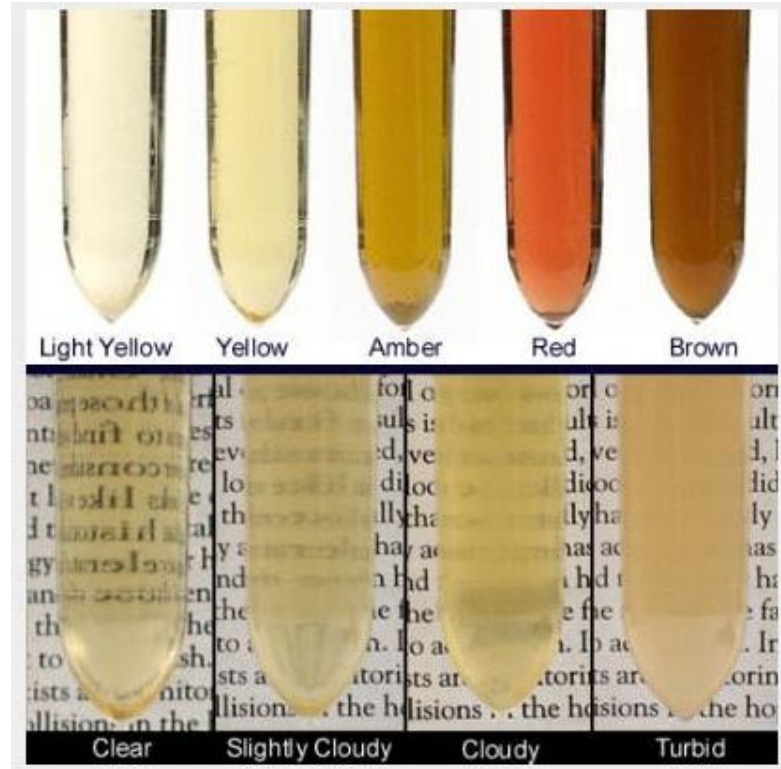
Pembuatan Sediaan Sitologik

Sediaan sitologik merupakan suatu sediaan berbentuk kaca objek yang digunakan untuk melakukan pengamatan secara mikroskopis. Sediaan sitologik dapat diambil dari spesimen serviks, urin, dahak, biopsi aspirasi jarum halus, sikat bronkial dan lain sebagainya seperti yang telah Anda baca dan pahami di materi topik 1. Ketepatan dalam suatu diagnosis melalui sediaan sitologik dilihat sejauh mana sediaan itu dibuat dengan baik. Ketika sediaan sitologik itu tidak baik pembuatannya maka sediaan sitologik itu dapat memberikan hasil negatif palsu bahkan negatif palsu. Dalam pembuatan sediaan sitologik yang baik harus melalui tahapan berupa persiapan spesimen (topik 1), metode pembuatan sediaan, fiksasi sediaan sitologik (bab 4) dan diakhiri dengan teknik pewarnaan (bab 9).

Dalam pembuatan sediaan sitologik yang baik, ada beberapa hal yang harus diperhatikan, antara lain : 1. Jumlah sel yang ada dalam spesimen dan viskositas spesimen, 2. Teknik membuat sediaan sitologik.

A. PREDIKSI JUMLAH SEL DAN VISKOSITAS SPESIMEN

Dalam teknik pembuatan sediaan sitologik, salah satu yang menjadi pertimbangan adalah prediksi jumlah sel di dalam spesimen. Ketika jumlah sel diprediksi banyak maka jumlah atau metode yang akan dipakai selanjutnya menjadi suatu pertimbangan. Spesimen yang memiliki jumlah sel lebih banyak dari normal pada umumnya terlihat dari gejala atau prediksi diagnosis dari pasien. Seperti contoh pasien yang memiliki diagnosis awal kanker kandung kemih akan memiliki prediksi sel lebih banyak di dalam urin jika dibandingkan dengan urin pasien normal. Jumlah sel dari spesimen dapat juga dilihat dari konsisi awal spesimen sebelum dilakukan perlakuan mekanik. Spesimen berbentuk cairan yang memiliki tingkat kekeruhan dapat diprediksi memiliki sel yang lebih banyak jika dibandingkan dengan spesimen yang memiliki warna jernih dengan tingkat kekeruhan yang rendah bahkan tidak menunjukkan adanya kekeruhan.



Gambar 8.10. Tingkat kekeruhan spesimen urin
 Sumber : <http://www.belmarrahealth.com>

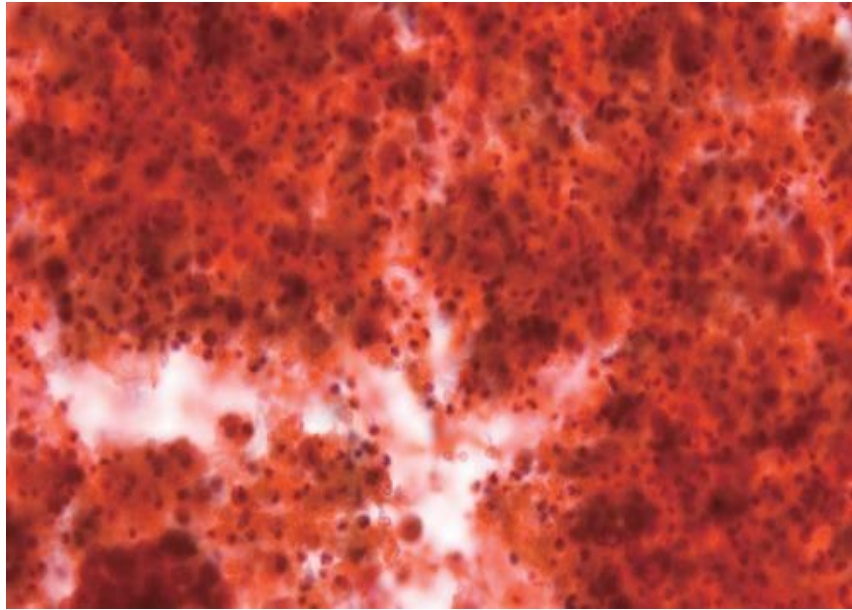
Pada gambar 8.9. menunjukkan tingkat kekeruhan spesimen urin. Makin tinggi tingkat kekeruhan urin maka makin besar kemungkinan sel epitel akan ditemukan, walaupun ada beberapa faktor lainnya yang dapat membuat kekeruhan dari urin itu meningkat. Faktor-faktor yang dapat membuat urin keruh selain dari banyaknya epitel dalam urin antara lain tingginya protein, adanya mikroorganisme, pasien sedang masa menstruasi hingga riwayat atau terapi pengobatan yang sedang dilakukan oleh pasien. Untuk melihat kemungkinan banyaknya sel epitel di dalam urin dan sedikitnya faktor pengganggu dapat dilakukan pemeriksaan urin rutin menggunakan dip stik terlebih dahulu. Ketika telah dilakukan konfirmasi dengan tes urin rutin maka Anda dapat melakukan perkiraan volume spesimen yang akan dilakukan tindakan selanjutnya (sentrifugasi) yang akan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Makin besar nilai epitel yang ditunjukkan dengan tes urin rutin maka makin sedikit volume yang dimasukkan ke dalam tabung dan begitu juga sebaliknya. Namun ketika kekeruhan terjadi karena faktor lainnya selain sel epitel (protein, terapi pengobatan dan faktor lainnya), Anda masih diperkenankan untuk masukkan volume standar dalam tabung sentrifugasi, bahkan Anda dapat melakukan perlakuan khusus dengan teknik pencucian.



Gambar 8.11. Spesimen urin yang mengandung banyak darah (kanan) dan urin dengan kondisi sedikit keruh (kiri)

Sumber : <https://prostatecancernewstoday.com>

Pada gambar 8.10 diatas, tabung kanan menunjukkan spesimen memiliki banyak darah. Munculnya darah merah dalam spesimen urin dalam disebabkan ketika pasien memiliki diagnosis kanker prostat atau kemungkinan memiliki penyakit kerusakan ginjal bahkan ketika pasien telah melakukan terapi radiasi. Spesimen yang memiliki jumlah darah merah yang berlebih dapat menyebabkan artifak dalam sediaan sitologik. Ketika spesimen memiliki kondisi dengan sel darah yang besar, maka spesimen itu dapat diberikan perlakuan terlebih dahulu untuk menghancurkan sel darah merah. Adapun ketika seorang teknisi laboratorium melakukan kesalahan daam sediaan sitologik pada urin yang mengandung banyak darah akan tertampil seperti berikut :



Gambar 8.12. Sediaan sitologik urin yang mengandung banyak darah

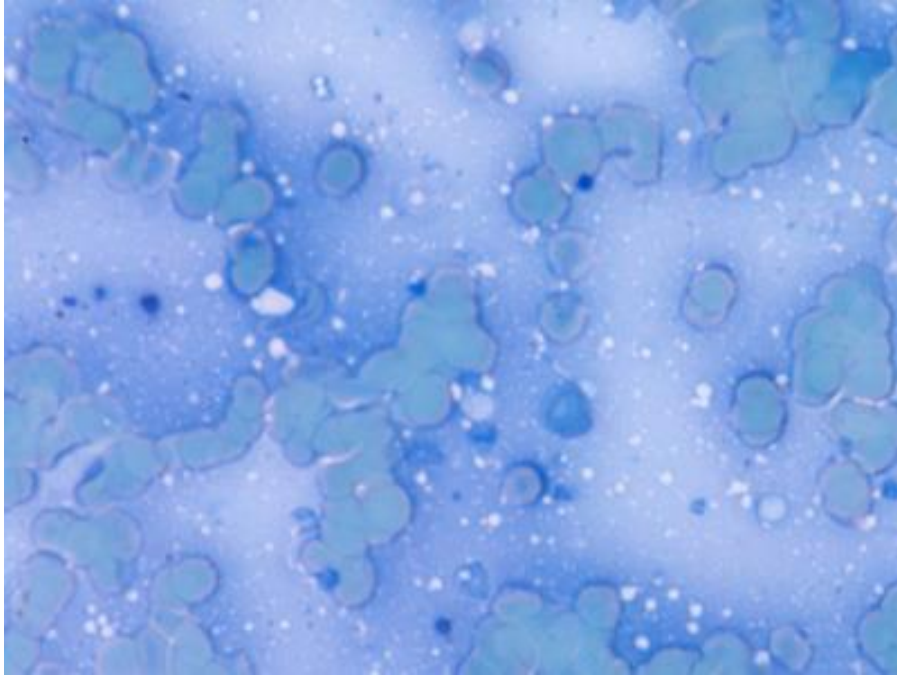
(Sumber : Evaluation of Urine Cytology in Urothelial Carcinoma Patients)

Selain dari cairan yang memiliki tingkat viskositas rendah (urin, csf dan lanin sebagainya) ada spesimen yang memiliki tingkat viskositas yang tinggi yaitu sputum. Sputum dapat mengandung sel yang banyak hingga sedikit, namun seperti yang telah diuraikan di atas, spesimen dapat tepat dikatakan sputum ketika sel bronkial ditemukan dalam sediaan sitologik. Pemilihan bagian kecil dari spesimen hingga jumlah sediaan yang akan dibuat ditentukan pula oleh banyak atau sedikitnya sel yang diprediksi mengandung banyak sel epitel.

B. TEKNIK PEMBUATAN SEDIAAN SITOLOGIK

Spesimen yang telah diidentifikasi sumber, tingkat kekeruhan dan gejala awal serta diagnosis awal pasien kemudian dilakukan pembuatan sediaan sitologik. Adapun hal-hal yang harus diperhatikan sebelum teknik dilakukan.

1. Label semua spesimen dengan identifikasi pasien, tanggal, dan sumber spesimen. Gunakan pensil tebal untuk label slide dan jangan gunakan stiker label.
2. Beri jarak kurang lebih 2 cm dari atas dan bawah kaca objek untuk melakukan pembuatan sediaan. Hal ini dikarekan ada beberapa mikroskop yang tidak mampu membaca hingga ke ujung kaca objek.
3. Jangan gunakan formalin untuk melakukan fiksasi sitologik, kecuali ketika akan dilakukan pembuatan sitoblok.



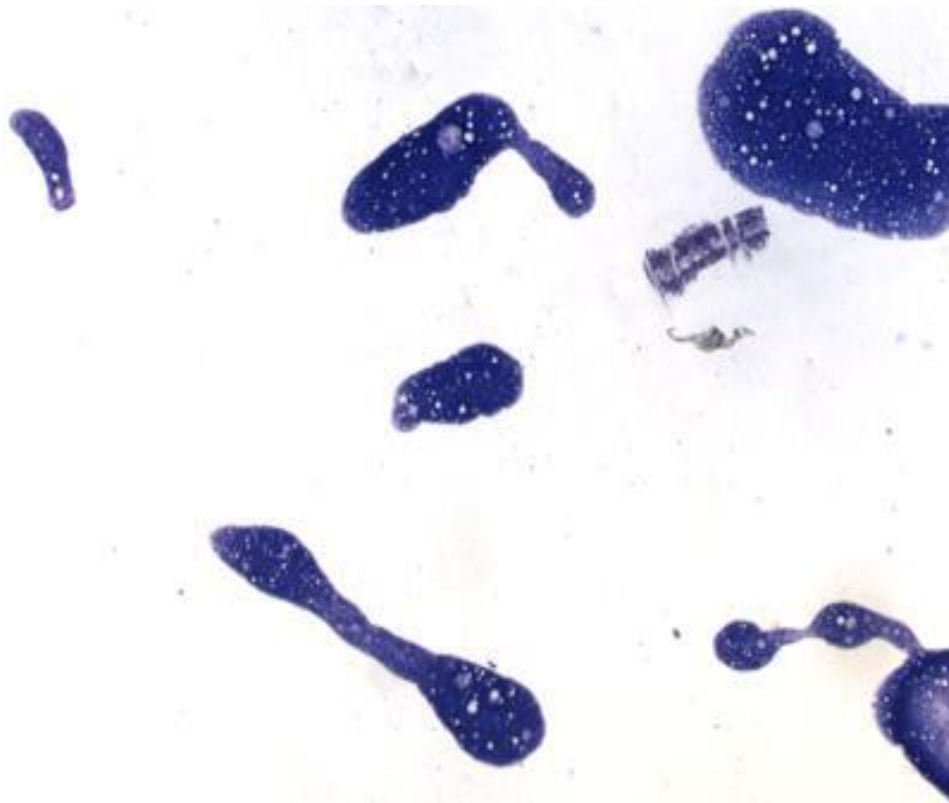
Gambar 8.13. Sediaan sitologik yang terpapar formalin pada saat persiapan spesimen.

(Sumber : <https://ahdc.vet.cornell.edu>)

4. Kirim secepat mungkin spesimen yang didapatkan dari pasien. Perubahan dapat terjadi dengan cepat pada spesimen sitologik seperti perubahan pada mikroorganisme (30 menit) dan fagositosis eritrosit (beberapa jam setelah spesimen didapat). Namun ketika spesimen sulit untuk diproses (jarak laboratorium jauh atau jumlah sediaan yang akan diproses terlalu banyak), maka spesimen dapat disimpan ke dalam lemari pendingin, hindari kontak langsung dengan es dan jangan dibekukan.

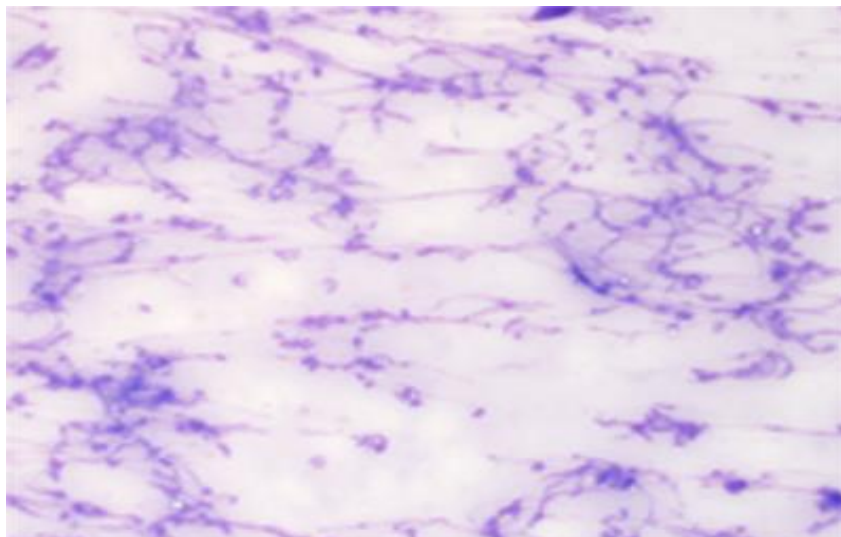
Untuk memperoleh kualitas sediaan sitologik yang baik yang berasal dari cairan, ada beberapa tips yang dapat digunakan sebelum dilakukan pembuatan sediaan sitologik, antara lain :

1. Pastikan kaca objek benar-benar bersih
2. Hindari teknik penyemprotan tanpa dilakukan penyebaran. Hal ini dapat menyebabkan sel menumpuk bahkan sulit untuk dilakukan interpretasi.



Gambar 8.14. Teknik penyemprotan tanpa penyebaran. Sediaan menunjukkan kumpulan sel yang padat dalam cairan
(sumber :<https://ahdc.vet.cornell.edu>)

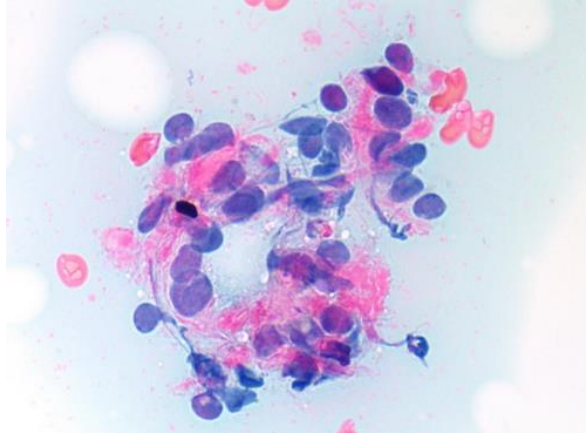
3. Gunakan tekanan dengan lembut.



Gambar 8.15. Sediaan sitologik yang dibuat dengan tekanan yang berlebihan. Pada beberapa spesimen seperti cairan kelenjar limfa memiliki sel yang mudah untuk rusak.

(sumber : <https://ahdc.vet.cornell.edu>)

4. Lakukan fiksasi secepat mungkin (fiksasi basah ataupun kering). Untuk melakukan fiksasi kering disarankan menggunakan penyemprot udara dengan suhu sesuai dengan lingkungan.



Gambar 8.16. Artifak yang disebabkan karena fiksasi kering yang terlalu lama. Sediaan sitologik menunjukkan detail inti yang tidak jelas dan sitoplasma yang kurang terwarnai

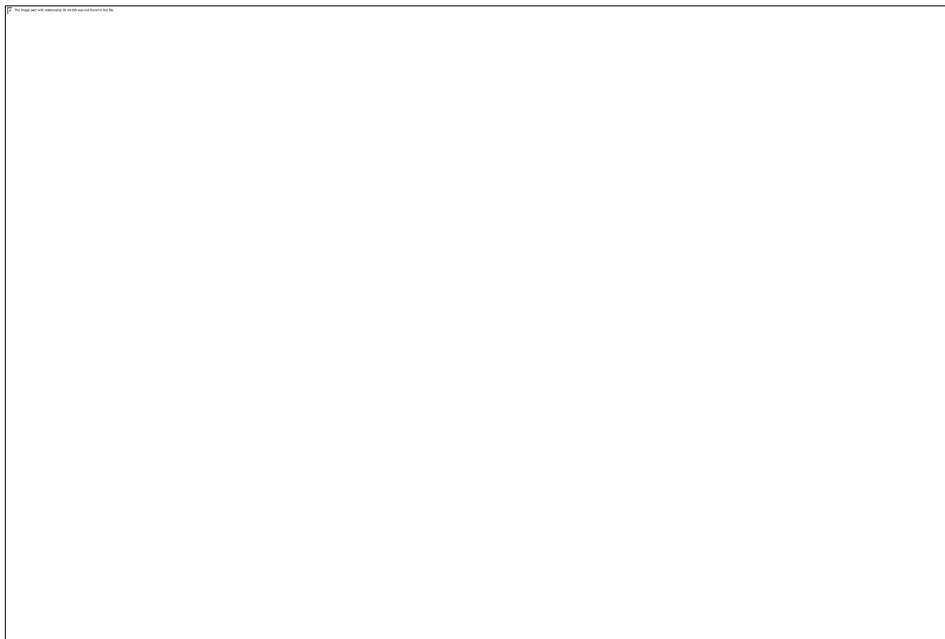
(Sumber : <http://www.pathologyoutlines.com>)

Teknik-teknik dasar pembuatan sediaan sitologik pada umumnya terbagi menjadi beberapa bagian, yaitu teknik manual dan otomatis (sitospin). Teknik manual dalam pembuatan sediaan sitologik adalah teknik yang dilakukan dengan menggunakan tenaga manusia dalam menempelkan dan menyebarkan sel di atas kaca objek, sedangkan teknik otomatis adalah teknik yang menggunakan instrumen khusus untuk menempelkan dan menyebarkan sel ke atas objek gelas. Adapun teknik manual dari pembuatan sediaan sitologik adalah sebagai berikut:

a. Metode Smear / Oles

Metode oles atau yang sering disebut dengan metode *smear* merupakan suatu metode pembuatan sediaan sitologi dengan jalan mengoles atau membuat lapisan tipis dari spesimen berbentuk cairan di atas objek gelas. Spesimen yang masuk ke dalam kategori untuk dilakukan pembuatan sediaan oles antara lain urin, *cerebro spinal fluid* (CSF) dan spesimen lainnya yang memiliki viskositas rendah. Namun kadangkala spesimen sputum yang masuk ke dalam laboratorium kadang kala sudah dicampur dengan alkohol 50% atau dengan larutan fiksasi *Sarkomanno*. Untuk spesimen yang telah dicampur dengan alkohol 50% dapat diperlakukan seperti spesimen urin namun dapat juga dikombinasikan dengan teknik *Sarkomanno*. Spesimen sputum yang telah difiksasi dengan fiksasi *Sarkomanno* akan menghasilkan total volume 50 ml. Namun jika spesimen sputum diterima dalam campuran dengan alkohol 50%, dapat juga ditambahkan dengan larutan stok *Saccomanno* yang cukup untuk mencapai konsentrasi akhir sekitar 2% Carbowa (misalnya, untuk 45 sampai 50 ml spesimen, tambahkan 4 ml larutan stok *Saccomanno* dan aduk rata). Spesimen yang telah dicampur dengan larutan *Sarkomanno* harus tetap dalam larutan fiksasi ini kira-kira setengah jam sebelum diproses.

Tahap selanjutnya adalah dengan menuangkan spesimen ke dalam wadah semi-mikro dan dilakukan pencampuran menggunakan alat “blender” antara sputum dengan larutan *Sarkomanno* pada kecepatan tinggi selama 5 sampai 10 detik (wadah harus tetap tertutup selama pencampuran). Setelah tercampurkan tuang campuran spesimen ke dalam tabung reaksi 50 ml. Jika masih terlihat butiran kasar atau benang halus maka larutan dapat di tambahkan waktu pencampuran dengan “blender” selama 5 sampai 10 detik. Larutan kemudian di sentrifugasi selama 10 menit di kecepatan 1800-2500 rpm. Setelah didapatkan endapan maka teknik yang digunakan untuk pembuatan sediaan sitologik menggunakan teknik oles / *smear*.



Gambar 8.17. Teknik Pembuatan Sediaan Sputum menggunakan metode Sarcomanno

Sumber : <https://ahdc.vet.cornell.edu>

Adapun langkah-langkah yang dilakukan untuk membuat sediaan sitologik dengan teknik oles adalah sebagai berikut :

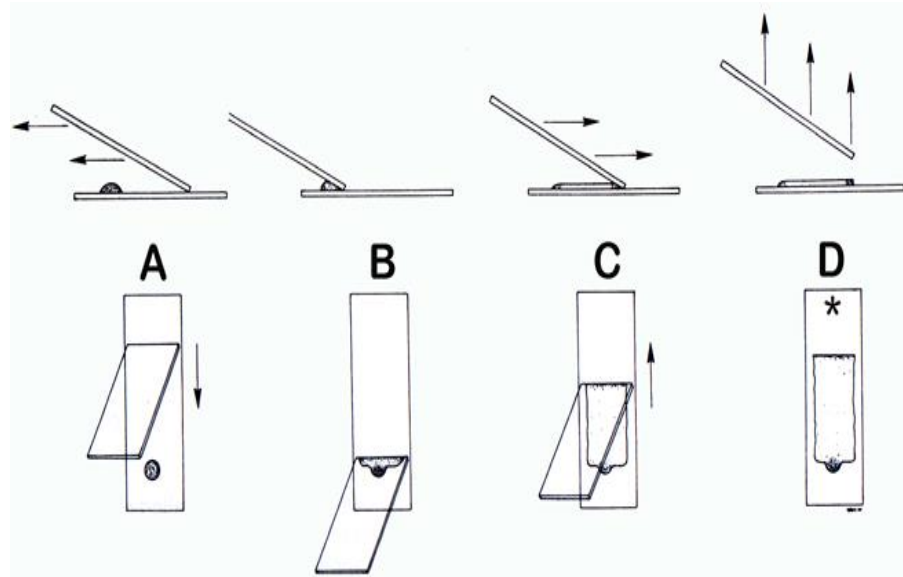
1. Perhatikan tampilan dari spesimen cair dan deskripsikan dalam formulir permintaan.
2. Tuangkan spesimen ke dalam 15-50 ml (tergantung dari perkiraan jumlah sel berdasarkan kekeruhan). Tabung sentrifus diputar selama sepuluh (10) menit dengan kecepatan berkisar 1.800-2.500 rpm.
3. Saat melakukan sentrifugasi, siapkan dua slide yang telah diberi label.
4. Tuang cairan supernatan (posisi yang di atas) kembali ke wadah spesimen asal. Ketika spesimen memiliki endapan yang tebal sisakan supernatan kurang lebih 1/3 bagian dari sedimen atau ketika sedimen sangat tipis

🔍 ■ Sitohistoteknologi 🔍 ■

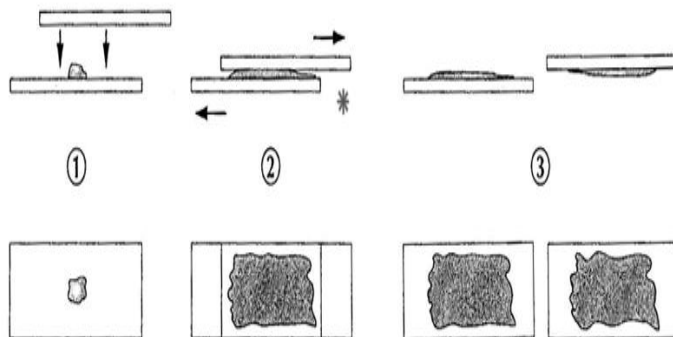
bahkan hampir tidak terlihat maka supernatan diusahakan terbuang hingga tidak ada tetesan kurang lebih 2-3 detik

5. Homogenkan kembali hasil no 4 dengan mengetukkan tabung atau dapat menggunakan vortex hingga terlihat lagi larutan yang bercampur.
6. Ambil larutan padatabung no 5 dan teteskan satu atau dua tetes pada sisi objek gelas (kurang lebih 2 cm dari tepi luar)
7. Pada poin 7 dapat dipilih salah satu (a atau b)
 - a. Lakukan metode "pull-apart" (tarik dan dorong), hingga sedimen menyebar merata pada permukaan (Gambar 8.15).
 - b. Tekan tetesan spesimen dengan kaca objek dan putar kedua objek hingga menjadi sejajar dan tarik perlahan dengan arah yang berlawanan atau yang disebut dengan "sliding smear" (Gambar 8.16).
8. Simpan sisa sedimen di tabung sentrifugal hingga diagnosisnya dilaporkan.
9. Lanjutkan dengan tahap fiksasi (kering atau basah) tergantung dari formulir permintaan.

Untuk lebih jelas Anda dapat melihat Gambar 8.15 berikut.



Gambar 8.18. Teknik pembuatan sediaan sitologik metode oles atau smear).
 Sumber : <https://ahdc.vet.cornell.edu>



Gambar 8.19. Metode Sliding Smear
 Sumber : <http://www.cytopath.co.uk/cytologysmears.html>

b. Metode Tekan (Squash)

Metode tekan merupakan metode yang hampir sama dengan metode oles, namun pada teknik ini terdapat perlakuan menekan pada spesimen. Penekanan dilakukan dengan lembut agar tidak terjadi kerusakan pada komponen sel. Teknik ini dilakukan untuk spesimen yang memiliki viskositas tinggi seperti sputum. Teknik tekan pada pembuatan sediaan sitologik kadang kala disebut dengan teknik “Pick and Smear”.

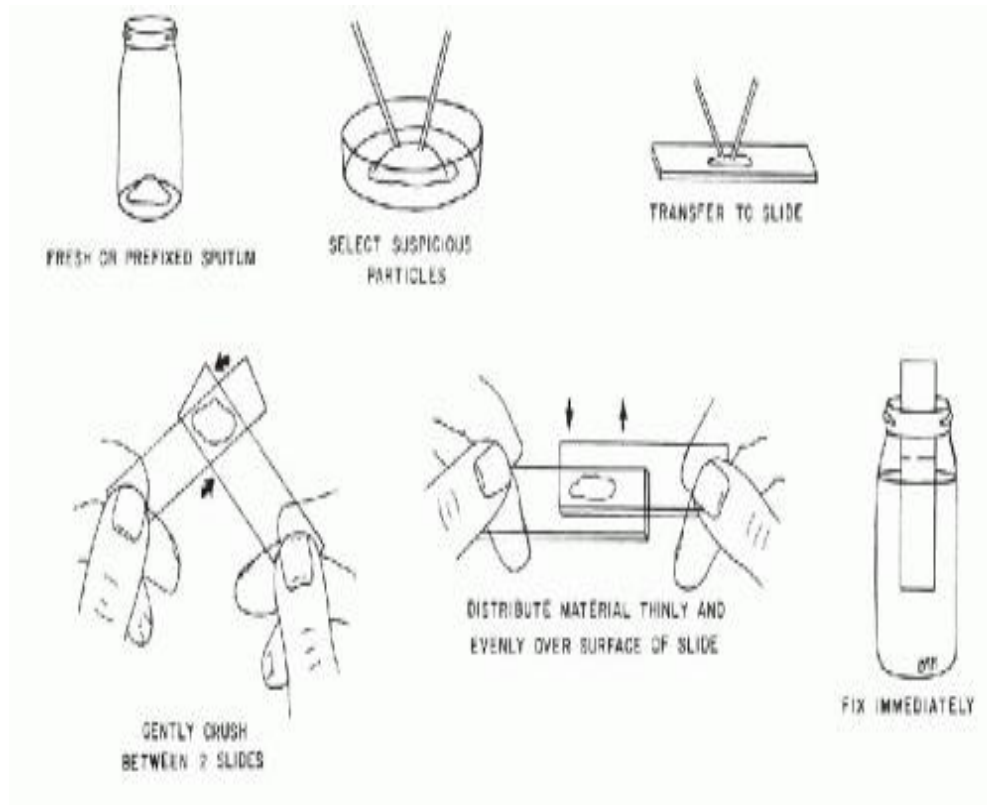
Pada pembuatan sediaan sitologik sputum, pemilihan bagian kecil dari sputum sangatlah penting dalam pengolahan spesimen dengan baik. Sputum yang akan diambil harus diperiksa dengan seksama. Pemilihan bagian sputum yang akan dibuat sediaan dapat dilakukan dengan menuang spesimen ke dalam cawan petri dan menyimpannya di daerah yang berlatar belakang hitam. Selain itu hasil yang maksimal akandidapatkan ketika spesimen sputum dituangkan ke wadah yang beralaskan kertas saring atau kertas penyerap. Kertas saring berfungsi untuk menyerap sebagian besar cairan dari spesimen dan tidak mengandung sel. Dalam membuat sediaan sitologik sputum, sputum seringkali sulit diambil untuk dipindahkan ke atas objek gelas dalam jumlah kecil karena konsentrasinya yang kental dan padat. Penggunaan dua instrumen kuret dengan design khusus (seperti kuret telinga) (lihat Gambar 8.16), atau tongkat aplikator kadangkala diperlukan, walaupun penggunaan pinset kadangkala ditemukan di laboratorium.



Gambar 8.20. Kuret sputum dan tongkat aplikator
(Sumber:<https://basicmedicalkey.com>)

Ketika sputum akan dipindahkan, pilih bagian yang berdarah, berubah warna, atau padat, dan letakkan sebagian kecil spesimen sputum yang terpilih ke kaca objek. Tekan dengan kaca objek lainnya yang bersih. Putar kaca objek hingga kedua kaca objek menjadi sejajar dan tarik ke arah atas. Pastikan ada jarak 2 cm di sisi untuk label dan 1 cm dari bawah. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 8.17. Sedangkan untuk cairan seperti nanah dan cairan lainnya yang memiliki viskositas yang tinggi namun konsentrasi tidak sepadat sputum, maka pengambilan sebagian kecil dari spesimen dapat menggunakan pipet tetes.

■ Sitohistoteknologi ■



Gambar 8.21. Teknik pembuatan sediaan sputum.
(Sumber :<https://basicmedicalkey.com>)

C. TEKNIK SITOSPIN

Teknik sitospin merupakan teknik pembuatan sediaan sitologik yang menggunakan instrumen khusus untuk mengkonsentrasikan sejumlah kecil sel pada suatu area tertentu. Teknik ini menggunakan gaya sentrifugal untuk memutar suspensi sel dan mengkonsentrasikan ke kaca objek dengan tambahan kertas saring. Ketika spesimen didapatkan, catat gambaran spesimen (warna, konsistensi) dan jumlah volume ke dalam formulir permintaan. Adapun setelah spesimen dicatat maka dilanjutkan dengan prosedur pembuatan sediaan teknik sitospin. Adapun prosedur pembuatan sediaan adalah sebagai berikut :

1. Matikan Cytospin, buka tutupnya, dan angkat bagian kepala keluar dari instrumen sebelum memasukkan spesimen.
2. Kepala dari sitospin kemudian dibuka dengan menarik tombol tengah atau ditekan terlebih dahulu. Klip geser kemudian dilepaskan dari rakitan kepala.
3. Posisikan kaca objek ke tempat tabung sitospin yang sebelumnya dibatasi dengan kertas saring. Pastikan lubang tabung sitospin tidak tertutup oleh kertas saring dan penjepit kaca objek dengan tabung sitospin menjepit dengan kuat.
4. Masukkan tabung sitospin ke wadahnya dan putar dengan kecepatan 1800 – 2500 rpm selama 10 menit.

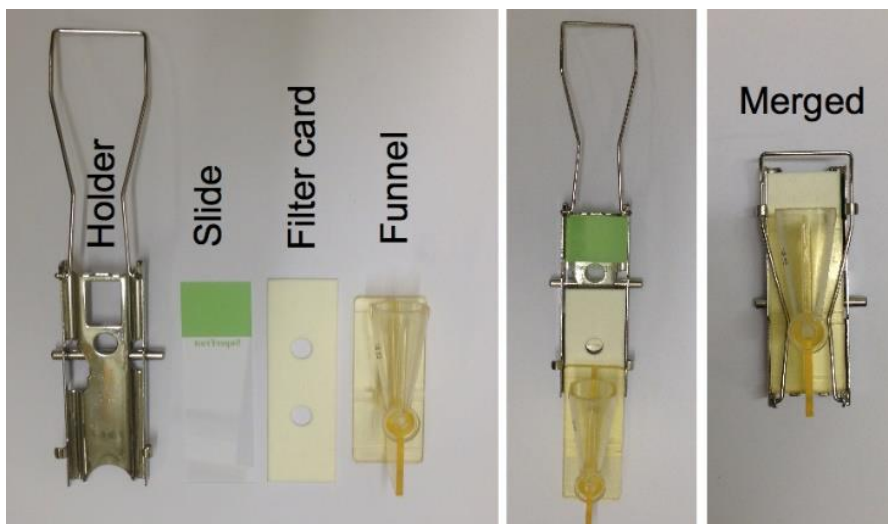
■ Sitohistoteknologi ■

5. Setelah berhenti, buka tutup sitospin dan lakukan teknik fiksasi tergantung dari jenis pewarnaan.

Hal-hal yang harus diingat dalam penggunaan sitospin adalah :

1. Pastikan wadah tabung sitospin terisi secara bersebarangan dengan volume yang kurang lebih seimbang
2. Tabung penyeimbang dapat menggunakan air keran atau aquades
3. Spesimen yang dianggap memiliki kekeruhan tinggi dapat diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis
4. Jangan membuka penutup sebelum alat pemusing sitospin benar-benar berhenti.

Adapun komponen dari sitospin adalah sebagai berikut :



Gambar 8.22. Komponen tabung sitospin yang terdiri dari penjepit (holder), kaca objek, kertas saring dan tabung sitospin. Tahapan pemasangan dari sitospin mulai dari kiri ke kanan. Spesimen dimasukkan ke dalam tabung setelah semua lengkap terpasang.

Sumber : <http://www.bio-protocol.org>

■ Sitohistoteknologi ■



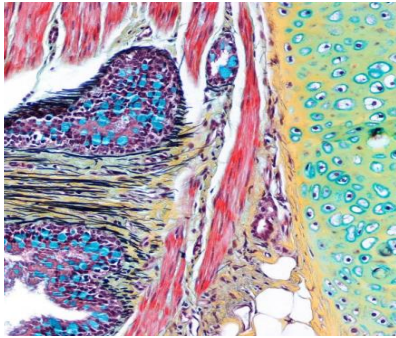
Gambar 8.23. Alat sitospin.

Sumber : <https://www.thermofisher.com>

BAB IX PEWARNAAN

Erick Khristian, M.Si.

PENDAHULUAN



Sumber :

<https://sharedresources.fredhutch.org>

Pewarnaan jaringan sangat diperlukan untuk mewarnai komponen-komponen jaringan yang transparan setelah melalui proses pematangan jaringan. Pewarnaan dapat memperlihatkan struktur dan morfologi jaringan, keberadaan dan prevalensi sel-sel jaringan tertentu. Pewarnaan rutin yang biasanya digunakan untuk histopatologi adalah pewarnaan Hematoxylin Eosin (H&E). Namun, sebelum melakukan pewarnaan, jaringan yang telah melewati proses pematangan jaringan masih mengandung parafin, sedangkan proses pewarnaan adalah proses yang banyak melibatkan air, sehingga sebelum proses pewarnaan, parafin harus dilunturkan terlebih dahulu. Proses pelunturan parafin dari jaringan dinamakan deparafinisasi. Selanjutnya adalah proses penarikan air yang disebut sebagai rehidrasi.

Pewarnaan H&E ini didasarkan pada prinsip sederhana, yaitu sifat asam basa dari larutan yang kemudian akan berikatan dengan komponen jaringan yang mempunyai kecenderungan terhadap sifat asam ataupun basa tersebut sehingga terjadilah ikatan antara molekul zat warna dengan komponen jaringan. H&E diminati karena pewarnaan ini sederhana dan kemampuannya untuk membedakan komponen-komponen yang ada di dalam jaringan. H&E dapat diterapkan pada banyak pemeriksaan dalam histopatologi.

Mahasiswa harus mengetahui bagaimana prinsip dari suatu pewarnaan. Hal ini berguna untuk mengidentifikasi keberhasilan dari suatu pewarnaan. Kualitas pewarnaan akan berpengaruh terhadap interpretasi hasil pengamatan. Oleh karena itu, pada bab ini Anda akan mempelajari tentang pewarnaan jaringan histopatologi. Pembahasan diawali dengan prinsip pewarnaan, kemudian pembahasan selanjutnya tentang pewarnaan Hematoxylin Eosin, terakhir adalah pembahasan tentang kontrol kualitas pewarnaan H&E.

Setelah mempelajari bab ini Anda diharapkan dapat :

1. Mengetahui prinsip pewarnaan Histopatologi
2. Mengetahui prinsip pewarnaan Hematoxylin Eosin dan Reagen yang digunakan
3. Mengetahui kontrol kualitas pewarnaan Hematoxylin Eosin

Kemampuan-kemampuan tersebut sangat penting dikuasai oleh seorang Teknisi Laboratorium Patologi Anatomi. Mudah-mudahan Anda dapat memahami dengan jelas materi bab ini sehingga dapat melakukan teknik pematangan jaringan dengan baik.

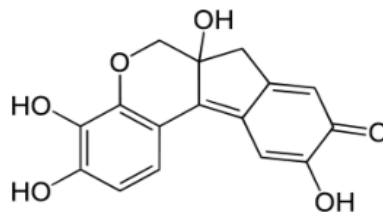
Topik 1 Dasar Hematoxylin Dan Eosin

Pewarnaan yang paling sering digunakan pada pemeriksaan histopatologi adalah pewarnaan Hematoxylin dan Eosin. Pada topik 1 ini, Anda akan mempelajari prinsip dasar pewarnaan Hematoxylin Eosin, serangkaian proses pewarnaan Hematoxylin Eosin dan mengetahui macam-macam Reagen yang dapat digunakan untuk pewarnaan Hematoxylin Eosin.

A. HEMATOXYLIN

1. Prinsip dasar Hematoxylin

Hematoxylin diekstrak dari kayu bulat Amerika yaitu *Haematoxylon campechianum*. Hematoxylin berasal dari bahasa Yunani, yaitu *haimatodec* (darah) dan *xylon* (kayu). Hematoxylin akan mengikat inti sel secara lemah, kecuali bila ditambahkan senyawa lainnya seperti aluminium, besi, krom dan tembaga. Senyawa hematoxylin yang dipakai adalah bentuk oksidasinya yaitu hematin. Proses oksidasi senyawa hematoxylin ini dikenal sebagai Ripening dan dapat dipercepat prosesnya dengan menambahkan senyawa yang bertindak sebagai oksidator seperti merkuri oksida, hidrogen peroksida, potassium permanganat dan sodium iodat. Hematin akan mengikat molekul yang bermuatan negatif. Material kromatis dalam inti sel bermuatan negatif, sehingga hematin akan berikatan dengan material kromatis di dalam inti sel. Secara sederhana, dapat dijelaskan bahwa kromatin pada inti sel mempunyai sifat asam dan akan menarik zat warna yang bersifat basa.



Gambar 9.1 Struktur Kimia Hematoxylin
(Sumber : <http://id.wikipedia.com>)

Hematoxylin Alum adalah kelompok yang paling sering digunakan di dalam pewarnaan histopatologi dan menghasilkan pewarnaan nukleus yang baik. Mordannya adalah aluminium, biasanya dalam bentuk 'tawas potas' (aluminium potassium sulfate) atau 'ammonium tawas' (Aluminium amonium sulfat). Untuk pewarnaan Hematoxylin jaringan secara rutin, yang paling banyak digunakan adalah Ehrlich, Mayer, Harris, Gill, Cole, dan Delafield. Hematoxylin Carazzi kadang-kadang digunakan, terutama untuk potong beku.

2. Macam-Macam Hematoxylin

a. Hematoxylin Erlich

Hematoxylin ini dibuat dengan cara pematangan yang alami yaitu pematangan selama 2 bulan. Waktu pematangan bisa lebih singkat dengan menempatkannya di tempat yang hangat seperti di jendela-jendela. Setelah pematangan berjalan dengan sempurna, maka Hematoxylin Erlich dapat digunakan dan dapat mempertahankan kemampuannya selama beberapa bulan. Hematoxylin Erlich dapat mewarnai mukopolisakarida pada tulang rawan, sehingga pewarnaan ini baik digunakan untuk tulang rawan. Adapun formulanya adalah sebagai berikut:

Hematoxylin	2 g
Alkohol absolut	100 ml
Gliserin	100 ml
Aquadest	100 ml
Asam asetat Glisial	10 ml
Potassium Alum	15 g

Cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Hematoksilin dilarutkan dalam alkohol, tambahkan bahan kimia yang lainnya
2. Gliserin ditambahkan untuk mengurangi oksidasi dan memperpanjang umur simpan
3. Pematangan alami di bawah sinar matahari memakan waktu 2 bulan, tapi dalam keadaan darurat bisa dimurnikan secara kimia dengan penambahan natrium iodat sebanyak 50 mg per 1 gram Hematoxylin, namun masa simpannya akan lebih pendek.
4. Saring sebelum digunakan

b. Hematoxylin Mayer

Hematoxylin ini matang dengan senyawa kimia yaitu sodium iodat. Hematoxylin mayer paling banyak digunakan dan memberikan hasil pewarnaan yang jelas. Masa simpannya lama. Counterstain dari hematoxylin mayer adalah Eosin 0,5-1%. Adapun formulanya adalah sebagai berikut:

Hematoxylin	1 g
Aquadest	1000 ml
Potassium atau ammonium alum	50 g
Sodium Iodat	0,2 g
Asam sitrat	1 g
Chloral hydrate SLR	50 g
atau Chloral hidrat AR	30 g

Cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Hematoxylin, Potassium alum dan natrium Iodat dilarutkan ke dalam aquadest dengan pemanasan, aduk kemudian biarkan di suhu kamar semalam
2. Tambahkan asam sitrat dan kloral hidrat, kemudian direbus selama 5 menit, dinginkan dan saring
3. Saring sebelum digunakan

c. Hematoxylin Harris

Hematoxylin ini matang secara kimiawi dengan oksida merkuri. Namun oksida merkuri ini sangat beracun, tidak ramah lingkungan dan memiliki efek panjang yang merugikan, dan bersifat korosif. Hematoxylin Harris mewarnai inti dengan baik. Counterstainnya adalah Eosin 0,5-1%. Adapun formulanya adalah sebagai berikut:

Hematoxylin	2,5 g
Alkohol Absolut	25 ml
Potassium alum	50 g
Aquadest	500 ml
Oksida merkuri	1,25 g
Sodium Iodat	0,5 g
Asam asetat glasial	20 ml

Cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Hematoxylin dilarutkan ke dalam alkohol absolut
2. Tambahkan ke dalam Potassium alum yang sebelumnya telah dilarutkan dalam aquadest hangat dalam labu 2 liter, campurkan larutan tersebut dan panaskan dengan cepat sambil diaduk.
3. Hentikan pemanasan, tambahkan merkuri oksida dan sodium iodat ditambahkan secara hati-hati.
4. Panaskan sampai warna menjadi purple gelap
5. Hentikan pemanasan dan tempatkan wadah ke dalam air dingin sehingga larutan Hematoxylin menjadi dingin.
6. Setelah larutan dingin, tambahkan asam asetat glasial. Penambahan asam asetat ini bersifat opsional.
7. Saring sebelum digunakan

d. *Hematoxylin Cole*

Hematoxylin Cole adalah salah satu pewarnaan alum (tawas), pewarnaan ini matang dengan larutan iodium beralkohol. Formulanya adalah sebagai berikut:

Hematoxylin	1,5 g
Potassium alum jenuh	700 ml
1% Iodium dalam 95% alkohol	50 ml
Aquadest	250 ml

Cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Hematoxylin dicampurkan dengan aquadest hangat
2. Campurkan dengan larutan iodine.
3. Tambahkan larutan alum, panaskan sambil diaduk
4. Dinginkan segera, kemudian disaring.

e. *Hematoxylin Carazzi*

Carazzi adalah Hematoxylin alum (tawas) yang matang secara kimiawi dengan kalium iodat. Adapun formulanya adalah sebagai berikut:

Hematoxylin	5 g
Gliserol	100 ml
Potassium Alum	25 g
Aquadest	400 ml
Kalium Iodat	0,1 g

Cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Hematoxylin dicampurkan dengan gliserol
2. Alum dicampurkan dengan aquadest, biarkan semalam
3. Larutan alum ditambahkan secara perlahan ke dalam larutan hematoxylin, campurkan dengan baik.
4. Kalium iodat dicampurkan dengan sisa air yang telah dihangatkan.
5. Tambahkan larutan tersebut ke dalam campuran hematoxylin-alum-gliserol tadi.
6. Saring sebelum digunakan.

f. *Hematoxylin Gill*

Formula Hematoxylin Gill adalah sebagai berikut:

Hematoxylin	2 g
Sodium Iodat	0,2 g
Aluminium Sulfat	17,6 g
Aquadest	750 ml
Ethylene Glycol (ethandiol)	250 ml
Asam asetat glasial	20 ml

Cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Campurkan aquadest dan ethylene glycol, tambahkan hematoxylin dan campurkan
2. Sodium iodat ditambahkan untuk oksidasi
3. Aluminium sulfat ditambahkan dan campurkan
4. Tambahkan asam asetat glasial, aduk selama 1 jam
5. Saring sebelum digunakan.

g. *Hematoxylin Delafield*

Hematoxylin alum yang matang secara alami, memiliki masa simpan panjang seperti Hematoxylin Ehrlich. Adapun formula larutan adalah sebagai berikut:

Hematoxylin	4 g
Alkohol 95%	125 ml
Ammonium alum jenuh 15 g/100 ml	400 ml
Gliserin	100 ml

Cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Hematoxylin dilarutkan dalam 25 ml alkohol 95%
2. Tambahkan ke larutan alum
3. Didiamkan selama 5 hari dalam ruangan yang cukup cahaya
4. Disaring, tambahkan gliserin dan 100 ml alkohol 95%
5. Didiamkan selama 3-4 bulan di ruangan yang cukup cahaya sampai warnanya menjadi cukup gelap, kemudian saring dan simpan
6. Saring sebelum digunakan.

3. Diferensiasi

Proses lainnya dalam pewarnaan H&E adalah diferensiasi. Diferensiasi adalah proses penggunaan larutan asam untuk menghilangkan pewarnaan yang berlebih/dekolorisasi. Larutan yang biasa digunakan adalah asam alkohol 1%. Larutan ini akan meningkatkan konsentrasi dari H^+ . Pada proses diferensiasi akan dilepas ikatan antara Al^{3+} dengan jaringan dan ikatan antara Al^{3+} dengan hematin.

4. Bluing

Bluing diperlukan untuk mengubah pewarnaan inti dari ungu kemerahan menjadi biru/ungu jernih. Agen bluing bersifat basa dengan kisaran pH optimal 7,5-9,0. Agen bluing diantaranya adalah *Scott's Tap Water*, *Ammonia Water*, dan *Lithium Carbonate*. Cara kerja bluing adalah dengan meningkatkan pH, mengurangi H^+ pada larutan yang berefek pada struktur hematoxylin, dan menghilangkan H^+ dari struktur ring. Seperti terlihat pada gambar berikut ini:

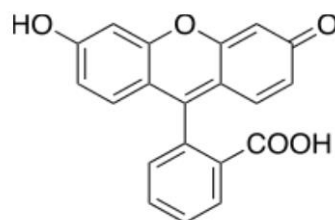


Gambar 9.2 Proses Bluing. Gambar kiri menunjukkan sebelum dan gambar kanan menunjukkan setelah proses bluing

(Sumber: Gary W. Gill. 2010. *H&E Staining: Oversight and Insights*. DAKO)

B. EOSIN

Eosin adalah pewarna sintesis yang termasuk golongan xanthene. Eosin bersifat asam dan akan mengikat molekul protein yang bermuatan positif di sitoplasma dan jaringan ikat. Eosin adalah *counterstain* yang dapat mewarnai sitoplasma dan jaringan ikat menjadi bernuansa merah dan oranye. Eosin juga mewarnai inti sel yang telah terwarnai hematoxylin dari biru menjadi berwarna ungu. Eosin yang tersedia dalam bentuk komersial diantaranya adalah Eosin Y (Eosin berwarna kekuningan dan larut di dalam air) C.I. No. 45380, Etil Eosin (Eosin S, larut dalam alkohol) C.I. No. 45386 dan Eosin B (Eosin kebiruan, eritrosin B) C.I. No. 45400. Namun yang paling banyak digunakan dan digabungkan dengan Hematoxylin adalah Eosin Y.



Gambar 9.3. Struktur Kimia Eosin Y

(Sumber : id.wikipedia.com)

Sebagai pewarna sitoplasma, Eosin biasanya digunakan dalam konsentrasi 0,5-1% di dalam aquadest. Kristal thymol ditambahkan untuk mencegah pertumbuhan jamur. Kemudian ditambahkan sedikit asam asetat (0,5 ml dalam 1000 ml zat warna) untuk mempertajam pewarnaan. diferensiasi terjadi ketika pencucian dengan air keran, dan ketika dilakukan dehidrasi dengan alkohol. Intensitas perpaduan warna H&E ditentukan oleh kita sebagai pengamat, keseimbangan warna harus bisa dilihat ketika preparat tersebut diperiksa di bawah mikroskop.

C. PROSEDUR PEWARNAAN HEMATOXYLIN EOSIN

Prosedur pewarnaan menggunakan hematoxylin eosin pada dasarnya tidak terpaut pada waktu yang ditentukan. Penentuan waktu tergantung dari larutan yang digunakan, apakah masih baru dibuat atau sudah digunakan sebelumnya. Waktu

1. Prosedur

Tabel. 9.1. Prosedur Pewarnaan Hematoxililn

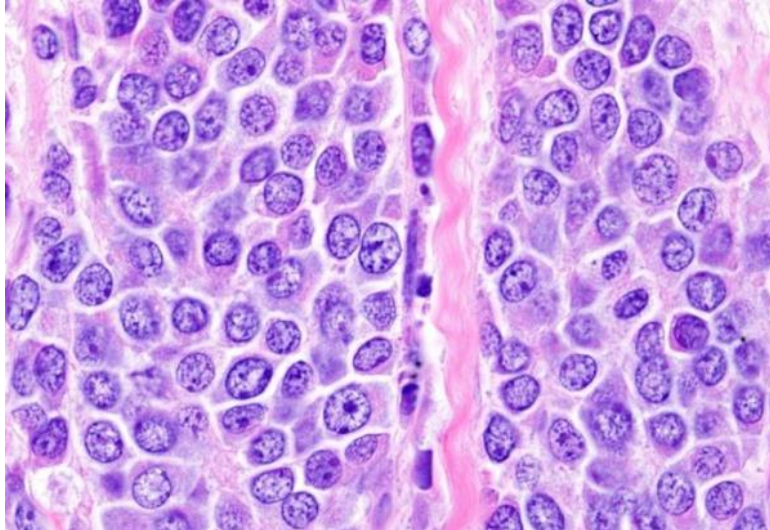
No.	Tahap	Zat	Waktu
1	Defarafinisasi	Xylol I	10 menit
	(menghilangkan parafin)	Xylol II	15 menit
2	Rehidrasi (memasukan air)	Alkohol dengan penurunan konsentasi Aquadest (Absolut-70%) Etanol Absolut – Alkohol 95% - Alkohol 70% - Aquades	@3 menit
3	Pewarnaan hematoksilin	Hematoxylin Alum	15 menit
4	Pencucian	Pencucian mengalir berwarna biru	pada air sampai 5 menit

✂ ■ Sitohistoteknologi ✂ ■

5	Diferensiasi (proses dekolorisasi sitoplasma)	(proses pada asam alkohol 1% (1% HCl dalam 70% Alkohol) dalam waktu 5-10 detik	3 celup
6	Pencucian	Air mengalir	1 menit
7	Blueing (proses memperjelas warna biru pada inti sel) diikuti dengan pencucian dengan air mengalir	Lithium Carbonat	3 celup
8	Pewarnaan eosin	Eosin 1% dalam waktu 10 menit	3- 5 menit
9	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol dengan @ kenaikan konsentrasi (70%-Absolut) Alkohol 70% - alkohol 95% - alkohol 95% - Etanol absolut – Etanol Absolut	1-3 menit
10	Clearing	Xylol Xilol 1 – Xilol 2	@ 3-5 menit
11	Mounting (proses penutupan jaringan diantara cover glass dengan objek glass oleh entelan)	Entelan	

2. Hasil

Nukleus berwarna biru/hitam, sitoplasma berwarna nuansa pink, serat otot berwarna pink lebih gelap, sel darah merah berwarna oranye/merah, fibrin berwarna pink gelap. Struktur dan substansi selain nukleus mungkin akan terwarnai oleh Hematoxylin, seperti hifa jamur, dan endapan kalsium yang sering kali berwarna hitam/biru.



Gambar 9.4. Hasil Pewarnaan Sediaan Jaringan.
(Sumber <http://www.leicabiosystems.com>)

Latihan

Untuk mengetahui sejauh mana tiap langkah dari pewarnaan itu sesuai dengan yang diharapkan, silahkan Anda lakukan latihan di bawah ini :

- 1) Buat tiga buah pita jaringan yang berasal dari block yang sama dengan jarak yang berdekatan.
- 2) Lakukan pewarnaan dengan 3 metode yang berbeda
 - a. Metode pertama prosedur yang tidak ada perubahan
 - b. Metode kedua dihilangkan tahapan blueing
 - c. Metode ketiga dihilangkan tahapan diferensiasi (asam asetat)
- 3) Buat laporan perbandingan hasil pewarnaan dari ketiga metode tersebut dilihat dari ?
 - a. Densitas warna inti
 - b. Densitas warna sitoplasma
 - c. Kekontrasan warna inti dibandingkan dengan sitoplasma

Ringkasan

Pewarnaan jaringan sangat diperlukan untuk mewarnai komponen-komponen jaringan yang transparan setelah melalui proses pematangan jaringan. Pewarnaan rutin yang biasanya digunakan untuk histopatologi adalah pewarnaan Hematoxylin Eosin (H&E). Hematoxylin akan mengikat inti sel secara lemah, kecuali bila ditambahkan senyawaan lainnya seperti aluminium, besi, krom dan tembaga. Senyawa hematoxylin yang dipakai adalah bentuk oksidasinya yaitu hematin. Hematin akan mengikat molekul yang bermuatan negatif. Material kromatis dalam inti sel bermuatan negatif, sehingga hematin akan berikatan dengan material kromatis di dalam inti sel. Untuk pewarnaan Hematoxylin jaringan secara rutin, yang paling banyak digunakan adalah Ehrlich, Mayer, Harris, Gill, Cole, dan Delafield. Hematoxylin Carazzi kadang-kadang digunakan, terutama untuk potong beku. Proses yang tak kalah penting lainnya dalam pewarnaan H&E adalah diferensiasi dan bluing. Diferensiasi adalah proses dekolorisasi zat warna yang berlebih sedangkan bluing adalah proses memperjelas warna biru pada inti sel dengan cara menaikkan pH. Eosin adalah pewarna sintetis yang termasuk golongan xanthene. Eosin bersifat asam dan akan mengikat molekul protein yang bermuatan positif di sitoplasma dan jaringan ikat. Eosin Y yang paling banyak digunakan sebagai counterstain dari Hematoxylin.

Test 1

Untuk mengetahui sejauh mana anda paham dengan bab ini silahkan anda berusaha mengerjakan soal-soal berikut ini :

- 1) Pewarnaan yang rutin digunakan pada pemeriksaan histopatologi adalah...
 - A. Hematoxylin Eosin
 - B. Imunohistokimia
 - C. histokimia
 - D. Papanicolou
 - E. Giemsa

- 2) Pewarnaan H&E didasarkan pada prinsip sederhana, yaitu sifat asam basa dari larutan yang kemudian akan berikatan dengan komponen jaringan yang mempunyai kecenderungan terhadap sifat asam ataupun basa tersebut sehingga terjadilah ikatan antara molekul zat warna dengan komponen jaringan. Senyawa Hematoxylin yang dipakai adalah bentuk oksidasinya yaitu Hematin. Hematin akan mengikat komponen sel yang bermuatan negatif. Apakah komponen sel tersebut?
 - A. Sitoplasma
 - B. Jaringan ikat
 - C. Jaringan kolagen
 - D. Kromatin sel
 - E. Eristrosit

- 3) Hematoxylin yang paling sering digunakan adalah Hematoxylin Alum. Berikut ini adalah macam-macam Hematoxylin Alum, kecuali...
 - A. Hematoxylin Mayer
 - B. Hematoxylin Erlich
 - C. Hematoxylin Weigert
 - D. Hematoxylin Harris
 - E. Hematoxylin Gill

- 4) Proses penggunaan larutan asam untuk menghilangkan pewarnaan yang berlebih/dekolorisasi disebut...
 - A. Bluing
 - B. Diferensiasi
 - C. Ripening
 - D. Deparafinisasi
 - E. Rehidrasi

- 5) Zat warna ini berwarna kekuningan dan larut dalam air. Paling sering digunakan sebagai *counterstain*. Prinsipnya di dasarnya di dasarkan pada sifat asam basa, dimana zat warna ini bersifat asam akan berikatan dengan komponen protein yang bermuatan positif seperti sitoplasma dan jaringan ikat. Apakah nama zat tersebut?
- A. Eosin B
 - B. Eosin S
 - C. Eosin Y
 - D. Hematoxylin
 - E. *Lithiumcarbonate*

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 1 yang terdapat di bagian akhir topik ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Topik 1.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan:

- 90 - 100% = baik sekali
- 80 - 89% = baik
- 70 - 79% = cukup
- < 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan mempelajari materi di topik9. Bagus! Jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi topik ini, terutama bagian yang belum Anda kuasai.

Topik 2

Kontrol Kualitas Pewarnaan

A. PEDOMAN KONTROL KUALITAS

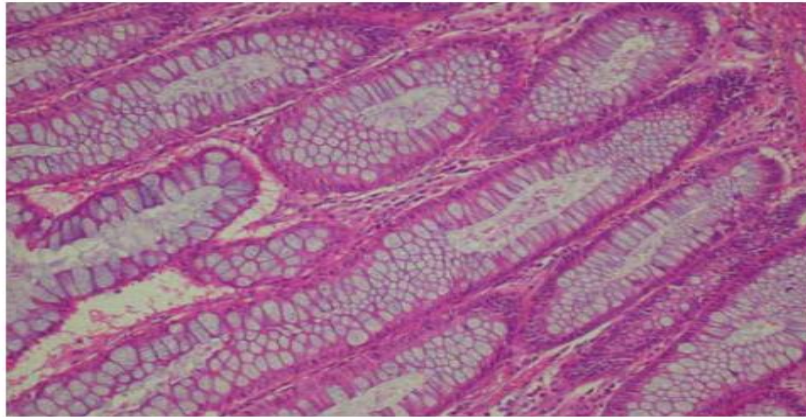
Membuat sediaan jaringan yang berkualitas sangat diperlukan untuk memperoleh hasil yang meyakinkan dan akurat. Namun sayangnya, jaringan terkadang mengalami kerusakan saat proses fiksasi, pematangan jaringan, pemotongan jaringan maupun pewarnaan. Seorang Teknisi Laboratorium Patologi Anatomi harus bisa meminimalisir kerusakan pada jaringan dan memperbaiki jika terjadi kerusakan. Hal tersebut dapat dicapai dengan melakukan kontrol kualitas pada suatu proses pembuatan sediaan jaringan. Pada Topik 2 ini, akan dibahas mengenai kontrol kualitas pada pewarnaan Hematoxylin Eosin sebagai pewarnaan histopatologi yang sering dipakai.

Beberapa pedoman umum yang dapat dipakai untuk menilai kualitas H&E adalah sebagai berikut:

1. Nukleus: zat warna dapat mewarnai nukleus menjadi biru dan dapat menunjukkan membran nukleus, nukleoli, kromatin, dan nukleus yang vakuolar dan hiperkromatis.
2. Sitoplasma dan substansi dasar lainnya: dapat mewarnai dan membedakan sitoplasma, kolagen, otot, eritrosit, sel darah merah dan mucin dengan nuansa warna kemerahan.
3. Pada potongan usus, usus buntu dan paru-paru: dapat mewarnai mucin pada sel epitel, apakah berwarna biru atau terang tergantung pada pH dari Hematoxylin. Menurunkan pH biasanya dapat dilakukan dengan menambahkan asam asetat, hal ini secara signifikan dapat mengurangi warna mucin.
4. Pewarnaan Hematoxylin yang terlalu teroksidasi akan menimbulkan warna coklat pada elemen-elemen tertentu pada jaringan.

Teknisi Laboratorium Patologi Anatomi harus bisa membedakan antara serat otot dan kolagen, otot akan berwarna merah lebih tua dari kolagen. Sel darah merah harus berwarna merah terang. Penilaian nukleus akan tergantung pada jenis sel pada jaringan yang diwarnai. Adapun beberapa pedoman kontrol kualitas harian pewarnaan H&E dapat dilakukan pada organ usus besar (kolon), kulit dan ginjal.

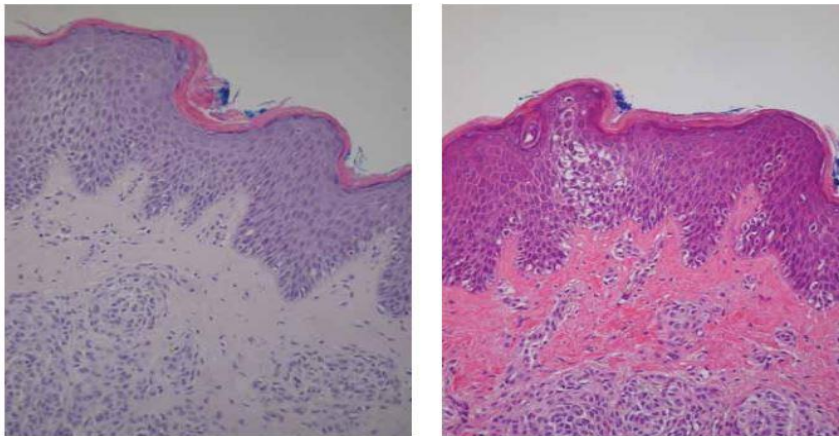
1. Kolon: dapat membedakan serat otot dan kolagen. Pewarnaan mucin yang tidak tepat, jika mucin terwarnai biru maka langkah yang dapat dilakukan adalah menurunkan pH Hematoxylin. Pewarnaan yang jelas terhadap nukleus sel epitel vesikuler.



Gambar 9.5. sediaan kolon yang diwarnai H&E memperlihatkan mucin yang berwarna biru. Untuk menghilangkan warna biru pada mucin dapat dilakukan dengan cara menurunkan pH pada Hematoxylin

(sumber: Henwood A. 2010. Microscopic Quality Control of Hematoxylin and Eosin - Know your Histology. DAKO)

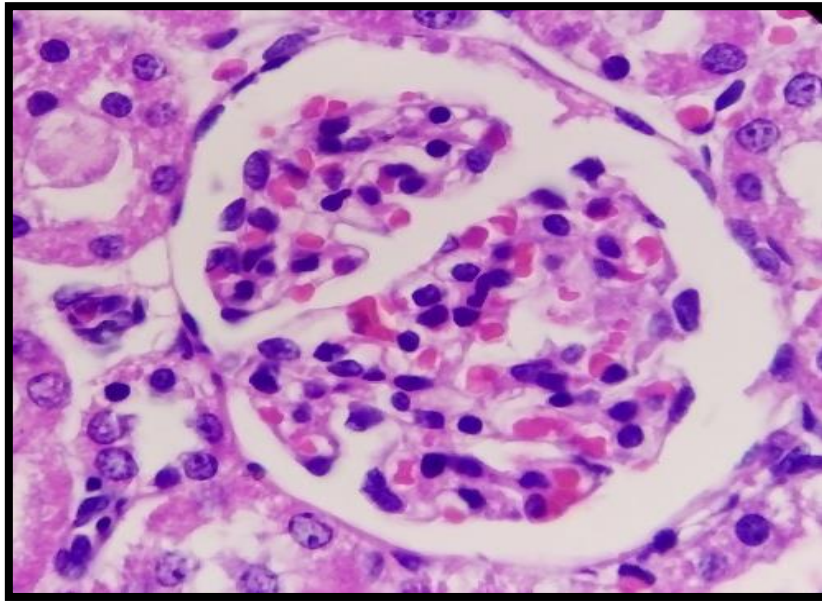
2. Kulit: dapat menunjukkan butiran keratohialin yang berwarna biru, dapat membedakan keratin dari kolagen dan saraf, memperlihatkan batas papiler pada dermis.



Gambar 9.6. sediaan kulit yang diwarnai H&E. gambar kiri menunjukkan pH Eosin terlalu tinggi, gambar kanan menunjukkan Eosin yang sesuai dapat membedakan serat kolagen dan jaringan saraf.

(sumber: Henwood A. 2010. Microscopic Quality Control of Hematoxylin and Eosin – Know your Histology. DAKO)

3. Ginjal: mengidentifikasi membranbasal dan tubulus kontortus. Ginjal mempunyai keragaman sel yang luas dari mulai sel yang mempunyai kromatin padat (glomerulus) hingga sel yang mempunyai kromatin seperti debu (selkuboidalitubuluspengumpul)



Gambar 9.7 sediaan ginjal yang diwarnai H&E. Sel dengan kromatin padat terdapat pada glomerulus. Sel dengan kromatin halus terdapat pada tubulus (sumber: dokumen pribadi)

C. TROUBLESHOOT PEWARNAAN HEMATOXYLIN

Masalah	Penyebab	Cara Mengatasi
Hiperkromatik	Hematoxylin yang terlalu kuat konsentrasinya (Hematoxylin Harris tanpa Asam Asetat)	Gunakan Hematoxylin yang konsentrasi lebih rendah; Encerkan 3:1 dengan etilenglikol; Persingkat waktu pewarnaan; Diferensiasi dengan HCl 0,25%
	Waktu pewarnaan terlalu lama	Kurangi waktu pewarnaan
	Diferensiasi HCl yang tidak memadai	Gunakan konsentrasi HCl yang lebih tinggi
	Agen diferensiasi sudah menurun kualitasnya	Ganti lebih sering
Masalah	Penyebab	Cara Mengatasi
Hipokromatik	Penurunan kualitas Hematoxylin	Ganti Hematoxylin
	Pewarnaan terlalu singkat	Tingkatkan waktu pewarnaan
	Diferensiasi yang berlebihan	Gunakan konsentrasi HCl yang lebih rendah

	Pemotongan yang terlalu tipis	Potong lebih tebal dan tingkatkan waktu pewarnaan
	Air mengalir yang asam (jarang)	Gunakan aquadest
	Klorin pada air mengalir (jarang)	Gunakan aquadest
	Bluing pada air mengalir yang asam	Gunakan scott's tap water (TWS)
Warna salah: ungu muda	Bluing terlalu singkat	Perpanjang waktu bluing
	Larutan bluing yang menurun kualitasnya	Ganti larutan bluing setiap hari
	Tidak ada filter biru pada mikroskop	Gunakan mikroskop "daylight" yang mempunyai filter biru
Warna salah: abu-abu	Mewarnai pengotor	Gunakan hematoxylin yang tersertifikasi atau buat hematoxylin yang segar
Warna salah: coklat	Terlalu banyak agen yang teroksidasi	Gunakan lebih rendah (0,1 gm/gm Hematoxylin)
	Oksidasi yang terlalu berlebihan pada paparan udara yang terlalu lama	Simpan dengan tertutup bertujuan agar menghindari paparan udara
Masalah	Penyebab	Cara Mengatasi
Mewarnai sitoplasma	Kurangnya Waktu Diferensiasi Dengan HCl	Tingkatkan lagi diferensiasi; Kurangi waktu pewarnaan atau encerkan
	Sitoplasma banyak mengandung RNA	

Mengatasi Masalah Pewarnaan Eosin

Masalah	Penyebab	Cara Mengatasi
Hiperkromatik	Perkiraan yang berlebihan	Sesuaikan perkiraan
	Pembilasan dengan alkohol yang tidak cukup	Tingkatkan waktu bilas, celupkan lebih banyak
	Diferensiasi HCl yang tidak memadai	Gunakan konsentrasi HCl yang lebih tinggi
Hipokromatik	Penurunan kualitas Eosin	Ganti Eosin

	Pewarnaan terlalu singkat	Tingkatkan waktu pewarnaan dua kali lipat
Warna Salah: Ungu Muda	Sitoplasma telah mempertahankan warna Hematoksilin yang diaplikasikan secara regresif dan baru terdiferensiasi sebagian	Gunakan Hematoxylin progresif atau tuntaskan proses diferensiasi
	Pembilasan alkohol yang tidak cukup	Gunakan 3 alkohol konsentrasi 95%, celupkan masing-masing 10 kali.

Latihan

Setelah Anda telah selesai membaca topik kedua ini, saatnya Anda melakukan latihan untuk melakukan control kualitas dari pewarnaan. Silahkan Anda buat kembali 3 buah pita jaringan dari spesimen yang sama dengan jarak yang berurutan. Lakukan pewarnaan dengan kondisi sebagai berikut :

- 1) Pita pertama lakukan pewarnaan dengan hematoxylin yang dikondisikan suasana asam dengan penambahan asam asetat 0.5%
- 2) Pita kedua lakukan pewarnaan dengan eosin yang dikondisikan netral (tanpa ada penambahan asam asetat)
- 3) Pita ketiga prosedur tetap tanpa ada perubahan
- 4) Buat laporan perbandingan dari ketiga metode tersebut.

Ringkasan

Membuat sediaan jaringan yang berkualitas sangat diperlukan untuk memperoleh hasil yang meyakinkan dan akurat. Hal tersebut bisa dicapai dengan cara mengontrol kualitas dari suatu proses pewarnaan. Pedoman kontrol kualitas pewarnaan H&E secara umum adalah dengan memastikan bahwa inti sel (nukleus) berwarna biru saat diwarnai Hematoxylin, sedangkan sitoplasma, jaringan ikat serta eritrosit berwarna oranye/merah saat diwarnai Eosin. Organ yang dapat dijadikan kontrol kualitas sehari-hari pada pewarnaan H&E adalah Kolon, Kulit dan Ginjal. sebagai Teknisi Laboratorium Patologi Klinik, jika terjadi masalah pada pewarnaan H&E maka harus bisa mencari penyebabnya dan memperbaiki masalah tersebut.

Test 2

Untuk mengetahui sejauh mana anda paham dengan topik ini silahkan anda berusaha mengerjakan soal-soal berikut ini :

- 1) Pedoman umum kontrol kualitas pewarnaan H&E adalah...
 - A. IntiberwarnamerahdenganHematoxylin, sitoplasmadanjaringanikatberwarnabirudenganEosin
 - B. Inti menjadi ungu muda dengan Hematoxylin, sitoplasma dan jaringan ikat berwarna coklat
 - C. Inti berwarna biru dengan Hematoxylin, sitoplasma dan jaringan ikat berwarna nuansa merah dengan Eosin
 - D. IntiberwarnacoklatdenganHematoxylin, sitoplasmadanjaringanikatberwarnamerahdenganEosin
 - E. Intiberwarnaabu-abu, sitoplasmadanjaringanikatberwarnamerahdenganEosin

- 2) Organ yang bisa dijadikan kontrol kualitas pewarnaan H&E adalah sebagai berikut, kecuali...
 - A. Kolon
 - B. Ginjal
 - C. Tulang
 - D. Ususbesar
 - E. Kulit

- 3) Salah satu organ untuk kontrol kualitas H&E dapat membedakan serat otot dan kolagen. Kemudian dapat melihat pewarnaan mucin yang tidak tepat, jika mucin terwarnai biru maka langkah yang dapat dilakukan adalah menurunkan pH Hematoxylin. Apakah nama organ tersebut?
 - A. Kulit
 - B. Kolon
 - C. Ginjal
 - D. Tulang
 - E. Hati

- 4) Berikut ini adalah solusi menyelesaikan masalah hiperkromatis pada pewarnaan Heamatoxylin, kecuali...
 - A. GunakanHematoxylinyankonsetrasinyalebihrendah
 - B. Encerkan 3:1 denganetilenglikol
 - C. Persingkat waktu pewarnaan
 - D. Potong lebih tebal dan tingkatkan waktu pewarnaan
 - E. Diferensiasi dengan HCl 0,25%

- 5) Bagaimana cara mengatasi masalah hipokromatik pada pewarnaan oleh Eosin?

■ Sitohistoteknologi ■

- A. Tingkatkan waktu pewarnaan dua kali lipat
- B. Gunakan konsentrasi HCl yang lebih tinggi
- C. Tingkatkan waktu bilas dengan alkohol, celupkan lebih banyak
- D. Gunakan 3 alkohol konsentrasi 95%, celupkan masing-masing 10 kali.
- E. Sesuaikan perkiraan pewarnaan

Cocokkanlah jawaban Anda dengan Kunci Jawaban Tes Formatif 2 yang terdapat di bagian akhir topik ini. Hitunglah jawaban yang benar. Kemudian, gunakan rumus berikut untuk mengetahui tingkat penguasaan Anda terhadap materi Topik2.

$$\text{Tingkat penguasaan} = \frac{\text{Jumlah Jawaban yang Benar}}{\text{Jumlah Soal}} \times 100\%$$

Arti tingkat penguasaan:

- 90 - 100% = baik sekali
- 80 - 89% = baik
- 70 - 79% = cukup
- < 70% = kurang

Apabila mencapai tingkat penguasaan 80% atau lebih, Anda dapat meneruskan mempelajari materi di topik selanjutnya. Bagus! Jika penguasaan Anda di bawah 80%, Anda harus mengulangi materi di topik ini, terutama bagian yang belum Anda kuasai.

Kunci Jawaban Tes

Tes 1

1. A
2. D
3. C
4. B
5. C

Tes 2

1. C
2. C
3. B
4. D
5. A

Daftar Pustaka

- Bancroft J.D, Gamble M. (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Philadelphia: Elsvier
- Gary W. Gill. (2010). *H&E Staining: Oversight and Insights*. DAKO
- Henwood A. (2010). *Microscopic Quality Control of Hematoxylin and Eosin – Know your Histology*. DAKO
- Treuting P.M, Dintzis S.M. (2012). *Comparative Anatomy and Histology*. United States of America: Elsvier



SITOHISTOTEKNOLOGI

PUSAT PENDIDIKAN SUMBER DAYA MANUSIA KESEHATAN

Badan Pengembangan dan Pemberdayaan
Sumber Daya Manusia Kesehatan

Jl. Hang Jebat III Blok F3,
Kebayoran Baru Jakarta Selatan - 12120

Telp. 021 726 0401

Fax. 021 726 0485

Email. pusdiknakes@yahoo.com