

**PENGARUH LAMA FIKSASI TERHADAP GAMBARAN
MIKROSKOPIS DENGAN PEWARNAAN
*Hematoxilyn Eosin (HE)***

Manuscript



**PROGRAM STUDI D IV ANALIS KESEHATAN FAKULTAS
ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH
SEMARANG
2018**

HALAMAN PERSETUJUAN

Manuscript dengan judul

**PENGARUH LAMA FIKSASI TERHADAP GAMBARAN
MIKROSKOPIS DENGAN PEWARNAAN
*Hematoxilyn Eosin (HE)***

Telah diperiksa dan disetujui untuk mempublikasikan

Semarang, 01 Oktober 2018

Pembimbing I



Dr. Sri Sinto Dewi, M.Si.Med.
NIK. 28.6.1026.034

Pembimbing II



Arya Iswara, M.Si.Med
NIK. 28.6.1026.224

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan dengan sungguh-sungguh bahwa Tugas Akhir ini adalah karya sendiri, disusun tanpa tindakan plagiatisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Muhammadiyah Semarang

Nama : Jahira
NIM : G1C217115
Fakultas : Ilmu Keperawatan dan Kesehatan
Program Studi : Analis Kesehatan
Judul : Pengaruh Lama Fiksasi Terhadap Gambaran Mikroskopis Dengan Pewarnaan *Hematoxilyn Eosin* (He)
E-mail : whitejahira@gmail.com

Jika dikemudian hari ternyata saya melakukan tindakan plagiatisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya menerima sanksi yang dijatuhkan Universitas Muhammadiyah Semarang kepada saya.

Semarang, Oktober 2018

A green 6000 Rupiah banknote is shown with a signature and the name 'Jahira' written over it. The banknote features the Garuda Pancasila logo and the text '6000 RUPIAH'.

PENGARUH LAMA FIKSASI TERHADAP GAMBARAN MIKROSKOPIS DENGAN PEWARNAAN *Hematoxilyn Eosin* (HE)

Jahira¹, Sri Sinto Dewi², Arya Iswara²

1. Program Study DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan Dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang .
2. Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Semarang

Info artikel

Abstrak

Formalin (BNF) 10% buffered Neutral is a long fixation agent that has become the standard for use in diagnostic settings. It is more effective than simple formalin mixtures such as the phosphate salt present making it impossible that erythrocytes will be damaged, and neutral pH inhibits formalin pigment. will adjust the pH around 7.0 as neutral but don't need to adjust it to this level if it's a little different. Fixation aims to preserve tissue and harden tissue, so that the tissue to be observed does not change shape or size, fixation can also kill bacteria that can make rotten tissue, this study is to see the effect of long fixation on microscopic images with *Hematoxylin Eosin* (HE) staining. From the results of the study, it was found that the fixation of rabbit's liver and kidney organs with different fixation times is 8, 16, and 24 hours that the microscopic image is good so that it can be concluded that buffered neutral formalin (BNF) is 10% good for fixation. short or long.

Keywords :

BNF 10%, *Hematoxylin Eosin* (HE), liver and kidney organs

Pendahuluan

Histoteknik adalah metode pembuatan sajian histologi dari spesimen tertentu melalui suatu rangkaian proses hingga menjadi sajian yang siap untuk dianalisa. Spesimen tertentu dapat berupa jaringan dari manusia atau hewan. Teknik ini merupakan salah satu teknik laboratorium yang dipergunakan dalam kegiatan eksperimental. Hasil pemeriksaan dari teknik ini adalah berupa spesimen mikroskopis setelah dilakukan pewarnaan sesuai dengan yang dibutuhkan, salah satunya adalah dengan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE). Salah satu tahapan histoteknik adalah fiksasi. Fiksasi bertujuan untuk mengawetkan jaringan dan

mengeraskan jaringan, agar jaringan yang akan diamati tidak mengalami perubahan bentuk ataupun ukuran. fiksasi juga dapat membunuh bakteri yang dapat membuat jaringan busuk. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan Buffered Neutral Formalin (BNF) 10%. Alasan memilih cairan fiksasi Buffered Neutral Formalin (BNF) 10% karena penggunaannya lebih muda dan dapat digunakan untuk mengawetkan jaringan dalam kurun waktu yang cukup lama, namun daya fiksasinya lebih lambat yakni 12-24 jam (Miranti,2010).

sehingga proses fiksasi sangat penting dalam pemeriksaan histologi jaringan manusia maupun hewan. pada jaringan hewan apabila dibiarkan lama setelah

*Corresponding Author:

Jahira

whitejahira@gmail.com

Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang Indonesia 50273

penyembelihan akan menyebabkan autolysis, selain menyebabkan kualitas daging menurun autolisis juga menyebabkan gangguan dalam mendiagnosis jaringan secara histopatologi, karena autolisis memiliki ciri-ciri yang menyerupai nekrosis ditandai dengan hiperkromatik dengan inti sel yang mengecil (Kroemer, 2005),

Autolisis merupakan perlemakan dan pencarian jaringan yang terjadi

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui gambaran mikroskopis ginjal dan hati kelinci yang difiksasi *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan variasi waktu 8, 16 dan 24 jam.

fiksasi, dan perubahan warna tidak boleh digunakan sebagai indikator bahwa itu sudah lengkap. (Briegleb, 2012)

Sangat penting bahwa waktu dalam catatan fiksasi, dan waktu yang cukup diperbolehkan untuk reaksi kimia terjadi, waktu yang diukur dalam beberapa jam tidak memadai, dan kurang ikatan silang dalam jaringan yang diperlukan untuk waktu yang singkat tidak akan memberikan perlindungan yang memadai terhadap jaringan efek fiksasi etanol dehidrasi. Potong-potongan jaringan yang lebih kecil tidak bisa diperbaiki dengan lebih cepat dari pada potongan yang lebih besar. Biopsi jarum harus membutuhkan waktu yang sama dengan irisan 3 mm dari organ padat.

Bahan Dan Metode

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah alkohol 70%, 80%, 96% dan alkohol absolut, *dek glass*, entelan eosin, fiksasi BNF 10%, hematoksilyn, kaca *objek glas*, *paraffin* dan xilol. alat yang digunakan yaitu alat untuk memboking, alat pemotong blok *paraffin* (mikrotom), alat untuk pewarnaan, kaset, mesin pengolahan jaringan *tissue processing*,

mikroskop, pisau jaringan (*makro knife*) pingset, water bath, (*section floatation bath*) dan Hot plate. penelitian yang dilakukan merupakan penelitian deskriptif analitik dengan menggunakan desain *cross sectional*.

Sampel diambil dari organ hewan coba (kelinci), dilakukan pembedahan kemudian diambil organ yaitu hati dan ginjal yang masih segar. jaringan dipotong masing-masing dimasukkan kedalam wadah yang berisi larutan fiksasi, kemudian difiksasi selama 8, 16 dan 24 jam.

Tahapan Pengolahan Jaringan

Prosedur pemotongan jaringan

Jaringan segar hati dan ginjal dipotong kemudian dimasukkan kedalam wadah berisi larutan fiksasi yang telah diberi label. Tebal irisan jaringan 2cm, volume fiksasi 10x (20ml) sampel jaringan yang akan difiksasi, dengan waktu fiksasi yaitu 8, 16 dan 24 jam.

Fiksasi

Bertujuan untuk mengawetkan organ agar tetap utuh dan sel, organel sehingga mendekati bentuk fisiologisnya. Organ hati dan ginjal di potong sepanjang 2 cm kemudian di fiksasi dengan larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan perbandingan 1:9 (organ hati/ginjal 2 cm, larutan BNF 10% 200 ml) waktu fiksasi 8, 16, dan 24 jam.

Dehidrasi

Tahapan dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan setelah dilakukan proses fiksasi. dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari chamber 2 alkohol 70%, chamber 3 alkohol 80%, chamber 4 alkohol 95%, chamber 5 alkohol absolut I, chamber 6, alkohol absolut II, chamber 7 alkohol absolut III selama masing-masing 1,5 jam.

Clearing

Bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantikannya dengan suatu larutan yang berikatan dengan *paraffin*. *Clearing* pada chamber 8, menggunakan reagen xylol 1 selama 1 jam diteruskan pada chamber 9

***Corresponding Author:**

Jahira

email:whitejahira@gmail.com

Program Studi DIV Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang Indonesia 50273

xylol II, chamber 10 xylol III selama masing-masing 1,5 jam.

Infiltrasi paraffin

Bertujuan untuk mengeluarkan cairan pembening dari jaringan yang diganti dengan *paraffin*. Tahapan infiltrasi menggunakan *paraffin* cair pada chamber II selama 1,5 jam dan chamber 12 selama 24 jam.

Pengeblokan

Bertujuan untuk pada saat pemotongan jaringan mudah dipotong dimikrotom. Proses pengeblokan dengan *paraffin* padat yang dicairkan dituangkan kedalam cetakan (*base mold*), jaringan yang dari pressing dimasukkan kedalam cetakan yang telah berisi *paraffin* cair, tekan jaringan agar semakin menempel di dasar cetakan. Tutup cetakan kaset, letakkan diatas cetakan dan ditekan, diberi label nomor sampel/etiket dipinggir kaset, biarkan sampai *paraffin* membeku setelah beku dikeluarkan dari cetakan.

Pemotongan Blok Paraffin

Bertujuan untuk membuat lembaran pita jaringan menjadi tipis, Pemotongan blok *paraffin* dengan cara diletakkan blok *paraffin* pada penjepit kaset mikrotom, dipasang pisau mikrotom yang masih tajam pada tempat pisau mikrotom kemudian diatur ketebalan 2 sampai 5 mikron dengan suhu 30⁰. putar pemutar mikrotom menggunakan tangan kanan sampai jaringan terpotong menjadi lembaran pita dengan ketebalan 2-5 mikron, kemudian lembaran pita jaringan diambil dan diletakkan di waterbath dengan suhu 50⁰ sampai mengembang lembaran jaringan diambil menggunakan objek gelas

Pewarnaan Hematokxylin Eosin (He)

Tahapan dimulai dari xylol I, xylol II, xylol III dengan masing-masing 3 menit, selanjutnya Alkohol Absolut 5 menit, Alkohol 95% 5menitAlkohol 70% 5 menit kemudian cuci dengan air mengalir selama 5 menit, lalu dilanjutkan dengan memasukkan kedalam Mayer Hematokxylin selama (5-10) menit cuci dengan air mengalir selama 5 menit dilanjutkan

dengan eosin 30 detik (3 celupan), alkohol 70 lalu keringkan

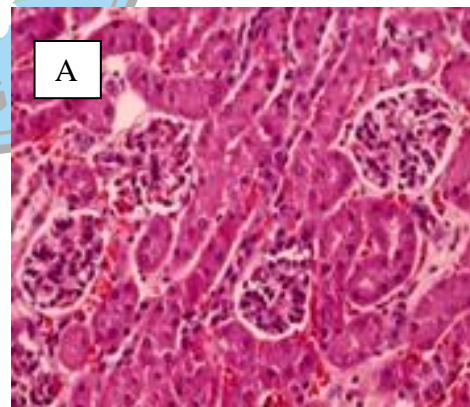
Mounting

Berfungsi untuk jaringan yang telah diwarnai dengan cara meneteskan preparat menggunakan entelan I tetes kemudian ditutup dengan deck glas.

Pembacaan Hasil

Pada penelitian ini untuk hasil pengamatan gambaran mikroskopis jaringan menggunakan tiga skor kriteria pewarnaan yaitu skor 1 (tidak baik) jika Warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah (*eosin*) pada sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas serta warna pada preparat tidak seragam, skor 2 (kurang baik) jika warna biru pada inti sel kurang, warna merah (*eosin*) pada sitoplasma dan jaringan ikat kurang, serta keseragaman warna pada preparat kurang. Tetapi masih bisa didiagnosis, dan skor 3 (baik) jika warna biru pada inti sel, warna merah (*eosin*) pada sitoplasma dan jaringan ikat serta warna pada preparat seragam.

Hasil pengamatan mikroskopis jaringan ginjal dengan fiksasi BNF 10% dengan pengecatan Hematoksilyn Eosin (HE)dilampirkan dalam bentuk gambar sebagai berikut :

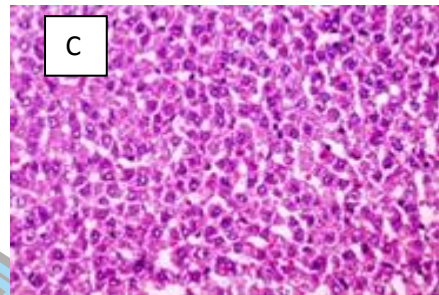
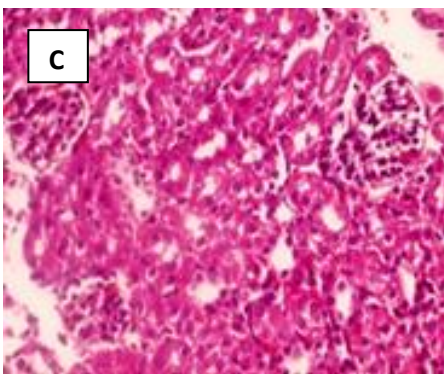
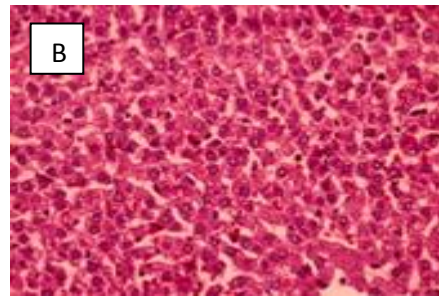
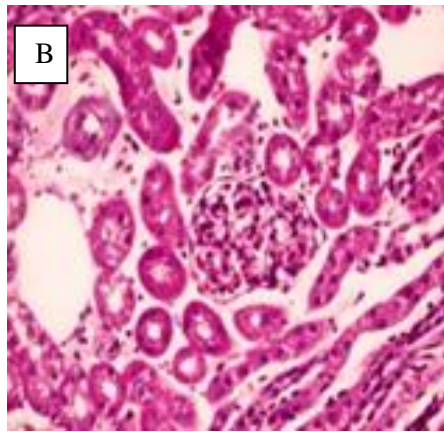


***Corresponding Author:**

Jahira

email:whitejahira@gmail.com

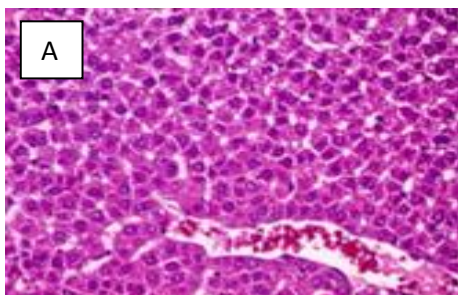
Program Studi DIV Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang Indonesia 50273



Gambar 2. Hasil gambaran mikroskopis pewarnaan HE pada jaringan hati dengan fiksasi BNF 10% pembesaran 100x. Keterangan : (A) 8 jam, (B) 16 jam dan (C) 24 jam. (1) Inti sel, (2) sitoplasma.

Gambar 1 Hasil gambaran mikroskopis pewarnaan HE pada jaringan ginjal dengan fiksasi BNF 10% pembesaran 100x. Keterangan : (A) 8 jam, (B) 16 jam dan (C) 24 jam. (1) Inti sel (2) sitoplasma

Hasil pengamatan mikroskopis jaringan ginjal dengan fiksasi BNF 10% dengan pengecatan *Hematoksilyn Eosin* (HE) dilampirkan dalam bentuk gambar sebagai berikut :



Buffered Nautral Formalin (BNF) 10% secara umum merupakan cairan fiksasi yang digunakan untuk pengawetan jaringan pada pemeriksaan histologi rutin. Cairan fiksasi ini dipilih karena penggunaannya lebih muda dan dapat digunakan untuk mengawetkan jaringan dalam kurun waktu yang cukup singkat. Buffered Nautral Formalin (BNF) 10% mengandung garam yang memiliki kelarutan terbatas dalam konsentrasi tinggi etanol. Untuk alasan itu jaringan harus ditranfer kedalam dehidrasi yang mengandung etanol 60% atau kurang, untuk waktu yang singkat untuk memberi garam kesempatan untuk dihapus. Jika ditranfer langsung ke 95% atau etanol absolut, fosfat keungkinan besar akan mengendap di jaringan, menyebabkan kesulitan dalam membagi, seperti merobek dan mencetak. Mesin pengolah harus dibilas secara berkala dengan air untuk menghilangkan garam yang berakumulasi.

Hematoksilin Eosin (HE) berperan sebagai warna dasar pada proses pewarnaan.

***Corresponding Author:**

Jahira

email:whitejahira@gmail.com

Program Studi DIV Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang Indonesia 50273

Hasil kurang baik atau baik pada *pewarnaan hematoksilin* eosin bisa di sebabkan karena *hematoksilin* berperan sebagai pewarna dasar. Setiap komponen yang terwarnai oleh zat ini mengandung asam nukleat, seperti inti sel yang kaya kromatin, dan daerah sitoplasma yang kaya RNA. Struktur dalam jaringan tampak berwarna ungu kebiruan. Pewarnaan inti yang tidak adekuat artinya kurang adekuatnya *hematoksilin* yang mewarnai bagian inti seluler, hal ini bisa disebabkan oleh fiksasi yang tidak adekuat. Penyebab lainnya adalah proses penghilangan paraffin yang tidak sempurna, waktu pewarnaan tidak adekuat, proses penghilangan warna terlalu kuat atau berlebihan, pemotongan yang tipis dan Ph nya yang tepat. (zulham 2009)

Pewarnaan sitoplasma, pada pewarnaan ini eosin berperan sebagai pewarna asam yang mewarnai komponen jaringan yang tidak berinti sehingga berwarna merah sampai merah muda. Pada pewarnaan sitoplasma menjadi lebih pucat dan samar. Batas antara sel kabur sitoplasma yang tidak adekuat terwarnai oleh eosin bisa juga disebabkan oleh pH terlalu tinggi, dehidrasi dengan alkohol terlalu lama, pemotongan yang terlalu tipis, waktu pewarnaan yang tidak adekuat. Hal ini sesuai dengan ikatan asam basa pada pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (sutoyo, 2009)

Kesimpulan

pada fiksasi organ ginjal dan hati kelinci dengan menggunakan larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dan menggunakan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE) dengan waktu fiksasi 8, 16, dan 24 jam hasil gambar rata-rata baik yaitu warna biru terang pada inti sel, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan warna pada preparat seragam. Sehingga larutan fiksasi *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% bisa di gunakan pada fiksasi jaringan dengan waktu yang lebih singkat.

Saran

Bagi peneliti selanjutnya fiksasi organ jaringan dengan larutan fiksasi *Buffered*

Neutral Formalin (BNF) 10% tetapi waktu fiksasi lebih cepat dari 8 jam atau lebih lama dari 24 jam.

Referensi

Briigmann, A. d., Eld, M., Lelkaitis, G., Nielsen, S., Grunkin, M., Hansel, D. J., Foged, T. N., Vyberg, M. (2012). Analysis of Membrane Connectivity is a Robust Measure of HER2 Immunostains. *Breast Cancer Res Treat, Springer*, 41-49.

Brigmann (2012). *National Cancer Institute Dictionary of Cancer Terms*. Retrieved April 26, 2013, from <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=653117>

Dobson, L. d., Conway, C., Hanley, A., Johnson, A., Costello, S., O'Grady, A., Connolly, Y., Magee, H., O'Shea, D., Jeffers, M., Kay, E. (2010). Image Analysis as an Adjust to Manual HER2 Immunohistochemical Review: a Diagnostic Tool to Standardize Interpretation. *Histopathology*, 27-38.

Miranti, M. d. (2010). The Burden of Cancer in Member Countries of the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention vol. 13*, 411-420.

Pamungkas, Z. (2011). *Deteksi Dini Kanker Payudara*. Jogjakarta: Bukubiru.

*Corresponding Author:

Jahira

email:whitejahira@gmail.com

Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang Indonesia 50273

Sutoyo, T. d., dkk. (2009). *Teori Pengolahan Citra Digital*. Yogyakarta: Andi Yogyakarta dan UDINUS Semarang.

Zulham. Penuntun praktikum histoteknik Biomedik. Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara. Medan.2009;



***Corresponding Author:**

Jahira

email:whitejahira@gmail.com

Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang Indonesia 50273