

Media Medika Muda

Copyright©2005 by Medical Faculty of Diponegoro University

Nomor 4

ARTIKEL TERKINI

Januari – Juni 2010



PENGOLAHAN JARINGAN UNTUK PENELITIAN HEWAN COBA

Ika Pawitra Miranti*)

TISSUE PROCESSING FOR ANIMAL STUDY

SUMMARY

Fixation is an important step of tissue processing and be as determinant for the next step achievement of tissue processing. The investigators had to follow all of the procedures in order to object the area that will be examined. This article is hoped may be a reference of tissue processing for animal study, so the histopathology specimens available to read, as well as the pathologic changes of the treated tissue will be examined better and clearly, and may compared to control group.

Key Words: *Tissue processing, animal experimental*

RINGKASAN

Dari berbagai tahap pengolahan jaringan, fiksasi merupakan tindakan pertama dan sangat menentukan keberhasilan tahap selanjutnya dari pemrosesan jaringan. Tindakan fiksasi beserta persyaratannya harus ditaati oleh peneliti (mahasiswa) sendiri, yang paling mengetahui area dimana sel-selnya akan diamati perubahannya. Tulisan ini diharapkan dapat sebagai acuan pemrosesan jaringan pada hewan coba agar preparat mikroskopik dapat layak baca, sehingga perubahan patologik pada struktur mikroanatomi suatu jaringan akibat perlakuan yang diberikan dapat diamati dengan lebih baik dan jelas, serta dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kata Kunci: Pengolahan jaringan, hewan coba

*Pengajar Patologi Anatomi FK UNDIP/RSUP Dr. Kariadi Semarang

PENDAHULUAN

Beberapa tahun terakhir ini penelitian hewan coba banyak diminati oleh mahasiswa kedokteran dalam menyusun karya ilmiah terakhir sebagai Sarjana Strata Satu, karena tidak membutuhkan sampel yang banyak dan intervensi dapat dilakukan dan dikontrol sesuai kebutuhan. Berbagai organ hewan yang telah diberi perlakuan diamati perubahannya secara mikroskopik, yang banyak adalah hati, ginjal, limfa dan saluran cerna. Pada beberapa penelitian yang berkaitan dengan dosis obat, perubahan mikroskopik ini sekilas tampak sangat minimal dan sangat tergantung pada keberhasilan pengolahan jaringan yang diambil dari tubuh hewan coba. Untuk itu perlu dipelajari prinsip dasar teknik pengolahan jaringan agar dapat menghasilkan gambaran mikroskopik yang layak baca.

Pengolahan jaringan terdiri dari beberapa tindakan yang saling menentukan satu sama lain, dengan urutan yaitu; fiksasi, dehidrasi, penjernihan, parafinisasi, perendaman dalam parafin, pemotongan, deparafinisasi dan pewarnaan.¹⁻⁴ Masing-masing tindakan tersebut mempunyai tujuan untuk menghasilkan jaringan yang dapat dipotong setebal 2-7 mikron dan dapat diwarnai dengan pewarnaan tertentu. Jaringan tipis tersebut bisa didapat bila jaringan ditempatkan pada suatu media yang cukup padat seperti parafin, namun bisa dipotong tipis.¹

FIKSASI

Tujuan dari fiksasi adalah; 1) mencegah perubahan *post mortal* (otolisis), 2) mempertahankan morfologi sel dan jaringan agar sedapat mungkin sama dengan saat terakhir jaringan tersebut diambil dari tubuh hewan atau manusia selama hidup, dan 3) mengeraskan jaringan agar dapat diproses lanjut dengan mengubah konsistensi sel dari semi-cair menjadi semi-padat.^{1,2} Tahap pertama pengolahan jaringan ini dapat dilakukan oleh peneliti (mahasiswa) sendiri dalam ruang terminasi hewan coba. Bila akan mengamati organ hati, hindari terminasi hewan dengan eter karena gambaran mikroskopik hati akan menampilkan perlemakan yang mengacaukan gambaran sel hati sendiri. Untuk lebih mempermudah pemrosesan, maka sebaiknya

permukaan jaringan disayat, agar cairan fiksatif dapat meresap ke bagian dalam, lalu jaringan direndam sebentar dalam larutan fiksatif sampai agak mengeras. Berdasarkan pengalaman, apabila organ ginjal dan hati tidak disayat, maka akan didapatkan gambaran mikroskopik membran sel yang tidak jelas, meskipun inti dapat terlihat jelas. Gambaran mikroskopik seperti itu akan sangat penting untuk menentukan kelainan degenerasi dan nekrosis sel akibat pemberian bahan uji.

Ada contoh kasus pengamatan toksisitas ginjal yang membandingkan antar kelompok hewan coba dengan melihat perubahan epitel daerah korteks, namun permukaan ginjal tidak disayat longitudinal, sehingga pada kelompok kontrol negatif yang terlihat jelas epitelnya adalah pada tubulus daerah medula, dan gambaran epitel area korteks mengalami lisis semua, dimana seharusnya keadaan ini tidak terjadi karena tidak ada perlakuan apapun. Kesalahan ini bisa terjadi karena cairan fiksatif meresap ke dalam ginjal lewat saluran yang terputus saat pemotongan ginjal.

Jaringan harus segera difiksasi maksimal 30 menit setelah dikeluarkan dari tubuh.² Bila terjadi hambatan penghantaran ke laboratorium, jaringan disimpan dalam lemari es dalam suhu 4°C, untuk memperlambat otolisis.³ Jumlah minimal cairan fiksatif adalah 15-20 kali volume jaringan yang direndam dan lama merendam yaitu 12-24 jam, tergantung pada jenis cairan fiksatif dan ukuran jaringan.²

Hopwood (1977) yang dikutip oleh Nasar mengemukakan bahwa kesempurnaan proses fiksasi dapat dinilai dengan rumus $d = kvt$ (d adalah dalamnya zat fiksatif menembus jaringan dengan ukuran mm, k adalah konstanta zat fiksatif, untuk formalin 10% adalah 0,78, dan t yaitu waktu fiksasi dalam jam).¹

Secara umum, jaringan yang akan diolah menjadi preparat mikroskopik dipotong sebesar dadu dengan permukaan rata dan sisi berukuran maksimal 1,5 sampai dengan 2 cm.² Setelah jaringan bentuk dadu tadi dibuat, lalu direndam lagi dalam cairan fiksatif yang sekaligus berperan sebagai media pembawa jaringan untuk diproses selanjutnya di laboratorium. Tempat merendam jaringan dapat berupa wadah dengan mulut lebar dari bahan kaca atau plastik.³ Penggunaan tabung reaksi sebagai fiksasi jaringan sebaiknya dihindari, karena akan mengubah bentuk asli jaringan dan

mengurangi luas pandang pengamatan mikroskopik.

Mengingat tujuan di atas, maka perlu diperhatikan bahwa tindakan fiksasi merupakan tahap yang sangat menentukan keberhasilan indikator layak baca dari sediaan mikroskopik jaringan. Banyak cairan fiksatif yang dapat dipilih untuk mengamati perubahan sel dan matriks. Secara umum, cairan fiksatif yang banyak dipakai di laboratorium patologi anatomi adalah formalin *buffer* netral 10% (campuran dari 100 ml formalin 37-40%, akuadestilata 900 ml. NaPO₄ monobasik 4 gr dan NaPO₄ dibasil anhidrous 6,5 gr, sehingga diperoleh pH=7). Alasan pemakaian cairan fiksatif ini karena formalin *buffer* netral 10% lebih mudah dan dapat digunakan untuk menyimpan jaringan dalam waktu lama.^{1,4} Untuk kebutuhan fiksasi cepat selama 4-6 jam dapat memakai larutan formalin-alkohol-asam asetat. Sedangkan untuk menyimpan blok jaringan segar dapat memakai larutan formalin-sodium asetat.

Uraian di atas menunjukkan betapa pentingnya peran peneliti (mahasiswa) dalam menentukan daerah, ukuran dan bentuk jaringan yang akan diamati terendam dalam volume tertentu cairan fiksatif, dan menyimpan jaringan untuk pemrosesan selanjutnya yang akan ditangani oleh petugas teknisi jaringan.

DEHIDRASI

Proses dehidrasi dilakukan bila jaringan dalam cairan fiksatif telah benar-benar masak, yang ditandai dengan perubahan warna merah menjadi coklat keabuan (Gambar 1). Tujuan dari tahap ini adalah untuk menarik atau mengeluarkan air dalam jaringan dengan bahan dehidran yang umum digunakan, yaitu alkohol bertingkat 80%, 70%, 50%, 30% atau aseton. Penggunaan alkohol bertingkat dapat dilakukan secara manual maupun dengan alat *autoprocessor* untuk memindah secara otomatis ke berbagai konsentrasi alkohol. Dehidrasi kuat yang lebih cepat menarik air daripada alkohol adalah aseton yang lebih murah biayanya, dan hanya membutuhkan satu macam konsentrasi saja. Namun, aseton dapat menyebabkan jaringan menjadi mengkerut, distorsi, sangat kering dan terlalu keras sehingga menyebabkan masalah saat pemotongan setebal 2-7 mikron dengan mikrotom.^{1,4}

Cairan dehidran lain yang juga dapat digunakan adalah dioksan yang bersifat toksik dan tetrahidrofuran yang tidak biasa dipakai berbagai laboratorium.

PENJERNIHAN

Setelah dikeluarkan dari cairan dehidran, jaringan dimasukkan dalam cairan penjernih yang pada akhir proses ini dihasilkan suatu jaringan yang transparan. Reagen yang dipakai adalah xylol, toluen, benzol atau kloroform.⁴ Waktu penjernihan harus diatur dengan tepat agar jaringan tidak terlalu keras, seperti misalnya pada penggunaan xylol yang terlalu lama. Tiga jenis cairan penjernih (xylol, toluen, benzol) sangat sulit dihilangkan selama proses memasukkan parafin cair ke dalam jaringan. Kloroform merupakan bahan penjernih pilihan yang dipakai pada beberapa laboratorium tertentu, karena tidak menimbulkan masalah dalam parafinisasi, tidak membuat jaringan terlalu keras, namun jaringan yang terendam di dalamnya tidak dapat menjadi transparan.⁴

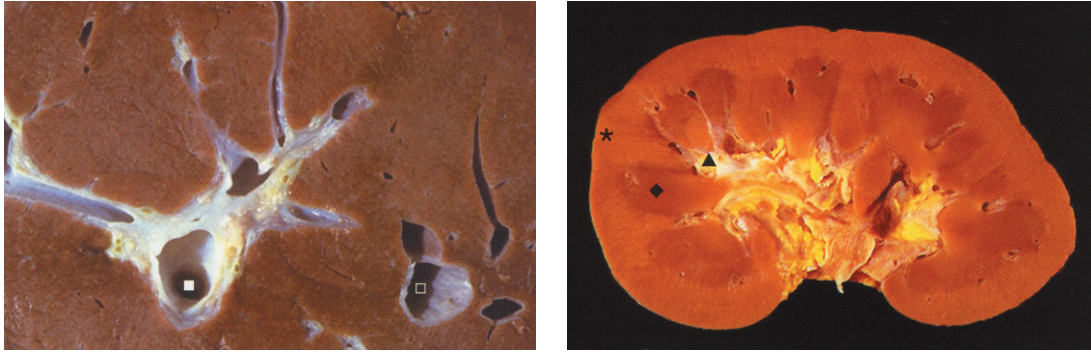
PARAFINISASI

Setelah menjadi transparan, jaringan dipindah dan dimasukkan dalam parafin cair yang akan mengadakan penetrasi jauh ke bagian dalam jaringan.⁴

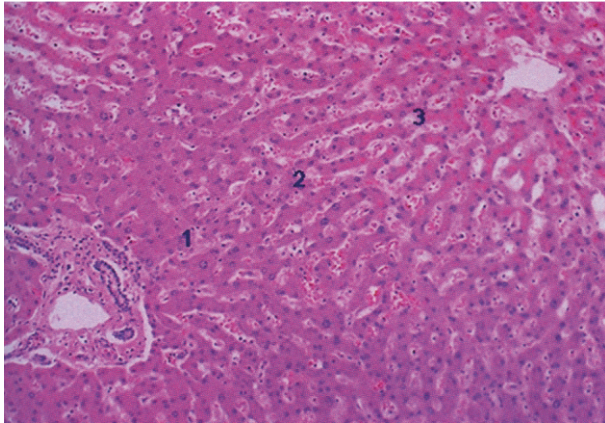
Pada umumnya, parafin yang dipakai adalah yang mencair sempurna pada suhu di bawah 60°C. Suhu tersebut harus dipertahankan agar tidak berakibat pengerutan dan pengerasan jaringan. Cairan parafin yang paling direkomendasikan adalah *paraplast*. Cairan parafin lainnya mempunyai kerugian dan mempunyai proses yang lebih rumit.

Tahapan selanjutnya dalam pemrosesan jaringan adalah menanamkan jaringan yang terisi parafin cair ke dalam cetakan yang telah dituangi parafin cair dan didiamkan sampai parafin membeku.⁴ Blok parafin yang berisi jaringan siap dipotong setebal 2-7 mikron dengan mikrotom.

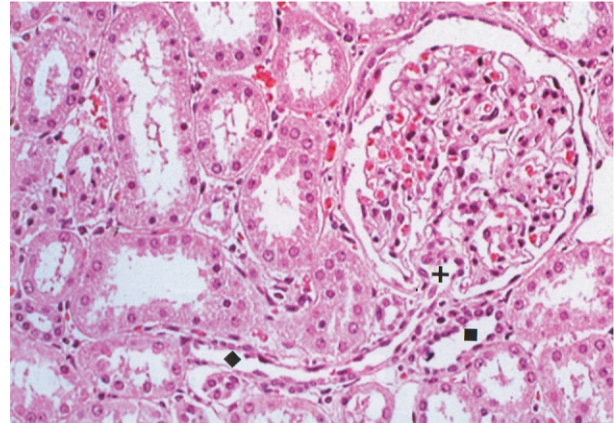
Lapisan tipis jaringan ditempelkan pada kaca obyek dan dimasukkan dalam oven untuk melelehkan parafin yang berada dalam jaringan. Pada akhirnya parafin cair yang terkandung dalam jaringan dilarutkan dalam xylol, dan selanjutnya jaringan siap diwarnai dengan Hematoksilin-Eosin



Gambar 1. Jaringan hati dan ginjal yang terfiksasi sempurna berwarna coklat



Gambar 2. Gambaran mikroskopik hati yang diproses secara benar



Gambar 3. Gambaran mikroskopik ginjal yang diproses secara benar

yang merupakan pewarnaan rutin untuk melihat gambaran mikroskopik dengan mikroskop cahaya (Gambar 2 & 3).

SIMPULAN

Pengolahan jaringan untuk penelitian hewan coba memerlukan tahapan yang runtut dan saling menentukan agar menghasilkan preparat yang baik. Setiap tahap pengolahan jaringan memiliki tujuan tertentu yang harus diperhatikan, karena berhubungan dengan proses/tahapan berikutnya. Kegagalan dalam satu tahap pengolahan jaringan, akan berefek pada proses selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. I Made Nasar. Prinsip dasar pengolahan jaringan untuk histopatologi. Kursus Imunohistokimia di Jakarta 1990.
2. Laite MB. Processing tissues in the laboratory. In: Principles of prosection, a guide for the anatomic pathologist. New York: John Willey & Sons Inc, 1980.
3. Rosai J. Gross techniques in surgical pathology. In: Rosai and Ackerman's surgical pathology. 9th ed Vol 1. London: Mosby, 2004.
4. Luna LG. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed New York: McGraw-Hill Book Co, 1968.