

PENGGUNAAN HOTPLATE SUHU 60°C SELAMA 10 MENIT SEBAGAI ALTERNATIF PEMANASAN PROSES FIKSASI SEDIAAN HISTOLOGI

Burhannudin^{1*}, Warida¹, dan Indah Puspita²

¹Prodi Diploma III Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Jakarta III

²Mahasiswa S.Tr Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes kemenkes Jakarta III

*Korespondensi penulis: mr.burhan88@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang: Proses fiksasi mendominasi keseluruhan proses pada pembuatan sediaan histologi. Waktu fiksasi telah berhasil diperpendek menggunakan bantuan pemanasan *microwave* pada suhu 60°C menjadi 2 – 10 menit. Namun, pemanfaatan *hotplate* masih terbatas dalam penggunaannya sehingga penelitian difokuskan untuk mengetahui waktu optimal penggunaan *hotplate* suhu 60°C pada proses fiksasi.

Metode: Penelitian dilakukan secara eksperimental murni dengan *post-test only control group design* menggunakan masing-masing 20 sediaan histologi dari 2 kelompok kontrol, konvensional (K) dan *microwave* (M), serta 3 kelompok perlakuan *hotplate* 60°C selama 3 menit (W1), 5 menit (W2) dan 10 menit (W3). Hasil sediaan dinilai secara mikroskopis berdasarkan hasil pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) dan skoring hasil pewarnaan HE yang mengacu pada penelitian sebelumnya. Hasil skoring diuji menggunakan tes *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney* dengan nilai $p < 0,05$ dinyatakan signifikan.

Hasil: Hasil mikroskopik sediaan menunjukkan warna HE yang gelap pada kelompok W2 dan W3. Namun, kelompok W1 menunjukkan hasil yang sama ($p > 0,05$) sedangkan kelompok W2 dan W3 menunjukkan hasil yang berbeda ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok K.

Kesimpulan: Penggunaan *hotplate* suhu 60°C selama 10 menit terbukti mampu menjadi alternatif pemanasan untuk mempercepat proses fiksasi dengan tetap mempertahankan kualitas hasil pewarnaan HE sediaan histologi. Namun, penggunaan suhu lain dan penggunaan alternatif pemanasan oven perlu dilakukan telusur lebih lanjut.

Kata kunci: fiksasi, histologi, *hotplate*, suhu, waktu

AN ALTERNATIVE TO FIXATING HISTOLOGY SPECIMENS BY USING HOTPLATE AT 60°C FOR 10 MINUTES

ABSTRACT

Background: The fixation process in histological preparation has been shortened by using microwave heating at 60°C for 2-10 minutes while maintaining the quality. However, the use of hotplates in this process is still limited. The study aims to determine the optimal duration of hotplate heating at 60°C for fixation.

Method: An experimental study was conducted using a post-test-only control group design. The study includes 20 histological specimens from two control groups (conventional and microwave) and three treatment groups with hotplate heating durations of 3 minutes (W1), 5 minutes (W2) and 10 minutes (W3). Histological slides were evaluated based on staining results and scored using a scoring system (0-3). The scoring was tested using the *Kruskal-Wallis* and *Mann-Whitney* tests, with a significance level of $p < 0.05$.

Result: microscopic evaluation of the specimens revealed dark staining with Haematoxylin and Eosin in the W2 and W3 groups. However, the W1 group showed similar results ($p > 0.05$) compared to the control group, while the W2 and W3 groups indicated significantly different results ($p < 0.05$) compared to the control group.

Conclusion: using a hotplate at 60°C for 10 minutes effectively accelerated the fixation process without compromising the quality of Haematoxylin and Eosin staining in histological specimens.

Keywords: fixation, histology, hotplate, heating, time

PENDAHULUAN

Penggunaan sediaan histologi masih menjadi standar penentuan prognosis dan terapi pada pasien kanker. Sediaan yang baik harus mampu menggambarkan kondisi jaringan yang serupa dengan kondisi pada waktu masih hidup. Namun, pembuatan sediaan histologi memerlukan waktu yang lama karena melalui berbagai tahapan dalam prosesnya (1) (2) (3). Bahkan, beberapa Rumah Sakit menyatakan bahwa hasil pemeriksaan patologi anatomi menggunakan sediaan histologi memerlukan 1 – 2 minggu untuk dapat diinformasikan kepada pasien (4) (5) (6).

Fiksasi merupakan satu dari sekian tahapan yang harus dilakukan dalam pengerjaan pembuatan sediaan histologi. Fiksasi memegang peranan penting karena merupakan tahapan pertama dalam pembuatan sediaan histologi, mencegah lisis jaringan dan menentukan keberhasilan tahapan-tahapan selanjutnya. Selain itu, fiksasi juga menggunakan alokasi waktu terbesar dalam pengerjaan hingga memakan 24 jam (3) (7) sehingga upaya untuk memangkas waktu fiksasi menjadi penting.

Proses fiksasi dipengaruhi oleh penggunaan suhu dan waktu tertentu. Penggunaan *microwave* pada suhu 60 °C selama 1 – 10 menit untuk membantu proses fiksasi telah terbukti dapat mempersingkat alokasi waktu fiksasi dan tetap menghasilkan kualitas hasil pewarnaan sediaan yang baik (8) (9). Namun, penggunaan *hotplate* belum pernah dilakukan sebelumnya padahal keberadaan *hotplate* melimpah di hampir semua laboratorium. Selain itu, permukaan *hotplate* yang datar mempermudah jalannya proses fiksasi dan pengadukan (7) (10). Penggunaan *hotplate* sebagai alternatif pengganti *microwave* perlu dilakukan dalam

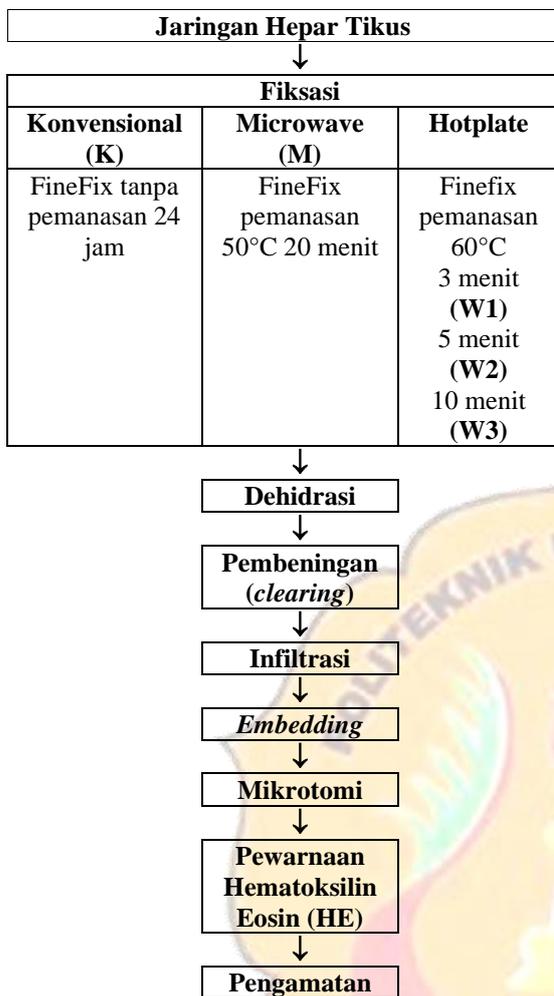
membantu proses fiksasi untuk menguji kualitas hasil sediaan histologi yang dihasilkan sehingga pemrosesan sediaan histologi mampu dilakukan pada laboratorium dengan pengaturan yang lebih sederhana namun menghasilkan kualitas yang baik dan cepat.

METODE

Penelitian ini merupakan studi ekperimental murni dengan menggunakan *post-test only control group design*. Penelitian dilakukan pada lima kelompok perlakuan yang terdiri atas dua kelompok kontrol, konvensional (K) dan *microwave* (M), serta tiga kelompok perlakuan *hotplate* dengan variasi suhu berbeda, selama 3 menit (W1), 5 menit (W2) dan 10 menit (W3). Setiap kelompok terdiri atas 20 sediaan histologi dari hepar satu ekor Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dengan bobot 200 gram dan berumur 10 – 12 minggu. Tikus Wistar didapatkan dari iRatco, Bogor dan sudah dipastikan galur murninya.

Tikus dieuthanasia dan dilakukan pembedahan untuk mendapatkan hepar. Hepar yang didapatkan direndam ke dalam larutan fiksasi FineFix yang dinilai aman untuk dipanaskan sesuai dengan kelompok perlakuan dan kontrolnya masing-masing. Proses dilanjutkan dengan pematangan jaringan dengan merendam hepar ke dalam larutan dehidrasi diikuti dengan proses penjernihan menggunakan xylol, infiltrasi dan *embedding* parafin, pemotongan tipis menggunakan mikrotom dan diakhiri dengan pewarnaan rutin Hematoksin Eosin (HE) sesuai dengan penelitian sebelumnya (11) (12). Seluruh tahapan dan proses penelitian yang dilakukan sudah mendapatkan surat persetujuan etik dari komite etik penelitian kesehatan (non kedokteran) Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka no.

03/23.05/02516. Skematis jalannya penelitian ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Skematis jalannya penelitian.

Jaringan hepar tikus yang didapatkan direndam ke dalam larutan fiksasi sesuai dengan kelompoknya. Proses dilanjutkan dengan merendam ke dalam alcohol bertingkat 70%-96%-absolut (dehidrasi), xylol (pembeningan), infiltrasi dan embedding parafin, dilakukan pemotongan tipis menggunakan mikrotom (mikrotomi), pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) dan diakhiri dengan pengamatan mikroskopis terhadap hasil pewarnaan HE.

Hasil pewarnaan HE dinilai oleh empat orang *blinded observers* dengan sistem skoring berdasarkan penelitian sebelumnya (12). Untuk mengetahui hasil keseragaman dari keempat *observers*, tes *Kappa* dilakukan dari hasil pembacaan skoring *observers* dengan nilai dinyatakan baik jika

mendekati 0,8. Hasil skoring disajikan dalam tabel dilengkapi dengan gambar hasil pewarnaan HE dan diuji dengan tes *Kruskall-Wallis* dilanjutkan dengan tes *Mann-Whitney* karena data tidak normal. Nilai uji dinyatakan signifikan jika nilai $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fiksasi sangat mempengaruhi kualitas hasil pewarnaan sediaan histologi. Fiksasi harus dilakukan secara tepat karena fiksasi yang belum sempurna (*under fixation*) dan fiksasi yang berlebihan (*over fixation*) dapat merusak sediaan histologi yang dibuat (13). Lamanya proses fiksasi telah berhasil dipersingkat dengan penggunaan *microwave* dan penelitian terbaru difokuskan untuk menggunakan alternatif *hotplate*.

Sebanyak 100 sediaan histologi yang dibagi rata ke dalam lima kelompok digunakan dalam penelitian untuk mengamati kualitas hasil perlakuan berdasarkan perbedaan perlakuan setiap kelompok, kontrol (konvensional dan *microwave*) dan pemanasan menggunakan *hotplate* suhu 60°C selama 3 menit (W1), 5 menit (W2) dan 10 menit (W3). Hasil data pengamatan menunjukkan adanya perbedaan kualitas hasil sediaan berdasarkan hasil pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Hasil pewarnaan HE hepar secara mikroskopi setiap kelompok perlakuan dapat diamati pada gambar 2.

Hasil pewarnaan HE menunjukkan bahwa kelompok W3 memberikan skor 3 sedangkan kelompok yang lain memiliki skor 2. Untuk mengetahui perbandingan hasil setiap perlakuan, tes *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney* dilakukan dari hasil skoring yang diberikan pada setiap sediaan. Hasil analisis statistik secara singkat ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis skor pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) setiap kelompok perlakuan

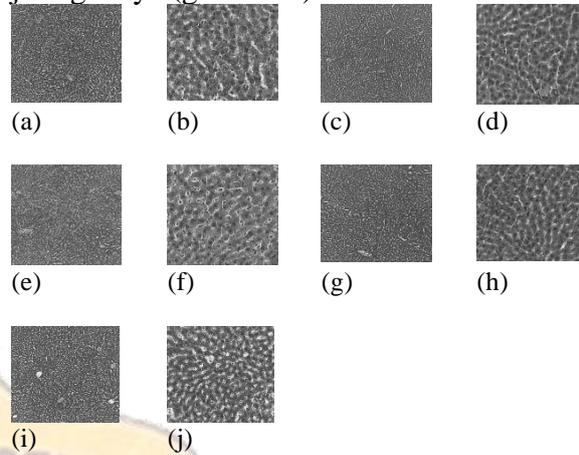
Kelompok	n	Median (nilai batas bawah-batas atas)	p
Kontrol konvensional (K)	20	2 (1,5 – 2,2) ^{a,b}	p<0,05
Kontrol Microwave (M)	20	2 (2 – 2,5)	
Hotplate 60°C 3 menit (W1)	20	2 (2 – 2,5)	
Hotplate 60°C 5 menit (W2)	20	2 (2,1 – 2,8) ^a	
Hotplate 60°C 10 menit (W3)	20	3 (2,3 – 2,7) ^b	

*a,b menyatakan adanya perbedaan signifikan antara 2 kelompok yang berbeda

Fiksasi menggunakan metode pemanasan sudah banyak dijadikan alternatif untuk memperpendek waktu fiksasi (8) (9). Penelitian terbaru juga menunjukkan hasil serupa. Hasil pemanasan 3 menit telah menghasilkan kualitas sediaan yang menyerupai metode konvensional. Bahkan, pemanasan yang lebih lama (10 menit) memiliki skor yang mendekati 3 (tabel 1).

Proses pemanasan dalam tahap fiksasi dapat membantu penetrasi larutan jaringan lebih cepat ke dalam jaringan (14). Pemanasan mampu menurunkan viskositas larutan sehingga meningkatkan permeabilitas membrane sel. Selain itu, jaringan lemak yang umumnya mengganggu dan menghasilkan artefak pada hasil pewarnaan dapat diminimalisir dengan penggunaan pemanasan (3) (9). Hal ini yang memungkinkan kualitas hasil pemanasan setara dengan penggunaan metode konvensional bahkan menghasilkan skor yang lebih bagus pada perlakuan pemanasan yang lama (gambar 2 dan tabel 1). Namun demikian, penggunaan pemanasan yang berkepanjangan perlu dipantau karena pemanasan memungkinkan adanya fenomena denaturasi protein pada jaringan yang memungkinkan rusaknya

jaringan sebelum sempat terfiksasi secara sempurna (3) (15). Hal ini dapat teramati pada kelompok W3 yang mengalami perlubangan pada jaringannya (gambar 2).



Gambar 2. Perbandingan hasil pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) hepar tikus secara mikroskopi.

a) kelompok *hotplate* 60°C 3 menit (W1) dengan perbesaran 10X dan b) perbesaran 40X. c) kelompok *hotplate* 60°C 5 menit (W2) perbesaran 10X dan d) perbesaran 40X. e) kelompok *hotplate* 60°C 10 menit (W3) perbesaran 10X dan f) perbesaran 40X. g) kelompok kontrol konvensional (K) perbesaran 10X dan h) perbesaran 40X. i) kelompok kontrol *microwave* perbesaran 10X dan h) perbesaran 40X. kelompok W1 memiliki gambaran inti sel yang gelap, sitoplasma pekat, warna preparat kurang seragam (skor 2). Kelompok W2, K dan M memiliki gambaran yang menyerupai kelompok W1. Di lain pihak, kelompok W3 memiliki gambaran skor sempurna dengan inti sel berwarna ungu, sitoplasma merah, kromatin jelas dan warna preparat terlihat seragam (skor 3). Pengukuran skor didasarkan pada penelitian sebelumnya (12).

Meskipun penggunaan *hotplate* telah membuktikan dapat mempercepat waktu fiksasi, suhu pemanasan menggunakan *hotplate* sangat dipengaruhi oleh suhu lingkungan. Pemantauan suhu secara kontinyu harus selalu dilakukan dengan menggunakan thermometer untuk mengetahui dan mengkondisikan suhu agar stabil (16). Selain itu, penggunaan proses pengadukan sangat memegang peranan penting untuk menyebarkan panas

hotplate ke seluruh larutan fiksasi yang digunakan.

KESIMPULAN

Penggunaan *hotplate* suhu 60°C selama 10 menit dapat menjadi alternatif pemanasan untuk membantu proses fiksasi dalam menghasilkan sediaan histologi hepar tikus yang baik. Namun, penggunaan *hotplate* harus disertai dengan pengawasan yang lebih ketat karena kecenderungan suhu *hotplate* yang berubah-ubah karena terpengaruh oleh suhu lingkungannya. Penggunaan suhu lain atau alat pemanasan lain seperti oven mungkin dapat digunakan untuk mencari alternatif pemanasan lain yang dapat diaplikasikan dalam membantu proses fiksasi dengan tetap memperhatikan luaran hasil sediaan histologi yang tetap baik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Michael Alfian Grey, PLP Laboratorium Sitohistoteknologi, Poltekkes Kemenkes Jakarta III yang telah membantu mempersiapkan peralatan yang dibutuhkan selama penelitian. Selain itu, penelitian juga didanai oleh dana DIPA Poltekkes Kemenkes Jakarta III Tahun 2023.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mescher, A. L. and Janqueira, L. C. U. 2013. *Janqueira's Basic Histology: Text and Atlas (13th Ed.)*. s.l. : McGraw-Hill Education.
2. Koesoemah, H. A. and Dwiastuti, S. A. P. 2017. *Histologi dan Anatomi Fisiologi Manusia*. s.l. : <http://bppsdmk.kemkes.go.id>.
3. Suvarna, K., Layton, C. and Bancroft, J. D. 2019. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (8th ed.)*. s.l. : ELSEVIER.
4. RSAP. 2018. *Standar Pelayanan Instalasi Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Anutapura Palu*. Kota Palu : RSAP.
5. Muntilan, RSUD. 2018. *Standar Pelayanan Publik pada Rumah Sakit Umum Daerah Muntilan, Standar Pelayanan Instalasi Laboratorium Patologi Anatomi*. Muntilan, Magelang : RSUD Muntilan.
6. Kartini, RSUD RA. 2019. *Standar Pelayanan Laboratorium Patologi Anatomi RSUD RA Kartini Kabupaten Jepara*. Jepara : RSUD RA Kartini.
7. Khristian, E. and Inderiati, D. 2017. *Sitohistoteknologi*. Jakarta : BPPSDM Kesehatan, Kementerian Kesehatan.
8. Tripathi, M., et al. 2013. *Comparison of Routine Fixation of Tissue with Rapid Tissue Fixation*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7. 2768-2773.
9. Adam, M., et al. 2022. *Evaluation of The Effect of Time of Fixation and Microwave Treatment on Quality of Fatty Tissue Fixation in Breast Cancer Specimens*. *SPR*, 2. 402-408.
10. Torlakovic, E. E., et al. 2015. *ICSH Guidelines for The Standarization of Bone Marrow Immunohistochemistry*. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37. 431-449.
11. Burhannudin, et al. 2018. *Chemopreventive Effects of Edible Canna (*Canna edulis* Kerr.) Against Colorectal Carcinogenesis: Effects on Expression of Adenomatous Polyposis Coli and Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat Inflammatory Model*. *Asian*

- Pacific Journal of Cancer Prevention, 19. 839-844.
12. Ariyadi, T. and Suryono, H. 2017. *Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode Microwave dan Conventional Histoprocessing Pewarnaan Hematoxylin Eosin*. Jurnal Labora Medika, 1. 7-11.
 13. Dey, P. 2018. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Singapore : Springer.
 14. Rao, M., et al. 2020. *Microwave-assisted Tissue Processing, Fixation and Staining in Tissue of Different Thicknesses: A Comparative Study*. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 24. 186.
 15. Rastogi, V., et al. 2013. *Artefacts: A Diagnostic Dillema - A Review*. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 7. 2408-2413.
 16. Alfita, R., et al. 2021. *Hotplate Magnetic Stirrer Pengatur Panas Automatis dan Kecepatan Air Berbasis PID (Proportion Integral Derivative)*. Sidoarjo : Universitas Muhammadiyah Sidoarjo.

