

Verifikasi Metode : Analisa Pewarnaan Umum Histopatologi Hematoxylin dan Eosin Modifikasi untuk Negri Bodies Rabies

Wahyuni¹,Fitria Idris¹, M. Gustav Satriadistfa Septiadi¹, Pitriani², Cristian Sutanto H.²

¹ Medik Veteriner .² Paramedik Veteriner Balai Besar Veteriner Maros
yunihadipurnama@gmail.com

Abstrak

Verifikasi dilakukan terhadap suatu metode baku sebelum diterapkan di laboratorium. Verifikasi sebuah metode bermaksud untuk membuktikan bahwa laboratorium yang bersangkutan mampu melakukan pengujian dengan metode tersebut dengan hasil yang valid. Deteksi penyakit rabies secara histopatologi adalah dengan di temukan positif negri bodies pada sel saraf otak. Pewarnaan umum histopatologi yang sering digunakan adalah hematoxylin dan eosin. Tujuan dari penulisan ini adalah untuk mengetahui hasil perkembangan metode pewarnaan hematoxylin dan eosin dengan modifikasi penambahan zat warna pada prosedur kerjanya. Hasil pengujian di analisa bahwa modifikasi yang di lakukan tetap memberikan hasil yang sama dengan pewarnaan umumnya tetapi juga memberikan hasil warna yang lebih bagus sehingga lebih memudahkan dalam melakukan analisa histopatologi.

Kata kunci : metode baku, zat warna, *negri bodies*

Abstract

Verification is carried out against a standard method before it is applied in the laboratory. The verification of a method is intended to prove the laboratory can use the method for valid results. The histopathological detection of rabies is finding positive negri bodies in the nerve cells of the brain. Common histopathological stains used are hematoxylin and eosin. The purpose of this paper is to determine the results of the development of the method of hematoxylin and eosin staining with the addition stain modification in the work procedure. The test results were analyzed that the modifications carried out still gave the same results as the general coloring but also gave better color results so that it was easier to carry out histopathological analysis.

Keyword : standard methods, stains , *negri bodies*

Pendahuluan

Pewarnaan histologi adalah sebuah teknik yang digunakan untuk memberikan warna pada organel sel sehingga lebih mudah diamati di bawah mikroskop. Tujuan pewarnaan supaya unsur-unsur jaringan tampak jelas dan dapat dibedakan bagian-bagiannya di bawah mikroskop.

Verifikasi metode adalah suatu tindakan validasi metode tetapi hanya pada beberapa karakteristik performa saja. Laboratorium harus menentukan karakteristik performa yang dibutuhkan. Spesifikasi analisis dapat menjadi acuan untuk merancang proses verifikasi. Rancangan yang baik akan menghasilkan informasi yang dibutuhkan serta meminimalisir tenaga, waktu dan biaya. Pemilihan parameter validasi atau verifikasi tergantung pada beberapa faktor aplikasi, sampel uji, tujuan metode, dan peraturan lokal atau internasional.

Rabies merupakan penyakit yang dapat menular dari hewan pembawa rabies (HPR) ke manusia melalui gigitan atau luka terbuka. Rabies disebabkan oleh Lyssa virus dan famili *Rhabdoviridae* yang dapat menimbulkan gejala klinis berupa hipersalivasi, hidrofobia, dan hampir selalu diakhiri dengan kematian (*case fatality rate* 100%).

Kasus gigitan hewan pembawa rabies di Indonesia (GHPR) pada tahun 2016 adalah sebanyak 64.774 kasus. Di Indonesia sebanyak 86 orang meninggal karena rabies pada tahun yang sama. Saat ini, terdapat sembilan provinsi di Indonesia yang dinyatakan sebagai daerah bebas rabies, sedangkan sebanyak 24 provinsi lainnya masih endemis. (Info datin 2017).

Penyakit rabies saat ini masih terjadi di 2/3 belahan dunia dan berdasarkan laporan WHO pada tahun 2017, setiap 10 menit terjadi kasus kematian akibat gigitan anjing gila di daerah endemis (Kementan 2019). Penyakit ini termasuk dalam Penyakit hewan menular strategis yang telah ditetapkan pemerintah pada Permentan Nomor 4026/Kpts./OT.140/3/2013 karena menyebabkan dampak sosial yang besar. Sampai sekarang belum ada obat yang efektif untuk pengobatan penyakit rabies.

Diagnosa rabies pada hewan pembawa rabies (HPR) dilakukan di laboratorium pengujian penyakit hewan rujukan pemerintah. Laboratorium Balai Besar Veteriner Maros (BBVet Maros) merupakan salah satu laboratorium rujukan pengujian penyakit hewan di Indonesia Timur. Diagnosa rabies di BBVet Maros dilakukan berdasarkan hasil uji Fluorescent

Antibody Technique (FAT) sebagai *gold standard* menurut WHO dan OIE. Uji Seller's dan diagnosa histopatologi juga dilakukan sebagai uji penunjang.

Pemeriksaan histopatologis merupakan pemeriksaan berdasarkan perubahan morfologi jaringan atau sel terinfeksi agen penyakit. Perubahan morfologi jaringan atau sel dapat diamati setelah pewarnaan Hematoxylin dan Eosin dari preparat jaringan terinfeksi. Pada preparat histopatologi, keberadaan Negri bodies merupakan ciri khas infeksi rabies, sehingga tampilan Negri bodies memegang peranan penting dalam diagnosa rabies secara histopatologi.

Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Untuk mengetahui perbandingan hasil modifikasi pewarnaan Hematoxylin dan Eosin Luna et al. (1968) terhadap literatur;
2. Untuk mengetahui hasil pewarnaan histopatologi Hematoxylin dan Eosin modifikasi terhadap keberadaan Negri bodies suspect rabies.

Materi dan Metoda

Sebanyak 18 organ otak dari 18 ekor anjing yang telah dinekropsi diproses untuk pembuatan preparat histopatologi hingga tahapan cutting dengan ketebalan jaringan 5 µm. Cutting dilakukan sebanyak dua kali untuk setiap spesimen sehingga dihasilkan 36 preparat. Preparat kemudian diwarnai dengan dua metode yang berbeda sehingga dihasilkan 18 preparat histopatologi dari pewarnaan Luna et al (1968) dan 18 preparat histopatologi dari pewarnaan Luna et al. (1968) yang telah dimodifikasi.

Bahan yang digunakan pada tahapan pewarnaan adalah Xylol, etanol 100%, etanol 95%, Mayer's hematoxylin, air, clarifier 2, bluing reagent. Alat yang digunakan pada tahapan pewarnaan adalah slide stainer Gemini AS produksi Thermo Fisher Scientific Inc.

Hasil Pengujian

a. Waktu dan Tahapan Pewarnaan

Pewarnaan H&E Luna et al (1968) dan pewarnaan yang telah dimodifikasi dilakukan dengan reagen dan waktu yang ditampilkan pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1 Tahapan dan waktu pewarnaan preparat dengan metode Luna et al (1968)

Reagen	Waktu
Xylol I	5 menit
Xylol II	5 menit
Xylol III	5 menit
Etanol 100% I	2 menit
Etanol 100% II	2 menit
Etanol 95% I	2 menit
Mayer's Haematoxylin	4 menit
Air mengalir	20 menit
Eosin	11 menit
Etanol 100% III	1 menit
Etanol 100% IV	1 menit
Etanol 100% V	1 menit
Xylol III	5 menit
Xylol IV	5 menit
Xylol V	5 menit
Total waktu	74 menit, 30 detik

Tabel 2 Tahapan dan waktu pewarnaan preparat dengan metode Luna et al (1968) yang telah dimodifikasi

Reagen	Waktu
Xylol I	5 menit
Xylol II	5 menit
Xylol III	5 menit
Etanol 100% I	2 menit
Etanol 100% II	2 menit
Etanol 95% I	2 menit
Mayers Haematoxylin	4 menit
Air mengalir	20 menit
Clarifier 2	30 detik
Air mengalir	1 menit
Bluing reagent	1 menit
Eosin	11 menit
Etanol 100% III	1 menit
Etanol 100% IV	1 menit
Etanol 100% V	1 menit
Xylol III	5 menit
Xylol IV	5 menit
Xylol V	5 menit
Total waktu	76 menit, 30 detik

Kedua metode tersebut menunjukkan waktu pewarnaan yang tidak signifikan, yaitu 74 menit, 30 detik pada pewarnaan Luna et al (1968) dan 76 menit, 30 detik menit pada metode Luna et al yang telah dimodifikasi.

b. Pengamatan histopatologi

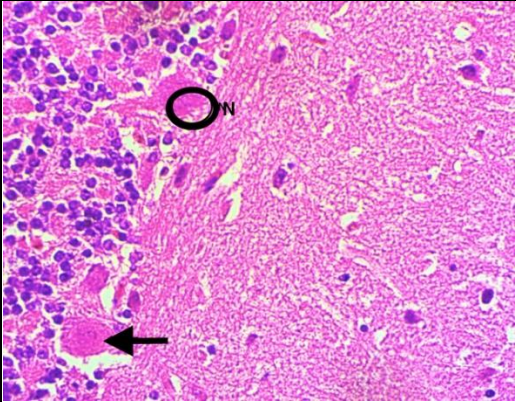
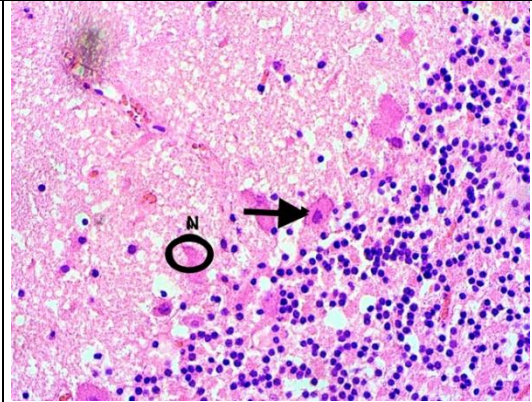
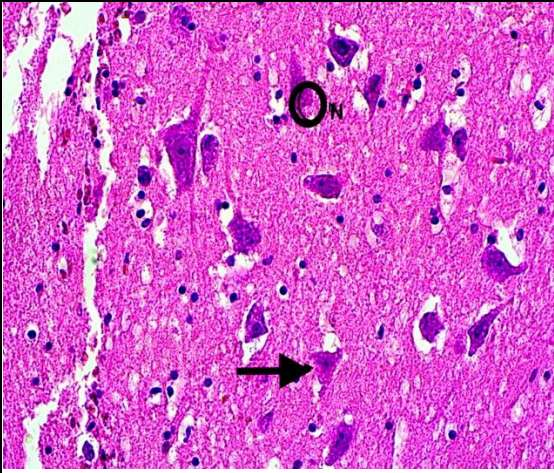
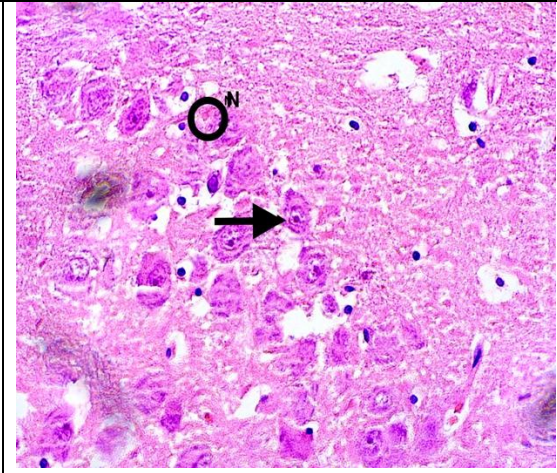
Pewarnaan hematoksilin eosin dilakukan terhadap 36 preparat dengan masing-masing pewarnaan sebanyak 18 preparat. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran objektif 10-40 kali. Pengamatan hasil pewarnaan meliputi hal seperti berikut

Tabel 3. skor hasil pewarnaan HE

No	Deskripsi	Kualitas	
		Skala ordinal	Skala interval
1	Warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas serta warna pada prepaat tidak seragam. Sediaan tidak didiagnosis	Tidak baik	1
2	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	Kurang baik	2
3	Warna biru pada inti sel, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat serta warna pada preparat seragam. Sangat mudah di diagnosis	Baik	3

Tabel 4 Perbandingan hasil pengamatan H&E dengan yang telah dimodifikasi

Parameter	H&E	modifikasi
Warna inti sel	merah (18/18)	biru (18/18)
Warna sitoplasma	merah (18/18)	merah muda (18/18)
Keseragaman warna	kurang (10/18)	seragam (18/18)
Latar belakang (background)	Merah muda (10/18)	Merah muda (18/18)
warna negri bodies	Merah dengan batas jelas (8/18)	Merah dengan batas jelas (18/18)

Pewarnaan H&E	Pewarnaan H&E modifikasi
	
<p>Gambar 1. Otak kecil : sel saraf warna sitoplasma tidak berbeda dengan background. Inti sel warna merah (panah). Negri bodies tidak nampak jelas (lingkaran)</p>	<p>Gambar 2. Otak kecil :sel saraf warna sitoplasma dapat dibedaka dengan background. Inti sel jelas warna biru (panah). Negri bodies tampak jelas (lingkaran)</p>
	
<p>Gambar 3. Hipocampus : sel saraf warna merah dengan inti sel tidak terlihat jelas (panah). Negri bodies tidak nampak jelas (lingkaran).</p>	<p>Gambar 4. Hipocampus : sel saraf berwarna merah muda dengan inti sel berwarna biru (panah). Negri bodies terlihat jelas (lingkaran).</p>

Pembahasan

Pewarna hematoxylin dan eosin merupakan salah satu dari pewarna yang digunakan paling umum dalam histologi. Ini adalah pewarna permanen yang berlawanan dengan pewarna sesaat (larutan iodium dalam KI). Saat ini hematoxylin yang dijual sudah dicampur dengan eosin untuk mempermudah pewarnaan. Pada awalnya hematoxylin memberikan warna merah

baik pada sel maupun jaringan, untuk melihatnya disarankan untuk menggunakan etanol 95% yang memiliki pH normal, agar jaringan dapat dilihat dengan mikroskop. Eosin adalah pewarnaan asam yang memiliki afinitas terhadap sitoplasma sel sedangkan pada hematoxylin memiliki afinitas terhadap nukleus. Eosin penggunaannya lebih aman dibandingkan dengan hematoxylin. Hematoxylin memberikan warna biru (basofilik) pada inti sel, serta eosin yang berfungsi untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma sel dan jaringan penyambung.

Pewarnaan H&E tanpa modifikasi menunjukkan warna eosinofilik yang kuat pada background, sitoplasma maupun Negri bodies sehingga warna merah yang dihasilkan tidak berbeda. Hal ini cukup menyulitkan diagnosis untuk mengidentifikasi keberadaan Negri bodies yang berwarna merah yang terletak dengan latar belakang sitoplasma yang juga berwarna merah (Gambar 1). Pewarnaan modifikasi menunjukkan warna eosinofilik lemah (merah muda) pada sitoplasma dan warna eosinofilik kuat (merah) pada Negri bodies. Hal ini memudahkan diagnosis untuk mengidentifikasi Negri bodies karena warnanya yang sangat kontras dengan warna latar belakang atau sitoplasmanya.

Perbedaan reagen terletak pada penambahan reagen Clarifier 2 dan Bluing reagent pada modifikasi pewarnaan H & E. Reagen Clarifier 2 merupakan reagen yang didesain untuk mengeliminasi pewarnaan latar belakang yang disebabkan kelebihan bahan adhesif pada *water bath* seperti gelatin. Clarifier 2 secara selektif membuang pewarnaan hematoxylin yang bersifat progresif dari kelebihan bahan adhesif tanpa mempengaruhi pewarnaan nuklear. *Bluing reagent* digunakan untuk menambah warna inti setelah pewarnaan hematoxylin. *Bluing reagent* memastikan alkalinitas yang tepat (pH 8). *Bluing reagent* akan mencegah pergeseran pH yang dapat berimbas pada cacat detail pada inti. Reagen ini bekerja dengan cara mengubah warna kromatin dari biru kemerahan menjadi biru ungu. Reaksi ini bergantung pada pH dan kemungkinan besar merupakan hasil dari kelasi (Thermo Fisher Scientific Inc. 2005).

Kesimpulan

Pewarnaan H&E modifikasi memberikan hasil pengamatan mikroskopis yang lebih baik dari yang tanpa modifikasi baik dari pewarnaan sel, inti sel dan latar belakang (background). Khusus untuk diagnosa penyakit rabies pewarnaan H&E modifikasi memberikan hasil yang lebih jelas dalam menemukan negri bodies dengan batas sel negri bodies yang jelas.

Saran

Pewarnaan H&E modifikasi dapat digunakan sebagai pewarnaan umum patologi untuk diagnosa histopatologi dan dapat diajukan sebagai akreditasi pewarnaan negri bodies diagnosa rabies.

Daftar Pustaka

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2011. Rabies Histologic examination (Internet) <https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/histologic.html> (Diakses pada 11 Juni 2020)
- Cindy Sampias, Geoffrey Rolls. 2020. H&E Staining Overview : A Guide to Best Practise. Leica.
- [Infodatin] Pusat data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. 2017. Situasi rabies di Indonesia (Internet) <https://pusdatin.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/infodatin-rabies-2017.pdf> (Diakses pada 11 Juni 2020)
- Kementan. 2019. Tahun 2019, Kementan tingkatkan prioritas Bali bebas rabies (Internet) <https://ditjennak.pertanian.go.id/tahun-2019-kementan-tingkatkan-prioritas-bali-bebas-rabies> (Diakses pada 11 Juni 2020)
- Luna LG. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology 3rd Edition*. American Registry of Pathology. McGraw-Hill Book Company. New York (US).
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2005. Thermo Scientific Richard-Allan scientific histology and cytology standard stains instruction for use. Michigan (US).