



SKRIPSI

**PENGARUH KOMBINASI
ASAM NITRAT 10% DENGAN EDTA
PADA PROSES DEKALSIFIKASI TULANG KEPALA
TERHADAP KUALITAS SEDIAAN
HEMATOKSILIN-EOSIN (HE)**

Disusun oleh:

DIYAN HARISNA

NIM: P3.73.34.2.23.183

**PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN
JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES JAKARTA III**

2024

Visi

Menjadi Institusi Pendidikan Tinggi Berbasis IPTEK Kesehatan yang Menghasilkan
Lulusan Berbudaya Saing Global Pada Tahun 2039



SKRIPSI

PENGARUH KOMBINASI ASAM NITRAT 10% DENGAN EDTA PADA PROSES DEKALSIFIKASI TULANG KEPALA TERHADAP KUALITAS SEDIAAN HEMATOKSILIN-EOSIN (HE)

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat
Meraih Gelar Sarjana Terapan Kesehatan**

Disusun oleh:

DIYAN HARISNA

NIM: P3.73.34.2.23.183

**PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN
JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES JAKARTA III**

2024

ii

Poltekkes Kemenkes Jakarta III

HALAMAN PERSETUJUAN

SKRIPSI

**PENGARUH KOMBINASI
ASAM NITRAT 10% DENGAN EDTA
PADA PROSES DEKALSIFIKASI TULANG KEPALA
TERHADAP KUALITAS SEDIAAN
HEMATOKSILIN-EOSIN (HE)**

Skripsi Ini Telah Disetujui oleh Pembimbing Skripsi
dan Layak Diuji di Hadapan Tim Penguji Skripsi
Program Studi Sarjana Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis

Oleh:

Diyana Harisna

NIM: P3.73.34.2.23.183

Menyetujui,

Bekasi, 19 Juni 2024

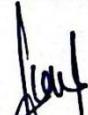
Pembimbing I



(Burhannudin, M.Sc)

NIP. 198810082020121002

Pembimbing II

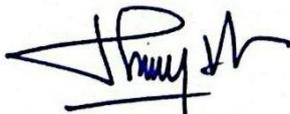


(dr. Hastrina Mailani, Sp. P.A)

NIP. 198605282012122001

Mengetahui

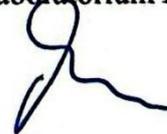
**Ketua Jurusan
Teknologi Laboratorium Medis**



(Dra. Mega Mirawati, M. Biomed)

NIP. 196703111998032001

**Ketua Program Studi Sarjana Terapan
Teknologi Laboratorium Medis**



(Dewi Astuti, S.Si, M. Biomed)

NIP. 198312172006042001

HALAMAN PENGESAHAN

SKRIPSI

**PENGARUH KOMBINASI
ASAM NITRAT 10% DENGAN EDTA
PADA PROSES DEKALSIFIKASI TULANG KEPALA
TERHADAP KUALITAS SEDIAAN
HEMATOKSILIN-EOSIN (HE)**

Skripsi Ini Telah Diperiksa dan Disetujui oleh Tim Penguji Skripsi
Program Studi Sarjana Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis

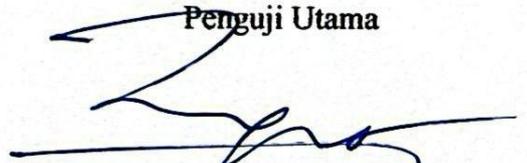
Oleh:

Diyan Harisna

NIM: P3.73.34.2.23.183

Telah duji pada: Senin, 24 Juni 2024

Dinyatakan lulus oleh,
Penguji Utama



(Husjain Djajaningrat, SKM., M.Kes)
NIP. 196511081988021001

Penguji I



(Puji Lestari, M.Biotech)
NIP. 199105162020122004

Penguji II



(Burhannudin, M.Sc)
NIP. 198810082020121002

Mengetahui

Ketua Jurusan
Teknologi Laboratorium Medis



(Dra. Mega Mirawati, M.Biomed)
NIP. 196703111998032001

Ketua Program Studi Sarjana Terapan
Teknologi Laboratorium Medis



(Dewi Astuti, S.Si, M. Biomed)
NIP. 198312172006042001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Diyan Harisna

NIM : P3.73.34.2.23.183

Program Studi : Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis dengan judul “Pengaruh Kombinasi Asam Nitrat 10% dengan EDTA pada Proses Dekalsifikasi Tulang Kepala terhadap Kualitas Sediaan Hematoksilin-Eosin (HE)”, benar-benar merupakan hasil karya saya bukan merupakan hasil menjiplak/mengambil karya orang lain yang saya akui sebagai karya sendiri. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa skripsi ini adalah hasil plagiat/jiplakan, maka saya bersedia menerima konsekuensi atau sanksi dari perbuatan tersebut.

Bekasi, Juni 2024
Yang membuat pernyataan



(Diyan Harisna)
NIM P3.73.34.2.23.183

ABSTRAK

Harisna, Diyan, 2024. Pengaruh Kombinasi Asam Nitrat 10% Dengan EDTA Pada Proses Dekalsifikasi Tulang Kepala Terhadap Kualitas Sediaan Hematoksilin-Eosin (HE). Skripsi, Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Jakarta III.

Burhannudin, M.Sc, dr. Hastrina Mailani, Sp.P.A

Dekalsifikasi menggunakan larutan asam dan larutan *chelating* merupakan metode yang paling umum di laboratorium. Asam nitrat 10% merupakan salah satu asam yang dapat melakukan dekalifikasi dengan waktu dekalifikasi yang lebih singkat, namun tidak maksimal dalam penyerapan warna hematoksilin-eosin (HE). Larutan *chelating* yang umum digunakan dalam dekalifikasi yaitu larutan EDTA, dimana larutan EDTA mampu mempertahankan keutuhan struktur dan memberikan intensitas warna hematoksilin-eosin (HE) yang lebih baik, namun membutuhkan waktu dekalifikasi yang lebih lama dibandingkan larutan asam. Penelitian ini menggabungkan kedua larutan dekalifikasi asam nitrat 10% dan EDTA. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbandingan larutan dekalifikasi asam nitrat 10% tanpa dan dengan penambahan EDTA 2:1, 1:1, dan 1:2 terhadap kualitas sediaan HE tulang kepala. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan populasi jaringan tulang kepala periode Juli 2023 sampai Maret 2024 di RS Pusat Otak Nasional Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta. Sampel penelitian menggunakan 25 sampel tulang kepala dengan 4 perlakuan dekalifikasi asam nitrat 10%, asam nitrat 10% + EDTA (2:1), asam nitrat 10% + EDTA (1:1), dan asam nitrat 10% + EDTA (1:2). Hasil sediaan mikroskopik menggunakan sistem skoring selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* diperoleh *p value* <0,05. Kesimpulan penelitian ini terdapat perbedaan kualitas sediaan HE tulang kepala pada proses dekalifikasi antara asam nitrat 10% tanpa penambahan EDTA dengan asam nitrat 10% + EDTA (2:1), asam nitrat 10% + EDTA (1:1), dan asam nitrat 10% + EDTA (1:2). Dekalsifikasi larutan asam nitrat 10% + EDTA (1:1) dapat dijadikan alternatif dekalifikasi untuk meningkatkan intensitas warna kualitas sediaan HE.

Kata kunci: dekalifikasi, asam nitrat 10%, EDTA, hematoksilin-eosin

ABSTRACT

Harisna, Diyan, 2024. The Effect of the Combination of Nitric Acid 10% with EDTA in the Head Bone Decalcification Process on the Quality of Hematoxylin-Eosin (HE) Slides. Thesis, Applied Bachelor of Medical Laboratory Technology Study Program, Polytechic of the Ministry of Health Jakarta III.
Burhannudin, M.Sc, dr. Hastrina Mailani, Sp.P.A

Decalcification using acid solutions and chelating solutions is the most common method in the laboratory. Nitric acid 10% is an acid that can carry out decalcification with a shorter decalcification time, but is not optimal in absorbing hematoxylin-eosin (HE) stain. The chelating solution commonly used in decalcification is EDTA solution, where EDTA solution is able to maintain structural integrity and provide better hematoxylin-eosin (HE) color intensity, but requires a longer decalcification time than acid solutions. This study combined both decalcification solutions of nitric acid 10% and EDTA. The purposes of this study was to determine the comparison of 10% nitric acid decalcification solution without and with the addition of EDTA 2:1, 1:1, and 1:2 on the quality of head bone HE slides. This research is an experimental study with a population of head bone tissue for the period July 2023 to March 2024 at the National Brain Center Hospital Prof Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta. The research samples used 25 head bone samples with 4 decalcification treatments of 10% nitric acid, 10% nitric acid + EDTA (2:1), 10% nitric acid + EDTA (1:1), and 10% nitric acid + EDTA (1:1). 2). The results of microscopic slides using a scoring system were then analyzed statistically using the Kruskal-Wallis test, obtaining a p value <0.05. The conclusion of this study is that there is a difference in the quality of head bone HE slides in the decalcification process between 10% nitric acid without the addition of EDTA and 10% nitric acid + EDTA (2:1), 10% nitric acid + EDTA (1:1), and 10% nitric acid. % + EDTA (1:2). Decalcification of 10% nitric acid + EDTA (1:1) solution can be used as an alternative decalcification to increase the color intensity of HE slide quality.

Keywords: decalcification, 10% nitric acid, EDTA, hematoxylin-eosin

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala karunia dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini tepat pada waktunya.

Skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Terapan Kesehatan di Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jakarta III dengan judul “Pengaruh Kombinasi Asam Nitrat 10% dengan EDTA pada Proses Dekalsifikasi Tulang Kepala terhadap Kualitas Sediaan Hematoksin-Eosin (HE)”. Skripsi ini berhasil penulis selesaikan karena dukungan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis sampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Siti Badriah, S.Kep.,Ners.,M.Kep.,Ns.Sp.Kep.Kom selaku Direktur Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jakarta III.
2. Dra. Mega Mirawati, M.Biomed selaku Ketua Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.
3. Dewi Astuti, S.Si, M.Biomed selaku Ketua Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis.
4. Burhannudin, M.Sc selaku dosen pembimbing I yang telah memberi arahan, bimbingan dalam menyelesaikan proposal skripsi ini.
5. dr. Hastrina Mailani, Sp.P.A selaku dosen pembimbing II yang telah memberi arahan, bimbingan dalam menyelesaikan proposal skripsi ini.
6. Direksi RS Pusat Otak Nasional Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian di wilayah kerjanya.
7. Segenap sekretariat dan tim pelaksana skripsi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jakarta III yang telah memfasilitasi proses pelaksanaan proposal skripsi.
8. Husjain Djajaningrat, SKM, M.Kes selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan pembimbingan selama perkuliahan.
9. Teristimewa untuk seluruh keluarga terkasih, yang telah memberikan dukungan dalam menyelesaikan proposal skripsi ini.

10. Seluruh teman-teman Kelas Alih Jenjang Teknologi Laboratorium Medis angkatan 4.

Penulis berharap semoga skripsi ini berguna bagi pembaca dan berbagai pihak yang terkait.

Bekasi, Juni 2024

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL DEPAN.....	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
ABSTRAK	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR SIMBOL, SINGKATAN, DAN ISTILAH	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
E. Ruang Lingkup Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Konsep Teori.....	6
1. Tulang Kepala	6
2. Fiksasi	7
3. Dekalsifikasi.....	7
4. Pematangan Jaringan.....	13
5. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).....	13
6. Kontrol Kualitas Sediaan HE.....	14
B. Kerangka Teori	16
BAB III METODE PENELITIAN.....	17
A. Kerangka Konsep.....	17
B. Hipotesis Penelitian	17
C. Desain Penelitian.....	17
D. Variabel Penelitian	18
E. Definisi Operasional Variabel	18
F. Lokasi dan Waktu Penelitian	19
G. Populasi dan Sampel.....	19
H. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	20
I. Prosedur Penelitian	20
J. Teknik Penyajian Data.....	21
K. Teknik Pengolahan dan Analisis Data	22
L. Etika Penelitian	22

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
A. Hasil Penelitian	23
B. Pembahasan	28
 BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	 34
A. Simpulan	34
B. Saran	34
 DAFTAR PUSTAKA	 36

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan HE.....	15
Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel.....	18
Tabel 4.1 Hasil Uji Pendahuluan	23
Tabel 4.2 Distribusi Frekuensi Kualitas Sediaan HE.....	26
Tabel 4.3 Hasil Uji <i>Kruskal-Wallis</i> Jenis Dekalsifikasi.....	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kerangka Teori.....	16
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	17
Gambar 4.1 Perbedaan Hasil Pewarnaan	25

DAFTAR SIMBOL, SINGKATAN, DAN ISTILAH

%	: Persen
EDTA	: <i>Ethylen Diamine Tetra Acetic acid</i>
HE	: Hematoksilin-Eosin
N	: Jumlah sampel yang diperiksa
pH	: Konsentrasi ion Hidrogen (H^+)
2:1	: 2 bagian asam nitrat 10% dan 1 bagian EDTA
1:1	: 1 bagian asam nitrat 10% dan 1 bagian EDTA
1:2	: 1 bagian asam nitrat 10% dan 2 bagian EDTA

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Permohonan Izin Kaji Etik Penelitian	38
Lampiran 2 Izin Penelitian	39
Lampiran 3 Surat Keterangan Kaji Etik Penelitian.....	40
Lampiran 4 Surat Pernyataan Kesiediaan Untuk Dimuat Dalam Majalah/Jurnal..	41
Lampiran 5 Data Hasil Penelitian	42
Lampiran 6 <i>Print Out</i> Analisis Statistik.....	43
Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian	48
Lampiran 8 Prosedur Pemeriksaan.....	50
Lampiran 9 Lembar Bimbingan	52

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Histologi adalah cabang ilmu biologi yang mempelajari tentang struktur sel dan jaringan secara detail menggunakan mikroskop.¹ Histoteknik atau teknik histologi merupakan ilmu atau seni mempersiapkan organ, jaringan atau bagian jaringan untuk dapat diamati dan ditelaah. Struktur dan komposisi molekul dapat dipertahankan pada jaringan agar tetap sama seperti di dalam tubuh, sediaan jaringan harus dibuat sedemikian rupa sehingga menghasilkan sediaan jaringan mikroskopis yang ideal.²

Pemeriksaan histopatologi merupakan pemeriksaan spesimen jaringan yang diambil dengan prosedur anestesi pada manusia atau binatang hidup atau *post mortem* (otopsi klinik). Pemeriksaan histopatologi merupakan pemeriksaan *gold standard* dalam penegakan diagnosis patologi anatomi.³ Spesimen yang digunakan dalam histopatologi adalah seluruh organ atau jaringan yang diambil dari pasien baik berukuran kecil maupun besar. Salah satu jaringan yang dilakukan pemeriksaan histopatologi adalah tulang. Dalam dunia histopatologi, tulang mendapatkan peran tertentu dalam suatu diagnosis penyakit. Salah satu penyakit yang menyerang jaringan tulang adalah tumor tulang. Untuk mendiagnosis penyakit tersebut maka perlu dilakukan pemeriksaan mikroskopis tulang.²

Tulang adalah jaringan ikat vaskular termineralisasi yang tersusun dari bahan organik dan anorganik.⁴ Tulang terdiri dari tulang keras dan tulang rawan. Tulang keras tersusun dari sel-sel osteosit yang banyak mengandung zat kapur dan fosfor. Contoh tulang keras ada tulang tengkorak, tulang kering, dan ruas tulang belakang.⁵ Pada beberapa kasus, tumor dapat menginvasi tulang di sekitarnya, misalnya meningioma.

Meningioma adalah tumor yang berasal dari sel meningotheial (arachnoid) leptomeningen. Meningioma umumnya menyebabkan pendesakan terhadap struktur otak disekitarnya dan sebagian meningioma dapat menginvasi jaringan tulang di sekitarnya yaitu tulang kepala.⁶ Angka kejadian meningioma sekitar 36% dari seluruh tumor otak, insidensinya diperkirakan 98/100.000 orang, dengan perkiraan rasio 2:1 antara wanita dan pria, dan insidensinya meningkat seiring dengan bertambahnya usia. Karakteristik tumor ini dapat tumbuh dengan besar dan cenderung menghasilkan hiperostosis, infiltrasi atau juga mengerosi tulang.⁷ Hiperostosis dapat terjadi akibat infiltrasi tulang oleh sel tumor dan hipervaskularitas di sekitar meningioma. Kasus hiperostosis tulang kepala dapat ditemukan hingga 44% pada meningioma.⁸

Berbeda dengan jaringan lunak, tulang yang merupakan jaringan keras perlu perlakuan khusus sebelum dilakukan pematangan jaringan berupa dekalsifikasi. Dekalsifikasi bertujuan untuk menghilangkan zat penyusun utama jaringan keras yaitu kalsium dalam tulang, sehingga tulang tersebut menjadi lunak dan dapat dilakukan ke tahapan pematangan jaringan.⁹ Pada dekalsifikasi atau penghilangan garam kalsium dapat dilakukan dengan larutan asam, larutan

chelating, resin penukar ion, metode elektrolisis, dan dekalsifikasi permukaan. Dekalsifikasi menggunakan larutan asam dan larutan *chelating* merupakan metode yang paling umum di laboratorium. Dekalsifikasi asam terdiri dari asam kuat dan asam lemah. Asam nitrat merupakan salah satu asam kuat yang dapat melakukan dekalsifikasi. Keuntungan asam nitrat dalam dekalsifikasi yaitu karena memberikan proses pelunakan tulang yang lebih cepat. Larutan *chelating* yang umum digunakan dalam dekalsifikasi yaitu larutan EDTA 10%. Keuntungan dekalsifikasi menggunakan larutan EDTA 10% mampu mempertahankan keutuhan struktur dan memberikan intensitas warna hematoksilin eosin (HE) yang lebih baik.¹⁰

Penelitian sebelumnya oleh Dewi, dkk (2020), menunjukkan larutan asam nitrat 10% cepat dalam melunakkan tulang, namun tidak maksimal dalam penyerapan warna HE sehingga inti sel relatif pucat.¹¹ Penelitian lainnya oleh Rakhmawati, dkk (2019), menunjukkan larutan EDTA 10% merupakan larutan dekalsifikasi paling optimal dalam penyerapan warna HE dari *Os Tibia*.¹² Penggunaan larutan asam nitrat 10% dan EDTA memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing, sehingga peneliti ingin berfokus mengkombinasikan keduanya yaitu menambahkan EDTA ke dalam larutan asam nitrat 10%, berharap akan memberikan hasil yang baik pada pewarnaan HE dengan waktu dekalsifikasi yang relatif cepat. Selain itu, penelitian ini akan membandingkan larutan dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA terhadap kualitas sediaan HE pada tulang kepala.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian yang dapat ditarik dari latar belakang yang disampaikan adalah apakah terdapat perbedaan dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA terhadap kualitas sediaan HE pada tulang kepala?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan umum

Penelitian yang dilakukan bertujuan mengetahui perbedaan dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA terhadap kualitas sediaan HE pada tulang kepala.

2. Tujuan khusus

Tujuan khusus penelitian adalah untuk mengetahui:

- a. Hasil kualitas sediaan HE tulang kepala dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% tanpa penambahan EDTA.
- b. Hasil kualitas sediaan HE tulang kepala dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (2:1).
- c. Hasil kualitas sediaan HE tulang kepala dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (1:1).
- d. Hasil kualitas sediaan HE tulang kepala dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (1:2).
- e. Menganalisis perbedaan kualitas sediaan HE tulang kepala pada dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA.

D. Manfaat Penelitian

1. Bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dan ilmu pengetahuan mengenai larutan dekalsifikasi asam nitrat 10% dan EDTA.

2. Bagi Rumah Sakit

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah dan menjadi masukan atau saran mengenai metode dekalsifikasi tulang kepala menggunakan asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA.

3. Bagi Institusi

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah dan menjadi masukan atau saran untuk penelitian selanjutnya mengenai metode dekalsifikasi menggunakan asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA.

E. Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui perbedaan kualitas sediaan HE tulang kepala pada dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA di RSPON Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Konsep Teori

1. Tulang Kepala

Tulang kepala atau kranium merupakan tulang pembentuk kepala yang tersusun menjadi dua bagian yaitu *neurocranium* (tulang otak) dan *viscerocranium* (tulang wajah).¹³ Tulang kepala terdiri dari delapan *neurocranium* dan 14 *viscerocranium*, dimana tulang-tulang ini akan mengeras dan menyatu melalui perkembangan untuk melindungi otak besar, otak kecil, batang otak, dan orbit. Selain itu, ia menopang otot-otot wajah dan kulit kepala dengan menyediakan perlekatan otot dan tendon, melindungi struktur neurovaskular, dan menampung berbagai sinus untuk mengakomodasi peningkatan tekanan.¹⁴

a. *Neurocranium*

Neurocranium adalah tulang kepala yang berfungsi sebagai pelindung otak. Tulang ini dibagi menjadi 2, yaitu *calvarium* (tutup kepala) dan *base* (dasar kepala). *Neurocranium* terdiri dari 1 tulang *ethmoid*, 1 tulang *frontale*, 1 tulang *occipital*, 1 tulang *sphenoid*, 2 tulang *parietal*, dan 2 tulang *temporal*.¹⁵

b. *Viscerocranium*

Viscerocranium atau disebut dengan tulang wajah merupakan tulang yang membentuk wajah. Tulang ini terdapat rongga-rongga yang

membentuk rongga mulut (*cavum oris*), rongga hidung (*cavum nasi*), dan rongga mata (*cavum orbita*).¹³ Tulang wajah terdiri dari dua bagian yaitu:

- 1) Bagian hidung yang terdiri dari *os lacrimal* (tulang mata), *os nasal* (tulang karang hidung), dan septum nasi (sekat rongga hidung).
- 2) Bagian rahang yang terdiri dari *os maxillaris* (tulang rahang atas), *os zygomaticum* (tulang pipi kanan dan kiri), *os palatum* (tulang langit-langit kanan dan kiri), dan *os mandibularis* (tulang rahang bawah).

2. Fiksasi

Fiksasi merupakan suatu hal yang menjadi salah satu faktor keberhasilan dalam suatu pembuatan sediaan. 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. 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%, jaringan akan mengalami sedikit pembengkakan namun ketika jaringan masuk ke dalam pematangan jaringan, maka spesimen kemungkinan akan menyusut kembali hingga 20% - 30% dari volumenya.²

3. Dekalsifikasi

Dekalsifikasi adalah tahap yang rutin digunakan pada proses pemotongan jaringan tulang, melalui proses pengeluaran kalsium dari

jaringan tulang tanpa merusak struktur jaringan tulang.¹⁶ Proses dekalsifikasi bertujuan untuk melunakkan tulang, gigi, atau jaringan yang mengandung garam kalsium sehingga mempermudah saat pemotongan menggunakan mikrotom. Larutan dekalsifikasi yang baik seharusnya dapat menghilangkan semua garam-garam mineral dalam tulang tanpa menimbulkan efek yang kurang baik pada sel atau jaringan dan tanpa mengganggu interpretasi hasil atau pewarnaan berikutnya.¹⁷

a. Larutan dekalsifikasi

Larutan dekalsifikasi terbagi menjadi 3 yaitu dekalsifikasi asam kuat, dekalsifikasi asam lemah, dan chelating. Dekalsifikasi asam lebih sering digunakan di laboratorium patologi karena lebih cepat dan hasil tidak merubah dan merusak morfologi dari jaringan yang akan didiagnosis.¹⁷ Prinsip dekalsifikasi adalah menghilangkan kation kalsium dengan mekanisme anion. Anion diperoleh dari larutan dekalsifikasi yang biasanya mengandung larutan asam. Larutan asam yang digunakan untuk proses dekalsifikasi antara lain asam nitrat, Perenyi's 10%, HCl 5 sampai 10%, larutan Von Ebner's, asam format 10%, Evans Krajian, dan Kristensen.²

1) Asam nitrat

Larutan dekalsifikasi asam nitrat ini cepat dalam proses dekalsifikasi, dan jika melebihi batas waktu akan mengurangi kualitas dari pewarnaan inti. Asam nitrat pada konsentrasi 10% merupakan larutan dekalsifikasi yang paling cepat dalam proses dekalsifikasi.² Berdasarkan hasil

penelitian Dewi, dkk (2020) konsentrasi larutan asam nitrat 3% menghasilkan kelunakan tulang yang lebih rendah dibandingkan asam nitrat 10%. Dengan meningkatnya konsentrasi asam nitrat kelunakan tulang akan semakin tinggi.¹¹ Asam nitrat dengan konsentrasi 10% dan 15% memberikan hasil kurang menyerap zat warna dengan baik.^{11,24}

2) Perenyi's 10%

Larutan dekalsifikasi dengan komposisi asam nitrat 10% sebanyak 40 ml, asam kromat 0,5% sebanyak 30 ml, dan alkohol absolut 30 ml. Larutan ini merupakan sebuah larutan dekalsifikasi tradisional membutuhkan waktu lebih lambat dari asam nitrat encer. Cukup baik dalam proses dekalsifikasi, namun jika melebihi batas titik akhir tetap akan mengganggu pewarnaan.²

3) HCl

Larutan dekalsifikasi HCl 5 sampai 10% dapat cepat dalam proses dekalsifikasi, dan jika melebihi batas titik akhir akan mengganggu pewarnaan.²

4) Larutan Von Ebner's

Cepat di dalam proses dekalsifikasi, jika melebihi waktu dekalsifikasi akan mengganggu pewarnaan.²

5) Asam format 10%

Larutan dekalsifikasi yang sederhana dan baik dalam hasilnya namun memiliki waktu pengerjaan yang lebih lama.²

6) Evans dan Krajian

Larutan dekalsifikasi dengan komposisi asam format sebanyak 25 ml, natrium sitrat 10 gram, aquades 75 mL. Larutan dekalsifikasi ini bersifat penyangga dengan penambahan sitrat. Hasil lebih baik karena tidak mempengaruhi pewarnaan namun waktu yang digunakan lebih lama.²

7) Kristensen

Larutan dekalsifikasi menggunakan asam format asam format sebanyak 18 ml, natrium format 3.5g, dan aquades sebanyak 82 ml. Larutan ini bersifat penyangga dengan penambahan natrium format. Hasil lebih baik karena tidak mempengaruhi pewarnaan namun waktu yang digunakan lebih lama.²

8) Larutan *chelating* EDTA

Larutan 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, Flourosens Insitu Hibridisasi (FISH). Larutan ini menggunakan konsentrasi sekitar 14% sebagai larutan yang dikondisikan netral. Rata-rata EDTA akan mendekalsifikasi tulang tergantung akan pH yang dikondisikan. Larutan EDTA sebagai dekalsifikasi yang umum digunakan ada pada pH berkisar 7. Larutan dekalsifikasi yang baik tanpa atau sangat sedikit mengalami kerusakan jaringan sekitarnya, namun waktu yang diperlukan sangat lama.² Pada penelitian sebelumnya oleh Guo, dkk (2016), dekalsifikasi menggunakan EDTA membutuhkan waktu yang lebih lama berkisar 2 hingga 4 bulan.

Sebelum jaringan dilakukan proses dekalsifikasi, jaringan harus dilakukan proses fiksasi terlebih dahulu. Jaringan keras yang tidak terfiksasi dengan baik, maka akan menyebabkan kerusakan pada jaringan lunak disekitarnya akibat agen dekalsifikasi.² Dekalsifikasi dilakukan setelah spesimen difiksasi secara menyeluruh dan sebelum pengolahan menjadi parafin.

b. Penentuan Titik Akhir

Penentuan untuk mengetahui proses dekalsifikasi sudah selesai antara lain radiografi, manipulasi (*probing* dan *bending*), waktu perendaman dan uji kimia. Radiografi merupakan metode alat akurasi yang dapat mendeteksi proses menghilangkan kalsium sudah sempurna atau belum pada tulang. Manipulasi (*probing* dan *bending*) metode yang sering digunakan karena mudah yaitu dengan menusuk jaringan dengan

benda tajam seperti pisau atau jarum. Waktu perendaman tergantung pada jenis dan besar dari jaringan. Proses dekalsifikasi sudah sempurna atau selesai apabila jaringan femur atau tulang mudah ditembus menggunakan jarum tanpa kekuatan atau tenaga.¹⁶

c. Faktor Dekalsifikasi

Faktor yang berpengaruh terhadap proses dekalsifikasi untuk diagnostik antara lain ketebalan tulang, volume larutan, kerapatan tulang, tekanan atau vakum, suhu, dan agitasi. Ketebalan tulang yaitu semakin tebal tulang maka semakin lama proses menghilangkan garam-garam kalsium di dalam tulang. Kerapatan atau densitas tulang yaitu keadaan tulang yang mengandung banyak kalsium lebih lama proses pelunaknya apabila dibandingkan dengan yang sedikit kandungan kalsium. Suhu dapat mempercepat proses dekalsifikasi, tetapi dengan suhu lebih dari 60°C dapat merusak jaringan dan mempengaruhi hasil pengecatan jaringan. Agitasi yaitu proses mempercepat dekalsifikasi dengan mekanik atau mengaduk saat proses dekalsifikasi. Vakum atau tekanan adalah proses pemberian tekanan yang biasanya untuk proses menghilangkan gelembung pada rongga tetapi apabila digabungkan dengan proses dekalsifikasi diharapkan akan mengurangi kerusakan jaringan saat dikerjakan. Faktor terakhir yang berpengaruh terhadap proses dekalsifikasi adalah volume larutan, semakin banyak larutan dekalsifikasi akan mempercepat proses dekalsifikasi. Larutan yang masuk ke dalam tulang

banyak sehingga lebih cepat menghilangkan garam-garam kalsium tulang.²

4. 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.² Adapun langkah-langkah pematangan jaringan yaitu:

- a. Dehidrasi atau mengeluarkan seluruh air dan cairan fiksatif dari dalam jaringan
- b. Pembeningan atau mengeluarkan cairan dehidrasi dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan media infiltrasi
- c. Infiltrasi atau memasukkan suatu filtrat tertentu yang dapat mengeras pada suhu ruang

5. Pewarnaan Hematoksilin-eosin (HE)

Pewarnaan HE adalah proses pemberian warna yang kontras pada komponen seluler sehingga dapat membedakan satu sel dengan sel yang lain. Hematoksilin eosin termasuk salah satu pewarnaan dasar histologi dengan kombinasi hematoksilin dan eosin.¹⁸ HE terdiri atas hematoksilin yang memberi warna inti sel menjadi ungu gelap atau biru dan eosin memberi warna pada sitoplasma menjadi pink atau merah muda.¹⁹ Hematoksilin akan mengikat inti sel secara lemah tetapi dengan adanya penambahan senyawa lain seperti besi, aluminium, besi, krom dan tembaga akan berikatan dengan

kuat. Senyawa hematoksilin yang digunakan adalah hematin. Hematin merupakan bentuk oksidasi senyawa hematokislin yang disebut Ripening. Kemampuan hematoksislin mewarnai inti sel akan terus berlangsung selama proses oksidasi dan akan berkurang jika proses telah berhenti. Upaya memperpanjang proses oksidasi maka larutan stok hematoksilin disimpan dalam wadah tertutup dan hindari paparan sinar matahari.²⁰

Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) merupakan pewarnaan rutin yang diminati dan biasa dilakukan dalam pewarnaan histopatologi, karena tergolong sederhana dan kemampuannya untuk membedakan komponen-komponen yang ada dalam jaringan. Prinsip pewarnaan HE yaitu sifat asam basa dari larutan yang kemudian akan berikatan dengan komponen jaringan yang mempunyai kecenderungan terhadap sifat asam atau basa tersebut sehingga terjadilah ikatan antara molekul zat warna dengan komponen jaringan.²

6. Kontrol kualitas sediaan HE

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. Beberapa pedoman umum yang dapat dipakai untuk menilai kualitas HE adalah sebagai berikut:²

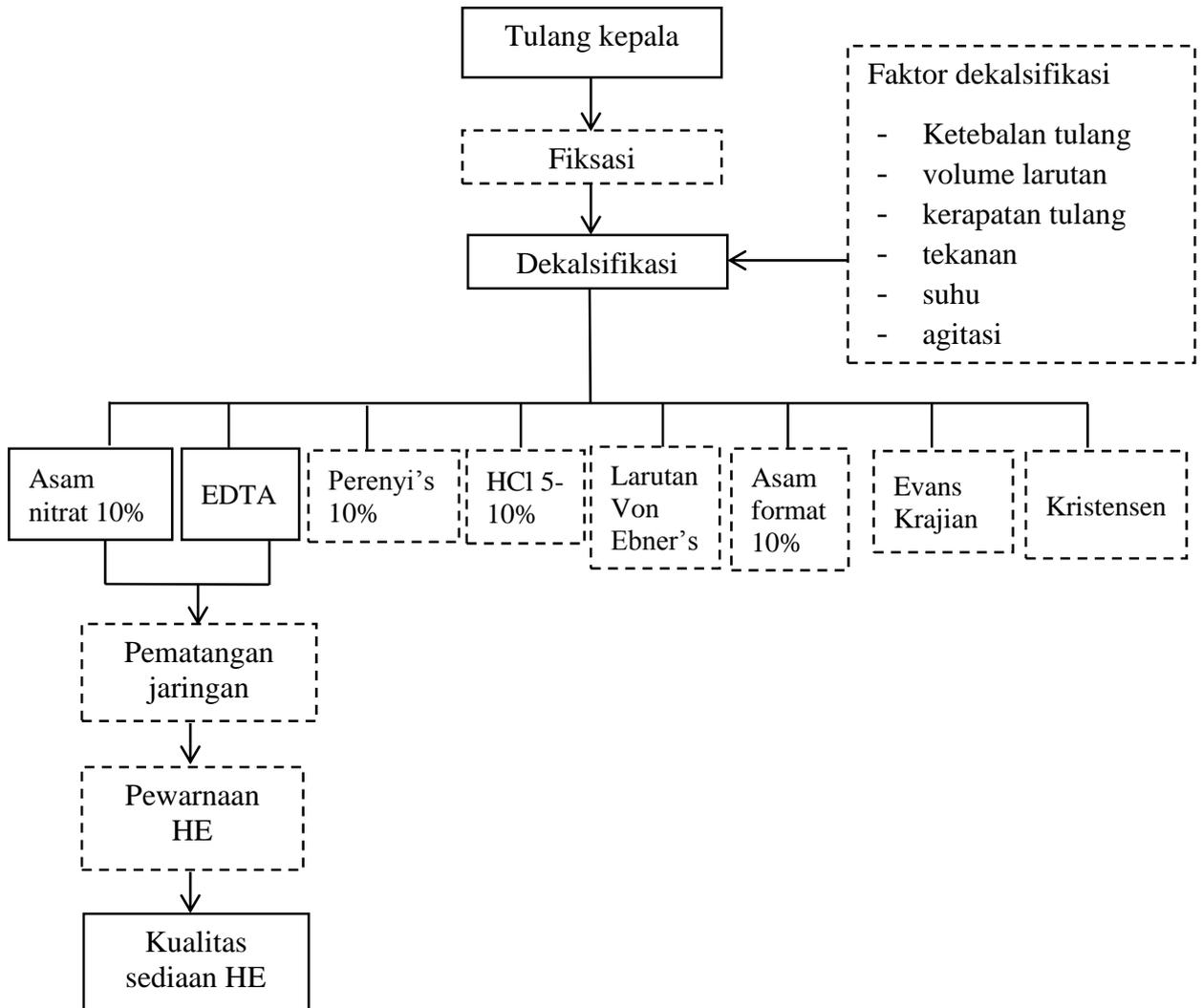
- a. Zat warna dapat mewarnai nukleus menjadi biru dan dapat menunjukkan membran nukleus, nukleoli, kromatin, dan nukleus yang vakuolar dan hiperkromatis.
- b. Zat warna dapat mewarnai dan membedakan sitoplasma, kolagen, otot, eritrosit, sel darah merah dan mucin dengan nuansa warna kemerahan.
- c. Zat warna dapat mewarnai mucin pada sel epitel usus, usus buntu, dan paru-paru, Kontras warna biru tergantung pada pH dari hematoksin. Menurunkan pH biasanya dapat dilakukan dengan menambahkan asam asetat, hal ini secara signifikan dapat mengurangi warna mucin.
- d. Pewarnaan Hematoksin yang terlalu teroksidasi akan menimbulkan warna coklat pada elemen-elemen tertentu pada jaringan.

Penilaian kualitas sediaan HE menurut Ariyadi dan Suryono (2017) tercantum pada tabel 2.1.²¹

Tabel 2.1 Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan HE

No.	Kriteria	Skala Ordinal
1	Warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas serta warna pada preparat tidak seragam. Sediaan tidak bisa didiagnosis.	Tidak baik
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
3	Warna biru terang pada inti sel, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat serta warna pada preparat seragam.	Baik

B. Kerangka Teori



Keterangan :

: Area yang diteliti

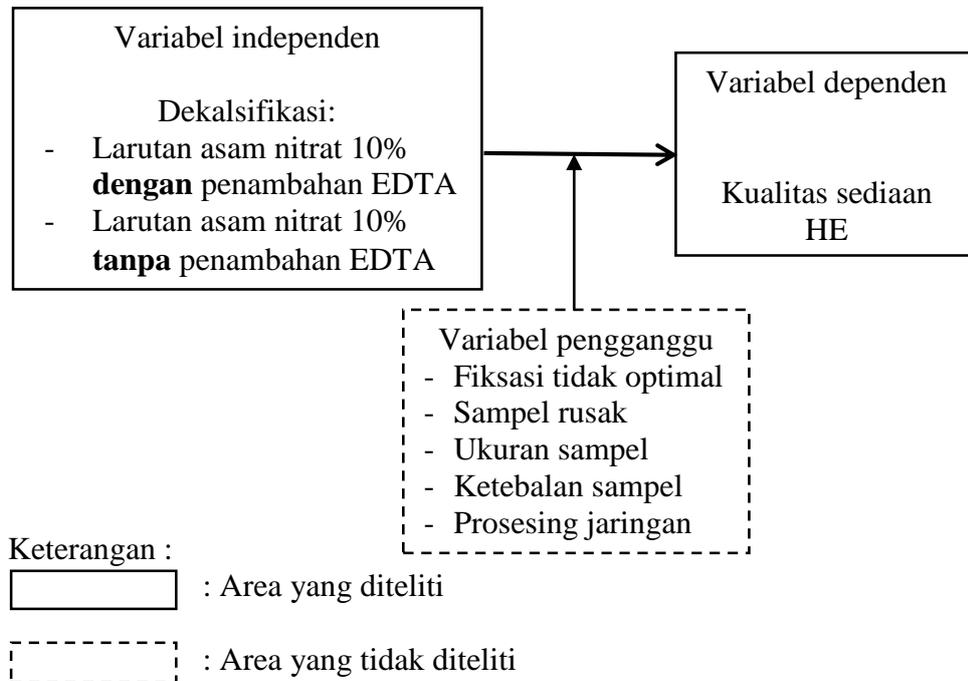
: Area yang tidak diteliti

Gambar 2.1 Kerangka Teori

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

B. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah terdapat perbedaan dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA pada kualitas sediaan HE tulang kepala.

C. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah kualitas sediaan HE

2. Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah dekalsifikasi menggunakan asam nitrat 10% dengan penambahan EDTA dan asam nitrat 10% tanpa penambahan EDTA

E. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Kategori & Kriteria	Alat Ukur	Skala
1	Dekalsifikasi	Proses melunakkan tulang kepala dengan merendam sampel ke dalam larutan dekalsifikasi menggunakan larutan asam nitrat 10% dan EDTA	1. Asam nitrat 10% 2. Asam nitrat 10% + EDTA (2:1) 3. Asam nitrat 10% + EDTA (1:1) 4. Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	Gelas ukur	Ordinal
2	Kualitas sediaan HE	Hasil sediaan tulang kepala menggunakan pengecatan HE. Warna inti terwarnai biru dan sitoplasma terwarnai merah muda	1. Tidak baik 2. Kurang baik 3. Baik	Mikroskop	Ordinal

F. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Instalasi Laboratorium RS Pusat Otak Nasional Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta dengan waktu penelitian April sampai Mei 2024.

G. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah jaringan tulang kepala periode Juli 2023 sampai Maret 2024.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah sediaan HE dari jaringan tulang kepala yang dilakukan dekalsifikasi menggunakan larutan asam nitrat 10% dengan penambahan EDTA dan larutan asam nitrat 10% tanpa penambahan EDTA di RS Pusat Otak Nasional Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta. Pengambilan data sampel penelitian berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi.

a. Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini sebanyak 25 sampel tulang kepala dengan 4 perlakuan yaitu sampel 1 sampai 25 dekalsifikasi dengan asam nitrat 10%, 26 sampai 50 dekalsifikasi dengan asam nitrat 10% + EDTA (2:1), 51 sampai 75 dekalsifikasi dengan asam nitrat 10% + EDTA (1:1), dan 76 sampai 100 dekalsifikasi dengan asam nitrat 10% + EDTA (1:2) sehingga total sampel ada 100 spesimen. Pada penelitian ini menggunakan dekalsifikasi asam nitrat 10% sebagai kontrol.

b. Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

- 1) Jaringan tulang kepala dilakukan pemotongan menggunakan gergaji dengan ketebalan sampel 0,5 cm.
- 2) Sampel dilakukan dekalsifikasi. Masing-masing sampel dilakukan dekalsifikasi menggunakan asam nitrat 10%, asam nitrat 10% + EDTA (2:1), asam nitrat 10% + EDTA (1:1), dan asam nitrat 10% + EDTA (1:2).
- 3) Dilakukan pemrosesan jaringan hingga menjadi sediaan HE.

H. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

Sampel dari tulang kepala dengan diagnosis meningioma dan dilakukan fiksasi menggunakan *neutral buffer formaline* (NBF) 10%.

2. Kriteria Eksklusi

- a. Fiksasi sampel tidak optimal
- b. Sampel rusak atau hancur

I. Prosedur Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan data primer, yaitu dengan melakukan pengambilan data hasil pemeriksaan dekalsifikasi tulang kepala menggunakan asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA terhadap kualitas sediaan HE pada spesimen tulang kepala. Prosedur penelitian sebagai berikut (prosedur lihat lampiran 9):

1. Membuat dan mengajukan surat izin penelitian dan kaji etik penelitian kepada Direktur Utama RS Pusat Otak Nasional Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta.
2. Memilah sampel tulang kepala periode Juli 2023 sampai Maret 2024.
3. Memotong spesimen tulang kepala menggunakan gergaji
4. Membuat pengenceran larutan dekalsifikasi asam nitrat 10% dari asam nitrat 69%.
5. Membuat larutan dekalsifikasi asam nitrat 10% dan EDTA dengan perbandingan 2:1, 1:1, dan 1:2 hingga spesimen lunak.
6. Melakukan pematangan jaringan menggunakan alat *tissue processor* yang mencakup fiksasi, dehidrasi, clearing, dan impregnasi
7. Melakukan *embedding* atau menanam jaringan yang sudah matang ke dalam blok.
8. Melakukan pembuatan *slide* dengan memotong tipis menggunakan alat mikrotom.
9. Melakukan pewarnaan dengan pewarnaan HE.
10. Melakukan pengamatan sampel.
11. Membuat pelaporan hasil pemeriksaan sampel.
12. Melakukan analisis data secara statistik.

J. Teknik Penyajian Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel, gambar, dan penjelasan dalam uraian narasi deskriptif serta statistik.

K. Teknik Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel secara statistik diawali dengan uji normalitas. Jika data normal (nilai $p > 0,05$), maka dilakukan uji parametrik *oneway anova*. Namun, jika data tidak normal (nilai $p < 0,05$), maka dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis Test*.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian RS Pusat Otak Nasional Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta dalam Surat Keterangan Etik Penelitian Nomor: DP.04.03/D.XXIII.9/98/2024 tanggal 30 Mei 2024.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Instalasi Laboratorium RSPON Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta pada bulan April sampai Mei 2024. Penelitian ini dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu yang bertujuan untuk mengetahui kondisi kelunakan dan lama dekalsifikasi menggunakan asam nitrat 10%, asam nitrat 10% + EDTA (2:1), asam nitrat 10% + EDTA (1:1), dan asam nitrat 10% + EDTA (1:2). Uji pendahuluan dilakukan dengan memotong terhadap 2 sampel tulang kepala masing-masing menjadi 4 bagian berukuran 1x0,5x0,5 cm dan direndam dengan larutan dekalsifikasi asam nitrat 10%, asam nitrat 10% + EDTA (2:1), asam nitrat 10% + EDTA (1:1), dan asam nitrat 10% + EDTA (1:2). Uji pendahuluan ini didapatkan hasil pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Uji Pendahuluan

Jenis dekalsifikasi	Lama dekalsifikasi (hari)	pH	Kondisi	Endapan
Asam Nitrat 10%	6	2	Lunak	Tidak ada
Asam Nitrat 10% + EDTA (2:1)	8	2	Lunak	Ada
Asam Nitrat 10% + EDTA (1:1)	11	2	Lunak	Ada
Asam Nitrat 10% + EDTA (1:2)	20	2	Lunak	Ada

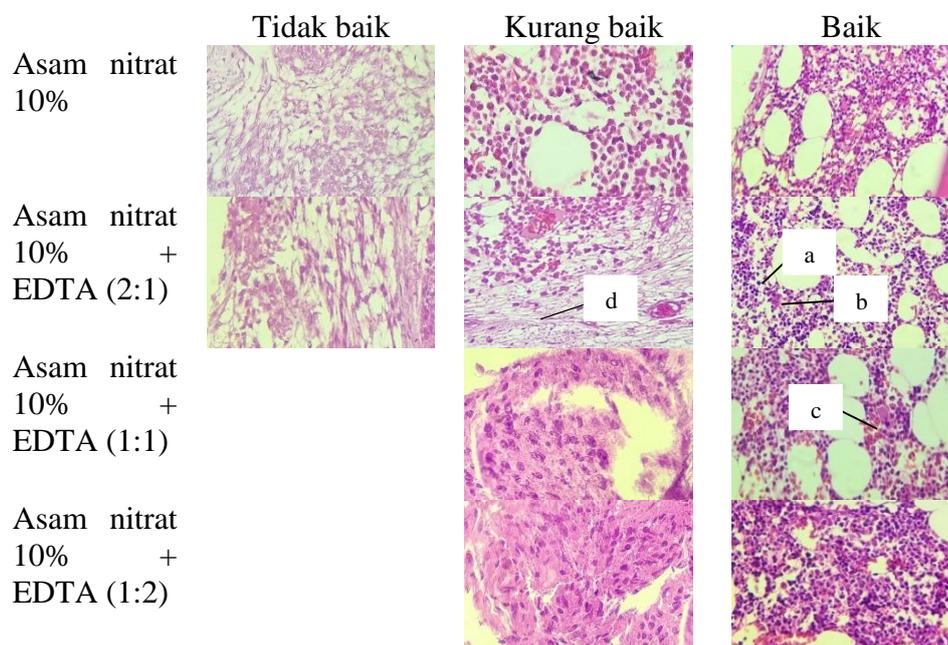
Berdasarkan hasil uji pendahuluan pada tabel 4.1, dekalsifikasi tulang kepala menggunakan empat larutan yang berbeda menunjukkan waktu dekalsifikasi yang berbeda. Dekalsifikasi menggunakan asam nitrat tanpa

penambahan EDTA menunjukkan waktu yang paling cepat yaitu 6 hari. Hal ini dapat disebabkan karena larutan asam nitrat merupakan asam kuat yang dapat lebih cepat merusak senyawa organik yang berada pada substansi dasar tulang.²

Dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan penambahan EDTA menghasilkan endapan putih (dapat dilihat pada lampiran 8). Endapan putih ini menyelimuti spesimen tulang yang dilakukan dekalsifikasi. Semakin banyak EDTA yang ditambahkan dalam larutan asam nitrat 10%, semakin banyak pula endapan putih yang terbentuk.

1. Analisis Univariat

Data penelitian ini menggunakan 25 sampel tulang kepala dengan 4 perlakuan yang berbeda, sehingga total ada 100 spesimen. Hasil pengamatan mikroskopik sediaan HE dapat ditemukan eritrosit, leukosit, sitoplasma, sel tumor, sitoplasma, sumsum tulang, dan komponen tulang. Pengamatan mikroskopik sediaan tulang kepala menggunakan pewarnaan HE dilakukan perbandingan dan didapatkan hasil seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Perbedaan Hasil Pewarnaan pada Kelompok Perlakuan Dekalsifikasi Asam nitrat 10%, Asam nitrat 10% + EDTA (2:1), Asam nitrat 10% + EDTA (1:1), dan Asam nitrat 10% + EDTA (1:2). a) inti sel, b) sitoplasma, c) eritrosit, d) jaringan ikat

Pengamatan pada sediaan HE dikategorikan “baik”, jika inti sel jelas terwarnai biru hingga keunguan, sitoplasma berwarna merah muda dan pewarnaan terlihat kontras perbedaan antara inti sel dan sitoplasma. Dikategorikan “kurang baik”, jika pewarnaan inti sel atau sitoplasma kurang jelas. Dikategorikan “tidak baik”, jika pewarnaan inti sel dan sitoplasma tidak jelas dan tidak dapat dibedakan antara inti sel dan sitoplasma.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopik sediaan dengan pewarnaan HE pada tulang kepala yang dilakukan dekalsifikasi asam nitrat 10%, asam nitrat 10% + EDTA (2:1), asam nitrat 10% + EDTA(1:1), dan asam nitrat 10% + EDTA (1:2) menunjukkan hasil yang berbeda dari keempat larutan. Hasil pengamatan sediaan HE dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Distribusi Frekuensi Kualitas Sediaan HE Berdasarkan Jenis Dekalsifikasi

No	Parameter Penilaian	Skor	Asam nitrat 10%		Asam nitrat 10% + EDTA (2:1)		Asam nitrat 10% + EDTA (1:1)		Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	
			N	%	N	%	N	%	N	%
			1	Tidak baik	1	13	52	1	4	0
2	Kurang baik	2	11	44	15	60	5	20	1	4
3	Baik	3	1	4	9	36	20	80	24	96
TOTAL			25	100	25	100	25	100	25	100

Pengamatan sediaan HE dilakukan pemberian skor oleh dokter spesialis patologi anatomi. Pengamatan dilakukan dengan uji *blind* (pengamat tidak mengetahui perlakuan dari sediaan yang diamati). Berdasarkan tabel 4.2, penilaian sediaan HE tulang kepala yang dilakukan dekalsifikasi asam nitrat 10% didapat 13 sediaan yang mendapat skor 1 (52%), skor 2 ada 11 (44%), dan skor 3 ada 1 (4%). Sediaan HE tulang kepala yang dilakukan dekalsifikasi dengan larutan asam nitrat + EDTA (2:1) didapat 1 sediaan yang mendapat skor 1 (4%), skor 2 ada 15 (60%) dan skor 3 ada 9 (36%). Sediaan HE tulang kepala yang dilakukan dekalsifikasi dengan larutan asam nitrat + EDTA (1:1) didapat 5 sediaan yang mendapat skor 2 (20%) dan skor 3 ada 20 (80%). Serta sediaan HE tulang kepala yang dilakukan dekalsifikasi dengan larutan asam nitrat 10% + EDTA (1:2) didapat 1 sediaan yang mendapat skor 2 (4%) dan skor 3 ada 24 (96%).

2. Analisis Bivariat

Penelitian ini membandingkan sediaan HE tulang kepala sebanyak 25 sampel dari Juli 2023 hingga April 2024 yang dilakukan dekalsifikasi terlebih

dahulu dengan larutan asam nitrat 10%, asam nitrat 10% + EDTA (2:1), asam nitrat 10% + EDTA (1:1), dan asam nitrat 10% + EDTA (1:2).

Data penelitian ini didapat hasil *p value* uji normalitas $<0,05$ (dapat dilihat pada lampiran 7), dimana tiap kelompok perlakuan menunjukkan distribusi hasil yang tidak merata, sehingga penelitian ini menggunakan analisis statistik non parametrik *Kruskal-Wallis test*.

Tabel 4.3 Hasil Uji *Kruskal-Wallis Test* Jenis Dekalsifikasi

Jenis Dekalsifikasi	N	Median (minimal – maksimal)	<i>p value</i>
Asam nitrat 10%	25	1 (1-3) ^{a,b,c}	
Asam nitrat 10% + EDTA (2:1)	25	2 (1-3) ^{a,d,e}	
Asam nitrat 10% + EDTA (1:1)	25	3 (2-3) ^{b,d}	0,000
Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	25	3 (2-3) ^{c,e}	

Keterangan: a: hasil uji kualitas sediaan HE dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (2:1). b: hasil uji kualitas sediaan HE dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (1:1). c: hasil uji kualitas sediaan HE dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (1:2). d: hasil uji kualitas sediaan HE dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (2:1) dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (1:1). e: hasil uji kualitas sediaan HE dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (2:1) dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (1:2).

Pada analisis statistik non parametrik *Kruskal-Wallis test* seperti yang tercantum pada tabel 4.3 didapatkan *p value* $<0,05$. Hal ini menunjukkan pada tingkat kepercayaan 95%, terdapat perbedaan kualitas sediaan HE tulang kepala antara dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan asam nitrat 10% + EDTA 2:1, 1:1, dan 1:2. Asam nitrat 10% + EDTA (1:1) dan asam nitrat 10% + EDTA (1:2) tidak menunjukkan perbedaan signifikan, sehingga larutan asam nitrat 10% + EDTA (1:1) dapat menggantikan larutan asam nitrat 10% untuk dapat

meningkatkan kualitas sediaan HE serta waktu yang lebih cepat dibandingkan asam nitrat + EDTA (1:2).

B. Pembahasan

Dekalsifikasi merupakan teknik yang digunakan untuk menghilangkan mineral dari tulang atau jaringan yang mengandung garam kalsium lain sehingga dapat dibuat sediaan yang baik tanpa adanya kerusakan akibat jaringan yang keras. Prinsip dekalifikasi didasarkan pada penghilangan kation kalsium melalui mekanisme anion. Anion berasal dari larutan dekalifikasi yang biasanya berupa larutan asam. Larutan dekalifikasi 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 (EDTA), dapat dijadikan larutan dekalifikasi yang baik.²

Berdasarkan tabel 4.1, dekalifikasi menggunakan larutan asam nitrat 10% memberikan waktu dekalifikasi yang lebih cepat dibandingkan dengan yang dilakukan penambahan EDTA yaitu 6 hari pada sampel tulang kepala. Penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Dewi (2020), yang menyebutkan bahwa dekalifikasi asam nitrat 10% memberikan waktu pelunakan tulang yang lebih cepat. Hal ini dapat disebabkan oleh mekanisme larutan asam untuk melunakkan tulang dengan cara melepaskan senyawa organik yang terdapat pada substansi dasar pembentuk tulang dan jaringan

sehingga larutan asam kuat dengan konsentrasi yang tinggi membutuhkan waktu yang lebih singkat.²

Dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan penambahan EDTA membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan asam nitrat 10% tanpa penambahan EDTA. Semakin banyak larutan EDTA yang ditambahkan dalam larutan asam nitrat 10% maka semakin lama pula waktu yang dibutuhkan untuk pelunakkan tulang. Hal ini kemungkinan dapat dikarenakan larutan asam nitrat yang ditambahkan EDTA memberikan endapan putih yang menyelimuti spesimen tulang, sehingga penyerapan asam nitrat ke dalam tulang tidak maksimal. Semakin banyak larutan EDTA yang ditambahkan dalam asam nitrat 10%, maka semakin tebal pula endapan putih yang terbentuk pada proses dekalsifikasi spesimen. Pada penelitian sebelumnya oleh Guo, dkk (2017), dekalsifikasi menggunakan EDTA membutuhkan waktu yang lebih lama berkisar 2 hingga 4 bulan.²² Dalam proses dekalsifikasi, larutan *chelating* 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.²

Berdasarkan gambar 4.1 dan tabel 4.2, larutan dekalsifikasi asam nitrat 10% mendapat hasil kualitas sediaan HE dengan skor 1 (tidak baik) sebanyak 13 sediaan. Kualitas tidak baik tersebut berupa kehilangan warna pada inti sel jaringan. Hasil ini, mendukung pernyataan pada penelitian sebelumnya oleh Rakhmawati (2019), bahwa pada sampel *os tibia* domba garut dengan

dekalsifikasi asam nitrat 10% memberikan hasil penyerapan pewarnaan HE yang tidak maksimal dengan intensitas pewarnaan yang relatif pucat pada inti sel dan jaringan.¹¹ Penggunaan larutan dekalsifikasi yang tidak tepat dapat merusak struktur jaringan, sering terlihat dengan hilangnya pewarnaan sitoplasma dan inti sel jaringan untuk analisis histopatologi. Hal ini dapat disebabkan oleh perendaman larutan asam kuat yang berlebih sering merusak komponen pewarnaan yang bersifat basofilik seperti inti sel. Inti sel bersifat asam apabila terlalu banyak terpapar larutan yang bersifat asam, maka akan membuat jaringan inti rusak dan bersifat asam, sehingga zat warna larutan hematoksilin yang bersifat basa tidak dapat masuk dan mewarnai ke dalam inti sel. Semua larutan dekalsifikasi asam akan merusak dari senyawa organik yang berada pada substansi dasar tulang dan jaringan lain. Larutan asam nitrat juga bersifat korosif, sehingga jika dilakukan terlalu lama dalam perendaman terhadap sampel tulang, maka akan merusak struktur jaringan yang ada pada tulang tersebut.² Selain itu, larutan fiksasi dan prosesing juga dapat mempengaruhi hasil kualitas sediaan HE. Menurut Musyarifah (2018), larutan fiksasi yang baik untuk tulang yaitu *helly's fixative*, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait penggunaan larutan fiksatif tersebut.²³ Prosesing jaringan yang mempengaruhi hasil kualitas terletak pada tahap infiltrasi parafin. Infiltrasi parafin pada jaringan tulang memerlukan titik leleh yang lebih tinggi dibandingkan yang lebih jaringan lunak.² Perlu adanya penelitian lebih lanjut terkait pengaruh infiltrasi parafin terhadap kualitas sediaan HE pada spesimen tulang.

Penelitian ini menggunakan sampel tulang kepala yang dilakukan pemotongan menggunakan logam besi yang tidak tajam, namun dengan cara mengikis bagian tulang yang akan dipotong dengan gaya gesek yang cepat. Hal ini menyebabkan ukuran dan ketebalan sampel tulang yang kurang seragam, sehingga memungkinkan batas titik akhir yang berbeda satu sama lain. Batas titik akhir dalam proses dekalsifikasi sangat penting untuk memastikan bahwa jaringan tersebut telah cukup lunak untuk dipotong, tetapi tidak terlalu lama terpapar sehingga menyebabkan kerusakan struktur jaringan atau hilangnya struktur histologis yang penting.¹¹ Pada penelitian ini, pengukuran batas titik akhir untuk menentukan sampel tulang sudah lunak atau belum yaitu dengan menggunakan pisau, jika tulang sudah dapat dilakukan pemotongan menggunakan pisau, maka proses dekalsifikasi sudah selesai, dan dapat dilanjutkan pada tahap netralisasi atau pencucian menggunakan air mengalir.

Netralisasi atau tahap pencucian merupakan tahap yang juga penting dalam proses dekalsifikasi yang bertujuan untuk meminimalisir jaringan yang telah didekalsifikasi tidak mengalami kerusakan akibat asam yang digunakan.² Pada proses ini dilakukan untuk menetralkan asam yang tersisa setelah dekalsifikasi, sehingga jaringan tidak menjadi rusak pada tahap selanjutnya. Pada penelitian ini, dilakukan netralisasi dengan mencuci sampel tulang dengan air mengalir selama 15 menit. Belum adanya penelitian terkait waktu yang optimal dalam melakukan netralisasi setelah proses dekalsifikasi, sehingga kemungkinan sampel tulang pada penelitian ini masih memiliki sisa asam dari larutan asam nitrat 10%, sehingga dapat ditemui hasil sediaan yang tidak baik

dan kurang baik pada larutan asam nitrat 10% baik yang ditambahkan EDTA maupun tanpa penambahan EDTA.

Penelitian sebelumnya oleh Rakhmawati (2019), hasil dekalsifikasi menggunakan EDTA 10% menunjukkan hasil paling optimal dalam keutuhan struktur dan penyerapan warna HE dari *os tibia* domba garut. Hal ini dikarenakan EDTA adalah agen pengkelat ion kalsium dengan sangat efektif tanpa merusak komponen jaringan lainnya.¹²

Berdasarkan gambar 4.1, tabel 4.1, dan tabel 4.2, hasil penelitian dekalsifikasi menggunakan larutan asam nitrat 10% + EDTA mendapat kualitas sediaan “baik” yang lebih banyak, namun membutuhkan waktu dekalsifikasi yang lebih lama dibandingkan dengan asam nitrat 10% tanpa penambahan EDTA. Hal tersebut kemungkinan dapat dikarenakan larutan asam nitrat 10% yang ditambahkan EDTA yang bersifat pengkelat akan mengeluarkan garam kalsium dan menghasilkan endapan putih yang menyelimuti spesimen tulang, sehingga penyerapan sifat korosif pada asam nitrat akan berkurang. Selain itu, EDTA tidak bersifat korosif dan proses dekalsifikasi EDTA umumnya lebih lambat yang memungkinkan penghilangan kalsium secara bertahap, sehingga dapat mengurangi risiko kerusakan jaringan dan memastikan struktur sel tetap utuh.²

Keterbatasan penelitian ini hanya menggunakan larutan dua jenis dekalsifikasi yaitu asam nitrat 10% dan EDTA. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai larutan dekalsifikasi yang lebih bervariasi, sehingga didapatkan larutan

dekalsifikasi yang optimal untuk spesimen tulang kepala. Selain itu, penelitian ini hanya menilai kualitas sediaan HE dalam pemeriksaan histopatologi, sehingga perlu dikembangkan dalam penilaian kualitas pemeriksaan lanjutan seperti imunohistokimia dan patologi molekuler.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan penelitian perbandingan dekalsifikasi asam nitrat dengan dan tanpa penambahan EDTA terhadap kualitas sediaan tulang kepala, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Dekalsifikasi asam nitrat 10% tanpa penambahan EDTA didapatkan hasil 13 sediaan mendapat skor 1 (52%), 11 sediaan mendapat skor 2 (44%), dan 1 sediaan mendapat skor skor 3 (4%).
2. Dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (2:1) didapatkan hasil 1 sediaan mendapat skor 1 (4%), 15 sediaan mendapat skor 2 (60%) dan 9 sediaan mendapat skor 3 (36%).
3. Dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (1:1) didapatkan hasil 5 sediaan yang mendapat skor 2 (20%) dan 20 sediaan mendapat skor 3 (80%).
4. Dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (1:2) didapatkan hasil 1 sediaan yang mendapat skor 2 (4%) dan 24 sediaan mendapat skor 3 (96%).
5. Terdapat perbedaan dekalsifikasi asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA 2:1, 1:1, dan 1:2 terhadap kualitas sediaan HE tulang kepala.

B. Saran

1. Bagi teknisi laboratorium patologi anatomik dapat menjadikan larutan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA (1:1) sebagai alternatif untuk

meningkatkan intensitas warna kualitas sediaan HE dengan hasil dekalsifikasi yang relatif cepat.

2. Bagi peneliti selanjutnya untuk melakukan penelitian dengan menentukan batas waktu dalam proses dekalsifikasi, metode netralisasi setelah dekalsifikasi, dan melakukan dekalsifikasi menggunakan larutan dekalsifikasi yang lebih bervariasi.
3. Bagi peneliti selanjutnya untuk dapat melakukan penelitian lebih lanjut terkait penggunaan larutan *helly's fixative* serta pengaruh infiltrasi parafin pada spesimen tulang.
4. Bagi peneliti selanjutnya untuk dapat melakukan penelitian dengan membandingkan metode dekalsifikasi terhadap kualitas hasil pemeriksaan patologi anatomik lanjutan seperti imunohistokimia dan patologi molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

1. Susilawati dan Bachtiar, N. 2018. Biologi Dasar Terintegrasi. Pekanbaru: Kreasi Edukasi.
2. Khristian, E., dan Dewi, I. 2017. Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medis Sitohistoteknologi. Jakarta: Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Kesehatan Manusia.
3. Ramkita, N. 2022. Penanganan Jaringan Patologi Anatomi. Jakarta: Kementerian Kesehatan.
4. Fauzia, M. dkk. 2022. Tulang. Malang: Universitas Brawijaya Press.
5. Rohendi, D. 2022. Rangkuman Pengetahuan Alam Lengkap. Jakarta: BMedia.
6. Nirvana, I Wayan. 2022. Meningioma. Jakarta: Kementerian Kesehatan.
7. Kepmenkes, RI. 2020. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Tumor Otak. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
8. Fathalla, H., dkk. 2020. Extent of Hyperostotic Bone Resection in Convexity Meningioma to Achieve Pathologically Free Margins. *J Korean Neurosurg Soc.* p: 821-826.
9. Susilawati, R., dkk. 2023. Buku Ajar Histologi. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
10. Dev, P. 2023. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Singapura: Springer.
11. Dewi, Y.R., dkk. 2020. Perbedaan Kualitas Jaringan Tulang Pipa Tikus Menggunakan Larutan Sekalsifikasi Asam Nitrat 3% dan Asam Nitrat 10% dengan Pengecatan HE. *Jurnal Labora Medika*. Vol 4: 6-11.
12. Rakhmawati, dkk. 2019. Efektivitas Larutan Dekalsifikasi pada Os tibia Domba Garut (*Ovis aries*). *Jurnal Veteriner*. Vol. 20 No. 3: 403-408
13. Hansen, J. T. 2019. *Netter's Clinical Anatomy*. Philadelphia: Elsevier.
14. Anderson, B., dkk. 2023. *Anatomy, Head and Neck, Skull*. United States: StatPearls.

15. Drake, R. L., dkk., 2015. *Gray's Atlas of Anatomy*. Philadelphia: Elsevier.
16. Liu, H, dkk. 2017. Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using. *BioMed Research International*. p: 1-6
17. Kapila, S. N., Natarajan, S., Boaz, K., Pandya, J. A., & Yinti, S. R. 2015. *Driving the Mineral out Faster: Simple Modifications of the Decalcification Technique*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. p: 93-97
18. Mescher, A.L. 2017. *Histologi Dasar Junqueira: teks dan atlas*. Jakarta: EGC.
19. Raheem , E. M., Ibnouf, A.-A. O., Shingeray, O. H., & Farah, H. J. 2015. Using of Hibiscus Sabdariffa extract as a natural histological stain of the Skin. *American Journal of Research Communication*. p: 443-453
20. Setiawan, B. 2016. *Optimalisasi Metode Automatic Slide Stainer untuk Pewarnaan Jaringan menggunakan Hematoksilin-Eosin*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
21. Ariyadi, T., dan Suryono, H. 2017. *Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode Microwave Dan Conventional Histoprocessing Pewarnaan Hematoxylin Eosin*. *Jurnal Labora Medika*. p: 7-17
22. Guo, Y., dkk. 2016. JiangTang XiaoKe granule attenuates cathepsin K expression and improves IGF-1 expression in the bone of high fat diet induced KK-Ay diabetic mice. *Life Sciences*.
23. Musyarifah, Z., & Agus, S. 2018. *Proses Fiksasi pada Pemeriksaan Histopatologik*. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 7(3): 443-453.
24. Laure, A.S.T. 2023. *Gambaran Kualitas Sediaan Jaringan Dekalsifikasi Dengan Larutan Asam Nitrat 3%, 10%, dan 15% Menggunakan Pewarnaan Hematoxylin-Eosin*. Diploma Thesis. Poltekkes Kemenkes Kupang.

Lampiran 1 Permohonan Izin Kaji Etik Penelitian



Kementerian Kesehatan
Poltekkes Jakarta III

Jalan Arteri JORR Jatiwarna Pondok Melati
Bekasi, Jawa Barat 17415
(021) 84978693
<https://poltekkesjakarta3.ac.id>

Nomor : PP.07.01/F.XIX/4228/2024
Hal : Permohonan Izin Kaji Etik Penelitian
a.n Qudsiyati Maftufah dkk

26 Maret 2024

Yth. Direktur RS Pusat Otak Nasional
Prof. Dr.dr. Mahar Mardjono Jakarta
Di Tempat

Dalam rangka memenuhi kredit semester dalam kurikulum pendidikan mahasiswa Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Jakarta III, mahasiswa tingkat akhir diwajibkan untuk membuat Skripsi. Terkait hal tersebut, maka kami mohon kiranya diberikan izin Kaji Etik Penelitian di tempat yang Bapak/Ibu pimpin.

Mahasiswa yang akan melaksanakan Kaji Etik adalah :

No	Nama	NIM	Judul Penelitian
1.	Qudsiyati Maftufah	P3.73.34.2.23.213	Korelasi antara Jumlah Leukosit dengan Glukosa Spesimen Cairan Otak pada Pasien Meningitis Bakterial
2	Dita Kinesti	P3.73.34.2.23.182	Korelasi antara Jumlah Leukosit dengan kadar Protein Spesimen Cairan Otak pada Pasien Meningitis Bakterial
3	Diyan Harisna	P3.73.34.2.23.183	Perbandingan Dekalsifikasi Asam nitrat 10% dengan dan tanpa penambahan EDTA terhadap kualitas sediaan Hematoksin Eosin (HE) Tulang kepala

Demikian permohonan ini kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

Direktur,
Yupi Supartini, S.Kp, M.Sc
NIP. 196209141985032002

Tembusan :

Komite Etik RS Pusat Otak Nasional Prof. Dr.dr. Mahar Mardjono Jakarta

Kementerian Kesehatan tidak menerima suap dan/atau gratifikasi dalam bentuk apapun. Jika terdapat potensi suap atau gratifikasi silahkan laporkan melalui HALO KEMENKES 1500567 dan <https://wbs.kemkes.go.id> Untuk verifikasi keaslian tanda tangan elektronik, silahkan unggah dokumen pada laman <https://tte.kominfo.go.id/verifyPDF>



Lampiran 2 Izin Penelitian


Kementerian Kesehatan
RSPON Mahar Mardjono

Jalan M.T. Haryono Kavling 11, Cawang
 Jakarta 13630

(021) 29373377

<https://www.rspn.co.id>

Nomor : DP.04.03/D.XXIII/1057/2024

3 Juni 2024

Hal : Izin Penelitian

Yth. Direktur
 Politeknik Kesehatan
 Kementerian Kesehatan Jakarta III
 Bekasi, Jawa Barat 17415

Sehubungan dengan adanya surat Permohonan Izin Kaji Etik Penelitian a.n Qudsiyati Maftufah dkk dari Direktur Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jakarta III nomor PP.07.01/F.XIX/4228/2024 tanggal 26 Maret 2024 dan memperhatikan Surat Keterangan Komite Etik Penelitian Rumah Sakit Pusat Otak Nasional Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta nomor DP.04.03/D.XXIII.9/98/2024 tanggal 30 Mei 2024 atas nama peneliti sebagai berikut:

nama peneliti : Diyan Harisna, A.Md.AK
 judul penelitian : Perbandingan Dekalsifikasi Asam Nitrat 10% Dengan dan Tanpa Penambahan EDTA terhadap Kualitas Sediaan *Hematoksilin-Eosin* (HE) Tulang Kepala
 asal instansi : Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jakarta III

Maka kami sampaikan bahwa pada prinsipnya kami dapat menyetujui permohonan kegiatan penelitian tersebut. Kegiatan penelitian tersebut dapat dimulai segera setelah surat izin ini diterima oleh peneliti yang bersangkutan. Untuk informasi lebih lanjut dapat menghubungi sdr. Yenni Syafitri di Nomor HP 0878-3989-4930 / Anindita Yuda di Nomor HP 0896-3564-9402 pada Komite Etik Penelitian Rumah Sakit Pusat Otak Nasional Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta.

Demikian kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

Direktur Utama RSPON Prof. Dr. dr. Mahar
 Mardjono Jakarta,



dr. ADIN NULKHASANAH, Sp.S., MARS

Kementerian Kesehatan tidak menerima suap dan/atau gratifikasi dalam bentuk apapun. Jika terdapat potensi suap atau gratifikasi silahkan laporkan melalui HALO KEMENKES 1500567 dan <https://ybs.kemkes.go.id>. Untuk verifikasi keaslian tanda tangan elektronik, silahkan unggah dokumen pada laman <https://te.kominfo.go.id/verifyPDF>.



Dokumen ini telah ditandatangani secara elektronik yang diterbitkan oleh Balai Sertifikasi Elektronik (BSrE), BSSN

Lampiran 3 Surat Keterangan Kaji Etik Penelitian



Kementerian Kesehatan
RSPON Mahar Mardjono

Jalan M.T. Haryono Kavling 11, Cawang
Jakarta 13630
(021) 29373377
<https://www.rspn.co.id>

KOMITE ETIK PENELITIAN
RUMAH SAKIT PUSAT OTAK NASIONAL
PROF. Dr. dr. MAHAR MARDJONO JAKARTA

SURAT KETERANGAN

Nomor : DP.04.03/D.XXIII.9/98/2024

Setelah menelaah usulan dan protokol penelitian dibawah ini, Komite Etik Penelitian Rumah Sakit Pusat Otak Nasional Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta menyatakan bahwa penelitian dengan judul :

“Perbandingan Dekalsifikasi Asam Nitrat 10% Dengan dan Tanpa Penambahan EDTA terhadap Kualitas Sediaan *Hematoksin-Eosin* (HE) Tulang Kepala”

Peneliti Utama : Diyan Harisna, A.Md.AK
Asal Institusi : Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jakarta III

Dapat disetujui pelaksanaannya dengan syarat :

1. Tidak bertentangan dengan nilai-nilai kemanusiaan dan kode etik penelitian
2. Melaporkan jika terdapat amandemen protokol penelitian
3. Melaporkan penyimpangan/ pelanggaran terhadap protokol penelitian
4. Melaporkan secara periodik perkembangan penelitian dan laporan akhir
5. Melaporkan kejadian yang tidak diinginkan
6. Mengikutsertakan peneliti mitra dari RSPON Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono apabila hasil penelitian ini akan dipublikasikan ke Jurnal Nasional maupun Internasional.

Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu maksimum selama 1 (satu) tahun.

30 Mei 2024

Ketua Komite Etik Penelitian RSPON
Prof.Dr.dr. Mahar Mardjono Jakarta,



dr. Ita Muharram Sari, Sp.S

Kementerian Kesehatan tidak menerima suap dan/atau gratifikasi dalam bentuk apapun. Jika terdapat potensi suap atau gratifikasi silahkan laporkan melalui HALO KEMENKES 1500567 dan <https://whs.kemkes.go.id>. Untuk verifikasi keaslian tanda tangan elektronik, silahkan unggah dokumen pada laman <https://ite.kominfo.go.id/verifyPDE>.



Lampiran 4 Surat Pernyataan Kesiediaan Untuk Dimuat Dalam Majalah/Jurnal

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Diyan Harisna

NIM : P3.73.34.2.23.183

Program Studi : Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil penelitian saya dengan judul “Pengaruh Kombinasi Asam Nitrat 10% dengan EDTA pada Proses Dekalsifikasi Tulang Kepala terhadap Kualitas Sediaan Hematoksin-Eosin (HE)” bersedia untuk dimuat di dalam majalah atau jurnal ilmiah atas nama pembimbing dengan tetap mencantumkan nama saya sebagai peneliti utama.

Bekasi, Juni 2024
Yang membuat pernyataan



(Diyan Harisna)
NIM. P3.73.34.2.23.183

Lampiran 5 Data Hasil Penelitian

HASIL PENGAMATAN KUALITAS SEDIAAN HE TULANG KEPALA

Angka	Kriteria	Skala Ordinal
1	Warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas serta warna pada preparat tidak seragam. Sediaan tidak bisa didiagnosis.	Tidak baik
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
3	Warna biru terang pada inti sel, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat serta warna pada preparat seragam.	Baik

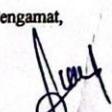
Sampel	Hasil
1	3
2	2
3	1
4	2
5	2
6	2
7	1
8	1
9	1
10	2
11	2
12	2
13	1
14	2
15	1
16	2
17	1
18	2
19	1
20	2
21	1
22	1
23	1
24	1
25	1

Sampel	Hasil
26	3
27	3
28	3
29	3
30	3
31	2
32	3
33	1
34	3
35	2
36	2
37	2
38	3
39	2
40	2
41	2
42	2
43	2
44	2
45	2
46	2
47	3
48	2
49	2
50	2

Sampel	Hasil
51	3
52	3
53	3
54	3
55	3
56	3
57	2
58	3
59	3
60	3
61	3
62	3
63	3
64	3
65	2
66	2
67	3
68	3
69	2
70	2
71	3
72	3
73	3
74	3
75	3

Sampel	Hasil
76	3
77	3
78	3
79	3
80	3
81	3
82	3
83	3
84	3
85	3
86	3
87	3
88	3
89	3
90	3
91	3
92	3
93	3
94	2
95	3
96	3
97	3
98	3
99	3
100	3

Pengamat,


 dr. Hastrina Mailani, Sp.P.A
 NIP 198603282012122001

Lampiran 6 *Print Out* Analisis Statistik**Statistics**

		Jenis Dekalsifikasi	Kualitas Sediaan HE
N	Valid	100	100
	Missing	0	0

Jenis Dekalsifikasi * Kualitas Sediaan HE Crosstabulation

		Kualitas Sediaan HE			Total	
		Tidak baik	Kurang baik	Baik		
Jenis Dekalsifikasi	Asam nitrat 10%	Count	13	11	1	25
		% within Jenis Dekalsifikasi	52,0%	44,0%	4,0%	100,0%
		% within Kualitas Sediaan HE	92,9%	34,4%	1,9%	25,0%
		% of Total	13,0%	11,0%	1,0%	25,0%
	Asam nitrat 10% + EDTA (2:1)	Count	1	15	9	25
		% within Jenis Dekalsifikasi	4,0%	60,0%	36,0%	100,0%
		% within Kualitas Sediaan HE	7,1%	46,9%	16,7%	25,0%
		% of Total	1,0%	15,0%	9,0%	25,0%
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:1)	Count	0	5	20	25
		% within Jenis Dekalsifikasi	0,0%	20,0%	80,0%	100,0%
		% within Kualitas Sediaan HE	0,0%	15,6%	37,0%	25,0%
		% of Total	0,0%	5,0%	20,0%	25,0%
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	Count	0	1	24	25
		% within Jenis Dekalsifikasi	0,0%	4,0%	96,0%	100,0%
		% within Kualitas Sediaan HE	0,0%	3,1%	44,4%	25,0%
		% of Total	0,0%	1,0%	24,0%	25,0%
Total	Count	14	32	54	100	
	% within Jenis Dekalsifikasi	14,0%	32,0%	54,0%	100,0%	
	% within Kualitas Sediaan HE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	14,0%	32,0%	54,0%	100,0%	

Case Processing Summary

	Jenis Dekalsifikasi	Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kualitas	Asam nitrat 10%	25	100,0%	0	0,0%	25	100,0%
Sediaan HE	Asam nitrat 10% + EDTA (2:1)	25	100,0%	0	0,0%	25	100,0%
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:1)	25	100,0%	0	0,0%	25	100,0%
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	25	100,0%	0	0,0%	25	100,0%

Tests of Normality

	Jenis Dekalsifikasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kualitas	Asam nitrat 10%	,333	25	,000	,721	25	,000
Sediaan HE	Asam nitrat 10% + EDTA (2:1)	,357	25	,000	,721	25	,000
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:1)	,488	25	,000	,493	25	,000
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	,539	25	,000	,203	25	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Jenis Dekalsifikasi	N	Mean Rank
Kualitas Sediaan HE	Asam nitrat 10%	25	20,26
	Asam nitrat 10% + EDTA (2:1)	25	45,06
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:1)	25	64,90
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	25	71,78
	Total	100	

Test Statistics^{a,b}

Kualitas Sediaan

HE

Kruskal-Wallis H	59,039
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Jenis

Dekalsifikasi

Mann-Whitney Test**Ranks**

Jenis Dekalsifikasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kualitas Sediaan HE	Asam nitrat 10%	25	17,82	445,50
	Asam nitrat 10% + EDTA (2:1)	25	33,18	829,50
	Total	50		

Test Statistics^a

Kualitas Sediaan HE

Mann-Whitney U	120,500
Wilcoxon W	445,500
Z	-4,090
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: Jenis Dekalsifikasi

Ranks

Jenis Dekalsifikasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kualitas Sediaan HE	Asam nitrat 10%	25	14,70	367,50
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:1)	25	36,30	907,50
Total		50		

Test Statistics^a

Kualitas Sediaan HE

Mann-Whitney U	42,500
Wilcoxon W	367,500
Z	-5,598
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: Jenis Dekalsifikasi

Ranks

Jenis Dekalsifikasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kualitas Sediaan HE	Asam nitrat 10%	25	13,74	343,50
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	25	37,26	931,50
	Total	50		

Test Statistics^a

Kualitas Sediaan HE	
Mann-Whitney U	18,500
Wilcoxon W	343,500
Z	-6,210
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: Jenis Dekalsifikasi

Ranks

Jenis Dekalsifikasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kualitas Sediaan HE	Asam nitrat 10% + EDTA (2:1)	25	19,90	497,50
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:1)	25	31,10	777,50
Total		50		

Test Statistics^a

Kualitas Sediaan HE	
Mann-Whitney U	172,500
Wilcoxon W	497,500
Z	-3,155
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002

a. Grouping Variable: Jenis Dekalsifikasi

Ranks

Jenis Dekalsifikasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kualitas Sediaan HE	Asam nitrat 10% + EDTA (2:1)	25	17,98	449,50
	Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	25	33,02	825,50
Total		50		

Test Statistics^a

Kualitas Sediaan HE	
Mann-Whitney U	124,500
Wilcoxon W	449,500
Z	-4,424
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: Jenis Dekalsifikasi

Ranks

Jenis Dekalsifikasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kualitas Sediaan	Asam nitrat 10% + EDTA (1:1)	25	23,50	587,50
HE	Asam nitrat 10% + EDTA (1:2)	25	27,50	687,50
Total		50		

Test Statistics^a

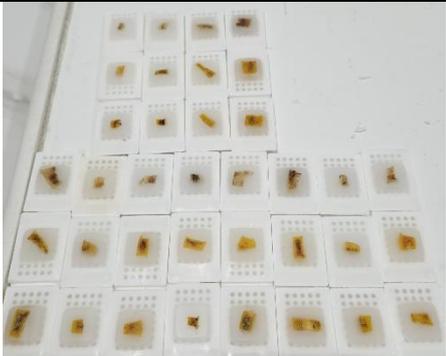
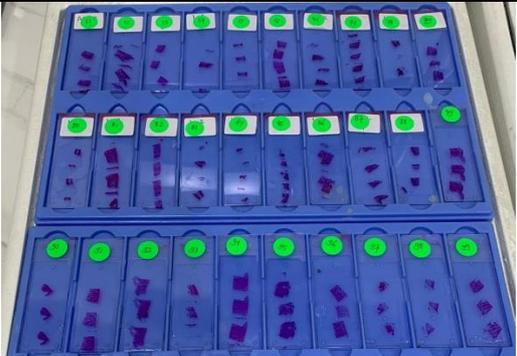
Kualitas Sediaan HE	
Mann-Whitney U	262,500
Wilcoxon W	587,500
Z	-1,723
Asymp. Sig. (2-tailed)	,085

a. Grouping Variable: Jenis Dekalsifikasi

Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian

Alat pemeriksaan penelitian



Contoh sampel tulang kepala	Proses pemotongan tulang
	
Spesimen tulang 1 hari dengan dekalsifikasi asam nitrat 10% + EDTA terdapat endapan putih	Sampel tulang yang sudah dipotong
	
Blok parafin spesimen tulang	Sediaan HE
	

Lampiran 8 Prosedur Pemeriksaan

PROSEDUR DEKALSIFIKASI

1. Jaringan tulang yang telah difisasi dengan neutral formalin buffer 10% dipotong dengan alat pemotong tulang dengan ukuran 1 x 1 x 0,5 cm.
2. Jaringan yang telah dipotong dimasukkan ke dalam pot kemudian direndam dengan cairan dekalsifikasi.
3. Jaringan tulang diperiksa kelunakannya setiap hari
4. Jaringan tulang yang telah lunak dimasukkan ke dalam kaset kemudian dialiri dengan air mengalir selama 15 menit

PROSEDUR PEMBUATAN SEDIAAN

1. Wadah kaset yang berisi potongan jaringan diolah dengan mesin prosesing otomatis dengan tahapan dehidrasi, *clearing*, dan impregnasi.
2. Setelah prosesing mesin selesai, dilakukan *embedding* dengan membuat blok parafin menggunakan alat Myr.
3. Blok parafin dilakukan *trimming* menggunakan mikrotom, kemudian dilakukan *sectioning* dengan ketebalan 3 mikron.
4. Potongan pita jaringan / hasil *sectioning* dimasukkan kedalam *waterbath* berisi air hangat bersuhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$, kemudian ditempelkan pada kaca objek dan ditiriskan, selanjutnya dipanaskan pada *hot plate* suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit.
5. Sediaan dilakukan *clearing* menggunakan xylene selama 20 menit.

PROSEDUR PEWARNAAN HEMATOKSILIN-EOSIN (HE)

1. Xylol I, 10 menit
2. Xylol II, 10 menit
3. Alkohol absolut, 10 menit
4. Alkohol 96%, 10 menit
5. Alkohol 70%, 10 menit
6. Air Mengalir, 5 menit

7. Hematoxyline mayer, 5 menit
8. Air mengalir, 3 menit
9. Alkohol 96%, 1 menit
10. Eosin , 50 menit
11. Alkohol 96%, 5 menit
12. Alkohol 96%, 5 menit
13. Alkohol absolute, 10 menit
14. Xylol I, 20 menit
15. Sediaan ditutup dengan deckglass yang sudah diberi entellan

Lampiran 9 Lembar Bimbingan

KEMENTERIAN KESEHATAN R.I. POLTEKKES JAKARTA III
 JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
 PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
 KELAS REKOGNISI PEMBELAJARAN LAMPAU (RPL)

AGENDA BIMBINGAN
 PENYUSUNAN SKRIPSI

MAHASISWA

NAMA : Dijan Harisna
 NIM : P3.73.34.2.23.183

PEMBIMBING II (TEKNIS)

NAMA : Burhannudin, M.Sc
 NIP : 198810082020121002

NO	TANGGAL BIMBINGAN	URAIAN MATERI YANG DIKONSULTASIKAN	SARAN/MASUKAN	TANDA TANGAN PEMBIMBING
1.	12/1/2024	Konsultasi Judul Skripsi	Perbedaan diganti Perbandingan	<i>[Signature]</i>
2.	2/2/2024	Konsultasi Bab I	Tambahkan alasan ingin dilakukan penelitian tsb. Lanjut sampai Bab III	<i>[Signature]</i>
3.	15/3/2024	Konsultasi Bab I-III	Perbaiki kerangka konsep, Definisi operasional	<i>[Signature]</i>
4.	20/3/2024	Revisi Bab I-III	Tambahkan variabel Asam nitrat 10% + EDTA 2:1:1, 1:2	<i>[Signature]</i>
5.	21/3/2024	Revisi Bab I-III	Lanjut pengajuan Kaji Etik	<i>[Signature]</i>
6.	23/5/2024	Konsultasi Bab IV	Tambahkan keterangan Lunak / tidak lunak pd tabel hasil uji pendahuluan.	<i>[Signature]</i>
7.	30/5/2024	Revisi Bab IV	Perbaiki pengajian hasil	<i>[Signature]</i>
8.	4/6/2024	Revisi Bab IV	Tambahkan pembahasan Lanjut Bab V	<i>[Signature]</i>
9.	6/6/2024	Konsultasi Bab IV-V	Tambahkan keterbatasan penelitian pd pembahasan	<i>[Signature]</i>
10.	13/6/2024	Revisi Bab IV-V	Perbaiki simpulan & Saran Lanjut Abstrak	<i>[Signature]</i>
11.	19/6/2024	Abstrak dan Lampiran	Perbaiki penulisan	<i>[Signature]</i>
12.	30/7/2024	Revisi pasca sidang	siap uji 19/6 '24 Revisi - Selesai - 27/09 '24	<i>[Signature]</i>

CATATAN:

- Pembimbingan minimal 12 (dua belas) kali (mulai dari penyusunan proposal sampai dengan perbaikan setelah sidang skripsi)
- Apabila mahasiswa telah menyelesaikan bimbingan minimal 10 kali, pembimbing menuliskan "SIAP UJI" pada bagian akhir agenda sebagai dasar penjadwalan Sidang Skripsi
- Bimbingan selanjutnya dapat dilakukan setelah Ujian Sidang Skripsi (perbaikan)

KEMENTERIAN KESEHATAN R.I. POLTEKKES JAKARTA III
 JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
 PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
 KELAS REKOGNISI PEMBELAJARAN LAMPAU (RPL)

AGENDA BIMBINGAN
 PENYUSUNAN SKRIPSI

MAHASISWA

NAMA : Diyah Harisna
 NIM : P3.73.34.2.23.183

PEMBIMBING I (MATERI)

NAMA : dr. Hastina Mailani, Sp.PA
 NIP : 19860528 2012 12 2 001

NO	TANGGAL BIMBINGAN	URAIAN MATERI YANG DIKONSULTASIKAN	SARAN/MASUKAN	TANDA TANGAN PEMBIMBING
1.	8/1/2024	Konsultasi judul Skripsi	Lanjut Bab I	
2.	30/1/2024	Konsultasi Bab I	Perbaiki Latar Belakang	
3.	13/2/2024	Revisi Bab I	Lanjut Bab II	
4.	18/2/2024	Konsultasi Bab II	- Perbaiki kerangka teori - Tambahkan referensi	
5.	10/3/2024	Konsultasi Bab III	Perbaiki variabel	
6.	18/3/2024	Konsultasi Bab I-III	Siap uji Etik	
7.	7/5/2024	Konsultasi Hasil Penelitian	Perbaiki Penyajian Hasil	
8.	28/5/2024	Konsultasi Bab IV	Perbaiki dan tambahkan referensi pembahasan	
9.	3/6/2024	Revisi Bab IV	Perbaiki penulisan	
10.	10/6/2024	Konsultasi Bab V	Lanjut Abstrak	
11.	14/6/2024	Abstrak & Lampiran	Perhatikan penulisan	
12.	27/9/2024	Revisi pasca sidang	Siap uji 19/6-24 - selesai - 27/09 '24	

CATATAN:

- Pembimbingan minimal 12 (dua belas) kali (mulai dari penyusunan proposal sampai dengan perbaikan setelah sidang skripsi)
- Apabila mahasiswa telah menyelesaikan bimbingan minimal 10 kali, pembimbing menuliskan "SIAP UJI" pada bagian akhir agenda sebagai dasar penjadwalan Sidang Skripsi
- Bimbingan selanjutnya dapat dilakukan setelah Ujian Sidang Skripsi (perbaikan)