

## PEMANFAATAN METODE STEREOLOGI PADA PENELITIAN DENGAN SEDIAAN HISTOLOGI

Rina Susilowati

Departemen Histologi dan Biologi Sel,  
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada  
\*Email: rina\_susilowati@ugm.ac.id

### ABSTRAK

Pengamatan sediaan histologi di bawah mikroskop membuat jaringan yang merupakan struktur tiga dimensi diamati dalam bentuk gambaran dua dimensi. Hal tersebut mengakibatkan bangunan yang ada dalam jaringan terlihat berbeda. Volume bangunan tampak sebagai area, area permukaan terlihat seperti garis, bangunan yang panjang terlihat sebagai profil (penampang irisan). Pada irisan yang diamati, jumlah suatu obyek tidak tampak secara keseluruhan. Karena itu untuk melakukan kuantifikasi secara obyektif diperlukan metode yang tidak bias. Stereologi adalah gabungan antara geometri dan statistik yang digunakan sebagai metode untuk melakukan kuantifikasi struktur tiga dimensi dari gambaran dua dimensi. Hal yang perlu diperhatikan adalah pengambilan sampel dan pemilihan "probe" yang tepat. Pengambilan sampel harus dijaga supaya tidak bias dengan menggunakan prinsip "systematic uniform random sampling". "Probe" merupakan bangunan geometri yang digunakan untuk melakukan kuantifikasi pada irisan jaringan 2 dimensi. Jumlah dimensi "probe" dengan dimensi bangunan yang diperiksa adalah 3. Optimasi metode stereologi dilakukan dengan mempertimbangkan variasi biologis dan variasi yang didapat dari pengambilan sampel pada satu individu. Secara umum pekerjaan akan optimal bila jumlah hitungan pada satu individu sekitar 100-200 dari 6 hingga 15 irisan. Dengan menggunakan teknik stereologi didapatkan perkiraan volume, luas, panjang dan jumlah yang mendekati nilai yang sebenarnya.

**Kata kunci:** stereologi, irisan histologi, kuantifikasi, perkiraan jumlah, perkiraan volume

### LATAR BELAKANG

Sediaan histologi yang diamati dengan mikroskop cahaya dapat memberi gambaran umum struktur sel dan matriks ekstraseluler pada jaringan yang diperiksa, gambaran sel tertentu serta ekspresi RNA atau protein pada sel dan struktur subseluler. Pemeriksaan sediaan histologi pada berbagai penelitian dapat digunakan untuk melihat gambaran struktur umum suatu jaringan atau lokasi suatu protein di dalam sel atau jaringan. Namunkadang penelitian dengan sediaan histologi jugabertujuan mendapatkan data untuk analisis kuantitatif, misalnya jumlah sel, luas area atau panjang suatu bangunan pada irisan jaringan. Data kuantitatif memungkinkan kita untuk melakukan analisis statistik untuk membuat simpulan tentang perubahan patologis atau efek terapi yang dipelajari.

Ketika mengamati irisan jaringan yang merupakan struktur dua dimensi, kita harus mampu membayangkan struktur tersebut sebagai suatu struktur tiga dimensi. Misalnya, gambaran glomerulus renalis, folliculus ovarii, nodulus lymphaticus yang merupakan struktur membulat seperti bola, pada irisan jaringan hanya akan dapat diamati sebagai suatu gambaran lingkaran atau oval. Luas permukaan seperti luas permukaan epithelium intestinalis, luas permukaan pertukaran gas di alveoli yang memiliki dua dimensi hanya akan dapat diamati sebagai garis. Panjang suatu obyek seperti panjang pembuluh darah dan ductus excretorius glandula sudorifera hanya akan dapat diamati sebagai profil (penampang irisan). Jumlah

suatu obyek seperti jumlah sel, jumlah glomerulus renal tidak dapat dilihat secara keseluruhan dalam satu irisan. Karena itu, untuk dapat melakukan kuantifikasi obyek pada jaringan yang merupakan struktur tiga dimensi ini perlu dilakukan pendekatan yang tepat.

Dalam jaringan tiga dimensi, distribusi obyek yang diamati seringkali tidak sepenuhnya merata. Misalnya distribusi insula pancreatica, distribusi sel kanker pada hepar dan paru hewan cobakan sebagainya. Karena itu, pengamatan pada satu irisan tidak mampu memberikan gambaran yang utuh tentang keberadaan obyek yang diamati pada seluruh jaringan yang diperiksa. Pembuatan sediaan histologi hanya dapat memproses jaringan dalam ukuran yang tidak terlalu besar sehingga hanya sebagian kecil saja sampel jaringan yang dapat diamati di bawah mikroskop. Untuk mendapatkan perkiraan yang akurat, pengambilan sampel dalam jumlah dan tempat yang tepat untuk mewakili seluruh jaringan, merupakan suatu keharusan. Prinsip yang sama juga digunakan pada metode pemilihan sampel hitung cepat hasil pemilihan umum (Estok, *et al.*, 1964). Sampel responden dipilih secara acak sehingga mampu mewakili seluruh pemilih terdaftar. Bila responden tidak dipilih secara acak, hasilnya akan bias. Dalam hal pengamatan pada irisan histologi, peneliti juga tidak sepatutnya memilih bagian jaringan yang akan diamati, karena akan menimbulkan bias pada kuantifikasi yang dilakukan. Semua bagian dari organ yang diperiksa harus memiliki kesempatan yang sama untuk diambil sebagai sampel. Karena itu pengambilan sampel jaringan perlu dilakukan secara acak dan sistematis (Boyce *et al.*, 2010; West, 2012a).

Stereologi memiliki akar bahasa dari bahasa Yunani yang berarti pengamatan obyek tiga dimensi. Stereologi juga digunakan di berbagai bidang lain, tidak hanya pada bidang biologi. Sebagai suatu cabang ilmu, stereologi mulai digunakan tahun 1961 dalam suatu pertemuan para ilmuwan biologi, geologi, rekayasa dan ilmu material. Prinsip geometri, matematika dan statistik digunakan untuk mempelajari obyek menggunakan teknik pengambilan sampel yang tidak bias (West, 2012; Mühlfeld & Ochs, 2013). Di bidang histologi, selain pengamatan dengan mikroskop cahaya, stereologi juga dapat diterapkan pada jaringan yang diamati dengan mikroskop elektron dan berbagai metode pencitraan lainnya yang menghasilkan gambaran dua dimensi.

Parameter dasar yang dapat diperkirakan pada irisan jaringan adalah volume, luas, panjang dan jumlah. Untuk melakukan kuantifikasi, perlu digunakan "probe" (bangunan geometri yang digunakan untuk melakukan kuantifikasi pada irisan jaringan 2 dimensi), yang sesuai. Volume merupakan bangun berdimensi 3 dan untuk melakukan perkiraan volume digunakan "probe" berupa titik yang tidak memiliki dimensi (dimensi 0). Area berdimensi 2 dan diperkirakan dengan "probe" berdimensi 1 yaitu garis. Panjang memiliki dimensi 1 dan perkiraan panjang dilakukan menggunakan "probe" berupa area yang berdimensi 2. Jumlah tidak memiliki dimensi sehingga untuk melakukan perkiraan jumlah perlu menggunakan "probe" berdimensi 3 yaitu volume. Bila kita perhatikan, jumlah dimensi bangunan yang diamati dan dimensi "probe" yang digunakan selalu sama dengan 3. Pemilihan "probe" yang tepat merupakan salah satu kunci mendapatkan perkiraan yang akurat pada penelitian dengan teknik stereologi (Howard & Reed, 2005; Boyce, *et al.*, 2010; West, 2012a).

Pada tulisan ini dipaparkan prinsip stereologi secara umum, pengambilan sampel, metode perkiraan volume dan jumlah serta optimasi pada penelitian yang menggunakan teknik stereologi. Paparan yang dikemukakan diupayakan untuk dapat meningkatkan pengenalan dan pemahaman awal tentang stereologi. Rincian teknik yang lebih lanjut tentunya perlu dipelajari dengan membaca referensi yang diacu.

### **Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel perlu dilakukan dengan cara acak dan sistematis. Mengapa tidak sekedar acak saja? Pengambilan sampel yang acak dapat memberikan hasil berupa

pengelompokan sampel yang terambil (“clusters”) atau adanya jarak yang lebar antar sampel terambil (“gaps”) (Howard & Reed, 2005). Dengan demikian dapat terjadi pengambilan sampel berlebihan pada satu tempat namun juga dapat terjadi kehilangan sampel pada tempat yang justru sangat berarti (gambar 1). Hal tersebut dapat mengarah pada kesimpulan hasil penelitian yang bias.

Organ yang berukuran besar, misalnya hepar mencit, ginjal dan paru tikus, tidak dapat dipersiapkan sampelnya dalam satu blok saja karena keterbatasan metode fiksasi dan proses pembuatan irisan, pengecatan serta mikroskop yang digunakan. Karena itu, pengambilan sampel organ yang besarterbagi menjadi beberapa langkah. Langkah pertama adalah pemilihan blok jaringan, langkah kedua adalah pengambilan irisan jaringan dilanjutkan dengan pengambilan sampel area pada irisan jaringan yang akan diamati. Pada sampel berukuran kecil misalnya hippocampus, glandula adrenal dan ganglion tikus atau mencit, seluruh organ dapat diambil sebagai sampel awal pembuatan blok. Pengambilan sampel yang acak dan sistematis (“Systematic Uniform Random Sampling”-SURS) sangat penting untuk mendapatkan hasil yang tidak bias. Salah satu metode untuk mengambil sampel secara acak dan sistematis adalah dengan teknik “smooth fractionator” (Gardi, *et al.*, 2006).

Adanya orientasi pada struktur jaringan membuat pemilihan arah irisan menjadi sumber bias. Istilah “isotropy” (berasal dari bahasa Yunani, “iso” yang berarti sama dan “tropos” yang berarti arah) menggambarkan adanya keseragaman dan nilai yang sama pada semua parameter pada semua arah. Bila jaringan bersifat “isotropy” maka arah pengirisan tidak memberikan pengaruh yang besar pada kemungkinan bagian-bagian jaringan tersebut untuk terambil menjadi sampel. Namun demikian, sebagian besar jaringan dan sel bersifat “anisotropy” misalnya neuron memiliki akson dan dendrit yang tidak terdistribusi sama pada semua arah; jaringan otot memiliki sel dengan orientasi arah tertentu; vasa darah dan intestinum juga memanjang pada satu arah tertentu. Hal tersebut dapat menimbulkan bias terutama bila kita ingin memperkirakan panjang dan luas di dalam irisan jaringan dan juga perkiraan lokal (“local estimator”) seperti volume sel (Howard & Reed, 2005; West, 2013c). Untuk mencegah bias kita harus membuat semua bagian jaringan yang bersifat “anisotropy” memiliki kemungkinan yang sama untuk diamati sebagai sampel. Beberapa teknik yang dikembangkan adalah dengan “orientator”, “isector” dan pengirisan vertikal (“vertical section”). Namun demikian, kondisi “anisotropy” tersebut dapat ditoleransi bila pengenalan struktur akan sulit dilakukan ketika kita menggunakan “orientator”, “isector” atau pengirisan vertikal. Misalnya pada irisan kulit, epidermis atau dermis mungkin tidak didapatkan bila irisan dibuat dengan arah yang acak. Untuk lebih dalam mempelajari tentang “isotropy”, paparan referensi berikut dapat dibaca lebih lanjut (Howard & Reed, 2005; West, 2013a).

Prinsip pengambilan sampel secara acak dan sistematis sangat penting dalam rancangan metode stereologi (Gundersen & Jensen, 1987; Howard & Reed, 2005). Pada prinsipnya peneliti memilih fraksi sampel yang akan diambil ( $1/f$ ). Prinsip acak dalam hal ini diterapkan pada pengambilan irisan/blok jaringan yang pertama. Prinsip sistematis diterapkan pada pemilihan irisan/blok jaringan yang kedua dan seterusnya. Contohnya, ketika suatu organ diiris dengan ketebalan 3 mm dengan arah sejajar dihasilkan 23 irisan (irisan 1-23, gambar 2). Bila kita memutuskan mengambil  $1/4$  sampel saja maka setiap 4 irisan akan diambil. Irisan yang pertama kali diambil, diputuskan dengan mengambil bilangan acak antara 1-4. Misalnya didapat angka acak 2, maka irisan 2 diambil sebagai sampel pertama. Irisan berikutnya diambil setiap 4 irisan, yaitu irisan ke 6, 10, 14, 18 dan 22. Irisan lain dapat dibuang atau digunakan sebagai sampel teknik pemeriksaan lain, misalnya pemeriksaan biokimiawi atau diproses untuk disimpan di bank jaringan. Bila ukuran atau jumlah sampel masih terlalu besar, langkah yang sama dapat diulang sehingga terambil sampel yang dapat diolah dengan mudah namun mewakili seluruh bagian organ yang diperiksa. Misalnya, dari

sampelyang terambil pada langkah di atas hanya 1/5 saja yang kemudian diteruskan menjadi blok parafin. Hal yang sama juga dilakukan bila sampel tersebut sudah dibuat blok parafin dan akan diambil fraksi sampel irisannya. Misalnya, diputuskan akan membuat irisan dengan ketebalan 3  $\mu\text{m}$  dan fraksi yang diambil adalah setiap 100 irisan. Bila dengan mengambil angka acak didapat irisan 16 yang diambil sebagai irisan pertama, maka irisan yang diambil adalah irisan 16, 116, 216, 316 dan seterusnya.

Area pada satu irisan jaringan yang diamati di bawah mikroskop juga dapat diambil fraksi sampelnya. Misalnya hanya 1/5 saja yang diamati. Tentunya distribusi area yang diamati juga harus tersebar secara acak pada seluruh irisan jaringan, dan tidak dipilih oleh pengamat. Caranya adalah membuat deretan segi empat dengan panjang dan lebar yang diketahui, berderet ke bawah dan ke samping dengan jarak yang sama satu sama lain (lihat gambar 3). Hanya area di dalam segi empat tersebut yang diamati. Pada contoh di atas fraksi sampel yang diamati adalah  $\frac{1}{4}$  dikalikan  $\frac{1}{5}$  dikalikan  $\frac{1}{100}$  dikalikan  $\frac{1}{5} = \frac{1}{10000}$ . Hanya sebagian kecil sampel jaringan yang diamati namun pemilihan fraksi sampel tersebut dilakukan secara acak dan sistematis. Penyusunan rencana kerja sebelum penelitian dimulai tentunya memegang peranan yang sangat penting untuk mendapatkan hasil yang baik.

### Perkiraan Volume

Perkiraan volume telah dikembangkan sebelum stereologi sebagai cabang ilmu dikembangkan. Bonaventura Cavalieri pada tahun 1637 mengembangkan prinsip bahwa volume suatu obyek dapat diperkirakan secara akurat dengan cara menjumlahkan luas area permukaan irisan obyek tersebut. Pada tahun 1930, diperkenalkan teknik hitung titik ("point counting") yang mempermudah perkiraan luas area permukaan irisan (Howard & Reed, 2005; West, 2012b; Mühlfeld & Ochs, 2013).

Perkiraan volume dapat dilakukan dengan menghitung jumlah titik yang jatuh pada permukaan irisan obyek tersebut (gambar 4). Sebagai contoh, suatu obyek diiris sejajar dengan jarak yang diketahui ( $t$ ). Pada setiap hasil irisan, permukaan irisan sebelah kiri diletakkan di atas. Suatu "probe" berisi titik yang berjarak sama satu sama lain dan mewakili luas area tertentu ( $a$ ) diletakkan di atas irisan jaringan tersebut. Jumlah titik yang jatuh pada irisan jaringan dihitung ( $p$ ). Volume obyek tersebut dapat diperkirakan dari  $V = p \cdot a \cdot t$ . Penghitungan titik juga dapat dilakukan pada sebagian sampel saja. Misalnya, pada irisan jaringan tiap  $f$  irisan (sampel adalah  $1/f$ ) dengan ketebalan tertentu ( $t$ ) diambil. Jumlah titik yang jatuh pada irisan jaringan ( $p$ ) dan luas area yang diwakili oleh satu titik ( $a$ ), diketahui. Perkiraan volume obyek tersebut dapat dihitung sebagai  $V = \frac{1}{(1/f)} \cdot p \cdot a \cdot t$ . Tentunya semakin kecil area yang diwakili oleh satu titik ( $a$ ) dan semakin kecil ketebalan irisan ( $t$ ) dan semakin banyak fraksi yang diambil ( $1/f$ ) maka presisi perkiraannya semakin tinggi. Namun demikian prinsip efisiensi untuk tidak melakukan pekerjaan yang berlebihan perlu diperhatikan (lihat bagian optimasi dalam penelitian stereologi).

Semua proses pembuatan sediaan histologi seperti fiksasi dan dehidrasi dapat membuat jaringan mengalami pengerutan, sehingga volumenya tidak lagi sama dengan volume saat keadaan segar (Howard & Reed, 2005; West, 2013b). Dengan mengukur dan membandingkan volume saat sampel masih segar, dalam fiksatif dan setelah menjadi irisan blok parafin maka dapat diketahui faktor pengerutan sampel yang dipelajari. Faktor pengerutan setiap sampel ternyata tidak sama persis walaupun jenis jaringannya sama dan perlakuan yang diberikan pun sama. Karena itu ketika akan membandingkan volume suatu obyek pada individu yang berbeda, faktor pengerutan ini perlu dipertimbangkan.

### Perkiraan Jumlah

Pada irisan jaringan suatu obyek yang akan dihitung jumlahnya tampak sebagai profil. Jumlah profil yang tampak pada suatu irisan 2 dimensi tidaklah sama dengan jumlah obyek sebenarnya pada jaringan 3 dimensi. Obyek berukuran besar yang memiliki orientasi tegak lurus terhadap sisi irisan, akan mendapatkan kesempatan lebih tinggi untuk terambil pada irisan jaringan dan ikut dihitung sebagai sampel. Sementara itu obyek yang berukuran kecil atau berorientasi sejajar dengan arah irisan mendapatkan kesempatan jauh lebih kecil untuk dapat diambil sebagai sampel. Berbagai cara koreksi dikembangkan (Abercrombie, 1944), namun tidak mendapatkan hasil yang memuaskan karena koreksi tersebut dibuat berdasarkan asumsi tertentu sehingga tidak bebas dari bias.

Solusi untuk mendapatkan perkiraan jumlah suatu obyek dari irisan histologidikembangkan oleh D.C. Sterio, nama samaran seorang ahli stereologi (Sterio, 1984). Karena pada irisan jaringan yang tipis dimensinya hanya 2 maka dua irisan dengan jarak yang diketahui digunakan untuk membentuk "probe" volume. Karena dua irisan tipis digunakan maka istilah yang dipakai untuk sepasang irisan tersebut adalah "disector". "Disector" adalah "probe" volume 3 dimensi yang terdiri dari dua irisan serial yang diketahui jarak antar irisannya. Dalam volume tersebut hanya profil yang tampak pada satu irisan dan tidak tampak pada irisan yang dijadikan acuanlah yang dihitung. Hal ini akan memastikan bahwa setiap obyek hanya dihitung satu kali. H.J. Gundersen, mengembangkan teknik "disector" ini dengan menggunakan irisan jaringan tebal sehingga terbentuk "disector" optik yang diketahui ketebalannya (Howard & Reed, 2005; West, 2012b).

Hukum penghitungan dengan bilik hitung ("counting rules") juga dikembangkan oleh Gundersen untuk menghindari bias karena hitung ganda (Howard & Reed, 2005). Prinsipnya adalah menggunakan kotak segi empat yang diketahui panjang sisi sisinya dan membuat garis larangan dan garis hitung (gambar 5). Profil yang terpotong oleh garis yang membentuk kotak akan diberi perlakuan berbeda. Profil yang kena garis larangan tidak akan dihitung sedangkan yang kena garis hitung akan ikut dihitung. Semua profil yang masuk dalam area segi empat akan dihitung, sepanjang tidak menyentuh garis larangan atau perpanjangannya. Misalnya, sisi kanan dan sisi atas segi empat merupakan garis hitung, berarti profil yang terpotong oleh kedua garis tersebut akan ikut dihitung. Bila suatu profil mengenai garis larangan, yaitu garis di sisi kiri dan sisi bawah kotak, maka profil tersebut tidak akan dihitung. Pada irisan tebal, efek tepi irisan yang biasanya tidak sempurna karena bersinggungan langsung dengan mikrotom ("edge effect"), juga perlu diperhatikan (Howard & Reed, 2005). Karena itu, ketebalan "disector" optik yang digunakan biasanya lebih tipis dari ketebalan irisan. Saat ini beberapa perangkat lunak telah dikembangkan untuk mempermudah proses pemilihan fraksi area sampel pada irisan jaringan dan menemukan pasangan area yang diamati pada "disector" fisik.

Jumlah keseluruhan obyek pada satu organ merupakan data yang lebih bermakna dibandingkan jumlah per volume. Pemaparan hasil sebagai jumlah per volume saja, rentan mengalami bias karena terjebak kondisi jaringan yang dijadikan referensi ("reference trap"). Densitas (jumlah suatu obyek di dalam volume tertentu) merupakan rasio dengan jumlah ("numerator") per unit pembagi tertentu ("denominator"). Dengan demikian, angka tersebut tidak dapat digunakan untuk melakukan evaluasi keseluruhan jumlah obyek di dalam organ. Suatu organ dapat menyusut volumenya namun jumlah obyek yang dihitung masih tetap sama. Bila data disajikan dalam bentuk jumlah per volume maka angkanya akan lebih besar, padahal sebenarnya jumlah obyek tersebut tidaklah bertambah. Kemungkinan lain adalah jumlah sel berkurang namun volume juga berkurang, sehingga penghitungan jumlah sel per volume menghasilkan angka yang sama dengan kondisi sebelumnya. Dengan demikian bila

kondisi tersebut dilaporkan dalam bentuk jumlah per volume, laporan tersebut menjadi bias (Dorph-Petersen, *et al.*, 2001; Howard & Reed 2005; West, 2012a).

Ada dua pendekatan dalam memperkirakan jumlah total obyek dengan “disector”. Satu pendekatan adalah dengan melakukan perkiraan volume sampel yang diperiksa ( $V_{ref}$ ) dan menghitung jumlah obyek pada sampel yang diperiksa ( $N_v$ ). Jumlah keseluruhan obyek tersebut ( $N$ ) dihitung dengan rumus  $N=N_v \cdot V_{ref}$ . Metode kedua adalah dengan cara menghitung jumlah obyek ( $\Sigma Q$ ) pada fraksi sampel yang diketahui ( $1/f$ ). Dalam hal ini  $N= \Sigma Q \cdot 1/(1/f)$ . Dengan demikian jumlah seluruh obyek pada satu organ tertentu dapat diperkirakan (Howard & Reed, 2005).

### Optimasi dalam Penelitian Stereologi

Perkiraan yang dilakukan perlu dirancang sehingga dapat mendekati jumlah yang sebenarnya (akurasi tinggi) dengan presisi yang tinggi pula. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh variasi antar individu. Besarnya variasi antar individu pada satu kelompok dapat dilihat dari “coefficient of variation” (CV) yang dihitung dari simpang baku dibagi dengan rerata (“ $CV=std\ dev/mean$ ”). Sumber variasi antar individu tersebut berasal dari dua sumber yaitu variasi biologi ( $CV_{biol}$ ) dan variasi karena metode pengambilan sampel (“coefficient of error/CE”). Hubungan antar komponen tersebut dapat digambarkan dengan persamaan  $CV^2=CV_{biol}^2+CE^2$ . Variasi biologi dapat berasal dari perbedaan genetik dan lingkungan dan merupakan sumber variasi antar individu terbesar. Besarnya  $CV_{biol}$  tidak dapat diketahui secara langsung. Penambahan jumlah subyek dapat mengurangi variasi data yang dihasilkan. Namun demikian, penggunaan jumlah subyek yang lebih banyak akan meningkatkan waktu, tenaga dan biaya yang diperlukan. Dalam kasus hewan coba, jumlah hewan coba yang terlalu banyak juga tidak sesuai dengan prinsip etika penggunaan hewan coba. Jumlah hewan coba yang optimal biasanya berkisar antara 5-10 ekor per kelompok. Untuk melakukan optimasi CV, perlu dilihat kontribusi dari metode pengambilan sampel (CE). CE dapat dihitung dengan berbagai metode penghitungan CE yang telah dikembangkan (Howard & Reed, 2005; West, 2012d). Hal ini mirip dengan metode hitung cepat saat pemilihan umum yang membuat perkiraan dengan mengambil sampel dari populasi. Laporan yang diberikan pada metode hitung cepat pemilihan umum biasanya menyertakan “margin of error” yang merupakan kemungkinan kesalahan yang bisa terjadi dari metode yang dilakukan (Estok, *et al.*, 1964).

Metode stereologi yang digunakan dianggap optimum bila memenuhi kriteria berikut;  $0,2 < CE^2/CV^2 < 0,5$ . Untuk menurunkan nilai CE yang masih terlalu tinggi dapat dilakukan penambahan jumlah irisan dan area yang diperiksa. Dibandingkan dengan penambahan jumlah subyek, optimasi CE lebih sedikit memerlukan biaya. Pengambilan sampel yang efisien dan optimal biasanya hanya menghasilkan sekitar 100-200 (Boyce, *et al.*, 2010). hitungan per individu. Irisan atau pasangan irisan yang dianjurkan untuk diamati berkisar antara 6-10 (Boyce, *et al.*, 2010), 12-15 irisan (West, *et al.*, 2012b) atau 10-15 irisan (Howard & Reed, 2005). Bila nilai CE terlalu kecil berarti kita terlalu banyak melakukan pekerjaan yang tidak perlu. Keakuratan perkiraan yang dihasilkan tidak bertambah baik dengan pengambilan sampel yang berlebihan. Prinsip efisiensi tersebut digambarkan oleh ahli stereologi dari Swiss, E. Weibel dengan suatu semboyan “do more, less well” (Gundersen & Osterby, 1981).

### KESIMPULAN

Untuk melakukan kuantifikasi pada sediaan histologi perlu digunakan metode stereologi yang meliputi pemilihan sampel yang acak dan sistematis serta penggunaan “probe” yang sesuai. Optimasi metode dilakukan untuk menghasilkan perkiraan yang akurat menggunakan sumberdaya secara efisien.

### Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih pada program "Scheme of Academic Mobility and Exchange" (SAME), Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan kesempatan belajar stereologi di Universitas Aarhus, Denmark serta Dr. Ginus Partadiredja yang telah memberikan masukan untuk perbaikan.

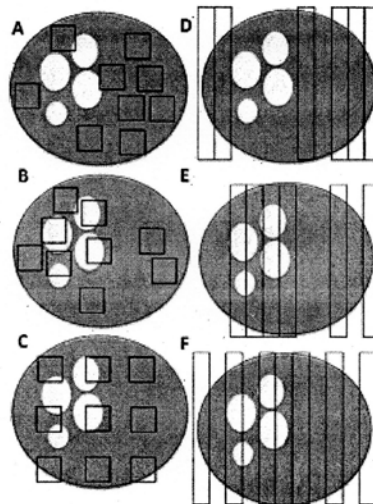
### DAFTAR PUSTAKA

- Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec.* 94: 239–247
- Boyce, R.W., Dorph-Petersen, K.A., Lyck, L., Gundersen, H.J., 2010. Design based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol Pathol.* 38(7):1011-25.
- Dorph-Petersen, K.A., Nyengaard, J.R., Gundersen, H.J., 2001. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc.* 204(3):232-46
- Estok, M., Nevitte, N., Cowan, G., 1964. The Quick Count and Election Observation. National Democratic Institute ISBN: 1-880134-31-4
- Gardi, J.E., Nyengaard, J.R., Gundersen, H.J., 2006. Using biased image analysis for improving unbiased stereological number estimation - a pilot simulation study of the smooth fractionator. *J Microsc.* 222(3):242-50.
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 147: 229–263.
- Gundersen, H.J., Osterby, R., 1981. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: Or "do more less well!". *J Microsc* 121: 65–73.
- Howard, C.V. & Reed, M.G., 2005. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, 2<sup>nd</sup> edition. Abingdon: Garland Science/BIOSScientific
- Mühlfeld, C., Ochs, M., 2013. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principle of lung stereology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 305(3):L205-21.
- Sterio, D.C., 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134: 127–136
- West, M.J., 2012a. Introduction to Stereology. *Cold Spring Harb Protoc* 2012(8)
- West, M.J., 2012b. Estimating object number in Biological Structure. *Cold Spring Harb Protoc* 2012(10):1049-66.
- West, M.J., 2012c. Estimating volume in Biological Structure. *Cold Spring Harb Protoc* 2012(11):1129-39
- West, M.J., 2012d. The precision of estimates in stereological analyses. *Cold Spring Harb Protoc.* 2012(9):937-49.
- West, M.J., 2013a. Isotropy, iSectors, and Vertical Sections in Stereology. *Cold Spring Harb Protoc* 2013(1)
- West, M.J., 2013b. Tissue shrinkage and stereological studies. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013(3).
- West, M.J., 2013c. Local estimators of size in stereological studies. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013(8):719-26

**Tabel dan gambar**

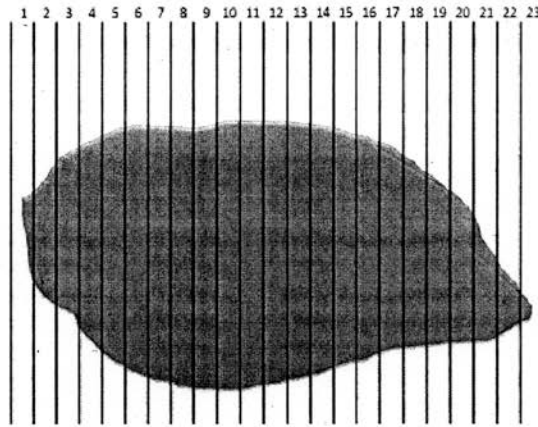
Tabel 1. Parameter yang dibuat perkiraannya serta "probe" yang digunakan dalam metode stereologi

Jenis	Parameter Obyek		"Probe"		Penghitungan
	Dimensi	Pada sediaan tampak sebagai	Jenis	Dimensi	
Volume	3	Area	titik	0	jumlah titik yang jatuh di area obyek
Luas Permukaan	2	Garis batas	garis	1	jumlah persilangan garis batas area obyek dengan garis "probe"
Panjang	1	Profil	area	2	jumlah potongan yang ada pada area "probe"
Jumlah	0	Partikel	volume ("disector")	3	jumlah partikel yang ada pada volume "probe"

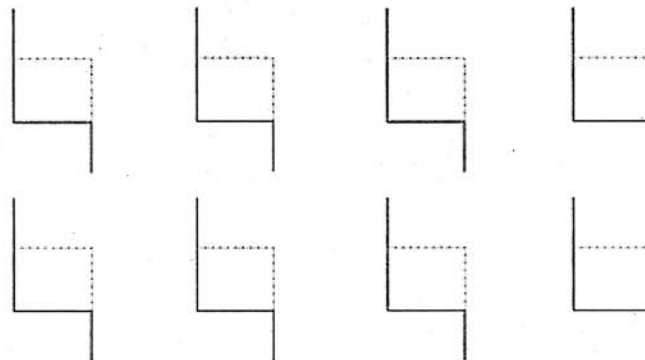


Gambar 1. Pengambilan sampel secara acak (A,B,D,E) dan acak-sistematis (C&F). Suatu organ diambil sampel sejumlah sama (bujur sangkar atau persegi panjang). Organ tersebut memiliki obyek yang ingin diamati (bulatan terang). Bila sampel diambil secara acak saja, ada kemungkinan sebagian besar obyek yang ingin diamati sangat sedikit terambil (A,D) atau terambil terlalu banyak (B,E) sehingga dapat mengakibatkan simpulan yang keliru. Bila sampel diambil secara acak dan sistematis (C,F) maka semua bagian jaringan memiliki kesempatan yang sama untuk diambil sebagai sampel, sehingga obyek yang ingin diamati pun terambil secara proporsional.

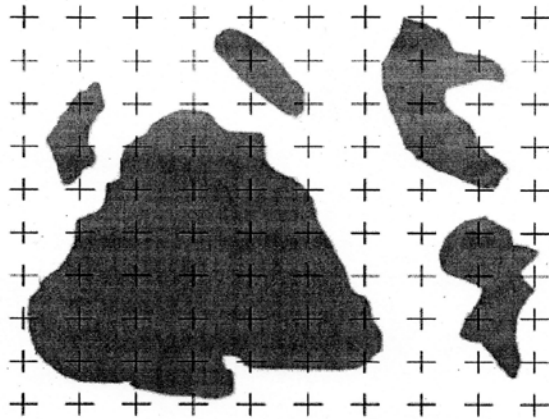




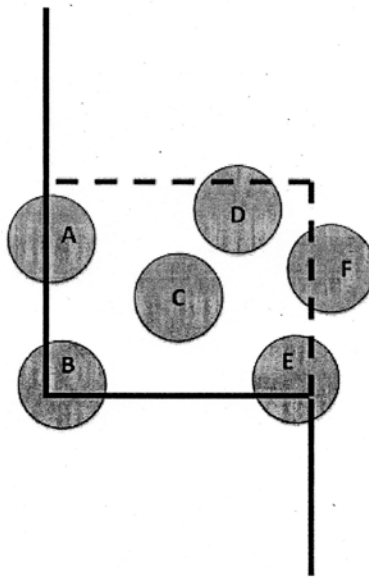
Gambar 2. Suatu organ dipotong sejajar. Sampel diambil dengan prinsip "systematic uniform random sampling" (lihat naskah).



Gambar 3. Deretan persegi empat dengan panjang dan lebar yang diketahui berjarak sama satu sama lain yang dapat digunakan sebagai alat pengambilan sampel yang acak pada irisan jaringan.



Gambar 4. Teknik hitung titik (“point counting”) untuk memperkirakan volume suatu obyek dari area permukaan irisan obyek tersebut.



Gambar 5. Contoh penghitungan dengan bilik hitung. Garis putus putus digunakan sebagai garis hitung. Semua partikel yang ada di dalam kotak dan yang terpotong oleh garis hitung ikut dihitung, sepanjang tidak menyentuh garis larangan atau kepanjangannya. Garis yang tidak putus putus digunakan sebagai garis larangan. Semua partikel yang terpotong oleh garis larangan tidak ikut dihitung. Pada contoh ini, profil A,B dan E tidak dihitung karena menyentuh garis larangan. Profil C,D, dan F dihitung karena terletak di dalam kotak (seluruhnya atau sebagian) dan tidak menyentuh garis larangan.