

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

1. Histoteknik

Histoteknik adalah metode yang digunakan untuk menyiapkan preparat histologis dari spesimen tertentu melalui serangkaian langkah hingga siap untuk observasi dan analisis. Spesimen jaringan yang digunakan untuk preparat histologis diperoleh dari manusia dan hewan. Jaringan ini dapat diambil dari hewan yang difiksasi, baik dalam keadaan hidup maupun mati. (Saputro 2024). Prosedur histoteknik menghasilkan Gambaran mikroskopis struktur jaringan, termasuk susunan dan morfologi sel, sitoplasma, inti sel, serat jaringan otot yang menunjukkan kesesuaian dengan jaringan normal (Wulansari *et al.*, 2024). Proses histoteknik memiliki beberapa tahapan yang terdiri dari fiksasi (*fixation*), dehidrasi (*dehydration*), pembersihan (*clearing*), penanaman (*embedding*), pengecoran (*blocking*), pemotongan (*sectioning*), pewarnaan (*staining*), perekatan (*mounting*) dan pelabelan (*labelling*) (Sumiwi 2023).

2. Proses Histoteknik

Proses histoteknik adalah upaya untuk membuat sediaan jaringan dari spesimen tertentu melalui suatu tahapan rangkaian sediaan jaringan hingga menjadi sediaan yang siap diamati dan dianalisa. Sediaan preparat jaringan yang sempurna dapat membantu menegaskan diagnosa penyakit (Wulansari *et al.*, 2024). Pemeriksaan histopatologi saat ini masih menjadi gold standard yang digunakan dalam patologi diagnostik (Lamsudiansyah *et al.*, 2023). Hasil fiksasi yang berkualitas baik akan menghasilkan gambaran morfologi jaringan yang mencakup bentuk, susunan sel, nukleus sel dan sitoplasma serta serat jaringan ikat yang mendekati kondisi jaringan saat masih hidup sehingga memudahkan proses pembacaan preparat histologi (Oktaviando 2020).

Beberapa tahapan proses histoteknik dalam pembuatan sediaan histopatologi diantaranya adalah fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *blocking*, pemotongan jaringan (*sectioning*), pewarnaan (*staining*), perekatan (*mounting*) dan

pelabelan (*labelling*) (Wulandari *et al.*, 2022). Seluruh proses tersebut harus dilakukan sebaik mungkin karena setiap tahapan akan menentukan kualitas akhir specimen yang dihasilkan (Indah 2016).

a. Fiksasi

Fiksasi merupakan tahap awal dalam proses penyiapan preparat histopatologi. Fiksasi merupakan prosedur yang bertujuan untuk mengawetkan struktur sel dan komposisi biokimianya. Fiksasi berfungsi memperlambat proses degeneratif yang dimulai setelah jaringan kehilangan komponen darah. Proses autolisis akan menyebabkan jaringan yang dicerna dengan enzim intraseluler yang dilepas ketika membran dalam organel tersebut pecah. Salah satu proses yang dicegah mencakup aktivitas bakteri pengurai atau dekomposisi yang diinduksi oleh mikroorganisme yang mungkin sudah terdapat pada spesimen tersebut. (Musyarifah & Agus 2018). Fiksasi jaringan harus dilakukan dengan untuk mempertahankan komponen sel untuk mencegah terjadinya perubahan dan mencegah kerusakan dari autolisis dan pembusukan yang dapat mengganggu interpretasi hasil sehingga kualitas sediaan terjaga (Khristian & Dewi, 2017).

Tujuan fiksasi jaringan untuk menjaga sel dan komponen jaringan dalam keadaan yang sedekat mungkin dengan kondisi hidup, sehingga struktur dan morfologi sel dapat dipertahankan dengan baik. Larutan fiksatif yang dapat digunakan dengan tepat menggunakan larutan fiksatif seperti *Neutral Buffered Formalin* (NBF). Fiksasi umumnya tidak hanya mempertahankan integritas jaringan tetapi juga mempermudah analisis lebih lanjut, baik untuk pemeriksaan rutin maupun untuk diagnosis penyakit.

Fiksasi berfungsi untuk menghambat proses dekomposisi dan autolisis, pengawetan, pengerasan jaringan, pematangan keloid, diferensiasi optik, dan mempengaruhi pewarnaan. Jaringan yang dibiarkan terlalu lama tanpa segera dilakukan fiksasi akan mengalami

autolisis yang pada akhirnya akan mengganggu proses diagnosis histopatologis (Hasan *et al.*, 2015).

Prinsip kerja fiksasi salah satunya Adalah mempertahankan bentuk sel dan organelnya agar tetap mendekati kondisi fisiologisnya. Cairan fiksatif bekerja dengan memodifikasi komposisi jaringan secara kimiawi dan fisik. Secara kimiawi, protein dalam sel mengalami perubahan struktur dan fungsional melalui pembentukan ikatan antara cairan fiksasi dan protein sel, yang merupakan makromolekul berbeda. Ikatan tersebut membuat sel menjadi resisten terhadap pergerakan udara dan dan cairan lainnya, Akibatnya struktur sel menjadi resisten terhadap pergerakan air dan cairan lain, sehingga menstabilkan struktur sel dan tidak mudah berubah selama proses berikutnya. Disamping itu, banyak enzim didalam sel menjadi terinaktivasi yang menyebabkan terhentinya proses metabolisme dalam sel yang awalnya hidrofilik yang dilarutkan mengakibatkan sela-sela sel membesar. Hal ini membantu tahapan pada tahap parafinasi dan pewarnaan, cairan tersebut akan memasuki sel dan melekat secara efisien (Alwi 2016). Oleh karena itu, fiksasi yang efektif sangat penting dalam menghasilkan preparat histologis yang berkualitas tinggi (Aditya & Parwanto, 2024).

Beberapa faktor yang mempengaruhi tingkat efektivitas dan kecepatan fiksasi yaitu :

1) Waktu Fiksasi

Jaringan fiksasi dilakukan sesegera mungkin setelah dikeluarkan. Optimalnya waktu fiksasi bergantung pada berbagai faktor dan variasi tergantung situasi fiksasi yang digunakan. Waktu menjadi salah satu faktor terpenting terhadap jaringan yang telah dilakukan fiksasi, maksimal waktu setelah keluar dari tubuh dan dilakukan fiksasi yaitu 30 menit. Apabila jaringan difiksasi lebih dari 30 menit setelah jaringan dilepas dari tubuh maka akan terjadilah keterlambatan fiksasi atau delay yang akan menjadikan jaringan rusak karena autolisis. Waktu fiksasi yang optimal

dipengaruhi oleh berbagai faktor termasuk jenis larutan fiksasi yang digunakan, misalnya ketebalan spesimen. Semakin besar larutan yang difiksasi durasi yang diperlukan untuk pencapaian verifikasi sempurna akan semakin panjang. Sebagian besar spesifik jaringan dan proses termasuk (suhu, kapasitas buffer, ketebalan fiksasi, rasio volume) sehingga dalam penggunaan yang berkepanjangan dapat mengakibatkan hilangnya daya tanggap penyusutan dan pembekuan sampel (Musyarifah & Agus, 2018).

2) Kestabilan Suhu

Peningkatan suhu atau pemanasan larutan fiksasi dapat mempercepat penetrasi larutan ke dalam jaringan serta mempercepat reaksi kimia antara komponen fiksasi dengan jaringan. Namun, Peningkatan suhu juga dapat meningkatkan laju reaksi keseluruhan, sehingga perlunya kontrol agar tidak merusak struktur jaringan yang diawetkan. Pemanasan yang disarankan disuhu ruang yang bertingkat secara perlahan hingga mencapai suhu 45°C. Suhu yang optimal baik untuk menjaga morfologi sel dan kualitas jaringan (Khristian & Dewi, 2017).

3) Konsentrasi Larutan

Konsentrasi larutan disesuaikan dengan tingkat yang serendah mungkin, karena bisa menghemat biaya dalam pembuatan jaringan Formalin dengan konsentrasi 10% merupakan pilihan optimal, glutaradehid umumnya digunakan pada rentang 0,25% sampai 4% sedangkan etanol pada konsentrasi 70%. Jika konsentrasi terlalu tinggi maka berpotensi memengaruhi jaringan dengan adanya artefak. Hal itu sebanding jika panas berlebihan (Musyarifah & Agus, 2018).

4) Ketebalan Pemotongan

Ketebalan jaringan bergantung pada bagaimana kemampuan berdifusi dan berat molekul dari masing-masing fiksatif, dimana formalin dan alkohol memiliki penetrasi yang optimal dan glutaradehid

kurang optimal. Merkuri berada diantara keduanya. Cara terbaik mengatasi hal ini adalah melalui pemotongan jaringan menjadi tipis (2-3 mm) dengan begitu akan menjadi lebih cepat daripada bagian yang tebal. Ketebalan tidak boleh melebihi 4 mm. idealnya ketebalan 3 mm dapat menghasilkan fiksasi dan pengolahan jaringan yang berkualitas baik (Musyarifah & Agus, 2018).

5) Rasio volume fiksasi

Rasio volume fiksasi berkaitan dengan penurunan konsentrasi akan mengurangi kecepatan penetrasi dalam jaringan. Semakin sedikit jumlah larutan fiksasi yang digunakan, maka konsentrasi akhir larutan saat kondisi isotonik juga akan menurun, sehingga memperlambat proses penetrasi. Sebaliknya, menggunakan larutan fiksasi dalam volume besar maka konsentrasi akhir pada saat kondisi isotonik tidak begitu kompilasi serta penetrasi kecepatannya terjaga. 1:20 adalah perbandingan yang sudah teruji. Namun akan lebih baik memperhatikan waktu dan kualitas rasio ditampilkan lebih jelas pada 1:50 (Khristian & Dewi, 2017).

6) Tingkat Keasaman pH

pH suatu larutan, ukuran konsentrasi ion hidrogen, sangat penting dan harus dijaga pada tingkat netral, sekitar 6-8. Hipoksia dalam jaringan dapat menyebabkan penurunan pH, sehingga diperlukan fungsi penyangga dalam fiksatif untuk mencegah dehidrasi berlebih. Keasaman dapat memengaruhi pembentukan pigmen formalin-heme, yang muncul sebagai endapan hitam dalam jaringan. Penyangga yang umum digunakan meliputi fosfat, bikarbonat, kakodilat, dan veronal. Formalin, penyangga yang umum digunakan, menggunakan penyangga fosfat pada pH 7. Fiksatif hipertonik menyebabkan penyusutan sel, sedangkan fiksatif hipotonik menyebabkan pembengkakan sel. (Musyarifah & Agus, 2018). Penggunaan larutan fiksasi dalam

volume besar dapat menyebabkan terbentuknya asam format yang kemudian akan membentuk larutan asam, sehingga menghasilkan larutan asam. Larutan ini dapat bereaksi dengan hemoglobin dalam jaringan sehingga membentuk pigmen artefak. Pada keadaan asam terkadang penggunaan bahan seperti asam asetat maupun asam pikrat diperlukan. Ketika proses fiksasi diinginkan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan penggunaan formalin atau larutan lain seperti peningkatan kontras, namun jika larutan yang bersifat asam diberikan dalam jangka waktu yang lama, hal ini akan menyebabkan sel mengkerut dan menjadi lebih rentan terhadap kerusakan fisik (Khristian & Dewi, 2017)

b. Dehidrasi

Dehidrasi adalah tahapan penting dalam proses pengolahan jaringan dalam histopatologi yang bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan agar dapat mempersiapkannya untuk tahap berikutnya. Reagen yang digunakan dalam proses ini bersifat cenderung berikatan dengan air dan memiliki suhu tinggi sehingga molekul tersebut dapat berikatan dengan molekul air melalui pembentukan ikatan *hydrogen*. Beberapa reagen komponen kimia yang digunakan untuk dehidrasi adalah etanol, etanol aseton, methanol, isoprofil, butanol, glikol dan alkohol terhidrasi (Khristian & Dewi, 2017). Proses dehidrasi umumnya dilakukan dengan menempatkan sampel ke dalam serangkaian larutan alkohol dengan konsentrasi betingkat secara bertahap. Pada prinsipnya proses ini dimulai dengan alkohol konsentrasi rendah misalnya, 70% alkohol kemudian secara berurutan dilanjutkan dengan konsentrasi yang lebih tinggi 80%, 90%, 95%, hingga alkohol 100%. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa air dihilangkan dari sampel dengan cara yang terkontrol dan perlahan untuk mencegah kerusakan pada struktur jaringan (Aditya & Parwanto, 2024).

Setiap tahapan memerlukan waktu tertentu, tergantung pada jenis dan ukuran sampel, umumnya

berkisar antara 10 menit hingga beberapa jam. Setelah tahapan dehidrasi selesai, sampel akan dibersihkan dengan bahan seperti xylene atau substituenya untuk membuat jaringan menjadi transparan untuk infiltrasi dengan parafin. Dehidrasi penting untuk memastikan menjadi parafin yang baik pada tahapan berikutnya, jika masih terdapat air dalam jaringan, parafin tidak akan masuk dengan baik dan dapat mempengaruhi kualitas potongan untuk mikroskopi. Meskipun demikian, proses dehidrasi berpotensi menimbulkan artefak pada jaringan, seperti penyusutan, sehingga perlu dilakukan dengan hati-hati (Aditya & Parwanto, 2024)

c. Penjernihan (*Clearing*)

Penjernihan atau *clearing* adalah proses penting dalam persiapan jaringan untuk analisis histologis yang melibatkan penghilangan alkohol dari jaringan dan penggantian dengan pelarut yang dapat berikatan dengan parafin. Proses *clearing* biasanya dilakukan dengan menggunakan agen seperti xylol atau toluene, yang efektif dalam menghilangkan air dan alkohol dari jaringan. Proses ini penting karena parafin, yang digunakan untuk impregnasi jaringan, tidak dapat berikatan langsung dengan alkohol. Oleh karena itu, *clearing* bertujuan untuk memastikan bahwa jaringan menjadi transparan dan siap untuk diisi dengan parafin, sehingga struktur morfologi sel dapat dipertahankan dengan baik selama pemotongan dan analisis mikroskopis (Junqueira 2017).

Penjernihan adalah tahapan yang digunakan untuk menghilangkan sisa alkohol dari jaringan dan diganti dengan larutan yang memiliki afinitas terhadap parafin. Pada tahap ini berperan penting karena adanya residu di jaringan tersisa alkohol meskipun jumlahnya rendah, parafin tidak akan dapat menembus jaringan. Sehingga proses pembentukan blok, pemotongan dan pewarnaan jaringan tidak akan berlangsung optimal. (Alwi 2016)

Proses *clearing* dapat dilakukan dengan berbagai jenis zat penjernih diantaranya xylol dan toluol yang memiliki kelebihan dan keterbatasan. Keunggulan xylol

terletak pada kecepatan dan harganya yang relatif terjangkau. Namun, keterbatasannya antara lain jaringan hanya dapat dibersihkan dengan alkohol absolut, dan jaringan yang dibersihkan dengan xylol tidak mencapai tingkat transparansi yang jernih, sehingga sulit untuk menentukan keberhasilan prosesnya. Toluene kelebihanannya yaitu sudah banyak dipergunakan oleh kebanyakan laboratorium, harganya yang ekonomis, ketersediaannya yang melimpah serta kemampuannya menghasilkan jaringan yang terlihat transparan apabila proses penjernihan berjalan optimal. Namun, jika jaringan tidak tampak transparan menandakan bahwa proses dehidrasi sebelumnya belum selesai. Keterbatasannya antara lain jaringan hanya dapat dipisahkan dari alkohol absolut selain itu, perendaman yang terlalu lama dalam toluene dapat menyebabkan pengerasan yang berlebihan, sehingga menyulitkan pemotongan dengan mikrotom. (Alwi 2016).

Faktor yang mempengaruhi tahapan clearing yaitu :

1) Waktu pemrosesan

Tahapan *clearing* yang terlalu lama dapat menyebabkan jaringan menjadi rapuh, sehingga diperlukan pemantauan waktu saat tahapan clearing berlangsung.

2) Jenis Larutan yang Digunakan

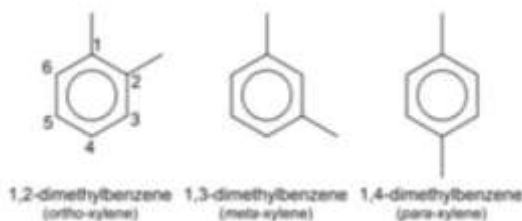
Jenis larutan yang digunakan pada tahap *clearing* dapat mempengaruhi hasil karena memiliki sifat yang berbeda sehingga mempengaruhi proses. Macam- macam agen atau larutan yang dapat digunakan seperti xylol, toluene, kloroform, xylol substitusi dan *citrus fruid oil* (Khristian & Dewi, 2017).

Adapun beberapa agen atau larutan yang umum digunakan dalam tahap *clearing* sebagai berikut :

1) Xylol

Xylol cairan yang bersifat mudah terbakar, tidak bewarna dan memiliki aroma khas menyerupai minyak bumi. Zat ini larut dengan sebagian besar pelarut organik serta paraffin. Xylol digunakan sebagai cairan pembening pada jaringan dengan ketebalan ≤ 5

mm karena kemampuannya mampu mengganti alkohol dan menebus jaringan dengan cepat dan efisien.

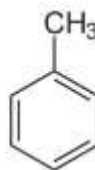


Gambar 1. Struktur Kimia Xilol

(Sumber : <https://id.wikipedia.org>)

2) Toluene

Toluene bersifat mudah terbakar dan tidak bewarna berbau aroma khas minyak bumi, mirip dengan xylol, tetapi jaringan tidak merusak meskipun waktu perendam jaringan berlangsung lama. Toluene lebih mudah terbakar dan mudah amaenguap daripada xylol (Khristian & Dewi, 2017)



Gambar 2. Struktur Kimia Toluene

(Sumber : <https://id.wikipedia.org>)

3) Kloroform

Kloroform lebih rapuh dan lambat. Meskipun demikian zat ini mampu digunakan untuk memproses jaringan dengan ketebalan lebih dari 1 mm. Kloroform tidak memberi efek transparansi atau kejernihan jaringan, namun keunggulannya terletak pada sifatnya yang tidak mudah terbakar. Kloroform memiliki tingkat toksik yang tinggi dan dapat mrnghasilkan gas fosgen yang bersifat racun apabila dipanaskan. Karena karakteristiknya tersebut kloroform umumnya digunakan dalam pemrosesan specimen dari system saraf pusat (Kristian & Dewi, 2017).

4) Xylol substitusi

Xylol substitusi merupakan hidrokarbon alifatik yang berbentuk pendek dan rantai panjang. Terdapat perbedaan jumlah atom karbon dan rantai karbon. Rantai alifatik yang panjang tidak terlalu cepat menguap sehingga menyebabkan terjadinya kontaminasi pada lilin parafin pada saat pematangan jaringan (Khristian & Dewi, 2017).

5) *Citrus Fruit Oil* (Reagen Limonene)

Reagen limonene merupakan ekstrak dari kulit buah lemon dan jeruk. Reagen ini non toksik dan memiliki kelarutan ringgi dalam air. Kelemahannya memiliki aroma yang menyengat yang menyebabkan sakit kepala dan peengendapan partikel airnya menyerupai bau tembaga. Tidak hanya itu, reagen ini sangat berminyak dan tidak dapat digunakan daur ulang (Khristian & Dewi, 2017).

d. Infiltrasi Parafin

Infiltrasi merupakan fase dalam pemrosesan jaringan histopatologi setelah tahap pembersihan. Media embedding utama yang digunakan selama fase ini adalah parafin. Parafin menunjukkan kelarutan dalam agen pembersih, seperti xilena, dan mengalami pemadatan pada suhu ruang, menjadikannya substrat optimal untuk preparasi irisan jaringan yang sangat tipis melalui mikrotomi. Setelah menembus ke dalam jaringan, parafin memadat setelah pendinginan, sehingga membentuk matriks padat yang kondusif untuk pemotongan. Efikasi infiltrasi sangat penting untuk menjamin integritas irisan jaringan yang akan diperiksa mikroskopis, karena permeasi parafin yang tidak memadai dapat menghasilkan irisan yang rapuh atau sulit diperoleh selama mikrotomi. (Aditya & Parwanto, 2024). Suhu yang digunakan untuk mencairkan paraffin yaitu 56°C hingga 62°C. Beberapa faktor perlu diperhatikan termasuk suhu dan waktu yang dapat mempengaruhi kualitas preparat histologis (Jahira 2018).

Paraffin adalah filtrat yang telah umum digunakan untuk infiltrasi dan *embedding*. Paraffin yang digunakan dalam berbagai bentuk dan suhu lelehnya dengan penambahan zat tertentu dapat dihasilkan potongan jaringan yang berkualitas (Nadia 2022). Lilin paraffin merupakan campuran hidrokarbon berantai panjang yang dihasilkan melalui proses pemecahan minyak mineral. Sifatnya berbeda, sesuai dengan titik leleh yang dimilikinya. Lilin paraffin masuk ke dalam jaringan dalam bentuk cair dan membeku dengan cepat saat didinginkan. Lilin paraffin yang mempunyai titik didih tinggi akan lebih baik digunakan pada jaringan keras misalnya tulang sehingga menghasilkan pemotongan tipis namun sulit saat pembuatan pita, begitupula sebaliknya (Khristian & Dewi, 2017).

e. *Embedding* (Pengeblokan)

Embedding adalah proses histoteknik yang mengikuti proses penanaman jaringan yang bertujuan untuk memberikan struktur yang memadai untuk jaringan sehingga mudah dan dapat dipotong menjadi bagian tipis untuk mikroskopis (Aditya & Parwanto, 2024). Zat yang digunakan tahapan ini adalah paraffin cair panas yang mempunyai suhu lebur sekitar 56°C - 59°C (Rahmawati & Sidarta, 2021).

Beberapa hal yang harus diperhatikan pada tahapan ini diantaranya yaitu jaringan yang akan ditanam harus dicek kembali atau dicocokkan kembali antara keterangan didalam formulir data pasien dan data yang tertempel pada label kaset *embedding*. Teknik penanaman ini harus dilakukan secara cepat sehingga paraffin tidak membeku dan pastikan juga menutup dengan *base mold* dengan kaset, posisi benar sehingga jaringan kuat (Kristian & Dewi, 2017).

Prosedur-prosedur berikut perlu dipertimbangkan selama proses penanaman antara lain :

1) Persiapan Parafin

Parafin dipanaskan terlebih dahulu dalam oven penanaman hingga mencapai keadaan cair. Suhu yang

dibutuhkan bergantung pada titik leleh parafin yang digunakan (Najid 2025).

2) Pengambilan Jaringan

Jaringan yang telah diinfiltrasi dengan parafin dikeluarkan dari oven dan diletakkan di atas pelat pendingin untuk memfasilitasi pendinginan dan pemadatan, sehingga menyederhanakan penanaman selanjutnya (Bancroft *et.al.*, 2022).

3) Penempatan Jaringan

Jaringan kemudian diorientasikan dengan presisi di dalam cetakan parafin. Orientasi jaringan menjadi sangat penting pada tahap ini, karena menentukan cara jaringan akan ditampilkan pada slide mikroskopis (Bancroft *et.al.*, 2022).

4) Penambahan Parafin

Parafin cair kemudian dimasukkan ke dalam cetakan untuk membungkus jaringan. Parafin harus mengisi semua rongga di dalam cetakan dan membungkus jaringan sepenuhnya (Najid 2025).

5) Pendinginan

Cetakan yang berisi jaringan dan parafin kemudian diletakkan di atas pelat pendingin agar parafin memadat dan membentuk blok yang kohesif (Najid 2025).

6) Penyimpanan

Setelah parafin mengeras, blok parafin yang membungkus jaringan disiapkan untuk pemotongan dengan mikrotom. Blok tersebut harus dijaga pada suhu ruangan di tempat yang kering hingga pemotongan dilakukan (Khristian & Dewi, 2017).

f. Sectioning (Pemotongan)

Pemotongan merupakan tahapan yang dilakukan sebelum pewarnaan sampel. Ketebalan dalam pemotongan atau *sectioning* menggunakan alat khusus yang dinamakan mikrotom. Mikrotom merupakan alat yang dilengkapi dengan pisau tajam dan dapat memotong blok jaringan dengan ukuran dengan sangat tipis dan ketipisannya dapat diatur sesuai yang diinginkan. Bagian jaringan telah

dipotong kemudian ditempelkan pada kaca objek lalu diproses untuk menghasilkan preparat yang dapat diamati dibawah mikroskopis. Mikrotom memotong jaringan tersebut secara vertical menggunakan pisau khusus, sehingga didapat pita pada jaringan dengan ketebalan tertentu. Ukuran ideal untuk histologi rutin yaitu 2-5 mikron. Hasilnya dimasukkan dalam *floating bath* berisi air yang bertujuan merenggangkan hasil potongan dan meletakkan pada kaca preparat (Rahmawati *et al.*, 2022). Suhu yang digunakan pada waterbath adalah 40°C (Alwi 2016). Tahap selanjutnya kaca preparat dimasukkan dalam inkubator atau *hotplate* agar sampel mengering.

Teknik pemotongan blok paraffin yang baik yaitu :

- 1) Blok paraffin letakkan pada dudukan mikrotom
- 2) Sudut kemiringan diatur antara 20 hingga 30°
- 3) Ketebalan yang diinginkan diatur dengan ukuran yang ideal
- 4) Tuas mikrotom diputar kearah pisau secara perlahan dan pastikan posisi pisau dan blok jaringan sudah baik. Kemudian, lakukan pemotongan secara perlahan, buang pita- pita paraffin yang tidak terdapat jaringan hingga potongan pita.
- 5) Pita paraffin dipindahkan menggunakan kuas kedalam *waterbath* dengan suhu tertentu dan didiamkan beberapa saat hingga pita jaringan mekar dan tidak terdapat lipatan.
- 6) Kemudian dengan objek glass perlahan lahan untuk mengambil pita jaringan dari dalam *waterbath*. Kemudian diletakkan pada *hot plate* dengan suhu 40°C - 45°C, tahapan ini berfungsi untuk menghilangkan sisa kadar air yang masih tertempel jaringan dan pastikan pita paraffin tertempel pada objek glass. Selanjutnya preparat masukkan dalam tahapan pewarnaan (Alwi 2016).

g. Pewarnaan Jaringan (*Staining*)

Pewarnaan jaringan merupakan langkah penting dalam proses histoteknik yang bertujuan untuk meningkatkan kontras visual antara berbagai komponen

sel dan jaringan saat diamati di bawah mikroskop. Proses sampel jaringan disini dapat membedakan bagian bagian jaringan yang akan diamati seperti inti sel, sitoplasma, dan lain-lain (Rahmawati *et al.*, 2021).

Jaringan tubuh manusia umumnya menunjukkan sifat akromatik. Untuk memudahkan pemeriksaan mikrostrukturnya, komponen seluler dan jaringan memerlukan pewarnaan awal. Beragam pewarna tersedia untuk tujuan ini. Pewarnaan merupakan prosedur pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong, sehingga menghasilkan kontras di antara konstituen jaringan untuk memungkinkan identifikasi dan pengamatan melalui mikroskop. Manifestasi warna muncul dari pembentukan ikatan kimia antara molekul pewarna spesifik dan elemen struktural terlokalisasi di dalam jaringan. Cahaya insiden, yang mencakup panjang gelombang tertentu yang berasal dari iluminasi matahari atau sumber iluminasi mikroskop berinteraksi dengan spesimen sehingga panjang gelombang tertentu diserap atau dipantulkan. Pewarna yang telah melekat pada jaringan secara selektif menyerap cahaya dengan panjang gelombang tertentu, sehingga memberikan rona yang terlihat pada jaringan (Sari 2019).

Metode pewarnaan yang paling umum digunakan adalah H&E, dimana hematoksilin berfungsi sebagai pewarna basa yang mewarnai inti sel menjadi biru, sedangkan eosin, yang bersifat asam, mewarnai sitoplasma dan jaringan ikat menjadi merah muda. Prinsip dasar pewarnaan H&E bertumpu pada interaksi asam-basa antara larutan pewarna dan konstituen jaringan, yang menunjukkan afinitas spesifik terhadap asam-basa larutan, sehingga membentuk ikatan kimia antara pewarna dan entitas molekuler. Pewarnaan H&E banyak digunakan karena metodologinya yang sederhana dan efikasinya dalam menggambarkan beragam komponen jaringan. (Kristian & Inderiati, 2017).

Pewarnaan H&E telah digunakan sebagai teknik diagnostik primer di laboratorium histopatologi selama

lebih dari satu abad dengan kemampuannya untuk memberikan gambaran morfologi yang jelas dari struktur jaringan, Kualitas hasil pewarnaan sangat bergantung pada beberapa faktor, termasuk ketebalan irisan jaringan dan waktu perendaman dalam larutan pewarna. Ketebalan yang terlalu tipis dapat mengakibatkan pewarnaan yang kurang merata atau tidak optimal, sedangkan ketebalan yang terlalu tebal dapat menyebabkan intensitas warna meningkat secara tidak merata (Khristian & Dewi, 2017). Beberapa tahapan pada proses pewarnaan H&E antara lain :

1) Deparafinisasi

Deparafinisasi bertujuan untuk membersihkan sisa-sisa parafin dari jaringan yang telah dipotong. Proses ini dilakukan dengan hati-hati agar tidak merusak struktur jaringan, dan biasanya melibatkan penggunaan larutan xylol secara bertahap untuk memastikan semua parafin terhapus dengan baik (Khristian & Dewi, 2017).

2) Rehidrasi

Berfungsi untuk mengeluarkan larutan xylol yang masih berada dalam preparat dengan cara memasukkan ke dalam alkohol bertingkat dari tinggi kerendah atau 100% - 70%.

3) Pencucian

Pencucian dilakukan dengan air mengalir yang tujuannya untuk mengeluarkan sisa-sisa pewarnaan yang masih terbawa pada slide jaringan.

4) Hematoksilin & Eosin

Hematoksilin ini bersifat basa yang berarti khusus untuk mewarna unsur asam yang fungsinya untuk memberikan warna biru pada inti sel. Sedangkan eosin bersifat asam yang berarti khusus untuk mewarnai unsur basa yang fungsinya untuk memberikan warna merah pada sitoplasma jaringan.

5) Dehidrasi

Berfungsi untuk menghilangkan kadar udara yang terbawa. Larutan yang digunakan adalah alkohol dari 70% - 100%.

6) *Clearing*

Tahap ini membantu menggantikan alkohol yang tersisa dalam jaringan atau untuk menghilangkan agen dehidrasi (alkohol) dari jaringan. Larutan yang digunakan umumnya dengan xylol

7) Perekatan (*Mounting*)

Perekatan merupakan tahap akhir dari prosedur ini. Pada tahap ini, spesimen dilapisi dengan media transparan, seperti entelan, untuk melindungi dan menjaga integritas jaringan dari agen mikroba dan bakteri..

3. Larutan Fiksasi

a. Macam- macam larutan fiksasi

1) *Neutral Buffer Formalin (NBF) 10%*

Neutral Buffer Formalin (NBF) 10% adalah salah satu larutan fiksasi yang paling umum digunakan dalam teknik histologi patologi. NBF 10% mengandung formaldehida yang dilarutkan dalam larutan buffer dengan pH yang dijaga pada kisaran netral sekitar 7.0 hingga 7.4 jika pH menurun bisa merusak struktur sel dan komponen jaringan. Larutan ini terdiri dari formaldehida 10%, yang biasanya setara dengan formalin 4% atau larutan formaldehida 37–40%, dan bahan *buffering*, seperti natrium fosfat (Na_2HPO_4 atau NaH_2PO_4), untuk menjaga keseimbangan pH. formalin bekerja dengan reaksi gugus amina pada molekul protein, yang dapat menyebabkan terjadinya ikatan silang antar protein dan mencegah perubahan struktur. Proses ini mengurangi kemungkinan kerusakan atau degradasi jaringan yang bisa terjadi seiring waktu. Kelebihan larutan NBF 10% ini mampu memberi kestabilan jaringan, larutan ini relatif mudah disiapkan . Kekurangan larutan ini yaitu formalin

adalah senyawa toksik dan karsinogenik penggunaan formalin memerlukan prosedur keselamatan untuk mencegah paparan terhadap tubuh (Kasprzyk *et al.*, 2023).

Larutan fiksatif NBF 10% memiliki sifat isotonik atau memiliki tekanan osmotik yang sama dengan cairan ekstraseluler sehingga mempertahankan struktur jaringan. Prinsip penggunaan NBF 10% sebagai larutan fiksasi yaitu penambahan gugus sisi dari asam amino (lisin) serta pembentukan ikatan peptide dari atom amida nitrogen dengan metilen sehingga terjadi ikatan silang metilen yang menghubungkan dua formaldehid. NBF 10% memiliki kecepatan penetrasi 1mm/ jam (Khristian & Dewi, 2017).

2) Larutan Bouin

Larutan bouin adalah salah satu larutan fiksasi yang digunakan untuk mengawetkan jaringan biologis. Larutan ini efektif dalam mempreservasi struktur seluler dengan memberikan kontras yang jelas antara berbagai bagian jaringan, sehingga sangat berguna dalam berbagai teknik pewarnaan dan analisis mikroskopis (Sharma *et al.*, 2022). Larutan bouin adalah larutan fiksasi yang mengandung senyawa asam yang berfungsi sebagai pelunak (dekalsifikasi) jaringan keras seperti tulang. Larutan ini banyak digunakan untuk mengawetkan larva karena warnanya yang memberi kesan kekuningan, sehingga proses histologi yaitu pengeblokan dan pembedahan dapat dilakukan dengan mudah (Mujimin & Suratmi, 2016).

Larutan bouin terdiri dari 10% formaldehida (dari larutan formalin 25%), asam asetat konsentasi 0,9 M dan asam pikrat sebanyak 0.04 M yang dilarutkan didalam air. Larutan bouin memiliki pH sekitar 1,5-2. Larutan ini umumnya digunakan ketika sediaan akan dilakukan pewarnaan menggunakan pewarna trichome. Sampel jaringan yang biasanya direndam atau dilakukan fiksasi menggunakan larutan bouin

selama 24 jam. Namun, setelah fiksasi jaringan dalam larutan ini terjadi hidrolisis, disertai degradasi dan hilangnya DNA dan RNA. Akibatnya jaringan yang diawetkan dalam larutan Bouin memerlukan pencucian menyeluruh sebelum diproses lebih lanjut. (Khristian & Dewi, 2017).

3) Formalin

Formalin atau formaldehida adalah gas yang terbentuk dalam gugus aldehida ($-CHO$). Konsentrasi formaldehida sering digunakan fiksasi adalah 4%-10% (Alwi, 2016). Larutan formalin 5% biasanya digunakan dalam proses fiksasi larva dan hasilnya lebih baik dibandingkan dengan larutan fiksatif yang lainnya. Larutan formalin 10% digunakan untuk fiksasi gonad, organ dalam bentuk yang lunak. Formaldehida dapat membuat protein didalam jaringan menjadi asam, oleh karena itu jaringan yang difiksasi formalin akan memiliki afinitas yang baik terhadap zat-zat warna basa (Rusmiatik 2019).

Kelebihan dari larutan formaldehida adalah larutan ini murah dan mudah didapatkan serta lebih stabil, selain itu formaldehida juga mengawetkan jaringan tanpa mengubah warna aslinya. Namun, kelemahan formaldehida yang perlu diperhatikan terletak pada toksisitasnya dan kemampuannya menyebabkan iritasi kulit, karena sifat gasnya yang kuat, yang dapat memicu reaksi asma pada individu yang terpapar dalam waktu lama atau mereka yang menderita alergi. (Alwi 2016).

b. Larutan Pengganti Fiksasi

Salah satu alternatif sebagai pengganti larutan fiksasi *Neutral Buffer Formalin* (NBF 10%) adalah larutan fiksasi berbasis aceton yang mekanisme kerjanya sama dengan formaldehid.

1) Aceton

Aceton adalah salah satu larutan yang digunakan dalam proses fiksasi ketika fiksasi segera dibutuhkan. Aceton bekerja dengan cara

menghilangkan air dari jaringan dan mengawetkan struktur protein, sementara jaringan tetap berada dalam keadaan kering. Sifat dari acetone sangat cepat dalam mengeringkan sampel sehingga sering digunakan untuk analisis teknik imunohistokimia dan pewarnaan fluorosensi. Acetone memiliki kelebihan dan kekurangan. Salah satu kelebihannya adalah untuk memfiksasi jaringan tanpa menyebabkan kerusakan struktural yang signifikan pada protein atau sel (Risanto *et al.*, 2018)

Beberapa kekurangannya seperti tidak mampu dalam mempertahankan morfologi jaringan secara detail dan pengaruhnya yang kurang baik pada struktur ultraseluler. Jika dibandingkan dengan fiksasi lain seperti formaldehida atau glutaraldehid. Penggunaan acetone ini tidak menjadi saran untuk memfiksasi jaringan terutama yang mengandung lipid banyak, karena sifat pelarutnya dapat merusak membran sel. Sehingga secara keseluruhan, acetone cocok digunakan untuk fiksasi sementara, terutama dalam penelitian yang memerlukan fiksasi cepat atau untuk molekuler tertentu (Musyarifah & Agus, 2018).

4. Gula Pasir

Scaccarum officinarum adalah spesies tebu yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia. Harga yang relative terjangkau dan ramah lingkungan karena merupakan pemanis alami. Selain perannya sebagai pemanis, gula sering kali berfungsi sebagai penstabil dan pengawet. Gula pasir, yang utamanya berasal dari nira tebu, merupakan produk utama dari proses ini dan tersedia di mana-mana di masyarakat. Dengan kandungan sukrosa 97,1%, gula pasir terbukti efektif sebagai fiksatif alternatif pengganti formalin penyangga netral (NBF) 10%, karena kandungan sukrosanya yang tinggi. Dalam pemanis alami ber-pH rendah, sukrosa mengalami hidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa, yang difasilitasi oleh H₂O (air suling). Selanjutnya, dalam lingkungan asam, fruktosa menghasilkan gugus aldehid, yang membentuk ikatan silang dengan asam amino inheren jaringan (Wardani dan Rahmawati, 2020). Selain

itu gula pasir biasanya mengandung 1,24%, gula pereduksi 0,61% air, dan 0,7% senyawa organik non-gula, sehingga memungkinkan gugus aldehida berinteraksi dengan asam amino jaringan dan menghasilkan fiksasi. Proses ini bekerja melalui mekanisme yang sama dengan fiksasi yang dimediasi formaldehida. (Pratiwi 2019).

Gula pasir yang merupakan alternatif fiksasi jaringan memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan formaldehida. Salah satu keuntungan utama adalah sifat non toksiknyanya yang menjadikan aman untuk digunakan dalam laboratorium, terutama dalam konteks dimana paparan bahan kimia berbahaya perlu diminimalkan. Hal ini melibatkan jaringan biologis, dimana keselamatan dan integritas sampel harus diutamakan. Selain itu, gula pasir mudah diperoleh dan relative murah sehingga dapat diakses oleh berbagai kalangan, termasuk laboratorium pendidikan. Di samping itu menurut penelitian yang dilakukan Pratiwi, 2019 menunjukkan bahwa penggunaan gula sebagai fiksatif dapat meningkatkan kualitas gambar yang dihasilkan dalam analisis mikroskopis.

5. Madu

Madu adalah cairan manis alami yang dihasilkan oleh lebah dari nektar bunga atau sekresi tanaman yang diolah oleh lebah. Madu terdiri dari berbagai komponen, termasuk karbohidrat, air, protein, dan senyawa bioaktif lainnya. Komposisi utama madu adalah gula sederhana seperti glukosa dan fruktosa, yang menyumbang sekitar 80-85% dari total berat madu. Selain itu, madu juga mengandung vitamin, mineral, dan senyawa antioksidan yang memberikan manfaat kesehatan. Karena keanekaragaman sumber nektar yang dikumpulkan oleh lebah, karakteristik dan kualitas madu dapat bervariasi tergantung pada jenis tanaman dan lokasi geografis. Fungsi madu dalam kehidupan manusia sangat beragam, mulai dari pemanis alami hingga penggunaan dalam pengobatan tradisional. Madu dikenal memiliki sifat antimikroba dan antiinflamasi sehingga sering digunakan dalam perawatan luka dan infeksi (Supeno & Erwan, 2016).

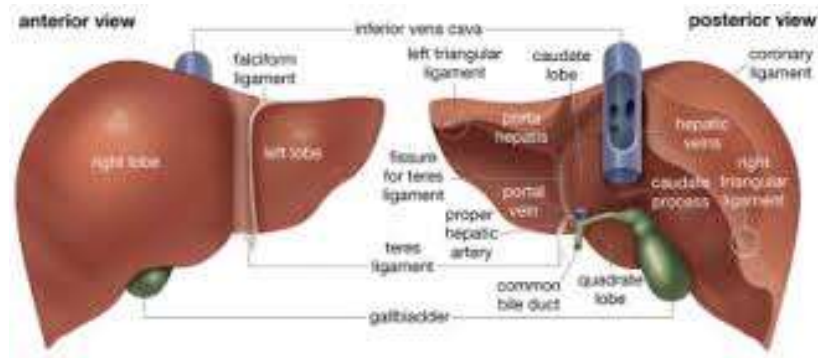
Madu telah lama dikenal sebagai bahan alami yang memiliki berbagai manfaat kesehatan, dan dalam bidang

histologi, madu juga dianggap sebagai bahan alternatif yang potensial untuk fiksasi jaringan. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Hossain *et al.*, 2013, madu mengandung sejumlah senyawa seperti gula, asam amino, dan vitamin yang berfungsi sebagai pengawet alami dalam proses fiksasi jaringan. Penggunaan madu sebagai bahan fiksatif dapat memberikan hasil fiksasi yang lebih lembut dibandingkan dengan formalin, sehingga struktur sel dan jaringan dapat dipertahankan dengan lebih baik (Hossain *et al.*, 2013) Selain itu, madu memiliki sifat antimikroba yang dapat membantu mencegah kontaminasi selama proses fiksasi. Ini sangat penting dalam konteks laboratorium patologi, di mana keutuhan dan kebersihan sampel jaringan sangat diperlukan. Dengan menggunakan madu, risiko infeksi atau pertumbuhan mikroba dapat diminimalkan, sehingga meningkatkan kualitas hasil analisis jaringan (Rini 2023).

Madu juga dikenal memiliki sifat antioksidan yang melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif selama proses fiksasi. Kerusakan oksidatif dapat menyebabkan perubahan pada struktur sel dan jaringan, yang pada gilirannya dapat mempengaruhi hasil analisis histologis. Dengan menggunakan madu, diharapkan kerusakan ini dapat diminimalkan, sehingga jaringan tetap dalam kondisi yang lebih baik untuk analisis lebih lanjut. Secara keseluruhan, penggunaan madu sebagai larutan fiksasi jaringan menawarkan alternatif yang menarik dan berpotensi lebih aman dibandingkan dengan formalin (Rini 2023).

6. Organ Hati

Organ hati adalah organ intestinal terbesar dengan berat kurang lebih 25% berat badan orang dewasa. Hati penting pada tubuh manusia dan memiliki banyak fungsi terutama dalam mempertahankan keseimbangan metabolisme tubuh manusia. Organ ini terletak di rongga perut bagian kanan atas, di bawah diafragma, dan terdiri dari dua lobus besar yang terbagi lagi menjadi lobulus yang disebut hepatosit. Unit fungsional hati adalah lobus hati yang tersusun atas sel-sel hati yang merupakan terbesar dengan satu atau dua inti sitoplasma granular yang halus (Alwi 2016).



Gambar 3. Organ Hati

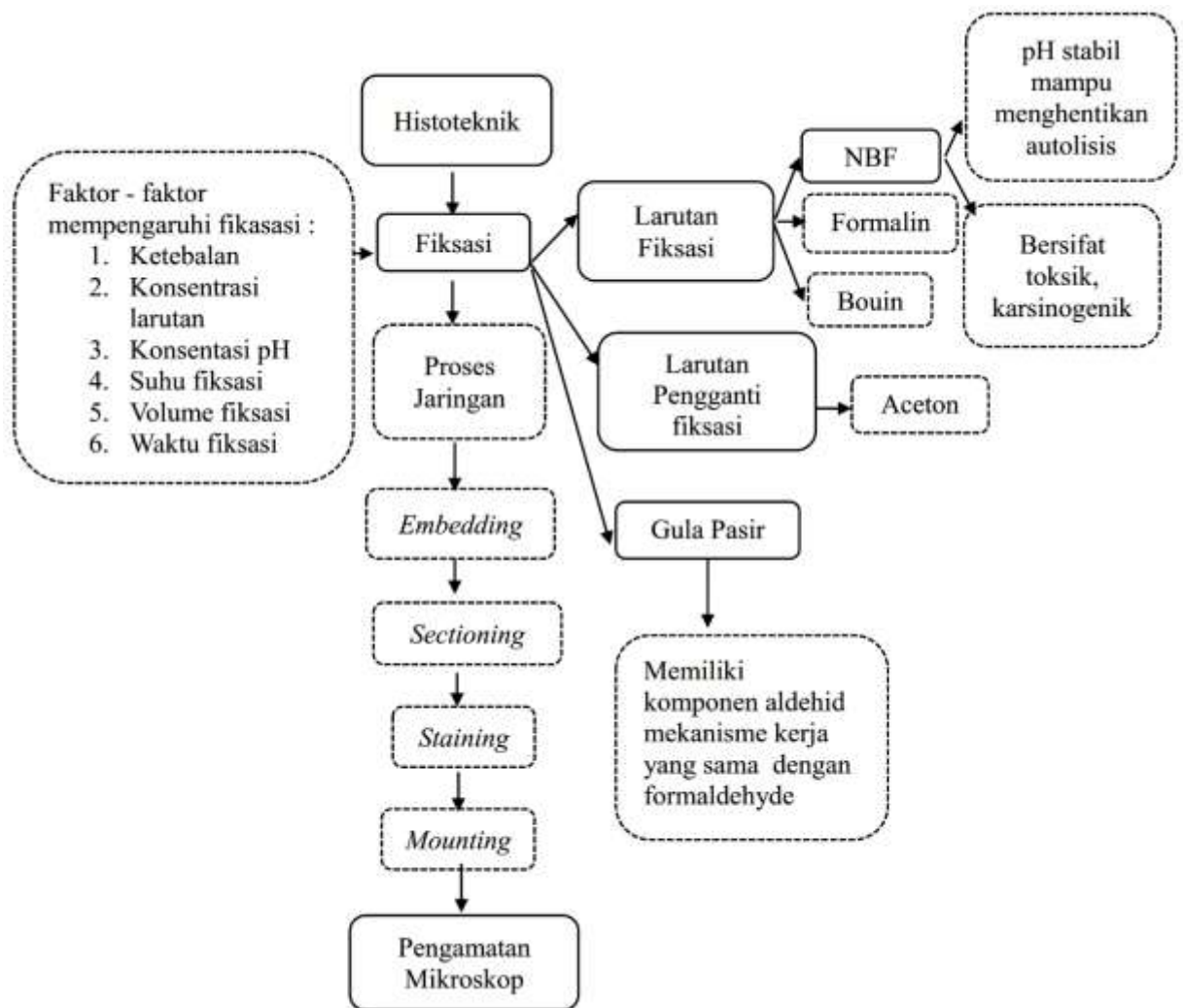
Hati terdiri atas sel yang disebut dengan hepatosit. Hepatosit adalah sel polihidral yang besar dengan diameter 20-30 μm . didalam sel hepatosit terdapat satu hingga dua inti sel terbentuk bulat dan terdapat organel- organel sel diantaranya reticulum endoplasma, mitokondria, badan golgi, lemak dan glikogen. Fungsi utama hati meliputi sintesis protein plasma, detoksifikasi, penyimpanan glikogen, produksi empedu, dan metabolisme berbagai macam zat makanan dan obat-obatan. Hati berguna dalam proses pembekuan darah dengan memproduksi faktor pembekuan dan menjaga keseimbangan dalam tubuh (Guyton 2019).

Hati juga memiliki sistem vaskular yang unik, di mana darah dari vena porta dan arteri hepatica bercampur sebelum mencapai vena sentralis. Struktur ini memungkinkan hati untuk melakukan berbagai fungsi penting, termasuk pengolahan zat-zat berbahaya dan produksi protein plasma. Salah satu ciri khas jaringan organ hati berupa struktur yang terorganisir dengan baik memungkinkan fungsi yang kompleks. Pada tingkat mikroskopis, hepatosit membentuk lapisan-lapisan teratur yang dikelilingi oleh sinusoida, yaitu pembuluh darah kecil yang memungkinkan pertukaran zat antara darah dan sel-sel hati. Sinusoida ini berperan penting dalam proses detoksifikasi dan metabolisme, serta memastikan bahwa produk sampingan yang dihasilkan oleh hepatosit dapat dibawa ke sistem peredaran darah (Alwi 2016). Selain hepatosit, hati juga mengandung sel kupffer yang berfungsi dalam pertahanan imun dan sel stellate juga memiliki peran penting dalam penyimpanan vitamin A dan pengaturan perbaikan jaringan hati. Dengan demikian, kesehatan hati sangat mempengaruhi keseimbangan

metabolisme tubuh secara keseluruhan dan kemampuan tubuh untuk mendetoksifikasi zat berbahaya (Maulina 2018).

Hati organ vital yang berperan penting dalam berbagai fungsi metabolisme tubuh termasuk sintesis protein, detoksifikasi, dan penyimpanan nutrisi sebagai organ intestinal terbesar, hati memiliki struktur yang terorganisir dengan baik, terdiri dari lobus-lobus yang dibagi menjadi lobulus kecil, di mana sel-sel hepatosit berfungsi sebagai unit fungsional utama. Hepatosit tidak hanya bertanggung jawab untuk metabolisme karbohidrat dan lemak, tetapi juga berperan dalam produksi empedu yang diperlukan untuk pencernaan lemak. Pada tingkat mikroskopis, struktur hati yang kompleks memungkinkan interaksi antara hepatosit dan sinusoida, yaitu pembuluh darah kecil yang memungkinkan pertukaran zat antara darah dan sel-sel hati (Maulina 2018).

B. Kerangka Pikir Penelitian



Gambar 4. Kerangka Pikir Penelitian

Keterangan :

 : Diteliti
 : Tidak diteliti