

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

1. Histoteknik

Histoteknik adalah teknik yang digunakan untuk pembuatan sediaan histopatologi rutin. Tujuan utama histoteknik adalah untuk mengenali karakteristik jaringan, baik dari segi struktur maupun morfologi sel, serta membantu dalam proses diagnosis penyakit. Terdapat beberapa proses untuk menghasilkan preparat jaringan yaitu pertama proses fiksasi agar tidak terjadi autolisis, kemudian dilakukan *dehidrasi*, *clearing* (pembeningan), *filtrasi paraffin*, *embedding* (pengeblokan), *sectioning*, *deparafinasi*, *staining* atau pewarnaan, dan *maunting* (Prahanarendra, 2015). Rangkaian pembuatan preparat jaringan antara lain:

a. Fiksasi

Fiksasi merupakan tahapan pertama dalam pembuatan preparat histopatologi yang bertujuan untuk menghentikan autolisis dan kerusakan jaringan, sehingga struktur dan komponen jaringan tetap dapat diamati secara mikroskopik. Proses fiksasi juga berfungsi melindungi jaringan biologis dari denaturasi, mencegah dehidrasi, serta menjaga kestabilan sel sehingga tidak mengalami pengerasan pada tahap pengolahan dan pewarnaan berikutnya (Musyarifah & Agus, 2018).

Prinsip fiksasi bertujuan mempertahankan struktur sel dan organel agar tetap mendekati kondisi fisiologisnya. Cairan fiksatif menyebabkan dua jenis perubahan pada jaringan, yaitu secara kimiawi maupun fisik. Dari sisi kimiawi, protein dalam sel mengalami perubahan fungsi dan struktur melalui proses koagulasi yang menghasilkan senyawa aditif baru. Sementara secara fisik, membran sel yang bersifat hidrofilik akan bereaksi dengan cairan fiksatif sehingga pori-pori sel mengalami pembesaran (Prahanarendra, 2015). Fiksasi juga memicu perubahan pada jaringan berupa penyusutan, pembengkakan, serta pengerasan berbagai komponen (Rachmayani, 2015). Pengerasan pada proses fiksasi agar memudahkan untuk pembuatan jaringan irisan tipis (Fitriana, 2014). Fiksasi diterapkan pada jaringan tertentu untuk mempengaruhi elemen yang nantinya akan diwarnai menggunakan reagen histokimia maupun imunohistokimia (Rachmayani, 2015). Tujuan fiksasi pada jaringan yang diproses antara lain :

- 1) Mempertahankan struktur serta komponen kimia jaringan
Mempertahankan struktur serta komponen kimiawi sel atau jaringan agar mendekati kondisi aslinya saat masih hidup, sehingga analisis patologi maupun pewarnaan histokimia dapat dilakukan secara optimal (Rachmayani, 2015).

2) Pencegahan kerusakan dan kematian

Autolisis adalah proses penghancuran sel melalui enzim intraselular yang dilepaskan saat membran lisosom rusak. Pembusukan jaringan terjadi karena adanya mikroorganisme yang sudah terdapat pada spesimen. Cirinya dengan ditunjukkannya pembentukan gas dan bakteri pada wadah spesimen (Rachmayani, 2015).

3) Mengerasakan sel dan jaringan

Proses pengerasan jaringan ini menjadi efek fiksasi yang menguntungkan, sehingga efek pengerasan memudahkan pada saat pemotongan makroskopis khususnya jaringan yang lunak seperti otak, usus, dll (Rachmayani, 2015).

4) Pemadatan koloid

Pemadatan merupakan reaksi kimiawi dalam larutan fiksasi. Komponen jaringan yang cair seperti gel yang konsistensinya setengah cair akan menjadi konsistensi semipadat hingga padat (Rachmayani, 2015).

5) *Optical diferensiasi*

Selain melindungi sel dari kerusakan, fiksasi juga berfungsi mengubah indeks bias komponen sel dan jaringan, sehingga hasil fiksasi lebih mudah untuk diamati secara visual (Rachmayani, 2015).

6) Efek pewarnaan

Pada kasus tertentu, penggunaan larutan fiksatif dapat memperkuat warna pada sel dan jaringan. Misalnya, formalin mampu meningkatkan hasil pewarnaan saat digunakan dengan hematoksilin. Sedangkan pada pewarnaan *masson trichome*, larutan fiksasi Bouin digunakan karena dapat menghasilkan kontras warna yang lebih jelas (Rachmayani, 2015).

7) Perekatan sel

Dalam pembuatan preparat sitologi, larutan fiksatif berperan membantu sel menempel pada objek kaca. Sel yang difiksasi akan melekat optimal, baik menggunakan larutan fiksatif maupun melalui fiksasi kering. Fungsi ini sering diterapkan pada apusan sel dan bakteri di kaca objek (Rachmayani, 2015).

Fiksasi dapat dibedakan menjadi dua, yaitu fiksasi fisik dan fiksasi kimia. Fiksasi fisik dilakukan menggunakan suhu yang ekstrem, baik suhu rendah (*cryo-fixation*) maupun tinggi (*boiling* atau *microwave*). Penggunaan fiksasi panas jarang diterapkan untuk pemeriksaan smears atau mikroorganisme, walaupun metode *microwave* kini telah banyak dimanfaatkan dalam pemeriksaan rutin di laboratorium. Sementara itu, *cryo-fixation* lebih sering dipakai untuk pewarnaan histokimia, tetapi jarang untuk diagnosa jaringan. Sedangkan fiksasi kimia dilakukan dengan cara merendam jaringan dalam larutan fiksatif atau melalui injeksi cairan fiksatif ke dalam

sistem vaskuler. Pada fiksasi kimia, perlindungan sel dan jaringan dilakukan melalui proses denaturasi protein dengan cara koagulasi (fiksasi non-aditif), *cross-linking* (membentuk senyawa aditif), atau gabungan dari keduanya. Fiksasi ini paling umum digunakan pada sediaan yang dilihat menggunakan mikroskop (Musyarifah & Agus, 2018).

Waktu fiksasi menjadi salah satu faktor terpenting karena jika jaringan tidak terfiksasi dengan waktu yang cukup maka akan menghasilkan gambar yang tidak baik. Secara umum waktu fiksasi yang baik adalah 6 - 72 jam, Jika lebih dari 72 jam jaringan akan mengalami kerusakan jaringan yaitu pengerasan pada jaringan. Sedangkan jika kurang dari 6 jam maka akan mengakibatkan terjadinya degenerasi pada jaringan. Proses fiksasi juga dapat menghasilkan artefak pada preparat sebagai bentuk efek protektif. Jenis fiksatif yang paling umum digunakan dalam histopatologi adalah NBF 10% (Musyarifah & Agus, 2018).

b. *Dehidrasi*

Dehidrasi merupakan tahapan penghilangan air serta zat fiksatif yang tersisa pada jaringan. Bahan reagen untuk dehidrasi memiliki sifat hidrofilik, dengan kutub-kutub yang mudah berinteraksi dan mengikat molekul air. Proses *dehidrasi* dilakukan secara bertahap, karena penggunaan konsentrasi tinggi secara tiba-tiba dapat menyebabkan gangguan difusi melalui membran sel yang berpotensi

merusak jaringan. Jika *dehidrasi* dilakukan berlebihan, jaringan bisa menjadi kaku, rapuh, dan kusut. Bahan kimia yang umum dipakai untuk proses ini meliputi etanol, etanol-aseton, metanol, isopropil, butanol, glikol, serta alkohol terdenaturasi (Rachmayani 2015).

c. *Clearing* (Pembeningan)

Clearing (pembeningan) adalah langkah untuk menghilangkan sisa alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan larutan yang kompatibel dengan parafin. Tahapan *clearing* menjadi krusial ketika jaringan masih mengandung sisa alkohol, meskipun dalam jumlah kecil, sebab parafin tidak dapat meresap ke jaringan jika alkohol masih ada. Untuk proses *clearing*, digunakan bahan penjernih seperti *xylol* dan *toluen*, yang masing-masing memiliki keunggulan dan kelemahan tersendiri. *Xylol* unggul karena prosesnya cepat dan biayanya relatif murah. Namun, kekurangannya adalah hanya dapat memindahkan jaringan dari alkohol absolut, dan hasil jernihannya kadang tidak tampak transparan sepenuhnya sehingga sulit memastikan apakah prosesnya sudah optimal. *Toluen* memiliki keunggulan karena umum digunakan di banyak laboratorium, harganya ekonomis, mudah diperoleh, dan memberikan hasil jernih yang transparan. Namun, jika hasilnya tidak transparan, hal ini menunjukkan proses *dehidrasi* sebelumnya belum dilakukan dengan baik. Kekurangan *toluen* adalah hanya dapat digunakan untuk memindahkan jaringan dari alkohol absolut. Jika jaringan direndam

terlalu lama dalam *toluen*, jaringan dapat menjadi keras sehingga menyulitkan pemotongan dengan mikrotom (Alwi, 2020).

Reagen *clearing* berfungsi sebagai penghubung antara larutan *dehidrasi* dan larutan *infiltrasi*. Reagen ini dapat larut dalam kedua larutan tersebut dan umumnya berupa hidrokarbon dengan indeks bias yang mendekati indeks bias protein. Agen pembeningan idealnya memiliki kemampuan menembus jaringan dengan cepat, mampu menghilangkan agen *dehidrasi* secara efisien, mudah digantikan oleh agen *infiltrasi*, tidak menimbulkan kerusakan jaringan yang signifikan, memiliki sifat mudah terbakar yang rendah, toksisitas minimal, serta biaya yang terjangkau. Karena titik didihnya yang rendah, agen pembeningan biasanya lebih mudah digantikan oleh parafin cair. Namun, jika jaringan terpapar terlalu lama dengan agen pembeningan, jaringan dapat menjadi rapuh (Reagen Limonene) (Rachmayani, 2015).

d. *Infiltrasi Parafin*

Infiltrasi merupakan tahapan memasukkan larutan filtrat ke dalam jaringan, yang menyebabkan jaringan menjadi lebih keras setelah larutan tersebut meresap pada suhu ruang. Larutan yang dipakai untuk proses *infiltrasi* biasanya adalah parafin dengan titik leleh sekitar 47 hingga 64°C. Bahan *infiltrasi* berfungsi menjaga integritas sel dan komponen ultrastruktural agar tetap stabil selama tahap pemotongan. Lilin parafin umumnya dilengkapi dengan

plasticizer atau aditif resin lain yang tersedia secara komersial, sehingga dapat disesuaikan dengan kebutuhan berbagai laboratorium. Jaringan dibenamkan dalam parafin kemudian membentuk matriks, hal ini untuk mencegah kerusakan struktur jaringan selama pemotongan (Rachmayani, 2015).

e. *Embedding (Pengeblokan)*

Embedding atau pembedaman adalah tahap di mana cairan pembening (*clearing agent*) dihilangkan dari jaringan dan digantikan dengan parafin. Pada proses ini, jaringan harus sepenuhnya bebas dari sisa cairan pembening, karena residu yang mengkristal dapat menyebabkan jaringan mudah robek saat dipotong menggunakan mikrotom. Bahan yang digunakan pada tahap ini adalah parafin panas dengan titik lebur sekitar 54°C hingga 58°C (Alwi, 2020). Proses penanaman harus dilakukan dengan cepat agar parafin tidak sempat membeku, serta memastikan posisi jaringan sudah benar-benar kokoh sebelum *base mold* ditutup dengan kaset (Rachmayani, 2015).

f. *Sectioning (Pemotongan Organ)*

Proses pemotongan jaringan dilakukan dengan menggunakan alat khusus yang disebut mikrotom. Mikrotom memiliki mata pisau yang sangat tajam dan mampu menghasilkan irisan blok jaringan dengan ketebalan yang sangat tipis sesuai kebutuhan. Untuk keperluan histopatologi rutin, ketebalan potongan mikrotom yang ideal adalah sekitar 3–5 mikron. Terdapat berbagai jenis mikrotom, antara lain

Hand microtome, Rocking microtome, Rotary microtome, Freezing microtome, Base sledge microtome, dan Vibrating knife microtome (Alwi, 2020). Adapun teknik pemotongan blok parafin adalah sebagai berikut:

- 1) Blok parafin yang berisi jaringan diletakkan pada dudukan mikrotom dan kunci dengan kuat.
- 2) Sesuaikan sudut kemiringan mikrotom pada rentang 20–30 derajat.
- 3) Tentukan ketebalan irisan jaringan yang diinginkan, umumnya sekitar 3–5 mikrometer.
- 4) Putar tuas secara perlahan ke arah pisau dan lakukan pemotongan dengan ketebalan yang konsisten. Singkirkan pita parafin yang hasilnya kurang baik.
- 5) Pindahkan pita parafin yang memiliki kualitas baik menggunakan kuas ke dalam *waterbath* bersuhu 40°C, kemudian biarkan beberapa saat hingga pita parafin yang berisi jaringan mengembang dan tidak lagi menggulung.
- 6) Setelah pita parafin mengembang dengan sempurna, angkat pita tersebut dari *waterbath* menggunakan kaca objek. Selanjutnya, letakkan di atas *hot plate* dengan suhu antara 40°C hingga 45°C, tahapan ini berfungsi untuk menghilangkan sisa kadar air yang tertempel pada preparat jaringan dan untuk memastikan pita

parafin tertempel dengan baik pada objek glass. Selanjutnya akan dilakukan proses pewarnaan (Alwi, 2020).

g. *Deparafinasi*

Deparafinasi adalah tahap yang dilakukan sebelum proses pewarnaan (*staining*) dengan tujuan untuk menghilangkan atau melarutkan parafin, sehingga pewarna dapat terserap secara optimal pada jaringan. Proses *deparafinasi* umumnya menggunakan *xylol* (E. N. Pratiwi & Armalina, 2021).

h. *Staining (Pengecetan)*

Staining adalah proses pemberian warna pada jaringan. Proses ini dilakukan untuk mempermudah pengamatan di bawah mikroskop serta membantu membedakan struktur jaringan, seperti inti sel, sitoplasma, dan komponen lainnya (Rahmawanti *et al.*, 2021). Pewarna yang umum digunakan dalam teknik histologi adalah hematoksilin dan eosin (Alwi, 2020).

i. *Mounting*

Penempelan (*mounting*) adalah tahap pemasangan *coverglass* pada kaca preparat dengan memanfaatkan cairan perekat yang disebut entellan. Pemasangan *coverglass* bertujuan untuk melindungi preparat sampel dari kontak langsung dengan lensa mikroskop selama proses pengamatan (Rahmawanti *et al.*, 2021).

2. Larutan Fiksasi

a. Macam-macam larutan fiksasi

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

Neutral Buffer Formalin atau NBF 10% merupakan larutan fiksatif yang umum digunakan di laboratorium histologi maupun patologi untuk menjaga integritas jaringan sebelum analisis mikroskopis. Larutan ini terdiri dari 10% formalin (setara dengan 4% formaldehida murni) yang dicampur dengan larutan penyangga fosfat untuk mempertahankan pH netral, yaitu sekitar 7,0. Komposisi ini memungkinkan NBF 10% untuk menghambat aktivitas enzimatik dan pertumbuhan mikroorganisme yang dapat merusak jaringan, sekaligus mempertahankan struktur morfologi secara detail (Dahar *et al.*, 2019). Fiksasi menggunakan NBF 10% juga mempersiapkan jaringan agar lebih kompatibel dengan berbagai teknik pewarnaan, seperti pewarnaan *hematoksilin-eosin* (HE), sehingga mempermudah identifikasi elemen seluler dan jaringan. Keunggulannya yang serbaguna membuat NBF 10% menjadi standar fiksatif dalam prosedur diagnostik dan penelitian biomedis (Chung *et al.*, 2018).

Neutral Buffer Formalin (NBF) 10% dikenal sebagai larutan fiksatif standar emas (*gold standard*) untuk pengawetan jaringan pada pemeriksaan histopatologi secara rutin. Larutan ini memiliki keunggulan berupa pH netral, yakni sekitar pH 7,

sehingga lebih mudah digunakan dan mampu mengawetkan jaringan dalam jangka waktu yang cukup lama. Proses fiksasi dengan NBF biasanya memerlukan waktu 12–24 jam sebelum jaringan siap untuk diproses lebih lanjut. Sedangkan kekurangan larutan ini daya fiksasi lebih lambat dibandingkan dengan larutan fiksatif lainnya (Sriwahyunizah, 2018).

Larutan NBF 10% merupakan campuran dari aquadest, 37% formaldehida dan garam natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4). Penambahan garam berfungsi untuk mendapatkan pH netral yang dapat dipertahankan. Larutan fiksatif NBF 10% ini memiliki sifat isotonik atau memiliki tekanan osmotik yang setara dengan cairan ekstraseluler. sehingga dapat mempertahankan struktur jaringan. Prinsip kerja larutan NBF 10% melibatkan penambahan rantai samping dari asam amino, khususnya lisin, serta ikatan peptida dari atom nitrogen amida. Ikatan silang yang terbentuk menghubungkan gugus metilen dari dua molekul formaldehida yang saling berikatan. NBF 10% memiliki kecepatan penetrasi 1mm/jam (Rachmayani, 2015).

Neutral Buffer Formalin (NBF) 10% memiliki sejumlah kelebihan dan kekurangan yang penting untuk dipertimbangkan. Salah satu keunggulan utama NBF 10% adalah kemampuannya menjaga struktur jaringan secara detail dan kompatibilitasnya dengan berbagai teknik pewarnaan histologi, seperti pewarnaan

hematoksilin-eosin (HE). pH netralnya mencegah kerusakan jaringan akibat lingkungan yang terlalu asam atau basa, serta mampu menghentikan proses autolisis dan putrefaksi secara efektif. Namun, NBF 10% juga memiliki kekurangan, seperti sifat toksik dan karsinogenik dari formaldehyda yang memerlukan penanganan hati-hati serta ventilasi yang memadai (Chung *et al.*, 2018). Penggunaannya dapat menyebabkan pengerasan jaringan jika waktu fiksasi terlalu lama, sehingga menyulitkan proses pemotongan jaringan. Larutan ini juga dapat memodifikasi biomolekul seperti DNA dan RNA, membuatnya kurang ideal untuk analisis molekuler tertentu. Meskipun demikian, keunggulan dalam mempertahankan morfologi jaringan membuat NBF 10% tetap menjadi fiksatif standar dalam histologi dan patologi (Agustin *et al.*, 2021).

2) Larutan Formalin

Formalin atau formaldehyda merupakan gas yang termasuk dalam gugus aldehyda (-CHO). Untuk keperluan fiksasi, konsentrasi formaldehyda yang digunakan berkisar antara 4% hingga 10%. Formaldehyda memiliki sifat yang keras sehingga dapat menimbulkan iritasi. Salah satu alasan penggunaannya dalam fiksasi adalah kemampuannya menurunkan tekanan atmosfer dan vakum dalam proses pengolahan jaringan. Beberapa penelitian merekomendasikan penggunaan formaldehyda dengan

pH 7 yang distabilkan menggunakan fosfat sebagai penyingga. Formalin banyak digunakan sebagai fiksatif yang disarankan dalam teknik histologi maupun histokimia. Keunggulan formaldehida antara lain harganya relatif murah, mudah disiapkan, stabil, serta mampu memfiksasi jaringan tanpa mengubah warna aslinya. Namun, kelemahannya adalah sifatnya yang beracun dan dapat menyebabkan iritasi pada kulit, serta jika terpapar dalam waktu lama dapat menguap ke udara sehingga memicu iritasi pada mukosa hidung dan bahkan menyebabkan asma pada individu yang sensitif atau memiliki alergi (Alwi, 2020).

3) Larutan Bouin

Larutan Bouin merupakan larutan fiksatif yang mengandung komponen asam dengan fungsi utama sebagai pelunak (dekalsifikasi) pada jaringan keras seperti tulang. Larutan ini sering digunakan untuk mengawetkan larva karena memiliki warna kekuningan, sehingga mempermudah proses pengeblokan dan pemotongan. Komposisi larutan Bouin terdiri dari 10% formaldehida (25% formalin), asam asetat 0,9 M, dan asam pikrat 0,04 M yang dilarutkan dalam air. Asam pikrat bekerja dengan menembus jaringan secara perlahan, mengentalkan protein, serta dapat menyebabkan sedikit penyusutan jaringan. Larutan Bouin memiliki pH berkisar antara

1,5 hingga 2. Dibandingkan dengan NBF, penetrasi larutan Bouin berlangsung lebih cepat. Namun, penyimpanan jaringan terlalu lama dalam larutan ini dapat memicu hidrolisis dan hilangnya DNA maupun RNA. Oleh karena itu, jaringan yang difiksasi menggunakan larutan Bouin harus melalui tahap pencucian terlebih dahulu sebelum diproses lebih lanjut (Rachmayani, 2015).

b. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses fiksasi

1) Konsentrasi ion hidrogen (pH)

Fiksasi idealnya dilakukan pada kondisi pH netral, yaitu sekitar pH 7. Kondisi hipoksia pada jaringan dapat menurunkan pH, sehingga diperlukan fungsi buffer pada larutan fiksatif untuk mencegah terjadinya keasaman berlebih. Keasaman yang tinggi dapat memicu terbentuknya pigmen formalin-heme yang terlihat sebagai deposit berwarna hitam pada jaringan. Larutan formalin yang umum digunakan biasanya mengandung buffer fosfat dengan pH 7. Fiksatif yang bersifat hipertonik dapat menyebabkan sel menyusut, sedangkan fiksatif hipotonik berpotensi menimbulkan pembengkakan sel (Musyarifah & Agus, 2018). Jika pH berada di luar rentang tersebut, struktur jaringan dapat mengalami kerusakan akibat presipitasi sel. Perubahan pH juga memengaruhi jumlah ion, sehingga dapat

mempercepat atau memperlambat laju reaksi yang pada akhirnya berdampak pada hasil pengamatan mikroskopis (Alwi, 2020).

2) Suhu atau Temperatur pada proses fiksasi

Kenaikan suhu pada reaksi kimia umumnya akan mempercepat laju fiksasi serta meningkatkan penetrasi agen fiksatif ke dalam jaringan. Formalin dengan suhu yang lebih tinggi mampu memperbaiki jaringan dengan lebih cepat, sehingga sering digunakan sebagai tahap awal dalam proses pengolahan jaringan otomatis. Pada pemeriksaan mikroskop cahaya, fiksasi biasanya dilakukan pada suhu ruang, kemudian dilanjutkan pada suhu sekitar 45°C selama proses pengolahan jaringan (Musyarifah & Agus, 2018).

3) Penetrasi Larutan

Penetrasi dipengaruhi oleh kemampuan difusi serta berat molekul dari masing-masing larutan fiksatif. Formalin dan alkohol memiliki daya penetrasi paling baik, sedangkan glutaraldehid menunjukkan kemampuan penetrasi yang paling rendah. Proses penetrasi pada jaringan dengan ketebalan tipis (2–3 mm) berlangsung lebih cepat dibandingkan jaringan yang lebih tebal (Musyarifah & Agus, 2018). Selain itu, komponen intraseluler dapat menghambat proses penetrasi selama fiksasi. Perhitungan kedalaman penetrasi dapat dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$d = K \sqrt{t}$$

di mana d adalah kedalaman penetrasi (mm), K merupakan koefisien kemampuan difusi dari larutan fiksatif, dan t adalah waktu fiksasi (jam) (Alwi, 2020).

4) Tingkat Konsentrasi pada Larutan

Pengaturan konsentrasi larutan fiksatif harus dilakukan pada tingkat serendah mungkin agar lebih efisien dalam penggunaannya. Konsentrasi yang dianggap ideal untuk formalin adalah sekitar 10%, sedangkan glutaraldehid digunakan pada rentang 0,25%–4%, dan etanol umumnya dipakai pada konsentrasi 70%. Konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan munculnya artefak, serupa dengan efek yang ditimbulkan oleh paparan panas yang berlebihan (Musyarifah & Agus, 2018).

5) Volume Fiksasi

Fiksasi jaringan menggunakan formalin dalam waktu yang terlalu lama dapat menyebabkan sel mengalami penyusutan. Penting untuk menjaga volume sel tetap mendekati ukuran normal agar tampak seperti sel hidup saat diamati di bawah mikroskop (Alwi, 2020). Perbandingan volume larutan fiksatif dengan jaringan yang besar akan membantu memastikan fiksasi berjalan optimal. Rasio yang direkomendasikan antara larutan fiksatif dan jaringan adalah 20 : 1 (Musyarifah & Agus, 2018).

6) Waktu Fiksasi

Waktu merupakan salah satu faktor terpenting dalam proses fiksasi. Jaringan yang telah dilakukan pembedahan atau pengambilan harus segera di fiksasi, maksimal waktu setelah jaringan diambil atau keluar dari tubuh dan dilakukan fiksasi yaitu 30 menit. Jika lebih dari 30 menit maka akan terjadi keterlambatan fiksasi yang menyebabkan jaringan rusak karena terjadi autolisis. Secara umum waktu fiksasi yang baik adalah 6 - 72 jam. Waktu fiksasi optimal bergantung pada beberapa faktor diantaranya ketebalan jaringan, semakin tebal jaringan yang di fiksasi semakin lama waktu yang dibutuhkan untuk dapat terfiksasi dengan sempurna jaringan tersebut dan faktor lain mencakup suhu, kemampuan penetrasi zat fiksatif, serta perbandingan volume. Proses fiksasi yang berlangsung terlalu lama dapat menyebabkan penurunan reaktivitas antigen, penyusutan, dan pengerasan pada spesimen (Musyarifah & Agus, 2018).

3. Larutan Pengganti Fiksasi

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan terdapat macam-macam pengganti larutan fiksasi yang dapat digunakan antara lain:

a. Gula

Gula pasir adalah jenis gula yang dihasilkan dari nira tebu dan memiliki harga yang relatif terjangkau. Kandungan sukrosa pada gula

pasir mencapai sekitar 97,1%, sehingga berpotensi digunakan sebagai larutan fiksatif alternatif pengganti NBF 10% berkat kandungan sukrosanya. Sukrosa dalam pemanis alami dengan pH rendah akan terhidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa dengan bantuan H_2O (air suling). Selanjutnya, fruktosa dalam kondisi asam akan membentuk gugus aldehid, yang kemudian melakukan ikatan silang dengan asam amino pada jaringan (Wardani dan Rahmawati 2020).

Gula dapat digunakan sebagai larutan pengganti fiksasi dalam beberapa aplikasi penelitian, meskipun memiliki sejumlah keunggulan dan keterbatasan yang harus diperhatikan. Salah satu keunggulannya adalah sifatnya yang non-toksik dan mudah didapat, membuatnya menjadi pilihan yang aman dan terjangkau untuk fiksasi sementara. Gula juga dapat membantu menjaga hidrasi jaringan, khususnya sebelum proses pembekuan dalam teknik mikroskop fluoresensi (Pratiwi *et al.*, 2019). Keterbatasannya terletak pada ketidakmampuannya untuk membentuk ikatan silang pada protein atau asam nukleat, sehingga struktur jaringan tidak dapat dipertahankan dalam jangka panjang. Selain itu, gula tidak efektif dalam mencegah autolisis atau pertumbuhan mikroorganisme, yang dapat menyebabkan degradasi jaringan. Meskipun gula dapat digunakan dalam beberapa kasus, larutan ini tidak ideal sebagai pengganti fiksatif permanen yang lebih stabil dan efektif (Pratiwi *et al.* 2019).

b. *Acetone*

Acetone merupakan salah satu jenis larutan yang digunakan dalam fiksasi jaringan, khususnya ketika diperlukan proses fiksasi yang berlangsung cepat. Sebagai fiksatif, *acetone* bekerja dengan cara menghilangkan air dari jaringan dan mengawetkan struktur protein, sementara jaringan tetap dalam keadaan kering. Karena sifatnya yang sangat cepat dalam mengeringkan sampel, *acetone* sering digunakan untuk analisis jaringan yang sensitif terhadap degradasi enzimatik, seperti dalam teknik imunohistokimia dan pewarnaan fluoresensi. Keunggulan *acetone* adalah kemampuannya untuk memfiksasi jaringan tanpa menyebabkan kerusakan struktural yang signifikan pada protein atau sel (Risanto *et al*, 2018).

Acetone memiliki beberapa kekurangan, seperti tidak mampu dalam mempertahankan morfologi jaringan secara detail dan pengaruhnya yang kurang baik pada struktur ultraseluler jika dibandingkan dengan fiksatif lain seperti *formaldehida* atau *glutaraldehyde*. Penggunaan *acetone* tidak disarankan untuk fiksasi jaringan yang mengandung banyak lipid, karena sifat pelarutannya dapat merusak membran sel. Secara keseluruhan, *acetone* lebih cocok digunakan untuk fiksasi sementara, terutama dalam penelitian yang memerlukan fiksasi cepat atau untuk analisis molekuler tertentu (Musyarifah dan Agus 2018).

c. Madu

Madu merupakan cairan dengan beragam cita rasa, mulai dari manis, asam, hingga pahit, yang dihasilkan oleh lebah madu dari berbagai sumber nektar, seperti nektar bunga (*floral*), ekstrafloral, embun madu (*honeydew*) yang merupakan sekresi serangga, serta cairan non-nektar seperti nira, sari buah, atau perasan batang tebu, jagung, dan gandum. Cairan ini dikumpulkan oleh lebah, kemudian diolah secara enzimatis di dalam tubuhnya dan disimpan di dalam sel-sel madu atau pot madu di sarang hingga matang, dengan kadar air sekitar 20%. Klasifikasi madu juga dapat didasarkan pada daerah atau kota asal penghasilnya, seperti madu Sumbawa, madu Lampung, madu Lombok, madu Sumba, dan madu Kalimantan di Indonesia (Supeno & Erwan, 2016).

Madu jika ditinjau dari variasi cita rasanya yang telah dikenal adalah madu manis, madu pahit, dan madu asam (kecut). Madu manis telah umum dikenal dan banyak beredar di pasaran yang dihasilkan oleh lebah *Apis spp* dari berbagai sumber nektar tumbuhan. Madu pahit adalah jenis madu yang diproduksi oleh lebah hutan seperti *Apis dorsata* atau spesies *Apis* lainnya dari nektar tanaman tertentu, misalnya madu Pahit Palawan. Madu Pahit Palawan berasal dari lebah madu yang mengumpulkan nektar dari pohon palawan (*Tristaniopsis spp.*) yang banyak tumbuh di hutan Bangka Belitung. Spesies lebah madu seperti *Apis dorsata*, *Apis laboriosa*, *Apis andreniformis*, dan *Apis florea* masih belum dapat dibudidayakan, sehingga madu yang

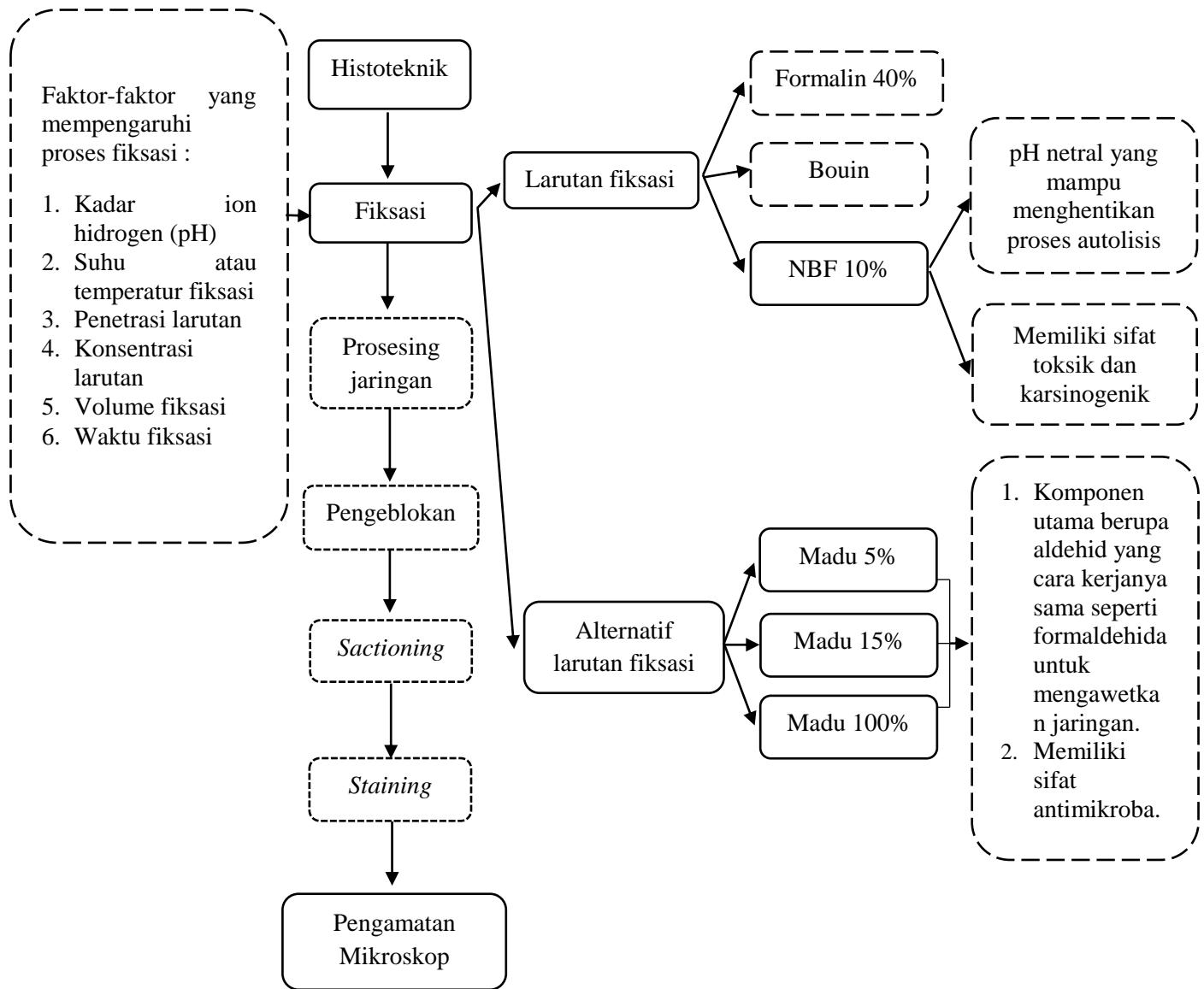
dihasilkan tergolong madu hutan. Sementara itu, spesies lain seperti *Apis cerana*, *Apis koschevnikovi*, *Apis mellifera*, *Apis nigrocincta*, *Apis nuluensis*, *Apis binghami*, dan *Apis breviligula* merupakan penghasil madu dari proses peternakan (Supeno & Erwan, 2016). Madu sebagai alternatif fiksasi alami, memiliki beberapa kelebihan dalam pengawetan jaringan hati. Keunggulannya adalah sifat antimikroba yang dapat membantu mencegah pembusukan dan pertumbuhan mikroorganisme pada jaringan selama proses fiksasi. Madu memiliki sifat pH asam dan komponen utama berupa aldehid yang cara kerjanya sama seperti formaldehida. Madu dapat menggantikan formalin beracun yang bersifat karsinogenik karena dapat bertindak sebagai agen antibakteri untuk mengawetkan tanpa efek berbahaya (Sabarinath *et al.*, 2014). Madu juga aman digunakan karena bersifat non-toksik dan ramah lingkungan, sehingga cocok untuk penelitian yang mengutamakan bahan alami. Meskipun demikian, madu memiliki beberapa kekurangan (Karsyani, 2020). Penggunaannya tidak efektif untuk mempertahankan struktur morfologi dan detail ultrastruktur jaringan hati secara rinci, seperti yang dilakukan fiksatif kimia seperti formalin atau glutaraldehyde. Kandungan gula dalam madu juga dapat mempengaruhi hasil pewarnaan histologi dan imunohistokimia, sehingga mengurangi akurasi analisis. Selain itu, madu tidak mampu mencegah autolisis atau degradasi jaringan dalam jangka panjang, yang membatasi penggunaannya pada fiksasi sementara. Madu bisa menjadi pilihan yang aman dan alami, ia lebih cocok digunakan dalam kondisi yang

memerlukan pengawetan jaringan dalam waktu singkat atau untuk tujuan tertentu yang tidak memerlukan detail struktural yang tinggi (Arapahni *et al*, 2019)

4. Organ Hati

Hati merupakan organ terbesar dalam sistem pencernaan dengan berat sekitar 1,2–1,8 kg atau sekitar 25% dari total berat badan orang dewasa, yang terletak di sebagian besar kuadran kanan atas abdomen serta berperan sebagai pusat metabolisme dengan fungsi yang sangat kompleks. Organ ini berada di bagian paling atas rongga perut sebelah kanan, tepat di bawah diafragma, dan terlindungi secara luas oleh tulang iga. Batas atas hati sejajar dengan ruang interkostal kelima di sisi kanan, sedangkan batas bawahnya miring ke atas dari iga kesembilan kanan menuju iga kedelapan kiri. Hati terbagi menjadi dua lobus utama, yakni lobus kanan dan lobus kiri. Bagian permukaan atas hati berbentuk cembung dan menempel di bawah diafragma, sedangkan permukaan bawahnya tidak rata dengan adanya lekukan dan fisura transversal. Berbagai pembuluh darah melintas pada permukaan hati untuk keluar dan masuk ke dalam organ ini (Azmi, 2016).

B. Kerangka Pikir



Gambar 1. Kerangka Pikir

C. Hipotesis

Terdapat perbedaan hasil gambaran mikroskopis jaringan hati ayam dengan larutan fiksasi *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10% dan Madu (*Dimocarpus Longan*) pada pewarnaan *Hematoksilin Eosin*.