

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

1. Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Pewarnaan bertujuan untuk memudahkan pengamatan menggunakan mikroskop dan membedakan bagian-bagian jaringan yang akan diamati seperti sel, sitoplasma, dan lain-lain (Ellywati 2018). Pewarnaan yang digunakan untuk pewarnaan histopatologi adalah pewarnaan Hematoxylin Eosin.

Hematoxylin-Eosin merupakan pewarnaan rutin yang digunakan untuk memulas inti dan sitoplasma serta jaringan penyambung. Hematoxylin bekerja sebagai pewarna basa, artinya zat ini mewarna inti ini mewarnai unsur basofilik jaringan. Hematoxylin memulas inti dan struktur asam lainnya dari sel karena unsur yang paling asam ialah asam deoksiribonukleat (DNA) dan asam ribonukleat (RNA), maka inti dan lingkungan sitoplasma dan banyak terdapat ribosom akan tampak berwarna biru sampai ungu. Eosin bersifat asam sehingga akan memulas komponen asidofilik jaringan seperti mitokondria, granula sekretoris dan kolagen. Eosin mewarnai sitoplasma dan kolagen sehingga menjadi warna merah muda. Prinsip dari pewarnaan adalah terjadinya afinitas antara jaringan dengan bahan pewarna, baik secara langsung, yaitu bahan cat dengan jaringan dapat berkaitan secara langsung atau secara tidak langsung, yaitu bahan cat dengan jaringan tidak dapat berkaitan secara langsung, kecuali diberi bahan perantara yang bisa disebut sebagai mordant, dalam kondisi terpapar oleh cahaya sebaiknya larutan diganti sekurangnya seminggu sekali (Setiawan, 2016).

Fiksasi adalah salah satu tahap teknik histoteknik yang bertujuan untuk mempertahankan jaringan atau sel tetap berada pada tempatnya, sama seperti jaringan hidup tanpa adanya perubahan bentuk maupun ukuran. 4,13 Fiksasi berfungsi untuk mempertahankan bentuk jaringan seperti life like state atau membuat jaringan agar sedemikian rupa tidak mengalami perubahan atau hanya mengalami perubahan seminim mungkin.

Selain itu, fiksatif dapat membuat jaringan lebih mudah menyerap zat warna.

Prinsip kerja dari fiksasi adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk fisiologinya. 3,4 Cairan fiksatif mengubah komposisi jaringan secara kimiawi dan fisik. Secara kimiawi, protein sel diubah secara fungsional dan struktural dengan cara koagulasi dan membentuk senyawa aditif baru.

2. Histologi jaringan

Histologi adalah ilmu yang mempelajari suatu organ atau bagian tubuh hewan atau tumbuhan secara cermat dan rinci. Usaha atau cara untuk dapat mengamati, mempelajari dan meneliti jaringan-jaringan tertentu dari suatu organisme dapat ditempuh dengan jalan penyiapan spesimen histologi (Labai, N. F. 2019).

Pemeriksaan ini dilakukan melalui pemeriksaan terhadap perubahan-perubahan abnormal pada tingkat jaringan. Pemeriksaan ini hendaknya disertai dengan pengetahuan tentang gambaran histologi normal jaringan, respon jaringan terhadap etiologi dan patologi komparatif terhadap hewan-hewan kelas tinggi. Kepentingan pemeriksaan histopatologi dalam diagnosa penyakit infeksi selain diketahui kemungkinan penyebab infeksinya, juga dapat dilakukan klasifikasi penyakit berdasarkan waktu dan distribusi penyakit. Dalam penentuan penyebaran infeksi dan tingkat keberlangsungan infeksi dapat dilihat dari peradangan dan infiltrasi sel radang yang ada (Wulansari, N. 2022).

Perkembangan histologi tergantung pada penggunaan dan perkembangan mikroskop. Mereka memberikan pengetahuan yang lebih baik tentang biologi jaringan dalam interaksi dan pengembangan kimia, fisiologi, imunologi, dan patologi. Oleh karena itu lahirlah ilmu histokimia, imunokimia dan histopatologi yang dapat memudahkan mahasiswa dalam memahami biologi jaringan. Histologi juga digunakan secara luas dalam penelitian biomedis, untuk mengidentifikasi penyebab dan kemungkinan pengobatan penyakit.

Histoteknik adalah teknik untuk mengubah spesimen tertentu menjadi presentasi histologis melalui serangkaian

prosedur hingga siap untuk dianalisis. Jaringan dari manusia atau hewan mungkin ada pada beberapa spesimen. Salah satu teknik yang digunakan di laboratorium untuk kegiatan eksperimen adalah yang satu ini. Hasil pemeriksaan dengan metode ini berupa spesimen mikroskopis yang telah diwarnai dengan tepat. Pewarnaan Hematoxylin-Eosin adalah salah satu metode untuk salah satunya (Labai, N.F. 2019).

3. Hewan percobaan

Animalia adalah kelompok yang termasuk mencit (*Mus musculus*). Hewan ini memiliki karakteristik aktif di saat malam, mempunyai siklus hidup pendek, jinak, mampu berkembang biak dengan mudah, ketakutan pada cahaya, serta poliestrus. Hewan tersebut juga menjadi binatang percobaan yang paling banyak dipergunakan pada penelitian laboratorium, yang menyumbang antara 40 dan 80 persen dari semua penggunaan hewan. (Labai, N. F. 2019).

Adapun kelebihan mencit dalam menjadi binatang percobaan dibandingkan dengan hewan-hewan yang lain antara lain ialah variasi sifatnya tinggi, rentang hidupnya cenderung pendek, mudah ditangani, serta anak yang dilahirkan dalam sekali kelahiran relatif banyak (Hasanah, U., & Masri, M. 2015).

4. Fiksasi (*Fixation*)

Tahap fiksasi merupakan bagian terpenting dari semua teknik histologi dan sitologi dengan tetap memberikan warna yang alami, untuk mencegah terjadinya denaturasi protein yang berlanjut terdapat tiga metode, yaitu dengan koagulasi, membentuk senyawa adiktif, atau gabungan dari koagulasi dan senyawa adiktif (Jamie, 2010).

Prinsip kerja dari fiksasi adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk fisiologinya. Cairan fiksatif mengubah komposisi jaringan secara kimiawi dan fisik. Secara kimiawi, protein sel diubah secara fungsional dan struktural dengan cara koagulasi dan membentuk senyawa aditif baru. Senyawa tersebut terbentuk dengan cara ikatan silang dari dua makromolekul yang berbeda, yakni cairan fiksatif dan protein sel. Hal ini menyebabkan sel resisten terhadap gerakan air dan cairan-cairan lainnya. Akibatnya, struktur sel menjadi

stabil, baik di dalam maupun diantara sel-sel. Selain itu, kebanyakan enzim didalam sel menjadi terinaktivasi, sehingga proses metabolisme sel tidak terjadi, dan mencegah adanya autolisis sel. Secara fisik membran sel awalnya hidrofilik, dilarutkan dengan cairan fiksatif, khususnya pada proses parafinasi dan pewarnaan dimana zat-zat tersebut akan dapat masuk kedalam sel dan menempel dengan mudah (Waheed, 2012).

5. Pemotongan Makroskopis

Merupakan pemotongan sampel organ menjadi ukuran yang lebih kecil sehingga memudahkan tahap pembuatan preparat selanjutnya (Pratomo, 2011). Jaringan yang telah difiksasi selama 24 jam ditiriskan pada saringan kemudian dipotong menggunakan pisau *scalpel* dengan ketebalan 1x1 cm disusun ke dalam *tissue cassette* dan diberi label.

6. Dehidrasi (*Dehydration*)

Dehidrasi merupakan metode yang digunakan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan setelah dilakukan proses fiksasi sehingga nantinya dapat diisi dengan parafin untuk membuat blok preparat (Rina, 2013).

7. Penjernihan (*Clearing*)

Penjernihan merupakan tahapan membuat jaringan menjadi jernih dan transparan menggunakan pelarut organik seperti *xilene* dan *toluene*. Tahap ini bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan digantikan dengan parafin. Proses mengeluarkan alkohol dari jaringan ini sangat krusial karena bila di dalam jaringan masih tertinggal sedikit alkohol maka parafin tidak bisa masuk ke dalam jaringan sehingga jaringan tidak sempurna dalam proses *blocking*, pemotongan dan pewarnaan (Peckham, 2014).

Proses *clearing* dapat menggunakan larutan penjernih misalnya *xilene* atau xilol dan *toluene* yang masing-masing memiliki kekurangan dan kelebihan. Xilol memiliki kelebihan yaitu proses penjernihan cepat, mudah didapat dan harga tidak terlalu mahal. Kekurangan dari xilol adalah jaringan tidak begitu jelas dikarenakan perendaman yang terlalu lama dan akibat dari perendaman pada alkohol absolut sebelumnya. Jaringan yang terlalu lama direndam dalam xilol menyebabkan

mudah rapuh, mengkerut dan sulit diiris. Penjernihan menggunakan *toluene* memiliki kelebihan yaitu mudah, cepat, jaringan akan menjadi jernih atau transparan bila prosesnya telah sesuai dan tidak akan mengkerut walaupun jaringan direndam lama.

8. Infiltrasi Parafin (*Embedding*)

Infiltrasi parafin (*Embedding*) merupakan proses untuk mengeluarkan cairan pembening dari jaringan dan digantikan dengan parafin. Jaringan ini harus terbebas dari cairan pembening karena nantinya akan mengkristal dan sewaktu dipotong jaringan akan mudah robek. Berdasarkan metode prosesnya yaitu jaringan akan dibenamkan di larutan parafin selama 3x dan dalam jangka waktu tertentu sambil dipanaskan agar parafinnya tidak membeku (Rina, 2013).

9. Pengeblokan (*Blocking*)

Pengeblokan adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom menggunakan parafin. Pengeblokan bertujuan mengganti parafin cair disertai dengan pengerasan jaringan. Penggunaan parafin sebagai media untuk membuat jaringan keras memang didisain untuk preparat yang amati di mikroskop.

Pembuatan blok (*Blocking*) merupakan proses pengisian parafin padat yang dicairkan agar dapat dipotong menggunakan mikrotom. Proses ini menggunakan parafin sebagai media pengisian jaringannya agar memadat dan mudah di potong. Prosesnya yaitu dengan menyiapkan tempat *blocking*, dan kemungkinan parafin, dilanjutkan dengan memasukkan organ kedalam parafin yang sudah disediakan. Selanjutnya setelah blok parafin kering dan sudah beku dapat dikeluarkan dari tempat *blocking* dan dapat dilanjutkan ke proses selanjutnya (Rina, 2013).

10. Pemotongan (*Sectioning*)

Sectioning adalah proses pemotongan blok preparat dengan menggunakan mikrotom. Tujuan dari pemotongan blok adalah untuk mendapatkan potongan jaringan yang tipis dengan ketebalan 3 – 8 μm . mikrotom adalah alat yang dapat mengiris potongan blok dengan tipis dan sesuai dengan ukuran ketebalan yang diinginkan (Reiliana, 2019).

11. Evaluasi preparat

Evaluasi preparat setelah tahap pemotongan dilakukan untuk melihat preparat jaringan baik atau tidak sebelum dilakukan proses selanjutnya. Preparat jaringan yang berada di *object glass* diamati dibawah mikroskop dan dilihat ada tidaknya kerusakan yang terjadi misalnya jaringan retak, tergores atau terlipat sebelum dilakukan proses pewarnaan. Tahap ini bertujuan untuk mengurangi kerugian akibat kerusakan jaringan selama pemrosesan jaringan (Suntoro, 1983; Jusuf, 2009).

12. Pewarnaan (*staining*)

Pewarnaan adalah teknik memberikan warna pada komponen seluler dengan tujuan membedakan antar sel pada jaringan. Warna adalah persepsi dari mata yang dapat dibedakan berdasarkan panjang gelombang. Teknik pewarnaan ini membantu dalam menghasilkan kontraks dimana setiap warna memiliki afinitasnya masing-masing (Steven dkk, 2013).

13. Pewarnaan Hematoxylin

Hematoxylin Mayer

Larutan Hematoxylin Mayer merupakan larutan yang dapat disimpan dalam waktu lama (berbulan-bulan), counterstaining dengan 0,5-1% larutan eosin dan waktu inkubasinya 10-15 menit serta mewarnai inti sel dengan baik dan jelas serta tidak menggunakan alcohol asam dan blueing (Jusuf,2019). Formulasinya adalah :

BAHAN	
Hematoxylin kristal	1 gram
Aquades	1000 ml
Sodium iodate	0,2 gr
Ammonium/potassium alum	50 gr
Citric acid	1 gr
Chloral hydrate	50 gr

14. Hematoxylin Harris

Larutan pewarna yang dapat dipakai segera setelah selesai dibuat, *counterstaining* dengan 0,5-1% larutan eosin dan waktu inkubasinya adalah 15-20 menit namun mengandung merkuri sehingga bersifat karsinogen (Avwioro, 2011). Formulasinya adalah sebagai berikut :

BAHAN	
Kristal Hematoxylin	2,5 gram
Alcohol 100%	50 ml
Ammonium/potassium alum	50 gr
Distilled water	5000 ml
Mercuri oksida	1,5 gram
Glacial acetic acid	20 ml
Sodium iodate	0,5 gr

15. Fungsi Hematoxylin

Fungsi-fungsi Hematoxylin Mayer dan Harris (Avwioro, 2011)

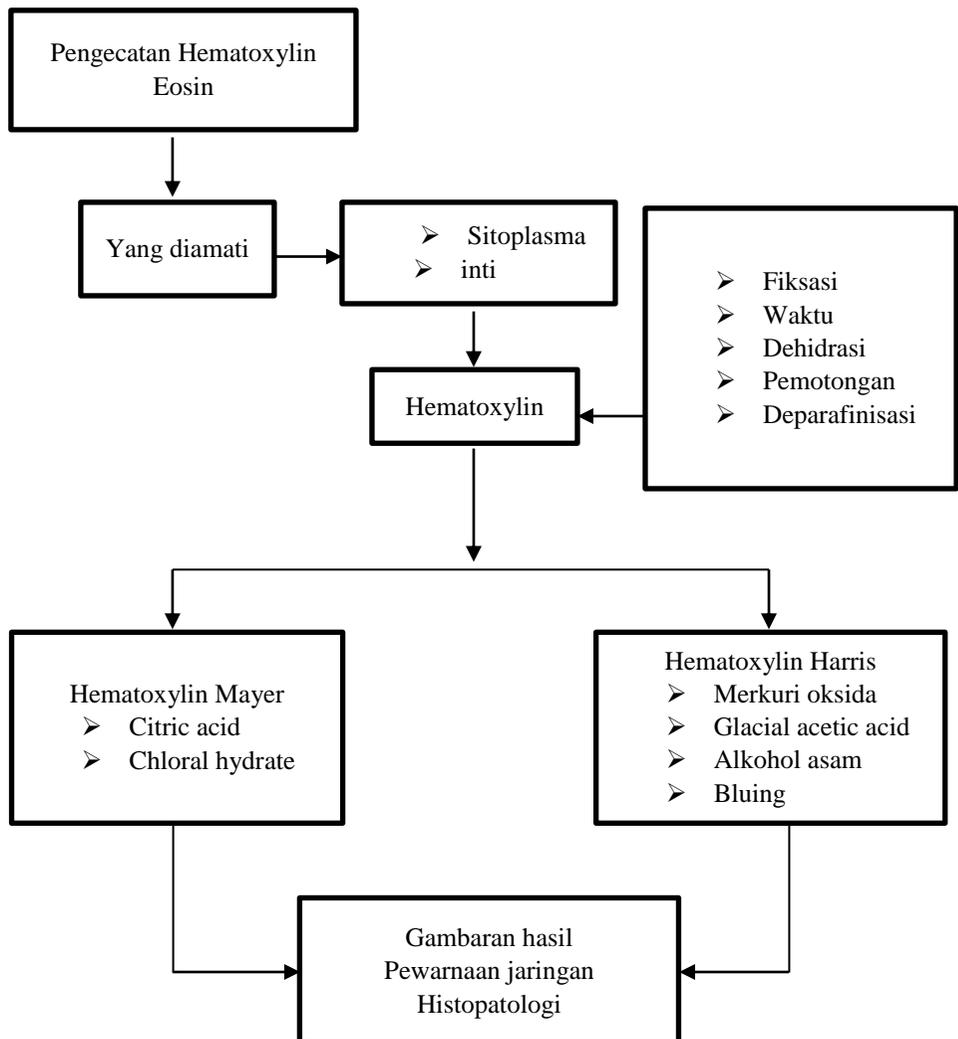
- a. Hematoxylin Mayer adalah pewarna yang lebih kuat, dengan waktu pewarnaan 10-15 menit. Hematoxylin Mayer dapat digunakan sebagai pewarna glikogen, amiloid dan Mucicarmin. Hematoxylin Mayer mengandung natrium iodat, yang mengoksidasi Hematoxylin ke haematein dan dapat digunakan segera setelah persiapan. *Chloral hydrate* di Hematoxylin Mayer bertindak sebagai pengawet sementara serta asam sitrat memperpanjang pewarnaan.
- b. Hematoxylin Harris adalah pewarna kuat. Dalam kemampuan pewarnaan, umumnya digunakan dalam sitologi eksfoliatif untuk melihat bentuk sel-sel ganas dan non ganas. Memiliki waktu pewarnaan 15-20 menit. Harris hematoxylin mengandung oksida merkuri, yang mengoksidasi hematoxylin ke haematein (kebiruan) sehingga memungkinkan untuk larutan yang akan digunakan segera dan pada metode pewarnaannya mengandung alkohol asam dan blueing.

16. Faktor-faktor yang mempengaruhi pengecatan

Pewarnaan Hematoxylin Eosin yang kurang baik dapat disebabkan beberapa factor seperti pewarnaan inti yang tidak baik atau kurang baik pada pewarnaan hematoxylin. Hal ini bisa disebabkan oleh fiksasi yang tidak adekuat, penyebab lainnya adalah proses penghilangan paraffin (deparafinisasi) yang tidak sempurna, waktu pewarnaan tidak adekuat, proses penghilangan warna terlalu kuat atau berlebihan, pemotongan yang tipis dan pH nya tidak tepat dan waktu pewarnaan yang tidak adekuat serta pewarnaan sitoplasma, pada pewarnaan ini eosin berperan sebagai pewarna yang mewarnai sitoplasma berwarna merah

sampai merah muda. Pada pewarnaan sitoplasma, fiksasi yang tidak adekuat juga mempengaruhi sitoplasma. Akibatnya fiksasi yang buruk akan menyebabkan sitoplasma menjadi lebih pucat dan samar. Sitoplasma yang tidak adekuat terwarnai oleh eosin bisa juga disebabkan oleh pH terlalu tinggi, dehidrasi dengan alcohol terlalu lama, pemotongan yang terlalu tipis, dan waktu pewarnaan yang tidak adekuat.

B. Kerangka Teori



Gambar 2.1. Kerangka Teori