

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Histologi

Histologi adalah penyelidikan organ, jaringan organ, dan struktur jaringan organ secara mendalam menggunakan alat pembesar dengan pengaturan potongan yang rapi. Potongan tipis tersebut nantinya akan memperlihatkan berbagai bentuk, ukuran dan lapisan. Histologi juga bisa disebut sebagai studi tentang sistem kehidupan kecil. Sistem kehidupan manusia adalah bidang tertentu di dalam sistem kehidupan yang berkonsentrasi pada konstruksi tubuh manusia (Mujimin & Suratmi, 2016). Morfologi dan sifat dari jaringan organ tubuh normal ini dipelajari dengan cara dibuat preparat histologi dari potongan jaringan yang melalui serangkaian proses hingga diwarnai kemudian diamati dibawah mikroskop (Eroschenko, 2013).

2. Histoteknik

Histoteknik adalah suatu cara atau metode untuk membuat sajian histologis dari sampel jaringan atau organ yang kemudian melalui serangkaian proses hingga menjadi preparat yang telah diwarnai dan siap untuk diamati di bawah mikroskop. Terdapat sembilan proses atau tahapan yang dibutuhkan untuk

menghasilkan preparat histopatologi yaitu fiksasi, dehidrasi, *clearing* (pembeningan), infiltrasi parafin, *embedding* (pengeblokan), *sectioning*, *deparafinasi*, *staining* atau pewarnaan, dan *mounting* (Suprianto, 2014). Langkah mendasar menuju pemisahan jaringan adalah menyiapkan perangkat dan perencanaan pengujian. Perencanaan pengujian harus diselesaikan jika contoh diambil dari makhluk. Contoh kesiapan termasuk makhluk yang ditahan dalam keadaan untuk membekalkan makhluk percobaan. Sementara itu, tes dari mayat atau orang harus segera dimasukkan ke dalam pengaturan obsesi setelah diambil (Sumanto, 2014).

Histoteknik menikmati keuntungan karena dapat melihat gambar yang masuk akal dari kesiapan desain sel jaringan yang berbeda, pada hasil pengaturan yang dapat disimpan cukup lama dan dapat membuatnya lebih mudah jika Anda memiliki keinginan untuk lihat jaringan yang telah berubah menjadi perencanaan kapan saja. Kerugiannya adalah dalam produksi rangkaian jaringan membutuhkan investasi yang lama untuk membuat rangkaian yang bagus dan hasilnya dapat dilihat di bawah lensa pembesar (Defi, 2020).

Sajian yang layak adalah sajian yang dapat membantu dalam memahami desain histopatologis jaringan seperti pada keadaan sebenarnya selama hidup. Sajian yang bagus akan memberikan hasil yang tepat untuk mendukung kesimpulan (Tyas *et al.*, 2018). Rangkaian proses pembuatan sajian histopatologi antara lain:

a. Fiksasi

Fiksasi adalah tahapan awal pengelolahan jaringan, yang merupakan proses yang sangat penting untuk mendapatkan preparat histopatologi yang sesuai untuk pembacaan. Fiksasi yang tepat adalah landasan sajian histologis yang baik. Kesalahan selama fiksasi tidak dapat diperbaiki pada tahap selanjutnya dan menyebabkan preparat rusak, menyebabkan kerusakan sel dan jaringan yang diamati. Oleh karena itu, hasil akhir dari gambaran histologis yang baik sangat bergantung pada seberapa baik fiksasi dilakukan (Jusuf, 2009).

Fiksasi memiliki kemampuan menahan siklus pembusukan dan autolisis, konservasi, pemanjangan jaringan, pemanjangan koloid, pemisahan optik, dan mempengaruhi pewarnaan. Jaringan yang dibiarkan terlalu panjang dan tidak segera difiksasi akan menyebabkan autolisis sehingga menyebabkan gangguan dalam mendiagnosis jaringan secara histopatologis (Hasan *et al.*, 2015).

Aturan fungsi fiksasi adalah untuk menyelamatkan keadaan sel dan organel agar mendekati bentuk fisiologisnya. Cairan fiksatif mengubah potongan jaringan secara sintetik dan sebenarnya. Secara sintetik, protein sel diubah secara praktis dan pada dasarnya melalui koagulasi dan menyusun senyawa pembentuk kebiasaan baru. Senyawa ini dibingkai dengan menghubungkan silang dua makromolekul unik, khususnya cairan fiksatif dan protein sel. Hal ini membuat sel menjadi kebal terhadap pertumbuhan

air dan cairan lainnya. Selanjutnya, struktur sel menjadi stabil, baik di dalam maupun di antara sel. Selain itu, sebagian besar katalis dalam sel menjadi tidak aktif, sehingga proses pencernaan sel tidak terjadi, dan mencegah autolisis sel. Sebenarnya, lapisan sel, yang mula-mula bersifat hidrofilik, dipecah oleh cairan fiksatif, yang menyebabkan pori-pori sel membesar. Selanjutnya, makromolekul dapat memasuki sel. Ini membantu tahap setelah fiksasi, terutama dalam proses parafinasi dan pewarnaan di mana zat ini benar-benar ingin masuk ke dalam sel dan menempel tanpa masalah (Alwi, 2016).

Autolisis adalah pengondisian dan pencairan jaringan yang terjadi dalam keadaan steril melalui siklus senyawa yang dibawa oleh bahan kimia intraseluler, pada akhirnya autolisis adalah pemusnahan jaringan atau sel makhluk oleh protein, yang dihasilkan oleh sel yang sebenarnya. Sehingga organ yang kaya bahan kimia akan mengalami proses autolisis lebih cepat dibandingkan organ yang tidak memiliki banyak senyawa. Organel yang berperan dalam siklus autolisis adalah lisosom, kemampuan lisosom dalam interaksi autolisis adalah sebagai bentuk ledakan sel dengan membebaskan setiap protein dalam lisosom yang sebenarnya. Autolisis memiliki sifat yang terlihat seperti pembusukan, misalnya sel yang mengalami piknosis yang digambarkan dengan hiperkromatik dengan inti sel yang berkontraksi (Hasan *et al.*, 2015).

Efek fiksasi terhadap jaringan yang diproses yaitu :

1) Menghambat proses pembusukan dan autolysis

Fiksasi akan menahan jalannya pembusukan yang dibawa oleh mikroba yang berasal dari luar tubuh. Untuk mencegah perubahan setelah kematian seperti autolisis dan kebusukan. Autolisis adalah gerakan sia-sia. Autolisis dilakukan pada komponen pemrosesan jaringan yang diselesaikan oleh senyawa intraseluler yang dikirimkan ketika lapisan organel lisosom rusak. Pemborosan juga bisa terjadi karena makhluk mini yang mungkin sudah tersedia di contoh. Suatu unsur yang menunjukkan adanya mikroorganisme adalah adanya perkembangan gas pada kompartemen contoh (Mujimin & Suratmi, 2016).

2) Pengerasan

Pengerasan pada dasarnya bukan penyebab utama obsesi ini, melainkan pengerasan menjadi efek obsesi yang bermanfaat dari siklus ini, sehingga efek pengerasan mempertimbangkan pemotongan yang terlihat lebih alami secara alami, terutama jaringan halus seperti otak, organ pencernaan, dll (Khristian & Dewi, 2017).

3) Pemadatan koloid

Dengan respon sintetik susunan obsesi, bagian-bagian dalam sel atau jaringan mengalami pengerasan cairan dari konsistensi semi-cair (gel) menjadi konsistensi semi-kuat hingga kuat (Khristian & Dewi, 2017).

4) Differensiasi optic

Siklus fiksasi akhirnya melindungi sel dari kerusakan dan efek lain dari rangkaian obsesi dapat mengubah daftar bias berbagai bagian sel dan jaringan sehingga bagian yang diperbaiki dengan benar lebih mudah untuk digambarkan (Khristian & Dewi, 2017).

5) Pengaruh terhadap pewarnaan

Dalam kasus tertentu, pengorganisasian pengaturan fiksasi dapat memperluas kekuatan varietas dalam sel dan jaringan. Bahan fiksatif tertentu seperti formalin dapat memperkuat karakter pewarnaan jaringan, terutama jika diwarnai dengan hematoxylin, berbeda jika rencananya akan diwarnai dengan *masson trichrome*, obsesi yang digunakan adalah larutan fiksasi Bouin yang dapat membuat varietas menjadi sangat berbeda (Khristian & Dewi, 2017).

Hasil fiksasi yang baik akan memberikan gambaran bentuk, pola permainan sel, inti sel, dan sitoplasma, serta cara kerja filamen jaringan ikat yang sesuai dengan gambaran jaringan saat kondisi masih hidup, sehingga akan berfungsi. dengan cara yang paling umum membaca pengaturan histologis (Oktaviando, 2020).

b. Dehidrasi

Tahapan pertama dalam proses pematangan jaringan yaitu dehidrasi. Dehidrasi adalah salah satu tahapan proses jaringan dengan

tujuan untuk menghilangkan kadar air dan zat fiksatif dalam jaringan. Reagen yang digunakan dalam tahapan dehidrasi ini bersifat hidrofilik (suka air), memiliki kutub yang kuat berinteraksi dengan molekul air dengan cara mengikat *hydrogen*. Proses dehidrasi dilakukan dengan merendam jaringan kedalam alcohol dengan konsentrasi bertingkat mulai dari terendah hingga absolut. Konsentrasi bertingkat dari rendah hingga absolut misal pada awal jaringan direndam dalam alkohol 70%, kemudian jaringan dipindah kedalam larutan alkohol 95% dan kemudian larutan alkohol 100% (Maulani *et al.*, 2018).

Dehidrasi harus dilakukan secara bertahap. Dehidrasi yang ekstrim dapat membuat jaringan menjadi keras, lemah dan berkerut parah. Hidrasi yang kurang akan menghambat masuknya reagen pembersih ke dalam jaringan, sehingga jaringan menjadi rapuh dan tidak dapat diinvasi. Hal penting yang harus diperhatikan sebelum siklus ini adalah jaringan harus diperbaiki dengan benar, sehingga peninggalan tidak terjadi karena fiksasi minuman keras. Beberapa reagen yang dapat digunakan untuk pengawetan adalah etanol, etanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$, metanol, isopropil, butanol, glikol dan cairan kering (Khristian & Dewi, 2017).

c. *Clearing* (Pembeningan)

Maulani dkk (2018) mengatakan bahwa *clearing* merupakan tahapan dengan tujuan untuk mengeluarkan kadar alkohol yang tersisa didalam jaringan dan menggantinya dengan larutan yang dapat berikatan

dengan parafin (Peckham, 2014). Parafin tidak dapat masuk kedalam jaringan dikarenakan alkohol dan parafin tidak bisa saling melarutkan, oleh karena itu diperlukan tahapan pembeningan atau *clearing* untuk sisa kadar alkohol. Proses pengeluaran alkohol dari jaringan ini juga menjadi salah satu tahapan yang krusial karena bila jaringan masih mengandung alkohol maka parafin tidak bisa masuk kedalam jaringan yang menyebabkan jaringan sulit untuk dipotong. Larutan yang biasa digunakan untuk tahapan *clearing* adalah xilol. Selain itu juga ada beberapa larutan yang bisa digunakan untuk proses *clearing* ini yaitu *chloroform*, *benzene*, *benzyl benzoate* dan *methyl benzoate* (Maulani et al., 2018).

d. Infiltrasi Parafin

Infiltrasi adalah proses memasukkan bahan ke dalam jaringan dengan tujuan agar jaringan dapat mengeras pada suhu kamar. Parafin merupakan bahan yang sering digunakan untuk penetrasi dan implantasi jaringan di fasilitas penelitian histopatologi. Tahapan ini dilakukan dengan cara merendam jaringan dalam parafin cair dengan tujuan untuk mengeluarkan cairan *clearing* dan diganti dengan parafin (Maulani dkk., 2018). Tahapan infiltrasi ini dilakukan pada *chamber* nomor 11 selama 1,5 jam dan *chamber* 12 selama 24 jam. Suhu yang diigunakan untuk mencairkan parafin yaitu 56°C hingga 62°C (Jahira, 2018).

e. *Embedding* (Pengeblokan)

Setelah proses infiltrasi dengan parafin cair atau proses pematangan jaringan, selanjutnya jaringan akan masuk kedalam proses penanaman jaringan atau *Embedding*. *Embedding* merupakan proses penanaman jaringan kedalam parafin dengan menggunakan cetakan atau *base mold*. Tahapan ini bertujuan untuk mempermudah dalam proses pemotongan atau *sectioning*. Zat yang digunakan dalam tahapan adalah parafin cairan panas yang mempunyai suhu lebur sekitar 56°C - 59°C (Rahmawati & Sidarta, 2021).

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

f. *Sectioning*

Sectioning adalah fase pemotongan blok jaringan menggunakan pisau unik yang disebut mikrotom. Mikrotom adalah instrumen yang dilengkapi dengan pisau tajam dan dapat memotong jaringan yang sangat kecil. Ketebalan dalam pemotongan atau *sectioning* menggunakan mikrotom yang ideal untuk histologi rutin yaitu 3 – 5 mikron. Pita

jaringan yang terbentuk dari potongan jaringan menggunakan mikrotom ditempelkan pada objek glass dengan cara meletakan pita jaringan dalam air pada *waterbath* suhu 40°C kemudian ditangkap menggunakan objek glass (Alwi, 2016).

Teknik pemotongan blok parafin yang baik yaitu :

- a) Blok parafin diletakan pada dudukan mikrotom
- b) Atur sudut kemiringan mikrotom antara 20 hingga 30 derajat.
- c) Kemudian atur ketebalan yang diingikan, ketebalan pemotongan blok jaringan yang ideal yaitu 3 hingga 5 μm .
- d) Putar tuas mikrotom perlahan kearah pisau secara perlahan dan pastikan posisi pisau dan blok jaringan sudah baik. Kemudian, lakukan pemotongan secara perlahan, buang pita-pita parafin yang tidak terdapat jaringan hingga mendapatkan potongan pita yang terdapat jaringan.
- e) Pita parafin dipindahkan menggunakan kuas kedalam *waterbath* dengan suhu 40°C dan didiamkan beberapa saat hingga pita jaringan mekar dan tidak lagi terdapat lipatan.
- f) Dengan objek glass perlahan-lahan ambil pita jaringan dari dalam *waterbath*. Kemudian letakan pada *hot plate* dengan suhu 40°C hingga 45°C, tahapan ini berfungsi untuk menghilangkan sisa kadar air yang masih tertempel pada preparat jaringan dan memastikan pita parafin benar-benar tertempel pada objek glass.

Selanjutnya preparat akan masuk kedalam tahapan pewarnaan (Alwi, 2016).

g. *Deparafinisasi*

Deparafinisasi merupakan proses yang harus dilakukan sebelum memasuki tahapan pewarnaan, tahapan ini memiliki tujuan untuk menghilangkan sisa parafin yang masih terdapat pada preparat jaringan, sehingga zat pewarna dapat masuk kedalam jaringan dengan sempurna. Proses deparafinisasi ini dilakukan dengan menggunakan larutan xilol (Ariyadi dan Suryono, 2017).

h. *Staining* atau *Pengecatan*

Staining adalah proses pewarnaan jaringan. Pewarnaan bekerja dengan persepsi menggunakan alat pembesar dan mengenali bagian jaringan yang akan diamati seperti inti sel, sitoplasma, dan lain-lain. Metode yang terlibat dengan pewarnaan contoh menggunakan warna hematoxylin dan eosin. Warna eosin pada tahap pewarnaan digunakan untuk memvariasikan trombosit atau sitoplasma pada contoh (Rahmawanti *et al.*, 2021).

Pewarnaan adalah suatu proses yang digunakan mikroteknik untuk memperjelas dan mempertajam jenis jaringan, yang pertama adalah sel-selnya sehingga mudah diamati dibawah mikroskop. Tanpa pewarnaan jaringan akan sulit untuk diamati, dengan adanya pewarnaan akan memperjelas rinci suatu jaringan sehingga akan lebih mudah untuk

diamati (sari *et al.*, 2016). Metode pewarnaan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pewarnaan hematoksilin eosin. Pewarnaan HE adalah suatu jenis pewarnaan jaringan yang paling sering digunakan dalam pewarnaan jaringan (Ellyawati, 2018)

Tahapan pewarnaan dimulai dari memasukan preparat kedalam xilol I, xilol II, xilol III masing-masing selama 5 menit, selanjutnya alkohol bertingkat (70%, 95% dan alkohol absolut) masing-masing selama 3 menit kemudian cuci dengan air mengalir, lalu dilanjutkan dengan memasukkan kedalam mayer hematoksilin selama 15-20 menit, kemudian cuci dengan air mengalir, dilanjutkan eosin 30 detik, lalu masuk kedalam alkohol bertingkat sebanyak 10 kali celupan dan xilol selama 1 menit (Ariyadi, 2017).

i. Mounting

Mounting merupakan tahapan akhir dalam proses pembuatan preparat, dengan cara meneteskan 1 sampai 2 tetes larutan entelan yang kemudian ditutup dengan deck glass pada preparat agar preparat terlihat lebih jelas ketika diamati, tahapan ini juga berfungsi untuk melindungi preparat histologi dari lensa mikroskop saat pengamatan dibawah mikroskop. Selain itu *mounting* juga berfungsi untuk mengawetkan preparat (Jahira, 2018). Dalam pembuatannya tidak diperbolehkan terdapat gelembung udara pada jaringan karena akan mempengaruhi

pembacaan. Setelah mounting selesai, beri lebel identitas pasien dibagian kasar objek glass (Kemenkes RI, 2017).

3. Fiksasi

Menurut Mujimin dan Suratmi (2016) Fiksasi memberikan perlakuan tertentu terhadap komponen-komponen jaringan, terutama pada nukleus dan sitoplasma jaringan, sehingga dapat diawetkan dalam kondisi yang menyerupai kondisi aslinya (Mujimin & Suratmi, 2016).

Prosedur untuk fiksasi jaringan diantaranya yaitu potong jaringan dengan ukuran yang diinginkan. Kemudian siram dengan larutan fiksasi sesuai dengan alasan pewarnaan, lalu tunggu sampai fiksasi benar-benar terbungkus. Kemudian cuci dengan air mengalir atau air sulingan jika perlu dan lakukan tahapan berikut. Fiksasi besar harus memenuhi beberapa keadaan, termasuk keadaan jaringan baru, ketika jaringan masih baru, fiksasi harus dilakukan secepat mungkin, karena degenerasi sel dimulai ketika sel membutuhkan suplai darah dan koordinasi saraf tubuh. Jika fiksasi tidak dapat segera dilakukan, jaringan harus segera didinginkan tetapi tidak membeku. Suhu yang digunakan dalam proses ini yaitu 4°C. Berikutnya yang harus diperhatikan yaitu pemilihan larutan fiksasi yang tepat (Khristian & Dewi, 2017).

a) Macam-Macam Larutan Fiksasi

1) Larutan NBF 10%

Neutral Buffer Formalin (NBF) 10% adalah larutan fiksasi standar untuk mengawetkan jaringan pada pemeriksaan histopatologi rutin. Hal tersebut dikarenakan larutan ini mengandung bahan penyanga sehingga lebih dapat memberi efek fiksasi atau pengawet. Keuntungan dari rangkaian NBF 10% ini adalah karena rangkaian ini memiliki pH normal dengan penggunaan yang lebih mudah dan dapat digunakan untuk melindungi jaringan dalam jangka waktu yang sangat lama. Selain itu, kelebihan lain dari larutan NBF 10% yaitu jika dibandingkan dengan larutan bouin yang memiliki kandungan asam pikrat yang agak lambat untuk masuk ke dalam jaringan sehingga dapat menyebabkan pengentalan protein dan penyusutan maka larutan NBF 10% lebih baik untuk digunakan sebagai larutan fiksatif. Kekurangan larutan ini yaitu daya fiksasinya lebih lambat dibandingkan dengan larutan fiksatif lainnya (Mujimin & Suratmi, 2016).

Larutan NBF 10% adalah jawaban fiksasi standar untuk jaringan histologis yang sangat bagus untuk lemak namun tidak memperbaiki karbohidrat pelarut, tidak memecah lipoid atau lemak namun menghancurkan glikogen dan urea (Miranti, 2010). Larutan NBF 10% merupakan campuran dari aquades, 37% formaldehid dan garam

Natrium diHidrogen Phospat (NaH_2PO_4). Penambahan garam pada larutan ini berfungsi untuk mendapatkan pH netral yang dapat dipertahankan. Larutan fiksatif NBF 10% memiliki sifat isotonik atau memiliki tekanan osmotik yang sama dengan cairan ekstraseluler sehingga dapat mempertahankan struktur jaringan. Kemudian prinsip penggunaan NBF 10% sebagai larutan fiksasi yaitu dengan penambahan sisi rantai dasar asam amino (lisin) dan ikatan peptide dari atom amida nitrogen dengan metilen sehingga terjadi ikatan silang metilen yang menghubungkan dua formaldehid. NBF 10% memiliki kecepatan penetrasi 1 mm/jam. (Khristian & Dewi, 2017).

2) Larutan Formalin

Formalin atau formaldehida adalah gas keras yang dapat larut didalam air. Konsentrasi formaldehida yang sering digunakan dalam proses fiksasi yaitu konsentrasi 4% - 10%. 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 yang lunak. Formaldehida dapat membuat protein didalam jaringan menjadi lebih asam, oleh karena itu jaringan yang difiksasi menggunakan formalin akan memiliki afinitas yang baik terhadap zat-zat warna basa(Al-azhar, 2019).

Kelebihan dari larutan formaldehida adalah larutan ini murah dan mudah didapatkan serta lebih stabil, selain itu formaldehida juga memfiksasi jaringan tanpa merubah warna asli dari jaringan tersebut. Sedangkan kekurangan formaldehida yaitu beracun dan dapat menyebabkan iritasi pada kulit karena formaldehida termasuk dalam gas yang keras dan dapat menyebabkan asma pada orang yang mengalami alergi (Alwi, 2016).

3) Larutan Bouin

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 berwarna kekuningan, sehingga proses histologi yaitu pengeblokan dan pemotongan dapat dilakukan dengan lebih mudah (Mujimin & Suratmi, 2016).

Susunan bouin terdiri dari 10% formaldehida (formalin 25%), korosif asam 0,9 M dan korosif pikrat 0,04 M yang terurai dalam air. Rangkaian bouin memiliki pH sekitar 1,5 - 2. Penggunaan rangkaian bouin sangat tepat bila rangkaian akan diwarnai menggunakan warna trichrome. Tes jaringan biasanya disiram atau diperbaiki dengan larutan Bouin selama 24 jam. Namun, ketika jaringan berdiferensiasi secara berurutan, hal itu menyebabkan hidrolisis dan hilangnya DNA

dan RNA. Hal ini membuat tisu yang difiksasi dengan Bouin's answer dicuci terlebih dahulu sebelum penanganan tambahan (Khristian & Dewi, 2017).

Kelebihan larutan ini adalah memiliki kemampuan penetrasi kedalam jaringan lebih cepat pada nukleus dan jaringan ikan akan terpulas dengan baik. Tetapi kelemahan larutan ini yaitu jika waktu fiksasi terlalu lama akan mengakibatkan jaringan menjadi rapuh dan susah untuk diris (Rusmiatik, 2019).

4) Larutan Alkohol

Alkohol adalah larutan fiksatif yang berfungsi sebagai fiksatif untuk susunan sitologi, susunan alkohol yang biasa digunakan dalam susunan sitologi adalah 50% alkohol. Namun terkadang, dalam kondisi terbatas, dapat digunakan sebagai obsesi untuk pengaturan histologis. Fiksasi pengaturan histologis dengan pengaturan cairan tidak dapat digunakan pada suhu rendah karena putih telur dan globulin dalam plasma akan pecah. Persepsi lipoid dalam sel tidak boleh menggunakan alkohol karena minuman keras dapat menghancurkan lipoid. Manfaat pengaturan ini adalah kemampuan cairan untuk memasuki jaringan dengan cepat. Kekurangan dari susunan ini adalah dapat membuat jaringan mengerut sehingga jaringan tidak menyebar seperti yang diharapkan (Sumanto, 2014).

Etanol (CH₃CH₂OH) dan metanol (CH₃OH) adalah kumpulan alkohol yang dapat menjadi fiksatif koagulan yang mendenaturasi protein. Mereka mencabut ikatan air dalam organisasi kemudian mengganggu ikatan hidrofobik dan hidrogen dengan cara ini mengungkap bagian hidrofobik dalam protein dan mengganggu konstruksi tersier dan solvabilitasnya dalam air (Musyarifah & Agus, 2018).

b) Faktor-faktor yang mempengaruhi Fiksasi

Beberapa faktor yang mempengaruhi tingkat efektivitas dan kecepatan fiksasi jaringan yaitu :

1) Waktu Fiksasi

Waktu menjadi salah satu faktor terpenting didalam proses fiksasi. Jaringan yang telah dilakukan pengambilan atau pembedahan harus segera untuk dilakukan fiksasi, maksimal waktu setelah jaringan keluar dari tubuh dan dilakukan fiksasi yaitu 30 menit. Apabila jaringan difiksasi lebih dari 30 menit setelah jaringan lepas dari tubuh maka akan terjadi keterlambatan fiksasi atau *delay* fiksasi yang menyebabkan jaringan menjadi rusak karena terjadi autolisis. Waktu fiksasi optimal tergantung pada beberapa faktor dan jenis larutan fiksatif yang digunakan, contoh faktor yang mempengaruhi waktu fiksasi diantaranya yaitu ketebalan jaringan, semakin tebal jaringan

yang akan difiksasi maka akan semakin lama waktu yang dibutuhkan untuk dapat terfiksasi dengan sempurna jaringan tersebut dan contoh lainnya diantaranya yaitu suhu, penetrasi zat fiksatif dan rasio volume (Musyarifah & Agus, 2018).

Secara teoritis waktu yang dianjurkan untuk fiksasi jaringan yaitu 6 sampai 72 jam. Fiksasi yang terlalu lama lebih dari 72 jam akan terjadi *over* fiksasi yang menyebabkan kerusakan jaringan yakni jaringan menjadi keras dan akan mempengaruhi proses selanjutnya. Selain itu fiksasi yang berlebihan juga mengakibatkan hilangnya reaktivitas antigen, penyusutan dan pengerasan jaringan. Apabila fiksasi kurang dari 6 jam maka akan terjadi *under* fiksasi yang akan menyebabkan jaringan rusak akibat autolisis (Khristian & Dewi, 2017).

Menurut Penelitian Zulda dan Jahira (2018) waktu fiksasi yang baik yaitu 8 – 24 jam, fiksasi yang terlalu lama lebih dari 24 jam menyebabkan penyusutan jaringan. Sedangkan jaringan yang difiksasi lebih dari 100 jam akan mengakibatkan jaringan mengeras sehingga akan susah untuk dipotong (Zulda, 2018 ; Jahira, 2018).

2) Suhu / Temperatur

Temperatur atau suhu pada tahap fiksasi dihubungkan dengan kecepatan respon zat antara fiksatif dan jaringan. Suhu yang disarankan untuk digunakan pada tahap fiksasi adalah suhu ruangan

yang dinaikkan secara bertahap hingga mencapai suhu 45°C. Suhu ini cukup untuk menjaga morfologi jaringan berkualitas tinggi. Fiksasi menggunakan solusi dengan suhu yang terlalu tinggi dapat meningkatkan laju degenerasi jaringan. Peningkatan suhu pengaturan fiksasi juga dapat dilakukan pada suhu yang lebih tinggi hingga 65°C, namun perlu diperhatikan bahwa waktu yang digunakan harus lebih terbatas (Khristian & Dewi, 2017).

3) Penetrasi Larutan

Penetrasi jaringan bergantung pada difusivitas dan muatan atomik dari setiap fiksatif, di mana formalin dan alkohol memiliki kapasitas masuk terbaik dan glutaraldehida buruk. Merkurius dan lainnya berada di tengah-tengah. Salah satu cara untuk mengatasi masalah ini adalah dengan memotong jaringan secara halus (2 sampai 3 mm). Masuknya potongan yang tipis akan terjadi lebih cepat daripada bagian yang tebal (Ganjali & Ganjali, 2013).

Faktor penetrasi larutan ini dibagi menjadi 2 yaitu:

- Waktu Penetrasi

Waktu masuk spesifik untuk siklus obsesi bervariasi antara jenis fiksatif yang ada dan juga jenis sel yang ada dalam rangkaian. Perhitungan musim masuknya susunan fiksatif merupakan pemikiran untuk menentukan musim autolisis jaringan. Waktu

masuk diharapkan sampai pada masalah esensial yang paling mendalam sebelum siklus autolisis adalah mendapatkan tingkat aliran. Ketika bagian dalam jaringan tidak memiliki kemampuan untuk memperbaiki, ada kemungkinan perspektif yang agak bengkok pada struktur yang sangat kecil (Khristian & Dewi, 2017).

- Tingkat Penetrasi

Tingkat Penetrasi zat pengikat bergantung pada kualitas dispersinya dan berfluktuasi dari satu material ke material lainnya. Dalam istilah yang berguna, ini menyiratkan bahwa koefisien dispersi (K) adalah jarak dalam milimeter yang telah dilalui oleh spesialis fiksatif ke dalam jaringan dalam waktu sekitar 60 menit, misalnya formalin 10% memiliki $K = 0,78$, ini menyiratkan bahwa formalin tidak dapat diantisipasi untuk memasukkan lebih dari 1 mm dalam 60 menit (Musyarifah & Agus, 2018).

4) Rasio Volume

Pada tahap fiksasi, volume antara pengaturan fiksasi dan contoh yang akan diperbaiki harus dipikirkan. Ini terkait dengan sentralisasi pengaturan fiksasi dengan kecepatan infiltrasi ke dalam jaringan. Semakin sedikit pengaturan yang digunakan untuk fiksasi menimbulkan kondisi isotonik yang pasti akan berkurang dan akan

menurunkan kecepatan infiltrasi. Proporsi jawaban fiksatif yang tinggi untuk jaringan akan menjamin siklus fiksasi berjalan dengan baik. Proporsi volume fiksasi terhadap volume jaringan yang ditentukan adalah 1: 20, misalnya 1 untuk contoh dan 20 untuk pengaturan fiksasi. Untuk memastikan rasio volume larutan fiksasi selalu berada dalam rasio yang baik larutan fiksatif yang digunakan harus diganti secara periodik beberapa kali selama proses fiksasi (Musyarifah & Agus, 2018).

5) Tingkat keasaman (pH)

Fiksasi harus diakhiri dengan pH netral 6-8. Hipoksia dalam jaringan dapat menurunkan pH, sehingga harus ada kemampuan penyangga dalam cairan fiksatif untuk mencegah rasa pedas yang tidak perlu. Sifat korosif dapat mempengaruhi pembentukan warna formalin-heme yang muncul sebagai warna gelap yang tersimpan dalam jaringan. Bahan pendukung yang biasa digunakan antara lain fosfat, bikarbonat, cacodylate dan veronal. Formalin yang biasa digunakan menggunakan bantalan dengan fosfat pada pH 7. Bahan fiksatif yang hipertonik atau memiliki konsentrasi zat terlarut lebih tinggi dari yang lain akan membuat sel mengkerut sedangkan fiksatif bersifat hipotonik atau memiliki konsentrasi lebih rendah dan lebih banyak air dibandingkan lainnya. pengaturan akan menyebabkan sel berkembang (Ganjali & Ganjali, 2013).

4. Ayam

Ayam pedaging (broiler) merupakan salah satu komoditi unggas yang memiliki laju pertumbuhan yang sangat cepat yaitu 6 – 7 minggu. Jenis ayam ini dipilih sebagai hewan uji karena memiliki ukuran organ hepar yang besar dan harganya yang terjangkau dikalangan masyarakat. Selain itu jenis ayam broiler ini juga mudah untuk didapatkan (Umam dkk, 2015). Menurut Susilorini dkk., (2009) menyatakan bahwa taksonomi ayam broiler sebagai berikut :

Kerajaan : *Animalia*
 Filum : *Chordata*
 Kelas : *Aves*
 Subkelas : *Neonithes*
 Ordo : *Galliformis*
 Genus : *Gallus*
 Spesies : *Gallus domesticus*

5. Organ Hati

Hati adalah organ intestinal terbesar dengan berat kurang lebih 25% berat badan orang dewasa. Hati terletak dibagian teratas abdomen disebelah kanan dibawah diagfragma, yang terbagi dalam dua belahan utama, lobus kanan dan lobus kiri. Unit fungsional dasar hati adalah lobulus hati yang tersusun atas sel-sel hati yang merupakan sel-sel terbesar dengan satu atau dengan dua inti sitoplasma granular yang halus (Azmi, 2016).

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 berbentuk bulat dan terdapat organel-organel

sel diantaranya reticulum endoplasma, mitokondria, badan golgi, lemak dan glikogen (Alwi, 2016).

Hati memiliki fungsi penting dalam pengelolahan produk-produk dari pencernaan manusia, contoh sel-sel hati menghilangkan kelebihan glukosa dari aliran darah dan mengubah glukosa menjadi polimer yaitu glikogen untuk disimpan. Hati juga berfungsi dalam metabolisme asam amino yang disebut deaminasi yaitu mengkonveksi asam amino menjadi senyawa yang dapat digunakan dalam metabolisme energi. Dengan demikian, hati akan menghapuskan gugus amino dan memproduksi urea (Hetty & Sagung, 2017).

B. Landasan Teori

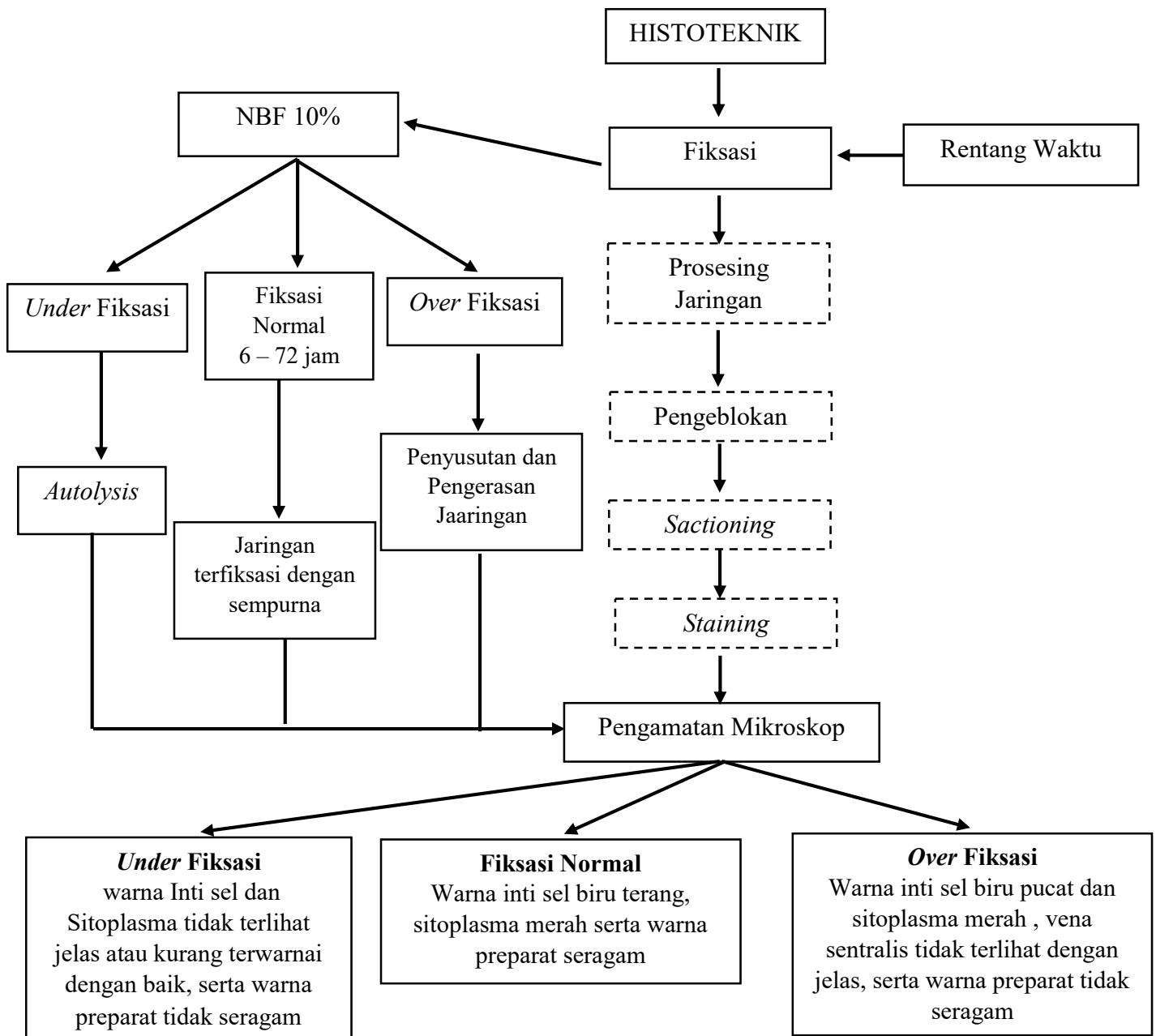
Histologi adalah ilmu yang mempelajari tentang organ, jaringan atau bagian jaringan yang akan diamati dan diperiksa. Pengamatan dengan mikroskop konduksi dan batuan, seperti struktur dengan detail dan elemen dasar yang melekat pada slide, spesimen dan pelindung jembatan kaca. Salah satu teknik yang digunakan untuk membuat sajian histologi yaitu Histoteknik yang melingkupi beberapa tahapan yaitu fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi parafin, *embedding* (pengeblokan), *deparafinisasi*, dan *staining* (pewarnaan) serta mounting.

Fiksasi merupakan tahapan awal pembuatan sajian histologi. 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.

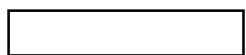
Dalam pembuatan sajian histologi rutin ada beberapa faktor yang mempengaruhi hasil fiksasi. Salah satu faktor yang mempengaruhi pewarnaan yaitu lamanya waktu fiksasi. Secara ideal waktu yang dianjurkan untuk digunakan dalam tahapan fiksasi yaitu 6 sampai 72 jam. Pada fiksasi yang terlalu lama menyebabkan hilangnya reaktivitas antigen, penyusutan dan pengerasan specimen.

C. Kerangka Pikir



Gambar 1. Kerangka Pikir

Keterangan :



: Diteliti



: Tidak diteliti

D. Hipotesis

Terdapat perbedaan gambaran histopatolgi hati ayam dengan variasi waktu fiksasi *Neutral Buffer Formalin* 10% selama 4 jam, 24 jam dan 96 jam pada pewarnaan Hematoksilin-Eosin