

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Histologi

Histologi merupakan ilmu yang mempelajari tentang sel organ dan jaringan tubuh yang normal secara mikroskopis. Morfologi dan sifat normal ini dipelajari dengan cara dibuat preparat histologi dari potongan jaringan yang diwarnai kemudian diamati dibawah mikroskop Untuk mendapatkan preparat histologi ini perlu melalui beberapa tahapan. (Eroschenko, 2013).

2. Histoteknik

Histoteknik merupakan metode dalam pembuatan preparat jaringan. Dalam metode ini ada beberapa tahapan yang perlu dilakukan sehingga menghasilkan preparat yang telah diwarnai dan siap untuk diamati dibawah mikroskop (Jahira, 2018). Tahapan pembuatan jaringan antara lain :

a. Fiksasi

Fiksasi merupakan tahap awal dari histoteknik. Tujuannya untuk mempertahankan jaringan agar tetap utuh, menghindari pembusukan, serta mencegah sel dalam jaringan mengalami autolisis atau kerusakan pada jaringan (Jahira, 2018).

Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses fiksasi, antara lain konsentrasi larutan fiksatif, kemampuan penetrasi larutan fiksatif dan ketebalan pemotongan jaringan, derajat keasaman (netral), volume (20:1), suhu (suhu kamar) serta rentang waktu dari lepasnya jaringan dari tubuh dengan perendaman larutan fiksatif. Jaringan yang telah lepas dari tubuh segera difiksasi dalam rentang waktu 30 menit. Jika difiksasi lebih dari 30 menit setelah lepas dari tubuh akan terjadi keterlambatan fiksasi sehingga mengakibatkan jaringan menjadi rusak sebab telah autolisis. (Zulda, 2018).

Larutan fiksasi terbaik untuk histologi rutin saat ini adalah *Neutral buffer Formalin* (NBF) 10%. Larutan NBF

10% adalah campuran antara aquades, formalin (37% formaldehid) serta penambahan garam yaitu Natrium diHidrogen Phospat ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) dan Dinatrium Hidrogen Phospat (Na_2HPO_4). Penambahan garam berfungsi agar pH netral dapat dipertahankan. Selain memiliki pH netral dan dapat mempertahankan pH-nya, larutan NBF 10% bersifat isotonik atau memiliki tekanan osmotik yang sama dengan cairan ekstraseluler sehingga dapat mempertahankan bentuk dari sel. Prinsip penggunaan NBF 10% 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. Kecepatan penetrasi sedemikian, pada umumnya fiksasi jaringan dilakukan selama 6 jam sampai 72 jam. Bila fiksasi dilakukan kurang dari 6 jam maka akan terjadi *under* fiksasi hal ini menyebabkan jaringan rusak akibat autolisis. Sedangkan bila fiksasi dilakukan lebih dari 72 jam maka akan terjadi *over* fiksasi hal ini menyebabkan kerusakan pada jaringan yaitu jaringan menjadi keras dan akan mempengaruhi proses selanjutnya (Khristian, 2017).

Selain NBF 10% larutan fiksasi lainnya yaitu larutan Bouin yang berisi 0.04 M asam pikrat, 0.9 M asam asetat dan 10% formaldehida (25%) yang dilarutkan dalam air. NBF 10% lebih baik dibanding larutan Bouin karena asam pikrat dalam larutan Bouin agak lambat untuk masuk dalam jaringan sehingga dapat menyebabkan pengentalan protein dan penyusutan. Walaupun kecepatan penetrasi Larutan Bouin lebih baik dari NBF 10% tetapi jika jaringan terlalu lama direndam dalam larutan Bouin bisa menyebabkan hilangnya DNA dan RNA serta terjadinya hidrolisis. Larutan Bouin sangat cocok jika preparat jaringan dilakukan pewarnaan menggunakan pewarna Trichrome (Khristian, 2017).

b. Dehidrasi

Tujuannya untuk menarik air yang berlebihan dari dalam jaringan. Larutan dehidrasi bersifat hidrofilik yang

berarti dapat menarik molekul air dengan cara mengikat hidrogen. Dehidrasi dilakukan dengan merendam jaringan dalam alkohol yang konsentrasi bertingkat, dimulai dari yang terendah hingga absolut misalnya berawal dari larutan alkohol 70%, lalu dipindah dalam larutan alkohol 95% dan kemudian larutan alkohol 100%. Dehidrasi harus dilakukan dengan konsentrasi bertingkat karena jika langsung dengan konsentrasi tinggi bisa menyebabkan kerusakan pada jaringan (Maulani, 2018).

Ada beberapa larutan yang dapat digunakan dalam proses dehidrasi, antara lain alkohol terdenaturasi, etanol, methanol, etanol aseton, butanol, isopropyl dan glikol. Larutan yang paling sering digunakan adalah alkohol terdenaturasi. Alkohol terdenaturasi merupakan kombinasi alkohol seperti etanol ditambah methanol (1%) dan isopropil alkohol. Tanda jika jaringan terdehidrasi dengan baik yaitu jaringan menjadi berwarna abu – abu pucat, tekstur lunak serta rapuh, tidak terlihat adanya aliran larutan Ketika akan dimasukkan dalam larutan dehidrasi terakhir (Khristian, 2017).

c. *Clearing*

Penjernihan adalah metode yang digunakan untuk menghilangkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang mengandung paraffin. Penjernihan sangat penting karena jika alkohol masih ada dalam jaringan meskipun dalam jumlah kecil maka paraffin tidak dapat masuk kedalam jaringan sehingga mempengaruhi proses selanjutnya seperti *blocking*, pemotongan dan pewarnaan (Rina, 2013). Tujuan langkah ini untuk menghilangkan sisa alkohol dari jaringan, kemudian menggantinya dengan larutan yang berikatan dengan paraffin (Maulani, 2018). Larutan yang biasanya digunakan adalah *xylol* atau *toluene*. Menurut Khristian (2017) selain larutan yang disebutkan diatas ada beberapa larutan yang dapat digunakan antara lain, *xylol* substitusi, *chloroform* dan *citrus fruit oil*.

d. Infiltrasi paraffin

Infiltrasi adalah proses memasukkan suatu bahan ke dalam jaringan agar mengeras pada suhu ruangan. Parafin merupakan bahan yang umum digunakan untuk infiltrasi dan penanaman jaringan di laboratorium 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)

Merupakan penanaman jaringan dalam paraffin menggunakan cetakan atau *base mold*. Sisa cairan pada tahap clearing harus benar – benar bersih pada tahap ini karena sisa cat akan menjadi kristal dan pada saat dipotong dapat mengakibatkan jaringan mudah patah dan robek (Rina, 2013). Tahap ini untuk mempermudah saat proses pemotongan atau *sectioning*. Pemotongan menggunakan mikrotom untuk histologi rutin memiliki ketebalan ideal yaitu 3 – 5 mikron. Pita jaringan dari pemotongan jaringan ditempelkan pada *object glass* dengan cara meletakkan pita jaringan dalam *waterbath* suhu 40°C lalu ditangkap menggunakan *object glass* (Rahmawati, 2020).

f. Pemotongan (sectioning)

Pemotongan dilakukan menggunakan mikrotom. Mikrotom adalah alat yang dilengkapi dengan pisau yang tajam dan mampu memotong potongan block dengan ukuran yang sangat tipis hingga ketebalan yang diinginkan. Kunci dari pemotongan yaitu pisau yang dipakai harus tajam agar mendapatkan potongan yang halus. Pita paraffin yang telah dipotong dengan ukuran ketebalan tertentu dan mengandung preparate jaringan kemudian dipindahkan pada waterbath dengan temperature 37 – 40°C (Rina, 2013).

g. *Deparafinisasi*

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

h. *Staining* atau pewarnaan

Pewarnaan merupakan tahap pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan dapat dikenali/dibedakan dengan menggunakan mikroskop (Ellyawati, 2018). Menggunakan pewarna *Hematoxylin – Eosin*, bertujuan agar inti sel dan sitoplasma terwarnai dengan warna berbeda sehingga mudah dibedakan (Ariyadi, 2017).

Hasil yang kurang baik atau baik pada pewarnaan *Hematoxylin – Eosin* mungkin disebabkan oleh *Hematoxylin* yang bertindak sebagai pewarna dasar. Setiap komponen yang diwarnai dengan zat ini mengandung asam nukleat, seperti inti sel yang kaya kromatin, dan daerah sitoplasma yang kaya RNA. Struktur jaringan tampak berwarna ungu kebiruan. Pewarnaan inti yang tidak mencukupi berarti pewarnaan *Hematoxylin* yang tidak mencukupi dibeberapa bagian inti sel, kemungkinan karena fiksasi yang tidak tepat. Penyebab lainnya adalah penghilangan parafin yang tidak sempurna, waktu pewarnaan yang tidak mencukupi, proses penghilangan warna berlebihan, pemotongan yang tipis dan pH yang tepat. (Jahira, 2018).

i. *Mounting*

Merupakan tahap akhir yang berguna untuk melekatkan *deck glass* dengan preparat agar preparat terlihat lebih jelas Ketika diamati dan preparat terlindungi dari lensa mikroskop saat pengamatan. Cara melakukan *mounting* yaitu dengan meneteskan 1 – 2 tetes larutan entelen yang berfungsi selain untuk melekatkan bisa juga sebagai

pengawet (Ariyadi, 2017). Dalam pembuatannya tidak diperbolehkan terdapat gelembung udara pada jaringan karena akan mempengaruhi pembacaan. Setelah mounting selesai, beri label identitas pasien dibagian kasar objek glass (Kemenkes RI, 2017).

3. Pewarnaan *Hematoxylin – Eosin*

Prinsipnya reaksi ionisasi atau reaksi ikatan asam basa. *Hematoxylin* bisa juga disebut pewarna basofilik karena memiliki sifat yang basa dan mudah mewarnai bagian sel bermuatan negatif (anion) atau bersifat asam. Bagian seluler inti sel yang paling asam adalah *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan *ribonucleic acid* (RNA). Cat *Hematoxylin* mewarnai inti sel menjadi warna ungu sampai biru tua (Rahmawati, 2020).

Eosin bisa juga disebut pewarna asidofilik atau eosinofilik karena sifatnya yang asam. Sifat catnya yang asam mempermudah mewarnai bagian sel yang bermuatan positif (kation) dan bersifat basa. Cat *Eosin* mewarnai sitoplasma menjadi warna merah muda. (Rahmawati, 2020).

a. *Hematoxylin*

Bukan pewarna sintetik melainkan pewarna yang berasal dari ekstrak kayu pohon logwood (*Haematoxylon campechianum*). Hematin merupakan bentuk oksidasi dari senyawa *Hematoxylin*. Hematin mengikat molekul yang bermuatan negatif dan bersifat asam. (Anthony, 2013).

b. Bluin

Merupakan proses perendaman preparat menggunakan larutan yang cenderung basa untuk memperjelas inti sel dengan mengubah warna inti sel menjadi biru tua atau ungu jernih. Prinsipnya meningkatkan pH dengan cara mengurangi H^+ dalam larutan, hal ini mempengaruhi struktur *Hematoxylin* dan menghilangkan H^+ dari struktur ring. pH larutan *Blueing* sekitar 7,5 hingga 9,0 (Khristian, 2017). Menurut Sampias (2020) ada beberapa tempat tidak melakukan proses ini karena pencucian menggunakan air keran, air keran memiliki pH cenderung

basa karena mengandung mineral jadi memungkinkan pembiruan inti tanpa memerlukan reagen bluing.

c. Diferensiasi

Merupakan perendaman preparat menggunakan larutan bersifat asam untuk menghilangkan pewarnaan inti sel yang berlebihan. Fungsi dari larutan ini untuk menghilangkan pewarnaan inti yang berlebihan. Asam alkohol 1% atau HCl adalah larutan yang sering digunakan. Pada pewarnaan *Hematoxylin – Eosin* apabila menggunakan pewarna jenis *Hematoxylin Mayer* maka proses *diferensiasi* tidak diperlukan tetapi jika menggunakan pewarna jenis *Hematoxylin Harris* maka memerlukan larutan *diferensiasi* karena pewarnaan inti sel lebih kuat dibandingkan *Hematoxylin Mayer* (Sampias, 2020).

d. Eosin

Sebab sifatnya yang asam *Eosin* disebut pewarna eosinofilik atau asidofilik, *Eosin* merupakan pewarna sintetik. *Eosin* akan mengikat sel yang bersifat basa seperti sitoplasma, warna yang dihasilkan adalah merah muda. *Eosin Y* merupakan *Eosin* yang sering digunakan dan dikombinasikan dengan Hematoksilin, *Eosin* juga mewarnai inti sel yang sudah diwarnai *Hematoxylin* dari warna biru menjadi ungu. Konsentrasi 0,5% atau 1,0% merupakan konsentrasi *Eosin* yang biasanya digunakan (Bancroft, 2019).

4. Faktor – faktor yang mempengaruhi pewarnaan

a. Hematoxylin

Menurut Ariyadi (20117) Pewarnaan inti sel oleh *Hematoxylin* bisa saja buruk karena fiksasi yang kurang baik, pemotongan jaringan yang tipis, pH *Hematoxylin* yang tidak tepat, *deparafinisasi* yang tidak sempurna, penghilangan warna yang berlebihan serta lama pewarnaan yang tidak adekuat.

b. *Eosin*

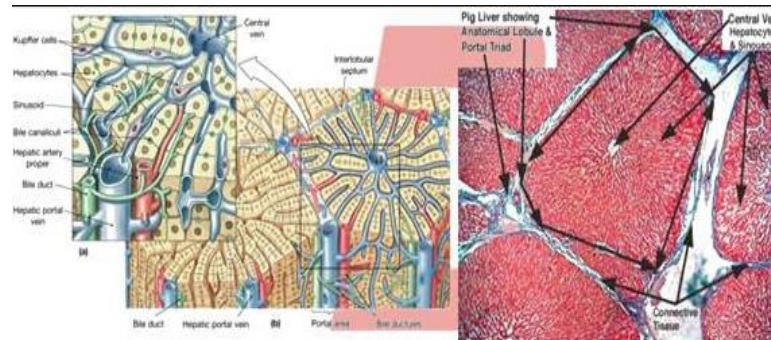
Ariyadi dan Suryono (2017) mengatakan fiksasi yang buruk, pemotongan jaringan terlalu tipis, pH cat *Eosin* yang terlalu tinggi, proses dehidrasi terlalu lama serta warna pewarnaan kurang tepat menyebabkan hasil pewarnaan *Eosin* kurang baik. Saat diamati dibawah mikroskop sitoplasma tampak samar – samar dan berwarna pucat diakrenakan fiksasi yang buruk.

c. Waktu Pewarnaan

Menurut Abdullah (2017) Waktu perendaman yang terlalu lama atau tidak sesuai dapat menyebabkan preparat menjadi gelap sehingga tidak mungkin mengamati dan membedakan jaringan mana yang menjadi sasaran pengamatan.

5. Hepar

Menurut Azmi (2016), Hepar merupakan kelenjar dari saluran cerna dengan kedudukan pembukaan diaphragm.s. hepar memiliki lobus kanan dan kiri. Komponen structural utama hati adalah hepatosit yang bertumpuk satu sama lain dan membentuk lapisan sel dengan memiliki satu atau dua inti yang bulat. Sel – sel hati dikelompokkan bersama dalam susunan yang saling berhubungan untuk membentuk unit struktural yang disebut lobulus hepar.



Gambar 2.1. Hepar

Secara makroskopis dan ditutupi oleh jaringan fibroelastick yang disebut kapsul glison yang berasal dari limfe, pembuluh darah dan saraf. Hepatosit yang berkumpul pada satu

lempeng tersusun menjadi lobulus. Hepatosit dianggap sebagai unit fungsional hati (Maulina, 2018).

Hati berperan penting dalam mengolah produk pencernaan manusia. misalnya, hepatosit membuang kelebihan glukosa dari darah dan mengubah glukosa menjadi polimer khususnya glikogen, untuk disimpan. Hati juga memiliki metabolisme asam amino yang disebut deaminasi, yaitu konversi asam amino menjadi senyawa yang dapat digunakan dalam metabolisme energi. Dengan demikian, hati akan menghilangkan gugus amino dan memproduksi urea (Hetty & Sagung, 2017).

B. Landasan Teori

Histologi adalah ilmu yang mempelajari tentang morfologi dan sifat jaringan atau sel yang normal. Histoteknik adalah suatu metode pembuatan preparat histologi dari spesimen tertentu melalui serangkaian proses hingga menjadi preparat yang siap untuk diamati atau dianalisis dibawah mikroskop. Proses histologi meliputi fiksasi (*fixation*), dehidrasi (*dehydration*), pembeningan (*clearing*), pemberian (*embedding*), pengecoran (*blocking*), pemotongan jaringan (*sectioning*), pewarnaan (*staining*), perekatan (*mounting*) (Galang, 2015).

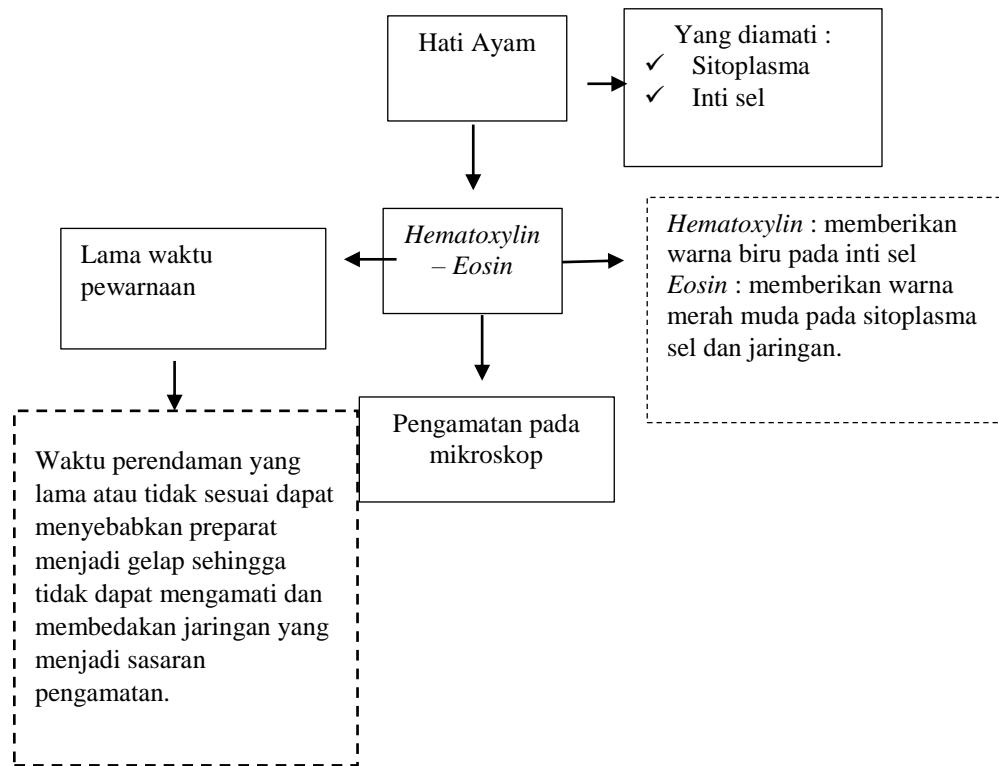
Jaringan adalah sekelompok sel yang disimpan dalam suatu kerangka struktural atau matriks yang mempunyai unit organisasinya mampu mempertahankan integritasnya dan beradaptasi dengan lingkungan di luar batasnya. Pewarnaan adalah langkah terakhir pembuatan preparat histologi, pewarnaan merupakan suatu proses pewarnaan jaringan yang bertujuan untuk memudahkan pengamatan mikroskopis dan membedakan bagian jaringan yang ingin diamati seperti inti sel dan sitoplasma. Tahap pewarnaan menggunakan waktu yang berbeda antar proses. Waktu baku yang digunakan sesuai dengan referensi (buku dan journal) yang digunakan sebagai panduan pewarnaan. Namun, pada penerapannya waktu standart tidak dapat dijadikan pedoman untuk semua jenis jaringan yang diwarnai, termasuk hati. Jaringan hati yang diwarnai pada waktu standar mempunyai intensitas warna yang tinggi sehingga sulit untuk diamati bagian jaringan yang diinginkan. (Ellyawati, 2018).

Prinsipnya reaksi ionisasi atau reaksi ikatan asam basa. *Hematoxylin* bisa juga disebut pewarna basofilik karena memiliki sifat yang basa dan mudah mewarnai bagian sel bermuatan negatif (anion) atau bersifat asam. Bagian seluler inti sel yang paling asam adalah *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan *ribonucleic acid* (RNA). Cat *Hematoxylin* mewarnai inti sel menjadi warna ungu sampai biru tua (Rahmawati, 2020).

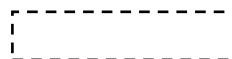
Hematoxylin dan *Eosin* adalah metode pewarnaan yang banyak digunakan untuk pewarnaan jaringan dan oleh karena itu penting dalam diagnosis dan penelitian. *Hematoxylin* adalah pewarna yang biasa digunakan pada pewarnaan histoteknik, diekstraksi dari pohon *logwood tree*. Inti sel umumnya terlihat sebagai struktur bulat atau lonjong, biasanya terletak dipusat sel. Hepatosit mempunyai inti yang besar dan terwarnai baik serta terletak di tengah sitoplasma, satu atau lebih inti terlihat disetiap inti, menunjukkan sintesis protein yang kuat. (Anthony, 2013).

Menurut Galang (2015) Nukleus memiliki afinitas yang tinggi terhadap pewarnaan *Hematoxylin*, sedangkan sitoplasma memiliki yang afinitas tinggi terhadap pewarnaan basa yaitu *Eosin*. Lama waktu dalam proses pewarnaan menentukan kualitas preparat. Waktu perendaman yang lama atau tidak sesuai menyebabkan preparat menjadi gelap sehingga tidak dapat mengamati dan membedakan jaringan yang menjadi sasaran pengamatan (Abdullah, 2017). Prosedur standar yang digunakan pada pewarnaan menggunakan *Hematoxylin* dengan waktu 15 menit dan *Eosin* 5 menit inti sel dan sitoplasma terlihat jelas (Parmenkes). Menurut panduan Leica prosedur standar yang digunakan pada pewarnaan *Hematoxylin* 3 menit dan *Eosin* 1 menit mendapatkan hasil sitoplasma dan inti terlihat jelas pada mikroskop (Elen, 2019). Menurut Ellyawati (2018), pewarnaan menggunakan *Hematoxylin* 20 detik dan *Eosin* 20 detik mendapatkan hasil yang baik dalam pembuatan preparat histologi hati dengan hasil inti sel dan sitoplasma terlihat jelas sehingga dapat dibedakan.

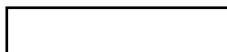
C. Kerangka Pikir



Keterangan :



: Tidak diteliti



: Diteliti

Gambar 2.2. Kerangka Pikir