

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

1. Pengertian Histologi

Istilah Histologi berasal dari bahasa Yunani “histo”, yang berarti jaringan atau jaring dan “logos” yang berarti ilmu yang mempelajari atau pengetahuan. Histologi merupakan ilmu pengetahuan yang mempelajari tentang jaringan tubuh yang dapat menyusun suatu organ. Jaringan epitel, jaringan ikat, jaringan otot, dan jaringan saraf merupakan jaringan fundamental tubuh (Soesilawati 2019).

Histologi mempelajari tentang semua aspek biologi baik sel, jaringan dan organ yang berfokus pada mekanisme susunan dan struktur dalam mengoptimalkan fungsi yang spesifik untuk organ. Histologi adalah ilmu pengetahuan tentang sel dan matriks ekstraselular dari jaringan. Ukuran sel dan matriks ekstraselular yang kecil membuat perkembangan histologi bergantung pada penggunaan dan pengembangan mikroskop (Meschel 2016).

Terdapat teknik yang disebut dengan histoteknik. Teknik tersebut dimulai dari pemotongan jaringan untuk mendapatkan organ-organ tertentu kemudian diproses hingga menjadi preparat yang siap untuk diteliti, serta diamati menggunakan mikroskop. Proses histoteknik atau proses pembuatan sediaan yaitu, fiksasi (*fixation*), dehidrasi (*dehydration*),

penjernihan (*clearing*), perendaman parafin (*infiltrasi*), pemotongan jaringan (*sectioning*), deparafinisasi dan terakhir pewarnaan (Sari Y, 2021).

2. Proses Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan sediaan jaringan masih menjadi *gold standar* dalam menentukan diagnosis keganasan bagi pasien. Preparat histologi yang baik yaitu dimana sediaan tersebut dapat memberikan gambaran berupa bentuk, susunan jaringan, kualitas pewarnaan inti, sitoplasma dan lain sebagainya sesuai dengan kondisi pada waktu seseorang masih hidup yang tahap akhirnya akan dibandingkan dengan kontrol kualitas (Wulandari and Nuroini 2022).

Prosedur sediaan jaringan yang biasanya digunakan dapat dipelajari dengan bantuan mikroskop cahaya. Di bawah mikroskop cahaya, jaringan dapat diamati melalui berkas cahaya yang menembus jaringan. Karena jaringan dan organ biasanya terlalu tebal untuk ditembus cahaya, jaringan tersebut harus diiris menjadi lembaran-lembaran tipis yang transparan yang kemudian akan dilekatkan pada objek glass sebelum dilakukan proses selanjutnya. Sediaan jaringan mikroskopik yang ideal harus dibuat sedemikian rupa sehingga jaringan tersebut tetap memiliki struktur dan komposisi molekul yang sama seperti di tubuh (Meschel 2016).

a. Fiksasi

Fiksasi merupakan tahap pertama dalam proses pembuatan preparat histologi. Fiksasi dilakukan untuk menghindari terjadinya pencernaan jaringan oleh enzim (autolisis) atau bakteri untuk mempertahankan

struktur fisik, potongan jaringan harus segera diolah dengan tepat sebelum atau secepat mungkin setelah diangkat dari tubuh hewan maupun manusia. Fiksasi biasanya dilakukan secara kimiawi, dimana jaringan akan direndam ke dalam larutan yang dapat menstabilkan atau dalam bahan pengikat yang disebut bahan fiksasi (Meschel 2016).

Tujuan umum dari fiksasi jaringan adalah menjaga agar komponen-komponen sel maupun jaringan seperti ketika sel itu masih dalam kondisi hidup. Secara teknis fiksasi bertujuan untuk mencegah atau menahan proses degeneratif yang dimulai segera setelah jaringan lepas dari kontrol tubuh dan kehilangan pasokan darahnya. Tingkat efektifitas dan kecepatan fiksasi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu suhu/temperatur, penetrasi larutan, dimensi spesimen, rasio volume terhadap spesimen, dan tingkat keasaman (pH). Larutan fiksatif yang paling umum digunakan dalam pembuatan sediaan jaringan histologi adalah larutan 4% formaldehid yang biasa disebut dengan formalin 10% (Khristian and Inderianti 2017).

Ada empat tujuan dari fiksasi jaringan yaitu:

- 1) Menghentikan autolisis jaringan dengan inaktivasi enzim hidrolisis dari lisosom dan dengan demikian dapat memberikan morfologi seluler yang lebih baik untuk dianalisis serta menstabilkan struktur baik di dalam maupun di antara sel dengan membuat molekul menjadi resisten terhadap disolusi air dan cairan lainnya.

- 2) Memobilisasi jaringan dan antigen seluler untuk imunolabelling dari antigen.
 - 3) Persiapan yang lebih baik dalam pemotongan sampel histologi dengan cara memadatkan dan mengeraskan jaringan.
 - 4) Mencegah proses pembusukan yaitu proses penghancuran jaringan yang diakibatkan oleh aktifitas bakteri dan biasanya dengan pembentukan gas.
- b. Dehidrasi
- Dehidrasi merupakan tahap kedua dalam pemrosesan jaringan. Tujuannya untuk menghilangkan/menarik air dan zat fiksatif dari dalam jaringan. Proses ini dilakukan secara bertahap dan perlahan karena apabila gradient konsentrasi reagen berlebihan mengakibatkan jaringan menjadi keras, rapuh dan kusut (Khristian and Inderianti 2017).
- Dehidrasi dilakukan dengan serangkaian pencelupan dalam larutan alkohol yang dimulai konsentrasi rendah hingga konsentrasi yang tinggi dimana diakhiri dengan alkohol dengan konsentrasi 100%. Serangkaian proses tersebut dapat dengan efektif mengeluarkan air dari dalam jaringan (Meschel 2016).

Karena sebagian besar volume sel terdiri dari air dan air memberikan konsistensi lunak pada jaringan sehingga keberadaan air dalam sel akan menyulitkan pengirisan jaringan. Untuk itu, air dalam jaringan/sel mesti dikeluarkan dari sel dengan menggunakan dehidran seperti alkohol atau aseton. Selain menarik air dari dalam jaringan dan sel, penggunaan

alkohol akan mengakibatkan larutnya komponen lemak dari sel. Dengan cara ini, saat jaringan telah diwarnai kita akan mendapati vakuola lemak kosong di dalam sel preparat jaringan adiposa putih (Sari Y *et al.*, 2019).

c. Clearing

Pembeningan (*Clearing*) adalah salah satu tahapan dalam pembuatan sediaan histologi yang bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan setelah proses dehidrasi dan menggantikannya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Jaringan tidak dapat langsung dimasukkan ke dalam parafin karena alkohol dan parafin tidak bisa saling berikatan. *Clearing* juga dilakukan agar jaringan tidak mudah membusuk akibat adanya alkohol di dalam jaringan. Hasil *clearing* yang baik akan membuat jaringan terlihat transparan (Wulandari and Nuroini 2022).

Istilah "*clearing*" berasal dari fakta bahwa bahan pembersih seringkali memiliki indeks bias yang sama dengan protein. Akibatnya ketika jaringan benar-benar disusupi dengan agen pembersih. itu menjadi tembus cahaya. Perubahan kenampakan ini sering digunakan sebagai indikasi efektifitas atau kelengkapan proses *clearing* (Rai *et al.* 2016).

Reagen dalam proses bertindak sebagai perantara antara larutan dehidrasi dan infiltrasi. Reagen pembeningan harus bisa mengganti semua agen dehidrasi agar jaringan tersebut dapat menjadi lebih bening dan tembus cahaya. Agen pembeningan yang baik memiliki

kemampuan penetrasi jaringan yang cepat, penghapusan agen dehidrasi cepat, mudah digantikan oleh agen infiltrasi, menimbulkan kerusakan jaringan yang minimal, sifat mudah terbakar yang rendah, toksisitas rendah dan murah. Agen pembeningan memiliki titik didih yang rendah sehingga umumnya lebih mudah digantikan dengan lelehan parafin.

Faktor yang dapat mempengaruhi proses clearing jaringan, yaitu

- Waktu prosesing

Pemaparan agen pembeningan yang terlalu lama dapat menyebabkan jaringan menjadi rapuh. Oleh karena itu, harus dilakukan pemantauan terhadap waktu saat berlangsungnya proses pembeningan.

- pH larutan

Agen pembeningan yang digunakan harus diperhatikan pHnya. pH yang terlalu asam dapat menyebabkan tidak maksimalnya proses clearing pada jaringan dan sebaliknya dapat menyebabkan kelunakan pada jaringan (Mujimin and Suratmi 2016).

- Jenis Larutan

Perbedaan jenis larutan yang digunakan dapat mempengaruhi hasil karena masing-masing larutan memiliki karakternya tersendiri yang dapat mempengaruhi proses. Macam-macam agen pembening yang dapat digunakan yaitu

xilol, toluene, kloroform, xilol substitusi dan *Citrus Fruit Oil* (Khristian and Inderianti 2017).

d. Infiltrasi Parafin

Dalam pemrosesan jaringan dibutuhkan proses pemendaman jaringan dengan medium padat yang biasa juga disebut dengan tahapan infiltrasi parafin. Tahapan ini dilakukan dengan tujuan untuk memudahkan pemotongan jaringan. Bahan infiltrasi yang paling umum digunakan yaitu parafin. Infiltrasi dilakukan dengan memasukan jaringan ke dalam parafin cair dengan suhu 58°C (52-60 °C), rongga-rongga akan diisi oleh parafin cair tersebut (Meschel 2016).

Lilin parafin dapat resap ke dalam jaringan dalam bentuk cair kemudian akan dengan cepat membeku ketika didinginkan. Pemberian jaringan ke dalam parafin cair ini dapat mencegah kerusakan struktur jaringan selama pemotongan. Lilin parafin yang mempunyai titik leleh lebih tinggi baik digunakan untuk jaringan yang lebih keras misalnya tulang, dapat memungkinkan pemotongan yang lebih tipis, namun kesulitan pada saat proses pembuatan pita. Lilin parafin yang mempunyai titik leleh yang rendah akan lebih lembut namun tidak dapat mendukung untuk jaringan yang keras. Lebih sulit mendapatkan pemotongan yang tipis namun lebih mudah membuat pita. Parafin murah, mendukung kualitas potongan, dan mudah beradaptasi untuk semua kegunaan (Khristian and Inderianti 2017).

e. Penanaman jaringan (*embedding*)

Untuk dapat diiris dengan mikrotom, jaringan harus menjadi cukup keras. Secara rutin, parafin digunakan mengisi bagian sel yang telah ditinggalkan oleh air. Namun, parafin tidak dapat menyusup ke dalam sel tanpa bantuan zat yang disebut sebagai bahan penjernih (*clearing agent*). Jaringan akan direndam dalam parafin cair bersuhu 55°C selama 3 jam di dalam inkubator. Diperkirakan selama waktu tersebut, parafin yang dapat bercampur dengan xilol akan menggantikan xilol di dalam jaringan (Sari Y *et al.*, 2019).

f. Pengecoran (*blocking*)

Pengecoran (*blocking*) merupakan proses pembuatan blok-blok parafin yang berisi jaringan pada *base mold*. Proses *embedding* dilakukan dengan mengambil jaringan dari kaset dan menempatkan pada *base mold*, lalu tuangkan parafin cair yang sejenis dengan paraffin yang digunakan pada proses infiltrasi. Tahap yang penting di dalam proses ini adalah memposisikan jaringan secara baik sehingga dapat mempermudah proses pemotongan jaringan. Jaringan dapat diposisikan di tepi, di ujung atau di permukaan, tergantung pada jenis jaringan yang ditanam. Harus diperhatikan juga bahwa ada beberapa spesimen yang memiliki pedoman posisi tersendiri. Kesalahan yang terjadi dalam tahapan penanaman adalah kesalahan dalam diagnosis dimana dapat diperbaiki dengan melakukan pemotongan dalam atau tanam ulang (Khristian and Inderianti 2017).

g. Pemotongan dengan mikrotom

Proses pemotongan dilakukan setelah proses *embedding*, dimana blok parafin yang telah keras akan diiris menggunakan suatu alat yang disebut mikrotom dengan tujuan agar mendapatkan hasil pemotongan setipis mungkin. Penggunaan mikrotom sebagai penggunaan rutin alat, dengan tebal irisan biasanya 1-10 mikron atau yang paling ideal yaitu 5 mikron (Meschel 2016).

Hasil potongan sampel kemudian dimasukkan ke dalam floating bath yang berisi air dengan suhu 49°C yang bertujuan untuk merengangkan hasil potongan dan meletakkannya pada kaca preparat. Tahapan selanjutnya yaitu kaca preparat dimasukkan ke dalam inkubator agar sampel pada preparat mengering. Penyimpanan pada inkubator dilakukan selama ±2-3 jam (Rahmawanti, Setyowati, and Mukhlis 2021).

3. Pewarnaan Histologi

Pewarnaan jaringan merupakan salah satu proses penting yang sangat diperlukan untuk mewarnai komponen – komponen jaringan yang transparan setelah melalui proses pematangan jaringan. Pewarnaan dapat memperlihatkan struktur dan morfologi jaringan, keberadaan dan prevalensi sel-sel jaringan tertentu (Khristian and Inderianti 2017).

Proses timbulnya warna terkait dengan terjadinya ikatan antara molekul tertentu yang terdapat pada daerah dan struktur jaringan yang tertentu. Sinar dengan panjang gelombang tertentu yang terdapat dalam sinar cahaya matahari atau lampu mikroskop yang dipaparkan pada sajian yang telah

diwarnai akan diabsorpsi (diserap) atau diteruskan. Zat warna yang terikat pada jaringan akan menyerap sinar dengan panjang gelombang tertentu sehingga jaringan tersebut akan tampak berwarna (Sari Y *et al.*, 2019).

Hampir semua pewarna dalam studi histologi bersifat sebagai senyawa asam dan basa juga cenderung membentuk ikatan elektrostatik dengan radikal yang dapat dilepaskan dari jaringan. Kombinasi hematoksilin eosin merupakan kombinasi warna yang paling banyak digunakan dalam pewarnaan histologi yang biasa disebut dengan pewarnaan HE (Meschel 2016).

Beberapa istilah pewarnaan yang didasarkan pada sifat dan karakter pewarnaan yang perlu dipahami yaitu asidofilik dan basofilik. Asidofilik menjelaskan pola pewarnaan sel jaringan tertentu yang menggunakan pewarnaan asam dan basa (misalnya HE). Secara khusus, asidofilik merujuk pada sifat struktur yang senang berikatan dengan zat warna asam. Pada pewarnaan yang menggunakan eosin, suatu zat warna yang bersifat asam, makna asidofilik dapat disamakan dengan eosinofilik. Bagian sel yang sering menunjukkan sifat asidofilik adalah sitoplasma sel. Basofilik merujuk pada sifat struktur yang senang berikatan dengan zat warna basa. Zat warna basa yang sering digunakan adalah hematoksilin. Bagian sel yang menunjukkan sifat basofilik adalah nukleus (Sari Y *et al.*, 2019).

a. Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Pewarnaan Hematoksilin eosin merupakan pewarnaan rutin yang biasa digunakan untuk mewarnai preparat histologi. Prinsip pewarnaan HE

didasarkan pada sifat asam dan basa dari larutan yang digunakan, kemudian akan saling berikatan sehingga terjadilah molekul zat warna dengan komponen jaringan (Khristian and Inderianti 2017).

Pewarna inti yang paling umum digunakan adalah hematoksilin yang sifat memulasnya tergantung pada adanya hasil oksidasinya dalam larutan yaitu hematein. Bila dipulas dengan zat demikian, inti sel tampak biru karena mengandung DNA dan RNA yaitu suatu zat yang bersifat asam. Larutan eosin dibuat dengan melarutkan zat warna eosin dalam akuades dan alkohol (Sari Y *et al.*, 2019). Sementara itu, eosin akan mengikat komponen sel yang bersifat asam. Salah satu pewarna asam yang biasanya dipakai untuk memulas sitoplasma pada umumnya yaitu eosin. Kombinasi paling umum adalah hematoksilin dan eosin (HE), yang memulas setiap struktur inti menjadi ungu tua atau biru dan hampir semua struktur sitoplasma dan substansi interseluler menjadi merah muda (Meschel 2016).

b. Proses Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Prosedur pewarnaan hematoksilin eosin pada preparat jaringan meliputi deparafinisasi, rehidrasi, pewarnaan hematoksilin, dehidrasi, pewarnaan eosin, *clearing* dan mounting (Mayangsari *et al.* 2019).

1) Deparafinisasi

Deparafinisasi merupakan tahapan awal dalam proses pewarnaan HE yang bertujuan untuk melarutkan dan melepaskan parafin sebelum dilakukan pewarnaan pada preparat jaringan sehingga penyerapan warna lebih maksimal. Parafin merupakan salah satu bahan yang

memiliki sifat tidak larut didalam air sehingga diperlukan pelarut yang dapat menghilangkan parafin yang ada pada preparat (Halim 2018). Untuk menghilangkan parafin maka harus lebih dahulu dilakukan proses deparafinasi kemudian dicuci atau direhidrasi dengan alkohol bertingkat untuk menghilangkan pelarut organik dan parafin yang ada di dalam jaringan (Damayanti, Ariyadi, and Ayuning 2022).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kegagalan proses deparafinasi diantaranya yaitu

- Ketebalan preparat

Ketebalan preparat yang biasa digunakan yaitu sekitar 3 - 5 mikron. Preparat yang lebih tebal dapat menyebabkan tidak maksimalnya proses pewarnaan pada jaringan (Elen 2019).

- Waktu prosesing

Lamanya perendaman jaringan sehingga mempengaruhi faktor penyerapan cairan ke dalam jaringan untuk mewarnai komponen sel (Sari Y, 2021).

- Pemilihan suhu

Pada beberapa jenis agen pengganti clearing seperti air lemon memerlukan suhu tinggi 90°C hingga 94°C untuk membantu menghilangkan parafin dan mencegah parafin menempel pada sediaan jaringan sehingga membantu dalam tahapan deparafinasi (Sari 2021).

- pH larutan

Agen pembeningan yang digunakan harus diperhatikan pHnya. pH yang terlalu asam dapat menyebabkan tidak maksimalnya proses clearing pada jaringan dan sebaliknya dapat menyebabkan kelunakan pada jaringan (Mujimin and Suratmi 2016).

- Jenis Larutan

Perbedaan jenis larutan yang digunakan dapat mempengaruhi hasil karena masing-masing larutan memiliki karakternya tersendiri yang dapat mempengaruhi proses. Macam-macam agen pembening yang dapat digunakan yaitu xilol, toluene, kloroform, xilol substitusi dan *Citrus Fruit Oil* (Khristian and Inderianti 2017).

2) Rehidrasi

Tahapan rehidrasi dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan xilol yang terbawa oleh preparat dan memasukan air ke dalam jaringan agar proses pewarnaan menghasilkan kualitas preparat yang baik. Pada tahapan ini biasanya menggunakan larutan alkohol absolut I,II,III masing-masing selama 3 menit, alkohol 95%, 90%, 80%, masing-masing selama 3 menit, alkohol 70% selama 5 menit.

3) Pencucian dengan air mengalir

Pencucian dengan air mengalir ini bertujuan agar dapat melepaskan sisa-sisa cat ataupun cairan yang terbawa dari proses sebelumnya (Khristian and Inderianti 2017).

4) Pengecatan Hematoksilin

Hematoksilin merupakan zat pewarna yang bersifat basa sehingga akan mewarnai inti sel dan struktur bersifat asam lainnya seperti bagian kaya RNA dan DNA pada sitoplasma (Meschel 2016). Hematoksilin merupakan pewarna inti yang paling umum digunakan yang sifat pewarnaannya bergantung pada adanya hasil oksidasinya dalam larutan yaitu hematein. Jadi jika diwarnai dengan zat ini maka inti dari sel akan nampak berwarna biru. Hematoksilin yang mewarnai inti menjadi biru tua atau hitam, memiliki pengaplikasian yang lebih luas. Larutan pewarna hematoksilin mengandung beberapa zat lainnya selain zat warna hematoksilin, dikenal sebagai zat mordan (Khristian and Inderianti 2017).

5) Pengecatan eosin

Berbeda dengan hematoksilin, eosin sendiri merupakan zat pewarna yang bersifat asam yang akan mewarnai sitoplasma menjadi merah dan kolagen menjadi merah. Larutan eosin dibuat dengan melarutkan zat warna eosin dalam akuades dan alkohol (Meschel 2016).

6) Dehidrasi

Setelah dimasukkan kedalam zat pewarna, kelebihan zat warna tersebut dapat dihilangkan dengan air ataupun alkohol tergantung pelarut dari zat warna tersebut. Irisan jaringan diairkan dengan mencelupkannya ke dalam deretan alkohol dengan

konsentrasi yang makin meningkat mulai dari konsentrasi tinggi ke rendah yaitu 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%. Lamanya pencelupan pada setiap tingkatan persentase alkohol yaitu 3-5 menit (Beandrade, Amelia, and Hasmar 2022).

7) *Clearing*

Setelah tahapan rehidrasi, dilanjutkan dengan tahapan *clearing* (penjernihan) yang bertujuan untuk menjernihkan dan melepaskan alkohol pada preparat. Tahapan ini dilakukan dengan memasukkan kedalam xilol I, II, III masing-masing selama 3 menit (Sumarmin, Yuniarti, and Yaulandary 2017).

Faktor yang dapat mempengaruhi hasil clearing jaringan yaitu ketebalan preparat, waktu prosesing yang tidak sesuai prosedur, pemilihan suhu, pH larutan dan jenis larutan yang digunakan sehingga mempengaruhi faktor penyerapan cairan ke dalam jaringan untuk mewarnai komponen sel (Sari 2021).

8) *Mounting*

Penempelan (*Mounting*) adalah tahapan terakhir dari pewarnaan histologi. Tahapan ini dilakukan dengan cara menutupi irisan tipis jaringan dengan coverglass menggunakan media perekat. Media perekat yang biasanya digunakan yaitu entelan (Khristian and Inderianti 2017). Penggunaan coverglass bertujuan untuk melindungi kaca preparat sampel dari lensa mikroskop pada saat pengamatan (Rahmawanti et al. 2021).

4. Macam-Macam Agen dalam Proses *Clearing* dan Deparafinisasi

Sebagian besar laboratorium pemrosesan histologi menggunakan xilol sebagai agen *clearing* setiap hari yang memang menawarkan banyak keuntungan tetapi sayangnya dianggap sangat beracun sehingga berpotensi menimbulkan bahaya pekerjaan bagi teknisi histopatologi.

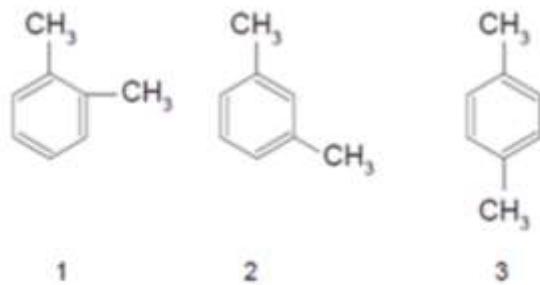
Persyaratan ideal agen *clearing*

- Dengan cepat menghilangkan agen dehidrasi.
- Menghilangkan lelehan lilin dengan mudah menyebabkan kerusakan jaringan yang minimal
- Toksisitas minimum
- Hemat biaya (Rai et al. 2016)

Agen yang biasa digunakan dalam proses *clearing* dan deparafinisasi sebagai berikut.

a. Xilol

Xilol atau *xylene*, disebut juga dimetilbenzena adalah turunan benzena dengan rumus molekul $(CH_3)_2C_6H_4$. Xylol memiliki berat molekul 106,17 gram/mol dengan komposisi karbon 90,5% dan hidrogen 9,5%. Selain itu ada juga ada tiga isomernya, yaitu *ortho-xylene*, *meta-xylene* dan *para-xylene*. Nama tersebut bergantung pada lokasi atom karbon pada cincin benzena yang diikat oleh dua metil (Cahyana, Sukrisna, and Mulyani 2015).



Gambar 2. 1 Ortho Xylol (1); Meta Xylol (2); Para Xylol (3)
Sumber: *Xylene: Features, Risks and Management of Waste*, 2017

Xilol adalah cairan yang mudah terbakar dan tidak berwarna dengan aroma khas minyak bumi, larut dengan sebagian pelarut organik dan lilin parafin. Cocok digunakan untuk dijadikan cairan pembening pada blok dengan ketebalan kurang dari 5 mm dan cepat menggantikan alkohol dari jaringan. Xilol dapat mengeraskan jaringan. Xilol paling sering digunakan di laboratorium histologi rutin (Khristian and Inderianti 2017).

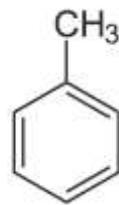
Xilol digunakan dalam laboratorium histologis untuk pemrosesan jaringan dan pewarnaan. Faktor solvabilitasnya yang tinggi memungkinkan perpindahan maksimum alkohol dan membuat jaringan menjadi transparan, meningkatkan infiltrasi parafin. Dalam prosedur pewarnaan, kemampuan dewaxing dan clearing yang luar biasa berkontribusi pada slide yang diwarnai dengan cemerlang. Meskipun sangat berguna, namun dapat menyebabkan berbagai bahaya kesehatan dan toksitas pada kulit, mata, hidung, sistem saraf, dan sistem musculoskeletal. Paparan xilol dapat terjadi melalui inhalasi, konsumsi, dan kontak mata atau kulit. *National Institute for Occupational Safety*

and Health merekomendasikan batas paparan xylene pada 100 ppm sebagai *Time-Weighted Average* hingga shift kerja 10 jam dan minggu kerja 40 jam dan 200 ppm selama 10 menit sebagai batas jangka pendek. Penghapusan xilol dari pemotongan biaya pemrosesan jaringan, menghemat waktu dan meningkatkan lingkungan laboratorium (Thajudeen et al. 2022).

Kelebihan dari xilol yaitu dapat bekerja dengan cepat sehingga membuat jaringan lebih cepat menjadi transparan. Selain itu juga, xilol memiliki kekurangan seperti harganya yang relatif mahal, paparan jangka panjangnya dapat memberikan efek yang berbahaya bagi kesehatan dan dapat merusak tubuh. Apabila terhirup uap, tertelan atau terjadi kontak langsung dapat menyebabkan depresi SSP (sistem saraf pusat), pusing, efek GI (gastrointestinal) seperti mual, muntah, kehilangan nafsu makan, depresi pernapasan, eritema kulit, bersisik, dan iritasi (Sehrawat and Kaur 2020).

Xilol telah banyak digunakan karena memiliki banyak kelebihan, seperti sebagai peluntur lilin parafin dan pelarut organik yang baik. Xilol sangat baik digunakan ada proses deparafinasi. Mengingat cukup banyak kekurangan dari xilol yang berbahaya bagi kesehatan tubuh manusia dan lingkungan sehingga dibutuhkan pengganti xilol yang lebih aman dan terjangkau (Mayangsari et al. 2019).

b. Toluen



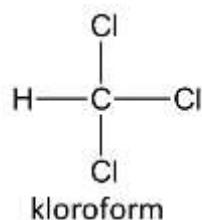
Gambar 2. 2 Struktur Kimia Toluen
(Khristian and Inderianti 2017)

Toluen (C₆H₅CH₃) adalah senyawa hidrokarbon aromatik yang tidak berwarna. Karakteristik spesifik lainnya dari senyawa ini diantaranya adalah mudah terbakar, mudah terurai, sedikit larut dalam air, beraroma manis dan tajam, memiliki tekanan uap 28,4 mm Hg pada suhu 25°C, massa molar 92,14g/mol dan densitas 0,8669 g/mL, zat cair (Lael, Santosa, and Aryadi 2018).

Toluen memiliki sifat yang mirip dengan xilol, tetapi jaringan tidak rusak meskipun waktu perendaman jaringan berlangsung lama. Toluen lebih mudah terbakar dan mudah menguap daripada xilol (Khristian and Inderianti 2017) .

Toluol memiliki kelebihan yaitu sedikit lebih ramah lingkungan karena terbuat dari minyak bumi mentah yang berasal dari pohon tolu, harganya lebih terjangkau, dan hasil pembuatan preparat lebih jernih (Lael et al. 2018)

c. Kloroform



Gambar 2. 3 Struktur Kimia Kloroform
(Bahri, Kurniasih, and Ahmadi 2017)

Kloroform (CHCl_3) atau disebut juga triklorometana merupakan cairan tak berwarna pada suhu kamar dengan bau manis seperti eter dan memiliki massa molekul 119,38 g/mol dan titik didih normal $61,2^\circ\text{C}$, densitas massa 1479 kg/m^3 , dan viskositas (kuantitas yang sebanding dengan ketahanannya terhadap aliran) sebesar $5,37 \times 10^{-3} \text{ Paxs}$ [$\text{kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$] pada 25° C (Ramírez 2022).

Titik didih normal lebih lambat beraksi daripada xilol dan menyebabkan kerapuhan yang kurang. Reaksi dari kloroform lebih lambat sehingga dapat mengurangi faktor penyebab bahaya. Jaringan yang ketebalannya lebih dari 1 mm bisa diolah. Kloroform tidak membuat jaringan menjadi bening dan tembus cahaya tidak mudah terbakar tapi mempunya toksitas yang tinggi dan menghasilkan gas fosgen beracun ketika dipanaskan. Kloroform biasanya paling sering digunakan untuk mengolah spesimen sistem saraf pusat (Khristian and Iderianti 2017).

d. Larutan pengganti Xilol

Xilol telah dilaporkan memiliki efek berbahaya yang maksimal. Standar peraturan OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*) telah menyatakan xilol sebagai berbahaya dan menganjurkan penggantinya dengan bahan kimia yang dapat mengurangi bahaya di laboratorium histologi tanpa menurunkan kualitas pewarnaan dan diagnosis yang tepat. Beberapa penelitian telah

mengusulkan penggunaan solusi alami dan ramah lingkungan sebagai alternatif xilol (Rai et al. 2016).

1) Asam Cuka

Asam cuka atau disebut juga asam asetat (CH_3COOH) adalah pelarut polar atau protik hidrofilik, mirip seperti air dan etanol serta mempunyai konstanta dielektrik yang sedang yaitu 6,2 sehingga dapat melarutkan senyawa polar seperti garam anorganik dan gula maupun senyawa non-polar seperti minyak dan unsur unsur seperti iodin, dan logam. Asam cuka yang beredar di pasaran memiliki kadar kurang lebih 25%, biasanya ada yang bermerek dan ada yang tidak bermerek. Pada cuka yang bermerek biasanya tertera kadar asam cuka pada kemasannya (Halim 2018).

Asam cuka juga merupakan salah satu bahan alternatif yang cukup efektif dalam menghilangkan noda-noda di dapur seperti minyak, kadar lemak yang menempel di dinding atau di bagian lemari dapur (Putri 2022). Dibandingkan dengan xilol, asam asetat memiliki efek toksitas asam asetat lebih rendah. Asam asetat memiliki sifat yang sama dengan asam cuka, sehingga terdapat kemungkinan asam asetat dapat digunakan sebagai agen deparafinasi (Galuh, 2020).

Menurut Halim (2018) dalam penelitiannya, Asam Cuka dapat menjadi pengganti xilol sebagai Agen Deparafinasi pada Pengecatan Hematoksilin. Asam cuka dengan konsentrasi 2% dapat

menghasilkan intensitas warna yang sama dengan xilol dan tidak terjadi kerusakan pada preparat potongan jaringan serta tidak menimbulkan perubahan struktur sel secara mikroskopik. Hasil warna pada inti sel berwarna biru terang dan warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat serta warna pada preparat seragam. Tingginya konsentrasi dan kandungan asam cuka yang dipakai pada proses deparafiniasi sehingga parafin dapat dihilangkan secara optimal dan tidak menghalangi penyerapan zat warna sehingga asam cuka dapat digunakan sebagai agen clearing maupun deparafiniasi menggantikan xilol. Ada beberapa keuntungan dari penggunaan asam cuka sebagai agen deparafinasi diantaranya, reagen yang dipakai lebih sedikit, waktu yang dibutuhkan juga lebih sedikit dan biayanya lebih murah.

Menurut penelitian lainnya oleh A. Putri (2022), menunjukkan bahwa asam cuka dengan konsentrasi 4% dapat memberikan hasil gambaran mikroskopis hepar mencit (*Mus musculus*) dengan intensitas warna pada bagian inti dan sitoplasma yang hampir sama dengan xylol sebagai kontrol. Dimana inti sel terlihat jelas karena terwarna biru oleh hematoksilin dan bagian sitoplasma terlihat jelas karena terwarnai merah oleh pewarna eosin. Hasil penelitian tersebut menunjukan bahwa asam cuka dapat menjadi agen deparafinasi yang baik menggantikan xilol.

2) Minyak Tanah

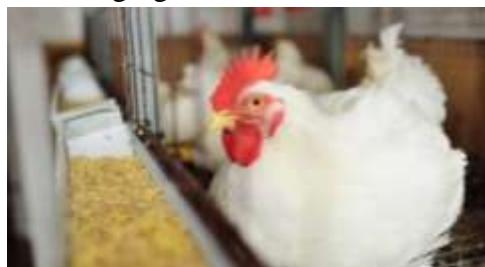
Minyak tanah (*kerosene*) juga disebut parafin atau minyak parafin adalah jenis produk petroleum berupa cairan hidrokarbon tidak berwarna yang mudah terbakar serta memiliki bau yang khas, namanya berasal dari bahasa Yunani “*Keros-wax*”. Cairan ini diperoleh dari distilasi fraksional dari petroleum pada 150°C dan 275°C serta dianggap sebagai non-karsinogenik dan non-teratogenik. Penanganan dan penggunaan akut dapat diminimalkan asalkan digunakan sesuai keamanan saat praktik (Narayan Biswal et al. 2017).

Minyak tanah juga digunakan sebagai pelarut (misalnya dalam pembersih, pestisida dan cat), degreaser dan minyak pemanas rumah tangga. Suatu bentuk minyak tanah yang dihilangkan baunya terkadang digunakan dalam produk dalam negeri . Berdasarkan data *National Institute for Occupational Safety & Health* (NIOSH), minyak tanah merupakan pelarut minyak olahan (terutama C₉–C₁₆), yang biasanya terdiri dari 25% parafin normal, 11% parafin bercabang, 30% monosikloparafin, 12% disikloparafin, 1% trisikloparafin, 16% aromatik mononuklear & 5% aromatik dinuklir.

Di laboratorium histologi sebagai agen *clearing*, minyak tanah juga menunjukkan morfologi inti dan sitoplasma yang lebih baik, kejernihan, keseragaman, dan kerenyahan pewarnaan bila dibandingkan dengan xilol (Sehrawat and Kaur 2020).

Penelitian yang dilakukan oleh Dineshshankar et al., (2019) menggunakan *kerosene* atau minyak tanah sebagai pengganti xilol dalam pemrosesan jaringan. Hasil menunjukkan bahwa morfologi inti dan sitoplasma yang lebih baik, kejelasan, keseragaman, dan kerenyahan pewarnaan. Tidak adanya perubahan morfologi jaringan dengan minyak tanah sebagai pengganti xilol sehingga dapat digunakan sebagai alternatif yang ramah lingkungan dan tidak beracun.

5. Hewan Uji Ayam Pedaging



Gambar 2. 4 Ayam Broiler (Yusuf et al. 2022)

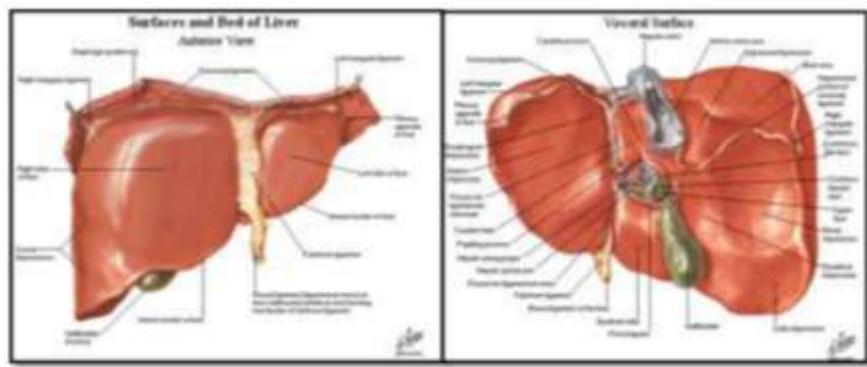
Ayam pedaging (*broiler*) merupakan salah satu komoditi unggas yang memberikan kontribusi besar dalam memenuhi kebutuhan protein asal hewani bagi masyarakat Indonesia. *Broiler* adalah jenis ternak unggas yang memiliki laju pertumbuhan yang sangat cepat, karena dapat dipanen pada umur 5 minggu. Keunggulan *broiler* didukung oleh sifat genetik dan keadaan lingkungan yang meliputi makanan, temperatur lingkungan, dan pemeliharaan (Umam et al. 2015).

Sebagai hewan percobaan, genetika yang berasal dari ayam ini dinilai sangat baik. Penggunaan yang memanfaatkan ayam harus sesuai kriteria yaitu sehat dan berkualitas sesuai dengan materi penelitian. Hewan

tersebut dikembangbiakkan dan dipelihara secara khusus dalam lingkungan yang diawasi dan dikontrol dengan ketat. Penggunaan hewan yang berkualitas dapat mencegah pemborosan waktu, kesempatan, dan biaya (Yusuf et al. 2022).

6. Organ Hepar

a. Anatomi Hepar



Gambar 2. 5 Hepar Tampak Anterior dan Permukaan Posterior
(Maulina 2018)

Hepar atau hati merupakan organ atau kelenjar terbesar di dalam tubuh, memiliki berat sekitar 1-2,3 kg atau sekitar 2,5% dari berat badan (Maulina 2018). Hepar biasanya berukuran sekitar

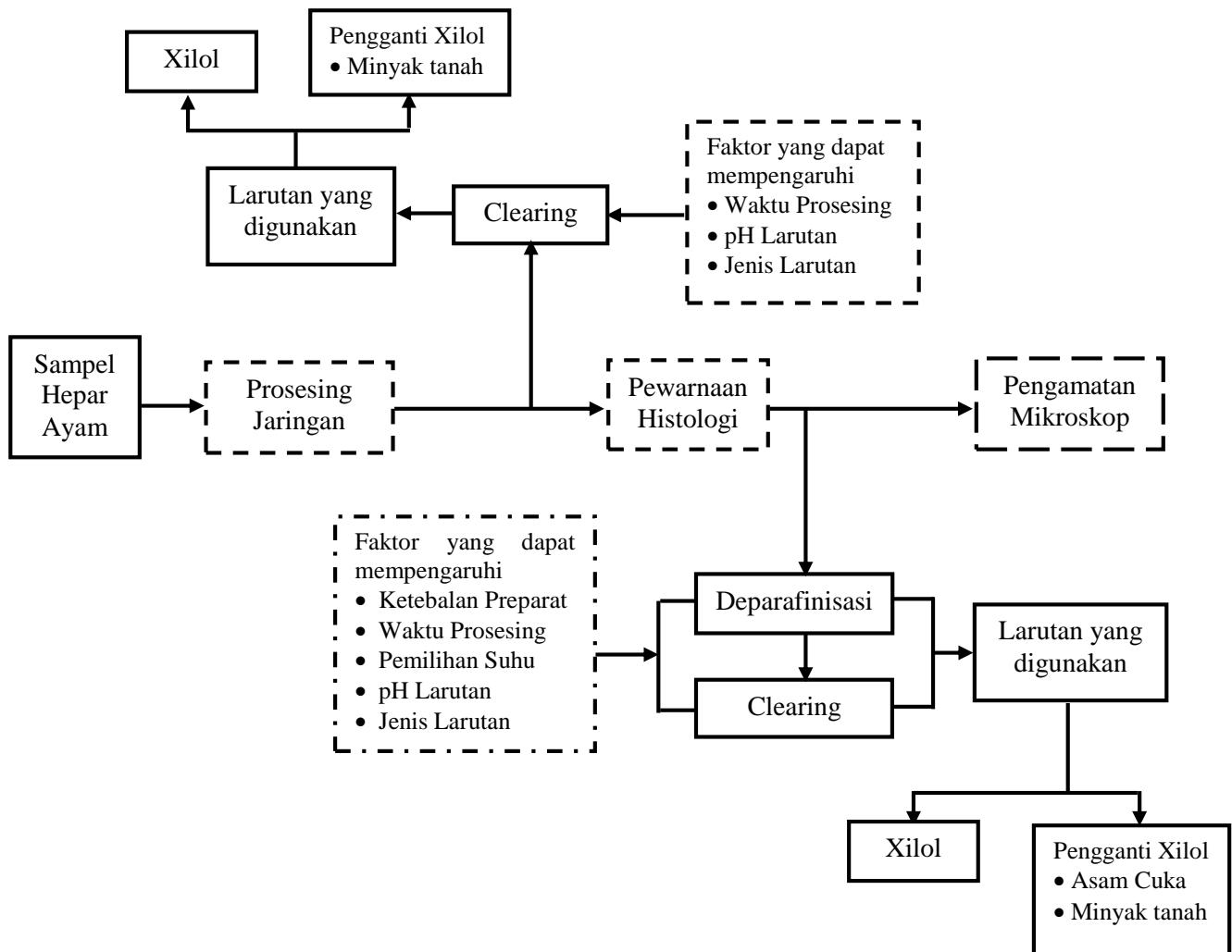
Hati memiliki struktur jaringan yang lunak dan terdapat beberapa komponen pada hati yang dapat berpengaruh terhadap proses fiksasi yaitu adanya lemak, darah dan air dengan kadar yang tinggi (Fajrina, Ariyadi, and Nuroini 2018).

b. Fisiologi Hepar

Hati merupakan organ eksresi yang berfungsi untuk mendetoksifikasi zat-zat toksik sehingga adanya kerusakan hati merupakan

petunjuk apakah suatu zat itu bersifat toksik atau tidak. Jika hati terus menerus terpapar obat dan zat kimia dalam jangka panjang maka sel-sel pada hati dapat mengalami perubahan terutama pada sel hepatosit seperti degenerasi lemak dan nekrosis yang dapat menurunkan kemampuan regenerasi sel sehingga menyebabkan kerusakan permanen sampai kematian sel (Sijid et al. 2020).

B. Kerangka Pikir



Keterangan



= Variabel yang diteliti



= Variabel yang tidak diteliti

C. Hipotesis

1. Tidak adanya perbedaan gambaran histologi jaringan hepar ayam dengan modifikasi proses *clearing* dan deparafiniasi menggunakan xilol dengan asam cuka.
2. Tidak adanya perbedaan gambaran histologi jaringan hepar ayam dengan modifikasi proses *clearing* dan deparafiniasi menggunakan xilol dengan minyak tanah.
3. Tidak adanya perbedaan gambaran histologi jaringan hepar ayam dengan modifikasi proses *clearing* dan deparafiniasi menggunakan asam cuka dengan minyak tanah.