

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tinjauan Pustaka**

##### **1. Histologi jaringan**

Histologi adalah disiplin yang mempelajari organ atau komponen tubuh hewan atau tumbuhan secara teliti dan terperinci. Upaya atau metode untuk mengamati, mempelajari, dan meneliti jaringan tertentu dari sebuah organisme dapat dilakukan dengan spesimen histologi (Labai, 2019).

Pemeriksaan ini dilakukan melalui observasi terhadap perubahan-perubahan tidak normal pada tingkat jaringan. Pemeriksaan ini sebaiknya disertai dengan pengetahuan tentang gambaran histologi standar jaringan, respons jaringan terhadap penyebab dan perbandingan patologi dengan hewan-hewan tingkat tinggi. Pentingnya pemeriksaan histopatologi dalam diagnosa penyakit infeksi selain itu untuk mengetahui kemungkinan penyebab infeksinya, juga dapat dilakukan penggolongan penyakit menurut waktu dan penyebaran penyakit. Dalam penentuan penyebaran infeksi dan tingkat keparahan infeksi dapat dilihat dari peradangan dan infiltrasi sel radang (Dzulhidayat, 2022).

Perkembangan histologi bergantung pada penggunaan dan perkembangan pada mikroskop. Mereka memberikan pengetahuan yang baik berkenaan dengan biologi jaringan yang terdapat dalam interaksi dan pengembangan kimia, fisiologi, imunologi, dan patologi. Dengan begitu maka terciptalah ilmu histokimia, imunokimia dan histopatologi yang dapat memberikan berbagai kemudahan untuk mahasiswa dalam memahami biologi jaringan. Histologi juga banyak digunakan dalam penelitian biomedis untuk mengidentifikasi/menentukan 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, 2019).

## **2. Hewan Coba**

### **a. Hewan Mencit**

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, 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 *et al.*, 2015).

## **3. Ginjal**

### **a. Jaringan Ginjal**

Ginjal ialah organ tubuh yang berfungsi membersihkan ataupun menyaring darah melalui produksi zat sisa organik seperti kreatinin, urea, produk penguraian hormon dan hemoglobin, serta asam urat dan mempunyai pembuluh darah yang sangatlah banyak, akan tetapi dapat rusak jika terpapar zat-zat yang toksik (Almunawati *et al.*, 2017).

Ginjal yang masing-masing memiliki dua buah di sisi kanan dan kiri tubuh, merupakan dua buah organ yang letaknya tinggi di dinding perut bagian belakang dan memiliki warna coklat kemerahan sebagaimana warna kacang merah. Ekskresi, metabolisme, pencernaan, dan penyimpanan berbagai zat sangat dipengaruhi oleh ginjal. (Labai, 2019).

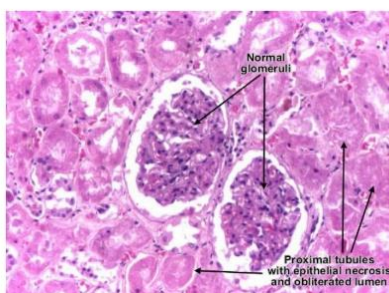
Ginjal ialah organ yang sangat esensial perannya dalam menjaga stabilitas lingkungan tubuh. Melalui

mekanisme penyaringan darah, ginjal mampu melakukan penyerapan kembali terhadap cairan non-elektrolit, elektrolit, dan air, serta mengekskresikan kelebihannya sebagai urin. Organ ginjal mampu menjaga keseimbangan yang tepat dari asam-basa, elektrolit, dan cairan tubuh, serta menghilangkan limbah metabolisme yang mengandung cairan non-elektrolit dan elektrolit lalu mengeluarkan kelebihannya sebagai urin. Tidak hanya itu saja, ginjal mampu membuang bahan kimia asing serta limbah metabolisme (asam urat, kreatin, urea), mengeluarkan erythropoietin (yang berguna dalam mensintesis darah), bentuk aktif dari vitamin D (guna meregulasi kalsium), serta renin (guna meregulasi kalsium). Uremia atau penyakit ginjal stadium akhir (PGSA) adalah kondisi medis yang terjadi ketika ginjal tidak mampu melakukan tugas penting ini (seperti kemampuan mensintesis darah).

Ginjal menyaring darah dan menghilangkan zat yang tidak dibutuhkan tubuh, seperti logam berat beracun. Karena sifat logam yang beracun, ginjal sering mengalami kerusakan sebagai akibatnya.

#### **b. Mikroskopis Ginjal Normal**

Masing-masing ginjal tersusun atas nefron sebagai unit yang jumlahnya mencapai 1-1,4 juta. Nefron merupakan unit fungsional ginjal yang tersusun atas lengkung henle, tumbai kapiler glomerulus, kapsula bowman, tubulus kontortus proksimal, serta tubulus kontortus distal yang mengosongkan diri ke ductus pengumpul. Sebuah unit nefron dimulai dari pembuluh darah kapiler / halus yang disebut sebagai glomerulus dan mempunyai sifat sebagai saringan.



**Gambar 2.1. Mikroskopis Ginjal (Labai, 2019)**

#### 4. Proses Pembuatan Jaringan

Pertama proses pembuatan jaringan dilakukan dengan makroskopis

Dalam melakukan pemotongan, pemeriksaan makroskopis menjadi hal pertama yang dilakukan. Pemeriksaan makroskopis meliputi identifikasi sediaan yang diterima dan orientasi jaringan yang diterima (jenis jaringan, bentuk jaringan, ukuran jaringan, warna, konsistensi, permukaan jaringan) lalu diambil bagian yang representatif untuk dipotong.

Tingkat kemudahan maupun kesukaran dalam proses pembuatan sediaan sangat bergantung dari bagian tubuh yang ingin diobservasi secara mikroskopis. Sebuah sediaan dapat dikatakan baik bilamana sediaan tersebut mampu merepresentasikan kondisi jaringan maupun sel sebagaimana saat jaringan ataupun sel tersebut masih berada di dalam tubuh (Khristian & Inderiati, 2017).

##### a. Fiksasi

Dalam serangkaian tahapan teknik histologi, fiksasi adalah tahapan yang paling esensial. Fiksasi semua teknik histologis adalah komponen terpentingnya. Fiksasi adalah pemeliharaan komponen jaringan untuk mencegah perubahan dan mencegah kerusakan. Fiksasi menjadi tahapan fundamental yang sangat esensial dalam menahan ataupun mencegah terjadinya degradasi jaringan beserta komponennya serta terjadinya autolisis supaya sediaan yang dihasilkan bisa diobservasi secara mikroskopis dengan baik (Niswatin, 2021).

Suatu proses fiksasi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti suhu fiksasi (temperatur kamar), konsentrasi ion hidrogen (pH netral), dan lainnya berdampak pada proses fiksasi seperti volume diksasi (20:1), konsentrasi larutan, ketebalan porongan (3-4 mm), serta waktu fiksasi (Musyarifah & Agus, 2018).

Mekanisme yang terjadi selama proses fiksasi bermanfaat sebagai pengawet untuk mempertahankan bentuk organel dan sel agar menyerupai keadaan aslinya di dalam tubuh. Cairan fiksasi akan berubah saat diberikan. Susunan kimiawi dan fisik jaringan. Tergantung pada jenis

fiksasi yang digunakan, sel dan komponen ekstraseluler yang tersusun atas berbagai macam elemen karbohidrat dan kompleks karbohidrat, fosfolipid dan lipid, protein dan peptida, RNA dan DNA, yang akan merespons selama proses fiksasi. (Khristian & Inderiati, 2017).

Tujuan fiksasi adalah untuk memastikan bahwa semua molekul dalam jaringan hidup dipertahankan dan tidak ada molekul baru yang terbentuk. Tujuan utama fiksasi adalah untuk menjaga kemiripan organel dan sel dengan bentuk fisiologisnya. Sebuah fiksasi dapat dikatakan baik bilamana syarat-syarat di bawah ini terpenuhi, antara lain:

- 1) Mampu menghasilkan jaringan yang tahan lama.
- 2) Mampu menghambat aurolisis dan pembusukan bakteri.
- 3) Tidak mengakibatkan korosif, keracunan, serta iritasi.
- 4) Ekonomis dan tidak menyulitkan.
- 5) Mampu menghasilkan gamabran mikroskopis yang baik.
- 6) Tidak mengakibatkan perubahan, pembengkakan, ataupun penyusunan sel.
- 7) Dilakukan dengan penekanan yang sejajar dan cepat.

#### **b. Tujuan**

Tujuan utama fiksasi adalah menjaga jaringan dan komponen sel tetap sama seperti saat sel masih hidup. Ada perubahan signifikan yang tidak diragukan lagi dalam susunan dan penampilan komponen sel jaringan selama pelaksanaan proses fiksasi beserta tahapan-tahapan selanjutnya yang dibutuhkan pada produksi sediaan jaringan (Khristian & Inderiati, 2017).

Menurut istilah teknis, fiksasi mencoba menghentikan atau menghentikan proses degeneratif, yang dimulai segera setelah jaringan tidak lagi berada di bawah kendali tubuh dan kekurangan darah. Proses degeneratif ini juga terkadang disebut sebagai proses memperlambat atau menghentikan metabolisme, yang menyebabkan kematian dan kehancuran sel. Usaha untuk meminimalisir terjadinya proses difusi, kehilangan, serta degenartif zat terlarut dalam sel harus dilakukan melalui mekanisme koagulasi dan pengendapat komponen dengan mekanisme “ikatan silang” dengan

komponen struktur lainnya yang tidak bisa larut. Prosedur pematangan jaringan, seperti infiltrasi suhu tinggi dalam parafin cair, harus melindungi jaringan dari bahaya. Perlindungan jaringan dari kerusakan yang dapat menghilangkan noda serta reagen lain seperti probe asam nukleat dan antibodi, atau menyebabkan reaktivitas (positif palsu) sama pentingnya untuk mencegah kerusakan struktural.

Tujuan tahap-tahap pada fiksasi secara umum ialah:

1) Mengeraskan jaringan dan sel

Pada prinsipnya, pengerasan memang bukan menjadi tujuan utama dari proses fiksasi akan tetapi dapat memberikan keuntungan yakni mempermudah pemotongan makroskopis pada jaringan-jaringan lunak seperti usus dan otak.

2) Menempelkan sel

Larutan fiksasi dapat berguna sebagai perekat sel dengan kaca objek dalam pembuatan sediaan sitologik, sebab sel yang telah melalui proses fiksasi dengan fiksasi kering ataupun menggunakan larutan fiksasi akan mampu merekat dengan sempurna. Fungsi perekatan ini berguna pada apusan bakteri ataupun apusan sel pada kaca sediaan.

3) Optikal diferensiasi

Proses fiksasi bukan hanya mencegah rusaknya sel, akan tetapi juga mampu memicu perubahan indeks bias dari berbagai macam komponen jaringan maupun sel, oleh karena itu proses fiksasi dapat mempermudah visualisasi komponen yang sudah terfiksasi.

4) Mencegah kematian dan kerusakan

Fiksasi berguna sebagai langkah preventif terhadap perubahan postmortem misalnya pembusukan dan autolisis. Autolisis sendiri ialah aktivitas penghancuran diri sendiri oleh enzim intraseluler dalam mekanisme pencernaan jaringan yang dilepaskan ketika membran organel lisosom pecah.

## 5) Efek pewarnaan

Dalam beberapa kasus, fiksasi mampu meningkatkan intensitas warna pada jaringan dan sel. Fiksasi tertentu, misalnya dengan menggunakan formulir mampu meningkatkan intensitas karakter pewarnaan jaringan, apalagi setelah dilakukan pewarnaan menggunakan hemaktosilin. Hal tersebut berbeda dengan jika sediaan akan dilakukan pewarnaan menggunakan masson trichrome, di mana peneliti menggunakan fiksasi bouin yang mampu mengkontraskan warna.

## 6) Pematatan

Pematatan komponen pada jaringan maupun sel dari yang awalnya berupa cairan ataupun konsistensi setengah cair (gel) menjadi semi padat hingga padat dapat terjadi setelah terjadi reaksi kimiawi pada larutan fiksasi.

## 7) Menjaga struktur dan komponen kimiawi

Fiksasi dapat menjaga komponen dan struktur kimiawi jaringan maupun sel sebagaimana keadaannya ketika masih hidup, oleh karena itu, pemeriksaan patologi atau struktur normal dan senyawa histokimia dapat dilanjutkan secara optimal.

**c. Penentuan Larutan Fiksasi yang tepat**

Larutan fiksasi yang digunakan harus menembus dari semua sisi. Semua permukaan harus ditembus oleh larutan fiksasi. Selalu letakkan spesimen dalam wadah yang sudah berisi fiksatif. Karena dapat menghalangi penetrasi larutan, hindari menempelkan tisu ke wadah. Sebelum menambahkan tisu ke wadah, tambahkan larutan fiksasi. Rongga harus dapat diakses. Organ dengan rongga alami ataupun spesimen berongga hendaknya senantiasa dibiarkan terbuka supaya terdapat akses fiksatif secara langsung. Bilamana hal tersebut tidak memungkinkan, maka peneliti dapat membungkusnya menggunakan kertas saring ataupun menggunakan aspirator supaya udara dapat keluar dan menggantinya dengan cairan fiksasi. Ketebalan organ maksimum adalah 4 mm.

Ketebalan spesimen atau potongan jaringan harus kurang dari 4 mm untuk mengoptimalkan proses fiksasi. Berikan waktu yang cukup. Jika Anda ingin proses fiksasi berjalan semulus mungkin, maka poronglah jaringan ataupun spesimen dengan ketebalan kurang dari 4 mm. Habiskan cukup waktu untuk itu. Waktu yang cukup harus berlalu selama proses fiksasi untuk memungkinkan larutan fiksasi mencapai area terkonsentrasi dari spesimen dan untuk memungkinkan larutan fiksasi dan suhu untuk menyelesaikan reaksi kimia. Pada suhu kamar 20°C, suhu fiksasi yang baik akan tercapai pada awal pemberian. Namun, dalam keadaan tertentu, temperatur bisa dinaikkan sampai 45°C; akan tetapi waktu fiksasi harus dipantau secara hati-hati untuk mencegah kerusakan jaringan.

Untuk pilihan dari Larutan Fiksasi yang tepat harus diperhatikan beberapa hal yaitu:

- 1) Seluruh fiksatif bersifat korosif dan toksik. Peneliti hendaknya memperlakukan larutan fiksasi dengan anggapan bahwasanya larutan tersebut adalah korosif dan beracun, walaupun jumlahnya variatif. Akan tetapi, peneliti harus waspada atas potensi bahaya yang mungkin saja terjadi jika ia terlanjut berkontak dengan larutan fiksatif tersebut.
- 2) Hindari tutup wadah yang bersifat logam. Peneliti hendaknya menggunakan wadah yang terbebas dari sifat logam saat melakukan proses fiksasi, sebab beberapa larutan fiksatif sangat korosif, misalnya garam merkuri.
- 3) Larutan fixatives hendaknya dibuat secara berhati-hati dari reagen yang berkualitas dan segar. Buruknya kualitas reagen akan menciptakan fiksasi dengan kualitas yang juga buruk. Beberapa formula fiksasi hendaknya diproduksi dari larutan stok sesaat sebelum dipergunakan, sebab larutan fiksasi sifatnya tidak stabil saat diberi larutan pengencer (contohnya cairan Helly).
- 4) Perlakuan setelah memberikan larutan fiksasi. Penggunaan beberapa larutan fiksasi terkadang mewajibkan peneliti untuk mencuci spesimen terlebih dahulu di dalam air sebelum berlanjut ke langkah



pematangan jaringan (contohnya Helly atau Zenker) ataupun terdapat beberapa syarat yang lain.

- 5) Frekuensi penggunaan larutan fiksatives. Peneliti hendaknya tidak menggunakan kembali larutan fiksasi yang sudah digunakan sebelumnya, walaupun rasio penggunaan jaringan sebelumnya tergolong sangat tinggi untuk menghindari kontaminasi dari jaringan yang sebelumnya.
- 6) Pergantian larutan fiksasi spesimen yang diterima dan sudah difiksatif hendaknya diperiksa dan dilakukan penggantian larutan fiksatifnya bilamana dinilai perlu, dan bila peneliti ragu, maka hendaknya ia menggantinya dengan larutan fiksasi baru dan jaringan hendaknya dicuci dulu menggunakan air mengalir.

Kemudahan ataupun kesurakan proses pembuatan sediaan sangat bergantung pada bagian tubuh yang akan diobservasi secara mikroskopis. Bergantung dengan bagian tubuh yang perlu disiapkan untuk pengamatan mikroskopis, proses persiapannya bisa saja tergolong sangat sulit atau sederhana. Preparat yang baik adalah yang dapat secara akurat menggambarkan keadaan jaringan ataupun sel ketika masih hidup dalam tubuh.

#### **d. Larutan Fiksasi**

Larutan fiksasi yang digunakan hendaknya dapat menembus semua sisi. Peneliti hendaknya senantiasa menempatkan spesimen di dalam wadah yang telah memiliki kandungan fiksatif dan memastikan bahwasanya jaringan tidak menempel dengan wadah untuk mencegah terjadinya pengurangan sisi penetrasi larutan.

Prosedur fiksasi harus diatur waktunya sehingga larutan fiksasi mencapai bagian tengah spesimen serta menyelesaikan reaksi kimia menggunakan temperatur dan larutan fiksasi. Temperatur fiksasi yang bagus adalah 20°C pada awal pemberian, namun pada beberapa keadaan, temperatur dapat dinaikkan menjadi 45°C; Namun, perawatan harus dilakukan untuk memperbaikinya untuk mencegah kerusakan jaringan.

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

Larutan NBF merupakan bahan fiksasi campuran yang umum digunakan dan berfungsi sebagai bahan pengawet dan untuk melindungi struktur fisik sel. Larutan NBF yang digunakan adalah NBF 10% dengan pH berkisar antara 6.5 –7.5. Formulasinya yang digunakan untuk 1 liter NBF adalah formaldehide (37-40%) sebanyak 100 ml yang dicampur dalam larutan aquadest 900 ml yang sebelumnya telah dicampur dengan Sodium phosphate monobasic 4 gram dan Sodium phosphate dibasic (anhydrous) 6.5 gram (Labai, 2019).

Larutan fiksasi NBF 10% memiliki keunggulan lebih sederhana, memiliki pH 7 (pH sangat baik), serta bisa berguna untuk menyimpan jaringan dalam jangka panjang (Miranti, 2010).

2) Larutan *Bouin*

Larutan Bouin berisi 25% formalin, asam asetat 0.9 M dan 0.04 M asam pikrat yang dilarutkan di dalam air. Asam pikrat menembus jaringan agak lambat, mengentalkan protein dan dapat menyebabkan beberapa penyusutan. Selain itu penggunaan asam pikrat akan menyebabkan jaringan menjadi berwarna kuning.

Larutan *Bouin* memiliki pH berkisar 1,5 –2. Penetrasi menggunakan larutan Bouin ini lebih cepat daripada penggunaan NBF. Spesimen biasanya direndam dalam larutan Bouin selama 24 jam. Namun ketika penyimpanan terlalu lama di dalam campuran tersebut dapat menyebabkan hidrolisis dan hilangnya DNA dan RNA. Hal ini mengharuskan jaringan yang difiksasi dengan larutan Bouin harus dilakukan pencucian terlebih dahulu sebelum melakukan proses lebih lanjut, Efek dari penggunaan larutan fiksasi ini akan menghasilkan warna kuning. Warna kuning tersebut dapat dihilangkan dengan perendaman dengan alkohol 70%, lithium karbonat atau pewarna asam yang dibarengi atau secara terpisah pemberiannya ketika proses pewarnaan berlangsung.

**e. Dehidrasi**

Dehidrasi dilakukan sebagai tahapan kedua pada proses jaringan dengan tujuan guna mengeluarkan cairan yang terkandung pada jaringan yang sudah difiksasi supaya jaringan tersebut bisa diisi dengan parafin ataupun zat yang lain sehingga bisa dipergunakan untuk membuat blok preparat. Proses dehidrasi dengan alkohol bertingkat dari larutan rendah ketinggian selama 2 jam dan 1 hari. (Labai, 2019).

Zat yang bisa digunakan antara lain ialah aseton, dioxane, ethanol, dan lain-lain. Akan tetapi, peneliti banyak menggunakan ethanol untuk proses dehidrasi. Pelaksanaan proses ini dilaksanakan secara bertahap dan perlahan, dimulai dari ethanol dengan konsentrasi yang rendah sampai yang tertinggi (ethanol absolut).

**f. Clearing**

*Clearing* ialah proses menghilangkan kandungan alkohol yang terdapat pada jaringan lalu menggantikannya dengan larutan yang berikatan dengan parafin, sama dengan kliring karena memiliki arti yang sama dengan kata tersebut. Xylol dan toluene adalah dua contoh dari berbagai larutan yang digunakan sebagai agen klarifikasi. Ini sangat penting selama proses pembersihan karena parafin tidak akan masuk ke jaringan dan akan menghalangi prosedur selanjutnya jika masih ada sedikit residu alkohol yang tertinggal di jaringan.

**g. Infiltrasi Parafin**

*Infiltrasi parafin* merupakan proses perendaman jaringan dalam parafin yang dicairkan pada suhu 58-60 °C selama 30 menit sampai 6 jam dalam inkubator bertujuan untuk mengeluarkan cairan pembening dari jaringan dan diganti dengan parafin selain itu juga membuat jaringan lebih tahan terhadap pemotongan.

**h. Blocking**

Proses ini dilakukan untuk memudahkan pemotongan jaringan menggunakan mikrotom. Pada tahapan ini, peneliti akan mempersiapkan tempat *blocking*, lalu parafin yang sudah disiapkan ditungkan ke dalamnya. Jika blok paraffin telah kering dan sudah mengeras dengan

sempurna serta sudah buka, dapat di keluarkan dari tempat blocking lalu di lanjutkan ke proses selanjutnya.

**i. Pemotongan**

Pisau mikrotom digunakan dalam tahapan ini. Persiapan saat menggunakan Pisau mikrotom adalah pisaunya harus tajam supaya peneliti mendapatkan jaringan yang baik dan tidak koyak. Pisau mikrotom ditempatkan pada tempatnya di mikrotom dengan sudut tertentu. Selanjutnya mempersiapkan kaca objek yang direkatkan dengan preparat kemudian mempersiapkan waterbath dengan temperature suhu 40 derajat dan mempersiapkan kuas dan jarum. (Labai, 2019).

**j. Deparafinisasi**

Deparafinisasi adalah langkah sebelum proses pewarnaan (staining). Tujuan deparafinisasi adalah untuk menghilangkan sisa-sisa parafin mirip dengan lemak pada jaringan, agar warnanya dapat menembus maka lapisan parafin harus dihilangkan. Xylol atau xylene umumnya digunakan sebagai agen deparafinisasi dalam histopatologi. Xylol bersifat toksik/racun.

**k. Pewarnaan**

Pewarnaan ialah proses di mana peneliti memberikan warna terhadap jaringan yang sudah dipotong supaya unsur jaringan tersebut memiliki warna yang kontras dan bisa diobservasi dengan mikroskop. Pewarnaan hematoxylin-eosin (HE) merupakan zat pewarna alami yang sering digunakan untuk mewarnai inti dan sitoplasma juga jaringan penyambungannya, sebab dapat mengikat inti sel dengan ikatan lemah dan akan berubah apabila berubah menjadi kuat ketika ditambahkan dengan senyawa lain. Pada tahapan ini, pewarna eosin juga bisa dipergunakan untuk memberikan warna pada sitoplasma ataupun sel darah dari sampel. Eosin akan memberikan warna pada corakan jaringan (Rahmawanti *et al.*, 2021).

**l. Mounting**

Proses mounting bertujuan untuk mengawetkan sediaan yang telah diwarnai agar tidak rusak oleh bakteri atau jamur. Mounting sendiri menggunakan media mounting

seperti lem/entelan yang ditetaskan diatas jaringan kemudian ditutup menggunakan deckglass. Dalam pembuatannya tidak diperbolehkan terdapat gelembung udara pada jaringan karena akan mempengaruhi pembacaan. Setelah mounting selesai, beri label identitas pasien di bagian kasar object glass.

## **5. Faktor-faktor yang mempengaruhi dalam pembuatan sediaan jaringan**

### **a. Fiksasi**

#### 1) Tingkat keasaman (pH)

pH pada sebuah larutan bisa menjadi esensial saat larutan yang dipergunakan pada proses fiksasi memiliki kandungan formaldehid. pH yang diberikan hendaknya selaras dengan pH netral. Kandungan formaldehid dalam larutan fiksasi akan membentuk asam format dan menciptakan larutan asam yang mampu bereaksi dengan hemoglobin dan memproduksi pigmen artefak (asam Hematin Formaldehid). Akan tetapi, bilamana larutan fiksasi pH-nya basa, maka besar kemungkinan sel akan membengkak.

#### 2) Suhu dan temperature

Temperatur yang meningkat dapat mengakselerasi kecepatan reaksi kimia antara jaringan/sel dengan unsur fiksatif. Sebagai akibatnya, laju degeneratif akan sukar untuk dihentikan. Temperatur yang diberikan hendaknya ialah temperatur yang bisa diterima dengan baik supaya kualitas dan morfologi jaringan serta sel dapat tetap terjaga. Temperatur dari larutan fiksasi juga bisa diberikan dalam suhu yang lebih tinggi hingga 65 °C, akan tetapi peneliti harus memastikan bahwasanya jangka waktunya haruslah lebih singkat.

#### 3) Dimensi spesimen

Peneliti hendaknya memberikan atensi pada dimensi spesimen sebab berkorelasi dengan proses difusi yang dipergunakan pada pematangan jaringan serta waktu optimal jaringan terfiksasi dari seluruh sisinya. Peneliti juga hendaknya mengetahui bahwasanya ketebalan dari kaset jaringan hendaknya 5 mm.

## 4) Volume terhadap spesimen

Peneliti benar-benar harus memberikan atensi pada volume larutan fiksasi terhadap spesimen sebab hal tersebut berkorelasi dengan kecepatan penetrasi dan penurunan konsentrasi larutan fiksasi. Bilamana peneliti menggunakan larutan fiksasi yang sedikit, maka konsentrasi akhirnya saat kondisi isotonik terjadi juga akan menurun drastis sehingga dapat memperlambat kecepatan penetrasinya.

**b. Gambaran Mikroskopis**

Peneliti hendaknya mengambil organ yang masih segar dan utuh, sebab jaringan yang sudah mengalami kerusakan tidak dapat dipakai dan diproses lebih lanjut. Untuk itu dibutuhkan ketelitian dan hat-i-hati dalam pengambilan organ. Adapun Faktor-faktor lain yaitu:

- 1) Pemotongan organ yang terlalu tebal.
- 2) Waktu Fiksasi terlalu lama dapat menyebabkan jaringan menjadi keras sehingga menyulitkan dalam proses pemotongan jaringan.
- 3) Pisau mikrotom kotor dan kurang tajam menyebabkan pita paraffin yang dihasilkan ada lipatan atau tampak garis-garis dan tidak bersih.
- 4) Penempatan pita jaringan pada air dalam waterbath tidak sesuai sehingga akan mengakibatkan pita jaringan mengalami lipatan.
- 5) Air pada waterbath suhunya terlalu panas dapat menimbulkan artefak pada jaringan yang sudah diiris.
- 6) Sudut pemotongan kurang tepat mengakibatkan pita jaringan menjadi pendek dan tidak sempurna.
- 7) Block jaringan yang tidak dingin sehingga menyebabkan pemotongan jaringan sulit dipotong tipis, mudah rusak dan adanya rongga.

**B. Landasan Teori**

Di antara beberapa jenis larutan fiksasi yang ada, larutan Bouin dan *Neutral Buffered Formalin* termasuk larutan yang paling sering digunakan. Cairan fiksatif yang ada pada dasarnya

mempunyai kelebihan maupun kekurangan. Sebelum dilakukan fiksasi perlu mempertimbangkan bahan yang akan digunakan dikarenakan kelebihan dan kekurangan dari bahan-bahan tersebut memberikan pengaruh nyata terhadap beberapa sampel sediaan dan hasil akhir setelah dilakukannya pewarnaan (Rusmiatik, 2019).

Larutan bouin dianggap sebagai fiksatif yang baik untuk struktur jaringan lunak yang halus. Sebagian besar fiksatif bouin mengandung asam pikrat dan sedikit asam asetat serta formaldehid (Bhat dan Hussein, 2021). Adapun kelebihan penggunaan larutan bouin dalam tahap fiksasi antara lain: kemampuannya lebih cepat dalam penetrasi ke dalam jaringan nukleus dan jaringan ikat akan terpulas dengan baik, cairan bouin dapat disimpan cukup lama serta dapat digunakan kapan saja (Sitanggang, 2021); (Rusmiatik, 2019); (Singhal *et al.*, 2016). Kekurangan dari penggunaan cairan bouin dalam tahap fiksasi adalah jika waktu fiksasi yang digunakan terlalu lama maka jaringan menjadi hancur dan sulit untuk diiris (Sitanggang, 2021; Sriwahyunizah, 2018).

Larutan fiksatif *buffered* formalin telah digunakan sebagai fiksatif histologis tujuan umum yang populer untuk memperbaiki jaringan. Larutan ini bersifat hipotonik dalam ion buffer (Bhat & Hussein, 2021). Adapun kelebihan dari pemakaian *buffered formalin* dalam tahap fiksasi antara lain: memiliki pH 7, dalam penggunaannya lebih mudah/fleksibel, serta dapat dimanfaatkan untuk mengawetkan jaringan dalam waktu lama (Sriwahyunizah, 2018). Sumber lain menyebutkan bahwa larutan formalin memiliki beberapa kelebihan antara lain: merupakan cairan fiksatif yang umum; lebih murah; lebih mudah disiapkan; Nilai pH cairan mendekati netral atau relatif stabil, sehingga tidak terjadi interaksi dengan haemoglobin atau produknya yang dapat membentuk pigmen formalin; dan potongan sediaan jaringan dapat ditinggalkan dalam cairan dalam jangka waktu yang lama (Rahmadhani, 2018). Adapun kekurangan dari penggunaan *buffered formalin* adalah daya fiksasinya lebih lambat, yaitu 12-24 jam (Sriwahyunizah, 2018); dan bersifat toksik, iritan, menyebabkan sinusitis, serta karsinogenik (Prasetyani, 2017); (Rahmadhani, 2018).

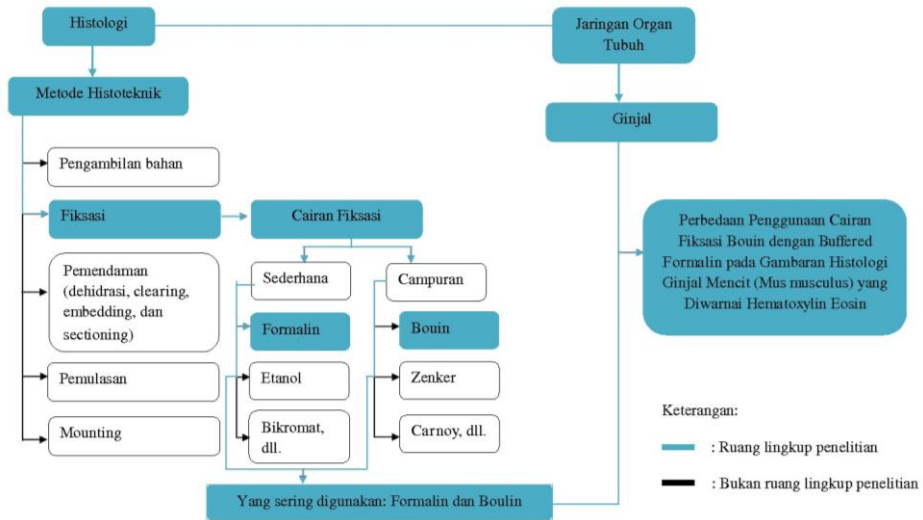
Beberapa penelitian telah dilakukan sebagai upaya untuk mengetahui perbedaan penggunaan cairan fiksasi bouin dan formalin pada gambaran histologi sediaan jaringan (Ellenburg *et al.*, 2020); (Rusmiatik, 2019); (Yohana, 2017). Riset yang pernah dilakukan oleh Ellenburg *et al.* (2020), dengan menggunakan jaringan testis tikus, menunjukkan bahwa fiksasi dengan larutan formalin menghasilkan histologi yang lebih baik dibandingkan dengan menggunakan larutan bouin. Sedangkan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yohana (2017), yang menggunakan jaringan hepar tikus putih, menunjukkan bahwa hasil fiksasi dengan menggunakan larutan bouin lebih baik dibandingkan dengan larutan formalin.

Ginjal adalah salah satu organ yang dapat diperiksa secara mikroskopis dengan menggunakan preparat histologi jaringan. Ginjal merupakan organ utama dalam sistem urin, yang berwarna merah coklat, berbentuk seperti biji kacang merah (Kurniasih, 2018). Organ ini dibungkus oleh anyaman fibrosa tipis (Mescher & Junqueira 2013, diacu dalam dalam Soesilawati 2020). Ginjal termasuk organ tubuh yang sangat peka terhadap pengaruh zat kimia hal tersebut dikarenakan ginjal menerima 25-30% sirkulasi darah yang akan dibersihkan. Selain itu, ginjal yang berfungsi sebagai organ filtrasi memungkinkan terjadinya perubahan patologik yang sangat tinggi saat terpapar zat kimia tertentu (Aulina, 2020). Rowley *et al.* (2020) melakukan analisis visualisasi *Hyaluronan* (HA) pada jaringan ginjal dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa larutan fiksasi antara lain: Larutan Bouin, Larutan *Carnoy*, *Ethanol-Formalin-Glacial Acetic Acid* (EFG), *Histochoice*, Larutan Davidson yang dimodifikasi, dan *Neutral Buffered Formalin* 10%.

### **C. Kerangka Teori**

Kerangka Teori dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.3 di bawah ini.





**Gambar 2.2. Kerangka Teori**

#### D. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

Ho : Terdapat perbedaan pada cairan fiksasi *buffered formalin* dengan bouin

Hi : Tidak terdapat perbedaan pada cairan fiksasi *buffered formalin* dengan bouin