

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Histoteknik**

Histoteknik adalah metode atau cara untuk membuat sajian histologi dari spesimen tertentu melalui suatu rangkaian proses hingga menjadi sajian yang siap untuk diamati atau dianalisis. Sajian histologi yang baik dapat digunakan untuk bahan pengajaran dan praktikum mahasiswa untuk mempelajari bentuk dan struktur jaringan tubuh tertentu, sebagai riset untuk mempelajari perubahan jaringan dan organ tubuh hewan percobaan, dan membantu menegakkan diagnosis penyakit yang diderita oleh seorang pasien. Tujuan tersebut dapat tercapai apabila sajian histologi yang dibuat dapat memberikan gambaran tentang bentuk serta susunan sel, inti sel dan sitoplasma, badan inklusi (glikogen, tetesan lemak, pigmen), susunan serat jaringan ikat, otot dan lain sebagainya sesuai dengan gambaran jaringan tubuh tersebut dalam kondisi hidup (Jusuf, 2009).

Sajian yang baik dapat membantu dalam memahami struktur histologi jaringan tubuh sesuai dengan kondisi yang sebenarnya pada waktu hidup. Sajian yang baik juga akan memberikan hasil yang benar-benar akurat yang sangat dibutuhkan oleh para peneliti untuk menjawab permasalahan yang timbul. Selain itu, sajian yang baik juga diperlukan oleh klinisi untuk menunjang diagnosis penyakit yang diderita oleh pasien (Jusuf, 2009).

Rangkaian proses pembuatan sajian histologi terdiri atas fiksasi (*fixation*), dehidrasi (*dehydration*), pembersihan (*clearing*), penanaman (*impregnasi/embedding*), pengeblokan (*blocking*), pemotongan jaringan (*sectioning*), pembuatan sediaan (*afixing*), pewarnaan (*staining*), penutupan (*mounting*), dan pelabelan (*labelling*). Langkah awal dalam isolasi jaringan tubuh adalah melakukan persiapan alat yang terdiri atas peralatan bedah minor, peralatan anestesi dan obat anestesi, serta perangkat pengawetan jaringan. Persiapan alat terdiri atas peralatan bedah minor yaitu gunting, pinset, skalpel, klem, pemegang jaringan, kassa, meja operasi, dan lampu. Peralatan anestesi terdiri dari *disposable syringe* dan sungkup/masker anestesi. Obat anestesi misalnya eter, ketalar, *phenobarbital*, serta perangkat pengawetan jaringan (fiksasi jaringan) yang terdiri atas wadah untuk fiksasi emersi, cairan fiksasi formalin, alkohol, formol salin, muller, bouin, zenker, serta *peristaltik pump/syringe pump* untuk fiksasi supravital (Sumanto. 2014).

Persiapan sampel perlu dilakukan apabila sampel diambil dari hewan. Persiapan sampel tersebut meliputi pemilihan hewan harus sehat, galur baik dan jelas, status gizi baik, dan dipelihara sesuai dengan syarat-syarat pemeliharaan hewan coba. Sedangkan sampel dari kadaver atau manusia harus segera diambil dan dimasukkan ke dalam larutan fiksasi. Tahapan pengambilan jaringan hewan adalah pembiusan, pembedahan, isolasi jaringan tubuh, dan fiksasi supra vital/intravital. pembiusan hewan yang akan diambil jaringan tubuhnya dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu pembiusan inhalasi dengan menggunakan eter dan sungkup muka dan pembiusan dengan menyuntikkan zat anestesi seperti

*chloralhydrate*, ketalar, *phenobarbital*, dan sebagainya. Setelah hewan terbius sempurna, proses selanjutnya adalah melakukan operasi dan pengambilan jaringan tubuh yang diinginkan. Jaringan tubuh kemudian dipotong-potong dan dibilas cairan NaCl 0.9% untuk menghilangkan darah (Jusuf, 2009).

## 2.2 Larutan Fiksatif

Dasar dari pembuatan sajian histologi yang baik adalah melakukan fiksasi yang benar. Kesalahan yang dilakukan pada tahap fiksasi tidak akan pernah dapat diperbaiki lagi pada tahapan selanjutnya. Hasil akhir sajian histologi yang baik sangat tergantung pada cara melakukan fiksasi. Tujuan dari fiksasi adalah mengawetkan jaringan yaitu mempertahankan susunan jaringan agar mendekati kondisi seperti sewaktu hidup dan mengeraskan jaringan terutama pada jaringan lunak supaya memudahkan pembuatan irisan tipis. Fiksasi akan menghambat terjadinya pembusukan yang disebabkan oleh kuman-kuman pembusuk yang berasal dari luar tubuh (Jusuf, 2009).

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam pembuatan jaringan histologi adalah tebal irisan jaringan, volume larutan fiksasi dan jenis cairan fiksasi. Tebal irisan jaringan adalah 3-5 mm sehingga larutan fiksasi dapat dengan cepat masuk ke seluruh jaringan. Apabila irisan terlalu tebal maka hanya permukaan luarnya saja yang difiksasi dengan baik, sedangkan bagian tengah jaringan sudah membusuk sebelum larutan fiksasi masuk ke dalam jaringan. Volume larutan fiksasi sekurang-kurangnya harus 10-20x volume jaringan yang akan difiksasi. Besarnya volume jaringan menentukan volume fiksasi yang diperlukan sedangkan

tebal jaringan menentukan kecepatan fiksasi. Panjang dan lebar jaringan umumnya ditentukan oleh jenis mikrotom yang akan digunakan (Jusuf, 2009).

Jenis larutan fiksasi yang akan digunakan tergantung unsur jaringan yang akan didemonstrasikan dan jenis pewarnaan yang akan digunakan. Larutan fiksasi dapat dibedakan menjadi 3 kelompok yaitu *Micro-anatomical fixation*, *cytological fixatives*, dan *histochemical fixatives*. *Micro-anatomical fixation* digunakan apabila struktur histologis jaringan akan dipertahankan dengan hubungan yang benar antara lapisan jaringan dan kelompok sel. Larutan fiksasi yang tergolong kelompok ini adalah larutan formalin atau modifikasinya, larutan asetik alkohol formalin, Heidenhain Susa, Zenker, dan Bouin. *Cytological fixatives* digunakan apabila struktur intraselular atau badan inklusi hendak dipertahankan. Tujuan tersebut dapat dicapai dengan cara melakukan penetrasi larutan yang merata. Fiksasi ini dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu fiksasi inti (nuklear) dan fiksasi sitoplasma. Larutan fiksasi yang tergolong dalam kelompok ini adalah fiksasi inti (larutan Carnov) dan fiksasi sitoplasma (larutan Muller, formol salin, *formol calcium*, *Zenker formol*). *Histochemical fixatives* digunakan apabila jaringan akan diwarnai dengan pewarnaan histokimia. Larutan fiksasi yang digunakan tidak boleh mengubah unsur-unsur yang akan didemonstrasikan (Jusuf, 2009).

Larutan formalin merupakan larutan fiksatif yang paling umum digunakan. Larutan formalin yang digunakan adalah formalin 10%. Formula yang digunakan adalah formalin 40% sebanyak 10 mL dan aquades sebanyak 90 mL. Formalin dalam bentuk polimer dari formaldehida tidak dapat digunakan untuk fiksasi. Formalin yang dapat digunakan adalah bentuk monomernya. Untuk menghasilkan

formalin dalam bentuk monomer diperlukan waktu, kecuali apabila pH larutan netral atau sedikit alkalis, karena kecepatan depolarisasi tergantung pada pH. Formalin bersifat asam karena mengandung asam formiat akibat oksidasi formaldehida. Larutan formalin 10% harus dibuat netral atau sedikit alkalis dengan menggunakan larutan *buffer phosphate* dengan pH 7.2 sebagai pelarut, atau dengan menambahkan kalsium asetat (Jusuf, 2009).

Larutan formalin 10% dengan *buffer phosphate* yang sering digunakan adalah *Formol Calcium* (Lillie 1965), Buffer formalin (NBF 10%), dan Buffer formalin sukrosa (Holt dan Hicks, 1961). Pembuatan NBF 10% yaitu dengan mencampurkan 10 mL formalin, 0,40 gram *acid sodium phosphate monohydrate*, 0,65 gram *anhydrous disodium phosphate*, dan aquadest sampai mencapai volume 100 mL. Larutan fiksatif formalin akan mengawetkan struktur halus (*fine structure*) dengan sangat baik, *phospholipid* dan beberapa enzim. Larutan ini sangat dianjurkan untuk dipakai pada penelitian gabungan secara sitokimia dan mikroskop elektron. Jaringan harus didinginkan sampai 4° Celsius dalam refrigerator untuk mendapatkan hasil yang terbaik (Jusuf, 2009).

Kelebihan larutan fiksatif formalin adalah formalin merupakan larutan fiksatif umum, pH mendekati netral, pigmen formalin (*acid formaldehyde haematin*) tidak terbentuk karena pembentukannya baru terjadi apabila ada interaksi antara larutan formalin pada pH asam dengan hemoglobin atau produknya. Larutan formalin sering digunakan untuk fiksasi organ yang mengandung banyak darah seperti hati, lien, sumsum tulang dan sebagainya. Apabila pigmen tersebut terbentuk dapat dihilangkan dengan perlakuan pikrat-

alkohol atau larutan alkohol 1% dalam sodium hidroksida (NaOH). Potongan jaringan dapat ditinggalkan di dalam larutan formol salin untuk jangka waktu lama (dapat sampai 1 tahun) tanpa ada perubahan yang berarti. Apabila diperlukan jaringan yang direndam dalam larutan fiksatif ini dapat dipindahkan ke dalam larutan fiksatif lain. Kekurangan larutan fiksatif formalin adalah jaringan yang difiksasi dengan cara rendam memerlukan waktu sedikitnya 24 jam baru dapat diproses (Jusuf, 2009).

Larutan fiksatif lain yang dapat digunakan dalam proses histoteknik adalah alkohol 70%. Alkohol merupakan larutan fiksatif yang berfungsi sebagai bahan fiksasi sediaan sitologi namun dalam keadaan terpaksa dapat digunakan sebagai fiksasi sediaan histopatologi. Fiksasi alkohol tidak dapat digunakan pada suhu rendah karena albumin dan globulin dalam plasma akan larut. Pengamatan lipoid dalam sel tidak boleh menggunakan alkohol karena akan melarutkan lipoid. Fiksasi alkohol dapat digunakan untuk mengawetkan enzim tertentu, misalnya *alkaline phosphatase*. Alkohol dalam presentasi tinggi banyak digunakan untuk fiksasi glikogen. Daya penetrasi alkohol terhadap jaringan cepat, akan tetapi penetrasi terhadap plasma darah lambat (Dawar, 2015). Setelah difiksasi dengan alkohol jaringan tidak perlu dicuci secara khusus dan dapat langsung ke tahap penjernihan. Kekurangan fiksasi dengan alkohol adalah dapat mengerutkan jaringan sehingga jaringan tidak terpulas dengan baik (Sumanto, 2014).

### 2.3 *Processing Jaringan*

Dehidrasi adalah proses yang bertujuan untuk menghilangkan kandungan air yang terdapat di dalam jaringan. Jaringan yang sudah difiksasi menyebabkan bersifat akuosa karena larutan fiksatif memiliki kelarutan dalam air yang akan mengganggu proses penjernihan. Prinsip penghilangan air dilakukan perlahan supaya jaringan tidak mengkerut akibat kehilangan air secara mendadak. Kandungan air dalam jaringan harus diganti dengan larutan lain yang nantinya dapat menyatu dengan larutan *clearing* (Sumanto, 2014).

*Clearing* adalah tahapan yang bertujuan untuk menjernihkan jaringan dari berbagai komponen biokimia yang dapat mengganggu pewarnaan sediaan. Larutan *clearing* yang biasa digunakan pada proses histoteknik adalah *xylol*. Sifat larutan *xylol* yang sangat menolak air dapat dijadikan kontrol keberhasilan proses dehidrasi. Apabila pada langkah awal larutan *clearing* menjadi keruh maka menandakan proses dehidrasi belum sempurna dan jaringan masih mengandung air (Sumanto, 2014). Tahap selanjutnya adalah penanaman jaringan. Bahan yang digunakan adalah parafin yang memiliki titik lebur 60°C. *Xylol* yang semula mengisi jaringan akan menguap akibat suhu inkubator yang lebih tinggi (Sumanto, 2014).

Setelah penanaman jaringan tahap selanjutnya adalah pengeblokan. Pengeblokan membutuhkan parafin padat yang dicairkan dan sebuah cetakan. Jaringan yang sudah terblok kemudian dipotong menggunakan mikrotom. Pemotongan blok jaringan yang baik akan menghasilkan pita potongan jaringan yang panjang. Potongan jaringan tersebut lalu dibuat sediaan (*afixing*). *Afixing*

adalah proses menempelkan potongan jaringan pada kaca objek untuk kemudian dilakukan pewarnaan (Sumanto, 2014).

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat diamati dengan mikroskop. 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 yang berasal dari 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 (Jusuf, 2009).

Pewarna yang sering digunakan secara rutin adalah pewarnaan yang dapat digunakan untuk memulas inti dan sitoplasma serta jaringan penyambungannya yaitu HE. Pewarnaan HE menggunakan 2 macam zat warna yaitu hematoxilin yang berfungsi untuk mewarnai inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoxilin yang digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan. Jenis hematoxilin yang sering dipakai adalah *mayer*, *delafied*, *Erlich*, *Bullard* dan *Bohmer*, sedangkan *counterstaining* yang dipakai adalah eosin, safranin, dan *phloxine* (Jusuf, 2009).

Larutan eosin yang digunakan terdiri atas larutan stok (*stock solution*) dan larutan kerja (*working solution*). Pewarna rutin yang banyak dipakai adalah pewarna hematoxilin-eosin. Kelebihan pulasan tersebut adalah diferensiasi warna sangat jelas, mewarnai inti sel dengan baik dan jelas dengan *background* yang

tidak bewarna, hasil konsisten, dan prosedurnya sederhana. Sediaan yang telah diwarnai dapat diawetkan untuk jangka waktu yang lama apabila dilakukan penutupan secara permanen. Penutupan dilakukan dengan meneteskan kanada balsam sebagai perekat kemudian menutupnya dengan kaca penutup (Jusuf, 2009).

## 2.4 Jantung

Jantung adalah organ berotot yang berkontraksi secara ritmik dan berfungsi memompa darah melalui sistem sirkulasi. Dinding jantung terdiri atas tiga tunika yaitu bagian dalam (endokardium), bagian tengah (miokardium) dan bagian luar (perikardium). Endokardium bersifat homolog dengan intima pembuluh darah. Terdiri atas selapis sel endotel gepeng yang berada di atas subendotel. Miokardium dan subendotel dihubungkan dengan lapisan subendokardium yang mengandung vena, saraf, dan cabang – cabang dari sistem penghantar impuls jantung yang disebut sel – sel purkinje. Miokardium adalah tunika yang paling tebal dan terdiri atas sel – sel otot jantung. Sedangkan perikardium adalah lapisan luar yang terdiri atas membran serosa (Junqueira, 2010).

Otot jantung tersusun atas lapisan yang mengelilingi bilik jantung dalam bentuk pilinan yang rumit. Sel otot jantung dewasa bergaris tengah kurang lebih 15  $\mu\text{m}$  dengan panjang 85-100  $\mu\text{m}$ . Sel jantung memperlihatkan pola garis melintang yang identik dengan pola otot rangka. Perbedaan otot jantung dengan otot rangka adalah otot rangka yang memiliki banyak inti, sedangkan otot jantung hanya memiliki satu atau dua inti pucat yang terletak di tengah. Otot jantung

mempunyai selubung halus jaringan ikat endomisium yang mengandung jalinan kapiler halus (Junqueira, 2010). Otot jantung memiliki ciri unik yaitu adanya garis gelap melintang yang melewati deretan sel – sel jantung dengan interval yang tidak teratur yang disebut diskus interkalaris. Diskus interkalaris adalah kompleks pertautan yang terdapat pada pertemuan otot – otot jantung yang bersebelahan (Junqueira, 2010). Menurut Lubis (2006) kandungan air pada jantung adalah 79 %, hal ini menjadi kekhawatiran akan terjadi pengurangan molekul air pada saat *processing* jaringan terutama pada tahap fiksasi sehingga menyebabkan jaringan cepat rusak.



Gambar 1. Mikroskopis Sediaan Jantung (Eroschenko, 1994)

## 2.5 Kerangka Teori

