

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

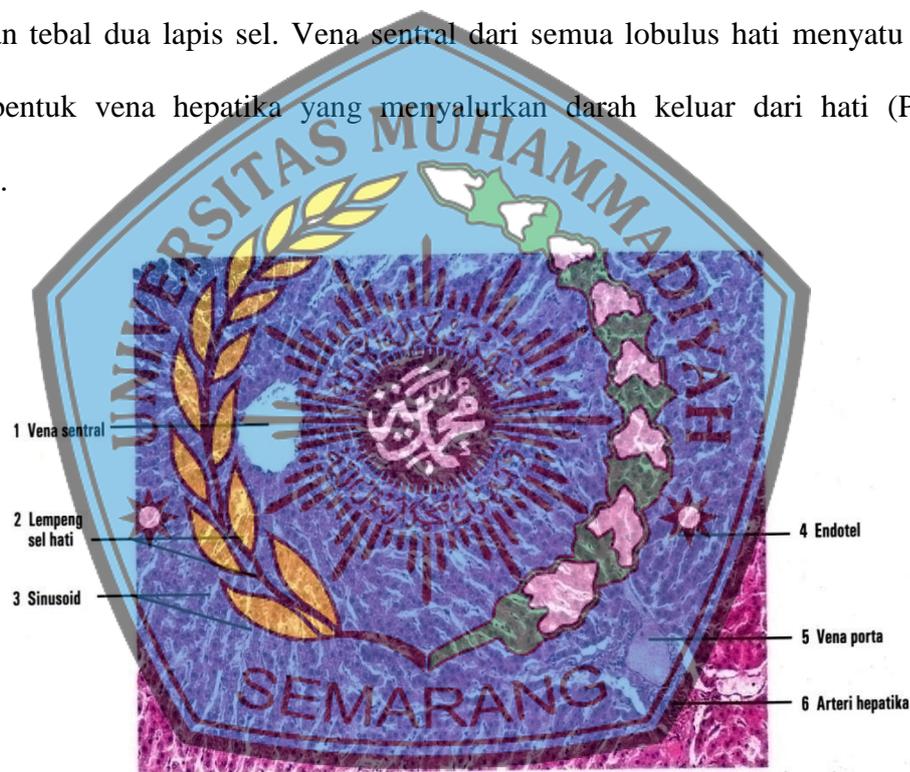
2.1 Hati

Hati adalah salah satu organ terbesar dalam rongga perut. Hati berwarna coklat kemerahan, bertekstur lunak, lentur, dan terletak tepat di bawah diafragma yaitu di dalam rongga abdomen (Snell, 2006). Hati merupakan organ yang memiliki berbagai macam aktivitas metabolisme (Salasia dan Hariono, 2010). Fungsi hati antara lain mengubah zat makanan yang diabsorpsi dari usus dan yang disimpan dalam tubuh, mengubah zat buangan dan bahan racun untuk di ekskresi dalam empedu dan urin. Hati juga merupakan tempat metabolisme karbohidrat, lemak, protein serta sebagai tempat untuk penyimpanan vitamin A, D, E, K, vitamin B12 dan berbagai macam mineral seperti tembaga dan besi (Guyton & Hall, 2008).

Unsur lain yang terdapat pada hati selain tembaga dan besi adalah air, lemak, karbohidrat, asam nikotinat, kalsium, dan sulfat. Kadar air yang terdapat pada hati sebesar 70%, darah 25% dan lemak 5% (Lu, 1995; Burt & Day, 2002; Kujovich, 2005; Maigoda, 2016). Hati tersusun menjadi unit-unit fungsional yang dikenal sebagai lobus. Hati terbagi menjadi empat lobus yaitu lobus kiri, lobus median, lobus kanan, dan lobus *caudatus* (Boorman, 2006). Sel-sel yang terdapat di hati antara lain sel hepatosit, sel endotel, sel makrofag yang disebut sebagai sel kuppfer, dan sel perisinusoidal. Sel hepatosit berderet di dalam lobulus hati dan membentuk lapisan sebesar 1-2 sel serupa dengan susunan bata. Lempeng sel ini mengarah dari tepian lobulus ke pusatnya dan membentuk struktur seperti labirin

dan busa. Celah diantara lempeng-lempeng ini mengandung kapiler yang disebut sinusoid hati (Junquiera, *et. al.*, 2007).

Sinusoid terdapat diantara barisan sel-sel hati ke vena sentral seperti jari – jari pada ban sepeda. Sel-sel kupffer melapisi bagian dalam sinusoid dan menghancurkan sel darah merah yang tidak digunakan dan bakteri yang mengalir bersama darah. Hepatosit tersusun di antara sinusoid-sinusoid dalam lempeng dengan tebal dua lapis sel. Vena sentral dari semua lobulus hati menyatu untuk membentuk vena hepatica yang menyalurkan darah keluar dari hati (Pendit, 2001).



Gambar 1. Mikroskopik Sediaan Jaringan Hati (*Hepar*) dengan perbesaran 100x hati manusia (Eroschenko, 2010).

2.2 Histoteknik

Histoteknik adalah proses pembuatan sediaan histologi dari spesimen tertentu melalui rangkaian proses tahapan sehingga menjadi sediaan yang dapat diamati dan dianalisis menggunakan mikroskop. Spesimen dapat diperoleh dari manusia maupun hewan (Putra, 2012). Proses jaringan histoteknik sangat

berpengaruh pada hasil diagnosis dan hasil akhir kualitas sediaan jaringan. Pemindahan sampel jaringan dari tubuh dapat menyebabkan terjadinya proses fisik dan kimia seperti terjadi perubahan struktur bentuk atau ukuran pada jaringan sehingga perlu adanya perlakuan supaya morfologi jaringan seperti dalam keadaan jaringan masih hidup dengan tujuan kualitas sediaan sesuai dengan gambaran yang sebenarnya (Suvarna, 2013).

Terdapat beberapa proses tahapan yang dibutuhkan dalam pembuatan sediaan histologi, antara lain isolasi jaringan, fiksasi, dehidrasi, penjernihan (*clearing*), infiltrasi parafin (*impregnasi-embedding*), penanaman (*blocking*), pemotongan (*cutting*), dan perekatan, pewarnaan (*staining*) dan pembacaan sediaan. Isolasi organ jaringan adalah metode untuk mengambil jaringan sebagai bahan penelitian yang diinginkan. Isolasi jaringan dapat dilakukan dengan cara anestesi. Anestesi yang umum digunakan adalah anestesi inhalasi. Anestesi inhalasi memiliki efek yang kuat untuk menghilangkan kesadaran dari hewan coba dan lebih aman terutama untuk prosedur pembedahan serta dapat dilakukan dengan proses yang cepat. Bahan umum yang digunakan untuk anestesi adalah *ether*. *Ether* merupakan salah satu bahan yang murah dan mudah untuk diperoleh. *Ether* merupakan cairan yang tidak berwarna, berbau tajam, memiliki titik didih 35°C dan mudah terbakar. *Ether* memiliki sifat analgesik dan anestetik. Selama anestesi *ether* meningkatkan produksi katekolamin oleh kelenjar adrenal sehingga denyut jantung meningkat (Sayuti, 2004).

Cara untuk melakukan anestesi cukup mudah yaitu dengan memasukan kapas yang telah diberi *ether* dan hewan percobaan ke dalam kotak yang tertutup.

Tunggu beberapa menit hewan coba dikeluarkan dari kotak tersebut dan tekan bagian pergelangan tangannya. Jika hewan coba masih merespon dengan gerakan, berarti hewan coba masih dalam keadaan sadar. Setelah dipastikan hewan coba tidak sadar, maka dapat dilakukan pembedahan dan pengambilan organ jaringan yang diinginkan untuk penelitian (Isbagio, 1992).

Fiksasi adalah proses agar jaringan yang telah diambil tidak mengalami autolisis atau pembusukan sehingga dapat memberikan gambaran tentang bentuk, susunan sel, inti sel dan sitoplasma, susunan serat jaringan ikat, otot dan lain sebagainya sesuai dengan gambaran jaringan pada kondisi masih hidup. Fiksasi dilakukan dengan cara merendam jaringan ke dalam zat-zat kimia yang berfungsi sebagai bahan pengawet agar terhindar dari enzim-enzim yang dapat menyebabkan autolisis atau bakteri (Muntha, 2001). Fiksasi sebaiknya dikerjakan segera mungkin setelah pengambilan jaringan agar tidak terjadi proses pembusukan dan autolisis. Autolisis adalah proses kerusakan jaringan tubuh yang disebabkan enzim-enzim proteolitik yang terdapat pada sel atau jaringan. Proses proteolitik ini akan lebih cepat terjadi pada suhu tropik. Apabila keadaan tidak memungkinkan jaringan dapat disimpan sementara dengan dibekukan dalam ruang bersuhu -20°C . Fiksasi juga bertujuan untuk mengeraskan jaringan terutama jaringan lunak sehingga memudahkan dalam proses pembedahan blok parafin (Suryono, 2016).

Larutan yang digunakan pada proses fiksasi antara lain larutan bouin, larutan zenker, larutan *helly*, larutan *carney*, larutan orth dan larutan NBF 10%. Larutan fiksasi NBF 10% merupakan salah satu larutan fiksasi rutin yang

digunakan dalam pembuatan sediaan histologi. Larutan NBF 10% sebagai larutan fiksasi secara umum membutuhkan waktu 24 jam setelah jaringan dinekropsi. Larutan fiksasi NBF 10% memiliki kelebihan seperti daya penetrasi yang cepat, pH mendekati normal, dapat disimpan dalam jumlah besar dan waktu yang lama serta mudah didapatkan. Konsentrasi larutan fiksatif yang dibutuhkan untuk pembuatan sediaan histologi adalah 10%. Larutan fiksasi NBF 10% merupakan larutan fiksatif yang dibuat dengan menggunakan formalin 4% dan aquadest sebagai bahan campuran atau pengenceran. Formalin yang memiliki konsentrasi tinggi dapat mengendapkan protein dan memberikan hasil yang kurang baik pada kualitas sediaan histologi. Salah satu sifat NBF 10% adalah mudah teroksidasi menjadi asam format yang bersifat asam. Oleh karena itu perlu adanya perlakuan khusus untuk mencegah terjadinya pembentukan asam tersebut dengan menyimpan BNF 10% di tempat yang berwarna gelap dan tertutup rapat atau pada dasar botol yang diletakkan sejumlah bubuk kalsium karbonat untuk menetralkan terbentuknya asam format yang dapat mengubah pH pada larutan fiksatif (Levy, 1934 ; Galang, 2015).

Alkohol adalah istilah yang umum untuk senyawa organik yang memiliki gugus hidroksil (OH) yang terikat pada atom karbon, atom hidrogen dan atom yang lainnya. Golongan yang paling sederhana adalah metanol dan etanol (Pujaatmaka, 1982). Alkohol diperkenalkan sebagai bahan pengawet oleh Robert Boyle pada tahun 1663. Alkohol adalah suatu cairan yang tidak berwarna dan dapat bercampur dengan air. Alkohol memiliki beberapa kelebihan seperti daya penetrasi terhadap jaringan cepat, mudah untuk diperoleh karena alkohol banyak

beredar pada toko obat dan swalayan yang dijual dengan harga terjangkau dibandingkan dengan larutan fiksasi yang lainnya. Keuntungan lain menggunakan alkohol sebagai larutan fiksasi adalah jaringan tidak perlu dicuci secara khusus dan dapat dibawa langsung pada proses selanjutnya sehingga tidak memerlukan waktu yang lama pada proses fiksasi (Suntoro, *et. al.*, 1983).

Alkohol yang digunakan sebagai larutan fiksasi dalam pembuatan sediaan histologi lebih baik menggunakan alkohol dengan konsentrasi rendah agar tidak merusak komponen protein dalam sel. Konsentrasi alkohol yang biasa digunakan untuk fiksasi berkisar 70%. Kelebihan lain dari alkohol yaitu dapat melarutkan lemak sehingga lebih mudah pada saat proses selanjutnya (Luna, 2000). Dehidrasi adalah proses yang dilakukan setelah proses fiksasi, dengan tujuan untuk menarik molekul air dari dalam suatu jaringan. Setiap sel dalam jaringan hidup mengandung air kira-kira 85% dari sitoplasmanya. Jaringan yang akan diproses dengan parafin harus didehidrasi terlebih dahulu untuk menarik molekul air yang terdapat dalam jaringan, karena parafin tidak dapat bercampur dengan air. Proses dehidrasi ini sangat menentukan bagus atau tidaknya kualitas sediaan histologi. Proses dehidrasi yang tidak sempurna menandakan molekul air masih tertinggal dan parafin tidak dapat menembus jaringan tersebut, akibatnya akan diperoleh irisan jaringan yang sulit dipotong dan tidak sesuai seperti yang diharapkan (Prahamarendra, 2015).

Larutan yang digunakan untuk dehidrasi antara lain, alkohol, *dioxane*, *acetone*, dan lain sebagainya. Alkohol adalah larutan yang umum digunakan pada proses dehidrasi yang dilakukan secara perlahan-lahan menggunakan alkohol

dengan konsentrasi bertingkat, dimulai dengan alkohol yang memiliki konsentrasi rendah sampai dengan alkohol konsentrasi tinggi. Menurut Masson (1928) dehidrasi akan diperoleh hasil yang baik apabila dimulai dari alkohol 95%, apabila ragu-ragu dapat dimulai dengan alkohol yang memiliki konsentrasi 80%. Waktu yang dibutuhkan pada proses dehidrasi bergantung dari konsentrasi larutan yang digunakan. Dehidrasi yang dilakukan dengan waktu yang lama khususnya alkohol dengan tingkat konsentrasi tinggi seperti, alkohol absolut dapat membuat jaringan menjadi keras (Rosalia, 2013).

Proses penjernihan (*clearing*) adalah untuk membuat jaringan menjadi jernih dan transparan agar lebih mudah diidentifikasi pada mikroskop. Waktu yang dibutuhkan pada proses ini tergantung dari tebal atau besarnya jaringan dan larutan penjernih yang digunakan. Larutan penjernih yang digunakan di laboratorium antara lain, *xylol* atau *xylene*, toluol atau *toluene*, minyak cedar, *chloroform*, minyak cengkeh, minyak anilin, dan *n-butyl alcohol*. Setiap larutan penjernih memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Kelebihannya *xylol* tidak memerlukan waktu yang lama, mudah diperoleh dan harganya tidak terlalu mahal. Kekurangan dari larutan *xylol* adalah jaringan yang dipindahkan pada larutan ini hanya dari alkohol absolut sehingga hasilnya tidak transparan dan sulit menentukan apakah proses penjernihan sudah sempurna. Penjernihan dengan waktu yang lama menggunakan *xylol* juga akan menyebabkan jaringan mudah rapuh, sangat mengkerut dan sulit untuk dipotong (Sumanto, 2014).

Toluol atau *toluene* lebih banyak digunakan untuk *clearing* di laboratorium karena harganya murah, mudah diperoleh, proses cepat dan jaringan

akan menjadi jernih atau transparan. Apabila jaringan yang ditinggal lama dalam larutan ini tidak juga transparan menandakan bahwa proses dehidrasi tidak sempurna dan jaringan akan menjadi keras dan sulit untuk dipotong. Penjernihan menggunakan toluel jaringan yang dipindahkan hanya dapat dari alkohol absolut. Minyak cedar memiliki sedikit kebaikan dan dapat menyebabkan jaringan mengkerut. Jaringan yang direndam dengan larutan penjernih ini dapat menjernihkan jaringan dari alkohol 95% akan tetapi memerlukan waktu yang relatif lama. *Chloroform* memiliki kelebihan menyebabkan sedikit pengerutan dan dapat digunakan untuk jaringan-jaringan yang berukuran besar. Larutan *chloroform* ini sangat mahal dan sulit dipindahkan ke parafin. Minyak cengkeh dan minyak anilin memiliki kelebihan dan kekurangan seperti *chloroform*. Larutan penjernih *n-Butyl alcohol* sangat baik untuk jaringan yang keras dan padat serta mudah saat dipindahkan ke proses penanaman pada parafin, kekurangannya yaitu membutuhkan waktu proses yang lama (Suntoro *et. al.*, 1983).

Infiltrasi parafin bertujuan untuk memasukkan parafin ke dalam pori-pori jaringan sehingga memudahkan dalam proses pemotongan blok parafin (Suryono, 2016). Jaringan dalam proses infiltrasi parafin sebaiknya tidak dimasukkan langsung dari zat penjernih ke parafin murni, tetapi sebelum parafin murni jaringan dimasukkan dulu ke dalam campuran larutan penjernih-parafin murni dengan volume dalam perbandingan yang sama. Waktu yang diperlukan oleh suatu jaringan di dalam campuran larutan penjernih parafin, tidak perlu terlalu lama cukup berkisar antara 10 - 30 menit tergantung besar kecilnya jaringan. Setelah waktu infiltrasi parafin dianggap cukup selanjutnya jaringan dimasukkan

ke dalam parafin murni I selama 30 – 60 menit, kemudian parafin murni II selama 30 – 60 menit dan yang terakhir parafin murni III 30 – 60 menit. Proses infiltrasi parafin dimaksudkan agar jaringan benar-benar terendam parafin yang murni. Tingkatan perendaman pada parafin ini dapat mencegah adanya zat penjernih di dalam jaringan, karena akan melunakkan jaringan dan membuat jaringan sulit dipotong (Rosalia, 2013).

Blocking adalah proses penanaman jaringan atau pembuatan blok parafin. Jaringan dimasukkan ke dalam cetakan yang telah diisi parafin cair. Penekanan cetakan ke arah dasar akan menyebabkan sampel menempel pada dasar cetakan, kemudian menutup cetakan dengan kaset (Suryono, 2016). Jaringan dapat diletakkan ke dalam cetakan yang berisi parafin menggunakan pinset. Blok parafin tidak boleh muncul adanya gelembung udara (Prahanarendra, 2015). Parafin yang digunakan untuk menanam jaringan harus memiliki titik cair yang sama dengan parafin yang digunakan untuk infiltrasi parafin (Sugiyono, 2011)

Cutting merupakan proses pemotongan blok parafin yang berisi jaringan, alat yang digunakan yaitu mikrotom sehingga menjadi lembaran-lembaran pita jaringan yang saling bergandengan atau saling menyambung satu sama lain. Hasil pemotongan blok parafin dimasukkan ke dalam *waterbath* yang berisi air dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya pita jaringan diambil menggunakan *object glass* dengan tujuan merekatkan jaringan pada *object glass* agar tidak lepas pada tahap pengecatan (Prasetyani, 2016).

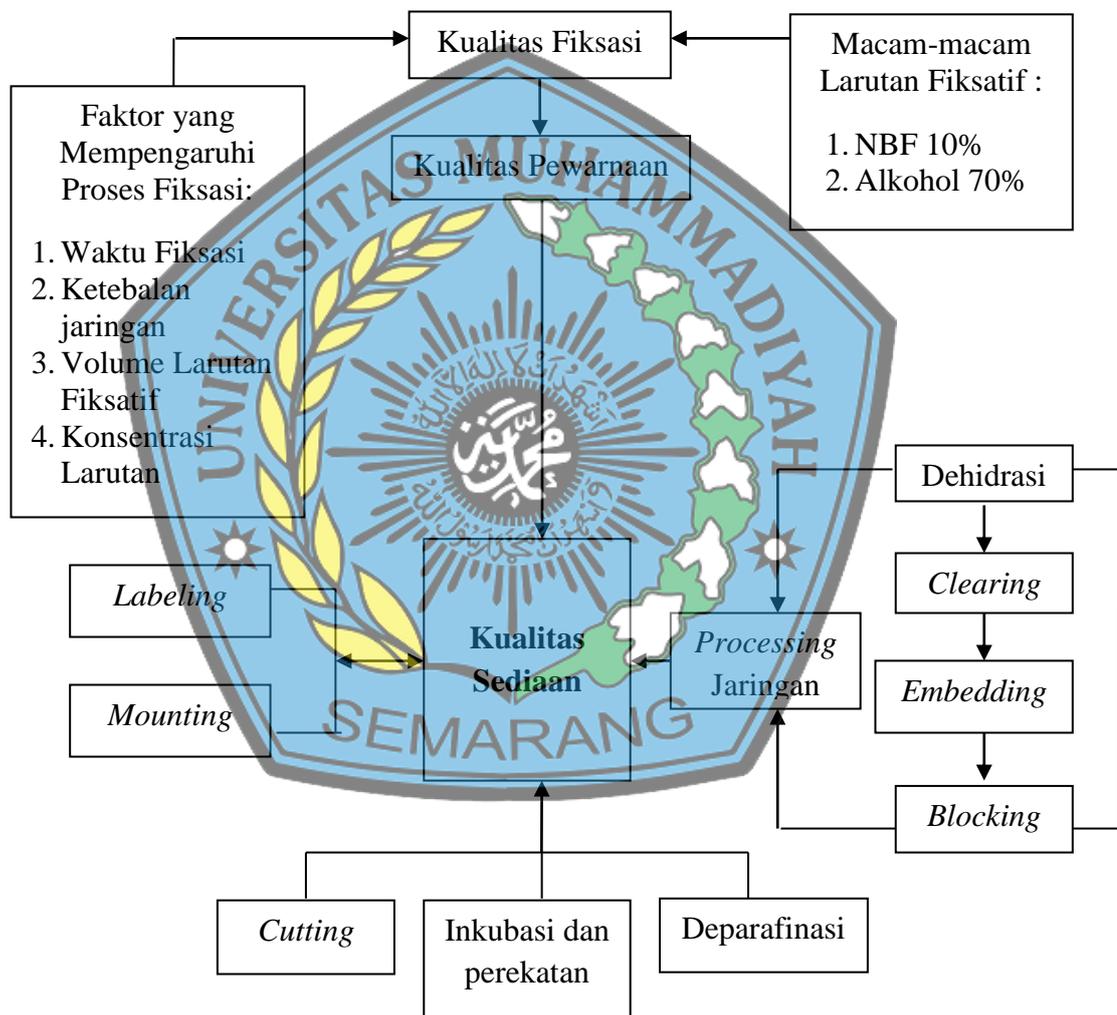
Inkubasi adalah tahapan untuk menguapkan air yang terdapat pada sediaan pada saat pengambilan lembaran pita jaringan hasil potongan dari *waterbath*,

sehingga jaringan menempel lebih kuat pada *object glass* (Prasetyani, 2016). Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong dan menempel pada *object glass* sehingga jaringan histologi menjadi kontras dan mudah untuk diamati menggunakan mikroskop. Pewarnaan yang rutin digunakan pada proses histoteknik adalah pewarnaan HE (Hematoksilin-Eosin) (Sumarno, 2012). Zat warna memiliki kemampuan dalam mewarnai jaringan sesuai dengan sifat-sifatnya. Hematoksilin merupakan pewarna yang bersifat basa sehingga hematoksilin dapat mewarnai unsur basofilik jaringan. Eosin bersifat asam dan dapat mewarnai komponen jaringan seperti mitokondria, granula sekretoris dan kolagen sehingga Hematoksilin akan mewarnai nukleus sedangkan eosin akan mewarnai sitoplasma (Afrida, *et. al.*, 2011).

Pewarnaan HE memiliki beberapa tahapan yaitu, deparafinisasi, rehidrasi, pewarnaan I, diferensiasi, *blueing*, pewarnaan II, dehidrasi, dan mounting. Deparafinisasi adalah tahapan yang bertujuan untuk menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan. Rehidrasi adalah memasukkan larutan alkohol absolut, 90% dan 80% ke dalam rongga-rongga jaringan. Pewarnaan I merupakan pewarnaan menggunakan hematoksilin dengan tujuan memberi warna pada inti dan sitoplasma pada jaringan. Diferensiasi adalah tahapan untuk mengurangi warna biru pada inti dan menghilangkan warna biru pada sitoplasma. *Blueing* berguna untuk memperjelas warna biru pada inti sel. Tahapan selanjutnya pewarnaan II untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel. Dehidrasi merupakan tahapan untuk menghilangkan air dari jaringan dan mounting adalah untuk mengawetkan jaringan yang telah diwarnai (Sumanto, 2015).

Pembacaan adalah proses akhir dari proses histoteknik. Pembacaan hasil kualitas sediaan menggunakan mikroskop dengan perbesaran lapang pandang 10 kali dan 40 kali lensa obyektif. Pembacaan tersebut bertujuan untuk melakukan pengamatan dan analisis terhadap warna dan struktur bentuk dari sel dan jaringan.

2.3 Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori