

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Buffered Neutral Formalin (BNF) 10%

*Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% biasa disingkat menjadi BNF, Telah menjadi fiksatif standar untuk digunakan dalam pengaturan diagnostik. Ini lebih efektif dari pada campuran formalin sederhana seperti garam fosfat yang hadir membuatnya tidak mungkin bahwa eritrosit akan rusak, dan pH netral menghambat pigmen formalin. Fosfat akan menyesuaikan pH sekitar 7,0 sebagai netral tetapi tidak perlu menyesuaikannya ketinggian ini jika sedikit berbeda.

Meskipun pembentukan pigmen formalin dihambat tidak berhenti sama sekali, dan dapat perlahan-lahan terbentuk di jaringan yang sangat berdarah, atau dalam jaringan yang disimpan untuk waktu yang lama di BNF 10% tanpa itu berubah. BNF berguna sebagai fiksatif untuk spesimen museum dan fotografi karena memungkinkan pemulihan warna alami pada spesimen. Waktu fiksasi ini harus diterapkan semalaman semaksimal mungkin, tetapi tidak lengkap sampai diterapkan selama beberapa hari, dan satu dua minggu tidak terlalu lama. Untuk fiksasi menyeluruh, protein di jaringan perlu diikat silang, tetapi sudah diketahui bahwa campuran formalin sederhana dapat mengubah jaringan dengan baik sebelum mengikat protein. Oleh karena itu pengamatan visual tidak memberikan indikasi apapun mengenai tingkat fiksasi, dan perubahan warna tidak boleh digunakan sebagai indikator bahwa itu sudah lengkap.

Sangat penting bahwa waktu dalam catatan fiksasi, dan waktu yang cukup diperbolehkan untuk reaksi kimia terjadi, waktu yang diukur dalam beberapa jam tidak memadai, dan kurang ikatan silang dalam jaringan yang diperlukan untuk waktu yang singkat tidak akan memberikan perlindungan yang memadai terhadap jaringan efek fiksasi etanol dehidrasi. Potong-potongan jaringan yang lebih kecil tidak bisa diperbaiki dengan lebih cepat dari pada potongan yang lebih besar. Biopsi jarum harus membutuhkan waktu yang sama dengan irisan 3 mm dari organ padat.

*Buffered Neutral Formalin (BNF) 10%* mengandung garam yang memiliki kelarutan terbatas dalam konsentrasi tinggi etanol. Untuk alasan itu jaringan harus ditranfer kedalam dehidrasi yang mengandung etanol 60% atau kurang, untuk waktu yang singkat untuk memberi garam kesempatan untuk dihapus. Jika ditranfer langsung ke 95% atau etanol absolut, fosfat kemungkinan besar akan mengendap di jaringan, menyebabkan kesulitan dalam membagi, seperti merobek dan mencetak. Mesin pengolah harus dibilas secara berkala dengan air untuk menghilangkan garam yang berakumulasi.

## **2.2 Hati**

Hati adalah organ viseral terbesar dan terletak dibawah kerangka iga. Hati memproduksi empedu yang berperan dalam emulsifikasi dan absorpsi lemak, hati dibungkus oleh suatu simpai tipis jaringan ikat yang menebal di hilus, tempat vena porta. Hepatica memasuki organ dan keluaranya duktus hepatica kiri dan kanan serta pembuluh limfe dari hati. Pembulu-pembulu dan duklus ini dikelilingi

jaringan ikat di sepanjang perjalanannya ke bagian ujung di dalam celah portal di antara lobules hati.

Hati terdiri atas satu jenis sel parenkim yaitu hepatosit. Hepatosit adalah sel polihidral yang besar dengan diameter 20-30 mikron. Didalam sel terdapat 1 atau 2 inti berbentuk bulat dan terdapat organel-organel sel seperti retikulum endoplasma, mitokondria, badan golgi, dan benda-benda inklusi seperti lemak glikogen. Pada organ ini, terdapat sel-sel parenkim hati yang merupakan sel-sel epitel kubus tersusun dalam lempeng dan tali-tali yang saling beranastomosis. Sel-sel parenkim hati merupakan struktur yang kompleks yang mempunyai peran penting dalam berbagai fungsi hati. Secara histologi sejumlah mikrovili pada permukaan sel-sel parenkim hati menonjol ke dalam celah disse, dan terkadang serat kolagen dan serat retikulin dapat ditemukan celah disse yang merupakan celah antara sel-sel epitel sinusoid dan sel-sel parenkim.

### **2.3 Ginjal**

Ginjal adalah organ yang mempunyai peran penting dalam tubuh untuk membuang sampah metabolisme dan racun tubuh dalam bentuk urin/air seni. Setelah itu ginjal juga berperan dalam mempertahankan keseimbangan air, garam dan elektrolit serta, tidak kalah pentingnya ginjal merupakan kelenjar endokrin yang sedikitnya mengeluarkan tiga hormone. Ginjal merupakan organ tubuh yang rentan terhadap pengaruh zat-zat kimia, karena organ ini menerima 25-30% sirkulasi darah untuk dibersihkan, sehingga sebagai organ filtrasi kemungkinan terjadinya perubahan patologik sangat tinggi (Corwin, 2001)

Setiap ginjal terdiri atas 1-1,4 juta unit fungsional yang disebut dengan nefron. Ginjal dibagi menjadi korteks dan medulla, dimana didalamnya terdapat bagian nefron yang berbeda. Pada korteks terdiri dari glomerulus, kapsula bowman, tubulus kontortus, dan ansa henle segmen tebal. Sedangkan pada medulla ginjal terdiri ansa henle segmen tipis, pembuluh darah kecil (vasa rekta), dan dukus kolektivus.

#### **2.4 Fiksasi**

Fiksasi adalah usaha untuk mempertahankan komponen-komponen sel atau jaringan agar tidak mengalami perubahan dan tidak mudah rusak. Proses fiksasi ini diharapkan setiap molekul pada jaringan yang hidup tetap berada pada tempatnya dan tidak ada molekul baru yang timbul. Pada prosesnya ini tentu tidak akan berjalan dengan sempurna, apa bila timbul molekul asing baru pada jaringan disebut artefak. Tujuan fiksasi ini agar jaringan tersebut tetap utuh. Fiksasi harus dilakukan sesegera mungkin setelah pengangkatan jaringan atau setelah kematian agar tidak terjadi autolysis.

Sel dari sebuah jaringan ditentukan dari bentuk dan ukuran makromolekul yang ada di dalam sel. Makromolekul utama yang ada dalam sel adalah protein dan asam nukleat. Fiksasi merupakan bagian terpenting dari semua tehnik histologi dan sitology dengan tetap memberikan warna yang alami, Prinsip kerja dari fiksasi adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk fisiologinya. Cairan fiksasi mengubah komposisi jaringan sehingga secara kimiaw dan fisik. Secara kimiawi protein sel diubah secara fungsional dan struktur dengan cara koagulasi dan membentuk senyawa aditif baru . senyawa

tersebut terbentuk dengan cara ikatan silang dari dua makromolekul yang berbeda, yakni cairan fiksasi dan protein sel. Hal ini menyebabkan sel resisten terhadap gerakan air dan cairan-cairan lainnya. Akibatnya struktur sel menjadi stabil, baik di dalam maupun di antara sel-sel selain itu, kebanyakan enzim di dalam sel menjadi terinaktivasi, sehingga proses metabolisme sel tidak terjadi, dan mencegah adanya autolisis sel. Secara fisik merman sel yang awalnya hidrofilik dilanjutkan dengan cairan fiksasi yang menyebabkan pori-pori sel membesar, akibatnya makroolekul dapat memasuki sel. Hal ini membantu untuk tehnik setelah fiksasi, khususnya pada proses parafinisasi dan pewarnaan dimana zat-zat tersebut akan dapat masuk kedalam sel dan menempel dengan mudah.

#### **2.4.1 Tehnik Pembuatan Blok**

Metode yang digunakan pada penelitian kali ini adalah metode paraffin yaitu metode yang paling sering digunakan. Keuntungan menggunakan metode ini yaitu pertama, irisan dapat lebih tipis mencapai ketebalan rata-rata 6 mikron, kedua irisan yang sifatnya seri dapat dengan mudah dikerjakan, ketiga proses pengerjaannya lebih cepat. Proses pengolahan dengan cairan farafin dituangkan kedalam cetakan, jaringan dimasukkan kedalam cetakan yang telah diisi farafin cair, tekan jaringan agar semakin menempel di dasar cetakan. Tutup cetakan kaset diambil, letakkan diatas cetakan dan ditekan, beri label pada pinggir kaset, biarkan sampai farafin membeku, kemudian dikeluarkan dari cetakan (Leong, 2014).

Proses ini dimulai dari fiksasi , pencucian (washing), dehidrasi, penjerhan (clearing), infiltrasi paraffin, penanaman (embendding), penyayatan (section),

penempelan (affixing), deparafinisasi, pewarnaan (staining), penutupan (mounting), dan labeling.

#### **2.4.2 Dehidrasi**

Dehidrasi merupakan metode yang digunakan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan setelah dilakukan proses fiksasi sehingga nantinya dapat diisi dengan paraffin untuk membuat blok preparat. Proses dehidrasi ini menggunakan alkohol bertingkat, mulai dari alkohol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95% dan alkohol absolut. Prosesnya suatu jaringan akan dicelupkan masing-masing alkohol dengan kisaran waktu tertentu sampai proses berlangsung.

#### **2.4.3. Penjernihan (clearing)**

Penjernihan adalah metode yang digunakan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantikannya dengan suatu larutan yang berikatan dengan paraffin. Pada proses *clearing* ini sangat penting karena apabila jaringan masih tersisa alkohol walaupun sedikit, paraffin tidak akan bisa masuk kedalam jaringan sehingga jaringan nantinya tidak akan sempurna dalam pembuatan *blocking*, pemotongan dan pewarnaan proses *clearing* ini menggunakan bermacam-macam zat penjernih yaitu xylol atau xylene yang memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing.

#### **2.4.4 Penanaman (*embedding*)**

Penanaman (*embedding*) merupakan proses untuk mengeluarkan cairan pembening dari jaringan dan digantikan dengan paraffin. Tujuannya adalah untuk mempermudah dalam melakukan proses pemotongan atau pengirisan jaringan.

#### **2.4.5 Pemotongan Organ**

Proses pemotongan organ atau pengirisan jaringan dengan menggunakan pisau khusus yang biasa disebut mikrotom. Mikrotom adalah alat yang dilengkapi dengan pisau yang tajam dan dapat mengiris potongan blok dengan sangat tipis dan sesuai dengan ukuran atau ketebalan yang kita inginkan. Proses pemotongan blok paraffin dengan cara meletakkan blok paraffin pada penjepit kaset mikrotom, pisau mikrotom yang masih tajam dipasang pada tempat pisau mikrotom kemudian atur pada ketebalan 3 atau 4 mikron dengan suhu 30<sup>0</sup>c. Putar pemutar mikrotom menggunakan tangan kanan sampai jaringan terpotong menjadi lembaran tipis jaringan dengan ketebalan 3-4 mikron, kemudian lembaran jaringan diambil dan diletakkan pada waterbath dengan suhu 50<sup>0</sup>c, sampai mengembang. Lembaran jaringan diambil menggunakan objek glass (Sumarno, 2011).

#### **2.4.6 Teknik pewarnaan**

Teknik pewarnaan merupakan suatu prosedur yang digunakan dalam bidang histoteknik. Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat diamati dengan mikroskop. Zat warna yang sering digunakan dalam histoteknik adalah hematoxilin eosin.

#### **2.4.7 Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)**

Hematoksilin didapatkan dari ekstrak pohon haematoxyloncampechiamun Linnaeus yang berasal dari amerika. Sebelum diberi warna oleh hematoksilin terlebih dahulu jaringan harus dioksidasi dengan hematin. Proses ini disebut dengan pematangan. Jika menggunakan paparan oksigen proses pematangan ini berlangsung dengan cepat dapat ditambahkan senyawa kimia, seperti merkuro oksida dan sodium iodide. Saat ini hematoksilin yang dijual sudah tercampur dengan eosin untuk mempermudah pewarnaan, pada awalnya hematoksilin memberikan warna merah baik pada sel maupun jaringan, untuk melihatnya disarankan untuk menggunakan etanol 95% yang memiliki pH normal, agar jaringan dapat dilihat dengan mikroskop, hematoksilin dapat memberikan pewarnaan dengan dua metode yaitu secara progresif dan regresif. Pada metode regresif jaringan dibiarkan dalam larutan sampai beberapa waktu kemudian larutan tersebut dibuang, sedangkan pada metode progresif jaringan di celupkan kedalam larutan hematoksilin hingga intensitas yang diinginkan tercapai seperti pada potongan jaringan yang beku.

Eosin adalah pewarnaan asam yang memiliki afinitas terhadap sitoplasma sel sedangkan pada hematoksilin memiliki afinitas terhadap nucleus. Eosin penggunaan lebih aman dibandingkan dengan hematoksilin. Namun satu-satunya masalah pada eosin adalah pewarnaan berlebih terutama pada jaringan yang memiliki dekalsifikasi. Proses pewarnaan hematoksilin eosin yaitu sebagai berikut (Deparafinisasi) dengan cara preparat dimasukkan ke xylol I, II dan III masing-masing 3 menit, setelah itu dibersihkan pinggir jaringan dengan kain kasa.

(rehidrasi) preparat masuk ke alkohol 100%, 95%, 80%, 70% masing-masing 3 menit. Tahapan berikutnya, preparat dialiri air mengalir 3 menit, dilanjutkan dengan pengecatan inti sel, preparat masuk kedalam meyer hematoksin selama 15 menit setelah itu preparat dialiri dengan air mengalir selama kurang lebih 3 menit dan dilanjutkan dengan merendam alkohol 70% I selama 3 menit, alkohol 70% II selama 3 menit, alkohol 70% III selama 3 menit, tahapan berikutnya preparat dimasukkan kedalam larutan eosin selama 5 menit. Tahapan berikutnya (dehidrasi) dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol 70%, 80%, 95%, 100% masing-masing 3 menit. Dilanjutkan dengan (clearing) menggunakan xilol I, dan II masing-masing 3 menit. Tahapan berikutnya adalah (mounting) dengan cara menetesi preparat menggunakan entelan dan menutup dengan objek glass (Lee, 1991).

## 2.5 Kerangka Teori



Gambar. 1 Kerangka Teori

## 2.6 Kerangka konsep

