

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Histoteknik

Histoteknik adalah suatu metode pembuatan sediaan dari spesimen tertentu melalui suatu rangkaian proses hingga diperoleh suatu preparat histologi yang siap untuk dianalisa. Preparat histologi dapat digunakan untuk mengetahui keadaan patologis serta perubahan suatu sel atau jaringan (Juliati, 2017).

Untuk membuat suatu sediaan histologi, jaringan diambil terlebih dahulu dari sumbernya kemudian siap untuk diproses. Ada beberapa rangkaian proses dalam pembuatan sediaan histologi diantaranya adalah fiksasi, dehidrasi, penjernihan, impegnasi, blocking, pemotongan block, floating dan pewarnaan (Prasetyani, 2017).

2.2. Fiksasi

Fiksasi adalah suatu metode 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, apabila timbul molekul asing baru pada jaringannya disebut artefak. Tujuan fiksasi ini agar jaringan tersebut tetap utuh. Fiksasi harus dilakukan sesegera mungkin setelah pengangkatan jaringan atau setelah kematian agar tidak terjadi autolisis (Anil & Rajendran, 2008).

Prinsip kerja dari fiksasi adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk fisiologinya. Cairan fiksatif mengubah komposisi jaringan secara kimiawi dan fisik. Secara kimiawi, protein sel diubah secara fungsional dan struktural dengan cara koagulasi dan membentuk senyawa aditif baru. Senyawa tersebut terbentuk dengan cara ikatan silang dari dua makromolekul yang berbeda, yakni cairan fiksatif 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, membran sel yang awalnya hidrofilik, dilarutkan dengan cairan fiksatif, yang menyebabkan pori-pori sel membesar. Akibatnya, makromolekul dapat memasuki sel. Hal ini membantu untuk teknik setelah fiksasi, khususnya pada proses parafinisasi dan pewarnaan dimana zat-zat tersebut akan dapat masuk ke dalam sel dan menempel dengan mudah (Jamie et al, 2010).

Proses fiksasi yang baik harus memenuhi beberapa syarat, sebagai berikut:

1. Fiksasi dilakukan dengan penekanan yang cepat dan sejajar,
2. Fiksasi tidak menyulitkan dan murah biaya,
3. Fiksasi harus bisa menghambat pembusukan bakteri dan terjadinya autolisis,
4. Fiksasi harus memberikan perbedaan gambaran mikroskopik yang bagus,
5. Fiksasi tidak boleh menyebabkan iritasi, keracunan, dan korosif,

6. Fiksasi tidak boleh menyebabkan penyusutan, pembengkakan, atau perubahan sel lainnya,
7. Fiksasi harus bisa membuat jaringan menjadi tahan lama,
8. Fiksasi harus mendapatkan izin untuk pengembalian warna dasar sebagai objek pengambilan foto (Alwi, 2016).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi fiksasi :

1. pH

pH optimal untuk dilakukan fiksasi adalah 6-8. Jika pH diluar rentang nilai tersebut maka secara garis besar dapat menyebabkan perubahan pada struktur jaringan, menjadi rusak akibat presipitasi sel. Perubahan pH akan mempengaruhi jumlah ion sehingga akan terjadi peningkatan atau penurunan laju reaksi yang memberikan efek pada pengamatan mikroskopik.

2. Suhu

Fiksasi yang akan dilihat dengan mikroskop elektron lebih baik disimpan pada suhu 0-4°C.

3. Perubahan volume

Selama fiksasi, volume jaringan biasanya mengalami perubahan. Hal ini disebabkan oleh penghambatan respirasi intraseluler, perubahan permeabilitas, dan perubahan transport ion. Fiksasi dengan formalin yang berkepanjangan akan membuat sel menyusut. Volume sel harus dijaga dalam batas normal agar pada saat pengamatan terlihat seperti sel yang hidup. Volume cairan fiksasi 5-10x sampel.

4. Waktu

Fiksasi dilakukan selama 12-24 jam pada suhu ruangan yang berkisar 25-30°C. Waktu fiksasi tergantung dari jenis fiksatifnya.

5. Konsentrasi

Konsentrasi memberikan efek positif yaitu dengan mempercepat proses fiksasi melalui banyaknya molekul yang terbentuk.

(Alwi, 2016).

2.2.1. BNF 10%

Secara umum, yang banyak dipakai di laboratorium patologi anatomi adalah BNF 10%, yaitu campuran dari 100 ml formaldehid 40%, aquadest 900 ml, sodium dehidrogen fosfat 4 gr dan disodium hydrogen fosfat 6,5 gr, dengan pH larutan 7, larutan ini memiliki penetrasi yang baik ke jaringan serta tidak menyebabkan jaringan menjadi rapuh, prinsipnya akan mengawetkan struktur halus (*fine structures*), fosfolipida, dan beberapa enzim dengan sangat baik efek pada jaringan yang mengandung lemak tidak rusak, sehingga menyerap warna dengan baik (Juliati, 2017).

Salah satu sifat formaldehida adalah mudah teroksidasi menjadi asam format yang bersifat asam. Namun formaldehida sendiri mempunyai sifat asam dan mempunyai afinitas baik pada zat warna basa. Untuk mencegah ini terjadi formalin sebaiknya disimpan dalam botol yang tertutup rapat, atau diletakkan bubuk kalsium karbonat pada dasar botol untuk netralisasi asam format yang terbentuk. Formaldehida tidak boleh dicampur dengan asam format atau osmium teroksida (Prasetyani, 2017).

Larutan formalin memiliki kelebihan dan kekurangan. Kelebihan dari cairan fiksatif ini adalah sebagai cairan fiksatif umum, lebih murah, lebih mudah disiapkan, dan merupakan cairan stabil. Pengerutan dan kerapuhan tidak disebabkan oleh cairan fiksatif formalin. Baik untuk sel lemak, sel protein dan paling baik untuk jaringan otak. pH cairan mendekati netral, sehingga tidak terjadi interaksi dengan haemoglobin atau produknya yang dapat membentuk pigmen formalin. Potongan jaringan atau organ dapat ditinggalkan dalam cairan dalam jangka waktu yang lama. Sedangkan kerugiannya adalah potongan jaringan membutuhkan waktu paling sedikit 24 jam untuk dapat diproses ke tahap berikutnya, bersifat toksik, iritan, menyebabkan sinusitis, dan karsinogenik (Prasetyani, 2017).

2.2.2. Metanol

Metanol merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Pada keadaan atmosfer metanol berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan daripada etanol). Metanol digunakan sebagai bahan pendingin anti beku, pelarut, bahan bakar dan sebagai bahan aditif bagi etanol industri (Hermansyah, 2015).

Metanol diproduksi secara alami oleh metabolisme anaerobik oleh bakteri. Hasil proses tersebut adalah uap metanol (dalam jumlah kecil) di udara. Setelah beberapa hari, uap metanol tersebut akan teroksidasi oleh oksigen dengan bantuan sinar matahari menjadi karbon dioksida dan air. Karena sifatnya yang beracun, metanol sering digunakan sebagai bahan additif bagi pembuatan alkohol untuk penggunaan industri. Penambahan racun ini akan menghindarkan industri

dari pajak yang dapat dikenakan karena etanol merupakan bahan utama untuk minuman keras (minuman beralkohol) (Hermansyah, 2015).

Dahulu metanol juga disebut sebagai *wood alohol* karena merupakan produk samping dari distilasi kayu. Saat ini metanol dihasilkan melalui proses multi tahap. Secara singkat, gas alam dan uap air dibakar dalam tungku untuk membentuk gas hidrogen dan karbon monoksida. Kemudian, gas hidrogen dan karbon monoksida ini bereaksi dalam tekanan tinggi dengan bantuan katalis untuk menghasilkan metanol. Tahap pembentukannya adalah endotermik dan tahap sintesisnya adalah eksotermik (Hermansyah, 2015).

Penggunaan methanol sering sebagai pelarut dan sebagai antibeku, dan larutan fiksatif. Methanol sebagai pelarut karena memiliki kemampuan yang baik dalam menarik berbagai senyawa polar maupun nonpolar (Herlina, 2008). Hal lain yang menjadi alasan dalam penggunaannya sebagai pelarut adalah harganya yang cukup murah dibandingkan dengan pelarut lain seperti etanol atau aseton (Hermansyah, 2015).

2.3. Tahap processing jaringan

2.3.1. Dehidrasi

Setelah proses fiksasi selesai selanjutnya adalah proses dehidrasi. Dehidrasi merupakan metode yang digunakan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan setelah dilakukan proses fiksasi sehingga nantinya dapat diisi dengan parafin untuk membuat blok preparat (Jusuf, 2009).

2.3.2. Penjernihan (*clearing*)

Penjernihan adalah adalah suatu tahap untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin (Juliati, 2017).

2.3.3. Impregnasi

Impregnasi adalah proses mengeluarkan cairan pembening (xylol) dari dalam jaringan untuk digantikan dengan paraffin. Pada tahap impregnasi, jaringan harus benar-benar bebas dari xylol karena sisa cairan pembening dapat mengkristal dan pada saat dilakukan proses pemotongan blok, jaringan akan menjadi mudah robek (Prasetyani, 2017).

2.3.4. Blocking

Pengeblokan (*embedding*) adalah proses pembuatan blok preparat. Dengan menanamkan atau memasukkan jaringan kedalam cetakan untuk memudahkan proses penyayatan dengan mikrotom. Cetakan yang digunakan adalah base mould, yaitu cetakan yang terbuat dari logam yang tidak berkarat. Tujuan dari proses ini untuk membuat blok paraffin menjadi preparat permanen (Juliati, 2017).

2.3.5. Pemotongan blok dengan mikrotom (*Sectioning*)

Pemotongan (*Sectioning*) adalah proses pemotongan blok preparat dengan menggunakan mikrotom. *Sectioning* bertujuan untuk mendapatkan sediaan jaringan yang tipis, rata serta tidak melipat ataupun terputus saat diletakkan pada gelas obyek (Jusuf, 2013).

2.3.6. Floating

Floating dilakukan dengan memasukkan obyek glass ke dalam waterbath lalu digerakkan ke arah pita paraffin yang akan direkatkan pada obyek glass. Tujuan floating adalah untuk merekatkan pita paraffin pada kaca obyek dengan cara memasukkan kedalam water bath suhu 60°C (Juliati, 2017).

2.3.7. Pewarnaan HE (*Hematoxilyn-Eosin*)

Hematoxilyn didapatkan dari ekstrak pohon *Haematoxylon campechianum Linnaeus* yang berasal dari Amerika. Sebelum diberi warna oleh *hematoxilyn* terlebih dahulu jaringan harus dioksidasi dengan hematin, proses ini disebut dengan pematangan. Jika menggunakan paparan oksigen proses pematangan ini berlangsung spontan namun lama. Tetapi untuk proses pematangan yang berlangsung dengan cepat dapat ditambahkan senyawa kimia, seperti merkuri oksida dan sodium iodide (Jamie et al, 2010).

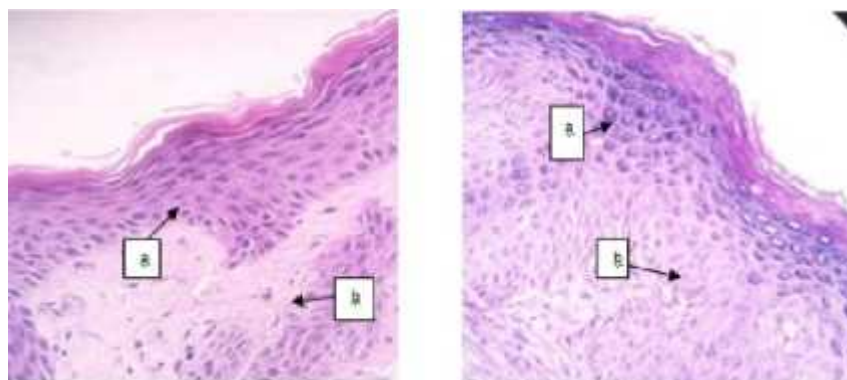
Saat ini *hematoxilyn* yang dijual sudah dicampur dengan *eosin* untuk mempermudah pewarnaan. Pada awalnya *hematoxilyn* memberikan warna merah baik pada sel maupun jaringan, untuk melihatnya disarankan untuk menggunakan etanol 95% yang memiliki pH normal, agar jaringan dapat dilihat dengan mikroskop. *Hematoxilyn* 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 ke dalam larutan hematoksin hingga intensitas yang diinginkan tercapai seperti pada potongan jaringan yang beku (Anil & Rajendran, 2008).

Eosin adalah pewarna asam yang memiliki afinitas terhadap sitoplasma sel sedangkan pada *hematoxilyn* memiliki afinitas terhadap nukleus. *Eosin* penggunaannya lebih aman dibandingkan dengan *hematoxilyn* (Anil & Rajendran, 2008).

Pewarnaan merupakan salah satu prosedur yang ada didalam bidang histoteknik. Pewarnaan merupakan proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong agar jaringan mudah dikenali pada saat pengamatan dengan menggunakan mikroskop. HE (*Hematoxilyn-Eosin*) merupakan zat warna yang sering digunakan dalam pewarnaan histoteknik (Jamie et al, 2010).

Hematoxilyn berfungsi untuk memberikan warna biru (basofilik) pada inti sel, serta *eosin* yang berfungsi untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma sel dan jaringan penyambung (Juliati, 2017).



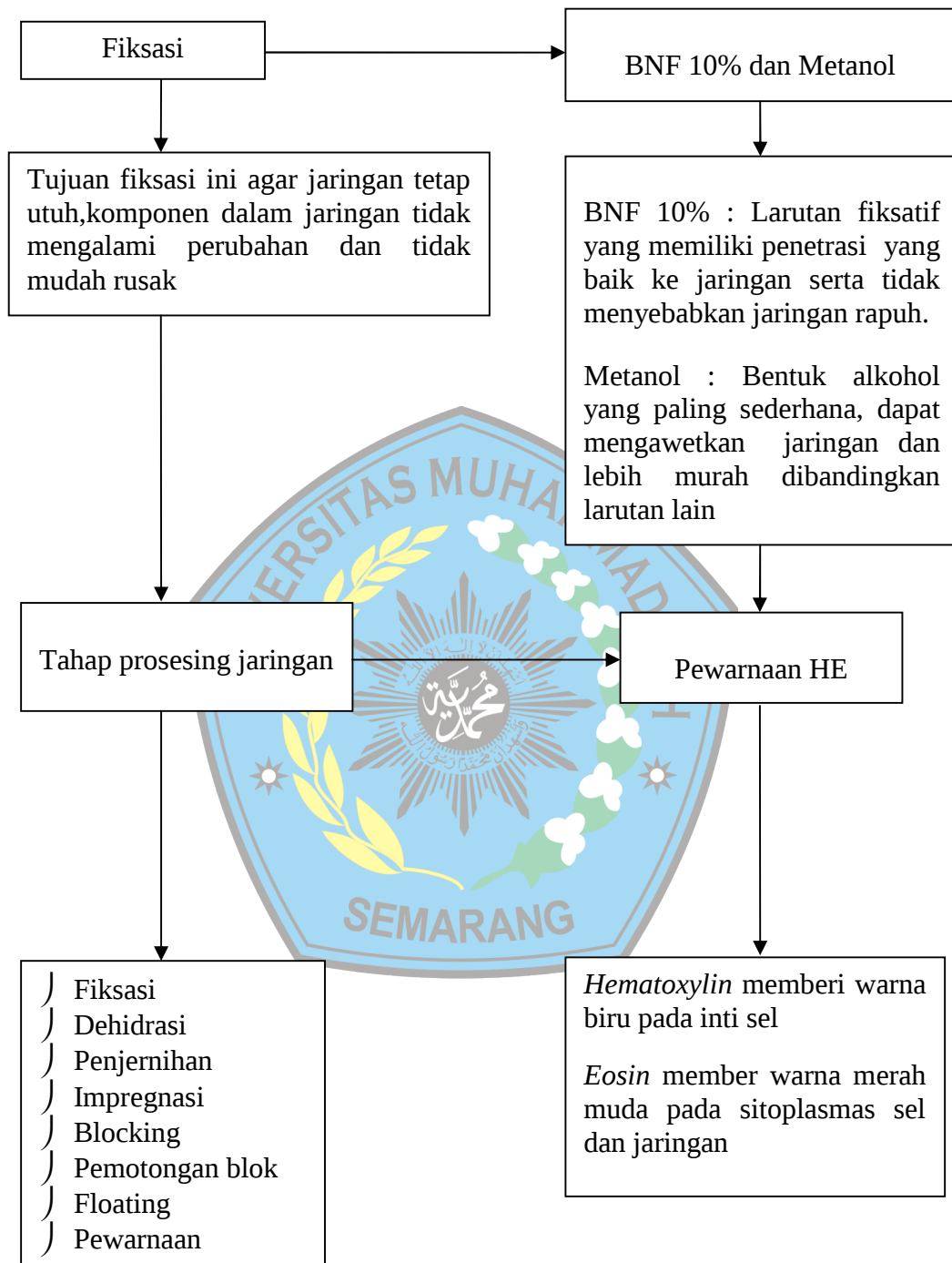
Gambar 1. Gambar jaringan hasil pewarnaan HE
Sumber : (Ariyadi T, 2017).

Berikut merupakan tabel skor hasil pewarnaan dengan menggunakan pewarnaan HE :

Tabel 2. Tabel skor hasil pewarnaan HE (Juliati, 2017)

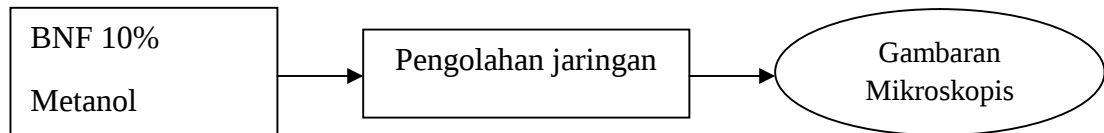
No	Deskripsi	Kualitas	
		Skala Ordinal	Skala Interval
1	Warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah (<i>eosin</i>) pada sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas serta warna pada preparat tidak seragam. Sediaan tidak didiagnosis.	Tidak Baik	1
2	Warna biru pada inti sel kurang, warna merah (<i>eosin</i>) pada sitoplasma dan jaringan ikat kurang, serta keseragaman warna pada preparat kurang. Tetapi masih bisa didiagnosis.	Kurang Baik	2
3	Warna biru pada inti sel, warna merah (<i>eosin</i>) pada sitoplasma dan jaringan ikat serta warna pada preparat seragam	Baik	3

2.4. Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori

2.5. Kerangka Konsep



Gambar 3. Kerangka Konsep

2.6. Hipotesis

Tidak ada perbedaan fiksasi BNF 10% dan metanol terhadap gambaran mikroskopis.

