

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fiksasi Jaringan

Fiksasi jaringan adalah suatu 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, 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 & Rejendran, 2008)

Mekanisme kerja dari fiksasi pada dasarnya adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk ketika masih di tubuh. Dengan pemberian cairan fiksasi maka akan mengubah komposisi jaringan secara kimiawi ataupun secara fisik. Pada sel atau jaringan yang akan difiksasi tersusun atas sel dan komponen ekstraseluler. Sel dan komponen ekstraseluler terdiri dari elemen peptida dan protein, lipid dan fosfolipid (membran), karbohidrat dan kompleks karbohidrat, berbagai jenis RNA dan DNA dan sebagainya. Elemen-elemen ini akan bereaksi selama proses fiksasi dan akan tergantung pada jenis fiksasi yang digunakan, baik itu akan dihilangkan atau dipertahankan (Khristian & Inderiati, 2017).

Tujuan fiksasi adalah mengawetkan jaringan secara permanen sedekat mungkin dengan keadaan saat hidup. Fiksasi sebaiknya dikerjakan sesegera

mungkin setelah pengambilan jaringan (pada kasus patologi bedah) atau segera setelah kematian (dengan otopsi) untuk mencegah autolisis. Tidak ada bahan pengawet yang sempurna, Seringkali larutan pengawet merupakan campuran dari berbagai bahan pengawet sehingga dapat memaksimalkan kemampuan masing-masing bahan atau mengurangi kelemahan bahan lainnya. Selain itu fiksasi juga bertujuan untuk mengeraskan jaringan terutama jaringan lunak sehingga memudahkan pembuatan irisan yang tipis (Zulham, 2009).

2.1.1. Prinsip-Prinsip Dasar Fiksasi

Untuk dapat menghasilkan efek fiksasi dengan baik, ada beberapa faktor yang harus dipenuhi oleh suatu proses fiksasi, anatar lain :

a. Koagulasi

Koagulasi adalah proses penggumpalan partikel koloid didalam sel karena adanya penambahan bahan kimia atau pemberian perlakuan fisik sehingga partikel-partikel tersebut bersifat netral dan membentuk endapan. Koagulasi pada proses fiksasi dapat terjadi pada protein yang ada didalam sel atau kandungan lainnya yang dianggap perlu dipertahankan akibat degrasi yang terus berlangsung (Khristian & Inderiati, 2017)

b. Presipitasi

Secara umum presipitasi adalah pengendapan yang terjadi akibat koagulasi yang terjadi sebelumnya. Presipitirasi yang diharapkan ketika proses fiksasi adalah presipitasi protein, yang mana protein inilah yang menjadi salah satu faktor utama pembusukan (Khristian & Inderiati, 2017)

2.2. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Fiksasi

Faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat efektifitas dan kecepatan fiksasi jaringan adalah sebagai berikut :

a. Suhu/Temperatur

Peningkatan suhu dapat juga mempercepat kecepatan reaksi kimia antara unsur fiksatif dengan sel atau jaringan. Dampak peningkatan suhu pada larutan fiksatif berpotensi meningkatkan laju degenerasi jaringan di area yang tidak sulit untuk dihentikan. Fiksasi yang menggunakan teknik pemanasan disarankan dimulai dari suhu kamar yang ditingkatkan secara perlahan hingga suhu mencapai 45⁰ C. Peningkatan suhu pada larutan fiksatif dapat juga dilakukan dengan suhu yang lebih tinggi sampai 65⁰ C, namun perlu diperhatikan jika waktu yang digunakan harus lebih singkat (Khristian & Inderiati, 2017).

b. Penetrasi Larutan

Penetrasi jaringan bergantung pada kemampuan difusi masing-masing fiksatif.. Untuk mengatasi ini, jaringan diiris dengan ketipisan 3 – 5 mm. Jaringan yang tipis akan lebih mudah dipenetrasi daripada jaringan tebal. Untuk pekerjaan rutin, jaringan dapat dibuat dengan ketebalan hingga 1 cm. Dengan ketebalan ini, diharapkan cairan fiksasi dapat dengan cepat memfiksasi seluruh jaringan. Bila irisannya terlalu tebal, maka permukaan luarnya saja yang berhasil difiksasi sedangkan bagian tengahnya dapat membusuk sebelum cairan fiksasi sempat merembes/menginfiltrasi ke sana. Untuk mikroskopi elektron, ketebalan irisan jaringan adalah 1 mm (Jusuf, 2009).

c. Waktu Penetrasi

Waktu penetrasi optimal untuk proses fiksasi bermacam-macam diantara jenis-jenis larutan fiksatif yang ada dan juga jenis sel yang ada dilarutannya. Perhitungan waktu penetrasi larutan fiksatif menjadi pertimbangan dalam mengejar waktu autolysis dari sel atau jaringan yang terdapat dipusat terdalam suatu jaringan tersebut. Waktu penetrasi diharuskan mencapai titik pusat terdalam sebelum proses autolysis berjalan (Khristian & Inderiati, 2017).

d. Dimensi Spesimen

Dimensi spesimen merupakan salah satu hal yang perlu diperhatikan. Hal ini berhubungan dengan waktu optimal jaringan terfiksasi dari seluruh sisi dan juga proses difusi dan larutan yang digunakan dalam pematangan jaringan (Khristian & Inderiati, 2017).

e. Volume

Pengawet Volume pengawet adalah penting. Sebaiknya, volume pengawet adalah 10 x volume jaringan yang difiksasi. Besarnya volume jaringan menentukan volume fiksasi yang diperlukan sedangkan tebalnya jaringan menentukan lamanya fiksasi. Panjang dan lebar jaringan umumnya ditentukan oleh jenis mikrotom yang digunakan (Jusuf, 2009).

f. Tingkat Keasaman (pH)

Tingkat keasaman suatu larutan (pH) dapat menjadi penting ketika larutan yang digunakan dalam fiksasi mengandung formaldehid. pH yang diberikan diharapkan sesuai dengan pH sel yaitu 6,8-7,2 (Khristian & Inderiati, 2017).

2.3. Buffer Netral Formalin

Formalin adalah larutan yang tidak berwarna dan baunya sangat menusuk. Didalam formalin mengandung sekitar 37% formaldehid dalam air, biasanya ditambah metanol hingga 15% (Astawan, 2006). Secara empiris terbukti untuk pemeriksaan rutin (morfologi) dan imunohistokimia zat formalin 10% dengan pH sekitar 7 adalah yang optimum. Untuk mempertahankan pH netral ditambah buffer pospat. Cara pembuatan formalin buffer pospat adalah 100 ml larutan formaldehyde 40%, 900 ml aquades, 4 gr sodium dihidrogen fosfat monohidrat, 6,5 gr disodium hidrogen fosfat anhidrat (Nassar, 2008).

Bahaya formalin ialah pada saat secara langsung terkontaminasi, baik itu terhirup atau terkena pada makanan yang kita konsumsi. Pada konsentrasi pekat dampak dari formalin dapat berupa iritasi pada saluran pernapasan, reaksi alergi, pemicu kanker dan dapat pula mengakibatkan kulit terbakar (WHO, 2002).

2.4. Aseton

Aseton adalah keton yang paling penting. Cairan volatil (titik didih 56°C) dan mudah terbakar. Aseton adalah pelarut yang baik untuk senyawa organik banyak digunakan sebagai pelarut pernis, lak dan plastik. Aseton bercampur dengan air dalam segala perbandingan. Sifat ini digabungkan dengan volatilitasnya membuat aseton sering digunakan sebagai pengering alat – alat gelas laboratorium (Intani, 2009).

Rumus molekul dari aseton adalah $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, dengan Berat molekul 58,08 gram/mol, Titik didih pada 760 mmHg $56,050\text{ C}$, Titik beku $-94,60\text{C}$, Panas pembakaran $431,9\text{ kkal/mol}$, Tekanan uap pada 200C adalah 24 kPa , Suhu kritis

235°C, Densitas pada 192.40 °K adalah 1,37 g/ml, Viskositas pada 25°C adalah 0.843 mPa.s(Perry's, 2008)

Asetogenin termasuk salah satu senyawa yang rentan terhadap suhu. Strukturasetogenin akan berubah pada suhu di atas 600C. Oleh karena itu dengan metodesokletasi yang menggunakan media pemanas diperlukan pelarut yang memiliki titik didih dibawah suhu 600C (Intani, 2009).

Aseton juga dikenal sebagai propanon, dimetil keton, 2-propanon, propan-2-on, adalah senyawa berbentuk cairan yang tidak berwarna dan mudah terbakar. Aseton merupakan keton yang paling sederhana. Aseton larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dan dietil eter. Aseton sendiri juga merupakan pelarut yang penting. Aseton cepat bereaksi namun memiliki penetrasi yang buruk dan menyebabkan kerapuhan dalam jaringan jika penggunaanya terlalu lama. Aseton juga menghilangkan lipid dari jaringan (Khristian & Inderiati, 2017).

2.5. Prosesing Jaringan

2.5.1. Fiksasi

Tahapan fiksasi merupakan bagian terpenting dari semua teknik histologi dan sitologi dengan tetap memberikan warna yang alami, untuk mencegah terjadinya denaturasi protein yang berlanjut terdapat tiga metode, yaitu dengan koagulasi, membentuk senyawa aditif, atau gabungan dari koagulasi dan senyawa aditif (Jamie, 2010).

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 didalam maupun diantara sel-sel. Selain itu, kebanyakan enzim didalam sel menjadi terinaktivasi, sehingga proses metabolisme sel tidak terjadi, dan mencegah adanya autolisis sel. Secara fisik membran sel awalnya hidrofilik, dilarutkan dengan cairan fiksatif, khususnya pada proses parafinisasi dan pewarnaan dimana zat-zat tersebut akan dapat masuk kedalam sel dan menempel dengan mudah (Waheed, 2012)

2.5.2. Dehidrasi

Untuk membuat potongan-potongan, maka jaringan harus dipendam dalam lilin. Namun demikian, lilin (parafin) tidak terlarut dalam air. Oleh sebab itu, air dalam jaringan harus dihilangkan dan diganti dengan medium dimana lilin dapat larut didalamnya. Hal dilakukan pertama-tama dengan mengganti air dengan alkohol, menempatkan jaringan dalam serangkaian larutan yang mengandung alkohol dengan konsentrasi yang semakin meningkat, dan berakhir pada konsentrasi 100%. Proses ini dilakukan secara bertahap dengan tujuan meminimalkan kerusakan jaringan. Selanjutnya, jaringan harus “dijernihkan” sebelum dipendam dalam lilin (Peckham, 2014)

2.5.3. Penjernihan (*Clearing*)

Penjernihan adalah metode yang digunakan mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantikannya dengan suatu larutan yang berikatan dengan

parafin. Pada proses *clearing* ini sangat penting karena apabila jaringan masih tersisa alkohol walaupun sedikit, parafin 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* dan *toluol* atau *toluene* (Waheed, 2012).

2.5.4. Penanaman (*Embedding*)

Pembenaman (*impregnasi*) adalah proses untuk mengeluarkan cairan pembening (*clearing agent*) dari jaringan dan diganti dengan parafin. Pada tahap ini jaringan harus benar-benar bebas dari cairan pembening karena sisa cairan pembening dapat mengkristal dan sewaktu dipotong dengan mikrotom akan menyebabkan jaringan menjadi mudah robek (Peckham, 2014)

2.5.5. Pembuatan (*Blocking*)

Pembuatan (*Blocking*) merupakan proses pengisian parafin padat yang dicairkan agar dapat dipotong menggunakan mikrotom. Proses ini menggunakan parafin sebagai media pengisian jaringannya agar memadat dan mudah dipotong. Prosesnya yaitu dengan menyiapkan tempat *blocking*, dan menuangkan parafin, dilanjutkan dengan memasukan organ kedalam parafin yang sudah disediakan. Selanjutnya setelah blok parafin kering dan sudah beku dapat dikeluarkan dari tempat *blocking* dan dapat dilanjutkan ke proses selanjutnya (Rina, 2013)

2.5.6. Pemotongan

Pemotongan dilakukan menggunakan pisau khusus yang biasa disebut mikrotom. Mikrotom adalah alat yang dilengkapi dengan pisau yang tajam dan

dapat mengiris potongan *block* dengan sangat tipis dan sesuai dengan ukuran ketebalan yang kita inginkan (Rina, 2013)

2.5.7. Mounting

Mounting adalah suatu proses perekatan sayatan jaringan pada kaca sediaan menggunakan bahan perekat (Syarif, 2015)

2.6. Teknik Pewarnaan

Pewarnaan merupakan salah satu 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 sekarang adalah hematoksilin dan eosin (Rina, 2013).

Jika terdapat potongan jaringan yang tidak diwarnai dan langsung dilihat ke mikroskop cahaya, maka komponen seluler tersebut terlihat sama antara organ yang satu dengan yang lainnya. Pewarnaan dilakukan untuk memberikan perbedaan warna pada komponen tiap sel. Faktor yang mempengaruhi pewarnaan yang pertama yaitu Reaksi asam basa dimana Komponen sel di alam terdiri dari komponen asam basa. Untuk komponen asam dapat diwarnai komponen basa dan pelarut dasar, begitupun sebaliknya, yang kedua yaitu Adsorbsi. Dalam adsorbsi, molekul kecil nantinya akan menempel pada molekul sel yang lebih besar. Yang ketiga adalah Perbedaan kelarutan. Pada larutan yang berbeda, jenis pewarnaan tergantung dari tingkat kelarutan yang ada pada sel (Rina, 2013).

2.7. Pewarnaan HE

Pewarnaan Hematoxylin Eosin merupakan pewarnaan standar untuk mengetahui struktur umum sel maupun jaringan dalam suatu organ. Hematoksilin didapatkan dari ekstrak pohon *Haematoxylon campechianum Linnaeus* yang berasal dari Amerika. Saat ini hematoksilin yang dijual sudah dicampur 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 (Jamie *et al*, 2010).

Eosin adalah pewarnaan asam yang memiliki afinitas terhadap sitoplasma sel sedangkan pada hematoksilin memiliki afinitas terhadap nukleus. Eosin penggunaannya lebih aman dibanding dengan hematoksilin. Namun satu-satunya masalah pada eosin adalah pewarnaan berlebih terutama pada jaringan yang memiliki dekalsifikasi (Jamie *et al*, 2010).

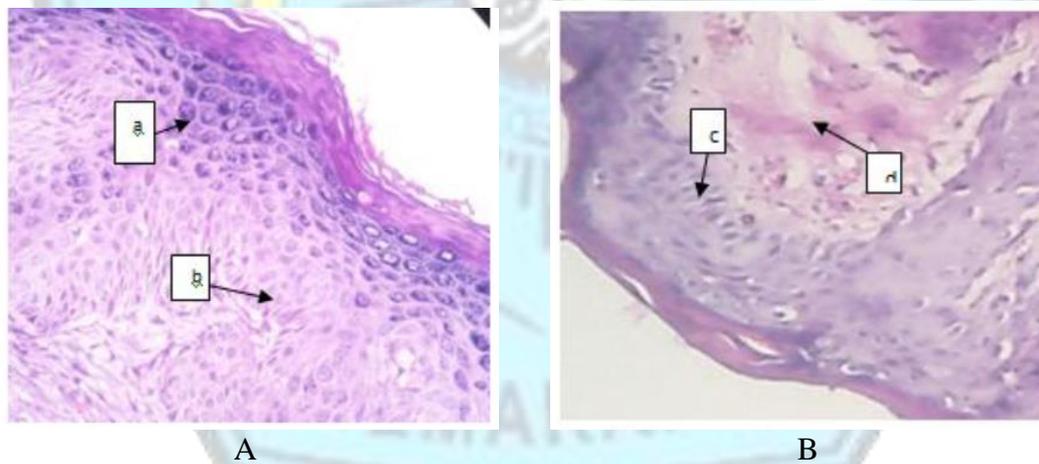
2.8. Penilaian Kualitas Sediaan pada Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Penilaian Kualitas sediaan dengan menggunakan kriteria pada tabel 2.1. dibawah ini :

Tabel 2. Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan Pada Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

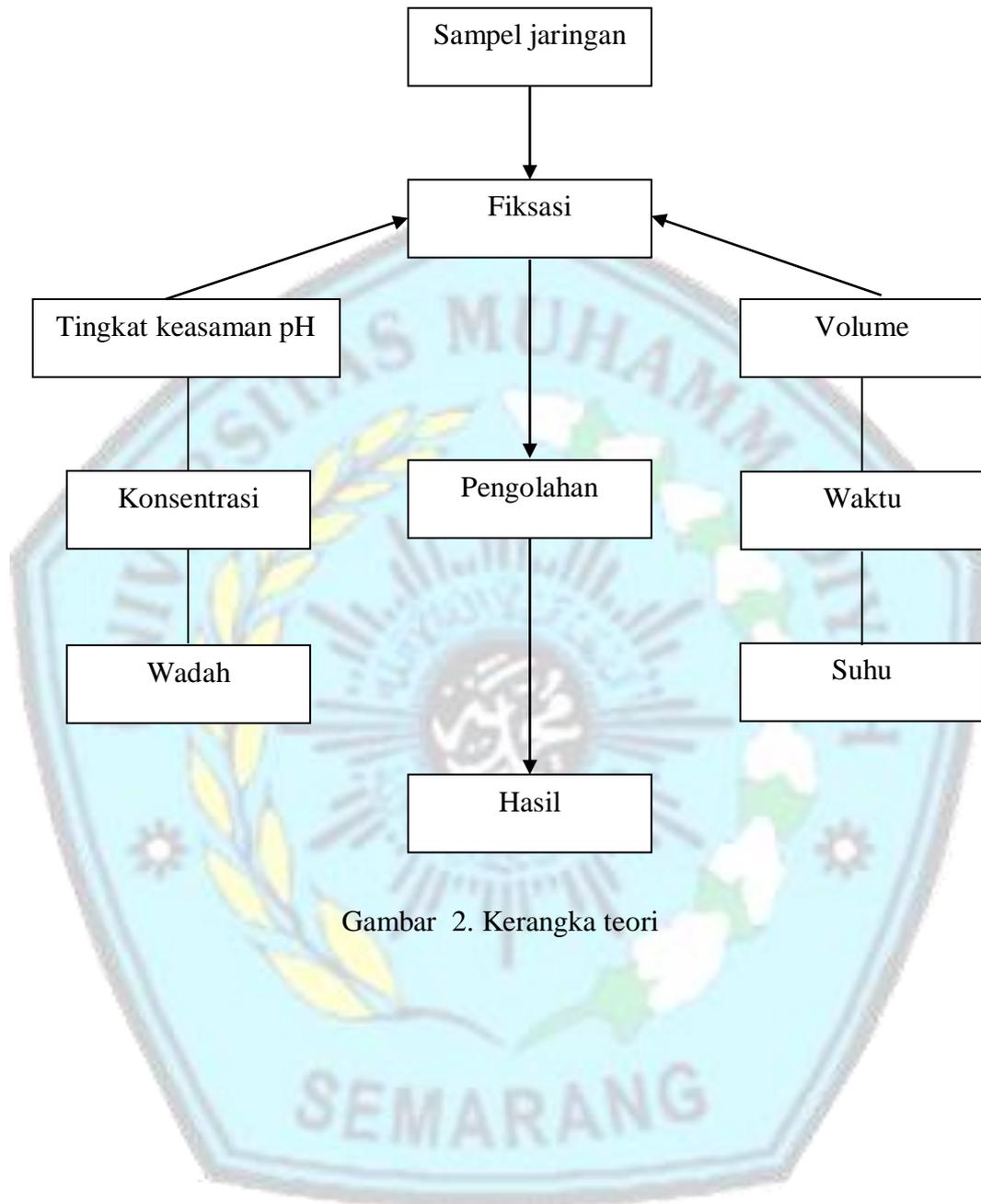
No	Deskripsi	Kualitas	
		Skala Ordinal	Score
1	Warna biru tua pada inti sel tidak jelas, warna merah (<i>eosin</i>) pada sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas serta warna pada preparat tidak seragam. Sediaan tidak bisa didiagnosis.	Tidak baik	1
2	Warna biru pada inti sel kuraang, warna merah (<i>eosin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

Sumber : Ariyadi & Suryono 2017



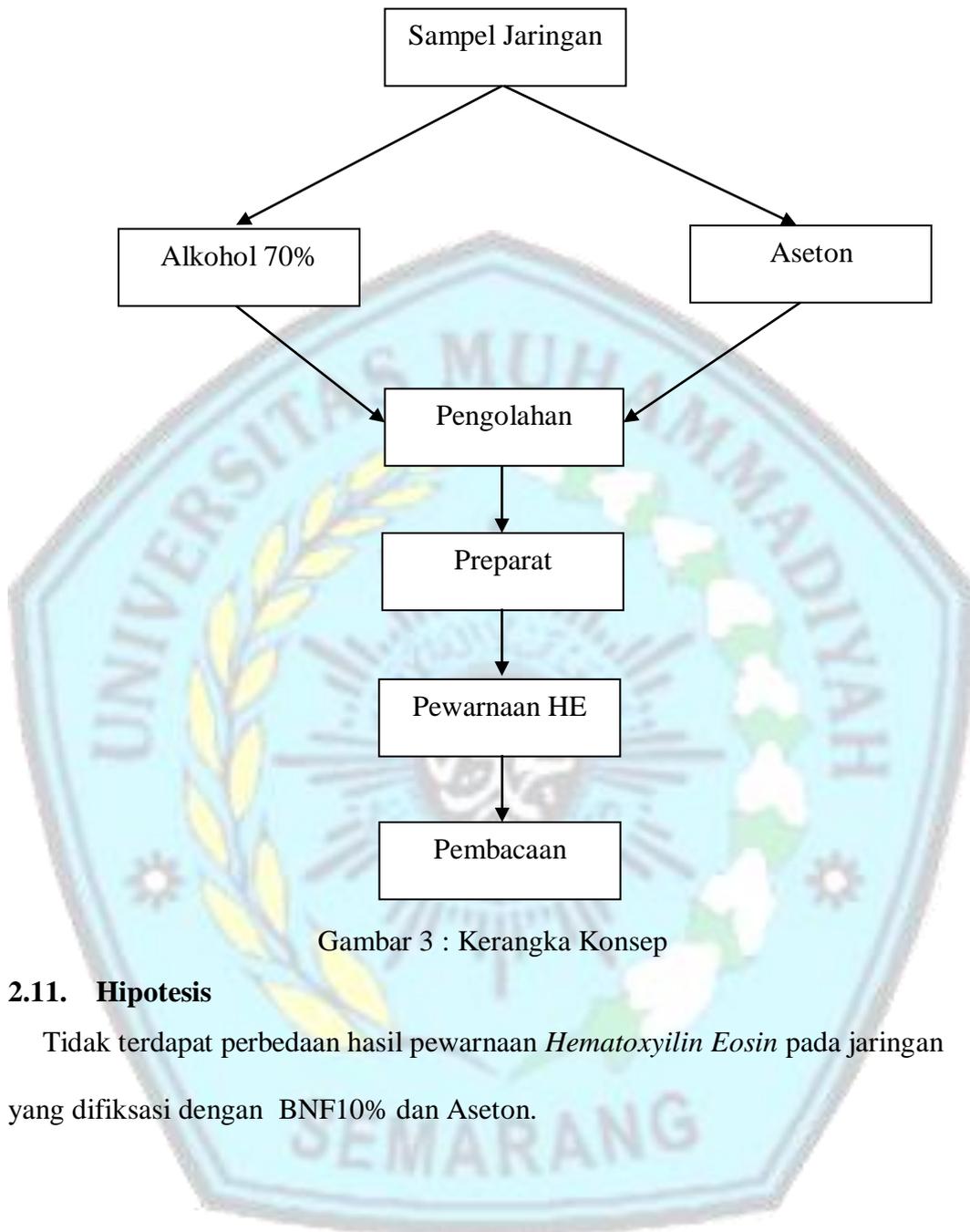
Gambar 1. (A) Hasil pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan score 3, (B) Hasil pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan score 2 (Ariyadi & Suryono 2017)

2.9. Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka teori

2.10. Kerangka konsep



Gambar 3 : Kerangka Konsep

2.11. Hipotesis

Tidak terdapat perbedaan hasil pewarnaan *Hematoxylin Eosin* pada jaringan yang difiksasi dengan BNF10% dan Aseton.