

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Prosesing Jaringan

2.1.1 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 parafinasi dan pewarnaan dimana zat-zat tersebut akan dapat masuk kedalam sel dan menempel dengan mudah (Waheed, 2012).

2.1.2 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 (Rina, 2013).

2.1.3 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).

2.1.4 Penanaman (*Embedding*)

Penanaman (*Embedding*) merupakan proses untuk mengeluarkan cairan pembening dari jaringan dan digantikan dengan parafin. Jaringan ini harus terbebas dari cairan pembening karena nantinya akan mengkristal dan sewaktu dipotong jaringan akan mudah robek. Berdasarkan metode prosesnya yaitu jaringan akan dibenamkan di larutan parafin selama 3x dan dalam jangka waktu tertentu sambil dipanaskan agar parafinnya tidak membeku (Rina, 2013).

2.1.5 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).

2.1.6 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)

2.2 Deparafinisasi

Deparafinisasi adalah suatu tahap pada proses pewarnaan (*staining*) dengan tujuan membersihkan parafin dari jaringan atau kaca objek (Sari et al, 2016). Reagen yang sering dipakai adalah *xylol*, toluen, benzol, atau kloroform. waktu penjernihan harus diatur dengan tepat agar jaringan tidak terlalu keras, misalnya pada penggunaan *xylol* yang terlalu lama. Kloroform merupakan bahan penjernih pilihan yang dipakai di laboratorium tertentu, karena tidak menimbulkan masalah pada parafinisasi., tidak membuat jaringan terlalu keras, namun jaringan yang terendam didadalamnya dapan menjadi transparan (Miranti, 2010).

Xylol juga digunakan pada proses *clearing* sebagai perantara antara larutan dehidrasi dan infiltrasi. Larutan yang paling jelas adalah hidrokarbon dengan indeks mirip dengan protein. Ketika agen dehidrasi sepenuhnya telah digantikan oleh sebagian besar pelarut ini maka jaringan akan memiliki tampilan yang

tembus pandang. *Xylol* merupakan cairan yang mudah terbakar dan tidak berwarna dengan karakter minyak bumi dan bau aromatik, yang tercampur dengan pelarut organik dan lilin parafin (Suvarna et al, 2012).

Paparan *xylol* di laboratorium terjadi selama pemrosesan jaringan deparafinasi bagian jaringan dan pengolahan jaringan bersih. Dalam upaya untuk menghilangkan penggunaan *xylol* dari laboratorium banyak bahan kimia pengganti hidrokarbon alifatik, hidrokarbon aromatik, minyak nabati, minyak zaitun dan pengganti minyak mineral telah digunakan (Ankle et al, 2011).

Histoeknik adalah proses dalam pembuatan sajian histologi dari spesimen tertentu melalui rangkaian proses tertentu hingga menjadi preparat yang bisa diamati dan dianalisis menggunakan mikroskop, serta mengetahui struktur sel dan bentuk jaringan (Prahanarendra, 2015).

Penggantian *xylol* dengan asam cuka sebagai *deparaffinization agent* mempertimbangkan hal-hal berikut.

- a. Lebih mudah didapat dan harganya relatif lebih murah
- b. Asam asetat memiliki konstanta dielektrik yang sedang yaitu 6,2, sehingga ia bisa melarutkan baik senyawa polar seperti garam anorganik dan gula maupun senyawa non-polar seperti minyak dan unsur-unsur seperti iodin, dan logam (Rukaesih, 2004).
- c. Asam cuka merupakan bahan yang cukup efektif untuk menghilangkan noda minyak di dapur seperti kadar lemak yang menempel pada dinding ataupun pada bagian lemari dapur (Syafriil, 2012).

2.3 Asam Cuka

Asam asetat dalam ilmu kimia disebut juga acetid acid atau acidicum aceticum, akan tetapi di kalangan masyarakat asam asetat biasanya disebut cuka atau asam cuka. Asam cuka merupakan cairan yang rasanya asam yang pembuatannya melalui proses fermentasi alkohol dan fermentasi asetat yang didapat dari bahan yang kaya gula seperti anggur, apel, nira kelapa, malt dan sebagainya (Anton, 2003).

Sifat fisika dari asam asetat adalah berbentuk cairan jernih, tidak berwarna, berbau menyengat, berasa asam mempunyai titik beku $16,6^{\circ}\text{C}$, titik didih $118,1^{\circ}\text{C}$ dan larut dalam alkohol, air, dan eter. Asam asetat tidak larut dalam karbon disulfida. Asam asetat dibuat dengan fermentasi alkohol oleh bakteri *Acetobacter*. Pembuatan dengan cara ini biasa digunakan dalam pembuatan cuka makan (Sarsojoni, 1996). Asam asetat mempunyai rumus molekul CH_3COOH dan bobot molekul 60,05 (Depkes RI, 1995).

Asam asetat mudah menguap diudara terbuka, mudah terbakar, dan dapat menyebabkan korosif pada logam. Asam asetat larut dalam air dengan suhu 20°C , etanol (95%) pekat, dan gliserol pekat. Asam asetat jika diencerkan tetap bereaksi asam. Penetapan kadar asam asetat biasanya menggunakan basa natrium hidroksida, dimana natrium hidroksida 1N setara dengan 60,05 mg CH_3COOH (DepkesRI, 1995).

Asam asetat merupakan sumber utama dalam pembuatan garam, derivat, dan ester asam asetat. Asam asetat dapat digunakan sebagai pelarut zat organik yang

baik dan untuk membuat selulosa asetat yang dibutuhkan untuk pembuatan rayon dan selofan. Asam asetat dapat juga digunakan sebagai pengawet bumbu-bumbu masak atau penambah rasa masakan, untuk membuat aneka ester, zat warna dan propanon. Selain itu asam asetat juga merupakan pereaksi kimia dan bahan baku industri yang pentingnya dapat pula dijadikan bahan pelarut (Anton, 2003).

Asam asetat merupakan pereaksi kimia dan bahan baku industri yang penting untuk menghasilkan berbagai senyawa kimia. Asam asetat digunakan sebagai pengatur keasaman dalam industri makanan. Asam asetat encer juga sering digunakan sebagai pelunak air di rumah tangga. Asam asetat pekat bersifat korosif, sehingga harus digunakan dengan hati-hati karena dapat menyebabkan luka bakar, kerusakan mata permanen, serta iritasi pada membran mukosa (Setiawan, 2007).

Asam asetat encer tidak berbahaya, namun konsumsi asam asetat yang lebih pekat berbahaya bagi manusia dan hewan karena dapat menyebabkan kerusakan pada sistem pencernaan, dan perubahan yang mematikan pada keasaman darah (Setiawan, 2007)

2.4 Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat diamati menggunakan mikroskop. Pewarna yang biasa digunakan secara rutin adalah pewarna yang dapat memulas inti dan sitoplasma serta jaringan peyambungannya yaitu pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) (Jusuf, 2009).

Hematoksilin merupakan zat warna alami yang pertama kali dipakai tahun 1863. Hematoksilin akan mengikat inti sel secara lemah, kecuali apabila ditambahkan senyawa lainnya seperti aluminium, besi, krom, dan tembaga. Jenis hematoksilin yang sering dipakai adalah mayer, delafied, erlich, bullard dan bohmer, sedangkan counter staining yang dipakai adalah eosin, safranin, dan phloxine. hematoksilin dan eosin adalah metode pewarnaan yang banyak digunakan dalam pewarnaan jaringan sehingga dibutuhkan dalam diagnosa dan penelitian (Setiawan, 2016).

Hematoksilin sering digunakan pada pewarnaan histoteknik yang merupakan ekstrak dari kayu ulin (logwood) pohon *Hematoxylon campechianum* yang berasal dari negara bagian Meksiko di Campeche, tetapi sekarang dibudidayakan di Hindia Barat. Hematoksilin diekstrak dari kayu bulat menggunakan air panas kemudian diendapkan dari larutan berair menggunakan urea. Oksidasi produk utamanya adalah hematein yang merupakan pewarna alami yang bertanggung jawab atas sifat warna (Suvarna et al, 2012).

Hematoksilin bekerja sebagai pewarna basa, artinya zat ini mewarnai unsur basofilik jaringan. Hematoksilin memulas inti dan struktur asam lainnya dari sel (seperti bagian sitoplasma yang kaya RNA dan matriks tulang rawan) menjadi biru. Eosin bersifat asam sehingga akan memulas komponen asidofilik jaringan seperti mitokondria, granula sekretoris dan kolagen. Eosin mewarnai sitoplasma dan kolagen menjadi merah muda. Oleh karena itu prinsip dari pewarnaan adalah terjadinya afinitas antara jaringan dengan bahan pewarna, baik secara langsung yaitu bahan cat dengan jaringan dapat berikatan secara langsung, atau secara tidak

langsung yaitu bahan cat dengan jaringan tidak dapat berikatan secara langsung kecuali diberi bahan perantara yang biasadisebut sebagai mordan (Setiawan, 2016).

Hasil pembacaan atau standar pengecatan Hematoksilin-Eosin (HE) yang baik (skor 3) menunjukkan warna biru terang pada inti sel, warna merah (Eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat serta warna pada preparat seragam (Aryadi et al, 2017).

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).

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 (Rina, 2013)

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).

Tahap akhir dari proses pewarnaan Hematoksilin eosin adalah mounting. Mounting adalah suatu proses perekatan sayatan jaringan pada kaca sediaan menggunakan bahan perekat (Syarif, 2015)

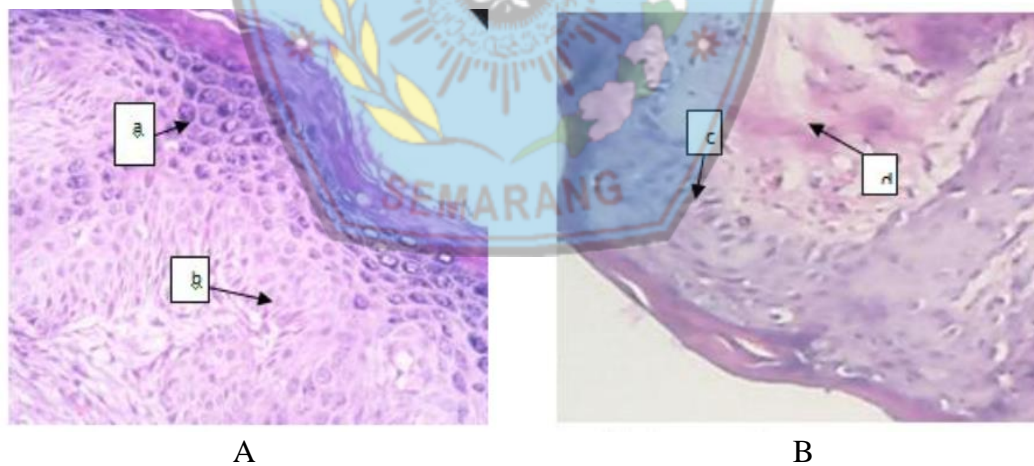
2.5 Penilaian Kualitas Sediaan pada Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Penilaian Kualitas sediaan dengan menggunakan kriteria pada tabel 2 dibawah ini:

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

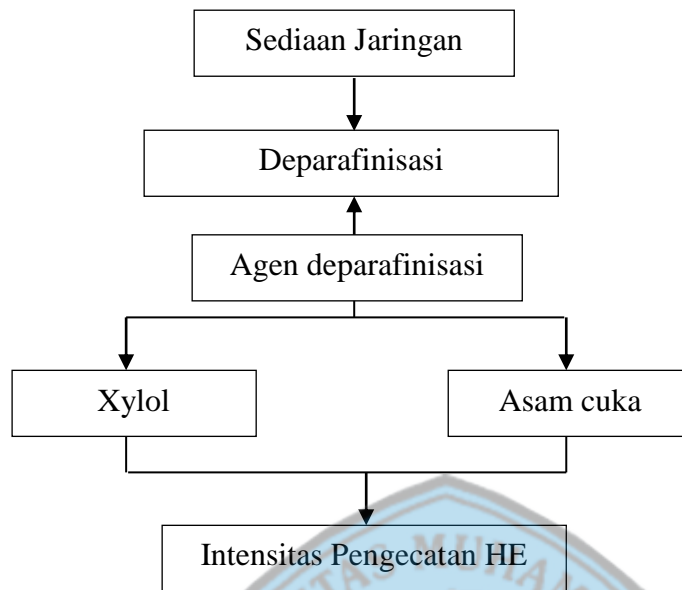
No	Deskripsi	Kualitas	
		Skala Ordinal	Score
1	Warna biru tua pada inti sel tidak jelas, warna merah (<i>eosin</i>) pada sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas serta warna pada preparat tidak seragam. Sediaan tidak bisa didiagnosis.	Tidak baik	1
2	Warna biru pada inti sel kurang, warna merah (<i>eosin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



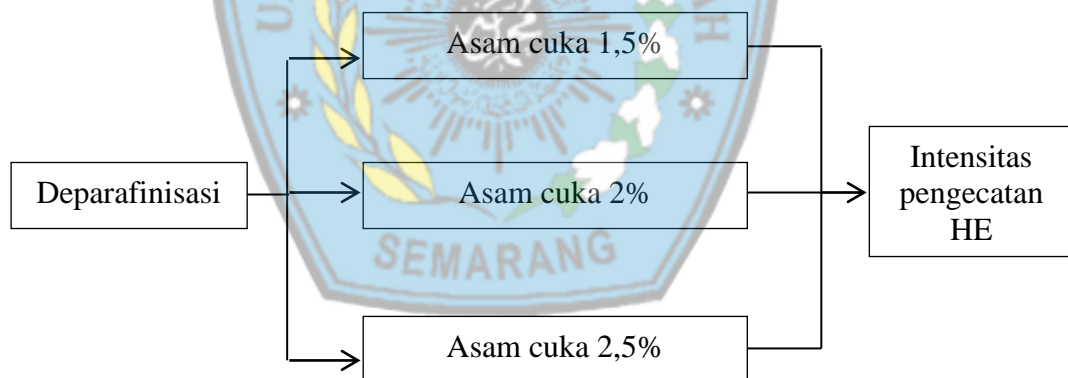
Gambar 1. (A) Hasil pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan score 3, (B) Hasil pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan score 2 (Ariyadi & Suryono 2017)

2.6 Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 3. Kerangka Konsep

2.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu tidak terdapat perbedaan intensitas yang dihasilkan dengan pengecatan Hematoksilin Eosin baik menggunakan *xylol* maupun asam cuka sebagai agen deparafinisasi.