

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tulang

Tulang merupakan penyanggah dan pelindung organ-organ penting yang ada di dalam tubuh. Tulang merupakan organ terkeras nomor dua setelah email gigi karena di dalam tulang terdapat adanya garam-garam kalsium yang terkandung dalam tulang tersebut. Struktur tulang bukan seperti beton yang padat melainkan mirip seperti sarang madu yang berongga-rongga, dan dipengaruhi oleh masa padat dari lubang-lubang kecil tersebut (Winarto, 2017). Menurut KBBI (2012) tulang merupakan rangka atau bagian rangka tubuh manusia atau binatang untuk menompang tubuh. Susunan utama tulang terdiri atas matrik ekstraseluler termineralisasi yang mengandung bahan organik dan anorganik seperti fosfor, kalsium, dan protein (Dharmayanti, *et. al.*, 2014). Kalsium dan fosfor juga mengatur kepadatan mineral tulang karena semakin padat tulang semakin berat juga tulangnya (Rizkuna, *et. al.*, 2012). Komposisi utama tulang kalsium (Ca) adalah elemen terbanyak nomor 5 sekaligus kation terbanyak dalam tubuh manusia dan hewan (Hidayat, 2012). Kalsium memiliki fungsi memelihara tulang dan gigi, membantu kontraksi, dan relaksasi pada otot (Susanti, 2016). Fosfor merupakan mineral nomor 2 setelah kalsium yang dibutuhkan oleh tubuh dengan 1% berat badan (Syarfaini, 2012).

Menurut Winarto (2017) tulang tersusun atas beberapa sel antara lain *osteoklas*, *osteoblast*, dan *osteosit*. *Osteoklas* berfungsi menghancurkan jaringan tulang dan bertanggung jawab menyerap ulang tulang untuk memperbaiki

jaringan tulang. *Osteoblast* merupakan sel pembentuk tulang yang berfungsi untuk mensintesis bahan organik. Sedangkan *osteosit* adalah sel dewasa yang berfungsi merespon tulang untuk mempertahankan bentuk yang terbaik atau optimal seperti tulang panjang atau pipa. Tulang pipa merupakan tulang yang keras karena komposisi sel-sel penyusunnya lebih padat dari tulang pada umumnya (Nazar, 2008).

Tulang panjang tersusun atas batang tebal panjang yang disebut diafisis dan dua ujung yang disebut epifisis. Tulang pipa umumnya berbentuk tabung dan berongga (Preace, *et. al.*, 2009). Tulang pipa seperti tulang kaki atau lengan sebagai tuas penggerak. Tulang pipa atau tulang panjang biasanya sebagai tempat umum terjadinya kanker *Osteosarkoma* yaitu kanker tulang yang biasanya mengenai ekstremitas tulang pipa atau tulang panjang dekat lempeng pertumbuhan metafisis (Seger, 2014).

Berdasarkan riset dasar kesehatan (2013) di Indonesia diketahui bahwa jumlah penyakit kanker sebesar 1,4 per mil (‰). Faktor rasio tumor tulang adalah 4,6 sedangkan kasus tumor tulang ganas di Indonesia sebesar 1,6% dari seluruh jenis tumor ganas pada manusia. Meningkatnya insiden tumor tulang setiap tahunnya di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo sebesar 1,2% dan tumor tulang ganas sebesar 1,3% (Mahyudin, *et. al.*, 2018).

2.2 Dekalsifikasi

Dekalsifikasi adalah tahap yang rutin digunakan pada proses pemotongan jaringan tulang, melalui proses pengeluaran kalsium dari jaringan tulang tanpa merusak struktur jaringan tulang (Liu, *et. al.*, 2017). Proses dekalsifikasi bertujuan

untuk melunakkan tulang, gigi, atau jaringan yang mengandung garam kalsium sehingga mempermudah saat pemotongan menggunakan mikrotom. Larutan dekalsifikasi yang baik seharusnya dapat menghilangkan semua garam-garam mineral dalam tulang tanpa menimbulkan efek yang kurang baik pada sel atau jaringan dan tanpa mengganggu interpretasi hasil atau pewarnaan berikutnya (Kapila, *et. al.*, 2015).

Menurut Skinner (2008) metode yang digunakan untuk mengetahui proses dekalsifikasi sudah selesai antara lain radiografi, manipulasi (*probing* dan *bending*), waktu perendaman dan uji kimia. Radiografi merupakan metode alat akurasi yang dapat mendeteksi proses menghilangkan kalsium sudah sempurna atau belum pada tulang. Manipulasi (*probing* dan *bending*) metode yang sering digunakan karena mudah yaitu dengan menusuk jaringan dengan benda tajam seperti pisau atau jarum. Waktu perendaman tergantung pada jenis dan besar dari jaringan. Uji kimia yaitu uji yang menggunakan bahan-bahan kimia. Menurut Liu *et. al.* (2017) proses dekalsifikasi sudah sempurna atau selesai apabila jaringan femur atau tulang mudah ditembus menggunakan jarum tanpa kekuatan atau tenaga.

Menurut Khristian *et. al.* (2017) faktor yang berpengaruh terhadap proses dekalsifikasi untuk diagnostik antara lain ketebalan tulang, volume larutan, kerapatan tulang, tekanan atau vakum, suhu, dan agitasi. Ketebalan tulang yaitu semakin tebal tulang maka semakin lama proses menghilangkan garam-garam kalsium di dalam tulang. Kerapatan atau densitas tulang yaitu keadaan tulang yang mengandung banyak kalsium lebih lama proses pelunaknya apabila

dibanding dengan yang sedikit kandungan kalsium. Suhu dapat mempercepat proses dekalsifikasi, tetapi dengan suhu lebih dari 60°C dapat merusak jaringan dan mempengaruhi hasil pengecatan jaringan. Agitasi yaitu proses mempercepat dekalsifikasi dengan mekanik atau mengaduk saat proses dekalsifikasi. Vakum atau tekanan adalah proses pemberian tekanan yang biasanya untuk proses menghilangkan gelembung pada rongga tetapi apabila dibarengkan dengan proses dekalsifikasi diharapkan akan mengurangi kerusakan jaringan saat dikerjakan. Faktor terakhir yang berpengaruh terhadap proses dekalsifikasi adalah volume larutan, semakin banyak larutan dekalsifikasi akan mempercepat proses dekalsifikasi. Larutan yang masuk ke dalam tulang banyak sehingga lebih cepat menghilangkan garam-garam kalsium tulang.

Metode dekalsifikasi Kapila *et. al.* (2015) antara lain seperti *chelation*, dekalsifikasi asam, *microwaves*, dan *electrolysis*. Larutan dekalsifikasi terbagi menjadi 3 yaitu dekalsifikasi asam kuat, dekalsifikasi asam lemah dan chelating. Dekalsifikasi asam lebih sering digunakan di laboratorium patologi karena lebih cepat dan hasil tidak merubah dan merusak morfologi dari jaringan yang akan didiagnosis. Prinsip dekalsifikasi adalah menghilangkan kation kalsium dengan mekanisme anion. Anion diperoleh dari larutan dekalsifikasi yang biasanya mengandung larutan asam. Larutan asam yang digunakan untuk proses dekalsifikasi antara lain asam nitrat, Parenyi's 10%, HCL 5 sampai 10%, Larutan Von Ebner's, asam format 10%, Evans, dan Krajian Kristensen (Khristian, *et. al.*, 2017).

Menurut Mehmet *et. al.* (2014) asam nitrat merupakan salah satu senyawa asam kuat sehingga larutan asam nitrat dapat mempercepat proses dekalsifikasi. Asam kuat dapat mempercepat proses dekalsifikasi jaringan yang mengandung garam-garam kalsium dengan kualitas hasil jaringan yang baik (Prasad, *et. al.*, 2013). Asam nitrat akan melepas ion kalsium pada jaringan sehingga jaringan tulang menjadi lunak. Mekanisme kerja larutan dekalsifikasi asam untuk melunakkan tulang dengan cara merusak senyawa organik yang terdapat pada substansi dasar pembentuk tulang dan jaringan. Proses dekalsifikasi memungkinkan semua kalsium di dalam tulang dapat hilang tanpa ada efek samping pada sel atau jaringan tanpa mengganggu hasil pewarnaan (Khristian, *et. al.*, 2017).

2.3 Processing Jaringan

Processing jaringan merupakan proses pembuatan jaringan menjadi preparat jaringan yang akan diamati secara mikroskopis menggunakan mikroskop. Pembuatan preparat histologi memiliki beberapa tahapan antara lain fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi parafin, *embedding*, pemotongan dengan mikrotom, deparafinisasi, dan *staining* (Subowo, 2009). Menurut Musyarifah *et. al.* (2018) fiksasi berfungsi mempertahankan struktur sel sehingga menjadi stabil secara fisik, kimiawi, dan mencegah terjadinya pembusukan. Dehidrasi berfungsi menghilangkan kandungan air dari dalam jaringan menggunakan alkohol. *Clearing* berfungsi mengeluarkan kandungan alkohol yang masuk ke dalam jaringan. Infiltrasi parafin bertujuan mengisi rongga-rongga atau pori-pori

jaringan yang kosong dengan parafin cair. *Embedding* atau penanaman yaitu memasukkan parafin ke dalam jaringan yang diletakan di dalam cetakan blok sehingga memungkinkan jaringan dapat diiris dengan mudah. Pemotongan jaringan yang sudah diblok dilakukan dengan ketebalan 2 sampai 4 mikron menggunakan mikrotom (Subowo, 2009). Deparafinisasi adalah menghilangkan sisa parafin yang masih menempel pada jaringan bisa menggunakan hotplate atau fiksasi kering bertujuan agar proses pewarnaan lebih cepat masuk pada jaringan dan membuat jaringan lebih menempel dengan sempurna sehingga saat proses pengecatan atau staining jaringan tidak ada yang hilang atau larut (Khristian, *et. al.*, 2017). *Staining* atau pengecatan jaringan digunakan untuk membedakan inti sel, sitoplasma, dan jaringan lainnya secara mikroskopis sehingga mudah dilakukan pengamatan dan penentuan diagnosis menggunakan mikroskop (Ellyawati, 2018).

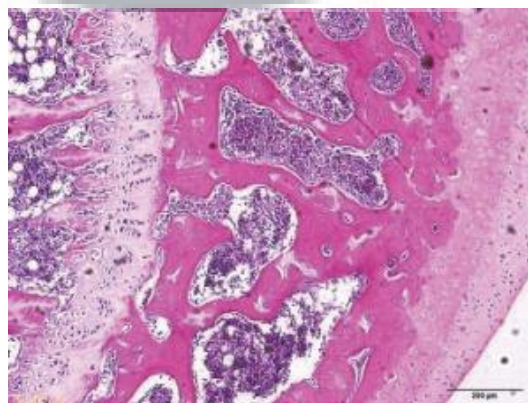
2.4 Pengecatan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Staining atau pengecatan jaringan adalah tahap terakhir pembuatan preparat histologi. Pengecatan jaringan bertujuan membedakan bagian-bagian pada jaringan seperti inti sel dan sitoplasma sehingga mempermudah saat pembacaan secara mikroskopis menggunakan mikroskop (Ellyawati, 2018). Pengecatan jaringan yang digunakan dapat memberi warna pada jaringan sesuai sifat, memiliki warna khusus, dan dapat bertahan lama di jaringan (Wahyuni, 2015). Menurut Khristian *et. al.* (2017) pengecatan HE memiliki prinsip dasar yaitu asam basa larutan akan terikat pada jaringan yang memiliki sifat asam atau basa sehingga terjadi ikatan antar molekul zat warna dengan komponen jaringan.

Pengecatan *hematoxylin* yang sering digunakan yaitu ehrlich, mayer, harris, gill, cole, dan delafield.

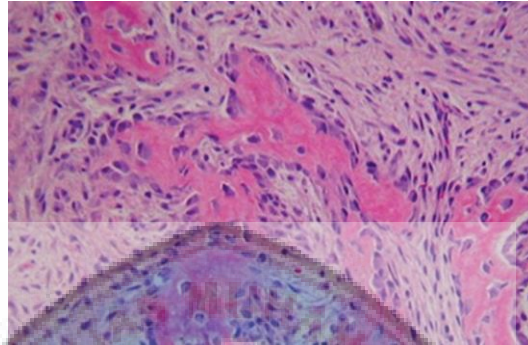
Pengecatan rutin untuk histopatologi adalah pengecatan *hematoxylin eosin* (HE). Pengecatan HE merupakan pengecatan yang umum dan terkenal digunakan untuk pengecatan histopatologi karena mudah digunakan, murah, tidak berbahaya, dan hasil yang diberikan sesuai dengan keinginan (Raheem, 2015). Menurut Liu *et. al.* (2017) pengecatan HE merupakan pengecatan histopatologi yang paling sering digunakan untuk menegakkan diagnosis medis.

HE terdiri atas *hematoxylin* yang memberi warna inti sel menjadi ungu gelap atau biru dan *eosin* memberi warna pada sitoplasma menjadi *pink* atau merah muda (Raheem, 2015). *Hematoxylin* memiliki sifat basa sehingga inti dan disekitar sitoplasma menjadi biru atau ungu, sedangkan *eosin* bersifat asam sehingga sitoplasma memberi warna *pink* atau merah muda (Setiawan, 2016). Gambar mikroskopis preparat dengan pengecatan HE seperti gambar 1 dan gambar 2.



Gambar 1. Preparat tulang femur tikus dengan pengecatan HE menggunakan larutan dekalsifikasi asam nitrat 3% (Liu, *et. al.*, 2017).

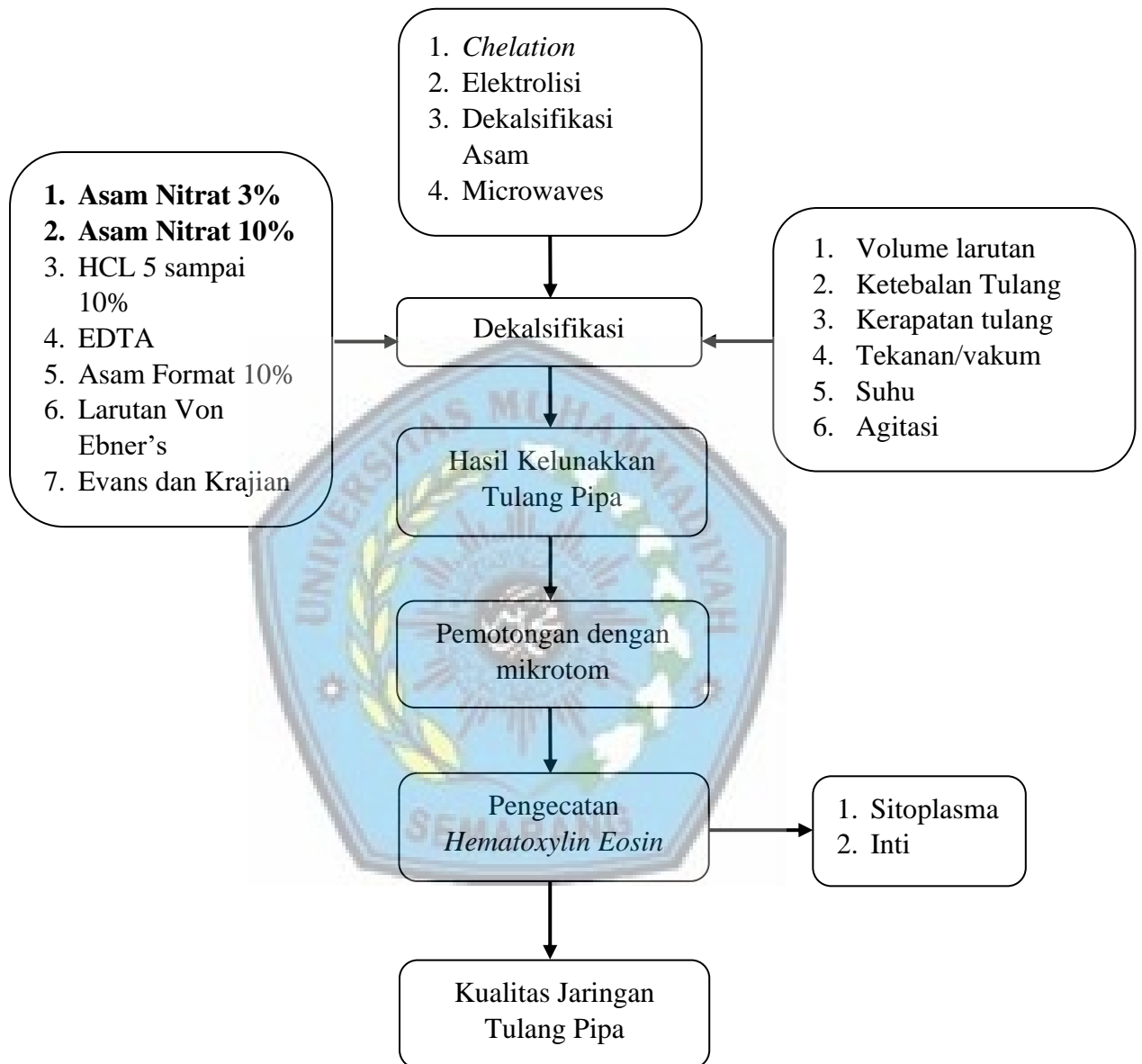
Gambar 1 merupakan gambaran mikroskopis preparat tulang femur tikus dengan pengecatan *hematoxylin eosin* preparat tersebut dinyatakan baik (3+) menunjukan warna biru terang jelas pada inti sel dan warna merah muda (eosin) pada sitoplasma sehingga dapat didiagnosis (Liu *et. al.*, 2017).



Gambar 2. Preparat gigi tikus dengan pengecatan HE menggunakan larutan dekalsifikasi Asam Nitrat 10% (Prasad, *et. al.*; 2013).

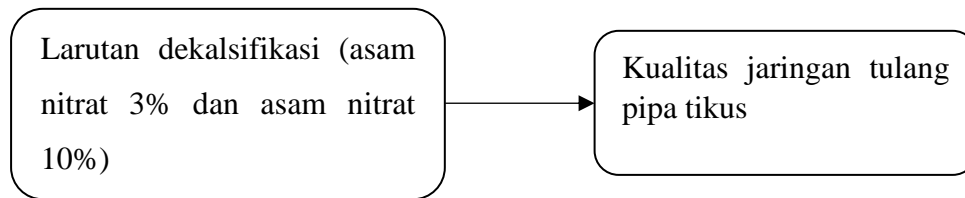
Gambar 2 merupakan gambaran mikroskopis preparat gigi tikus dengan pengecatan *hematoxylin eosin* preparat tersebut dinyatakan baik menunjukan warna biru terang jelas pada inti sel dan warna merah muda (eosin) pada sitoplasma sehingga dapat didiagnosis (Prasad, *et. al.*, 2013).

2.5 Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori Penelitian

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka Konsep Penelitian

2.7 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian yaitu terdapat perbedaan kualitas tulang pipa tikus dengan perbedaan konsentrasi larutan, dan lama perendaman menggunakan larutan dekalsifikasi asam nitrat 3% dan asam nitrat 10% dengan pengecatan HE.

