

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Histoteknik

Histoteknik adalah proses dalam pembuatan sajian histologi dan specimen tertentu melalui rangkaian proses tertentu sehingga menjadi sajian yang bisa diamati dan dianalisis. Terdapat 9 proses yang dibutuhkan untuk menghasilkan preparat histologi. Diawali dengan isolasi jaringan yang diinginkan. Kemudian jaringan tersebut difiksasi agar tidak mengalami proses autolisis (Jusuf, 2009).

Setelah jaringan difiksasi, dilakukan dehidrasi dengan tujuan menghilangkan molekul air agar proses selanjutnya, yaitu *clearing*, dapat berlangsung dengan baik. *Clearing* bertujuan agar jaringan menjadi transparan sehingga dapat dilihat di bawah mikroskop (Rina, 2013).

Agar jaringan dapat dipotong dengan ketebalan 4-6 μm dilakukan tahapan pengerjaan yaitu penanaman jaringan ke dalam parafin cair (*embedding*), dan pemadatan parafin tersebut (*blocking*). Tertanamnya jaringan dalam parafin padat, akan memudahkan proses pemotongan (*cutting*). Berikutnya dilakukan deparafinisasi yang bertujuan untuk menghilangkan molekul parafin, dilanjutkan dehidrasi kembali, dan terakhir adalah *staining* atau pewarnaan agar sel-sel penyusun jaringan dapat dibedakan pada mikroskop (Suprianto, 2014).

B. Euthanasia

Euthanasia berasal dari istilah Yunani, yaitu *eu* yang artinya baik dan *Thanatos* yang artinya kematian. Istilah ini biasanya digunakan untuk menggambarkan mengakhiri kehidupan binatang atau individu dengan carameminimalkan atau menghilangkan rasa sakit dan penderitaan. Kebijakan Dinas Kesehatan mensyaratkan yakni Kelembagaan Perawatan Hewan dan Penggunaan Komite menentukan bahwa metode euthanasia digunakan dalam profosal penelitian konsisten dengan rekomendasi dari 2013 *American Veterinary Medical Association* (AVMA).

Kriteria yang digunakan sebagai dasar untuk euthanasia menurut rekomendasi AVMA meliputi:

1. Nyeri, kecemasan, dan ketakutan yang dirasakan oleh hewan coba harus seminimal mungkin,
2. Waktu yang dibutuhkan hingga hewan coba tidak sadarkan diri minimal,
3. Keandalan dan ireversibilitas,
4. Keselamatan laboran, khususnya efek emosional,
5. Spesies dan keterbatasan umur

Euthanasia menyebabkan kematian oleh tiga mekanisme dasar: (1) depresi langsung neuron yang diperlukan untuk fungsi kehidupan, (2) hipoksia, dan (3) gangguan fisik aktivitas otak.

Proses euthanasia harus meminimalkan atau menghilangkan rasa sakit, kecemasan dan tekanan sebelum kehilangan kesadaran (Kuhlmann, 2009). Dari kriteria diatas, terdapat beberapa teknik yang dapat dipakai dan diterima secara umum. Berikut adalah teknik-teknik euthanasia yang disetujui oleh AVMSA:

1. Karbon dioksida menghirup CO_2 menyebabkan asidosis respiratorik dan menghasilkan keadaan anastesi yang reversibel oleh penurunan pH intraselular yang cepat. Karbon dioksida memiliki potensi untuk menyebabkan *distress* pada hewan melalui tiga mekanisme yang berbeda :
 - a. Nyeri akibat pembentukan asam karbonat pada saluran pernafasan dan okular membran,
 - b. Hipoksia sehingga timbul perasaan sesak nafas,
 - c. Stimulasi langsung dari saluran ion dalam amigdala yang terkait dengan respon rasa takut (Kuhlmann, 2009).

2. Overdosis Barbiturat

Dengan overdosis, anestesi yang mendalam berkembang menjadi apnea karena depresi pusat pernafasan, dan ini diikuti oleh serangan jantung. Semua turunan asam barbiturat digunakan untuk anestesi yang dapat diterima untuk euthanasia bila diberikan intravena. Barbiturat yang diinginkan adalah yang efeknya kuat, tidak menyebabkan iritasi, masa kerjanya panjang, stabil dalam larutan dan murah. Sodium

pentobarbital terbaik sesuai kriteria ini dan paling banyak digunakan (Suprianto, 2014).

Keuntungan utama dari barbiturat adalah :

- a. Kecepatan tindakan. Efek ini tergantung pada dosis, konsentrasi, rute, dan tingkat injeksi.
- b. Barbiturat menginduksi euthanasia dengan sangat lancar, tetapi ketidaknyamanan yang ditimbulkan sangat minimal.
- c. Barbiturat lebih murah dibandingkan agen euthanasia lainnya.
- d. Tim administrasi obat-obatan dan makanan menyetujui barbiturat solusi yang tepat untuk euthanasia.

3. Dekapitasi Tikus Dewasa

Cara euthanasia seperti ini sebaliknya dihindari. Cara ini hanya dapat dilakukan jika dalam penelitian terdapat kebutuhan khusus dan prosedur ini sudah mendapatkan persetujuan dari Institusi hewan coba.

4. Dislokasi Servikal

Metode ini dilakukan dengan cara memisahkan vertebrata pada daerah servikal dengan cubitan pada area leher dan menarik ekor tikus. Cara ini mudah dan efisien, namun kurang direkomendasikan karena dapat menimbulkan kerusakan jaringan, khususnya pada area servikal. Syarat untuk dapat melakukan metode ini ialah, berat tikus kurang dari 200 gr.

C. Teknik Fiksasi

Fiksasi adalah suatu usaha untuk mempertahankan komponen-komponen sel atau jaringan agar tidak mengalami perubahan dan tidak mudah rusak. Proses fiksasi ini dihadapkan setiap molekul pada jaringan yang hidup tetap berada pada tempatnya dan tidak ada molekul baru yang timbul (Anil, 2008).

Pada prosesnya ini tentu tidak akan berjalan dengan sempurna, apabila timbul molekul asing baru pada jaringannya disebut artefak (Hopwood, 1990). Tujuan fiksasi ini agar jaringan tetap utuh. Fiksasi harus dilakukan sesegera mungkin setelah pengangkatan jaringan atau setelah kematian agar tidak terjadi autolisis. 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 (Texas, 2013).

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 (Jensen, 2008).

Prinsip kerja dari fiksasi adalah mengawetkan 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 (Hendrich, 2004).

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 (Texas, 2013).

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 (Jensen, 2008).

Pada metode koagulasi tidak semua zat dikoagulasikan, contohnya fiksasi dengan asam asetat dimana kromatin terkoagulasi tetapi protein tidak dapat terkoagulasi. Hal ini memberi keuntungan untuk penggunaan parafin dan antibodi. Dengan metode ini juga akan meningkatkan paparan sel terhadap antigen sehingga sel tersebut menjadi lebih sensitif. Sedangkan pada metode kombinasi akan memberikan efek lain pada sel yaitu mengontrol tekanan osmotik, mengontrol pH, dan meniadakan efek sel yang membengkak ataupun mengkerut akibat paparan zat lain (Texas, 2013).

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 menggunakan alat yang keras guna mempermudah pemotongan,
4. Fiksasi harus bisa menghambat pembusukan bakteri dan terjadinya autolisis,
5. Fiksasi harus memberikan perbedaan perbandingan mikroskopik yang bagus,
6. Fiksasi tidak boleh menyebabkan iritasi, keracunan, dan korosif,
7. Fiksasi tidak boleh menyebabkan penyusutan, pembengkakan, atau perubahan sel lainnya,
8. Fiksasi harus bisa membuat jaringan tahan lama,
9. Fiksasi harus mendapatkan izin untuk pengambilan warna sebagai objek pengambilan foto.

1. Klasifikasi Fiksasi

Klasifikasi fiksasi terhadap tiga kelas, berikut pembagiannya :

a. Berdasarkan komposisinya dibedakan menjadi dua, yaitu:

- Sederhana : Larutan fiksasi yang hanya menggunakan 1 jenis.

Contoh : formalin, etanol

- Campuran : Larutan fiksasi yang digunakan lebih dari 1 jenis.

Contoh : etanol + asam asetat glasial dan formaldehida + merkuri klorida.

b. Berdasarkan efek terhadap sel dan jaringan:

- Mikroanatomi : Fiksasi yang memperlihatkan jaringan dengan cara yang disetujui oleh studi mikroskopik secara umum
- Sitologi : Fiksasi dengan melihat struktur intrasel yang dibagi dua bagian, yaitu nukleus dengan pH kurang dari 4,6 dan sitoplasma dengan pH lebih dari 4,6.

c. Berdasarkan golongannya :

- Aldehid : formaldehida, glutaraldehida, akrolein, glioksal.
- *Oxidizing agents* : osmium tetroksida, potassium dikromat, asam kromatik.

- *Unknown mechanism* : asam pikrat, merkuri klorida.
- *Protein-denaturing agents* : asam asetat, metil alkohol, etil alkohol.
- *Physical* : Panas, *microwave*.

2. Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Fiksasi

Faktor-faktor yang mempengaruhi fiksasi adalah sebagai berikut:

a. pH

pH optimal untuk dilakukan fiksasi adalah 6-8 kali. Jika diluar rentang nilai tersebut maka secara garis besar dapat menyebabkan perubahan pada struktur jaringan, menjadi rusak akibat presipitasi sel (Texas, 2013). Perubahan pH akan mempengaruhi jumlah ion sehingga akan terjadi peningkatan atau penurunan laju reaksi yang memberikan efek padaa pengamatan mikroskopik (Waheed, 2012).

b. Suhu

Fiksasi yang akan dilihat dalam mikroskop elektron lebih baik disimpan pada suhu 0-4 (Anil, 2008). Penggunaan panas untuk fiksasi dibidang bakteriologi biasanya formalin yang dipanaskan dengan suhu 60 .

c. Penetrasi

Penetrasi saat fiksasi biasanya berlangsung lambat karena dinding sel bersifat semi permeabel. Komponen yang ada dalam intrasel akan menahan daya penetrasi saat fiksasi. Untuk menghitung kedalaman penetrasi menggunakan rumus sebagai berikut :

$$d = K \sqrt{t}$$

Dimana d merupakan kedalaman penetrasi dalam (mm). K merupakan koefisien dari kemampuan difusi suatu zat fiksasi, dan t adalah waktu fiksasi (jam).

Berikut adalah nilai K pada beberapa pelarut

Tabel 2.1 Nilai K pada Zat Fiksasi

Zat fiksasi	Nilai K
-------------	---------

10% formalin dalam suhu ruangan	0,78mm/jam
0,1 asam pikrat $C_2H_2N_2O_2$	0,5mm/jam
Etanol C_2H_2O	0,1mm/jam
0,3% Potassium Dikromat	0,33mm/jam

Untuk kebutuhan tertentu, penetrasi memiliki nilai tersendiri, seperti pada mikroskop elektron ($1mm^3$) (Anil, 2008). Selain itu pengambilan penetrasi pada jaringan seperti uterus harus dibuka dengan lebar, sedangkan lim fa dipotong dengan tipis.

d. 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.

e. Osmolaritas

Osmolaritas berperan penting dalam menjaga bentuk sel. Nilai normal untuk osmolaritas yang isotonik adalah 340-400 mOsm. Jika osmolaritas terlalu tinggi atau hipertonik maka sel akan mengalami penyusutan.

f. Substansi yang ditambahkan pada larutan

Larutan fiksasi biasanya terdiri dari beberapa zat, yakni agen fiksasi, larutan penyangga, dan air. Pada penelitian secara biokimiawi penambahan garam dapat menyebabkan denaturasi, namun garam seperti amonium sulfat dan potasium dihidrogen fosfat dapat memberikan efek stabilisasi protein yang kuat. Asam tanik dapat meningkatkan fiksasi lemak dan protein pada pengamatan mikroskop elektron yakni dengan memperbaiki kerja mikrotubulus filamen.

g. Konsentrasi

Konsentrasi memberikan efek positif yaitu dengan mempercepat proses fiksasi melalui banyaknya molekul yang terbentuk. Namun ada batasan dalam hal ini, yakni :

1) Pertama, beberapa fiksasi harganya mahal, sehingga tidak dapat dikonsentrasikan

2) Kedua, nilai maksimum suatu daya larut fiksasi menentukan pada batas mana fiksasi bisa digunakan. Contohnya, penggunaan asam pikrat dengan konsentrasi 1% dapat digunakan sebagai fiksatif, tetapi jika menggunakan konsentrasi 10% asam pikrat tidak bisa digunakan sebagai fiksatif.

h. Durasi/Waktu

Secara umum fiksasi dilakukan selama 12-24 jam pada suhu ruangan yang berkisar 25-30 . Waktu fiksasi tergantung dari jenis fiksatifnya, larutan formalin harus membutuhkan waktu minimal 24 jam baru bisa dilakukan dehidrasi. Jika jaringan difiksasi dengan formalin selama 24 jam maka sebagian besar dari formalin tersebut akan luruh, tetapi formaldehida bereaksi sangat cepat dengan komponen jaringan dan sebagian reaksi bersifat reversible. Semakin lama fiksasi dengan formalin dapat menyebabkan penyusutan dan pengerasan pada jaringan (Rina, 2013).

D. Fiksasi Formalin

Formalin atau formaldehida adalah gas yang terbentuk dalam gugusan aldehida (-CHO). Konsentrasi formaldehida yang sering digunakan untuk fiksasi adalah 4%-10%. Formaldehida adalah gas yang keras sehingga dapat menyebabkan terjadinya iritasi. Salah satu alasan menggunakan formaldehida dalam fiksasi karena dapat menurunkan tekanan atmosfer dan vakum untuk pemrosesan jaringan. Formaldehida yang dijual dipasaran berkisar 35%-40% namun kemungkinan terdapat zat-zat yang tidak murni seperti asam format dan metanol. Tetapi formaldehida yang dapat digunakan untuk memfiksasi jaringan adalah konsentrasi 10%, sedangkan untuk memfiksasi jaringan otak adalah konsentrasi 15% (Jamie, 2010).

Dalam larutan, formalin berbentuk monohidrat yang setimbang dengan metilen glikol, tetapi dalam kesetimbangan tersebut masih terdapat molekul polimer. Pada beberapa penelitian formaldehida yang dianjurkan menggunakan pH 7 dan fosfat sebagai penyangga pH tersebut agar tetap konstan. Proses fiksasi berlangsung selama 12-18 jam dan dilanjutkan dengan fenol formalin selama 6 jam atau lebih.

Penggunaan formalin sebagai fiksasi direkomendasikan untuk kebutuhan teknik histologi dan histokimia. Dalam beberapa fiksasi, alkohol ditambahkan ke dalam formalin karena memiliki keuntungan lebih cepat dan menghasilkan glikogen yang lebih baik meskipun sel darah merah banyak yang hancur (John, 2010).

Kelebihan dari formaldehida :

1. Formalin lebih murah, mudah dipersiapkan, dan stabil.
2. Formalin memfiksasi jaringan tanpa merubah warna asli dari jaringan tersebut.
3. Formalin tidak menyebabkan penyusutan dan kerapuhan.
4. Fiksasi yang terbaik untuk jaringan saraf.
5. Pematangan beku lebih mudah diambil dengan menggunakan formalin.
6. Pewarnaan yang berbeda bisa digunakan dari jaringan yang menggunakan formalin.
7. Fiksasi yang baik untuk lemak dan protein.
8. Ikatan fiksasi dari formalin dapat mudah dipersiapkan untuk pengerjaan suatu jaringan. Jaringan yang telah menggunakan formalin tidak perlu dicuci sebelum pengerjaan.

Kekurangan dari formaldehida :

1. Salah satu fiksasi yang beracun dan dapat menyebabkan iritasi pada kulit jika digunakan dalam waktu yang lama.
2. Dapat menguap ke udara sehingga dapat menyebabkan iritasi pada mukosa hidung.
3. Dapat menyebabkan asma pada orang yang mengalami alergi.
4. Dalam penyimpanan yang lama, terutama dalam suhu yang dingin dapat berubah menjadi paraformaldehida yang tidak efektif untuk fiksasi dan juga memiliki bau yang tidak nyaman akibat proses dekomposisi.
5. Untuk penggunaan mikroskop elektron harus menggunakan formalin yang murni tanpa metanol.
6. Asam format yang terdapat dalam formalin dapat menurunkan kualitas pewarnaan dan mengotori nukleus.

7. Pada jaringan yang mengandung banyak darah seperti limfa, formalin yang tidak berikan buffer akan menyebabkan pembentukan artefak berwarna hitam dan bergranul.

8. Formalin memiliki kecepatan fiksasi yang standar karena waktu yang dibutuhkan hanya 12-24 jam.

E. Teknik Pembuatan Blok

Metode yang digunakan pada penelitian kali ini adalah metode parafin yaitu metode yang paling sering digunakan. Keuntungan menggunakan metode ini yaitu pertama, irisan dapat lebih tipis dibandingkan menggunakan metode lainnya yaitu dapat mencapai ketebalan rata-rata 6 mikron. Kedua, irisan yang sifatnya seri dapat dengan mudah dikerjakan. Ketiga, proses pengerjaannya lebih cepat dibandingkan dengan metode seloidin (mikrotom beku) (Gartner, 2012).

Selain keuntungan tentu ada kerugian dari metode ini yaitu jaringannya akan menjadi keras, mengerut dan mudah patah serta untuk jaringan yang besar akan sulit dikerjakan dan enzim-enzim akan larut pada metode ini. Pada pengolahan pembuatan blok ini dimulai dari fiksasi, pencucian (*washing*), dehidrasi, penjernihan (*clearing*), infiltrasi parafin, penanaman (*embedding*), penyayatan (*section*), penempelan (*affixing*), deparafinisasi, pewarnaan (*staining*), penutupan (*mounting*), dan *labeling* (Waheed, 2012).

1. 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. Proses dehidrasi ini menggunakan alkohol bertingkat. Mulai dari alkohol 30%, 50%, 70%, 80%, 95% dan alkohol absolut. Prosesnya, suatu jaringan akan dicelupkan dimasing-masing alkohol dengan kisaran waktu tertentu sampai prosesnya berakhir (Rina, 2013).

Dehidrasi kuat yang lebih cepat menarik air daripada alkohol adalah *aseton* yang lebih murah biayanya, dan hanya membutuhkan satu macam konsentrasi saja. Namun *aseton* dapat menyebabkan jaringan menjadi mengerut, distorsi, sangat

kering, dan terlalu keras sehingga menyebabkan masalah saat pemotongan setebal 2-7 mikron dengan mikrotom (Waheed, 2012).

2. 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 (Jhonson, 2011).

Proses *clearing* ini menggunakan bermacam-macam zat penjernih yaitu *xylol* dan *xylene* dan *toluol* atau *toluene* yang memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. *Xylol* atau *xylene* kelebihanannya yaitu prosesnya cepat dan harganya tidak terlalu mahal. Kekurangannya yaitu jaringan yang dapat dipindahkan hanya dari alkohol absolut, dan jaringan yang dijernihkan dengan *xylene* tidak begitu jelas menjadi transparan, sehingga tidak diketahui proses ini berjalan sempurna atau tidak (Jusuf, 2009).

Toluol atau toluene kelebihanannya yaitu sudah banyak dipergunakan oleh kebanyakan laboratorium, harganya murah, mudah didapat, dan jaringan yang penjernihannya sempurna akan terlihat jelas transparan. Tetapi apabila jaringan tidak terlihat transparan berarti proses dehidrasi yang sebelumnya belum sempurna. Kekurangannya yaitu jaringan hanya bisa dipindahkan dari alkohol absolut apabila jaringan terlalu lama ditoluol akan menyebabkan kerasnya jaringan sehingga sukar untuk dipotong menggunakan mikrotom (Mescher, 2012).

Jenis larutan yang digunakan dalam penjernihan :

a. Xylene

Xylene memberikan hasil yang bagus pada jaringan yang lebarnya tidak melebihi 4 mm. Pemberian minyak imersi juga tidak boleh terlalu lama karena dapat mengalami distorsi pada jaringan.

b. Toluene

Toluene memiliki kemampuan yang sama seperti *xylene*, tetapi tidak berefek pada pemberian minyak imersi yang lama. Zat ini cocok untuk pembersihan secara otomatis meskipun memiliki efek yang berbahaya.

3. Penanaman (*embedding*)

Penanaman (*embedding*) merupakan proses untuk mengeluarkan cairan pembeningan 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 di benamkan dilarutan parafin selama 3x dan dalam jangka waktu tertentu sambil dipanaskan agar parafinnya tidak membeku. Keuntungan menggunakan parafin dengan titik lebur rendah yaitu jaringannya tidak mudah menjadi rapuh (Kumar, 2010).

Paraffin wax adalah medium yang sering digunakan untuk mengisi suatu wadah dengan memecahkan minyak mineral dan digabung dengan senyawa hidokarbonat jenuh. Beberapa jenis parafin memiliki titik lebur yang bervariasi berkisar antara 40-70 . Normalnya parafin melebur pada suhu 54-58 . Jika ingin mendapatkan parafin yang sesuai dengan kebutuhan dapat menambahkan beberapa zat, seperti *lard*, *beeswax*, *stearic acid*, *rubber*, dan *ceresin* (Waheed, 2012).

Paraplast merupakan medium yang tersusun dari parafin murni dan beberapa polimer plastik sintesis. Paraplast memiliki rentan titik lebur yang lebih sempit daripada parafin yakni 56-57.

Keuntungan memakai paraplast yaitu sifat parafinnya sangat elastis sehingga tidak mudah sobek atau rusak ketika dipotong (Khulmann, 2009).

4. Pembuatan *blocking*

Pembuatan *blocking* merupakan proses pembuatan preparat agar dapat dipotong menggunakan mikrotom. Proses ini menggunakan parafin sebagai alat menempelkan jaringannya agar mudah dipotong. Prosesnya yaitu dengan menyiapkan tempat *blocking*, dan menuangkan parafin, dilanjut 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 (Steven, 2013).

Blok parafin yang sudah beku dan akan dipotong harus diberi label atau disebut *affixing*, metode ini bertujuan agar diketahui organ yang akan dipotong nantinya. Pengecoran (*Blocking*) adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom.

5. Pemotongan Organ

Pemotongan organ 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 diinginkan.

Terdapat berbagai jenis mikrotom yaitu:

a. *Hand microtome*

Merupakan jenis mikrotom yang sangat simpel dan biasanya digunakan untuk memotong tumbuhan dan jaringan hewan, tetapi mikrotom jenis ini sangat terbatas kemampuannya untuk memotong jaringan setipis mungkin.

b. *Rocking microtome*

Mikrotom jenis ini merupakan jenis yang hanya bisa memotong jaringan yang lembut dan tingkat kesulitannya rendah. Untuk jaringan yang lebih sulit contohnya, jaringan yang tingkat kekakuannya tinggi dapat menggunakan jenis *rotary microtome* atau *base sledge microtome* dibandingkan dengan *rocking microtome*.

c. *Rotary microtome*

Mikrotom jenis ini memiliki banyak keuntungan dan jenis yang paling cocok dengan metode *block* parafin. Mikrotom ini juga dapat memotong jaringan yang sangat besar dan tingkat kesulitan yang besar. Dengan metode ini, *block* dapat dipotong hingga ketebalan 0,5 sampai 2 mikrometer.

d. *Freezing microtome*

Metode ini memiliki banyak keuntungan yaitu diantaranya prosesnya cepat, jaringan yang mengkerut lebih sedikit dibandingkan dengan metode parafin serta hampir semua metode pewarnaan dapat dilakukan menggunakan metode ini. Selain keuntungan ada juga kerugiannya yaitu, irisan yang tipis dan irisan yang sering sulit untuk diperoleh.

e. *Base Sledge microtome*

Mikrotom jenis ini merupakan jenis yang paling banyak digunakan. Karena mikrotom jenis ini dapat memotong berbagai jenis, ukuran, dan tingkat kekerasan suatu jaringan. Mikrotom jenis ini cara pengoperasiannya secara hidrolis, sehingga memudahkan pemotongan dan dapat memotong bahan yang sangat keras sekalipun.

f. *Vibrating knife microtome*

Mikrotom jenis ini dapat memotong jaringan tanpa melakukan fiksasi. Mikrotom ini memiliki keuntungan pada preparat jaringan untuk uji enzimatik. Prinsip mikrotom ini dengan menggunakan elektron yang berada di jaringan, sehingga mampu memproses untuk pemotongan mikroskopik.

Prosedur persiapan pemotongan jaringan yaitu:

a. Persiapan pisau mikrotom

Jaringan yang akan dipotong harus menggunakan pisau yang tajam. Maka dari itu, pisau harus dipastikan ketajamannya dan harus diasah terlebih dahulu agar jaringan nantinya akan terpotong dengan baik. Selanjutnya pisau mikrotom diletakkan dengan sudut tertentu dan diatur ketebalan yang diinginkan. Kemudian blok parafin yang telah direkatkan pada holder letakkan ditempatnya pada mikrotom.

b. Persiapan kaca objek

Sebelum jaringan yang telah dipotong dimasukkan ke kaca objek, terlebih dahulu dilakukan pelapisan kaca objek menggunakan zat perekat. Contohnya, albumin, gelatin, *starch*, *cellulose*, *sodium silicate*, *resin*, *poly-L-lysine*.

c. Persiapan waterbath dengan suhu 37-40 °C

d. Persiapan kuas untuk memudahkan pengambilan jaringan yang telah dipotong.

Teknik pemotongan blok parafin yaitu:

- a. Blok parafin yang berisi jaringan diletakan pada dudukan mikrotom dan dikunci dengan kuat.
- b. Atur sudut kemiringan pisau mikrotom. Biasanya berkisar 30-40 derajat.
- c. Atur ketebalan yang diinginkan, ketebalan yang dapat dipakai biasanya 5-7 mikrometer.
- d. Gerakkan blok preparat kearah pisau sedekat mungkin dan potonglah blok preparat secara teratur ketebalannya. Buang pita-pita parafin yang tanpa jaringan sampai mendapatkan potongan yang mengandung preparat jaringan.
- e. Pita parafin yang mengandung jaringan dipindahkan menggunakan kuas ke dalam *waterbath* dengan suhu 37-40 derajat dan diamkan beberapa saat sampai pita parafin yang berisi potongan jaringan mengembang dan tidak meggulung.
- f. Setelah pita parafin mengembang dengan baik, tempelkan pita parafin pada kaca objek yang sebelumnya sudah direkatkan dengan albumin. Masukkan kaca objek ke dalam *waterbath* sampai mendapatkan pita parafin beserta jaringannya dan keluarkan secara perlahan.
- g. Letakkan kaca objek yang berisi pita parafin diatas hotplate dengan suhu 40-45 dan biarkan beberapa jam. Atau dapat juga menggunakan cara lain yaitu dengan melewati kaca objek di atas api sehingga pita parafin merekat di atas kaca objek.
- h. Setelah air mengering dan pita parafin sudah meleleh dengan kuat, kaca objek dapat dilanjutkan ke proses pewarnaan.

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 hematoxilin dan eosin (Waheed, 2012).

Jika terdapat potongan jaringan yang tidak terwarnai dan langsung dilihat ke mikroskop cahaya, maka komponen seluler tersebut, terlihat sama antara yang satu dengan yang lainnya. Pewarnaan dilakukan untuk memberikan perbedaan warna pada komponen tiap sel (Boyd, 2009).

Faktor yang mempengaruhi pewarnaan:

a. Reaksi asam basa

Komponen sel di alam terdiri dari komponen asam dan basa. Untuk komponen asam dapat diwarnai dengan komponen basa dan pelarut dasar, begitupun sebaliknya.

b. Adsorpsi

Dalam adsorpsi, molekul kecil nantinya akan menempel pada molekul sel yang lebih besar.

c. Perbedaan Kelarutan

Pada larutan yang berbeda, jenis pewarnaan tergantung dari tingkat kelarutan yang ada pada sel. Contohnya, untuk pewarnaan lipid dapat menggunakan *sudan Black B* atau *Oil Red O*.

7. Pewarnaan HE

Hematoksilin didapatkan dari ekstrak pohon *Haematoxylon campechianum 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 spontan namun lama. Tetapi untuk proses pematangan yang berlangsung sangat cepat dapat ditambahkan senyawa kimia, seperti merkuri, oksida dan sodium iodida (Jamie, 2010).

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 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 (Hendrich, 2004).

Pada metode regresif, jaringan dibiarkan dalam larutan sampai beberapa waktu kemudian larutan tersebut dibuang. Sedangkan pada metode progresif, jaringan di celupkan ke dalam larutan hematoksilin hingga intensitas yang diinginkan tercapai seperti pada pemotongan jaringan yang beku (Anil, 2008).

Eosin adalah pewarnaan asam yang memiliki afinitas terhadap sitoplasma sel sedangkan pada hematoksilin memiliki afinitas terhadap nukleus. Eosin penggunaannya lebih aman dibandingkan dengan hematoksilin. Namun satu-satunya masalah pada eosin adalah pewarnaan yang berlebihan terutama pada jaringan yang memiliki dekalsifikasi (Rina 2013).

F. Organ Ginjal Tikus

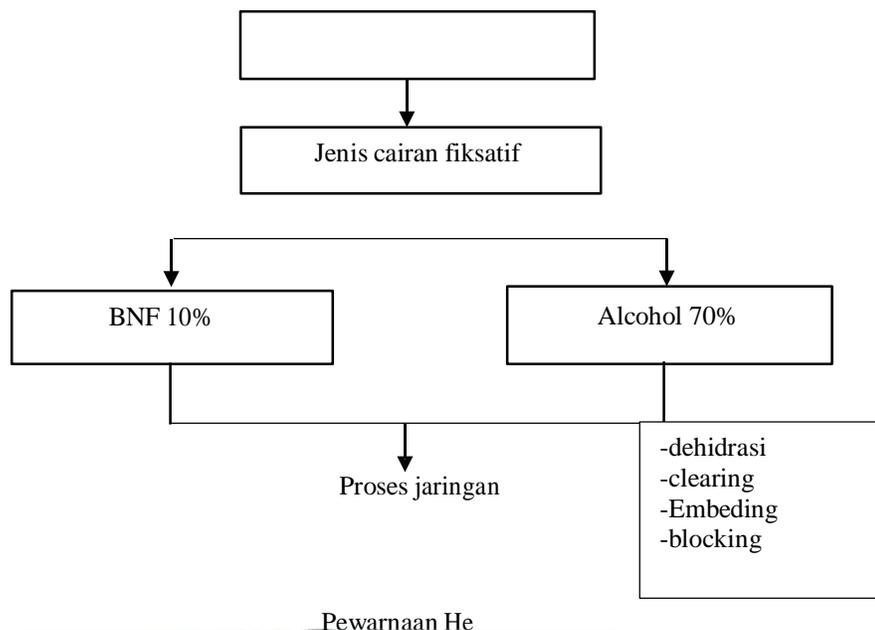
Ginjal adalah sepasang organ yang berbentuk seperti kacang dibungkus oleh suatu kapsula yang tipis dari jaringan ikat. Setiap ginjal terdiri dari 1-1,4 juta unit fungsional yang disebut dengan nefron. Ginjal dibagi menjadi korteks dan medula, dimana didalamnya terdapat bagian nefron yang berbeda.

Pada korteks terdiri dari glomerulus, kapsula bowman, tubulus kontortus, dan ansa henle segmen tebal. Sedangkan pada medula ginjal terdiri dari ansa henle segmen tipis, pembuluh darah kecil (vasa rekta). Dan duktus kolektivus (Gartner, 2012).

Ginjal merupakan organ berwarna coklat kemerahan seperti kacang merah yang terletak tinggi pada dinding posterior abdomen, berjumlah sebanyak dua buah dimana masing-masing terletak di kanan dan kiri (Snell, 2006). Ginjal adalah organ yang mempunyai peranan sangat penting didalam tubuh yang berfungsi untuk membuang sampah hasil metabolisme dan racun tubuh dalam bentuk urin atau seni. Selain itu, ginjal berperan dalam mempertahankan keseimbangan air, garam dan elektrolit, tidak kalah pentingnya ginjal merupakan kelenjar endokrin yang sedikitnya mengeluarkan 3 hormon. Ginjal juga merupakan organ tubuh yang rentan terhadap pengaruh paparan zat kimia, karena ginjal menerima 25-30% sirkulasi darah untuk dibersihkan, karena ginjal sebagai organ filtrasi kemungkinan terjadinya perubahan patologik sangat tinggi (Corwin, 2001).

G. Kerangka Teori

Fiksasi 24 jam + 2 minggu



Pewarnaan He

Kualitas sediaan organ ginjal tikus
sprague dawley

Skema 2.2 Kerangka Teori

H. Kerangka Konsep



Skema 2.3 Kerangka Konsep

I. Hipotesis

Terdapat perbedaan perbandingan antara kualitas sediaan organ ginjal tikus dengan fiksasi 24 jam dengan 2 minggu menggunakan BNF 10% dan Alkohol 70% pada pewarnaan He.