

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Histoteknik

Histoteknik adalah metode atau cara untuk membuat sajian histologi dari spesimen tertentu melalui suatu rangkaian proses hingga menjadi sajian yang siap untuk diamati atau dianalisis. Sajian histologi yang baik dapat digunakan untuk bahan pengajaran praktikum mahasiswa untuk mempelajari bentuk dan struktur jaringan tubuh tertentu, sebagai riset untuk mempelajari perubahan jaringan dan organ tubuh hewan percobaan, dan membantu menegakan diagnosis penyakit yang diderita oleh seorang pasien. Tujuan tersebut dapat tercapai apabila sajian histologi yang dibuat dapat memberikan gambaran tentang bentuk serta susunan sel, inti sel dan sitoplasma, badan inklusi (glikogen, tetesan lemak, pigmen), susunan serat jaringan ikat, otot dan lain sebagainya sesuai dengan gambaran jaringan tubuh tersebut dalam kondisi hidup (Jusuf, 2009).

Sajian yang baik dapat membantu dalam memahami struktur histologi jaringan tubuh sesuai dengan kondisi yang sebenarnya pada waktu hidup. Sajian yang baik juga akan memberikan hasil yang benar-benar akurat yang sangat dibutuhkan oleh para peneliti untuk menjawab permasalahan yang timbul. Selain itu, sajian yang baik juga diperlukan oleh klinisi untuk menunjang diagnosis penyakit yang diderita oleh pasien (Jusuf, 2009).

Rangkaian proses pembuatan sajian histologi terdiri atas fiksasi (fixation), dehidrasi (dehydration), pembersihan (clearing), penanaman (impregnasi/embedding), pengeblokan (blocking), pemotongan jaringan (sectioning), pembuatan sediaan (afixing), pewarnaan (staining), penutupan (mounting), dan pelabelan (labelling). Langkah awal dalam isolasi jaringan tubuh adalah melakukan persiapan alat yang terdiri atas peralatan bedah minor, peralatan anestesi dan obat anestesi, serta perangkat pengawetan jaringan. Persiapan alat terdiri atas peralatan bedah minor yaitu gunting, pinset, skalpel, klem, pemegang jaringan, kassa, meja operasi dan lampu. Peralatan anestesi terdiri dari disposable

syringe dan sungkup/masker anestesi. Obat anestesi misalnya eter, ketalar, phenonborbital, serta perangkat pengawetan jaringan (fiksasi jaringan) yang terdiri atas wadah untuk fiksasi emersi, cairan fiksasi formalin, alkohol, formol, salin, muller, bouin, zenker, serta peristaltik pump/syringe pump untuk fiksasi supervital (sumanto, 2014)

Persiapan sampel perlu dilakukan apabila sampel diambil dari hewan. Persiapan sampel tersebut meliputi pemilihan hewan harus sehat, status gizi baik, dan dipelihara sesuai dengan syarat-syarat pemeliharaan hewan coba. Sedangkan sampel dari kadaver atau manusia harus segera diambil dan dimasukkan ke dalam larutan fiksasi. Tahapan pengambilan jaringan hewan adalah pembiusan, pembedahan, isolasi jaringan tubuh, dan fiksasi supra vital/intravital. pembiusan hewan yang akan diambil jaringan tubuhnya dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu pembiusan dengan menyuntikan zat asnestesi seperti

Chloralhydrate, ketalar, phenobarbital, dan sebagainya. Setelah hewan terbius sempurna, proses selanjutnya adalah melakukan operasi dan pengambilan jaringan tubuh yang diinginkan. Jaringan tubuh kemudian dipotong-potong dan dibilas cairan NaCl 0,9% untuk menghilangkan darah (jusuf,2009).

B. Larutan Fiksatif

Dasar dari pembuatan sajian histologi yang baik adalah melakukan fiksasi yang benar. Kesalahan yang di lakukan pada tahap fiksasi tidak akan pernah dapat di perbaiki lagi pada tahapan selanjutnya. Hasil akhir sajian histologi yang baik sangat tergantung pada cara melakukan fiksasi. Tujuan dari fiksasi adalah mengawetkan jaringan yaitu mempertahankan susunan jaringan agar mendekati kondisi seperti sewaktu hidup dan mengeraskan jaringan terutama pada jaringan lunak supaya memudahkan pembuatan irisan tipis. Fiksasi akan menghambat terjadinya pembusukan yang di sebabkan oleh kuman-kuman pembusuk yang berasal dari luar tubuh (jusuf,2009)

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam pembuatan jaringan histologi adalah tebal irisan jaringan, volume larutan fiksasi dan jenis cairan fiksasi. Tebal

irisan jaringan adalah 3-5 mm sehingga larutan fiksasi dapat dengan cepat masuk keseluruh jaringan. Apabila irisan terlalu tebal maka hanya permukaan luarnya saja yang difiksasi dengan baik, sedangkan bagian tengah jaringan sudah membusuk sebelum larutan fiksasi masuk kedalam jaringan. Volume larutan fiksasi sekurang-kurangnya harus 10-20x volume jaringan yang akan difiksasi. Besarnya volume jaringan menentukan volume fiksasi yang diperlakukan sedangkan tebal jaringan menentukan kecepatan fiksasi. Panjang dan lebar jaringan umumnya ditentukan oleh jenis mikrotom yang akan digunakan (jusuf,2009).

Jenis larutan fiksasi yang akan digunakan tergantung unsur jaringan yang akan didemonstrasikan dan jenis pewarnaan yang akan digunakan. Larutan fiksasi dapat dibedakan menjadi 3 kelompok yaitu micro-anatomical fixation, cytological fixatives, dan histochemical fixatives. Micro-anatomical fixation digunakan apabila struktur histologis jaringan akan dipertahankan dengan hubungan yang akan benar antara lapisan jaringan akan di pertahankan dengan hubungan yang benar antara lapisan jaringan dan kelompok sel. Larutan fiksasi yang tergolong kelompok ini adalah larutan formalin atau modifikasinya, larutan asetik alkohol formalin, Heidenhain susa, Zenker, dan Bouin. Cytological fixatives digunakan apabila struktur intraselular atau badan inklusi hendak dipertahankan. Tujuan tersebut dapat dicapai dengan cara melakukan penetrasi larutan yang merata. Fiksasi ini dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu fiksasi inti (nuklear) dan fiksasi sitoplasma. Larutan fiksasi yang tergolong dalam kelompok ini adalah fiksasi inti (larutan carnov) dan fiksasi sitoplasma (larutan Muller, formol salin, formol calcium, zenker formol). Histochemical fixatives digunakan apabila jaringan akan diwarnai dengan pewarnaan histokimia. Larutan fiksasi yang digunakan tidak boleh mengubah unsur-unsur yang akan didemonstrasikan (jusuf, 2009).

Metanol merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Alkohol tidak secara rutin digunakan untuk mengawetkan jaringan karena menyebabkan terlalu rapuh dan keras pada preparat. Hal ini disebabkan daya tembus larutan yang kurang baik di karenakan larutan metanol yang bersifat asam menyebabkan jaringan cepat

menjadi keras dan mengkerut. Penyusutan akibat fiksasi yang terlalu lama membuat pori-pori membran sel membesar, sehingga ketika di lakukan dehidrasi, alkohol yang bersifat hidrofilik membuat cairan di dalam sel akan mudah keluar ke ekstrasel (Jamie et al, 2010)

Larutan fiksatif lain yang dapat digunakan dalam proses histoteknik adalah alkohol 70%. Alkohol merupakan larutan fiksasi yang berfungsi sebagai bahan fiksasi sediaan sitologi namun dalam keadaan terpaksa dapat digunakan sebagai fiksasi sediaan histopatologi. Fiksasi alkohol tidak dapat digunakan pada suhu rendah karena albumin dan globulin dalam plasma akan larut. Pengamatan lipoid. Fiksasi alkohol dapat digunakan untuk mengawetkan enzim tertentu, misalnya alkaline phosphatase. Alkohol dalam presentasi tinggi banyak digunakan untuk fiksasi glikogen. Daya penetrasi alkohol terhadap jaringan cepat, akan tetapi penetrasi terhadap plasma darah lambat (Dawar, 2015). Setelah difiksasi dengan alkohol jaringan tidak perlu dicuci secara khusus dan dapat langsung ke tahap penjernihan. Kekurangan fiksasi dengan alkohol adalah dapat mengerutkan jaringan sehingga jaringan tidak terpulas dengan baik (sumanto, 2014)

C. Processing Jaringan

Dehidrasi adalah proses yang bertujuan untuk menghilangkan kandungan air yang terdapat di dalam jaringan. Jaringan yang sudah difiksasi bersifat akuosa karena larutan fiksatif memiliki kelarutan dalam air yang akan mengganggu proses penjernihan. Prinsip penghilangan air dilakukan perlahan supaya jaringan tidak mengkerut akibat kehilangan air secara mendadak. Kandungan air dalam jaringan harus diganti dengan larutan lain yang nantinya dapat menyatu dengan larutan clearing (sumanto, 2014).

Clearing adalah tahapan yang bertujuan untuk menjernihkan jaringan dari berbagai komponen biokimia yang dapat mengganggu pewarnaan sediaan. Larutan clearing yang biasa digunakan pada proses histoteknik adalah xylol. Sifat larutan xylol yang sangat menolak air dapat dijadikan kontrol keberhasilan proses dehidrasi. Apabila pada langkah awal larutan clearing menjadi keruh maka

menandakan proses dehidrasi belum sempurna dan jaringan masih mengandung air (sumanto, 2014). Tahap selanjutnya adalah penanaman jaringan. Bahan yang digunakan adalah parafin yang memiliki titik lebur 60°C . Xylol yang semula mengisi jaringan akan menguap akibat suhu inkubator yang lebih tinggi (sumanto,2014)

Setelah penanaman jaringan tahap selanjutnya adalah pengeblokan. Pengeblokan membutuhkan parafin padat yang dicairkan dan sebuah cetakan. Jaringan yang sudah terblok kemudian dipotong menggunakan mikrotom. Pemotongan blok jaringan yang baik akan menghasilkan pita potongan jaringan yang panjang. Potongan jaringan tersebut lalu dibuat sediaan (afixing). Afixing adalah proses menempelkan potongan jaringan pada kaca objek untuk kemudian dilakukan pewarnaan (sumanto, 2014).

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan dapat diamati dengan mikroskop. Proses timbulnya warna terkait dengan terjadinya ikatan antara molekul tertentu yang terdapat pada daerah dan struktur jaringan yang tertentu, sinar dengan panjang gelombang tertentu yang terdapat dalam sinar yang berasal dari cahaya matahari atau lampu mikroskop yang dipaparkan pada sajian yang telah diwarnai akan diabsorpsi (diserap) atau diteruskan. Zat warna yang terikat pada jaringan akan menyerap sinar dengan panjang gelombang tertentu sehingga jaringan tersebut akan tampak berwarna (jusuf, 2009).

Pewarnaan yang sering digunakan secara rutin adalah pewarnaan yang dapat digunakan untuk memulas inti dan sitoplasma serta jaringan penyembungnya yaitu HE. Pewarnaan HE menggunakan 2 macam zat warna yaitu hematoxilin yang berfungsi untuk mewarnai inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan counterstaining hematoxilin yang digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan. Jenis hematoxilin yang sering dipakai adalah mayer, delafied, erlich, bullard dan bohmer, sedangkan counterstaining yang dipakai adalah eosin, safranin dan phloxine (jusuf, 2009).

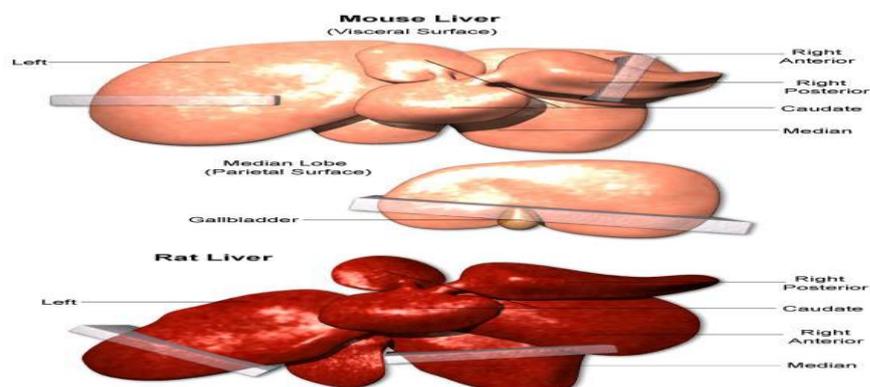
Larutan eosin yang digunakan terdiri atas larutan stok (stock solution) dan larutan kerja (work solution) pewarna rutin yang banyak dipakai adalah pewarna hematoksilin-eosin. Kelebihan pulasan tersebut adalah diferensiasi warna sangat jelas, mewarnai inti sel dengan baik dan jelas dengan background yang tidak berwarna, hasil konsisten dan prosedurnya. Sediaan yang telah diwarnai dapat diawetkan untuk jangka waktu yang lama apabila dilakukan penutupan secara permanen. Penutupan dilakukan dengan meneteskan kanada balsam sebagai perekat kemudian menutupnya dengan kaca penutup (jusuf,2009)

D. Hati

a) Anatomi hati

Hati merupakan organ yang mempunyai berbagai macam aktivitas metabolisme. Hati dibungkus sampai tipis jaringan ikat yang menebal dihilum, tempat vena porta dan arteri hepatica memasuki hati dan duktus hepaticus kiri dan kanan serta tempat keluarnya pembuluh limfe. Hati terletak dipermukaan caudal dan diafragma dan membentang disisi median dan sisi kanan lengkungan kosta kiri. Bagian cranial hati terbentuk cembung yang bersentuhan dengan otot diafragma dan bagian visceral berbentuk cekung karena bersentuhan dengan perut dari duodenum.

Hati tikus terbagi menjadi empat lobus yaitu lobus kiri, lobus median, lobus kanan dan lobus caudatus. Beberapa ligamentum yang merupakan pirotoneum membantu menyongkong hati. Dalam hati terdapat 3 jenis jaringan yang penting yaitu sel parenkim hati, susunan pembuluh darah dan susunan saluran empedu.



Gambar 2.1 Hati Tikus (Bredo *and* Vazquez, 2011).

b) Fisiologi hati

Hati adalah organ dalam yang paling besar dan mempunyai peranan utama dalam metabolisme tubuh. Hati memproduksi empedu yang membantu pencernaan lemak dan hati sendiri memproses asam amino, glukosa, asam lemak, serta gliserol. Hati juga mempunyai fungsi yang lebih jauh, yaitu menetralkan racun, walaupun hati tidak mempunyai perbendaharaan toksikologi untuk membedakan racun dan makanan. Hati melaksanakan fungsi pencernaannya terhadap sebagian besar bahan kimia beracun melalui aktivitas enzim yang beraneka ragam dengan dua cara yaitu degradasi dan konjugasi.

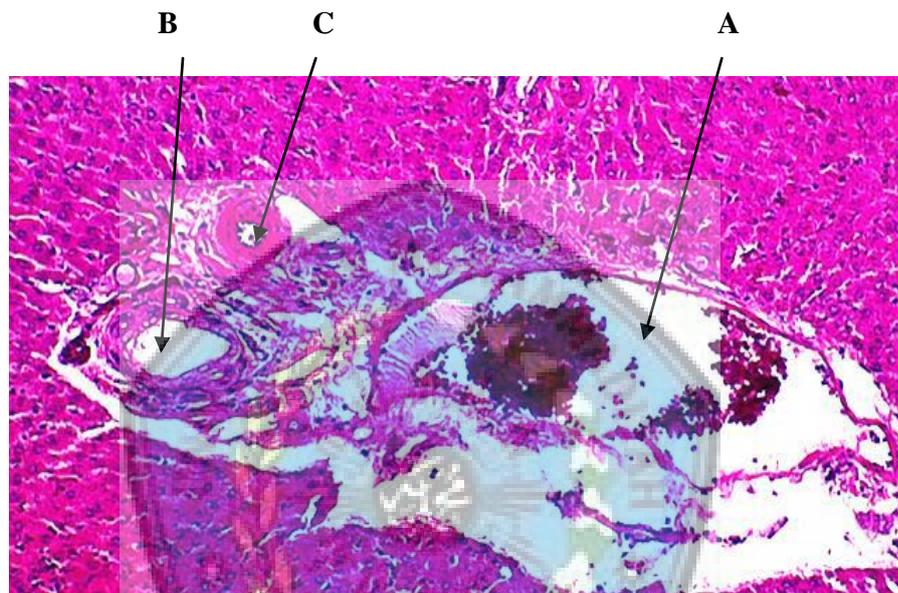
Tujuan hati adalah menghasilkan produk sampingan yang larut dalam air yang dapat dipakai sebagai bahan makanan atau bila berupa bahan asing (bukan bahan makanan), membuat bahan makanan tersebut dapat dikeluarkan melalui urin. Hati memiliki dua ciri khas yang relevan dengan perannya dalam menetralkan racun. Ciri khas pertama adalah induksi enzim. Agens penginduksi adalah faktor yang meningkatkan kadar enzim metabolik yang terkait dan dengan demikian memperbaiki atau mempercepat proses penetralan racun (atau meningkatkan produksi racun sekunder).

c) Histologi hati

Sel-sel yang terdapat dihati antara lain: hepatosit, sel endotel, dan sel makrofag yang disebut sebagai sel kuppfer, dan sel ito (sel penimbun lemak), sel hepatosit berderet secara radier dalam lobulus hati dan membentuk lapisan sebesar 1-2 sel serupa dengan susunan bata. Lempeng sel ini mengarah dari tepian lobulus ke pusatnya dan beranastomosis secara bebas membentuk struktur seperti labirin dan busa. Celah diantara 14 lempeng-lempeng ini mengandung kapiler yang disebut sinusoid hati.

Hati memiliki struktur jaringan yang lunak dan terdapat beberapa komponen pada hati yang dapat berpengaruh terhadap proses fiksasi yaitu adanya lemak, darah dan air dengan kadar yang tinggi (Jusuf, 2009). Berdasarkan komponen-komponen yang terdapat pada hati dapat tersebut dapat menjadi

kekhawatiran pembuatan sediaan jaringan hati saat proses fiksasi yang dapat menyebabkan larutan fiksatif tidak menyerap dengan baik. Potongan jaringan yang terlalu besar mengakibatkan jaringan tidak terfiksasi dengan sempurna dan dapat menyebabkan jaringan membusuk. Selain itu, apabila proses fiksasi terlalu lama akan menyebabkan jaringan menjadi keras dan sulit untuk dipotong.



Gambar 1. Gambaran histologi hati normal dengan pewarnaan HE
Keterangan gambar:

A. Vena Porta

B. Duktus Empedu

C. Arteri Hepatik. Pewarnaan HE, pembesaran 100X

E. Kerangka teori

