

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Histoteknik

Histoteknik merupakan metode atau prosedur dalam pembuatan sediaan histologi dari spesimen tertentu melalui serangkaian tahapan hingga menjadi sajian yang siap untuk diamati atau dianalisa secara mikroskopis menggunakan mikroskop (Suprianto, 2015). Tujuan utama histoteknik untuk mengetahui apakah terdapat perubahan struktur pada jaringan atau sel, serta membantu dalam diagnosis penyakit tertentu (Heryasari, 2024).

Proses pembuatan sediaan histologi terdiri dari 9 tahapan. Diawali dengan isolasi jaringan organ yang diinginkan. Kemudian jaringan tersebut difiksasi agar tidak mengalami proses autolisis. Setelah jaringan difiksasi, dilakukan dehidrasi, dilakukan dehidrasi untuk menghilangkan molekul air agar proses selanjutnya, yaitu *clearing*, dapat berlangsung dengan baik. Tujuan dari *clearing* agar jaringan terlihat transparan dan dapat dilihat di bawah mikroskop. Jaringan dapat dipotong dengan ketebalan 4-6 μm perlu dilakukan penanaman jaringan ke dalam parafin cair (*embedding*), dan pepadatan parafin (*blocking*). Tertanamnya jaringan dalam parafin padat, akan memudahkan proses pemotongan (*cutting*). Tahapan selanjutnya yaitu deparafinisasi yang bertujuan untuk menghilangkan parafin, dilanjutkan dengan dehidrasi

kembali, dan tahapan yang terakhir adalah *staining* atau pewarnaan agar sel-sel penyusun jaringan dapat dibedakan pada mikroskop (Prahanarendra, 2015; Suprianto, 2015).

2. Fiksasi Jaringan

Studi sistematis mengenai fiksatif dimulai pada pertengahan abad 19. Fiksasi itu sendiri dapat menimbulkan artefak dalam sediaan agar tercipta efek protektif (Wulff *et al.*, 2004). Cairan fiksatif yang ada saat ini memiliki kelebihan dan kekurangan. Sejumlah cairan fiksatif yang sudah ada, seperti formaldehid dapat mengurangi reaksi pengenalan antigen. Ketika dikombinasikan dengan pengolahan jaringan pada blok parafin. Saat ini berbagai larutan fiksatif lainnya telah diciptakan dan digunakan dalam waktu 10 tahun terakhir (Eltoum *et al.*, 2001).

Fiksasi merupakan salah satu tahapan dalam histoteknik yang bertujuan untuk mempertahankan jaringan atau sel tetap sama seperti jaringan hidup (*life like state*) yang ideal tanpa terjadi perubahan bentuk maupun ukuran. Fiksasi bertujuan agar jaringan tersebut tetap utuh setelah jaringan keluar dari bagian tubuh. Membuat jaringan agar sedemikian rupa tidak mengalami perubahan atau hanya mengalami perubahan seminim mungkin. Selain itu, fiksasi dapat membuat jaringan lebih mudah menyerap zat warna (Heryasari, 2024; Prahanarendra, 2015).

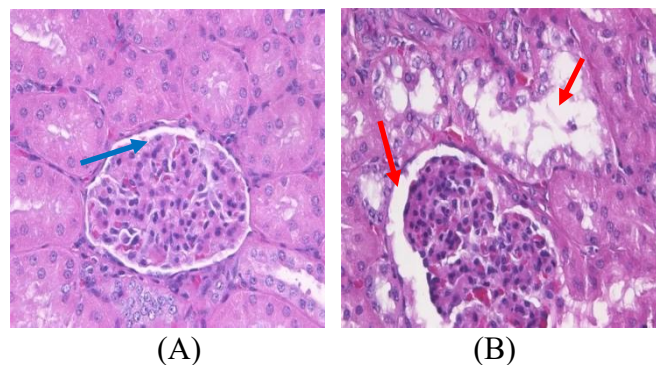
Prinsip kerja dari fiksasi adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk fisiologisnya. Cairan fiksatif

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 (*Cros-linking*) dari dua makromolekul yang berbeda, yakni cairan fiksatif dan protein sel. Hal tersebut 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, enzim di dalam sel menjadi terinaktivasi, sehingga tidak terjadi proses metabolisme sel dan mencegah terjadinya autolisis sel. Kemudian secara fisik, membran sel yang awalnya hidrofilik, dilarutkan menggunakan cairan fiksatif, yang menyebabkan pori-pori sel membesar dan mengakibatkan makromolekul masuk ke dalam sel. Hal ini membantu untuk teknik setelah fiksasi, khususnya pada proses pewarnaan sehingga zat-zat tersebut akan dapat masuk ke dalam sel dan menempel dengan mudah (Jamie, 2010).

Rasio volume antara larutan fiksatif dan jaringan merupakan parameter penting yang memengaruhi konsentrasi efektif larutan serta laju penetrasinya. Rasio ideal fiksatif terhadap jaringan adalah 20:1. Volume fiksatif yang terlalu kecil berpotensi menurunkan konsentrasi kerja sehingga menghambat proses penetrasi, sedangkan volume yang lebih besar membantu mempertahankan stabilitas konsentrasi dan

meningkatkan kecepatan penetrasi fiksatif ke dalam jaringan (Khristian, 2017; Musyarifah & Agus, 2018).

Kualitas fiksasi merupakan kunci untuk semua tahap selanjutnya yang penting dalam pembuatan sediaan histopatologik, oleh karena itu pengawetan sel dengan perubahan morfologi yang minimal dan secara kasat mata tanpa adanya kehilangan molekul sangat penting dalam pengolahan jaringan. Fiksasi diharapkan dapat melindungi spesimen biologi dari efek denaturasi dehidrasi dan semua proses pengolahan jaringan (Musyarifah & Agus, 2018). Fiksasi yang baik untuk dinilai oleh patolog (Gambar 1).



Gambar 1. Perbedaan kualitas sediaan jaringan antara (A) Fiksasi yang baik; panah biru menunjukkan pengerutan yang stabil, (B) Fiksasi yang buruk; panah merah menunjukkan hasil pengerutan berlebih

Sumber: Rolls G, 2017.

Menurut (Yeung et al., 2015) aturan untuk melakukan fiksasi jaringan sehingga didapatkan sediaan yang baik dan diharapkan adalah:

- a. Konsentrasi fiksatif mempengaruhi respon komponen sel secara berbeda, konsentrasi rendah memperpanjang waktu fiksasi dan

mempertahankan aktivitas enzim namun berisiko menyebabkan ekstrasi bahan seluler serta perubahan volume sel, sementara konsentrasi tinggi dapat merusak struktur halus dan menonaktifkan enzim

- b. Waktu fiksasi optimal ditentukan secara empiris untuk memastikan penetrasi dan pembentukan ikatan silang (*cross-linking*) yang cukup antara makromolekul jaringan. durasi yang terlalu singkat menyebabkan fiksasi tidak sempurna, sedangkan waktu yang terlalu lama dapat menimbulkan over *cross-linking* yang membuat jaringan menjadi rapuh dan menyebabkan keluarnya ion atau komponen sel.
- c. Suhu ruang saat proses fiksasi, karena suhu sangat berpengaruh pada kemampuan laju penetrasi fiksatif.

3. **Klasifikasi Fiksatif Kimiawi**

- a. Berdasarkan Mekanisme Kerja

Fiksasi kimiawi merupakan prosedur pengawetan jaringan biologis dengan memanfaatkan reagen kimia yang berfungsi menstabilkan struktur seluler dan jaringan melalui mekanisme pembentukan ikatan kimia pada komponen-komponen penyusunnya. Fiksasi kimia umumnya dilakukan dengan merendam jaringan pada larutan fiksatif atau pada sebagian kecil organ seperti paru dengan menginfuskan cairan fiksatif pada sistem vaskuler. Fiksasi kimia menjalankan perannya dalam memproteksi sel dan jaringan dengan mendenaturasi protein menggunakan cara koagulasi

(fiksasi non-aditif), *cross-linking* (membentuk senyawa aditif) atau kombinasi keduanya (Howat & Wilson, 2014). Fiksasi kimia adalah fiksasi yang paling umum digunakan untuk sediaan yang dilihat menggunakan mikroskop. Secara garis besar fiksatif kimiawi dibedakan atas dua yaitu :

1) Fiksatif non-koagulan atau *cross-linking fixative*, bekerja dengan membentuk ikatan silang antar molekul di dalam jaringan. Formalin, glioksal, atau glutaraldehida merupakan contoh fiksatif non-koagulan (Jamie, 2010).

a) *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10 %

Neutral Buffered Formalin (NBF) 10 % merupakan larutan fiksatif standar yang umum untuk digunakan dalam pembuatan sediaan histologi. Cairan ini terbuat dari pengenceran 100 ml *formaldehyde* 37-40% ditambah 900 ml larutan buffer, sehingga menghasilkan formalin 10% yang mengandung *formaldehyde* 4%. Larutan fiksatif tersebut memiliki kelebihan berupa pH 7 sehingga penggunaannya lebih mudah karena sifatnya yang netral dan stabil serta dapat digunakan untuk mengawetkan jaringan dalam waktu lama. Pada pembuatan formalin 10%, penambahan garam penyangga (buffer) diperlukan untuk memastikan larutan berada pada pH netral. Buffer dalam NBF 10% berperan mempertahankan kestabilan pH dengan mencegah

perubahan keasaman yang dapat mengganggu struktur jaringan, mengoptimalkan proses fiksasi, serta menjaga morfologi sel tetap utuh. Tanpa adanya buffer, formalin cenderung teroksidasi menjadi asam format seiring waktu, sehingga berpotensi merusak struktur sel dan menghambat kualitas analisis histologi (Musyarifah & Agus, 2018; Simos *et al.*, 2011).

Larutan fiksatif ini secara kimiawi bereaksi dengan protein serta komponen sel dan jaringan sehingga suatu ikatan kimia larutan fiksatif diambil dan menjadi bagian dari jaringan dengan cara mengisi dan membentuk *cross-link* inter molekul atau intra-molekul. Hasil dari ikatan *cross-linking* ini adalah perubahan konformasi pada struktur protein dan selanjutnya inaktivasi dari enzim (Musyarifah & Agus, 2018). Akan tetapi, NBF memiliki waktu yang lambat pada laju penetrasinya. Menurut *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) dan *Environment Health and Safety Information* (EHSI), formalin memiliki sifat toksik dan termasuk dalam kategori bahan karsinogenik kelas 1 yang berpotensi menyebabkan kerusakan mata yang parah, iritasi pernapasan, kantuk, pusing, reaksi alergi pada kulit, dan kanker. Walaupun NBF 10% efektif, tetapi toksisitasnya

menimbulkan kekhawatiran bagi berbagai penggunaannya (Kayni *et al.*, 2025; Zerlina *et al.*, 2025).

2) Fiksatif koagulan berfungsi dengan memodifikasi struktur protein melalui penghilangan molekul air dari gugus fungsional seperti karboksil bebas, hidroksil, amino, amido, dan imino pada protein. Sehingga menyebabkan terjadinya koagulasi protein sekaligus menyebabkan pengerutan jaringan (Howat & Wilson, 2014). Contoh dari fiksatif koagulan adalah alkohol, merkuri klorida, asam pikrat, *zinc* sulfat.

a) Larutan fiksatif Etanol

Larutan fiksatif etanol merupakan larutan yang menggunakan etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) sebagai bahan utama untuk mengawetkan jaringan biologis pada proses histologi. Etanol merupakan fiksatif koagulan yang bekerja dengan cara menyebabkan perubahan bentuk protein (*protein denaturation*) sehingga menyebabkan koagulasi protein dan pengerutan jaringan (Howat & Wilson, 2014). Etanol mempunyai kemampuan daya penetrasi lebih cepat dibandingkan formalin (Steicke *et al.*, 2018).

Pada penelitian oleh Salsabila *et al* (2023) penggunaan larutan etanol 50% dalam memfiksasi jaringan ginjal mencit dengan hasil preparat yang tidak berbeda secara signifikan

dari NBF 10%, baik dari segi penyusutan jaringan, artefak, maupun ketajaman struktur jaringan yang difiksasi.

b) Larutan fiksatif Metanol

Larutan fiksatif metanol adalah jenis larutan fiksatif koagulan. Metanol mampu menghidrasi secara efektif dalam jaringan serta mendorong koagulasi protein sehingga mampu berkontribusi dalam menjaga integritas morfologi jaringan (Rolls G, 2017). Metanol menggantikan air yang menghidrasi protein, mengganggu ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik sehingga menyebabkan presipitasi (koagulasi) protein dan penghentian aktivitas enzimatik intraseluler yang mencegah autolisis jaringan (Srinivasan *et al.*, 2002). Metanol dapat digunakan untuk fiksasi pada konsentrasi >80 % (Musyarifah & Agus, 2018). Pada penelitian oleh Steicke *et al.*, (2018) karakteristik penting methanol adalah penetrasi jaringan yang cepat akibat berat molekul kecil dan kemampuannya menembus parenkim lebih cepat dibandingkan formalin.

b. Berdasarkan Komposisi

Selain itu fiksatif itu juga dapat dibedakan berdasarkan komposisi jumlah zat penyusun yang ada dalam fiksatif tersebut yaitu:

- 1) Larutan fiksatif sederhana : larutan yang di dalamnya hanya mengandung satu macam zat saja.
- 2) Larutan fiksatif campuran atau fiksatif majemuk : fiksatif yang di dalamnya mengandung lebih dari satu macam zat. Contohnya larutan Bouin, merupakan larutan fiksatif yang terdiri dari asam pikrat, formalin, dan asam asetat glasial, dengan tujuan untuk saling melengkapi kekurangan masing-masing komponen sehingga sifat fiksasi larutan menjadi lebih optimal dan efisien dalam menjaga kualitas preparat jaringan.

a) Larutan Fiksatif *Ethmeth*

Larutan fiksatif *Ethmeth* merupakan fiksatif koagulan berbahan dasar alkohol yang terdiri dari campuran 100% etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dan 100 % metanol (CH_3OH) dengan perbandingan 3:1 bagian. Mekanisme kerja larutan tersebut yaitu dengan cara menyebabkan perubahan bentuk protein (*protein denaturation*) sehingga menyebabkan koagulasi protein dan pengerutan jaringan (Howat & Wilson, 2014). Mereka mengganti ikatan air pada jaringan sehingga mengganggu ikatan hidropobik dan hidrogen kemudian mengekspos bagian hidropobik internal dari protein dan mengganggu struktur tersiernya dan solubilitasnya di air (Musyarifah & Agus, 2018).

Etanol dan metanol sering digunakan sebagai agen fiksasi untuk mengawetkan jaringan biologis agar tidak membusuk dalam persiapan sediaan histologis. Etanol memiliki kemampuan penetrasi yang lebih unggul dibandingkan formalin pada jaringan hepar dan miokard (Steicke *et al.*, 2018). Metanol berfungsi menghidrasi secara efektif yang menggantikan air dalam jaringan dan mendorong koagulasi protein, suatu mekanisme yang berkontribusi terhadap terjaganya integritas morfologi jaringan (Rolls G, 2017). Tidak seperti fiksatif berbasis aldehid, kombinasi kedua alkohol ini tidak membentuk ikatan silang (*Cross-linking*), sehingga struktur seluler dan kualitas asam nukleat tetap lebih baik untuk analisis histologi maupun pemeriksaan molekular lanjutan (Fox *et al.*, 1985).

4. Tikus Wistar

Tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar merupakan tikus albino yang sering digunakan dalam berbagai penelitian. Tikus albino ini dikembangkan oleh Institut Wistar pada tahun 1906 para ahli yaitu Henry H. Donaldson dalam upaya untuk menstandarisasi produksi tikus albino Strain wistar yang dapat digunakan untuk penelitian (Wati *et al.*, 2024).

Rattus norvegicus strain wistar memiliki karakteristik morfologi yaitu kepala lebar, telinga yang panjang, ekor yang panjangnya

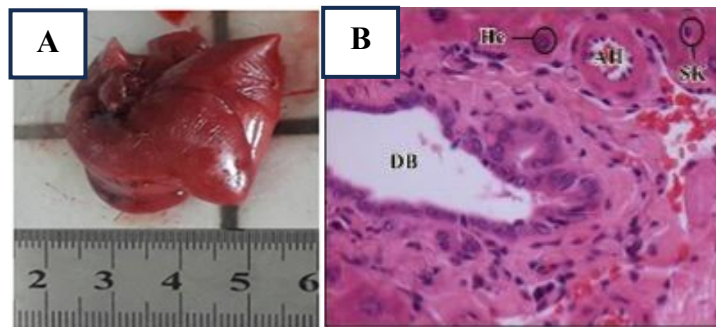
proporsional dengan tubuhnya. Selain itu, tikus ini memiliki ukuran tubuh yang moderat hingga besar untuk tikus laboratorium, memiliki usia reproduksi pada 7-10 minggu dengan berat badan 100-277 g, dan lama kehamilan 19-22 hari (Wati et al., 2024).

Tikus Wistar banyak dipilih sebagai model hewan dalam penelitian histologi karena memiliki karakter genetik yang stabil, morfologi organ yang mirip dengan manusia, dan mudah untuk dipelihara serta ditangani dalam kondisi laboratorium. Selain itu aspek etika juga menjadi faktor penting dalam pemilihan tikus Wistar sebagai model penelitian (Costa et al., 2024).

5. **Histomorfologi**

Histomorfologi merupakan cabang ilmu yang berfokus pada analisis dan pemantauan struktur serta ukuran organ, jaringan, dan bagian-bagiannya melalui observasi mikroskopis. Pendekatan ini memungkinkan pengamatan terperinci terhadap susunan jaringan, sehingga diperlukan penggunaan mikroskop untuk mengidentifikasi detail organ pada tingkat seluler yang tidak bisa dilihat dengan mata biasa (A. Sriwahyunizah, 2018). Melalui teknik pewarnaan seperti Hematoksin-Eosin (HE), histomorfologi memungkinkan identifikasi lapisan jaringan dan distribusi komponen seluler secara rinci, yang sangat penting dalam memahami kondisi fisiologis maupun patologis jaringan (Selan et al., 2020).

6. Histologi Jaringan Hati



Gambar 2. (A) Morfologi hati tikus normal makroskopis, (B) Histologi hati tikus normal perbesaran 40x, terlihat gambaran duktus biliaris (DB), hepatosit (HE), arteri hepatica (AH), dan sel Kupffer (SK), pada pewarnaan HE

Sumber: Fitmawati *et al.*, 2019; Atlas of Laboratory Mouse Histology, 2004.

Hati merupakan organ penting dalam tubuh yang memiliki peran dalam metabolisme bahan-bahan atau zat-zat toksik dalam tubuh (Salasa *et al.*, 2015). Hati tikus terbagi menjadi empat lobus yaitu lobus kiri, lobus median, lobus kanan dan lobus caudatus. Jaringan hati tersusun atas beberapa jenis sel utama, antara lain hepatosit, sel endotel, sel makrofag (dikenal sebagai sel kupffer), dan sel ito yang berperan menyimpan lemak. Hepatosit terorganisasi dalam bentuk lempeng yang tersusun radial di dalam lobus hati, membentuk lapisan satu hingga dua sel yang menyerupai tatanan batu bata. Lempeng-lempeng ini mengarah dari pinggir lobulus menuju pusatnya dan beranastomosis membentuk struktur seperti labirin. Diantara lempeng hepatosit terdapat ruang berisi kapiler darah (sinusoid hati), sehingga memungkinkan terjadinya

interaksi antara darah dengan jaringan hati secara optimal (Utami, 2020).

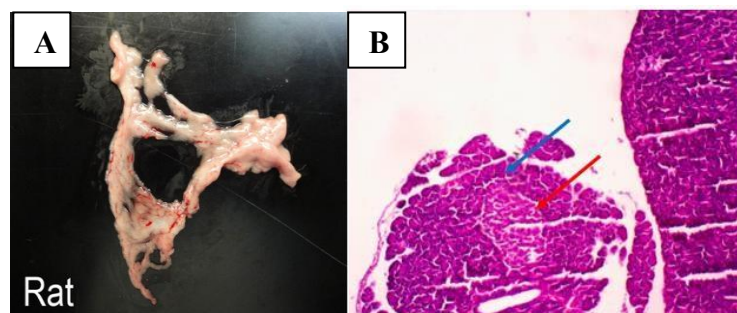
Struktur jaringan pada hati yaitu lunak dan terdapat beberapa komponen hati yang dapat berpengaruh terhadap proses fiksasi yaitu adanya lemak, darah dan air dengan kadar yang tinggi (Jusuf, 2009). Hati tersusun atas 70-80% hepatosit atau sel hepar, sehingga jaringan hati mudah untuk diamati dan juga sering dipakai sebagai uji coba pada pemeriksaan histopatologi (Zamad & Nailufar, 2025). Oleh karena itu kekhawatiran terhadap pembuatan sediaan jaringan hati saat proses fiksasi yang dapat menyebabkan penetrasi larutan fiksatif tidak bekerja dengan baik. Potongan jaringan terlalu besar mengakibatkan jaringan tidak terfiksasi dengan sempurna. Selain itu, apabila proses fiksasi terlalu lama akan mengakibatkan jaringan keras dan sulit untuk dipotong (Mulyatiningrum, 2020).

7. **Histologi Jaringan Pankreas**

Pankreas adalah kelenjar campuran dengan fungsi eksokrin dan endokrin yang menghasilkan enzim pencernaan dan hormon. Terletak di rongga retroperitoneal sebelah kiri atas abdomen, pankreas terdiri dari tiga bagian yakni kepala, badan, dan ekor. Organ ini dilapisi kapsula dari jaringan ikat tipis yang membentuk septa, melindungi duktus dan pembuluh darah utama serta memisahkan parenkim menjadi lobulus. Lobulus ini didominasi oleh sel eksokrin yang membentuk asinus, yaitu unit sekretori yang terdiri dari beberapa sel serosa

mengelilingi lumen, menghasilkan enzim yang disalurkan ke duodenum melalui saluran pankreas utama. Selain itu, terdapat komponen endokrin yaitu insula pankreatika ataupun langerhans yang mengandung berbagai jenis sel dengan vaskularisasi tinggi dan bertugas mengeluarkan hormon seperti insulin, glukagon, somatostatin, dan polipeptida ke darah. Bagian endokrin ini hanya menyumbang sekitar 1-2% dari massa pankreas, sedangkan sebagian besar, sekitar 95%, merupakan jaringan eksokrin (Longnecker, 2021).

Pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) memperlihatkan bahwa pulau Langerhans tampak lebih pucat dibandingkan dengan sel-sel asinus yang mengelilinginya. Hal ini disebabkan oleh jumlah retikulum endoplasma kasar yang lebih sedikit pada sel-sel pulau Langerhans, sehingga absorpsi pewarna pada sel tersebut lebih rendah (Peckham, 2014).

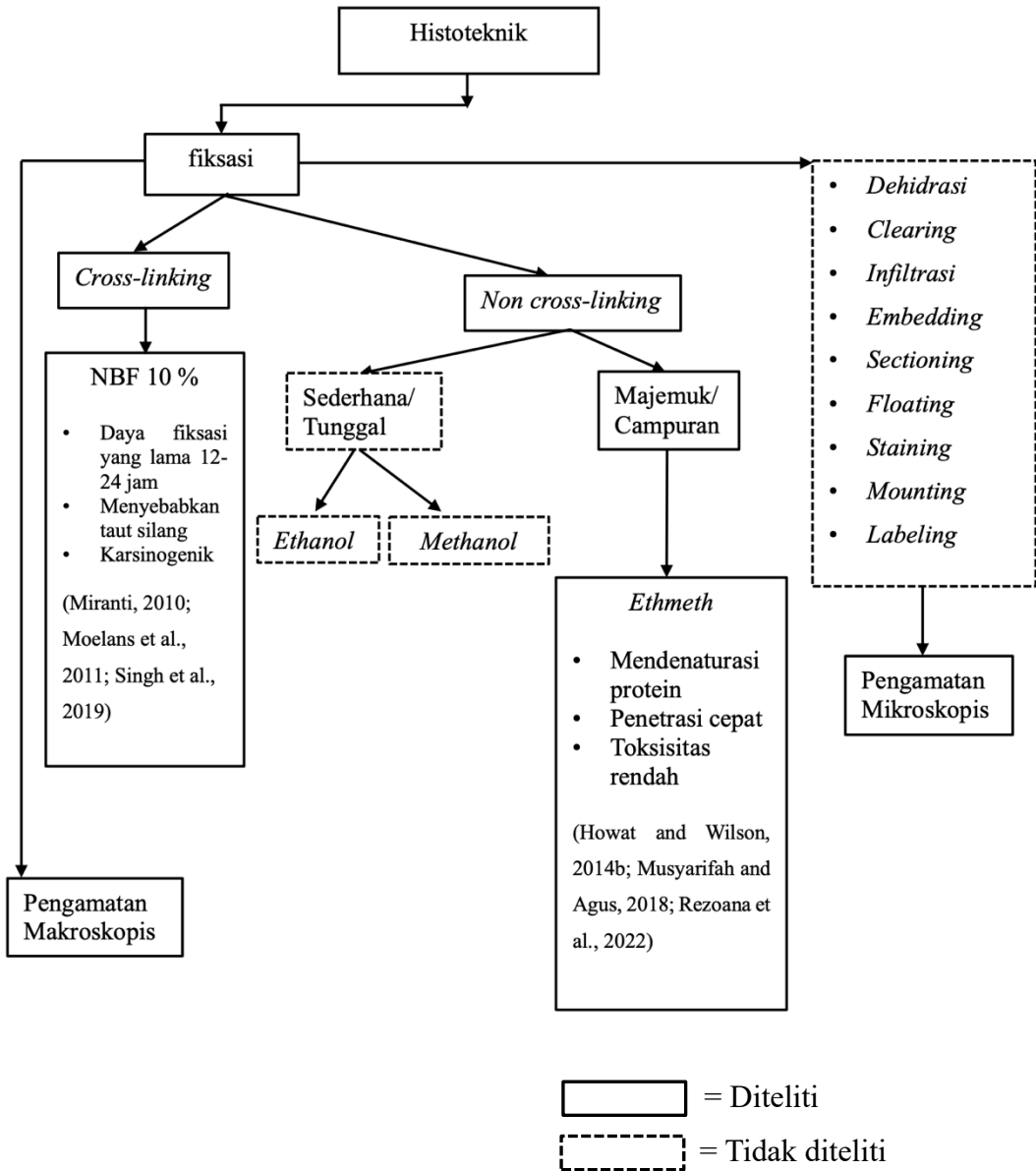


Gambar 3. A) Morfologi pankreas tikus, (B) Histologi pankreas tikus Wistar normal (x100;H&E; panah biru menunjukkan kelenjar eksokrin, panah merah menunjukkan pulau Langerhans)

Sumber: Tsuchitani *et al.*, 2016; Utama *et al.*, 2025.

B. Kerangka Teori

Kerangka teori penelitian ini ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Kerangka Teori

C. Pertanyaan Penelitian

Apakah larutan fiksatif *Ethmeth* sebagai agen fiksasi alternatif pengganti *Neutral buffered formalin* 10% (NBF) dapat memberikan hasil histomorfologi pada jaringan hati dan pankreas tikus Wistar sama baik dengan NBF?