

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Histoteknik

a. Definisi

Teknik pembuatan sediaan histologi (histoteknik) merupakan proses yang diawali dengan pemotongan hingga pengamatan di bawah mikroskop. Tujuan utama dari histoteknik adalah menanamkan jaringan dalam media yang padat, sehingga didapatkan potongan tipis dari bagian yang akan dipotong (Nazhiifah dan Sofyanita, 2023). Selain itu, tujuan dari histoteknik diantaranya, identifikasi jaringan dan sel berdasarkan struktur serta bentuknya, mendeteksi adanya perubahan, dan membantu dalam penegakan diagnosis suatu penyakit (Ramadhani et al., 2025). Proses dalam pembuatan preparat histologi adalah fiksasi (*fixation*), dehidrasi (*dehydration*), pembersihan (*clearing*), pembedaan (*embedding*), pengecoran (*blocking*), pemotongan jaringan (*sectioning*), pewarnaan (*staining*), perekatan (*mounting*), dan pelabelan (*labelling*) (Wulandari, dkk., 2022).

b. Tahapan Histoteknik

Histoteknik terdapat beberapa tahapan meliputi :

1) Fiksasi

Fiksasi adalah berbagai perlakuan yang dapat melindungi

struktur sel dan komposisi biokimia. Fiksasi diharapkan dapat melindungi spesimen biologi dari efek denaturasi, dehidrasi dan semua proses pengolahan jaringan. Tujuan fiksasi untuk mencegah atau menahan proses degeneratif yang dimulai segera setelah jaringan kehilangan pasokan darah. Komponen yang harus dicegah seperti bakteri pengurai yang sudah ada dalam spesimen (Musyarifah dan Agus, 2018).

2) Dehidrasi

Tahapan dehidrasi merupakan proses menghilangkan air dan formalin dari komponen jaringan. Dehidrasi yang digunakan adalah alkohol bertingkat. Tahapan dehidrasi harus dilakukan dengan benar agar tidak ada molekul air yang tertinggal sehingga parafin dapat menempati posisi dalam jaringan, sehingga diperoleh irisan jaringan yang utuh dan baik serta jaringan dapat dengan mudah dipotong tipis-tipis (Heryasari, 2024).

3) *Clearing* (Penjernihan)

Clearing adalah proses yang dilakukan untuk menghilangkan alkohol dan dehidran lain dari jaringan setelah proses dehidrasi dan menggantikannya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Tujuan dari penghilangan alkohol agar jaringan tidak mudah membusuk (Wulandari, dkk., 2022).

4) Infiltrasi

Infiltrasi adalah pemasukan filtrat tertentu ke dalam jaringan

sehingga jaringan tersebut dapat mengeras pada suhu ruang. Bahan filtrat yang sering digunakan adalah parafin. Fungsi dari proses infiltrasi adalah mempertahankan fungsi dari sel dan komponen struktural selama proses pemotongan (Hasanah, 2024).

5) *Embedding* (Penanaman)

Embedding adalah teknik yang digunakan dalam proses mempersiapkan suatu jaringan untuk analisis mikroskopis. Proses ini memerlukan penempatan jaringan dalam massa padat saat dipotong menggunakan mikrotom. Massa harus cukup keras untuk menopang jaringan, tetapi cukup lunak untuk dipotong dengan mudah menjadi beberapa bagian. Lilin parafin menjadi media yang paling sering digunakan pada proses *embedding* (Wulansari, dkk., 2024).

6) *Sectioning* (Pemotongan)

Sectioning adalah salah satu tahapan dalam mikroteknik yang sangat penting untuk menghasilkan sediaan yang baik. Pemotongan jaringan dilakukan dengan pemotongan blok jaringan menggunakan alat. Alat tersebut dinamakan mikrotom (Sofyanita dan Siwi, 2024).

7) *Floating*

Floating adalah proses penempatan pita jaringan pada air hangat dengan suhu 40-50°C sebelum ditempelkan pada *object*

glass. Tujuan dari tahapan ini untuk mengurangi lipatan pada pita jaringan (Heryasari, 2024).

8) *Staining* (Pewarnaan)

Pewarnaan sediaan diperlukan untuk mewarnai komponen-komponen jaringan transparan setelah melalui proses pematangan jaringan. Pewarnaan yang sering digunakan untuk histologi adalah pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Prinsip sederhana dari pewarnaan ini bersifat asam basa. Pewarna hematoxylin akan mewarnai inti sel menjadi biru sedangkan pewarna eosin akan mewarnai sitoplasma dan kolagen menjadi warna merah. Prosedur pewarnaan *Hematoxylin Eosin* terdapat beberapa tahapan meliputi, deparafinisasi, rehidrasi, pewarnaan hematoxilin, pencucian, pewarnaan eosin, dehidrasi, dan penjernihan (Hasanah, 2024).

9) *Mounting*

Setelah proses pewarnaan, preparat ditetesi dengan entelan lalu ditutup dengan *deck glass*. Tujuan dari tahapan ini agar preparat lebih tahan lama dan tidak tergores. Pada proses penutupan perlu dipastikan tidak ada gelembung yang terbentuk. Adanya gelembung udara akan mengganggu pengamatan dan diagnosa (Hasanah, 2024).

10) *Labelling*

Preparat yang diberi *cover glass* selanjutnya diberikan label. Proses *labelling* dilakukan untuk meminimalisir kesalahan sediaan yang dibuat (Heryasari, 2024).

2. *Clearing*

a. Definisi

Clearing adalah salah satu proses menjernihkan jaringan dari berbagai komponen pengganggu pewarnaan sediaan. Bahan *clearing* harus bisa menyatu dengan cairan alkohol sehingga dapat mendesak keluar cairan alkohol (Naziihah, 2024). *Clearing* dapat menghilangkan alkohol absolut dari jaringan dan menggantinya dengan pelarut yang dapat bercampur dengan alkohol absolut dan lilin parafin. Beberapa bahan *clearing* dapat meningkatkan indeks bias jaringan (Tsamiya et al., 2021). Agen *clearing* juga dapat meningkatkan transparansi jaringan selama mikroskopis ketika diaplikasikan setelah pewarnaan karena indeks biasnya yang tinggi. Xylene menjadi agen *clearing* paling umum dalam pengolahan dan pewarnaan jaringan (Bright et al., 2024).

b. Faktor yang mempengaruhi *clearing*

Menurut Rahmawati (2025), faktor yang memengaruhi proses *clearing* diantaranya ukuran jaringan, reagen, suhu dan waktu perendaman.

1) Ukuran jaringan

Ukuran jaringan memengaruhi proses *clearing*. Semakin besar ukuran jaringan, waktu perlakuan *clearing* juga akan lama untuk mencapai derajat kejernihan jaringan tersebut (Bordoloi et al., 2022; Bright et al., 2024; Shivani et al., 2025).

2) Reagen

Reagen yang sering digunakan pada *clearing* adalah xylene yang menghasilkan gambaran histomorfologis yang baik. Adapun beberapa penelitian menggunakan minyak alami seperti minyak kelapa, minyak zaitun, minyak kayu manis, minyak pinus, minyak mawar, minyak wijen, minyak limonene, minyak wortel, cedarwood. Selain itu, reagen lain yang digunakan seperti larutan pencuci piring, air lemon, air suling, *ultraclearTM*, dan *Polchem*. Masing-masing memiliki kesamaan sifat non-polar. Akan tetapi, tidak semuanya menghasilkan hasil histomorfologi yang baik seperti pada xylene (Rahmawati et al., 2020; Shivani et al., 2025; Tanwar et al., 2022).

3) Suhu

Suhu bergantung pada viskositas (kekentalan) dari reagen yang digunakan. Suhu akan mempercepat waktu *clearing* karena apabila dipanaskan akan mempercepat penetrasi ke jaringan (Rahmawati et al., 2020; Sofyanita dan Annisa, 2023).

4) Waktu

Lama waktu perendaman akan mempengaruhi *clearing* apabila terlalu lama atau terlalu cepat. Lama waktu perendaman akan mempengaruhi hasil histomorfologi jaringannya (Bordoloi et al., 2022; Rahmawati et al., 2020; Tanwar et al., 2022). Waktu standar *clearing* menggunakan xylene dengan ukuran jaringan 1 mm³ selama 2 x 15 menit. (Suvarna et al., 2019)

3. Xylene

a. Definisi

Xylene adalah bahan kimia yang memiliki rumus atom $C_6H_4(CH_3)_2$. Xylene memiliki berat molekul 106,17 gram/mol dengan komposisi karbon (C) sebesar 90,5% dan hidrogen (H) 9,5%. Xylene memiliki tiga isomer yaitu ortho-xylene, meta-xylene dan para-xylene. Xylene dengan kompatibilitas yang sangat baik dari alkohol dan lilin parafin telah banyak digunakan sebagai *clearing agent* (Tanwar et al., 2022). Xylene adalah senyawa volatil dengan titik nyala rendah, yaitu $28,9^{\circ}C$, sehingga menjadikannya pelarut yang mudah terbakar. Xylene memiliki viskositas sebesar rata-rata 0,62-0,81 cP pada suhu $20-25^{\circ}C$ (Agarwal et al., 2024; Dikio, 2014).

b. Kelebihan Penggunaan Xylene dalam Histologi

Pengamatan setelah pewarnaan menghasilkan gambaran yang baik secara mikroskopis. Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan warna inti terlihat jelas biru dan sitoplasma terlihat jelas merah muda (Sari dan Fitria, 2024). Faktor daya larut yang tinggi pada xylene bertujuan untuk pengeluaran alkohol dalam jaringan, sehingga membuat jaringan menjadi transparan dan dapat meningkatkan infiltrasi parafin. Xylene dapat bercampur dengan baik dengan alkohol dan parafin (Saribu, dkk., 2023).

c. Kekurangan Penggunaan Xylene

Penggunaan xylene pada histologi yang terlalu lama dapat menyebabkan jaringan menjadi kering dan mudah rapuh sehingga preparat tidak akan tahan lama (Yuniar et al., 2024). Xylene memiliki toksisitas yang tinggi sehingga dapat membahayakan peneliti di laboratorium. Paparan xylene yang tinggi dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan kerusakan hati, ginjal dan sistem saraf (Saribu, dkk., 2023). Selain itu, xylene memiliki sifat yang karsinogenik apabila terpapar terlalu lama akan memberikan dampak buruk bagi kesehatan tubuh manusia tubuh termasuk cedera jantung, diskrasia darah yang fatal, eritema kulit, dan sekunder infeksi (Sofyanita dan Azahra, 2023). Paparan jangka pendek yang dapat merusak sistem imun tubuh manusia (Sari dan Fitria, 2024).

4. Minyak Kelapa

a. Definisi

Minyak kelapa adalah minyak nabati yang umum digunakan, yang tidak beracun dan stabil terhadap panas. Minyak ini mengalami oksidasi secara perlahan dan memiliki ketahanan tertinggi terhadap kebusukan (Bordoloi et al., 2022). Minyak kelapa dihasilkan secara komersial dari kopra, yaitu daging buah kelapa yang telah dikeringkan. Minyak kelapa mengandung trigliserida dengan 86,5% asam lemak jenuh, 5,8% asam lemak tak jenuh tunggal, dan 1,8% asam lemak tak jenuh ganda (Bright et al., 2024).

Komponen asam lemak jenuh dalam minyak kelapa terdiri dari tujuh jenis asam lemak, termasuk 44,6% asam laurat, 16,8% asam miristat, dan 8,2% asam palmitat. Warna minyak kelapa bervariasi dari bening hingga coklat kekuningan. Minyak kelapa memiliki viskositas 51-53 cP pada suhu 20-25°C. Viskositas akan menurun 21-28 cP pada suhu 40°C (Bright et al., 2024; Nasir, 2020; Stanciu, 2020).

b. Kegunaan Minyak Kelapa pada Histoteknologi

- 1) Penelitian Bordoloi et al., 2022 menggunakan minyak kelapa sebagai alternatif *clearing agent* menggantikan xylene. Hasil yang didapat dari penelitian tersebut tidak ada perbedaan kualitas preparat dan histomorfologi jaringan antara *clearing* menggunakan xylene dan minyak kelapa. Sampel yang digunakan adalah jaringan patologi dari gigi dan mulut seperti hiperplasia epitelial, hiperkeratosis, hiperplasia fibrosa, kista dentigerous, ameloblastoma, fibroma odontogenik, dan granuloma sel raksasa perifer. Rata-rata ukuran sampel sebesar 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm. dengan ketebalan 3-5 mm.
- 2) Penelitian Poonam et al., 2023 menggunakan minyak kelapa sebagai alternatif *clearing agent* menggantikan xylene. Penelitian tersebut menggunakan variasi waktu dalam proses *clearing*. Waktu yang optimal minyak kelapa dalam proses penjernihan jaringan pada waktu 90 menit dengan 3 kali perendaman. Hasil preparat pada waktu 90 menit dengan 3 kali perendaman menghasilkan preparat

yang lebih baik daripada xylene. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu organ hepar kambing. Ukuran sampel tidak disebutkan dalam penelitian. Akan tetapi, jumlah sampel terdapat 48 jaringan.

- 3) Penelitian Bright et al., 2024 menggunakan minyak kelapa sebagai alternatif *clearing agent* dan agen deparafinisasi menggantikan xylene. Sampel yang digunakan adalah organ prostat. Rata-rata ukuran sampel yang digunakan sebesar 0.819 cm^3 .

c. Kelebihan Minyak Kelapa

Minyak kelapa dapat digunakan pengganti xylene karena tidak memengaruhi detail histologis sampel jaringan. Selain itu, minyak kelapa tidak menimbulkan efek samping untuk kesehatan bagi penggunaannya (Tanwar et al., 2022). Minyak kelapa mudah didapat, harga murah dan tidak bersifat toksik (Sofyanita dan Azahra, 2023).

d. Kekurangan Minyak Kelapa

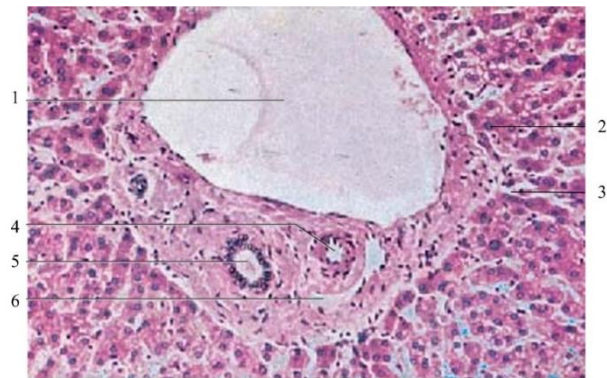
Minyak kelapa memiliki viskositas 51-53 cP pada suhu 20-25°C. Viskositas ini lebih tinggi dari xylene sehingga perlu dilakukan pemanasan. Semakin tinggi suhu semakin rendah viskositas fluida tersebut. Jika suhu *clearing* dinaikkan maka viskositas minyak menurun dan laju penetrasi minyak ke dalam jaringan meningkat (Nuraisyah dkk., 2025; Sofyanita dan Annisa, 2023; Stanciu, 2020).

5. Histomorfologi

Histomorfologi adalah suatu ilmu yang terdiri dari adanya cara

menelaah dan memantau saat pengamatan, mempelajari suatu ukuran organ, jaringan dan beberapa bagian jaringan. Struktur jaringan sangat terperinci maka menggunakan bantuan alat mikroskop yang dapat melihat dari bagian rinci yang paling kecil (Sriwahyunizah, 2018). Kategori histomorfologi dari kejelasan bentuk sel, pewarnaan sitoplasma, kejelasan inti sel (nukleus), pewarnaan inti sel, kromatin inti sel dan intensitas pewarnaan (Dewi, dkk., 2021).

6. Jaringan Hepar



Gambar 1. Histologi Jaringan Hepar Tikus Normal (perbesaran 120x;H&E; garis 1: cabang vena portal; garis 2: hepatosit; garis 3: sinusoid; garis 4: cabang arteri hepatic; garis 5: saluran empedu interlobular; garis 6: pembuluh limfatik)

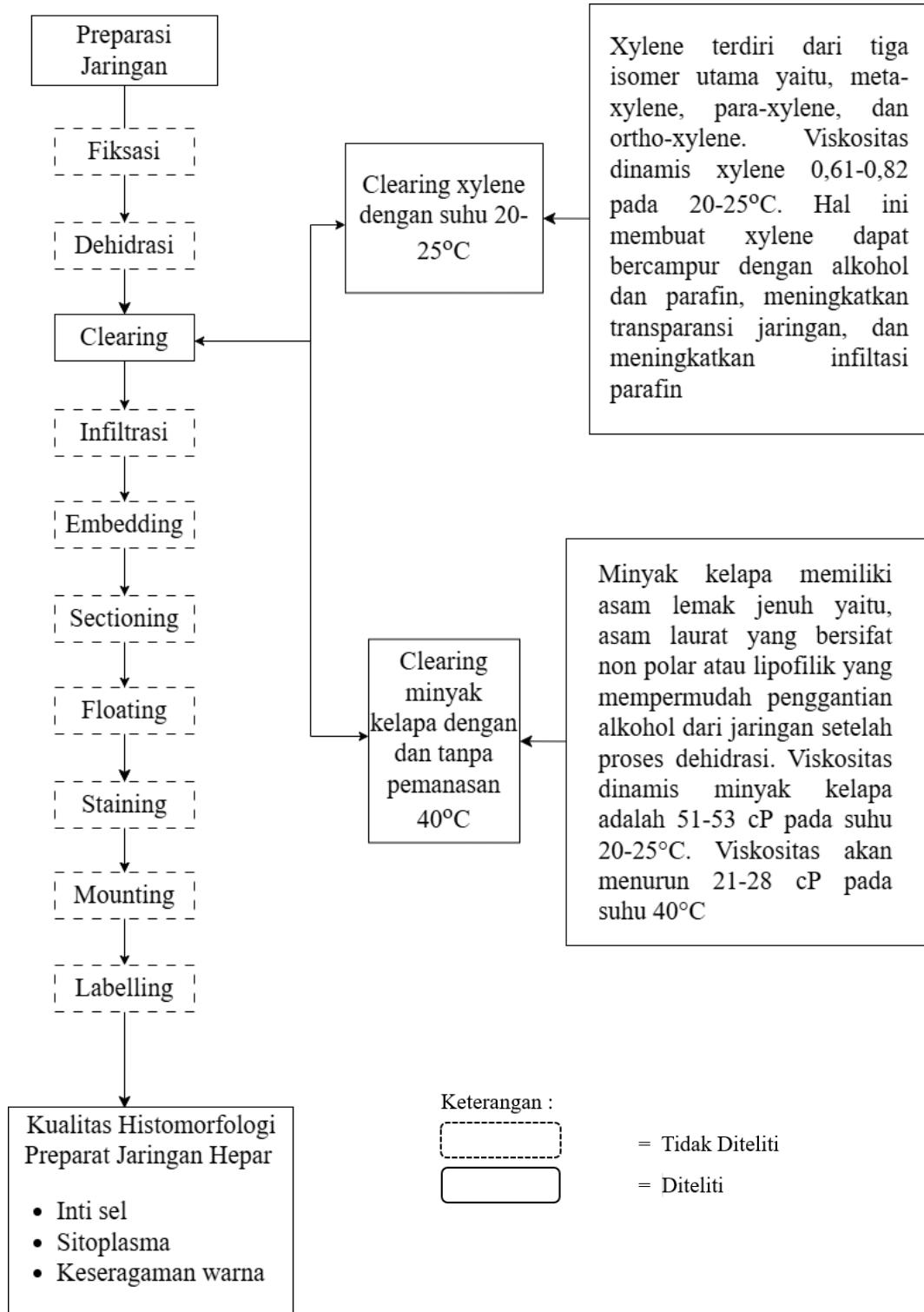
Sumber : Kuehnel, 2018

Hepar merupakan organ terbesar yang terdapat pada rongga abdomen yang berfungsi sebagai endokrin, eksokrin dan mentransfer zat hasil metabolisme ke organ tubuh lainnya. Hepar berfungsi sebagai penyimpanan beberapa mineral seperti besi dan tembaga, serta vitamin yang larut dalam lemak. Hati juga dapat menyimpan toksin dan obat-obatan yang tidak dapat dipecahkan atau diekskresi oleh tubuh (Yolanda, dkk., 2022).

Hati memiliki permukaan yang halus, dibagi menjadi lobus kanan yang lebih besar dan lobus kiri yang jauh lebih kecil pada garis perlekatan ligamen falsiformis di anterior dan fisura. (Panjaitan, dkk., 2022). Pada penampang melintang, lobulus tampak sebagai area berbentuk poligonal. Pembuluh darah pusat melintasi tengah lobulus (vena centralis). Hepatosit berbentuk seperti lembaran jaringan panjang (plat hati), yang menyebar dari tepi menuju pembuluh darah pusat lobulus. Kapiler hati berliku-liku di antara lapisan hati (sinusoid hati). Hal ini memastikan bahwa sel-sel hati terpapar pasokan darah arteri dari setidaknya dua sisi. Lobulus hati dikelilingi oleh serat jaringan ikat (berwarna biru). Jaringan ikat di titik-titik segitiga antara beberapa lobulus membentuk kapsul (kapsul Glisson, *triad* Glisson). Jaringan ikat antar lobulus terhubung saluran empedu antar lobulus secara teratur ditemukan di triad Glisson (Kuehnel, 2018).

Gambaran histologi normal menunjukkan saluran portal normal yang terdiri dari vena hepatic, arteri hepatic, dan duktus biliaris dengan hepatosit di sekitarnya (Fitri dan Cahayani, 2020). Sel hepatosit yang normal adalah tidak ada pembengkakan dan sinusoid terlihat normal. Jaringan hepar yang sehat ditunjukkan oleh sel hepatosit yang tersusun rapi dan ukuran sel seragam (Sitepu, dkk., 2024).

B. Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori

C. Pertanyaan Penelitian

Apakah minyak kelapa dengan dan tanpa pemanasan 40°C sebagai *clearing agent* dapat memberikan hasil yang sama baik dengan xylene terhadap histomorfologi pada jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*)