

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Histoteknik

a. Definisi

Histoteknik adalah rangkaian teknik yang dilakukan di laboratorium guna membuat sediaan jaringan (preparat) agar dapat diamati secara mikroskopis (Hasanah, 2024). Proses ini penting agar struktur jaringan seperti sel, nukleus, sitoplasma, dan interaksi antar sel dapat direpresentasikan sedekat mungkin dengan kondisi vivo (atau setidaknya keadaan setelah fiksasi) tanpa distorsi besar.

b. Tahapan Histoteknik

Tahapan dalam melakukan histoteknik meliputi:

1) Fiksasi (*fixtation*)

Fiksasi adalah salah satu tahapan penting dalam proses histoteknik yang bertujuan untuk mempertahankan morfologi atau struktur jaringan seperti kondisi awal atau fisiologis (Virgiawan, Tdanjungbulu dan Armah, 2024). Larutan fiksasi yang umum digunakan adalah *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10%. Rentang waktu yang diperlukan dalam proses fiksasi biasanya memakan waktu 12-24 jam. Fiksasi dalam jangka waktu ini biasanya cukup untuk memastikan bahwa reaksi antara formaldehida dan komponen seluler telah terjadi secara menyeluruh, sehingga mempertahankan kondisi sitoplasma dan inti yang baik dan rinci (Musyarifah dan Agus, 2018).

2) Dehidrasi (*dehydration*)

Dehidrasi adalah proses untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat pada jaringan setelah dilakukannya proses fiksasi, sehingga jaringan data diisi dengan parafin untuk membuat blok preparat (Heryasari, 2024). Media yang digunakan untuk proses dhidrasi adalah alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 96% dan alkohol absolut. Proses dehidrasi pada suatu jaringan akan direndam masing-masing alkohol dengan kisaran waktu tertentu sampai prosesnya berakhir (Onesiforus, Setyoningrum dan San, 2025).

3) Pembeningan (*clearing*)

Clearing atau penjernihan adalah tahapan mengeluarkan sisa-sisa alkohol dan menggantikannya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan media infiltrasi. Agen *clearing* yang umum digunakan adalah xylol. Xylol memberikan hasil preparat yang baik dalam tahapan *clearing* (Lamsudiansyah *et al.*, 2023). Proses pembeningan ini bertujuan untuk menghilangkan dehidran dari dalam jaringan dan mempermudah parafin masuk ke dalam jaringan (Sari dan Fitria, 2024).

4) Infiltrasi

Infiltrasi adalah proses dimana rongga atau ruang dalam jaringan diisi oleh medium pembedam (*embedding medium*), umumnya parafin, untuk memberikan dukungan struktural saat pemotongan (Sari *et al.*, 2019). Infiltrasi yang tidak sempurna akan menyebabkan irisan mudah robek, hasil pewarnaan tidak merata dan munculnya gelembung (Heryasari, 2024).

5) Penanaman (*embedding*)

Embedding adalah proses mengoreintasikan dan membenamkan jaringan ke dalam medium pendukung yang memberikan kekakuan untuk pemotongan (Sofyanita dan Utami, 2023).

6) Pemotongan Jaringan (*sectioning*)

Sectioning adalah proses memotong jaringan tipis dari blok menggunakan mikrotom untuk menghasilkan irisan yang dapat diamati secara mikroskopis. Ketebalan dalam pemotongan blok untuk membuat preparat menentukan kualitas dan pewarnaan dan kejelasan detail (Elen, 2022).

7) Pegapungan (*floating*)

Floating merupakan proses meletakkan pita jaringan pada air hangat sebelum ditempelkan pada kaca objek untuk mengurangi lipatan (Hidayat, Sari dan Nugroho, 2025).

8) Pewarnaan (*staining*)

Pewarnaan merupakan tahap pemberian warna pada jaringan, agar sel dan material ekstraseluler dapat diperiksa secara mikroskopis. Pewarna yang biasa digunakan dalam pembuatan preparat histologi umumnya menggunakan *Hematoxylin & Eosin* (HE). Hematoksilin memberikan warna pada DNA di inti sel dan eosin sebagai *counterstain* untuk mewarnai sitoplasma (Utami, Wahid dan Ridwan, 2025).

9) Perekatan (*mounting*)

Mounting merupakan proses pelekatan coverglass pada sediaan dengan menggunakan cairan perekat yang disebut dengan entellan. Proses ini bertujuan untuk melindungi sediaan dari lensa mikroskop ketika melakukan pengamatan (Novita dan Yuliana, 2023).

10) Pelabelan (*labeling*)

Pelabelan penting untuk memberikan informasi identitas sediaan. Cara pemberian label tergantung pada kebijakan manajemen lembaga pemeriksa, label dapat ditulis identitas pasien secara jelas atau hanya kode (Anisa *et al.*, 2024).

2. Clearing

Clearing adalah proses membuat jaringan menjadi transparan dengan mengganti agen dehidrasi dengan zat yang memiliki indeks refraksi serupa dengan jaringan, sehingga memungkinkan cahaya melewati tanpa hamburan (Yulita, 2020). *Clearing* dilakukan setelah dehidrasi jaringan dalam alkohol dan sebelum *embedding* (penyematan) dalam parafin. Agen pembersih yang biasa digunakan dalam pembuatan preparat histologi adalah xylol atau xilena. Proses ini mencegah distorsi selama pemotongan dan meningkatkan kualitas slide histologi (Lamsudiansyah *et al.*, 2023).

Faktor yang dapat mempengaruhi hasil *clearing* menurut buku *Theory dan Practice of Histological Techniques* (edisi ke-6, 2008) oleh Bancroft dan Gamble, (2008) dalam Wiryanti *et al.*, (2022) antara lain:

- 1) Jenis Zat Pembersih (*Clearing Agent*) : Pemilihan zat pembersih seperti xylol atau *toluene* memengaruhi kecepatan dan efektivitas *clearing*.

- 2) Durasi Paparan (*Duration of Exposure*) : Paparan yang terlalu lama terhadap zat pembersih dapat menyebabkan kerusakan jaringan, sedangkan waktu yang tidak cukup menyebabkan transparansi buruk.
- 3) Suhu (*Temperature*) : Suhu juga memengaruhi laju proses clearing. Suhu yang lebih tinggi mempercepat proses *clearing*, akan tetapi dapat menyebabkan penguapan sehingga kualitas preparat buruk.
- 4) Jenis jaringan (*Tissue Type*) : Jaringan yang berbeda memerlukan pendekatan waktu yang berbeda juga. Jenis dan ketebalan jaringan menentukan waktu *clearing* dan kesesuaian zat pembersih.
- 5) Kualitas Proses Sebelumnya (*Quality of Prior Processing*) : Dehidrasi yang tidak lengkap dapat menghambat *clearing* dan menghasilkan hasil preparat yang kurang optimal.

3. Parafin

Parafin lilin adalah media embedding yang paling umum digunakan karena kemudahan pemotongannya dan kompatibilitas dengan jaringan. Parafin dilelehkan pada suhu 56-60°C dan disusupkan ke dalam jaringan yang telah dijernihkan (Apriani *et al.*, 2023). Proses ini melibatkan infiltrasi parafin cair ke dalam jaringan, diikuti pendinginan untuk membentuk blok padat yang stabil. Parafin menjaga struktur jaringan, memfasilitasi pemotongan presisi dan memudahkan pewarnaan histologis. Namun, parafin dapat menyusut jika tidak dikontrol suhunya, dan alternatif seperti resin digunakan untuk jaringan keras atau spesimen khusus (Wulansari, 2022).

4. Xylol

Xylene atau lebih dikenal dengan nama xylol, adalah pelarut organik yang termasuk dalam kelompok hidrokarbon aromatik. Senyawa ini terdiri dari tiga isomer utama yaitu ortho-xylol (o-xylol), meta-xylol (m-xylol), dan para-xylol (p-xylol) yang memiliki rumus kimia yang sama, yaitu $C_6H_4(CH_3)_2$. Salah satu karakteristik xylol adalah viskositas nya yang sangat rendah. Xylol memiliki viskositas yang berkisar antara 0,6 – 0,8 mPa pada suhu 25°C (Halizah dan Tejamaya, 2024). Viskositas yang rendah ini mendukung efisiensi proses *clearing* karena mempercepat penetrasi pelarut ke dalam ruang antar sel dan memudahkan penggantian cairan dehidrasi dengan media *embedding* (Rahmawati, Putra dan Sari, 2024).

Tabel 1. Sifat Xylol

Sifat	Keterangan
Bentuk	Cairan bening
Bau	Khas, tajam (aromatik)
Titik didih	138-144°C (tergantung isomer)
Kelarutan	Tidak larut dalam air, larut dalam pelarut organik
Sifat Toksik	Dapat membuat iritasi mata, kulit dan saluran pernapasan

Xylol merupakan cairan mudah terbakar, dapat menyebabkan iritasi pada kulit dan mata serta dapat menyebabkan kerusakan pada organ hati, ginjal, dan sistem saraf pusat melalui paparan yang lama atau berulang (Naziihah, 2024).



Gambar 1. Piktogram Bahaya Xylol

Sumber: Chevron Phillips Chemical Company, (2020)

a. Kelebihan Xylol dalam Histologi

Xylol dikenal sebagai *clearing agent* yang sangat efektif karena mampu membuat jaringan tampak jernih dan memiliki daya penetrasi cepat, sehingga proses pembuatan preparat dapat dilakukan lebih efisien. Xylol juga bersifat kompatibel dengan berbagai media embedding, terutama parafin, sehingga sangat ideal digunakan dalam metode rutin pembuatan slide jaringan histologi (Rahmawati, Putra dan Sari, 2024).

b. Kekurangan Xylol dalam Histologi

Xylol termasuk senyawa yang bersifat toksik, dapat mengiritasi kulit, mata, dan saluran pernapasan, serta berpotensi menyebabkan kerusakan hati dan ginjal pada paparan kronis. Selain itu, penggunaan xylol yang berlebihan dapat menyebabkan pengerutan jaringan dan membuat tekstur jaringan menjadi lebih keras, sehingga dapat mempengaruhi kualitas hasil pengamatan mikroskopis (Irianti *et al.*, 2024). Xylol juga memiliki bau yang tajam dan mudah menguap, sehingga penggunaannya memerlukan fasilitas ventilasi yang baik serta protokol keselamatan laboratorium yang ketat (National Institute for Occupational Safety dan Health (NIOSH), 2020).

5. Minyak zaitun

Secara kimia, minyak zaitun tersusun atas asam lemak tak jenuh tunggal, khususnya asam oleat yang dapat mencapai lebih dari 70% dari total komposisinya. Sedangkan kandungan asam lemak yang lain dalam minyak zaitun adalah asam linoleat (2,5 – 21%), asam palmitat (7,5 – 20%) dan asam α -linolenat ($\leq 1,00\%$). Indeks bias (*refractive index*) pada minyak zaitun mendekati indeks bias beberapa komponen jaringan sehingga membantu membuat jaringan lebih *translucent* (mempermudah pembacaan struktur jaringan) (Amelia, 2022). Selain itu, minyak zaitun bersifat non polar sehingga mampu

menggantikan alkohol dalam jaringan. Semua kandungan dalam minyak zaitun memiliki peran dalam keberlangsungan proses penjerihan terutama pada asam oleat. Sifat kimia dari asam oleat bersifat lipofilik yang mempermudah difusi ke jaringan untuk menggantikan alkohol yang berada di ruang antar sel (Zuhri *et al.*, 2024).

Minyak zaitun memiliki viskositas yang lebih tinggi sehingga laju difusi dan penetrasinya ke dalam jaringan berjalan lebih lambat. Maka dari itu, pemanasan perlu dilakukan sebelum minyak zaitun digunakan sebagai agen penjernih (Ariani, 2020). Pemanasan pada suhu tertentu menyebabkan penurunan viskositas minyak, meningkatkan energi kinetik molekul, dan mempercepat penetrasi minyak ke dalam jaringan. Pemanasan yang dilakukan membantu membuka ruang antar sel sehingga alkohol efektif menghilangkan alkohol dan mempermudah proses infiltrasi parafin di tahap berikutnya (Sari dan Fitria, 2024).

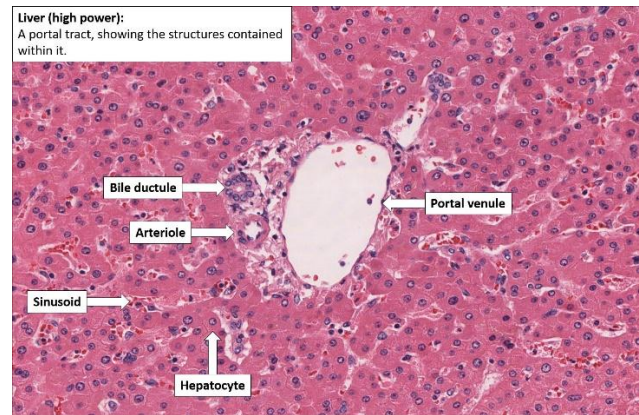
Dalam bidang histologi minyak zaitun sudah banyak diteliti sebagai bahan alternatif alami untuk agen penjernih pengganti xylol. Hal ini dilakukan karena xylol diketahui memiliki sifat toksik dan berdampak buruk terhadap kesehatan pekerja laboratorium. Secara sifat fisik, minyak zaitun memiliki indeks bias yang mendekati jaringan biologis sehingga dapat membantu proses pengerjaan preparat untuk menjadi lebih transparan dan siap untuk infiltrasi parafin (Hanifah dan Rahmawati, 2025). Penggunaan minyak zaitun sendiri sebagai agen penjernih menunjukkan efektivitas yang cukup baik, terutama pada jaringan dengan ukuran tidak terlalu tebal. Namun, minyak zaitun memiliki beberapa kekurangan, yaitu proses clearing yang berlangsung lebih lambat akibat daya penetrasinya yang lebih rendah dibandingkan xylol (Zakia, 2019). Hal ini menyebabkan transparansi jaringan yang dihasilkan kurang optimal, terutama pada

jaringan dengan ketebalan lebih tinggi. Oleh karena itu, meskipun minyak zaitun lebih aman untuk pengguna, efektivitasnya pada proses clearing masih dianggap kurang maksimal dibandingkan xylol (Putri, 2021).

6. Histologi Hepar

Hepar merupakan organ terbesar dalam tubuh yang memiliki peran penting dalam metabolisme, detoksifikasi, sintesis protein plasma, serta penyimpanan glikogen dan nutrisi. Pada aspek histologi, hepar tersusun atas unit sentralis yang disebut lobulus hepatikus, dengan vena sentralis di bagian tengahnya (Sari, Saebani dan Dhanardhono, 2018). Terdapat triad portal yang terdiri dari arteri hepatica, vena porta, dan ductus bilier pada bagian sudut lobulus yang berfungsi mengatur suplai darah dan pengeluaran empedu. Sel utama penyusun hepar adalah hepatosit, sebuah sel besar dengan inti bulat dan sitoplasma eosinofilik, yang menunjukkan aktivitas metabolik tinggi (Sari, Saebani dan Dhanardhono, 2018).

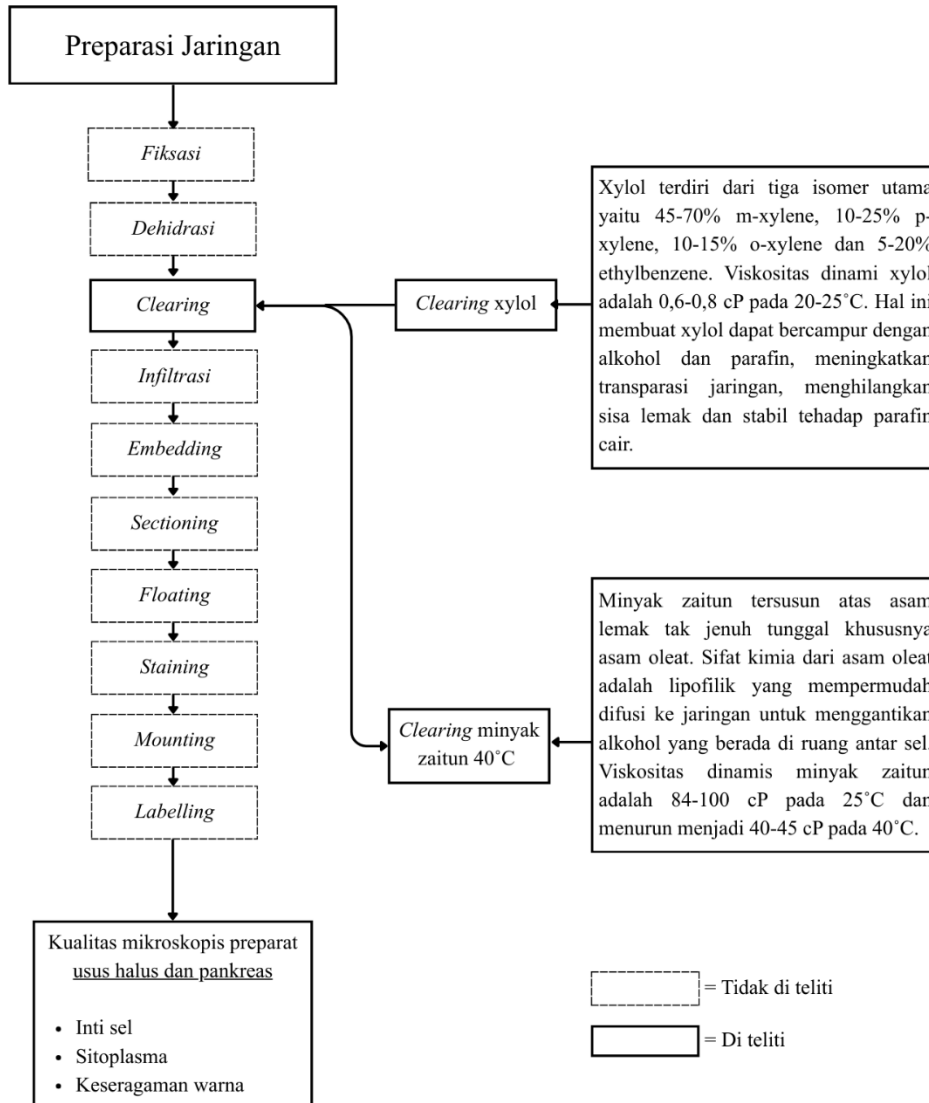
Di antara lempeng hepatosit terdapat sinusoid hepatic, kapiler berdinding tipis yang dilapisi sel endotel fenestrasi, yang memungkinkan terjadinya pertukara molekul antara darah dan hepatosit. Pada sinusoid juga terdapat sel kupffer, yaitu makrofag hati yang berfungsi untuk fagositosis sisa sel dalam sistem portal (Sitepu, Sitasiwi dan Suprihatin, 2024). Selain itu, di antara permukaan lateral hepatosit terdapat kanalikuli empedu, saluran sempit yang mengalirkan empedu ke ductus bilier. Pola aliran darah dan empedu di hepar tikus Wistar sama pada manusia, yaitu darah mengalir dari perifer lobulus menuju vena sentral, sedangkan empedu mengalir secara berlawanan arah menuju ductus bilier (Sari, Saebani dan Dhanardhono, 2018).



Gambar 2. Gambaran Histologi Jaringan Hepar dengan Pewarnaan H&E (400x)

Sumber: Afrida dan Priyanto, (2021)

B. Kerangka Teori



C. Pertanyaan Penelitian

Apakah minyak zaitun yang dipanaskan pada suhu 40°C sebagai agen penjernih menghasilkan kualitas preparat histologi yang baik pada jaringan hepar tikus Wistar?

