

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Definisi Histoteknik

Teknik pembuatan sediaan histologi atau histoteknik adalah metode untuk membuat sediaan histologi dari spesimen tertentu melalui suatu rangkaian proses hingga menjadi sediaan yang siap untuk diamati atau dianalisa. Sediaan histologi yang baik dapat digunakan untuk bahan pengajar dan praktikum mahasiswa, guna mempelajari bentuk dan struktur jaringan tubuh tertentu yang normal. Selain itu untuk riset, guna mempelajari perubahan jaringan dan organ tubuh hewan percobaan yang mendapat perlakuan tertentu atau mempelajari pertumbuhan dan perkembangan jaringan atau organ tubuh tertentu. Serta membantu menegakkan diagnosa penyakit yang diderita oleh seorang pasien (Wulansari, 2022). Teknik histologi, juga dikenal sebagai histoteknik, adalah seni dan ilmu mempersiapkan organ, jaringan, atau bagian jaringan untuk pengamatan dan analisis. Sediaan jaringan harus dibuat sedemikian rupa sehingga menghasilkan sediaan jaringan mikroskopis yang ideal. Ini memungkinkan struktur dan komposisi molekul jaringan tetap sama seperti di dalam tubuh (Khristian & Inderiati, 2017).

Histoteknik, menurut Supriyanto (2014), adalah proses membuat sediaan histologi dari suatu spesimen melalui berbagai prosedur hingga menjadi sediaan yang siap untuk diamati atau dianalisis. Pemeriksaan histopatologi adalah pemeriksaan morfologi sel atau jaringan pada sediaan mikroskopis menggunakan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE). Ini dilakukan untuk mendiagnosa kelainan seperti degenerasi, radang, atau infeksi neoplasma, yang merupakan faktor kematian forensik (Sari dan Hariyanto, 2020). Selain itu, pemeriksaan histopatologi juga bertujuan untuk memberikan diagnosis yang tepat, spesifik, dan menyeluruh, sehingga dokter dapat melakukan perawatan dan pengobatan (Khristian dan Inderiati, 2017).

Pemeriksaan histopatologi merupakan suatu cara yang dilakukan untuk melihat perubahan metabolisme dari perubahan jaringan yang terjadi. Pemeriksaan ini sangat penting dalam kaitan diagnosis penyakit karena salah satu pertimbangan dalam penegakan diagnosis adalah melalui hasil pengamatan terhadap jaringan yang diduga terganggu (McVary & Roehrborn, 2010). Metode teknik pembuatan preparat histopatologi: (1) Organ yang telah dipotong secara representatif dan telah difiksasi formalin 10% 3 jam; (2) Bilas dengan air mengalir 3–5 kali; (3) Dehidrasi dengan: alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alcohol absolut selama 1 jam, alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam; (4) Clearing :xylol I selama 1 jam, xylol II selama 1 jam; (5) Impregnasi dengan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65°C; (6) Pembuatan blok parafin: sebelum dilakukan pemotongan blok parafin didinginkan dalam lemari es. Pemotongan menggunakan rotary microtome dengan menggunakan disposable knife. Pita paraffin dimekarkan pada water bath dengan suhu 60°C. Selanjutnya dilakukan pewarnaan hema toksilineosin (HE) (Muhartono dkk., 2013).

2. Proses Pembuatan Sediaan Histologi

Pemeriksaan yang dianjurkan dalam menegakkan diagnosis adanya tumor adalah pemeriksaan darah rutin dan kimia darah (Depkes RI, 2018). Sedangkan pemeriksaan baku emas dalam menegakkan diagnosis kanker adalah pemeriksaan patologi anatomi, yaitu dengan cara memeriksa morfologi sel secara mikroskopik dengan sampel yang berasal dari hasil operasi atau biopsi jaringan kanker yang hasilnya akan digunakan sebagai dasar pengobatan dan penentuan jenis serta grading kanker (Syafri, 2015). Sebelum mengidentifikasi tingkat keganasan kanker, dibutuhkan sediaan jaringan. Serangkaian proses pembuatan sediaan dari jaringan ini yang disebut dengan prosesing jaringan (Sumanto, 2014). Prosesing jaringan untuk pemeriksaan histopatologi dapat dijabarkan sebagai berikut:

a. Fiksasi

Fiksasi adalah usaha untuk mempertahankan komponen-komponen sel atau jaringan agar tidak mudah rusak dan tidak mengalami perubahan. Proses fiksasi agar setiap molekul pada jaringan yang hidup tetap berada pada tempatnya dan tidak ada molekul baru yang timbul. Tujuan fiksasi agar jaringan tetap utuh. Fiksasi harus dilakukan sesegera mungkin setelah pengangkatan jaringan agar tidak terjadi autolisis (Alwi, 2016).

Prinsip kerja fiksasi adalah untuk mempertahankan bentuk sel dan organel agar mendekati bentuk fisiologisnya. Komposisi jaringan diubah secara kimiawi dan fisik oleh cairan fiksatif. Dengan koagulasi, protein sel diubah secara fungsional dan struktural secara kimiawi, membentuk senyawa aditif baru. Senyawa tersebut terbentuk dengan ikatan silang dari cairan fiksatif dan protein sel. Hal ini menyebabkan sel menjadi tahan terhadap pergerakan cairan, seperti air. Akibatnya, struktur sel menjadi stabil baik di dalam maupun di antara sel. Selain itu, enzim di dalam sel menjadi terinaktivasi, yang mencegah autolisis sel dan proses metabolisme sel. Secara fisik, membran sel yang awalnya hidrofilik dilarutkan dengan cairan fiksatif, yang menyebabkan pori-pori sel menjadi lebih besar. Akibatnya, makromolekul memiliki kemampuan untuk memasuki sel. Hal ini membantu untuk teknik setelah fiksasi, khususnya pada proses deparafinisasi dan pewarnaan di mana zat-zat tersebut dapat masuk ke dalam sel dan menempel dengan mudah (Alwi, 2016).

Tujuan utama fiksasi adalah untuk memastikan bahwa protoplasma tetap dalam kondisi yang sama seperti saat ia hidup. Selain berfungsi sebagai pengawet, cairan fiksasi biasanya menggumpalkan protoplasma, menjadikannya tidak larut, dan mengeraskan jaringan, sehingga mempermudah pengirisan. NBF 10%, yang merupakan reagen fiksasi yang paling umum digunakan, dapat memberikan hasil yang jelas terhadap inti sel, sitoplasma, keseragaman warna, dan sel endotel pada gambaran mikroskopis sediaan jaringan. Larutan Carnoy adalah

larutan fiksatif tambahan yang dapat digunakan untuk fiksasi. Menurut Afrida & Priyatno (2021), larutan ini baik untuk pengamatan mikroskopis jaringan terhadap inti sel sitoplasma, keseragaman warna, dan batas antar sel dengan variasi waktu selama empat jam.

b. 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 menggunakan alkohol bertingkat. Mulai dari alkohol 70%, 80%, 90%, 100%. Penggunaan alkohol dari konsentrasi dari yang rendah ke tinggi supaya tidak merusak jaringan lunak (Juliati, 2017).

Tujuan dari proses dehidrasi adalah untuk mengurangi jumlah air yang ada di dalam jaringan. Karena larutan fiksatif larut dalam air, jaringan yang sudah difiksasi menjadi akuosa. Penghilangan air dilakukan secara bertahap supaya jaringan tidak mengkerut karena kehilangan air yang cepat. Menurut Sumanto (2014), air dalam jaringan harus diganti dengan larutan tambahan. Larutan tambahan ini kemudian dapat menyatu dengan larutan clearing.

c. Penjernihan (*Clearing*)

Clearing juga dikenal sebagai penjernihan, adalah proses mengeluarkan zat yang dehidran dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan media infiltrasi. Di laboratorium pembuatan sediaan histologi, xilol adalah agen clearing yang umum digunakan. Xilol memberikan hasil preparat sediaan yang baik dalam tahap clearing karena memiliki tingkat kelarutan yang tinggi terhadap agen dehidran dan materi parafin. Xilol juga dapat memberikan efek transparan pada jaringan (Faridah, F., Ariyadi, T., & Nuroini, F., 2019).

d. Penanaman (Embedding)

Penanaman adalah proses di mana cairan pembening dari jaringan dikeluarkan dan digantikan dengan parafin. Jaringan harus bebas dari cairan pembening karena jika tidak, cairan pembening akan mengkristal dan jaringan akan mudah robek saat dipotong. Untuk mencegah parafin membeku, jaringan akan dibenamkan di larutan parafin tiga kali selama waktu tertentu sambil dipanaskan (Rina, 2013).

Posisi spesimen yang baik dalam proses penanaman jaringan adalah sebagai berikut:

- 1) Struktur tubular: penampang dinding dan lumen terlihat (vena, arteri, spesimen vas deferens, dan tuba falopi).
- 2) Biopsi kulit: penampang epidermis, dermis, eksisi, dan lapisan subkutan terlihat.
- 3) Biopsi epitel: potong bidang pada sudut kanan lalu ke permukaan, dan posisikan hingga pemotongan epitel dipotong terakhir guna meminimalisir tekanan dan distorsi lapisan epitel.
- 4) Biopsi otot: potongan harus mengandung bidang melintang dan longitudinal.
- 5) Jika pemotongan beberapa jaringan dilakukan secara bersamaan, maka epitel diposisikan menghadap arah yang sama (Khristian et al, 2017).

e. Blocking

Pengeblokan adalah proses pembuatan blok preparat. Dengan menanamkan atau memasukkan jaringan kedalam cetakan untuk memudahkan proses penyayatan dengan mikrotom. Cetakan yang digunakan adalah base mould, yaitu cetakan yang terbuat dari logam yang tidak berkarat. Tujuan dari proses ini untuk membuat blok paraffin menjadi preparat permanen (Juliati, 2017).

Prosesnya yaitu jaringan diambil dari kaset lalu ditempatkan pada base mold, kemudian paraffin cair yang sejenis dengan paraffin yang digunakan pada saat proses infiltrasi dituangkan ke dalam cetakan base mold. Tahap yang penting di dalam proses penanaman adalah

mengorientasikan jaringan secara baik sehingga dapat mempermudah proses pemotongan jaringan (BPPSDMK, 2017).

f. Pemotongan

Menurut Alwi (2016), pemotongan dilakukan dengan menggunakan pisau khusus yang disebut mikrotom. Mikrotom memiliki pisau yang tajam yang dapat mengiris potongan blok dengan sangat tipis dan sesuai dengan ukuran ketebalan yang diinginkan. Dengan menggunakan mikrotom, jaringan dipotong dari blok parafin setebal 4-5 mm. Blok parafin dipasang pada dudukan mikrotom, lalu bagian yang dipotong seperti pita dipotong, dan kemudian diapungkan pada waterbath untuk meregangkan bagian parafin. Selanjutnya, letakkan bagian untuk menempel pada objek kaca (Slaoui & Fiette, 2014).

Mikrotomi merupakan bagian dari jaringan yang dipotong dan ditempelkan pada suatu kaca objek yang kemudian akan diproses sehingga menghasilkan suatu sediaan yang dapat teramati secara mikroskopis. Umumnya mikrotomi ini diperoleh dari jaringan yang ditanam dalam parafin, sehingga didapat blok jaringan yang bersifat padat dan keras (Wulansari, 2022).

g. Floating

Tujuan floating adalah untuk merekatkan pita parafin pada kaca objek. Ini dilakukan dengan memasukkan objek kaca ke dalam waterbath pada suhu 60 derajat Celcius, lalu digerakkan ke arah pita paraffin (Juliati, 2017).

h. Deparafinisasi

Deparafinisasi adalah proses menghilangkan parafin sebelum pewarnaan agar warna dapat diserap sepenuhnya pada jaringan. Untuk menggunakan reagen seperti xylol, toluen, benzol, atau kloroform, bagian jaringan harus terlebih dahulu dideparafinisasi dengan xylol, kemudian dicuci dalam pengenceran alkohol bertingkat untuk menghilangkan pelarut organik dan parafin dari jaringan (Kalantari, Bayani, & Ghaffari2016).

Deparafinisasi salah satu langkah penting dalam proses pewarnaan sediaan jaringan. Karena sifat parafin yang tidak dapat larut dalam air (hidrofobik), parafin harus larut dengan pelarut nonpolar. Xylol adalah pelarut nonpolar yang paling umum digunakan dalam proses deparafinisasi dan pada tahap clearing, tahap pewarnaan yang juga membutuhkan xylol (Akmalia, 2018).

i. Pewarnaan

Pewarnaan merupakan salah satu prosedur yang ada didalam bidang histoteknik. Pewarnaan merupakan proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong agar jaringan mudah dikenali pada saat pengamatan dengan menggunakan mikroskop. HE (Hematoxilyn-Eosin) merupakan zat warna yang sering digunakan dalam pewarnaan histoteknik (Jamie et al, 2010).

Hematoxylin berfungsi untuk memberikan warna biru (basofilik) pada inti sel, serta eosin yang berfungsi untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma sel dan jaringan penyambung (Juliati, 2017). Eosin adalah pewarna asam yang memiliki afinitas terhadap sitoplasma sel sedangkan pada hematoxilyn memiliki afinitas terhadap nukleus. Eosin penggunaannya lebih aman dibandingkan dengan hematoxilyn (Anil & Rajendran,2008).

j. Perekatan (*Mounting*)

Setelah proses pewarnaan, preparat ditetesi dengan entelan lalu ditutup dengan deck glass. Tujuan pada tahap ini agar preparat lebih tahan lama dan tidak tergores. Pada saat preparat ditutup dengan deck glass, harus dipastikan bahwa tidak ada gelembung yang terbentuk. Adanya gelembung udara akan mengganggu pengamatan dan diagnosa (Juliati, 2017).

j. Pelabelan (*Labeling*)

Preparat yang sudah diberi cover, diberi label yang berisi nama pasien dan nomer rekam medik. Pemberian label dilakukan supaya diagnosa pasien yang satu dengan yang lainnya tidak tertukar (Juliati, 2017).

3. Penilaian Sediaan Histopatologis

Penetapan diagnosis histopatologis memerlukan pemeriksaan mikroskopis ringan pada bagian jaringan yang diwarnai Hematoksilin dan eosin (H&E) (Humphrey,2017).

Pedoman umum yang dapat digunakan untuk menilai kualitas pewarnaan HE adalah:

- a. Pewarna tersebut menyebabkan nukleus berwarna biru, menunjukkan bahwa selubung nukleus, nukleolus, dan kromatin memiliki vakuola dan hiperkromatis..
- b. Sitoplasma dan zat dasar lainnya: mewarnai sitoplasma, kolagen, otot, sel darah merah, eritrosit, dan musin dengan warna kemerahan, sehingga dapat dibedakan.
- c. Pewarnaan hematoxylin yang terlalu teroksidasi menodai elemen jaringan tertentu menjadi coklat.

Evaluasi spesimen jaringan parafin dengan pewarnaan HE terdiri dari beberapa parameter yaitu:

1. Fiksasi

Jaringan terfiksasi sempurna, tidak tampak lisis, merata dari tepi hingga tengah jaringan.

2. Pengolahan sampel sampai menjadi blok paraffin

- 1) Tidak tampak bercak putih dalam blok
- 2) Tidak ada fragmentasi
- 3) Orientasi jaringan menampilkan semua lapisan

3. Pemotongan blok paraffin

- 1) Blok tipis dengan ketebalan 1 sel maksimal 5 mikron
- 2) Ketebalan merata
- 3) Tanpa lipatan
- 4) Tidak ada goresan
- 5) Tidak ada kontaminan jaringan lain
- 6) Tidak ada bercak sidik jari

4. Pulasan dan Mounting

- 1) Kontras warna hematiksilin dan eosin cukup jelas
- 2) Sediaan bersih dan jernih
- 3) Tidak ada udara pada mounting
- 4) Mounting media tidak kurang/lebih
- 5) Seluruh jaringan tertutup oleh kaca penutup

(Badan Penjaminan Mutu Pelayanan Patologi Indonesia, 2018)

B. Kerangka Konsep

