

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Fiksasi

Fiksasi jaringan merupakan suatu upaya yang dilakukan untuk mempertahankan integritas komponen seluler maupun jaringan agar tidak mengalami perubahan struktural maupun kerusakan. Melalui proses ini, diharapkan setiap molekul yang terdapat pada jaringan tetap berada pada posisi aslinya, sehingga tidak terbentuk molekul baru yang dapat menimbulkan artefak. Tujuan utama fiksasi adalah menjaga agar jaringan tetap utuh dan representatif untuk keperluan analisis histologi. Oleh karena itu, tindakan fiksasi perlu dilakukan segera setelah jaringan diangkat atau setelah terjadinya kematian, guna mencegah terjadinya autolisis. (Anil dan Rejendran, 2008).

Secara prinsip, mekanisme kerja fiksasi bertujuan untuk mempertahankan morfologi sel dan organel sehingga strukturnya tetap mendekati kondisi asli saat masih berada di dalam tubuh. Pemberian larutan fiksatif menyebabkan terjadinya perubahan komposisi jaringan, baik secara kimiawi maupun fisik. Jaringan yang difiksasi tersusun atas sel dan komponen ekstraseluler, yang di dalamnya terdapat berbagai elemen seperti peptida dan protein, lipid serta fosfolipid pada membran, karbohidrat beserta kompleksnya, serta asam nukleat berupa DNA dan RNA. Selama proses fiksasi, elemen-elemen tersebut akan mengalami reaksi yang sifatnya sangat bergantung pada jenis larutan fiksatif yang digunakan, sehingga beberapa komponen dapat dipertahankan sedangkan yang lain mungkin mengalami degradasi atau hilang (Khristian dan Inderiati, 2017).

Tujuan dari Fiksasi ini dapat dituliskan beberapa tujuan sebagai berikut :

1. Menjaga Stuktur dan Komponen Kimiawi

Fiksasi bertujuan untuk mempertahankan struktur morfologis dan komponen kimiawi sel atau jaringan agar tetap menyerupai kondisi saat masih hidup. Dengan demikian, pemeriksaan terhadap struktur normal maupun patologis serta analisis histokimia dapat dilakukan secara optimal tanpa mengalami distorsi yang berarti.

2. Pencegahan Kerusakan dan Kematian

Fiksasi juga berfungsi untuk mencegah terjadinya perubahan pasca-mortem, seperti autolisis dan pembusukan jaringan. Autolisis merupakan proses degradasi diri yang terjadi melalui mekanisme pencernaan intraseluler

oleh enzim yang dilepaskan ketika membran lisosom mengalami kerusakan. Sementara itu, pembusukan umumnya disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme yang telah ada pada spesimen, yang ditandai dengan terbentuknya gas di dalam wadah penyimpanan jaringan.

3. Mengerasakan Sel dan Jaringan

Pengerasan jaringan pada dasarnya bukan merupakan tujuan utama dari proses fiksasi, namun merupakan efek samping yang menguntungkan. Hasil pengerasan tersebut mempermudah proses pemotongan secara makroskopis, terutama pada jaringan yang memiliki konsistensi lunak, seperti otak, usus, dan jaringan sejenis lainnya.

4. Pemadatan

Reaksi kimiawi yang terjadi akibat pemberian larutan fiksatif menyebabkan komponen sel maupun jaringan mengalami perubahan konsistensi, yaitu dari kondisi setengah cair (gel) menjadi semipadat hingga padat.

5. Opticdiferensiasi

Selain berfungsi untuk mencegah kerusakan sel, fiksasi juga memberikan dampak terhadap perubahan indeks bias pada berbagai komponen sel maupun jaringan. Perubahan ini memungkinkan struktur yang telah terfiksasi menjadi lebih mudah divisualisasikan di bawah mikroskop.

6. Efek Pewarnaan

Dalam kondisi tertentu, penggunaan larutan fiksatif dapat meningkatkan intensitas pewarnaan pada sel maupun jaringan. Sebagai contoh, formalin diketahui mampu memperkuat karakter pewarnaan jaringan, khususnya ketika menggunakan pewarnaan hematoksilin. Sebaliknya, apabila preparat akan diwarnai dengan metode Masson Trichrome, fiksatif yang lebih sesuai adalah larutan Bouin, karena mampu menghasilkan kontras warna yang lebih optimal.

7. Menempelkan sel

Pada pembuatan sediaan sitologis, larutan fiksatif juga berperan sebagai perekat yang membantu sel menempel pada kaca objek. Proses ini dapat dilakukan baik melalui fiksasi basah menggunakan larutan fiksatif maupun melalui metode fiksasi kering. Fungsi tersebut umum diterapkan pada preparat berupa apusan sel maupun apusan bakteri di atas kaca sediaan.

2. Fiksasi Sediaan Histologi

Larutan fiksatif yang paling banyak digunakan dalam histopatologi adalah formalin 10%, yaitu larutan yang mengandung sekitar 4% formaldehida. Formalin sendiri merupakan nama dagang dari larutan formaldehida 40% dalam air. Pada umumnya, formaldehida dalam larutan hadir dalam bentuk polimer larut yang mengalami polimerisasi. Untuk mencegah pembentukan polimer dengan berat molekul lebih tinggi, produsen menambahkan sekitar 10% metanol ke dalam larutan, sehingga terbentuk paraformaldehida. Penyimpanan formalin pada suhu rendah sering menimbulkan endapan berupa bubuk putih. Selain itu, formaldehida dalam larutan dapat mengalami reaksi cannizzaro, menghasilkan metanol dan asam format. Secara kimiawi, sebagian besar formaldehida berada dalam bentuk metilen hidrat yang terbentuk melalui reaksi reversibel dengan air. Formaldehida inilah yang bereaksi dengan protein jaringan, meskipun konsentrasi relatif rendah, yaitu sekitar 4%.

Larutan fiksatif ini telah digunakan selama lebih dari lima dekade karena kemampuannya mempertahankan pH netral serta menjaga tekanan osmotik tetap seimbang dengan cairan ekstraseluler. Untuk mencapai kondisi pH netral, formalin ditambahkan dengan garam penyanga sehingga dikenal sebagai *Neutral Buffered Formalin* (NBF). Mekanisme kerja NBF tidak berlangsung melalui proses koagulasi, melainkan melalui pembentukan ikatan silang dengan rantai samping asam amino, terutama lisin, serta dengan ikatan peptida pada atom nitrogen amida. Ikatan silang tersebut terbentuk melalui jembatan metilen hasil reaksi formaldehida, yang kemudian menghubungkan dua molekul protein. Proses ini menyebabkan perubahan struktur protein, menurunkan permeabilitas makromolekul, sekaligus tetap mempertahankan morfologi jaringan. Ukuran molekul formaldehida dan metilen glikol yang relatif kecil memungkinkan penetrasi cepat ke dalam jaringan, sehingga NBF efektif digunakan baik untuk spesimen berukuran besar maupun kecil (Bahan Ajar Sitohistoteknologi, 2017).

Adapun larutan yang sering digunakan sebagai larutan fiksasi dengan komposisi sebagai berikut :

Tabel 2. 1 Komposisi Neutral Buffer Formalin 10% (NBF)

No.	Kandungan	Kadar
1	Aquades	900 ml
2..	Formalin	100ml
3.	Sodium Fosfat Monobasik	4,0 gram
4.	Natrium diHidrogen Phospat (NaH_2PO_4)	4,0 gram
5.	Dinatrium Hidrogen Phospat (Na_2HPO_4)	6,5 gram

Sumber : (Prosedur Tetap/SOP Laboratorium Balai Veteriner Lampung)

Seluruh komponen dicampurkan hingga homogen, kemudian dilakukan pengukuran pH larutan yang diharapkan berada pada rentang 3,2–4,5 atau 4–5,5. Apabila pH yang diperoleh belum sesuai, maka dilakukan penyesuaian dengan menambahkan natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4) dan dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) dengan perbandingan 1:1,625 hingga pH tercapai. Jika larutan menunjukkan kondisi terlalu basa, maka penurunan pH dapat dilakukan dengan penambahan asam asetat secara bertahap hingga mencapai nilai pH yang diinginkan.

a. Bahaya Paparan *Neutral Buffer Formalin*

Paparan formalin, khususnya dalam bentuk larutan *Neutral Buffered Formalin* (NBF), diketahui bersifat toksik dan karsinogenik, sehingga berpotensi meningkatkan risiko kanker pada individu yang terpapar secara berulang maupun jangka panjang. Berdasarkan laporan *Environment Health and Safety Information* (EHSI), formalin dikategorikan sebagai bahan berbahaya yang harus diwaspadai karena sifat karsinogeniknya. Efek paparan formalin dapat menimbulkan berbagai keluhan klinis, antara lain iritasi pada kulit, mata, hidung, tenggorokan, dan saluran pernapasan, disertai gejala sistemik seperti sakit kepala, pusing, mual, muntah, sesak napas, serta dermatitis kontak. Paparan kronis bahkan dikaitkan dengan peningkatan risiko kanker, terutama kanker nasofaring dan leukemia. Oleh karena itu, penggunaan alat pelindung diri (APD) seperti sarung tangan, kacamata pelindung, dan masker pernapasan sangat dianjurkan bagi pekerja laboratorium.

3. Pemeriksaan Histopatologi

Histopatologi merupakan cabang ilmu biologi yang mempelajari struktur dan fungsi jaringan dengan tujuan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya kelainan atau penyakit (Sumanto, 2014). Proses pembuatan preparat histologis dilakukan melalui serangkaian tahapan, meliputi fiksasi (*fixation*), dehidrasi (*dehydration*), pembeningan (*clearing*), impregnasi dan penanaman (*embedding*), pemblokiran (*blocking*), pemotongan jaringan (*sectioning*), pembuatan sediaan (*affixing*), pewarnaan (*staining*), penutupan (*mounting*), serta pelabelan (*labeling*).

Langkah awal dalam isolasi jaringan meliputi persiapan alat yang terdiri atas instrumen bedah berukuran kecil, instrumen anestesi, serta peralatan untuk preservasi jaringan. Instrumen bedah yang umum digunakan antara lain gunting, tang, pisau bedah, klem, kaset jaringan, kain kasa, meja operasi, dan lampu. Untuk keperluan anestesi digunakan alat suntik sekali pakai, masker anestesi, serta bahan anestetik seperti eter, ketal, dan fenobarbital. Sementara itu, peralatan preservasi jaringan meliputi wadah fiksasi perendaman serta berbagai larutan fiksatif seperti formalin, alkohol, salin, larutan Muller, Bouin, Zenker, dan pompa peristaltik atau *syringe* untuk fiksasi ekstravital (sumanto, 2014).

Tahapan-tahapan pemeriksaan histopatologi antara lain :

1. Tahap Pra-analitik

Tahap pra-analitik merupakan fase awal dalam pemeriksaan histopatologi yang mencakup identifikasi sumber sampel, penilaian derajat kekeruhan, pengamatan gejala awal, serta pencatatan diagnosis awal pasien. Pada tahap ini juga dilakukan persiapan sitologi yang memerlukan beberapa perhatian khusus, antara lain:

- a. Setiap spesimen harus diberi label yang jelas berisi identitas pasien, tanggal pengambilan, dan sumber spesimen. Pelabelan sebaiknya menggunakan pensil tebal, bukan stiker, untuk memastikan keterbacaan pada slide.
- b. Pada saat membuat preparat, jarak sekitar 2 cm dari bagian atas dan bawah slide perlu dijaga, karena sebagian mikroskop memiliki keterbatasan pembacaan hingga ke tepi slide.
- c. Larutan formalin tidak dianjurkan untuk digunakan pada fiksasi sitologi, kecuali pada pembuatan sitoblok.
- d. Sampel sitologi sebaiknya segera dikirim ke laboratorium untuk diproses, karena

perubahan dapat terjadi dengan cepat setelah pengambilan. Misalnya, pertumbuhan mikroorganisme dapat muncul dalam waktu sekitar 30 menit, sedangkan eritrofagositosis dapat terlihat setelah sejumlah sampel diperoleh. Apabila pemrosesan tidak dapat segera dilakukan misalnya karena jarak laboratorium yang jauh atau jumlah preparat terlalu banyak maka sampel perlu disimpan dalam lemari pendingin. Penyimpanan dilakukan dengan hati-hati, yaitu menghindarkan kontak langsung dengan es serta mencegah terjadinya pembekuan.

2. Tahapan Analitik

Tahap analitik dimulai dengan pengolahan bahan hingga siap diperiksa oleh ahli patologi anatomi, dengan tujuan menghasilkan sediaan histologis yang berkualitas baik. Pada preparat yang berasal dari cairan, terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan sebelum pembuatan sediaan histologis, antara lain:

- a. Memastikan kaca objek (*slide*) dalam keadaan benar-benar bersih.
- b. Menghindari teknik penyemprotan yang tidak merata, karena dapat menyebabkan sel-sel menggumpal sehingga menyulitkan interpretasi.
- c. Melakukan pembersihan dengan tekanan yang ringan.
- d. Melakukan fiksasi sesegera mungkin, baik melalui metode fiksasi basah maupun kering (Khristian, 2017).

Langkah-langkah pada tahapan analitik meliputi :

A. Tahap Penerimaan Sampel

Teknisi pemotongan memeriksa ulang sampel untuk kesesuaian dengan informasi dalam resep pengantar. Teknisi akan memeriksa apakah fiksasi sudah benar. Jika salah, harus segera diperbaiki. Setelah sampel diterima, petugas loket terlebih dahulu melengkapi persyaratan administrasi berupa identitas pasien (nama, jenis kelamin, umur, dan jumlah sampel). Selanjutnya, sampel diserahkan kepada teknisi ruang potong untuk diperiksa ulang kesesuaiannya dengan data pada formulir pengantar. Pada tahap ini juga dilakukan pengecekan terhadap kualitas fiksasi; apabila ditemukan kekeliruan, tindakan korektif harus segera dilakukan.

B. Tahapan Pemotongan dan Pencatatan Makroskopik

Pemotongan jaringan dilakukan dengan mempertimbangkan jenis dan ukuran jaringan, dengan ketebalan potongan tidak melebihi kapasitas kaset jaringan. Setiap potongan diberi nomor sesuai identitas pasien atau formulir pengantar.

Setelah jaringan ditempatkan dalam kaset dan ditutup, kaset tersebut dimasukkan ke dalam wadah berisi *buffered formalin 10%*. Apabila jaringan belum terfiksasi sempurna, kaset perlu kembali ditempatkan dalam larutan fiksatif hingga proses fiksasi optimal tercapai.

C. Pematangan Jaringan

Pematangan jaringan terdiri dari beberapa tahapan, antara lain :

1. Dehidrasi (*Dehydration*)

Dehidrasi merupakan tahap di mana jaringan direndam secara bertahap dalam larutan etanol dengan konsentrasi yang meningkat. Tujuan utama proses ini adalah untuk mengeluarkan air dan sisa larutan fiksatif dari jaringan, serta mencegah perubahan mendadak pada struktur sel (Suntoro, 1983; Johnson, 1994). Agen dehidrasi bersifat hidrofilik, sehingga mampu membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan molekul air. Oleh karena itu, dehidrasi harus dilakukan secara perlahan untuk mencegah kerusakan sel akibat perbedaan gradien konsentrasi yang terlalu besar. Penggunaan larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat memungkinkan difusi cairan berlangsung lebih terkendali, sehingga mengurangi risiko artefak. Dehidrasi yang berlebihan dapat menyebabkan jaringan menjadi keras, rapuh, dan berkerut, sedangkan dehidrasi yang tidak sempurna dapat menghambat penetrasi agen clearing. Hal ini membuat jaringan tetap lentur dan sulit untuk diinfiltasi. Selain itu, penting dipastikan bahwa jaringan telah difiksasi dengan benar sebelum proses dehidrasi untuk menghindari artefak akibat penggunaan alkohol sebagai fiksatif.

2. Penjernihan (*clearing*)

Tahap penjernihan bertujuan untuk membuat jaringan menjadi transparan dengan mengganti larutan alkohol menggunakan pelarut organik, seperti xilena atau toluena. Proses ini sangat penting karena jika alkohol masih tertinggal dalam jaringan, parafin tidak dapat menembus dengan baik, sehingga menghambat tahap embedding, pemotongan, dan pewarnaan (Indrawati, 2017). Dengan demikian, clearing berperan krusial dalam mempersiapkan jaringan agar dapat diproses lebih lanjut secara optimal.

3. Infiltrasi (*Impregnasi*)

Infiltrasi merupakan tahap pemasukan bahan infiltrat ke dalam jaringan dengan tujuan untuk mengeraskan jaringan pada suhu kamar. Pada proses ini, pelarut pembersih digantikan oleh bahan infiltrasi yang sesuai kelarutannya sehingga dapat masuk ke dalam sel. Parafin merupakan bahan infiltrasi yang paling umum digunakan, tersedia dalam berbagai variasi titik leleh dan aditif untuk meningkatkan kualitas hasil jaringan. Penggunaan parafin dengan titik leleh rendah sering direkomendasikan karena dapat mempercepat proses infiltrasi. Selain itu, infiltrat parafin berfungsi mempertahankan struktur sel dan komponen ultrastruktural selama tahap pemotongan. Oleh karena itu, parafin menjadi pilihan utama dalam proses embedding dan infiltrasi jaringan.

D. Penanaman Jaringan

Embedding atau *blocking* adalah proses menanamkan jaringan ke dalam cetakan untuk membentuk blok parafin yang memudahkan proses pemotongan dengan mikrotom. Cetakan yang digunakan umumnya berupa *base mold* yang tahan karat dan stabil. Tujuan dari proses ini adalah menghasilkan blok parafin yang permanen dan siap dipotong (Juliati, 2017).

E. Pemotongan blok dengan mikrotom

1. *Sectioning*

Sectioning adalah tahap pemotongan jaringan menggunakan mikrotom untuk menghasilkan potongan jaringan tipis, rata, serta bebas dari lipatan atau kerusakan ketika diletakkan pada kaca objek (Jusuf, 2013).

2. *Floating*

Floating dilakukan dengan cara memasukkan kaca objek ke dalam *waterbath* bersuhu sekitar 60 °C, kemudian menggerakkannya ke arah pita parafin. Tujuan tahap ini adalah merekatkan pita parafin ke kaca objek agar potongan jaringan menempel dengan baik (Juliati, 2017).

F. Pewarnaan (*Staining*)

Pewarnaan histologis dilakukan untuk memberikan warna pada jaringan yang telah menjadi transparan setelah melalui proses pematangan. Pewarnaan ini penting untuk menampakkan struktur dan morfologi jaringan serta mendeteksi keberadaan dan distribusi sel tertentu.

Pewarnaan rutin yang umum digunakan adalah metode Hematoksilin-Eosin (HE), yang bekerja berdasarkan prinsip interaksi asam-basa. Hematoksilin, sebagai pewarna basa, mengikat komponen jaringan yang bersifat asam, khususnya inti sel, sehingga tampak berwarna biru. Sebaliknya, eosin, sebagai pewarna asam, mengikat komponen eosinofilik seperti sitoplasma dan kolagen, sehingga berwarna merah (Khristian, 2017).

G. Penutupan Sediaan (*Mounting*)

Sediaan histologis yang telah diwarnai dengan baik akan lebih tahan lama apabila dilakukan penutupan secara permanen. Penutupan permanen berfungsi melindungi spesimen dari kerusakan, baik akibat degradasi alami maupun kontaminasi mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Hal ini penting karena jaringan yang telah diproses tetap berpotensi mengalami kerusakan apabila tidak disimpan dengan tepat.

Proses mounting umumnya menggunakan kaca penutup (*cover glass*) yang terbuat dari bahan tipis, seperti fiberglass, serta perekat khusus. Bahan perekat yang sering digunakan adalah *Canada balsam* atau *Entellan*, keduanya berfungsi sekaligus sebagai perekat dan media pengawet preparat. Kedua perekat tersebut memiliki kelarutan yang baik dalam xilol, sehingga proses mounting sebaiknya dilakukan ketika preparat masih dibasahi oleh larutan xilol agar perekat dapat melekat dengan kuat pada jaringan dan kaca penutup. Dengan demikian, sediaan yang dihasilkan dapat terjaga kualitasnya dalam jangka panjang dan siap untuk dianalisis secara mikroskopis.

H. Pelabelan (*Labeling*)

Pelabelan sediaan merupakan tahap yang sangat krusial dalam pemeriksaan histopatologi. Tanpa adanya label, kualitas formulasi atau preparat yang baik sekalipun tidak memiliki nilai diagnostik, karena tidak dapat diidentifikasi kepada pasien atau sumber spesimen yang sesuai. Label dapat berupa identitas pasien secara langsung maupun berupa kode tertentu, tergantung pada kebijakan administrasi masing-masing laboratorium. Informasi yang dicantumkan pada label dapat bervariasi sesuai kebutuhan, namun secara umum meliputi nama atau kode spesimen, alamat atau asal spesimen, jenis bahan yang diperiksa, serta tanggal pengambilan sampel. Kejelasan dan ketepatan informasi pada label menjadi faktor penting untuk menjamin akurasi identifikasi serta validitas hasil pemeriksaan laboratorium (Sumanto, 2014).

3. Tahapan Pasca Analitik

Fase pasca analisis mencakup pelaporan hasil dan pemeliharaan catatan. Diagnosa dan pelaporan disajikan secara lengkap dan akurat serta mematuhi peraturan nasional dan internasional untuk pelaporan dan diseminasi penyakit yang relevan dengan setting patologis (Kemenkes, 2018).

4. Kualitas Pewarnaan Preparat

Pewarnaan merupakan salah satu teknik penting dalam rekayasa jaringan yang berfungsi untuk memberikan warna pada preparat jaringan sehingga struktur seluler dapat lebih mudah diamati di bawah mikroskop. Metode pewarnaan yang paling umum digunakan dalam histologi adalah pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) (Jamie, 2010). Proses pewarnaan histologis diperlukan karena jaringan yang telah melalui tahap pematangan cenderung bersifat transparan. Dengan pewarnaan, struktur dan morfologi jaringan, termasuk keberadaan serta distribusi sel tertentu, dapat ditampakkan dengan lebih jelas. Pada jaringan yang sebelumnya mengalami proses infiltrasi parafin, langkah awal pewarnaan harus diawali dengan pelarutan parafin (*deparaffinization*). Setelah itu dilakukan tahap rehidrasi untuk mengembalikan jaringan ke kondisi yang sesuai bagi proses pewarnaan.

Pewarnaan HE bekerja berdasarkan prinsip interaksi larutan asam-basa. Hematoksilin sebagai pewarna basa mengikat komponen jaringan yang bersifat asam, terutama inti sel, sehingga tampak berwarna biru. Sebaliknya, eosin sebagai pewarna asam mengikat komponen jaringan yang bersifat basa, khususnya sitoplasma dan serabut kolagen, sehingga tampak berwarna merah hingga merah muda. Kombinasi pewarnaan ini banyak digunakan karena kesederhanaannya, konsistensi hasil yang diperoleh, serta kemampuannya membedakan berbagai komponen jaringan dengan jelas.

a. Hematoxylin

Hematoksilin merupakan zat pewarna yang diperoleh dari ekstrak getah pohon *Haematoxylon campechianum*. Secara alami, hematoksilin memiliki afinitas yang rendah terhadap jaringan, sehingga diperlukan kombinasi dengan bahan lain agar dapat meningkatkan afinitas serta mempercepat proses pewarnaan inti sel.

Dalam pewarnaan histologis, hematoksilin berfungsi sebagai pewarna basa (*basic dye*) yang berikatan dengan komponen jaringan yang bersifat basofilik. Inti sel, yang bersifat asam, akan menarik pewarna basa ini sehingga tampak berwarna biru. Untuk meningkatkan kontras, digunakan *counterstain* berupa pewarna sitoplasma. Salah satu pewarna yang umum digunakan adalah eosin, yang bersifat asam sehingga dapat mewarnai komponen eosinofilik, seperti sitoplasma, dengan warna merah muda. Kombinasi hematoksilin dan eosin dikenal sebagai metode pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE), yang merupakan teknik standar dalam histopatologi (Setiawan, 2016).

b. Eosin

Eosin merupakan pewarna sintetis yang termasuk dalam kelompok xanthene. Pewarna ini bersifat asam dan berikatan dengan protein bermuatan positif pada sitoplasma maupun jaringan ikat. Sebagai *counterstain*, eosin mampu memberikan warna merah hingga jingga pada sitoplasma dan jaringan ikat, serta dapat mengubah warna inti yang sebelumnya biru akibat pewarnaan hematoksilin menjadi ungu. Secara komersial, eosin tersedia dalam beberapa bentuk, antara lain Eosin Y (berwarna kekuningan dan larut dalam air), Ethyleosin (larut dalam alkohol), serta Eosin B atau *Erythrosin B* (berwarna biru). Dalam praktik histologi, eosin biasanya digunakan pada konsentrasi 0,5–1 µl dalam air suling, dengan penambahan kristal timol untuk mencegah pertumbuhan jamur. Selain itu, sedikit asam asetat (0,5 ml per 1000 ml larutan pewarna) ditambahkan untuk memperhalus hasil pewarnaan. Perbedaan perlakuan seperti pencucian menggunakan air ledeng atau pengeringan dengan alkohol dapat memengaruhi intensitas warna. Kombinasi hematoksilin dan eosin (HE) menghasilkan keseimbangan warna yang harus dievaluasi secara cermat di bawah mikroskop untuk memastikan hasil pewarnaan optimal (Khristian, 2017).

5. Madu



Gambar 2. 1 Madu (Balai Veteriner, 2025)

1. Pengertian Madu

Madu merupakan suatu cairan kental yang mempunyai rasa manis alami yang dihasilkan dari nektar bunga. Madu juga merupakan suatu produk bahan makanan yang bisa digunakan tanpa diolah dahulu. Madu menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) merupakan cairan alami yang dihasilkan oleh lebah madu (*Apis sp.*) dari sari bunga tanaman (*floral nectar*) atau bagian lain dari tanaman (*ekstral froral*) sekresi serangga. Madu banyak didapatkan melalui hasil budidaya lebah dan biasanya diperoleh dari lebah liar (madu hutan). (Gebremariam, 2014).

Madu dapat diperoleh dari hasil budidaya lebah atau dari lebah liar (madu hutan). Madu hutan yaitu madu yang dihasilkan dan diambil langsung dari sarang lebah yang terdapat di pohon-pohon dalam hutan (Dharmestiwi, 2007). Madu budidaya merupakan cairan alami yang umumnya mempunyai rasa manis yang dihasilkan oleh lebah budidaya *Apis mellifera* atau *Apis cerana* dari sari bunga tanaman (*floral nektar*). Nektar adalah senyawa kompleks mengandung air, glukosa, fruktosa, sukrosa, protein, asam amino, karoten, vitamin dan minyak serta mineral (Suranto, 2007).

Warna dari madu sendiri sangat bervariasi, mulai dari transparan hingga berwarna terang kehitaman. Warna dasar dari madu itu sendiri yaitu berwana kuning kecoklatan. Beberapa faktor yang mempengaruhi warna madu adalah sumber nektar, proses ekstraksi, pengolahan, usia madu, dan juga waktu penyimpanan serta komponen kimia dalam madu. Komponen kimia madu yang berkontribusi besar pada warna madu yaitu adalah senyawa pigmen seperti karoten,

xanthofil, antosianin dan pigmen cerah atau hijau gelap. Jumlah madu yang dihasilkan lebah tergantung dari jenis lebah, jenis bunga, keadaan bunga dan juga musim, untuk menghasilkan madu, nektar bunga merupakan bahan baku pembuatan madu dan serangga yang bertindak sebagai tenaga ahlinya. Madu memiliki kandungan mineral seperti natrium, kalsium, magnesium, alumunium, besi, fosfor dan kalium. Vitamin – vitamin yang terdapat dalam madu adalah thiamin (B1), riboflavin (B2), asam askorbat (C), piridoksin (B6), niasin, asam pantotenat, biotin, asam folat, dan vitamin K (Rahmawaty, 2021).

2. Kandungan Madu

Kandungan madu yang utama yaitu adalah karbohidrat yang lebih dari 80 %. Adanya beberapa kandungan vitamin dan mineral serta beberapa senyawa fenolik, menjadikan madu sebagai makanan fungsional yang baik untuk dikonsumsi masyarakat. Madu juga diduga mengandung prebiotik yakni ingredients suatu bahan makanan yang dapat memberikan pengaruh menguntungkan bagi kesehatan karena dapat menstimulus pertumbuhan dan aktivitas berbagai mikroba baik di dalam saluran pencernaan manusia (Miguel, 2017).

Beberapa kandungan yang terdapat pada madu yaitu mineral seperti kalsium, natrium, magnesium, besi, aluminium, fosfor, dan kalium. Banyak pula kandungan vitamin yang terkadung dalam madu, yaitu vitamin B1 (thiamin), vitamin B2 (riboflavin), vitamin C (asam askorbat), vitamin B6 (piridoksin), vitamin K, niasin, asam panotenat, biotin, dan asam folat (Wulandari, 2017).

Kandungan makromolekul dan mikromolekul pada madu seperti karbohidrat, asam amino, mineral, enzim, vitamin dan air banyak ditemukan pada madu. Oleh karena itu madu banyak digunakan pada industri makanan, minuman farmasi, jamu dan kosmetik (Apriani, 2013).

Nilai gizi madu yang terdapat di gambar kemasan sebagai berikut : Protein 0,5%, Karbohidrat total 3% (8 g), dan Gula (7 g).



Gambar 2. 2 Nilai Gizi Madu (Balai Veteriner, 2025)

Komposisi madu yang terdapat di gambar sebagai berikut : 100% madu murni, terdapat dari bunga liar atau madu perhutani.



Gambar 2. 3 Komposisi Madu (Balai Veteriner, 2025)

3. Jenis-jenis Madu

Penelitian Silva Tropika, 2022, menyatakan hasil analisis kadar air madu menunjukkan bahwa setiap madu dari lebah yang berbeda memiliki kadar air yang berbeda pula. Pada madu lebah *Apis mellifera* memiliki kadar air yang paling rendah. Berdasarkan SNI kadar air madu lebah *Apis mellifera* memenuhi mutu madu. Sedangkan madu dari lebah lainnya tidak memenuhi SNI.

Madu klanceng yang dihasilkan oleh lebah klanceng yang baik untuk anti peradangan karena mengandung senyawa fenolik (Rina, 2021). Madu hutan yang dihasilkan oleh lebah hutan yang merupakan lebah penghasil madu terbesar di dunia (Avry, 2019). Kandungan nutrisi pada madu hutan antara lain: Niacin, Riboflavin, Asam pantotenat, Kalsium, Magnesium, Mangan, Kalium, Fosfor, Zinc. Madu hutan juga sangat bermanfaat untuk mengatasi gejala diare (dr. Fadhli, 2020). Madu yang digunakan oleh peneliti adalah madu perhutani yaitu madu hutan yang dihasilkan oleh lebah hutan.

4. Manfaat Madu

Manfaat yang diberikan oleh madu Ia memiliki nilai obat yang kuat karena efek antioksidan, antimikroba, anti-inflamasi dan antimutageniknya. Banyak bukti yang menunjukkan bahwa madu ternyata lebih efektif dalam mengobati luka. Hal ini dikemukakan oleh Samarghandian dkk. Madu dan kesehatan tinjauan penelitian klinis terbaru, dengan segala khasiat positif tersebut, banyak penelitian yang berupaya mengeksplorasi zat alami madu sebagai pengganti fiksasi jaringan dengan konsentrasi berbeda (Thamilselvan, dkk, 2021).

5. Mekanisme Madu Berperan Sebagai Fiksasi

Terlepas dari sifat antibakterinya, madu terbukti mencegah pembusukan jaringan yang direndam didalamnya hingga 30 hari tanpa menunjukkan tanda-tanda autolisis. Madu bila diencerkan menghasilkan hidrogen peroksida karena inaktivasi enzim glukosa oksidase, yang mengoksidasi glukosa menjadi asam glukonat dan hidrogen peroksida. Asam glukonat bersifat non-korosif, agak asam, tidak terlalu mengiritasi, tidak berbau, tidak beracun, mudah terurai secara hayati, dan asam organik yang tidak mudah menguap. Mekanisme kerja madu dalam proses fiksasi diduga disebabkan oleh konversi karbohidrat menjadi asam glukonat. Asam glukonat yang dihasilkan oleh reaksi dehidrogenasi yang dikatalisis oleh enzim glukonat oksidase diduga memiliki aplikasi luas dalam industri makanan dan farmasi sebagai pengawet dan dalam proses pengawetan pangan, karena asam glukonat mencegah pembusukan makanan dan juga memiliki sifat antiseptik, hipotesis lain yang diduga berperan dalam proses fiksasi adalah karena adanya fruktosa/glukosa dalam madu yang pada pH rendah terurai membentuk aldehida. Aldehida ini berikatan silang dengan asam amino yang ada dijaringan (mirip dengan kerja formaldehida) sehingga menghasilkan fiksasi (Sabarinath, dkk, 2014) Madu telah terbukti memiliki sifat dehidrasi dan pengawetan yang mirip dengan formaldehida (standar emas) sehingga ideal untuk digunakan sebagai bahan fiksatif ramah lingkungan di laboratorium patologi (Lalwani, dkk, 2015).

6. Uji Ph Madu

Madu merupakan cairan alami dan aman, dihasilkan oleh lebah penyengat *Apis Mellifera* yang dapat digunakan sebagai fiksatif. Karakteristik antibakteri, anti-autolitik, antimikroba, antioksidan dan pengerasan jaringan dari madu berkontribusi terhadap kapasitasnya untuk memperbaiki jaringan. Madu dikenal lebih mempertahankan morfologi jaringan dibandingkan dengan formalin. Madu alami memiliki pH sekitar 4,0 karena adanya asam amino dan asam organik. Karena madu memiliki pH asam 4,0, sebagian besar mikroorganisme akan mati karenanya dan lingkungan steril yang tercipta memungkinkan madu dan jaringan bertahan sangat lama (Sabarinath *et.al*, 2020).

Asam-asam organik seperti asam glukonat, asam asetat, asam laktat, asam sitrat, asam format, dan asam fumarat merupakan sumber pH asam tersebut. Oleh karena itu, madu akan menjadi pengganti formalin yang baik. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa jaringan yang diawetkan dalam konsentrasi madu rendah dan diwarnai dengan hematoksilin dan eosin menghasilkan hasil yang lebih unggul dibandingkan jaringan yang difiksasi dalam formalin sebagai kontrol (Bright, Osei, *et.al* 2023).

7. Mencit

Mencit merupakan hewan laboratorium yang relatif mudah dipelihara dalam jumlah besar karena kemampuan reproduksinya yang tinggi dan siklus hidup yang singkat. Selain itu, mencit memiliki keragaman genetik yang luas serta karakteristik anatomi dan fisiologis yang sederhana, sehingga mudah dipelajari dan sering dijadikan model penelitian biomedis. Secara taksonomi, mencit diklasifikasikan ke dalam: Kingdom *Animalia*, Filum *Chordata*, Kelas *Mammalia*, Ordo *Rodentia*, Famili *Muridae*, Genus *Mus*, dan Spesies *Mus musculus*. (Sri Rezeki, 2018)

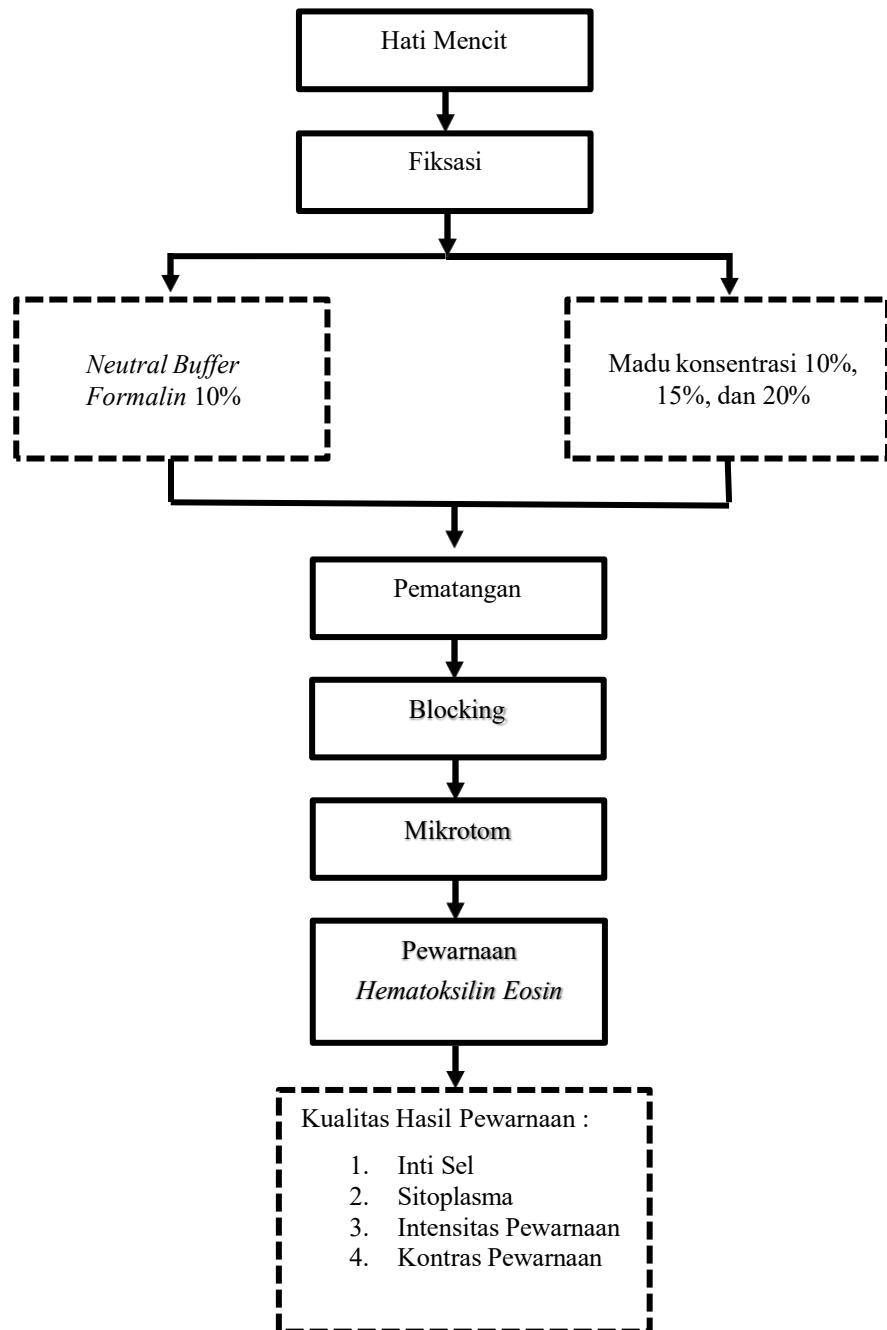
Karena banyak keuntungan yang dimilikinya termasuk siklus hidup yang relatif singkat, jumlah anak yang banyak per kelahiran, kemudahan penanganan, sifat reproduksi yang mirip dengan mamalia lain, dan kemiripan anatomis, fisiologis, dan genetik dengan manusia. Mencit sering digunakan sebagai hewan laboratorium (Herrmann 2019). Mencit yang akan digunakan untuk penelitian adalah organ hati mencit.

Hati merupakan organ yang berperan penting dalam tubuh manusia, metabolisme dari seluruh bahan makanan berlangsung di hati. Hati merupakan tempat utama untuk aktivitas sintesis, katabolik, dan detoksifikasi dalam tubuh. Selain itu, hati berperan dalam ekskresi pigmen darah. Sel-sel kupffer dalam hati juga ikut juga ikut berperan dalam reaksi imunologik. Kerusakan hati dapat rusak disebabkan oleh beberapa agen antara lain virus, alkohol, obat-obatan (seperti isoniazid, aspirin, tetrasiklin) agen-agen tersebut dapat menyebabkan fungsi dapat menyebabkan gangguan fungsi hati (Junqueira et al. 2007). Semua jelas pada hati menimbulkan gambaran patologi yang sama yaitu terjadinya degenerasi dan akumulasi instraseluler, nekrosis, inflamasi, regenerasi, dan fibrosis (Huang et al, 2003)



Gambar 2. 4 Mencit (Eggy, 2021)

B. Kerangka Teori

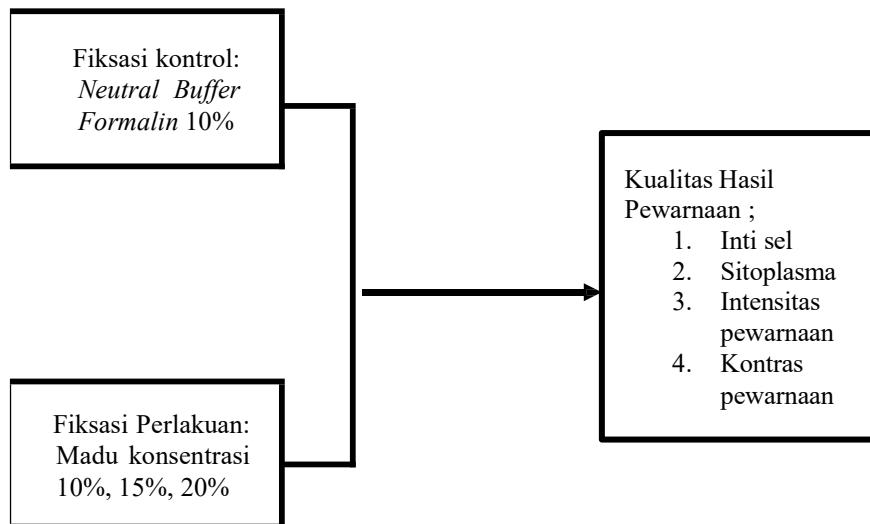


Keterangan :

[] Diteliti

[] Tidak diteliti

C. Kerangka Konsep



D. Hipotesis

H0 : Tidak ada perbedaan kualitas sediaan jaringan hati mencit difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% (NBF) dan madu konsentrasi 10%, 15%, 20% dengan melihat inti sel, sitoplasma, intensitas pewarnaan, dan kontras pewarnaan.

H1 : Ada perbedaan kualitas sediaan jaringan hati mencit difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% (NBF) dan madu konsentrasi 10%, 15%, 20% dengan melihat inti sel, sitoplasma, intensitas pewarnaan, dan kontras pewarnaan.