

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tinjauan Teori**

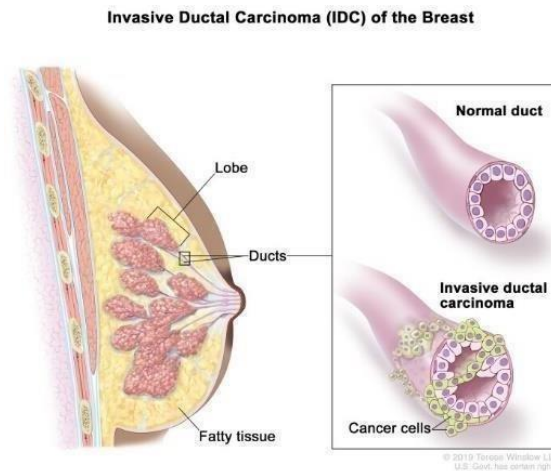
##### **1. Kanker Payudara**

Kanker payudara merupakan keganasan yang paling umum terjadi pada wanita, dan merupakan kanker non-kulit yang paling umum. Kanker payudara juga dianggap sebagai penyebab kematian akibat kanker terbanyak kedua pada wanita. Kanker payudara stadium IV saat ini tidak memiliki pengobatan kuratif dan ditangani dengan perawatan paliatif. Deteksi dini tumor secara signifikan mengurangi morbiditas dan mortalitas (Tomlinson-Hansen, 2024).

Kanker payudara merupakan satu dari delapan kasus kanker pada kedua jenis kelamin dan seperempat dari semua kanker pada wanita<sup>1</sup> dengan 70% kematian terjadi di lingkungan dengan keterbatasan sumber daya, sekitar 2,3 juta kasus baru setiap tahunnya merupakan kasus kanker payudara (WHO, 2024).

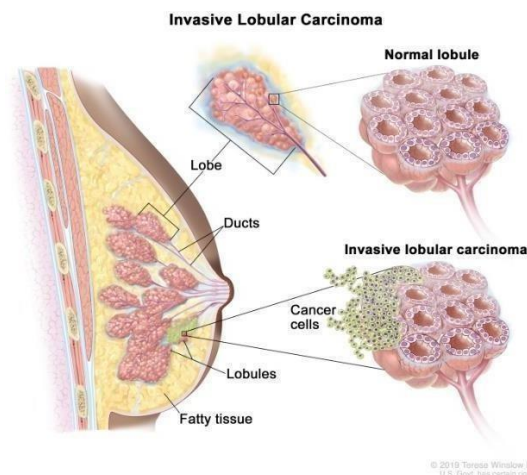
Kanker payudara dibagi menjadi kanker yang belum menembus membran basal (noninvasive) dan kanker yang sudah menembus membran (invasive). Bentuk utama karsinoma payudara dapat diklasifikasikan sebagai berikut, kanker non invasif yaitu Ductal Carcinoma In Situ & Lobular Carcinoma In Situ dan kanker invasif yaitu Invasive Ductal Carcinoma, Invasive Lobular Carcinoma, Carcinoma Inflamasi, Medullary Carcinoma, Carcinoma Koloid (Mucinosa), dan Tubular Carcinoma (Simanullang, 2022).

Jenis kanker payudara yang paling umum adalah karsinoma duktal, yang bermula di sel-sel duktus dan mencakup sekitar 70% hingga 80% dari semua kasus kanker payudara. Jenis kanker payudara yang paling umum kedua adalah karsinoma lobular, yang bermula di lobus atau lobulus dan mencakup 10% hingga 15% dari semua kasus kanker payudara.



Sumber : PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2024  
Gambar 2.1 Karsinoma duktal invasif pada payudara

Karsinoma duktal invasif (IDC) pada payudara bermula di lapisan saluran payudara (saluran susu) dan menyebar ke luar saluran ke jaringan lain di payudara. Kanker ini juga dapat menyebar melalui darah dan sistem limfatik ke bagian tubuh lainnya. IDC merupakan jenis kanker payudara invasif yang paling umum.



Sumber : PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2024  
Gambar 2.2 Karsinoma lobular invasif pada payudara

Karsinoma lobular invasif bermula di lobulus (kelenjar susu) payudara dan menyebar ke luar lobulus ke jaringan lain di payudara. Kanker ini juga dapat menyebar melalui sistem darah dan limfatik ke bagian tubuh lainnya.



Sumber : PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2024  
Gambar 2.3 Kanker payudara inflamasi

Salah satu kanker yang tumbuh cepat dan langka adalah jenis kanker payudara inflamasi, yaitu jenis kanker payudara di mana sel-sel kanker menyumbat pembuluh limfa di kulit payudara. Hal ini menyebabkan payudara tampak merah dan bengkak. Kulit juga mungkin tampak berlesung pipit atau berlubang, seperti kulit jeruk (*peau d'orange*), dan puting susu mungkin terbalik (menghadap ke dalam). Banyak kematian akibat kanker disebabkan ketika kanker berpindah dari tumor awal dan menyebar ke jaringan dan organ lain. Ini disebut kanker metastatik (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2024).

Faktor-faktor risiko yang dapat menimbulkan seseorang terkena kanker payudara antara lain usia, genetik/riwayat keluarga, menarche (menstruasi pertama), menopause, riwayat menderita penyakit payudara non-cancer, radiasi, pengaruh hormon akibat pemakaian pil KB, dan gaya hidup seperti alkoholik dan obesitas.

Beberapa hal yang dapat dilakukan untuk skrining kanker payudara yaitu pemeriksaan payudara sendiri (SADARI), pemeriksaan payudara klinis (SADANIS), pemeriksaan pencitraan dan pemeriksaan histopatologi. Namun pemeriksaan histopatologi merupakan gold standar untuk mendiagnosis kanker payudara. Dengan pemeriksaan histopatologi pula kita bisa mengetahui histologi dan stadium pada kanker payudara (Simanullang, 2022).

## 2. Pemeriksaan Histopatologi

Histologi merupakan ilmu pengetahuan yang mempelajari tentang jaringan tubuh yang dapat menyusun suatu organ. Untuk mempelajari histologi

diberikan preparat beserta alat yang disebut mikroskop. Histologi akan membicarakan hal-hal yang berhubungan dengan jaringan yang terdapat dalam organ tubuh sebagai komponen pembentuknya (Soesilawati, 2020).

Salah satu metode membuat sajian histologi yaitu metode histoteknik. Histoteknik merupakan metode pembuatan sajian histologi yang berasal dari spesimen tertentu melalui rangkaian proses sehingga menjadi sebuah sajian yang siap dianalisis. Hasil pemeriksaan dari teknik ini adalah berupa spesimen mikroskopik yang diperiksa oleh ahli Patologi Anatomi (Rahmadani, 2018).

Menurut PERMENKES RI Nomor 411/MENKES/PER/III/2010 menyebutkan bahwa laboratorium patologi anatomi merupakan salah satu laboratorium yang melaksanakan pelayanan pemeriksaan spesimen klinik pada satu bidang pemeriksaan yang memiliki kekhususan tertentu. Pelayanan laboratorium Patologi Anatomi menerima spesimen berupa jaringan dan/atau cairan tubuh yang didapat dari tubuh pasien dan bermakna klinis bagi diagnosis suatu penyakit. Pelayanan laboratorium patologi anatomi berperan sebagai baku emas dalam penegakkan diagnosis yang berbasis perubahan morfologi sel dan jaringan sampai pemeriksaan imunologik dan molekuler khusus yang bersumber dari sel maupun jaringan (Khristian & Dewi, 2017). Lingkup pemeriksaan Patologi Anatomi terdiri dari histopatologi, sitologi, potong beku atau *frozen section*, histokimia, imunohistokimia, dan pemeriksaan molekuler (Dirjen Yankes, 2022).

Pada laboratorium patologi anatomi terdapat dua komponen besar dalam pelayanan laboratorium yaitu laboratorium histopatologi dan laboratorium sitopatologi. Laboratorium histopatologi merupakan laboratorium yang menangani spesimen berupa jaringan sedangkan laboratorium sitopatologi menangani spesimen berupa cairan atau bentukan lain yang mengandung sel-sel untuk dilakukan diagnosis. Namun kadang kala kedua laboratorium tersebut dapat berkolaborasi menjadi satu ketika spesimen berupa materi mengandung sel namun diperlakukan seperti sebuah jaringan atau organ (cytoblock/sitoblok) (Khristian & Dewi, 2017).

Jenis spesimen sitologi yang diterima di laboratorium patologi anatomi adalah spesimen cervical Pap Smear, spesimen sitologi aspirasi jarum halus

FNA (Fine Needle Aspiration), spesimen dapat berasal dari urin, dahak, cairan cerebrospinal, cairan berasal dari bilasan dan lain sebagainya yang mengandung materi sel. Sedangkan jenis spesimen histopatologi yang diterima berupa seluruh organ/jaringan yang diambil dari pasien, baik berukuran kecil maupun berukuran besar (Khristian & Dewi, 2017).

Di laboratorium patologi anatomi, komponen-komponen kompetensi seperti proses fiksasi jaringan, pematangan jaringan ke parafin, pemotongan jaringan hingga pewarnaan jaringan pada kaca objek merupakan kompetensi khusus seorang analis/pranata laboratorium. Kompetensi untuk tenaga pranata laboratorium berada pada tahap analitik, dimulai dari melakukan prosesing jaringan, sampai menghasilkan preparat yang telah terwarnai untuk dapat dibaca oleh dokter patologi di bawah mikroskop (Khristian & Dewi, 2017).

Pada pemeriksaan histopatologi untuk mendapatkan kesimpulan dari suatu pengamatan yang baik maka diperlukan suatu manajemen laboratorium yang baik mulai dari proses praanalitik, analitik hingga pasca analitik. Berikut adalah tiga fase utama tahapan pemeriksaan histopatologi:

a. Tahap pra-analitik

Fase ini merupakan awal dari proses pemeriksaan dan mencakup langkah-langkah yang sangat penting karena 70-80% kesalahan terjadi pada tahap ini, jika terjadi kesalahan di tahap pra analitik, maka semua langkah selanjutnya akan terpengaruh. Aktivitas dalam tahap ini meliputi:

- 1) Pengambilan Sampel: Spesimen harus diambil dengan benar, mencakup informasi lengkap tentang pasien, lokasi biopsi, dan indikasi klinis.
- 2) Identifikasi dan Pelabelan: Sampel diberi label untuk menghindari kehilangan atau salah identifikasi.
- 3) Pengawetan/fiksasi: Sampel diawetkan dengan formalin atau larutan lain untuk menjaga integritas jaringan.

Fiksasi merupakan suatu tahapan yang wajib dilalui baik untuk sediaan histologik maupun sitologi. Fungsi dari fiksasi antara lain adalah menjaga sel dari kerusakan struktural maupun kimiawi, pencegahan kematian sel akibat postmortem ataupun autolisis, mengeraskan jaringan, memadatkan komponen sel, peningkatan intensitas optical, peningkatan intensitas warna pada saat proses pewarnaan dan pada kasus-kasus

tertentu dapat membantu merekatkan sel ke kaca sediaan. Fiksasi biasanya dilakukan dengan menggunakan larutan formalin 10%. Fiksasi merupakan hal yang sangat penting dan menjadi salah satu factor penentu keberhasilan dalam pembuatan sediaan, karena ketika terjadi kesalahan dalam proses fiksasi maka untuk proses selanjutnya menjadi sia-sia karena akan menghasilkan sediaan yang tidak baik (Khristian & Dewi, 2017).

- 4) Transportasi: Sampel dikirim ke laboratorium dengan prosedur yang sesuai untuk mencegah kerusakan selama perjalanan. Kesalahan umum pada tahap ini termasuk kesalahan pelabelan, hilangnya spesimen, dan pengisian informasi klinis yang tidak lengkap (Mubarak., 2023).



Sumber : Mubarak, M., 2023

Gambar 2.4 Diagram skema berbagai fase siklus pengujian laboratorium dan komponennya di laboratorium histopatologi. Dalam praktiknya, ini adalah proses yang berkesinambungan

#### b. Tahap analitik

Fase ini mencakup analisis teknis di laboratorium hingga diagnosis.

Langkah-langkahnya meliputi:

- 1) Grossing: Pemotongan dan deskripsi makroskopik jaringan untuk memastikan area yang relevan diproses.

2) Pematangan Jaringan: Proses Dimana air dan larutan fiksatif yang ada dalam jaringan dikeluarkan dan kemudian diganti dengan media yang membuat jaringan menjadi kaku sehingga dapat dipotong dengan ketebalan yang sangat tipis. Tahapan-tahapan pematangan jaringan yaitu:

a) Dehidrasi

Proses dehidrasi bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan, karena air tidak bercampur dengan parafin (media embedding). Proses ini dilakukan dengan merendam jaringan secara bertahap dalam larutan alkohol dengan konsentrasi meningkat, mulai dari 70%, 90%, hingga 100%. Pentingnya dehidrasi bertahap karena jika air tidak sepenuhnya dihilangkan atau dehidrasi dilakukan terlalu cepat, jaringan dapat mengalami kerusakan atau pengerutan, yang akan memengaruhi kualitas slide mikroskopis (Bancroft, 2018).

b) Clearing

Setelah dehidrasi, jaringan harus dibersihkan dari sisa alkohol agar dapat digantikan oleh media infiltrasi, seperti parafin. Clearing dilakukan menggunakan bahan kimia yang kompatibel dengan paraffin. Xylol adalah agen clearing yang paling umum digunakan, meskipun bahan alternatif seperti toluen dan kloroform juga dapat digunakan. Fungsi clearing juga membuat jaringan menjadi transparan, memudahkan pemeriksaan lebih lanjut. Clearing yang tidak memadai dapat menyebabkan infiltrasi parafin yang buruk, sehingga memengaruhi integritas jaringan (Bancroft, 2018).

c) Impregnasi

Proses impregnasi menggantikan agen clearing dengan parafin cair sehingga jaringan terinfiltrasi sepenuhnya. Parafin ini akan mengeras saat dingin dan membentuk blok solid untuk pemotongan mikrotom. Parafin biasanya dipanaskan pada suhu sekitar 56-60°C, di mana jaringan direndam beberapa kali untuk memastikan penetrasi sempurna. Jika proses ini tidak dilakukan dengan benar, jaringan akan rapuh atau tidak dapat dipotong dengan baik (Bancroft, 2018).

3) Blocking : Setelah impregnasi, jaringan dituangkan ke dalam cetakan bersama dengan parafin cair, yang kemudian dibiarkan mengeras. Hasilnya adalah blok parafin yang siap untuk pemotongan. Blocking berfungsi memastikan bahwa jaringan tetap dalam posisi yang benar dan stabil saat dipotong menjadi irisan tipis. Kesalahan selama blocking, seperti posisi jaringan yang salah atau gelembung udara dalam blok, dapat memengaruhi pemotongan jaringan dan analisis mikroskopis (Bancroft, 2018).

4) Mikrotomi: Pemotongan jaringan menjadi irisan tipis menggunakan mikrotom, dengan ketebalan mikron (biasanya 3-5 mikron). Pada proses pemotongan, blok parafin dipasang dengan kuat pada penahan mikrotom, ketebalan diatur sesuai kebutuhan diagnosis, pisau mikrotom harus tajam untuk menghasilkan irisan yang halus, serta pengaturan sudut antara pisau dan jaringan penting untuk menghasilkan irisan yang konsisten dan mencegah kerusakan jaringan (Bancroft, 2018).

5) Floating: Setelah jaringan dipotong menjadi pita tipis parafin, potongan tersebut diapungkan di atas waterbath dengan suhu air diatur sekitar 10°C di bawah titik leleh parafin agar potongan jaringan dapat mengembang tanpa meleleh. Potongan jaringan yang terapung akan diluruskan dengan pinset halus untuk menghilangkan lipatan kecil, kemudian dengan hati-hati segera tempelkan kaca objek ke jaringan pada permukaan air. Setelah jaringan ditempatkan pada slide, kelebihan air biasanya dikeringkan menggunakan penghangat seperti oven atau hot plate. Suhu pengeringan umumnya mendekati titik leleh parafin untuk mencegah deformasi jaringan (Bancroft, 2018).

6) Pewarnaan: Pewarnaan jaringan sangat diperlukan untuk mewarnai komponen-komponen jaringan yang transparan setelah melalui proses pematangan jaringan. Pewarnaan histologi merupakan proses di mana zat warna (dye atau stain) digunakan untuk menyoroti struktur dan komponen spesifik dalam jaringan. Prinsip dasar dari pewarnaan histologi berdasarkan pada interaksi antara zat kimia pada pewarna dan komponen tertentu dari sel dan jaringan. Pewarnaan Hematoxylin Eosin adalah teknik pewarnaan yang paling sering digunakan, yang menyoroti inti sel (dengan hematoxylin) dan



sitoplasma dan komponen ekstraseluler (dengan eosin). Namun selain pewarnaan Hematoxylin Eosin, terdapat juga berbagai teknik pewarnaan khusus yang dirancang untuk menargetkan struktur atau substansi khusus dalam sel atau jaringan seperti pewarnaan Trichrome, pewarnaan Reticulin, pewarnaan Prussian Blue, pewarnaan Congo Red, dan pewarnaan oil red O (Digambiro & Parwanto, 2024).

7) Pemeriksaan Mikroskopis: Ahli patologi menilai jaringan di bawah mikroskop untuk membuat diagnosis.

8) Pengujian Tambahan: Jika diperlukan, seperti imunohistokimia atau analisis molekuler. Kualitas setiap langkah sangat penting untuk menghasilkan slide yang dapat dianalisis dengan baik. Proses ini bergantung pada keahlian teknis dan interpretasi patologis yang akurat (Mubarak, 2023).

c. Tahap pasca analitik

Tahapan ini melibatkan pengelolaan hasil dan komunikasi dengan dokter pengirim. Langkah-langkahnya meliputi:

- 1) Penyelesaian Laporan: Memastikan laporan diagnosis akurat, lengkap, dan bebas kesalahan.
- 2) Pengiriman Laporan: Laporan harus dikirim dengan cepat ke dokter pengirim melalui sistem elektronik atau metode lainnya.
- 3) Diskusi Klinis: Jika diperlukan, dokter dan patologis berdiskusi untuk menjelaskan hasil.
- 4) Penyimpanan Sampel dan Data: Blok jaringan dan slide disimpan untuk referensi di masa mendatang.
- 5) Audit dan Tinjauan Ulang: Evaluasi kualitas untuk mengidentifikasi kesalahan dan memperbaiki system (Mubarak, 2023).

### **3. Pewarnaan Hematoxylin Eosin**

Pewarnaan Hematoxylin Eosin adalah teknik pewarnaan yang paling sering digunakan dalam histopatologi. Hematoxylin, yang berperilaku seperti pewarna basa (atau "basofilik"), mengikat dan memberi warna biru ke struktur yang bersifat

asam, seperti DNA dan RNA dalam inti sel. Eosin adalah pewarna asam (atau "eosinofilik") yang mengikat dan memberi warna merah atau merah muda ke struktur yang lebih basa, seperti protein sitoplasma. Berikut adalah langkah-langkah detail dalam pewarnaan Hematoxylin Eosin (Digambiro & Parwanto, 2024).

a. Deparafinisasi dan Rehidrasi:

Tahapan pertama yaitu deparafinisasi suatu proses yang dilakukan untuk melarutkan parafin sebelum dilakukan pewarnaan pada preparat jaringan. Biasanya tahapan ini menggunakan xylol sebagai pelarut organik (Hasanah, 2024).

- 1) Tempatkan slide dalam xylene selama sekitar 5-10 menit untuk menghilangkan parafin. Ulangi ini dalam xylene kedua.

Rehidrasi adalah tahap selanjutnya setelah defarafinisasi proses ini merupakan proses yang dilakukan untuk penarikan air dan memasukan alkohol dengan penurunan konsentasi alkohol dari yang tertinggi hingga yang terendah (Hasanah, 2024).

- 2) Rehidrasi sampel dengan meletakkan slide dalam serangkaian alkohol: duakali dalam alkohol absolut selama 2-3 menit, lalu 95% alkohol selama 2-3 menit, dan akhirnya 70% alkohol selama 2-3 menit.
- 3) Bilas slide dalam air mengalir selama 2-3 menit.

b. Pewarnaan inti dengan Hematoxylin:

Hematoxylin adalah pewarna alami yang diekstrak dari kayu pohon Logwood yang ditemukan di Meksiko dan Amerika Tengah. Hematoxylin sendiri bukanlah pewarna, hematoxylin perlu teroksidasi menjadi hematein yang mana proses ini dianggap sebagai pematangan. Pematangan dapat berlangsung secara spontan dan lambat dengan paparan oksigen atmosfer, atau cepat dengan penambahan oksidan kimia seperti natrium iodat. Hematein ini yang berfungsi sebagai pewarna jaringan (Hadi, 2016).



Sumber : Llewellyn, Bryan D, Stainsfile, 2025

Gambar 2.5 Hematoxylin dan Hematein

Dari dua rumus struktur di atas dapat dilihat bahwa hematoxylin dan hematein hanya berbeda satu atom hidrogen. Penghapusan hidrogen dari hematoxylin dilakukan secara alami oleh oksigen atmosfer atau dengan menggunakan zat pengoksidasi ringan dan menghasilkan senyawa dengan gugus hidroksil yang berdekatan dengan gugus karbonil. Konfigurasi ini merupakan salah satu yang memfasilitasi pembentukan kompleks koordinasi dengan logam, seperti aluminium. Dengan demikian, aluminium dapat dianggap sebagai penghubung atau jembatan, antara pewarna anionik hematein dan gugus fosfat nuklir bermuatan negatif (Llewellyn, 2025).

Hematein bukanlah basa kuat, ia bersifat anionik dengan afinitas yang buruk terhadap jaringan dan tidak memadai sebagai pewarna inti tanpa adanya mordan. Garam aluminium, besi, dan tungsten merupakan mordan yang paling berguna untuk hematein sehingga membentuk kompleks yang dapat berinteraksi dengan jaringan. Kompleks hematein-mordan inilah yang sebenarnya bersifat basa dan memiliki afinitas terhadap inti sel yang bersifat asam. Hematoxylin tawas Ehrlich, Mayer, Harris, Gill, Cole, dan Delafield adalah hematoxylin yang paling sering digunakan dalam pewarnaan Hematoxylin Eosin dan menghasilkan pewarnaan inti yang baik. Mordannya adalah aluminium, yang mewarnai inti dengan warna merah, lalu berubah menjadi biru-hitam yang umum saat potongan jaringan/ slide dicuci dalam larutan alkali lemah, hasil meunjukkan detail intranuklear yang cukup jelas (Bancroft, 2018).

1) Tempatkan slide dalam larutan hematoxylin selama sekitar 5-10 menit. Pencucian dilakukan dengan menggunakan air mengalir secara

perlahan-lahan, hingga warna yang didapatkan dari pewarna sebelumnya tersebut tidak luntur dan tidak mengganggu tahap berikutnya (Khristian & Dewi, 2017)

2) Bilas slide dalam air mengalir hingga air mengalir bening.

Tahap berikutnya yaitu Bluing, tahap ini diperlukan untuk mengubah pewarnaan inti dari ungu kemerahan menjadi warna biru atau ungu jernih. Yang mana agen bluing bersifat basa dengan pH kisaran optimal 7,5-9,0. Cara kerja bluing ini yaitu dengan meningkatkan pH, lalu mengurangi  $H^+$  pada larutan yang berefek pada struktur dari hematoxylin, lalu juga mampu menghilangkan  $H^+$  dari struktur ring (Khristian & Dewi, 2017).

3) Letakkan slide dalam air yang mengandung beberapa tetes amonia atau larutan biru Scott untuk memblueing hematoxylin.

c. Pewarnaan sitoplasma dengan Eosin:

Eosin merupakan pewarna rutin yang digunakan sebagai pewarna tandingan dalam pewarnaan Hematoxylin Eosin, dan terbentuk melalui reaksi antara Bromin dan Fluorescein. Ada dua varian Eosin yang digunakan dalam histologi yaitu Eosin Kekuningan yang juga dikenal sebagai Eosin Y, dan Eosin Kebiruan yang juga dikenal sebagai Eosin B. Eosin Y juga dapat diklasifikasikan berdasarkan kelarutan pewarna, yang memungkinkan untuk menemukan Eosin Y dalam air dan alkohol. Selain itu, peningkatan warna dapat dicapai dengan menambahkan Phloxine B ke Eosin. Eosin adalah pewarna asam yang mampu mengikat gugus kationik terionisasi dari protein seperti  $\beta$ -amino kelompok rantai samping lisin dan kelompok guanidin arginin, karena hampir semua protein mengandung kedua asam amino ini, maka Eosin dapat mengikat hampir semua struktur yang ada dalam jaringan (Veuthey, 2014).

Eosin mempunyai sifat asam, dan dengan kemampuan diferensiasi yang baik itu dapat membedakan antara sitoplasma dengan berbagai macam jenis sel, serat dan juga matriks jaringan ikat. Berbeda dari hematoxylin, eosin merupakan zat warna yang akan mewarnai sitoplasma dan kolagen menjadi warna merah muda. Ada beberapa jenis

eosin yang tersedia secara komersial, tetapi Eosin Y adalah yang paling banyak digunakan dan larut dalam air dan alkohol (Bancroft, 2018).

- 1) Bilas slide dalam air dan kemudian tempatkan dalam larutan eosin selama 1-2 menit.

d. Dehidrasi, Clearing, dan Mounting:

Dehidrasi merupakan proses pengeluaran air bebas tidak terikat dan larutan fiksatif. Dehidrasi harus dilakukan secara lambat. Spesimen diproses melalui proses peningkatan konsentrasi kadar alkohol secara bertingkat alkohol bertingkat seperti alkohol 70%, 80%, dan 90% (Khristian & Dewi, 2017).

- 1) Dehidrasi slide dengan meletakkan ke dalam alkohol bertingkat alkohol 70% - alkohol 95% - alkohol absolut selama beberapa menit.

Pada tahap ini dilakukan dengan menggunakan xylol 1 dan 2. Penjernihan ialah salah satu proses yang dilakukan setelah dehidrasi, untuk membuat jaringan menjadi jernih serta transparan agar dapat terwarnai dengan baik, dan juga dapat memperlihatkan warna sesuai dengan pewarnanya (Hasanah, 2024).

2) Letakkan slide dalam xylol selama beberapa menit untuk clearing. Proses mounting dilakukan dengan menggunakan deck glass berupa kaca penutup yang biasanya terbuat dari bahan fiberglass tipis. Selain deck glass perekat juga sangat dibutuhkan pada tahap ini, yaitu digunakan untuk perekat dan bahan pengawet bagi sediaan. Perekat yang biasa digunakan yaitu entelan. Proses mounting sendiri sebaiknya dilakukan dalam kondisi sediaan masih basah oleh larutan xylol agar perekat tersebut benar-benar menyatu dengan jaringan (Hasanah, 2024)

- 3) Tempelkan cover slip menggunakan bahan mounting yang sesuai dan biarkan mengering sebelum melihat di bawah mikroskop.

Tabel 2.1 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No	Tahap	Zat	Waktu
1	Deparafinisasi (menghilangkan parafin)	Xylol I	10 menit
		Xylol II	15 menit

2	Rehidrasi (memasukan air)	Alkohol dengan penurunan konsentrasi - Aquadest (Absolut-70%) Alkohol Absolut – Alkohol 95% - Alkohol 70% - Aquades	3 menit
3	Pewarnaan Hematoxylin	Hematoxylin Alum	15 menit
4	Pencucian	Pencucian pada air mengalir sampai berwarna biru	5 menit
5	Diferensiasi (proses dekolorisasi pada sitoplasma)	Asam alkohol 1% (1% HCl dalam 70% Alkohol) dalam waktu 5-10 detik	3 celup
6	Pencucian	Air mengalir	1 menit
7	Blueing (proses memperjelas warna biru pada inti sel) diikuti dengan pencucian dengan air mengalir	Lithium Carbonat	3 celup
8	Pewarnaan eosin	Eosin 1%	3-5 menit
9	Dehidrasi (menghilangkan air)	Alkohol dengan kenaikan konsentrasi (70%-Absolut) Alkohol 70% - alkohol 95% - alkohol 95% - Alkohol absolut – Alkohol Absolut	1-3 menit
10	Clearing	Xylol Xilol 1 – Xilol 2	3-5 menit
11	Mounting (proses penutupan jaringan diantara cover glass dengan objek glass oleh entelan)	Entelan	

Sumber: Khristian, 2017.

Pewarnaan Hematoxylin Eosin menjadi pilihan utama dalam banyak laboratorium histopatologi karena beberapa alasan: (Digambiro & Parwanto, 2024)

- Kontras yang Baik: Hematoxylin mewarnai inti sel menjadi biru (basofilik), sementara eosin mewarnai sitoplasma dan matriks ekstraseluler menjadi merah muda (asidofilik). Kontras ini memudahkan identifikasi struktur seluler dan arsitektur jaringan.
- Prosedur Standar: Hematoxylin Eosin telah menjadi standar dalam banyak protokol histologi, memungkinkan konsistensi dan reproduktifitas dalam diagnosis
- Efisiensi Waktu dan Biaya: Proses pewarnaan hematoxylin eosin relatif cepat dan ekonomis dibandingkan dengan beberapa teknik pewarnaan khusus lainnya.
- Kemampuan Diagnostik yang Luas: Meskipun sederhana, hematoxylin eosin mampu memberikan informasi diagnostik yang luas, memungkinkan identifikasi berbagai kondisi patologis.

Pewarnaan Hematoxylin Eosin digunakan untuk hampir semua jenis jaringan dalam tubuh, terutama untuk memberikan gambaran umum struktur morfologis. Namun, efektivitasnya tergantung pada sifat kimia jaringan dan kebutuhan analisis. Berikut jaringan yang dapat diwarnai dengan Hematoxylin Eosin:

- a. Jaringan Epitelial: Seperti kulit, mukosa saluran pencernaan, dan kelenjar.
  - b. Jaringan Ikat: Termasuk tendon, ligamen, dan jaringan adiposa.
  - c. Jaringan Otot: Seperti otot rangka, otot jantung, dan otot polos.
  - d. Jaringan Saraf: Termasuk otak dan sumsum tulang belakang.
  - e. Jaringan Reproduksi: Termasuk uterus, testis, dan ovarium
  - f. Jaringan Organ Spesifik: Seperti payudara, hati, ginjal, paru-paru, dan limpa.
- (Sampias, 2020).

Untuk memastikan diagnosis kanker, analisis mikroskopis sel dan komponen jaringan dari sampel kanker yang diwarnai harus dilakukan oleh ahli patologi. Berbagai jenis kanker dapat didiagnosis dengan analisis sampel histologis yang diwarnai dengan hematoxylin eosin. Melalui pewarnaan ini, dimungkinkan untuk mengidentifikasi arsitektur komponen jaringan dan menganalisis aspek morfologi seluler yang sangat penting untuk diagnosis kanker. Namun, persiapan sampel histologis dapat menyebabkan variasi warna yang mempengaruhi kinerja segmentasi dan klasifikasi dalam sistem analisis gambar histologis. Di antara faktor-faktor yang menentukan variasi warna ini adalah waktu pewarnaan yang berbeda, oksidasi kimia, konsentrasi dan pH larutan pewarnaan (Tosta, 2018).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kualitas pewarnaan hematoxylin eosin ialah fiksasi jaringan, ketebalan irisan jaringan, proses deparafinisasi & rehidrasi, kualitas & pH reagen pewarna, serta durasi pewarnaan. Pedoman kontrol kualitas harian pewarnaan hematoxylin eosin dapat dilakukan pada organ usus besar (kolon), kulit dan ginjal. Adapun beberapa pedoman umum yang dapat dipakai untuk menilai kualitas hematoxylin eosin adalah sebagai berikut:

- a. Nukleus: zat warna dapat mewarnai nukleus menjadi biru dan dapat menunjukkan membran nukleus, nukleoli, kromatin, dan nukleus yang vakuolar dan hiperkromatis.
- b. Sitoplasma dan substansi dasar lainnya: dapat mewarnai dan membedakan sitoplasma, kolagen, otot, eritrosit, sel darah merah dan mucin dengan nuansa

warna kemerahan

- c. Pada potongan usus, usus buntu dan paru-paru: dapat mewarnai mucin pada sel epitel, apakah berwarna biru atau terang tergantung pada pH dari Hematoxylin. Menurunkan pH biasanya dapat dilakukan dengan menambahkan asam asetat, hal ini secara signifikan dapat mengurangi warna mucin.
- d. Pewarnaan Hematoxylin yang terlalu teroksidasi akan menimbulkan warna coklat pada elemen-elemen tertentu pada jaringan (Khristian & Dewi, 2017).

Pewarnaan hematoxylin eosin baru yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pewarnaan dengan menggunakan larutan reagen hematoxylin eosin yang baru dan belum pernah dipakai untuk mewarnai jaringan agar lebih mudah diamati dengan mikroskop. Kelebihan pewarnaan hematoxylin eosin baru ialah konsentrasi dan pH larutan zat warna yang ada di dalam reagen masih sangat baik, sehingga menghasilkan kualitas pewarnaan yang baik dan jelas terlihat, namun kekurangan menggunakan reagen yang baru setiap akan melakukan pewarnaan ialah ketidakefisienan dalam segi biaya. Sedangkan pewarnaan hematoxylin eosin lama yang dimaksud ialah reagen hematoxylin eosin yang telah dipakai selama 2 bulan dengan akumulasi jumlah sampel preparat pasien sebanyak 150-200 preparat setiap bulannya. Kelebihan pewarnaan hematoxylin eosin lama adalah reagen dapat berulang kali dipakai dan lebih efisien dalam pengeluaran biaya. Sedangkan kekurangan pewarnaan hematoxylin eosin lama yaitu saat reagen harus disaring terlebih dahulu saat ingin digunakan dan hasil pewarnaan kurang jelas atau pucat karena kandungan konsentrasi dan pH larutan pewarna sudah berkurang.

#### **4. Peran pH Reagen Hematoxylin dan Eosin**

Hematoxylin Harris/tawas ini secara tradisional dimatangkan dengan oksida merkuri. Merkuri sangat beracun dan tidak ramah lingkungan, sehingga natrium atau kalium iodat sekarang umumnya digunakan untuk oksidasi. Komposisi larutan hematoxylin harris, yaitu

- e. Hematoxylin 2,5gr
- f. Alkohol absolut 25 ml
- g. Kalium tawas (mordan) 50 gr



- |                        |        |
|------------------------|--------|
| h. Air suling/aquades  | 500 ml |
| i. Natrium Iodat       | 0,5 gr |
| j. Asam asetat glasial | 20 ml  |

Hematoxylin dilarutkan dalam alkohol absolut, dan ditambahkan tawas yang sebelumnya telah dilarutkan dalam aquades hangat dalam labu bervolume 2 L. Campuran dididihkan dengan cepat dan natrium iodat kemudian ditambahkan perlahan. Dinginkan larutan dalam air dingin. Saat dingin, asam asetat ditambahkan dan pewarna siap digunakan segera. Asam asetat glasial bersifat opsional tetapi penambahannya memberikan pewarnaan inti yang lebih tepat dan selektif (Bancroft, 2018).

Sudah menjadi praktik umum untuk menambahkan sejumlah kecil asam ke dalam larutan hemalum (hematoxylin dan garam alumunium), awalnya untuk memperpanjang masa pakainya. Asam asetat merupakan yang paling umum digunakan. Larutan yang mengandung asam tambahan memiliki masa pakai yang jauh lebih lama, dan ketika akhirnya mulai berubah warna, dapat diremajakan dengan menambahkan sejumlah kecil asam lagi. Tentu saja, ada batasan berapa kali hal ini dapat dilakukan (Llewellyn, 2025).

Eosin adalah pewarna xanthene berfluoresensi yang mengikat garam dengan senyawa eosinofilik yang mengandung muatan positif. Pewarna ini paling cocok untuk dikombinasikan dengan hematoxylin tawas guna menunjukkan struktur histologis umum jaringan. Eosin Y adalah yang paling banyak digunakan dan larut dalam air dan alkohol. Sebagai pewarna sitoplasma, biasanya digunakan sebagai larutan 0,5 atau 1,0% dalam air suling, dengan kristal timol yang ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan jamur. Penambahan sedikit asam asetat (0,5 ml hingga 1000 ml pewarna) dikatakan dapat mempertajam pewarnaan (Bancroft, 2018).

Faktor penting yang mempengaruhi kemanjuran reagen pewarnaan dalam sediaan histopatologi adalah pH, yang secara signifikan dapat mempengaruhi sifat pengikatan pewarna, seperti hematoxylin dan eosin. Kisaran pH optimal sangat penting untuk mencapai kontras dan resolusi yang diinginkan pada bagian jaringan, khususnya dalam diagnosis kanker payudara (Brown, 2012).

Variasi pH dapat mengubah keadaan ionisasi zat pewarna, sehingga berdampak pada afinitasnya terhadap asam nukleat dan protein, pH yang tidak tepat dapat menyebabkan tingkat kecerahan warna yang dihasilkan tidak optimal, sehingga menghasilkan gambaran diagnostik yang ambigu dan dapat mengaburkan pengamatan patologis. Lebih lanjut, (da Silva Pinhal et al.) menyatakan bahwa teknik imunohistokimia, yang mengandalkan reaksi antigen-antibodi yang efektif, juga sensitif terhadap variasi pH, sehingga menggarisbawahi pentingnya kontrol pH yang tepat. Oleh karena itu, menggunakan reagen pada pH yang sesuai tidak hanya meningkatkan kualitas pewarnaan tetapi juga meningkatkan akurasi diagnostik, yang pada akhirnya memberikan manfaat bagi hasil evaluasi pasien kanker payudara.

Sifat pewarnaan hematoxylin dan eosin sangat dipengaruhi oleh tingkat pH, yang mempengaruhi keadaan ionisasi pewarna dan interaksinya dengan komponen jaringan. Pada pH asam, hematoxylin cenderung menunjukkan muatan positif karena protonasi gugus hidroksilnya, meningkatkan kemampuannya untuk berikatan dengan struktur seluler bermuatan negatif, seperti asam nukleat, sehingga menghasilkan pewarnaan nuklir yang lebih jelas. Sebaliknya, ketika pH menjadi lebih basa, eosin kehilangan muatan positifnya, yang mengurangi afinitasnya terhadap jaringan dan dapat menyebabkan penurunan kualitas pewarnaan sitoplasma (Brown, 2012).

Protokol larutan hematoxylin eosin standar diterapkan pada bagian jaringan 3  $\mu\text{m}$  menggunakan hematoxylin dengan standar pH 2,75 merupakan yang paling optimal untuk mencapai keseimbangan warna dan lapisan epitel definitif dalam pewarnaan H&E, sedangkan Eosin dengan standar pH 5,0 digunakan sebagai pewarna tandingan (Radzuan dkk, 2020).

Penelitian yang dilakukan oleh Hadi, A.G., et.al (2016) tentang kompleks hematoxylin dengan ion logam (mordan)  $\text{Al}^{3+}$  dan  $\text{Fe}^{3+}$  dianalisis menggunakan metode spektrofotometri, hasilnya menunjukkan nilai pH optimum untuk pembentukan kompleks hematoxylin dengan ion kompleks mordan  $\text{Al}^{3+}$  adalah 3,0, dan untuk  $\text{Fe}^{3+}$  adalah 4,0.

Kinerja larutan hematoxylin dipantau secara saksama. Selama masa kerjanya, larutan hematoxylin diencerkan secara bertahap oleh sisa-sisa air dari slide dan rak serta dipengaruhi oleh oksidasi yang berkelanjutan yang dapat mengurangi konsentrasi dan juga pH larutan pewarna. Sedangkan pH larutan eosin juga harus selalu dipantau, pH dijaga mendekati 5,0 untuk mempertahankan pewarnaan yang optimal. Ketika intensitas pewarnaan eosin menurun, biasanya disebabkan tertinggalnya air keran alkali yang dapat menyebabkan pH larutan eosin meningkat (Rolls et al, 2020).

Pertahankan kontrol yang baik terhadap konsentrasi, pH, dan kesegaran reagen pewarnaan, serta saring larutan hematoxylin secara teratur guna menghindari endapan biru-hitam menempel pada slide jaringan yang diwarnai. Selain itu, pastikan bagian-bagian jaringan pada slide telah dikeringkan dengan benar dan suhu yang sesuai ( $\leq 70^{\circ}\text{C}$ ) sebelum diwarnai untuk menghindari timbulnya gelembung atau bercak pada nukleus (Wick, 2019).

Teknik histoteknik hematoxylin eosin yang dioptimalkan memastikan kualitas pewarnaan yang baik dan dapat direproduksi. Praktik umum dalam menentukan kapan harus membuang larutan sangat bergantung pada frekuensi dan durasi penggunaan. Oleh karena itu, penting mengetahui pengaruh pH larutan hematoxylin eosin terhadap kualitas pewarnaan untuk dapat membantu dalam memutuskan apakah larutan tersebut perlu diganti.

## **5. Kualitas Pewarnaan Preparat**

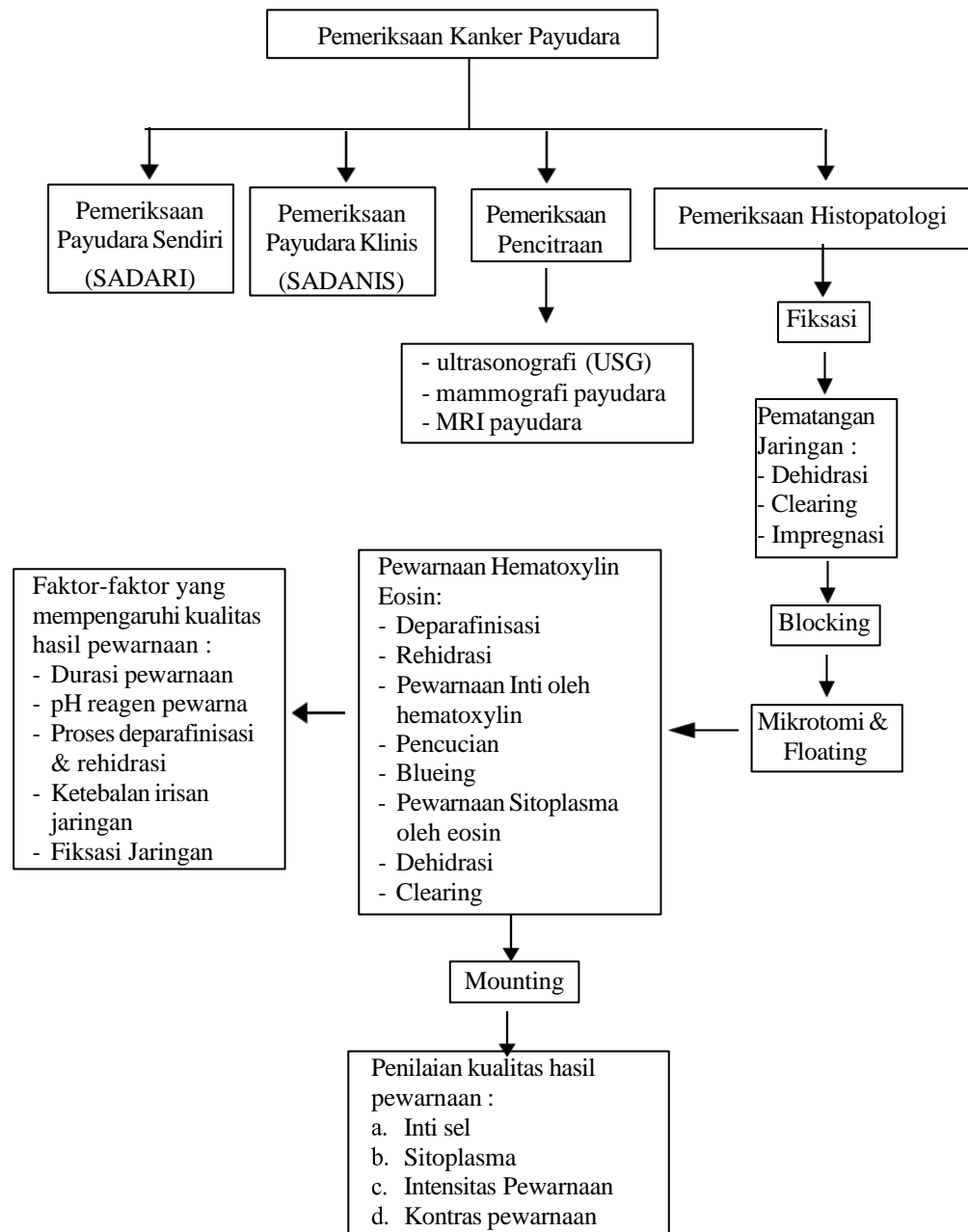
Menurut BPMPPPI, penilaian kualitas pewarnaan preparat jaringan kanker payudara nantinya akan dinilai oleh dokter spesialis patologi anatomi berdasarkan dengan penilai *skoring*. Skor maksimum yang mungkin diperoleh untuk satu kasus dengan mempertimbangkan keempat faktor. Sediaan dinilai baik apabila rerata skor antara 7-8 dan tidak baik dengan skor 4-6. Adapun parameter penilaian dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel: 2.2 Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan

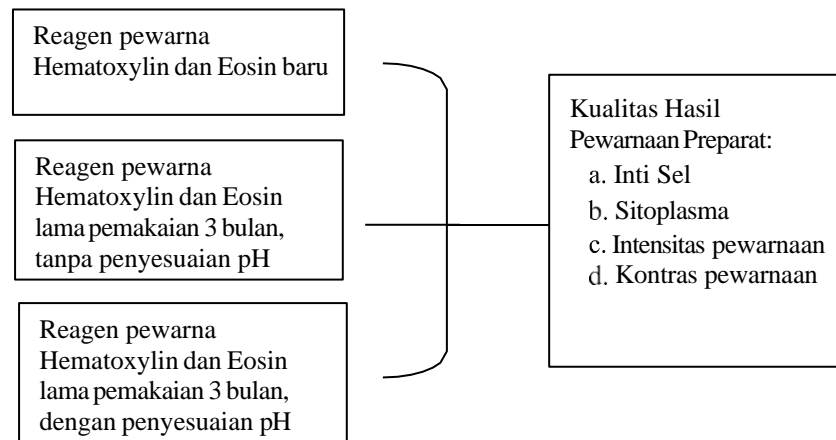
No	Parameter penilaian	Deskripsi	Skor
1	Inti sel	Warna ungu kebiruan pada inti sel kurang tampak jelas	1
		Warna ungu kebiruan pada inti sel terlihat denga jelas	2
2	Sitoplasma	Warna merah muda pada sitoplasma terlihat kurang jelas	1
		Warna merah muda pada sitoplasma terlihat jelas	2
3	Intensitas Pewarnaan	Tingkat kejelasan warna dari pewarnaan yang tampak lemah/pudar	1
		Tingkat kejelasan warna dari pewarnaan yang tampak kuat atau padat	2
4	Kontras Pewarnaan	Tidak ada perbedaan kontras yang jelas antara warna ungu kebiruan pada inti sel dan merah muda pada sitoplasma	1
		Ada perbedaan kontras yang jelas antara warna ungu kebiruan pada inti sel dan merah muda pada sitoplasma	2

Sumber : Sravya *et al.*, 2018 yang dimodifikasi BPMPPi

## B. Kerangka Teori



### C. Kerangka Konsep



### D. Hipotesis

H0: Tidak ada perbedaan kualitas pewarnaan preparat jaringan kanker payudara pada proses pewarnaan Hematoxylin Eosin menggunakan reagen baru dan reagen lama 3 bulan pemakaian yang diberikan perlakuan penyesuaian pH dan tanpa penyesuaian pH

H1: Ada perbedaan kualitas pewarnaan preparat jaringan kanker payudara pada proses pewarnaan Hematoxylin Eosin menggunakan reagen baru dan reagen lama 3 bulan pemakaian yang diberikan perlakuan penyesuaian pH dan tanpa penyesuaian pH.