

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Histologi

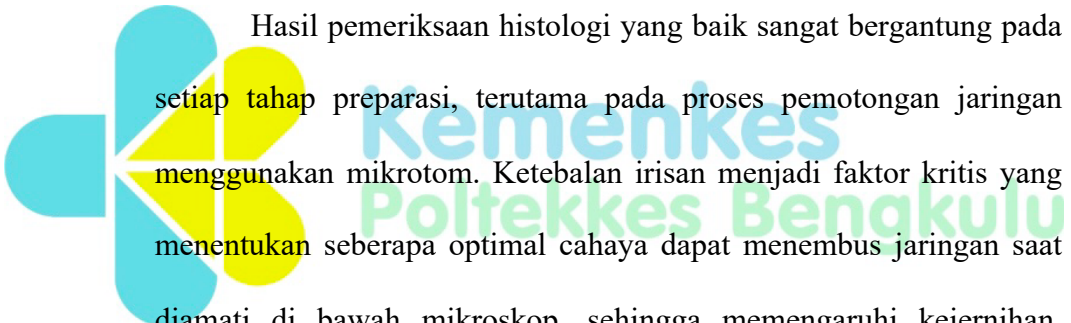
1. Pengertian Histologi dan Pemeriksaan Histologi

Histologi adalah cabang ilmu yang mempelajari struktur mikroskopis sel dan jaringan, termasuk hubungan antar sel serta karakteristik subselulernya. Dalam konteks kedokteran dan laboratorium medis, histologi berperan dalam mendukung diagnosis penyakit melalui analisis perubahan morfologis pada tingkat sel dan jaringan. Pemeriksaan histologis memungkinkan identifikasi kelainan patologis seperti inflamasi, degenerasi, atau proliferasi abnormal, yang sering menjadi indikator awal gangguan kesehatan (H. Ross *et al.*, 2021; Mazzarini *et al.*, 2021).

Pemeriksaan histologi dilakukan melalui serangkaian tahap: fiksasi, dehidrasi, infiltrasi parafin, pemotongan dengan mikrotom, penempelan jaringan pada kaca objek, pewarnaan, hingga interpretasi mikroskopis. Proses ini bertujuan untuk mempertahankan struktur jaringan sedekat mungkin dengan kondisi aslinya. Setiap tahapan ini berkontribusi terhadap kualitas akhir preparat. Salah satu tahap yang paling menentukan adalah pemotongan jaringan, karena kesalahan kecil pada ketebalan dapat mengubah hasil pewarnaan dan kejernihan struktur yang tampak (Dağdeviren *et al.*, 2024; Valdebenito *et al.*, 2025).

2. Prinsip Pemeriksaan Jaringan Histologi

Pemeriksaan jaringan histologi bertumpu pada dua prinsip utama, yaitu preservasi struktur jaringan dan visualisasi komponen seluler. Proses fiksasi bertujuan menghentikan aktivitas enzimatis dan mencegah autolisis jaringan, sedangkan pewarnaan dilakukan untuk memberikan kontras antara inti dan sitoplasma agar struktur sel dapat diamati dengan jelas (Bauer *et al.*, 2018).



Hasil pemeriksaan histologi yang baik sangat bergantung pada setiap tahap preparasi, terutama pada proses pemotongan jaringan menggunakan mikrotom. Ketebalan irisan menjadi faktor kritis yang menentukan seberapa optimal cahaya dapat menembus jaringan saat diamati di bawah mikroskop, sehingga memengaruhi kejernihan, kontras, dan kedalaman fokus hasil pewarnaan (Libard *et al.*, 2019).

Dalam konteks optik, irisan yang terlalu tebal akan menghambat transmisi cahaya, menghasilkan gambar gelap dengan kontras rendah. Sebaliknya, irisan yang terlalu tipis menyebabkan cahaya berlebihan dan menurunkan intensitas pewarnaan (Koivukoski *et al.*, 2023; Libard *et al.*, 2019). Oleh karena itu, kontrol ketebalan yang akurat menjadi aspek teknis penting untuk memperoleh hasil visualisasi yang optimal.

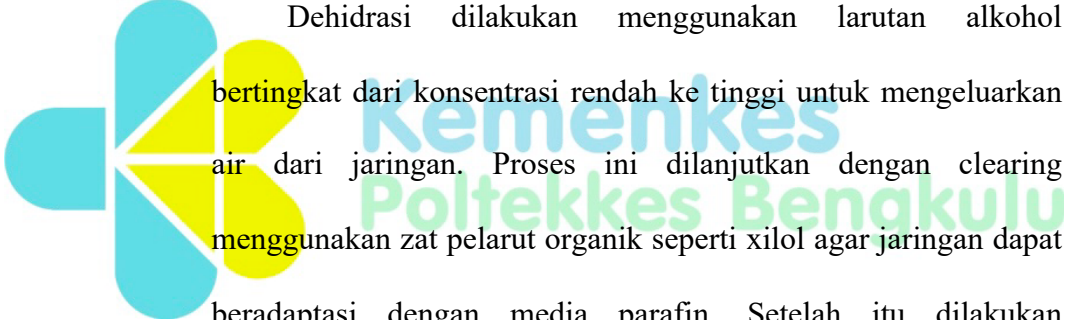
3. Tahapan Pemeriksaan Histologi

Setiap Pembuatan preparat jaringan histologi terdiri atas beberapa tahap yang saling berhubungan.

a. Fiksasi

Fiksasi bertujuan menghentikan aktivitas biologis dalam jaringan untuk mencegah kerusakan struktur sel. Fiksatif yang umum digunakan adalah formalin 10%, karena efektif mempertahankan morfologi jaringan tanpa menyebabkan pengerutan berlebihan. Fiksasi yang baik menghasilkan jaringan yang keras dan mudah dipotong (Thavarajah *et al.*, 2012).

b. Dehidrasi dan Embedding



Dehidrasi dilakukan menggunakan larutan alkohol bertingkat dari konsentrasi rendah ke tinggi untuk mengeluarkan air dari jaringan. Proses ini dilanjutkan dengan clearing menggunakan zat pelarut organik seperti xilol agar jaringan dapat beradaptasi dengan media parafin. Setelah itu dilakukan embedding atau penanaman jaringan ke dalam blok parafin hingga mengeras. Media parafin berfungsi sebagai penopang saat pemotongan dilakukan (Lerch *et al.*, 2019; Nelson *et al.*, 2022).

c. Pemotongan

Pemotongan jaringan dilakukan dengan alat mikrotom, menghasilkan irisan tipis dengan ketebalan tertentu, umumnya antara 3–8 mikrometer tergantung jenis jaringan. Ketebalan irisan mempengaruhi kualitas pengamatan, di mana irisan yang terlalu tebal menghasilkan citra yang buram dan sulit dianalisis. Setelah pemotongan, potongan jaringan ditempel pada kaca objek,

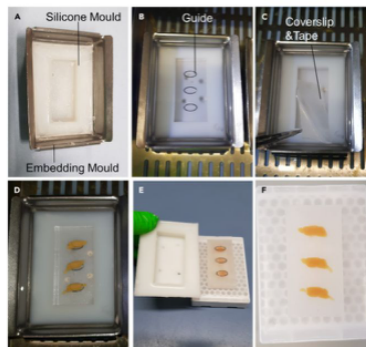
dikeringkan, dan siap untuk pewarnaan (Masuda *et al.*, 2021; Meyerholz dan Beck, 2018).

d. Pewarnaan dan Mounting

Pewarnaan berfungsi menonjolkan struktur seluler agar terlihat jelas di bawah mikroskop, sedangkan mounting menjaga preparat tetap awet dan tidak bergeser. Proses pembuatan preparat ini harus dilakukan secara sistematis dan konsisten agar hasil yang diperoleh memiliki kualitas tinggi dan dapat dibandingkan antar sampel (Ravikumar *et al.*, 2014).

B. Irisan Blok Parafin

1. Proses Pembuatan Blok Parafin

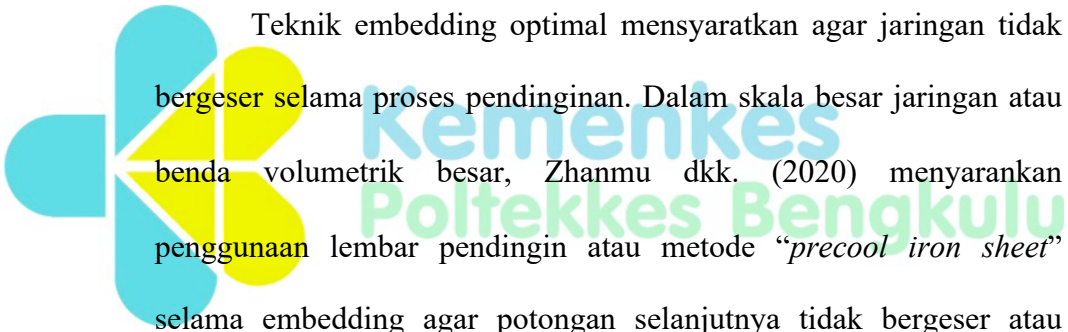


Gambar 2.1. Proses Embedding dan Pembentukan Blok Parafin
Sumber: (Smart *et al.*, 2023)

Pembuatan blok parafin adalah proses jaringan biologis dipotong tipis secara stabil. Pertama, setelah fiksasi dan dehidrasi, jaringan direndam dalam parafin cair untuk menggantikan cairan dan menciptakan medium pendukung. Proses embedding dilakukan dengan menuangkan parafin cair ke cetakan yang berisi jaringan dan membiarkannya mengeras secara bertahap. Teknik ini membantu

menjaga orientasi jaringan agar irisan sesuai bidang yang diinginkan (Nelson *et al.*, 2022; Zhanmu *et al.*, 2020).

Saat parafin mengeras, jaringan terikat dalam matriks padat yang mempermudah pemotongan irisan tipis dengan mikrotom tanpa merusak struktur. Ketepatan suhu parafin, kecepatan pendinginan, dan kebersihan cetakan sangat memengaruhi kualitas blok. Blok yang retak, mengandung udara, atau tidak homogen akan menghasilkan irisan yang cacat, misalnya lipatan atau robekan pada jaringan (Smart *et al.*, 2023).



Teknik embedding optimal mensyaratkan agar jaringan tidak bergeser selama proses pendinginan. Dalam skala besar jaringan atau benda volumetrik besar, Zhanmu dkk. (2020) menyarankan penggunaan lembar pendingin atau metode “*precool iron sheet*” selama embedding agar potongan selanjutnya tidak bergeser atau terjadi pecah.

Agar blok parafin dapat digunakan untuk pemotongan 2, 4, hingga 6 μm dengan konsistensi, proses embedding harus dijaga agar densitas parafin merata, tidak ada rongga udara, dan jaringan tertanam dalam posisi rata. Variasi embedding serta penggunaan parafin berkualitas tinggi akan mengurangi artefak pemotongan dan memudahkan menghasilkan irisan seragam (Fonti *et al.*, 2025).

2. Faktor yang Mempengaruhi Ketebalan Irisan

Ketebalan irisan tergantung pada beberapa faktor teknis utama:

kondisi pisau mikrotom, sifat mekanik blok parafin, suhu ruangan dan kelembapan, serta keterampilan operator. Pisau tajam dan sudut pisau yang tepat (*clearance angle optimal*) penting agar irisan tidak bergelombang atau retak. Ini sangat penting ketika memotong irisan tipis seperti 2 μm (Sato *et al.*, 2024).

Faktor lain adalah karakteristik blok parafin itu sendiri. Parafin yang terlalu keras atau terlalu lunak akan mempengaruhi kemampuan pisau menembus jaringan secara rata. Selain itu, variasi suhu ruang dan kelembapan dapat membuat parafin mengembang atau melembek, sehingga irisan menjadi tidak stabil (Kmecick *et al.*, 2023).

Selain itu, para peneliti juga mengukur ketebalan irisan melalui teknik yang inovatif. Contohnya, metode menggunakan intensitas fluoresensi pada foam embedding yang ditanam bersamaan untuk memperkirakan ketebalan irisan dengan presisi $\pm 0,5 \mu\text{m}$. Teknik ini memungkinkan evaluasi irisan dalam jumlah banyak dengan otomatis tanpa memerlukan mikroskop konfokal (Dadash-khanlou *et al.*, 2022).

3. Pengaruh Ketebalan terhadap Kualitas Visual Mikroskopis

Ketebalan irisan jaringan merupakan salah satu faktor yang sangat memengaruhi hasil pewarnaan histologis. Irisan yang terlalu tebal dapat menyebabkan penetrasi zat pewarna tidak merata, sehingga warna jaringan tampak lebih gelap atau menumpuk pada area tertentu. Sebaliknya, irisan yang terlalu tipis dapat

mengakibatkan bagian jaringan mudah robek dan menghasilkan warna yang terlalu pucat. Penentuan ketebalan optimal diperlukan agar proses penyerapan pewarna berjalan seimbang antara inti dan sitoplasma, sehingga diperoleh hasil pewarnaan yang kontras dan representatif secara morfologis (Masuda *et al.*, 2021; McCampbell *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2025).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sofyanita dan Siwi (2024) menunjukkan bahwa variasi ketebalan irisan jaringan memiliki pengaruh signifikan terhadap kualitas pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Pada penelitian tersebut, ketebalan irisan 3 μm memberikan hasil pewarnaan paling optimal dengan kontras warna yang baik dan morfologi jaringan yang masih terjaga dengan jelas. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin sesuai ketebalan irisan dengan karakteristik jaringan, maka semakin baik pula distribusi warna yang dihasilkan pada proses pewarnaan HE

Studi *Impact of Tissue Thickness on Computational* pada jaringan tiroid melaporkan bahwa variasi ketebalan mempengaruhi fitur nukleus dan parameter citra seperti intensitas, ukuran, dan kepadatan, yang berdampak pada analisis digital maupun visual. Ini relevan karena struktur nukleus di paru mencit juga menjadi parameter penting (Shah *et al.*, 2025).

Penelitian Skovgaard dkk. (2025) mengidentifikasi bahwa irisan dengan ketebalan optimal memberikan keseimbangan antara

visibilitas nukleus dan kemampuan pewarnaan terlalu tipis atau terlalu tebal sama-sama menurunkan kualitas interpretasi. Artikel ini membahas secara terperinci morphological distortions yang muncul ketika ketebalan tidak sesuai.

Selain itu, penelitian McCampbell dkk. (2019) pada IHC menyebut bahwa standard ketebalan 4–5 μm sangat disarankan untuk menjaga konsistensi dan menghindari variabilitas interpretasi.

Meskipun ini untuk IHC, prinsip dasarnya berkaitan dengan teknik pewarnaan jaringan yang serupa.

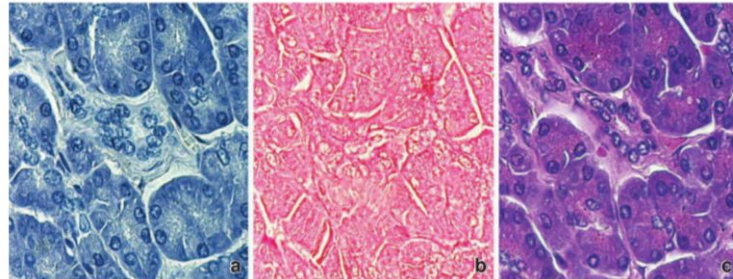
Fenomena kompresi irisan juga muncul selama pemrosesan. Studi pada jaringan tikus menunjukkan bahwa irisan parafin bisa mengalami penyusutan atau kompresi sel vertical hingga 3–5% dibanding ketebalan nominal. Ini menunjukkan bahwa meskipun mikrotom diatur ke 5 μm , irisan aktual mungkin sedikit lebih tipis setelah pewarnaan dan mounting (Xiang *et al.*, 2018)

C. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

1. Prinsip Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (H&E) merupakan metode standar dalam pemeriksaan histologi rutin. Hematoksilin berfungsi sebagai pewarna basa yang memiliki afinitas terhadap komponen asam jaringan seperti inti sel (DNA dan RNA), sehingga menghasilkan warna biru keunguan. Sebaliknya, Eosin merupakan zat warna asam yang mengikat komponen basa seperti sitoplasma dan protein, memberikan

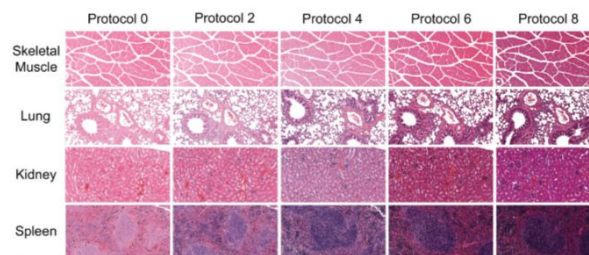
warna merah muda atau jingga (Cardiff *et al.*, 2014; H. Ross *et al.*, 2021).



Gambar 2.2. Pewarnaan Hematoxylin, Eosin, dan H&E
Sumber: (H. Ross *et al.*, 2021)

Prinsip dasar pewarnaan ini adalah pembentukan kontras warna antara struktur inti dan sitoplasma sehingga memudahkan identifikasi morfologi sel. Kombinasi kedua zat warna tersebut memberikan gambaran yang jelas tentang hubungan antar jaringan dan diferensiasi seluler. Oleh karena itu, teknik H&E masih menjadi metode utama di laboratorium histologi modern (E. Chlipala *et al.*, 2020).

2. Faktor-Faktor Yang Memengaruhi Kualitas Pewarnaan Hematoksilin-Eosin



Gambar 2.3. Tampilan Jaringan dan Intensitas Pewarnaan H&E
Sumber: (E. A. Chlipala *et al.*, 2021)

Pewarnaan Faktor-faktor yang memengaruhi kualitas hasil pewarnaan antara lain konsentrasi pewarna, lama waktu perendaman, serta ketebalan irisan jaringan. Irisan yang terlalu tebal menyebabkan

warna tampak gelap dan tidak merata (E. A. Chlipala *et al.*, 2021), sementara irisan yang terlalu tipis dapat menghasilkan warna pucat dan kehilangan detail morfologi. Karena itu, standar ketebalan irisan harus dijaga untuk mendapatkan hasil optimal (Dunn *et al.*, 2024).

Dalam konteks penelitian ini, variasi ketebalan irisan blok parafin menjadi variabel penting untuk menilai bagaimana perbedaan ketebalan memengaruhi distribusi pewarnaan H&E pada jaringan paru mencit. Kualitas pewarnaan yang baik menunjukkan ketepatan teknik pemotongan serta homogenitas proses histologi secara keseluruhan, yang menjadi dasar interpretasi mikroskopis yang valid (E. A. Chlipala *et al.*, 2021).

3. Proses Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Proses pewarnaan H&E dilakukan secara berurutan untuk memperoleh hasil optimal. Adapun tahapan pewarnaan secara umum adalah sebagai berikut (J.A. Kiernan, 2015):

a. Deparafinisasi

Sediaan jaringan yang telah dipotong dan ditempel pada kaca objek direndam dalam xylol untuk menghilangkan parafin. Langkah ini penting agar larutan pewarna dapat menembus jaringan dengan baik.

b. Rehidrasi

Preparat direndam secara bertahap dalam alkohol dengan konsentrasi menurun (100%, 96%, 80%, dan 70%), kemudian

dibilas dengan akuades untuk mengembalikan jaringan ke kondisi berair.

c. Pewarnaan dengan Hematoksilin

Preparat direndam dalam larutan hematoksilin selama beberapa menit hingga inti sel berwarna biru keunguan. Setelah itu dilakukan pembilasan dengan air mengalir.

d. Diferensiasi

Preparat dicelupkan singkat dalam larutan asam alkohol untuk menghilangkan kelebihan warna pada bagian non-inti.

e. Bluing (Pembiruan)

Tahapan ini menggunakan larutan basa ringan seperti lithium carbonate atau ammonia water untuk menstabilkan warna biru pada inti sel.

f. Pewarnaan dengan Eosin

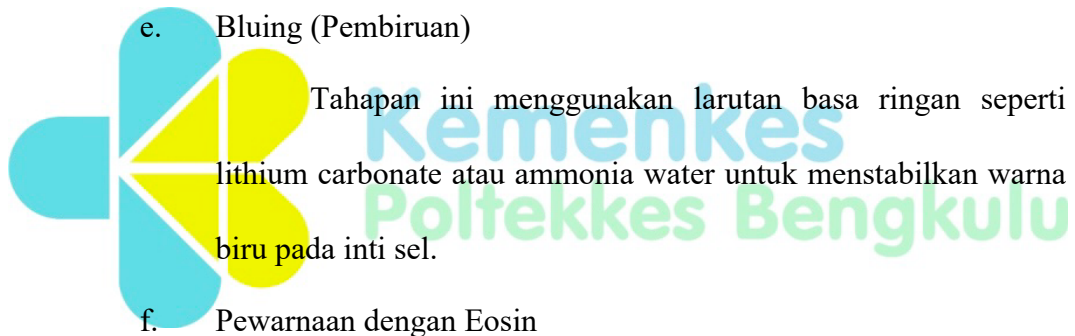
Preparat kemudian direndam dalam larutan eosin selama 1–2 menit untuk mewarnai sitoplasma dan jaringan penunjang dengan warna merah muda hingga oranye.

g. Dehidrasi Ulang

Preparat dimasukkan kembali ke dalam alkohol bertingkat (70%, 80%, 96%, 100%) untuk menghilangkan air.

h. Clearing dan Mounting

Preparat direndam dalam xylol untuk menjernihkan sediaan, kemudian ditetesi mounting medium dan ditutup dengan



kaca penutup (cover glass).

D. Jaringan Paru-Paru

1. Struktur Makroskopis dan Mikroskopis Paru

Paru-paru pada mamalia termasuk mencit dibagi menjadi lobus, dengan struktur bercabang yang meliputi bronkus, bronkiolus, dan alveolus. Organ paru berada di rongga toraks, dilindungi oleh tulang rusuk dan dibungkus pleura viseral serta pleura parietal yang meminimalkan gesekan selama proses pernapasan. Di tingkat mikroskopis, dinding alveolus sangat tipis, terdiri dari sel epitel tipis dan kapiler darah, memungkinkan difusi gas berlangsung efisien.

Jaringan interstisial mengandung kolagen, elastin, dan sel fibroblas yang menjaga bentuk dan elastisitas paru (Morton dan Snider, 2017; Sun *et al.*, 2023).

Bronkus dilapisi oleh epitel silindris bersilia dan memiliki struktur yang lebih besar dibanding bronkiolus yang sudah kehilangan tulang rawan dan kelenjar mukosa. Bronkiolus kemudian bercabang hingga saluran respiratorius yang langsung berhubungan dengan alveolus. Keragaman sel pada paru (epitel, sel Clara/Club, makrofag alveolar) mencerminkan adaptasi fungsional terhadap mekanisme pertahanan dan pertukaran gas (Schmitt *et al.*, 2020; Zhou dan Moore, 2017).

Studi patologi pada model mencit memperlihatkan bahwa preparat H&E paru memberikan gambaran infiltrasi sel peradangan,

penebalan septa alveolar, dan perubahan struktur bronkiolus bila ada kondisi penyakit atau perlakuan eksperimental. Misalnya, pada penelitian, jaringan paru tikus dicermati setelah infeksi dan diwarnai H&E untuk melihat perubahan histologis infiltrasi, edema, serta kerusakan alveolar (Yang *et al.*, 2022).

2. Fungsi Jaringan Paru

Fungsi utama paru-paru adalah sebagai media pertukaran gas: oksigen (O_2) masuk dari udara ke darah, dan karbon dioksida (CO_2) dikeluarkan dari darah ke udara. Difusi gas terjadi melalui membran alveolar-kapiler yang sangat tipis dan luas permukaannya, sehingga proses respirasi efisien. Struktur alveolus memungkinkan area permukaan yang besar dengan volume minimal (Klein, 2019).

Selain fungsi respirasi, paru juga berpartisipasi dalam kapasitas pertahanan tubuh terhadap patogen melalui sistem mukosiliar dan makrofag alveolar. Debu, partikel mikroba, dan zat asing lain dapat disaring sebelum mencapai alveolus bawah. Jaringan paru juga berperan dalam metabolisme lokal, menyaring mikroemboli, dan memproduksi mediator inflamasi (Spier dan Evans, 2021).

Pada model mencit, fungsi paru dapat berubah bila terjadi cedera, infeksi, atau perlakuan eksperimen. Pengukuran fungsi pernapasan (misalnya kapasitas paru, resistensi jalan napas) sering dipadukan dengan studi histologi untuk menemukan korelasi antara perubahan fungsional dan struktur histologis. Dalam studi inflamasi

paru, peradangan jaringan menurunkan efisiensi pertukaran gas dan meningkatkan resistensi pernapasan (Malengier-devlies *et al.*, 2021).

3. Karakteristik Jaringan Paru pada Mencit

Jaringan paru mencit (*Mus musculus*) memiliki keunikan dibanding paru manusia dalam aspek ukuran, densitas alveolar, dan kecepatan metabolisme jaringan. Alveolus mencit umumnya lebih kecil dan jumlahnya lebih banyak per unit volume, sehingga jarak antar alveolus relatif rapat. Hal ini menjadikan irisan jaringan lebih sensitif terhadap ketebalan dan artefak potongan (Klein, 2019).



Gambar 2.4. Bentuk Paru-Paru Mencit

Sumber: (Morton dan Snider, 2017)

Dalam penelitian histologi eksperimental, hewan uji seperti mencit (*Mus musculus*) sering digunakan karena memiliki struktur anatomi dan histologis yang menyerupai manusia serta ukuran organ yang kecil sehingga mudah untuk diproses di laboratorium (Masopust *et al.*, 2019).