

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Mencit

Hewan mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan percobaan yang sering digunakan di laboratorium. Sekitar 40-80% mencit digunakan sebagai hewan percobaan di laboratorium karena siklus hidupnya yang relatif pendek, memiliki jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat yang tinggi, dan sifat anatomis dan fisiologinya terkarakterisasi dengan baik (Tolistiawaty *et al.* 2014). Mencit dapat hidup selama 1-3 tahun, tingginya tingkat kesuburan mencit dapat menghasilkan kurang lebih satu juta keturunan dalam jangka waktu 1 tahun. Produktivitas seksual mencit berlangsung antara 7-8 bulan dengan rata-rata anak yang dilahirkan 6-10 anak (Tolistiawaty *et al.* 2014).

Klasifikasi mencit sebagai berikut:

Kerajaan : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Mammalia
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Subfamili : Murinae
Genus : Mus
Spesies : *Mus musculus* (Hanifah, 2008)

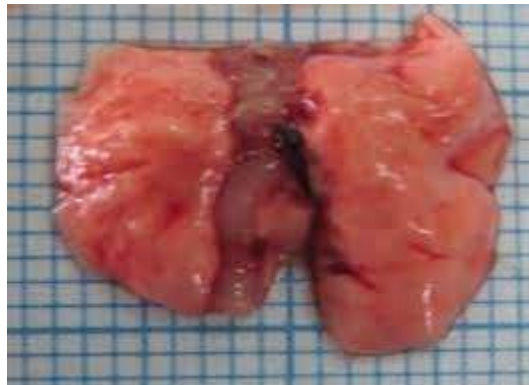
Mencit yang dipelihara di laboratorium masih merupakan satu famili dengan mencit liar. Sedangkan mencit yang sering dipakai untuk penelitian adalah *Mus musculus*. Pada penelitian ini kriteria mencit yang digunakan yaitu mencit dengan jenis kelamin Jantan dewasa, berwarna putih mencit dalam keadaan sehat, aktivitas dan tingkah laku normal dengan usia sekitar 60 hari-90 hari dan memiliki berat sekitar 20-40 gram (Pangestu, Aisyah, & Hardina, 2023)



Sumber : Respati, 2020
Gambar 2. 1 Mencit

2. Paru – Paru Mencit

Paru-paru merupakan organ utama dalam sistem pernapasan. Dalam paru-paru akan terjadi pertukaran oksigen dan karbondioksida. Paru-paru mencit lokasinya berada dalam rongga dada sebelah kanan dan kiri jantung. Paru-paru bagian kanan terdiri atas tiga kelompok alveolus yang merupakan dua lobus paru-paru, bronkus bagian kanan memiliki tiga cabang. Sementara bronkus bagian kiri memiliki dua cabang. Cabang dari bronkus dinamakan bronkiolus (Tamam, 2016)



Sumber : Triana,N, 2013
Gambar 2. 2 Organ Paru-Paru Mencit

3. Teknik Pembuatan Sediaan Histopatologi

Teknik pembuatan sediaan Histopatologi merupakan metode untuk membuat sediaan Histologi dengan menggunakan spesimen tertentu yang dimulai dari rangkaian proses hingga menjadi sediaan yang siap diamati. Sediaan Histopatologi dapat digunakan sebagai bahan ajar dan praktikum mahasiswa untuk mempelajari struktur jaringan, perubahan struktur jaringan, hewan percobaan yang mendapatkan perlakuan, mempelajari pertumbuhan dan

perkembangan jaringan, serta dapat membantu menegakan suatu diagnosis yang diderita suatu pasien (Jusuf, 2009).

a. Pembiusan

Menurut (Balai Veteriner Lampung) 2020 langkah awal yang dilakukan sebelum melakukan pembuatan sediaan, dilakukan pengambilan organ hewan uji coba dimulai dengan euthanasia memberikan efek hilangnya kesadaran pada hewan coba dengan cara membiuskan klorofom. Euthanasia harus dilakukan dengan cara:

- 1) Tidak menimbulkan rasa sakit atau takut pada hewan.
- 2) Tidak menyinggung dan menyakitin hati pemilik
- 3) Tidak menimbulkan perubahan pasca mati
- 4) Dilakukan dengan cara antara lain disklokasi captis pada unggas serta emboli dan bius pada mamalia.

b. Pembedahan, Isolasi, dan Pelabelan Jaringan

Setelah hewan terbius sempurna proses selanjutnya adalah melakukan oprasi dan pengambilan jaringan tubuh yang diinginkan. Jaringan dipotong potong menjadi ukuran yang lebih kecil kemudian dimasukan kedalam cairan NaCl 0,9% hal ini dilakukan agar cairan fiksasi dapat dengan mudah masuk kedalam jaringan. Kemudian potongan jaringan dimasukan kedalam wadah-wadah kecil yang telah diberi label dan keterangan. Langkah selanjutnya adalah pemprosesan jaringan (Wulandari, 2022).

Pembuatan sediaan Histopatologi dilakukan dengan beberapa proses diantaranya:

c. Fiksasi

Menurut (Alwi) 2016. Fiksasi merupakan usaha untuk mempertahankan komponen-komponen sel atau jaringan agar tidak mudah rusak dan mengalami perubahan. Pada proses fiksasi tidak akan berjalan dengan sempurna, apabila terdapat benda asing baru pada jaringannya disebut dengan artefak. Fiksasi memiliki tujuan jaringan agar tetap utuh. Fiksasi harus dilakukan segera mungkin setelah pengangkatan jaringan atau setelah kematian agar jaringan tidak terjadi autolisis.

Fiksasi merupakan bagian terpenting dari semua Teknik histologi dan sitologi karna akan memberikan warna tetap alami. Untuk mencegah terjadinya denaturasi protein yang berlanjutan.

Prinsip kerja fiksasi adalah mengawetkan bentuk sel dan organel sehingga mendekati bentuk fisiologinya. Cairan fiksasi mengubah komposisi menjadi jaringan kimiawi dan fisik. Secara kimiawi, protein sel diubah fungsional dan struktural dengan membentuk koagulasi dan senyawa adiktif baru. Senyawa terbentuk dari ikatan silang dua makromolekul yang berbeda yaitu cairan fiksasi dan protein sel. Hal ini menyebabkan sel menjadi resisten terhadap gerakan air dan cairan-cairan lainnya. Sehingga struktur menjadi stabil, kebanyakan enzim dalam sel menjadi tidak berfungsi, sehingga proses metabolisme sel tidak terjadi dan mencegah terjadinya autolisis. Sel awalnya mengalami hidrofilik kemudian dilarutkan dengan cairan fiksasi dan mengakibatkan pori-pori menjadi besar dan makromolekul dapat memasuki sel yang dapat membantu pada proses parafinasi dan pewarnaan dimana zat-zat tersebut akan masuk kedalam sel dan akan mudah menempel.

Pada fiksasi yang baik harus memenuhi syarat sebagai berikut (Alwi, 2016):

- 1) Fiksasi dilakukan tidak menyulitkan dan biaya yang murah
- 2) Fiksasi harus bisa menghambat pembusukan bakteri dan terjadinya autolisis.
- 3) Fiksasi tidak boleh menyebabkan penyusutan, pembengkakan atau perubahan sel lainnya.
- 4) Fiksasi harus bisa membuat jaringan tahan lama.
- 5) Fiksasi memberikan perbedaan gambaran mikroskopik yang bagus.

Faktor-faktor yang mempengaruhi fiksasi antara lain (Alwi, 2016):

- 1) Ph

Ph untuk melakukan fiksasi adalah 6-8. Jika Ph tidak masuk dalam nilai tersebut maka dapat menyebabkan perubahan struktur pada jaringan, menjadi rusak akibat prestipasi sel. Perubahan ph juga

menyebabkan jumlah ion meningkat atau menurun laju reaksi sehingga memberikan efek pada pengamatan.

2) Suhu

Fiksasi yang akan dilihat menggunakan mikroskop elektron sebaiknya menggunakan suhu simpan 0-4°C. Fiksasi dibidang bakteriologi yang menggunakan panas untuk fiksasi biasanya formalin yang dipanaskan dengan suhu 60°C.

3) Perubahan Volume

Dalam proses fiksasi, volume jaringan mengalami perubahan. Yang disebabkan respirasi intraseluler, perubahan permeabilitas, dan perubahan transport ion. Fiksasi menggunakan formalin yang berkepanjangan menyebabkan sel menyusut. Sehingga volume sel harus dijaga dalam batas normal agar Ketika pengamatan terlihat seperti sel yang hidup.

4) Osmolaritas

Osmolaritas memiliki peranan yang sangat penting yaitu untuk mempertahankan bentuk sel. Osmolaritas memiliki nilai normal yang isotonik sebesar 340-400 mOms. Jika osmolaritas meningkat maka sel akan mengalami penyusutan.

5) Subtansi Yang Ditambahkan Pada Larutan

Fiksasi biasanya memiliki beberapa zat fiksasi, buffer, dan air. Dalam studi biokimia, menambahkan garam dapat menyebabkan denaturasi pada sel, sedangkan, garam seperti ammonium sulfat dan potassium dihidrogen pospat dapat memberikan efek stabilitas protein yang kuat. Asam tanik juga dapat meningkatkan lemak dan protein.

6) Penggunaan deterjen dalam fiksasi

Deterjen dapat mempermudah masuknya molekul besar tanpa merusak membrane sel saat melihat di mikroskop elektron. Penambahan deterjen hanya bisa dilakukan pada molekul yang memiliki berat >150.000 Daltons.

7) Konsentrasi

Konsentrasi memiliki efek yang positif dengan cara mempercepat proses fiksasi melalui banyaknya molekul yang terbentuk.

8) Durasi atau waktu

Pada umumnya fiksasi dilakukan dengan durasi selama 12-24 jam pada suhu kamar dengan kisaran 25-30°C. Waktu fiksasi tergantung pada jenis fiksasi yang dilakukan, untuk fiksasi dengan larutan formalin membutuhkan waktu sekitar 24 jam baru bisa dilakukan tahap selanjutnya, dan kemungkinan sebgaiian besar formalin tersebut akan luruh, akan tetapi formaldehida bereaksi sangat cepat dengan komponen jaringan bersifat *reversible*.

d. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan proses pengeluaran air dan larutan fiksasi dari komponen jaringan. Specimen jaringan akan diproses melalui serangkaian larutan yang mengandung alkohol dengan konsentrasi yang terus meningkat. Larutan yang biasa digunakan untuk dehidrasi diantaranya etanol, aseton etanol, isopropyl, glikol dan alkohol yang terdenaturasi (Suvana, Layton, Bancroft, 2013).

e. Penjernihan (*clearing*)

Penjernihan atau *clearing* adalah proses mengeluarkan agen dehidrasi dan digantikan dengan larutan yang dapat berikatan dengan media infiltrasi. Xylol merupakan larutan yang umum digunakan dilaboratorium untuk *clearing* pada pembuatan sediaan histologi (Faridah, dkk, 2019).

f. Infiltrasi

Infiltrasi adalah suatu proses memasukkan filtrat ke dalam jaringan, sehingga jaringan tersebut dapat mengeras akibat filtrat tersebut di suhu ruang. Mekanisme memasukan filtrat ini kedalam sel adalah dengan menggantikan cairan pembeningan dengan tingkat kelarutannya. Parafin merupakan cairan yang sering digunakan untuk infiltrasi dan embedding (Kristian, dkk, 2017)

g. Pembenanaman (*embedding*)

Proses embedding (pembenaman) adalah proses mengeluarkan cairan pembening dari jaringan dan digantikan dengan parafin. Proses ini dilakukan menggunakan basemold yang bersifat tahan terhadap panas dan penghantar dingin dan jika beku akan terbentuk blok. Blok tersebut berguna untuk mempermudah mikrotomi (Suvana, Layton, Bancroft, 2013).

h. Pengecoran (*blocking*)

Proses bloking sebagian besar di laboratorium menggunakan pusat penyematan modular yang terdiri dari dispenser lilin parafin, dan area penyimpanan pemanasan untuk cetakan dan kaset jaringan yang di proses. Dengan kata lain bloking adalah proses penanaman jaringan dalam parafin (Wulansari, 2022).

i. Pemotongan (*Sectioning*)

Pada proses ini dilakukan jika parafin sudah mengeras dengan sempurna, pemotongan sudah dapat dilakukan, pemotongan organ menggunakan pisau khusus yang disebut mikrotom yaitu alat untuk mengiris blok parafin dengan ketipisan yang dapat diatur sesuai ukuran yang diinginkan (Alwi, 2016).

Pemotongan kasar atau trimming merupakan proses awal pemotongan blok jaringan yang bertujuan untuk membuang kelebihan parafin yang menutupi jaringan sehingga jaringan akan terbuka dan bisa menghasilkan pita jaringan yang utuh. Ketebalan pemotongan ini cukup tinggi yaitu sekitar 15-30 μm (Kristian, dkk, 2017)

Jaringan dipotong setebal kurang lebih 3-5 μm dari blok parafin. Pemotongan dilakukan dengan mikrotom. Blok parafin didudukan mikrotom, lalu bagian dipotong seperti pita dan diapungkan dalam waterbath untuk meregangkan bagian parafin agar tidak ada lipatan. Setelah itu tempatkan bagian agar menempel pada objek glass (Respati, 2020).

j. Floating

Floting dilakukan setelah pemotongan. Tujuan dilakukannya floting adalah untuk merekatkan pita parafin pada object glass dengan cara memasukan kedalam waterbath dengan suhu 60°C untuk mengurangi

lipatan. Floting dilakukan dengan cara memasukan *object glass* kedalam waterbath setelah itu di gerakkan kearah pita parafin yang akan direkatkan ke *object glass* (Respati, 2020).

k. Pewarnaan (*staining*)

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga jaringan menjadi kontras dan dapat diamati dengan mikroskop. Pewarnaan yang sering digunakan adalah pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) karena pewarnaan ini dapat mewarnai inti dan sitoplasma (Jusuf, 2009).

Pewarnaan Hematoksilin eosin dibagi menjadi dua zat warna, yakni Hematoksilin yang dipakai untuk mewarnai inti sel yang berwarna biru sedangkan Eosin digunakan sebagai pewarna sitoplasma yang berwarna merah (Alwi, 2016).

Hematoksilin memiliki sifat basa sedangkan inti sel memiliki sifat asam, sehingga menimbulkan ikatan lemah sehingga inti sel dapat berwarna. Eosin adalah zat pewarna sitoplasma yang baik karena dapat memberikan corakan pada jaringan (Alwi, 2016).

l. Perekatan (*mounting*)

Mounting merupakan salah satu proses penempelan deck glass pada kaca preparat dengan menggunakan entelen. Penggunaan deck glass bertujuan agar melindungi preparat sampel dari lensa mikroskop saat pengamatan (Rahmawati, dkk, 2021).

m. Pelebelan (*labeling*)

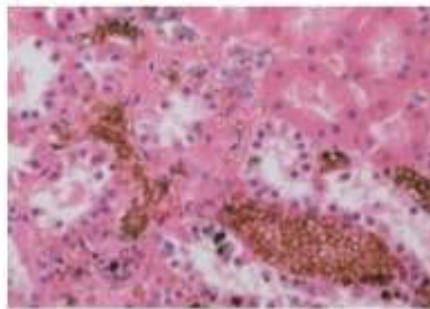
Preparat yang telah diberi deck glass, kemudian dilabeli dengan memberi nama pasien dan nomor rekam medik. Pemberiaan label diberikan agar diagnose pasien tidak tertukar dengan pasien lainnya (Juliati, 2017).

4. Fiksasi Formaldehid

Formaldehid (CH_2O) pada saat diincerkan akan mengalami pemutusan rantai polimer sehingga menurunkan bobot molekul. Formaldehid merupakan satu-satunya aldehid gas. Pada poses fiksasi formalin biasanya dilakukan pengenceran dengan sembilan bagian air atau buffer. Sehingga menghasilkan larutan formalin 10% yang mengandung 4% formaldehid, yang merupakan

sebuah konsentrasi dalam fiksasi. Produsen biasanya menambahkan pada formalin 10% methanol untuk menghambat polimer yang tinggi (Musyarifah & Agus, 2018).

Larutan formalin tanpa buffer lama kelamaan akan terjadi oksidasi menjadi asam formik yang menyebabkan penurunan pH dalam larutan. Asam formik akan bereaksi dengan *homoglobin forming acid dormaldehyde hematin*, yaitu sebuah artefak pigmen granular yang berwarna coklat-kehitaman yang disimpan pada jaringan yang mengandung banyak darah (Musyarifah & Agus, 2018).



Sumber :(Musyarifah & Agus, 2018).
Gambar 2. 3 pigmen formalin

Pigmen pada formalin dapat dihilangkan dengan *saturated aqueous picric acid* sebelum pewarnaan tetapi lebih baik hal tersebut dihindari dari awal proses. Pencegahan hal tersebut dilakukan karena formaldehid paling efektif pada pH netral, pada saat ini penambahan buffer diperlukan untuk menjaga agar pH mendekati netral (6,8-7,2) dan tekanan osmotik hampir sama dengan cairan ekstraseluler atau bias kita kenal dengan *neutral buffer formalin* (Musyarifah & Agus, 2018).

5. Penilaian Sediaan Histopatologi Hematoksilin Eosin

Penilaian sediaan Histopatologi terdapat beberapa cara untuk menilai kualitas sediaan apus histopatologi salah satunya adalah dengan buku panduan penjamin mutu pelayanan patologi Indonesia (BPMPII) dimana didalam buku BPMPII terdapat 16 parameter penilaian tentang kualitas sediaan histologi diantaranya kualitas pewarnaan Hematoksilin Eosin dengan memberikan skor 5 jika kontras warna Hematoksilin dan Eosin cukup jelas. Penilaian sesuai standar akan mendapatkan interpretasi 95-100, pada skor 70-94 mendapatkan

hasil perlu peningkatan, <70 mendapatkan hasil perlu bimbingan (BPMPII, 2020).

Penilaian menurut Sravya, 2018 terdapat 4 parameter dalam penilaian kualitas sediaan Hematoksilin Eosin diantara adalah inti sel, sitoplasma sel, keseragaman pulasan dan kejernihan pewarnaan dimana masing masing kualitas diberi kode 0 untuk hasil kualitas yang tidak memadai atau tidak baik dan kode 1 untuk hasil kualitas memenuhi atau kualitas baik kemudian dimodifikasi.

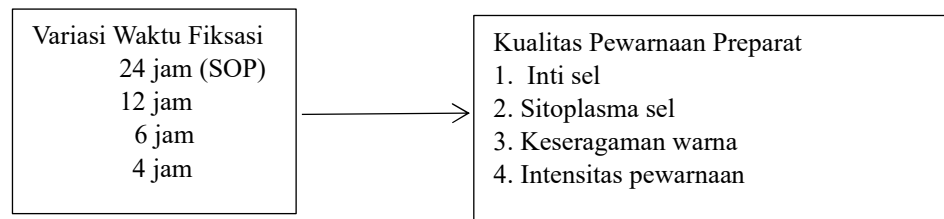
Kualitas pewarnaan sediaan diberi skor 1-2, dengan skor total dikatakan baik apabila mencapai skor 80%, 6-8 yaitu katogori baik dan 4-5 katogori tidak baik. Berikut ini parameter penilaian kualitas pewarnaan.

Tabel 2.1 penilaian kualitas Sediaan

No.	Parameter Penilaian	Skor
1.	Inti Sel	
	Tidak baik	1
2.	Baik	2
	Sitoplasma Sel	
3.	Tidak baik	1
	Baik	2
4.	Keseragaman warna	
	Tidak baik	1
5.	baik	2
	Intensitas pewarnaan	
6.	Tidak baik	1
	baik	2

Sumber: Sravya, 2018 yang telah dimodifikasi

B. Kerangka Konsep



C. Hipotesis

H0 : Tidak ada perbedaan kualitas sediaan apusan histologi pada variasi waktu fiksasi 24 jam sesuai SOP, 12 jam, 6 jam, dan 4 jam dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin.

H1 : Ada perbedaan kualitas sediaan apusan histologi pada variasi waktu fiksasi 24 jam sesuai SOP, 12 jam, 6 jam, dan 4 jam dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin.