

BAB II

TINJAUAN TEORI

A. Tinjauan Teori

1. Histologi Jaringan

Histologi merupakan cabang ilmu bidang biologi anatomi yang mempelajari tentang susunan struktur sel yang memiliki fungsi fisiologis sama tersusun dalam jaringan kompleks. Pada umumnya jaringan tersusun atas 3 komponen yaitu sel, substansi intraseluler dan cairan. Substansi intraseluler adalah hasil produksi dari sel, sedangkan cairan adalah komponen yang menonjol karena 65-70% susunan kimia jaringan tubuh tersusun oleh air (Mescher, 2016).

Histoteknik adalah metode yang digunakan untuk membuat sediaan histologi dari spesimen tertentu melalui beberapa rangkaian proses hingga menjadi preparat yang siap untuk diamati. Spesimen dapat berupa jaringan dari manusia maupun hewan (Khristian dan Inderiati, 2017).

2. Hewan Coba

a. Mencit (*Mus musculus*)



Sumber : Revata, 2019

Gambar 2.1 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit digunakan sebagai model di laboratorium sebanyak 40%, mencit seringkali digunakan dalam penelitian yang berkaitan dengan bidang fisiologi, toksikologi, farmakologi, histopatologi dan patologi. Hal ini karena mencit (*Mus musculus*) termasuk ke dalam jenis animalia yang memiliki banyak keunggulan, diantaranya seperti memiliki struktur anatomi fisiologi yang hampir sama dengan manusia, memiliki siklus hidup yang

termasuk pendek dan proses penanganan yang mudah (Mutiarahmi dkk, 2021).

b. Klasifikasi mencit (*Mus musculus*)

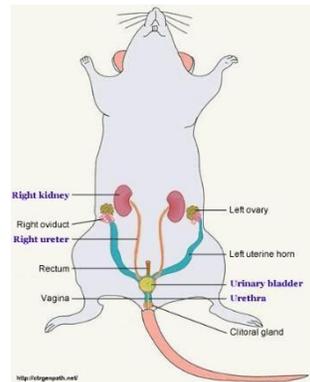
Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Sub filum : Vertebrata
Class : Mamalia
Sub class : Theria
Ordo : Rodentia
Sub ordo : Myomorpha
Famili : Muridae
Sub family : Murinae
Genus : Mus
Species : *Mus musculus* (Nugroho, 2018)

Kriteria mencit yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu mencit dengan usia minimal 30 hari dan maksimal 60 hari, memiliki berat sekitar 20-35 gram, sehat, aktivitas dan tingkah laku normal, berwarna putih (Pangestu dkk, 2023).

c. Ginjal Mencit (*Mus musculus*)

Ginjal adalah organ besar yang berbentuk menyerupai kacang dan terletak pada bagian belakang peritoneum dan berhubungan dengan tubuh bagian belakang. Fungsi utama dari ginjal yaitu sebagai organ ekskresi yang bertugas untuk mengeluarkan urin. Dari segi histologi, setiap ginjal memiliki sekitar 1-1,4 juta unit fungsional yang disebut nefron. Setiap nefron terdiri dari sel epitel tunggal yang sederhana dan panjang. Nefron adalah unit fungsional terkecil dalam struktur ginjal. Komponen-komponen utama dalam nefron yaitu glomerulus, kapsula bowman, tubulus kontraktus proksimal, tubulus kontortus dan ansa henle segmen tebal. Pada medula ginjal terdapat pembuluh darah kecil atau yang dikenal sebagai vasa rekta, duktus kolektivus dan ansa henle segmen tipis (Mescher, 2016). Pada

sediaan ginjal mencit yang diwarnai dengan Hematoxylin Eosin akan terlihat struktur-struktur ginjal seperti tubulus, glomerulus, dan pembuluh darah.



Sumber : Badrut,2016

Gambar 2.2 Letak ginjal mencit

Pada penelitian ini digunakan organ ginjal mencit karena mencit memiliki sistem reproduksi, pernafasan dan peredaran darah yang menyerupai manusia (Mutiarahmi dkk, 2021).

3. Processing Jaringan Histologi

a. Definisi

Menurut Permenkes RI Nomor 411/MENKES/PER/III/2010 menjelaskan bahwa laboratorium patologi anatomi merupakan sebuah laboratorium yang di dalamnya melaksanakan pembuatan preparat histopatologi, pulasan khusus sederhana, pembuatan preparat sitologi, dan pembuatan preparat dengan teknik potong beku. Pelayanan laboratorium patologi anatomi berperan sebagai baku emas dalam penegakan diagnosis yang berbasis perubahan morfologi sel dan jaringan hingga pemeriksaan imunologik serta molekuler khusus yang bersumber dari jaringan maupun sel (Khristian dan Inderiati, 2017).

b. Proses Pembuatan Sediaan Histologi

1. Fiksasi

Fiksasi merupakan proses yang wajib dilakukan baik pada sediaan sitologi maupun histologi. Fiksasi berfungsi untuk menjaga sel dari kerusakan kimia maupun struktural, memadatkan komponen sel, mengeraskan jaringan, meningkatkan intensitas optical, merekatkan sel pada objek glass dan meningkatkan intensitas warna pada saat proses pewarnaan. Hal yang dapat merusak namun juga bisa mempercepat jika terlalu lama waktu fiksasi diantaranya suhu, waktu penetrasi, jenis sel, dimensi spesimen, rasio larutan fiksasi berbanding ukuran spesimen dan tingkat keasaman larutan fiksasi (Khristian dan Inderiati, 2017).

2. Pematangan Jaringan

Merupakan suatu proses pengeluaran larutan fiksatif dan air yang terdapat pada jaringan, kemudian diganti dengan bahan yang dapat menjadikan jaringan keras sehingga dapat dilakukan pemotongan pada jaringan dengan ketebalan yang tipis. Dalam pembuatan preparat histologi, parafin merupakan media yang paling sering digunakan untuk menanam jaringan.

Adapun langkah-langkah pematangan jaringan diantaranya yaitu :

a. Dehidrasi

Merupakan langkah pertama dalam proses pematangan jaringan. Dehidrasi adalah proses pengeluaran seluruh air dan cairan fiksatif dari dalam jaringan. Dehidrasi harus dilakukan secara perlahan karena dehidrasi yang berlebihan membuat jaringan menjadi rapuh, kusut serta keras. Sebelum dilakukan dehidrasi pastikan jaringan sudah difiksasi dengan baik.

b. Pembeningan

Merupakan proses pengeluaran cairan dehidrasi yang kemudian diganti dengan larutan yang dapat berikatan dengan media infiltrasi. Reagen pembening merupakan perantara antara larutan infiltrasi dan dehidrasi. Reagen pembeningan larut pada larutan infiltrasi dan dehidrasi yang kebanyakan berupa hidrokarbon dengan indeks bias yang mirip dengan protein (Khristian dan Inderiati, 2017).

c. Infiltrasi

Infiltrasi adalah proses memasukkan cairan tertentu yang apabila pada suhu ruang dapat mengeras. Tahap masuknya filtrat ke dalam sel yaitu dengan mengganti cairan pembening dengan tingkat kelarutannya. Parafin merupakan bahan yang sering dipakai pada tahap embedding dan infiltrasi (Khristian dan Inderiati, 2017).

3. Penanaman Jaringan

Tahap selanjutnya setelah infiltrasi (pematangan jaringan) adalah penanaman jaringan pada *base mold*. Jaringan pada kaset diambil lalu diletakkan pada *base mold*, lalu parafin cair dituangkan pada jaringan. Mempersiapkan jaringan secara baik sehingga bisa memudahkan pada saat proses pemotongan merupakan tahapan yang penting pada proses penanaman (Khristian dan Inderiati, 2017).

4. Pemotongan Jaringan dengan Mikrotom

Pada pembuatan sediaan histologi hasil pemotongan yang baik dilakukan dengan dua cara pemotongan secara berurutan yaitu potong kasar dan potong halus.

a. Potong Kasar

Potong kasar (*trimming*) adalah tahap pertama dalam pemotongan blok jaringan, untuk membuang sisa-sisa parafin yang menempel di jaringan sehingga permukaan jaringan dapat terbuka dan dapat dihasilkan pita jaringan yang utuh. Pada proses ini mikrotom diatur pada ketebalan yang tinggi yaitu 15-30 μ m. Perhatikan proses pemotongan

karena bisa menyebabkan blok menjadi pecah dan jaringan yang didalamnya rusak (Khristian dan Inderiati, 2017).

b. Potong Halus

Sebelum pemotongan blok jaringan harus didinginkan terlebih dahulu agar suhu pada jaringan dan blok parafin stabil. Ketebalan pemotongan jaringan yaitu 3-4 μ m (Khristian dan Inderiati, 2017).

5. Pembuatan Sediaan (*affixing*)

Affixing merupakan proses penempatan sayatan jaringan pada objek glass, lalu objek glass yang berisi sayatan diletakkan pada *hot plate* hingga air menguap (Sari,dkk. 2016).

6. Pewarnaan (*staining*)

Hematoxylin Eosin (HE) merupakan pewarnaan yang sering dipakai pada sediaan histopatologi. Pewarnaan sediaan sangat penting untuk mewarnai komponen jaringan yang transparan setelah proses pematangan jaringan. Dengan melakukan pewarnaan maka akan terlihat morfologi, struktur jaringan, keberadaan dan prevalansi sel-sel jaringan tertentu. Pada proses pewarnaan merupakan proses yang melibatkan banyak air sedangkan jaringan yang telah matang masih mengandung parafin. Jadi parafin harus dilunturkan sebelum proses pewarnaan. Deparafinisasi merupakan proses pelunturan parafin dari jaringan (Khristian dan Inderiati, 2017). Pada proses pewarnaan Hematoxylin Eosin menggunakan 2 macam zat warna yaitu Hematoxylin dan Eosin.

a. Hematoxylin

Inti sel terikat secara lemah oleh Hematoxylin, kecuali jika ditambah dengan senyawa lain seperti besi, aluminium, krom dan tembaga. Pada pewarnaan histopatologi Hematoxylin alum sering dipakai karena menghasilkan warna yang baik pada nukelus.

Jenis-jenis Hematoxylin :

1. Hematoxylin Erlich

Hematoxylin erlich dibuat secara alami dengan proses pematangan selama 2 bulan, namun waktu dapat lebih cepat jika ditempatkan pada tempat yang hangat. Hematoxylin erlich mampu bertahan selama beberapa bulan. Mukopolisakarida pada tulang rawan dapat terwarnai oleh Hematoxylin, sehingga Hematoxylin erlich baik untuk digunakan pada tulang rawan.

2. Hematoxylin Mayer

Hematoxylin mayer paling sering dipakai karena memberikan hasil pewarnaan yang baik. Hematoxylin mayer matang dengan senyawa kimia yaitu sodium iodat. Hematoxylin ini dapat disimpan dalam waktu yang lama. Eosin 0,5-1% merupakan counterstain dari Hematoxylin ini.

3. Hematoxylin Harris

Hematoxylin harris mampu memberikan warna yang baik pada inti. Eosin 0,5-1% adalah counterstainnya. Namun, Hematoxylin harris matang secara kimiawi oksidasi merkuri yang sangat beracun, merugikan, tidak ramah lingkungan, serta bersifat korosif.

4. Hematoxylin Cole

Hematoxylin cole merupakan jenis pewarna alum atau tawas, hematoxylin cole matang oleh larutan iodium yang mengandung alkohol.

5. Hematoxylin Carazzi

Hematoxylin carazzi merupakan salah satu pewarnaan alum atau tawas, hematoxylin carazzi matang secara kimiawi dengan larutan kalium iodat.

6. Hematoxylin Delafield

Hematoxylin delafield merupakan hematoxylin alum yang dapat matang secara alami dan mempunyai waktu simpan yang lama (Khristian dan Inderiati, 2017).

b. Eosin

Molekul protein yang bermuatan positif pada jaringan ikat dan sitoplasma akan diikat oleh eosin yang bersifat asam. sitoplasma dan jaringan ikat akan diwarnai oleh Eosin dengan nuansa orange dan merah. Inti sel yang sudah diwarnai Hematoxylin juga akan diwarnai Eosin dari biru menjadi warna ungu. Macam-macam Eosin diantaranya adalah Eosin Y yaitu Eosin yang memiliki warna kekuningan yang larut pada air, etil Eosin (Eosin S) dan Eosin B (Eosin kebiruan) larut pada alkohol. Dari ketiga macam tersebut Eosin Y adalah eosin yang paling sering dipakai serta digabungkan dengan Hematoxylin (Khristian dan Inderiati, 2017). Namun, Eosin tetap memiliki kelemahan diantaranya mudah menguap, harganya yang cukup mahal, dan termasuk bahan kimia berbahaya (Wahyuni dan sabban, 2022). Penggunaan eosin bersifat karsinogenik yang memiliki efek negatif apabila digunakan dalam waktu yang lama diantaranya dapat menyebabkan kanker serta sisa limbah dapat merusak lingkungan sehingga diperlukan bahan alternatif untuk mengurangi dampak dari penggunaan eosin (Jumardi dkk, 2023).

c. Tahap-tahap Pewarnaan HE

1. Deparafinisasi, yaitu proses menghilangkan parafin larutan yang digunakan adalah xylol
2. Rehidrasi, yaitu proses untuk menghilangkan xylol dengan menggunakan alkohol bertingkat
3. Pencucian dengan aquadest
4. Hematoxylin untuk mewarnai inti sel
5. Pencucian dengan air mengalir

6. Diferensiasi, yaitu proses untuk menghilangkan warna pada sitoplasma dan mengurangi warna pada inti
7. Blueing, memperjelas warna biru pada inti sel
8. Pencucian dengan air mengalir
9. Sitoplasma yang diwarnai oleh Eosin
10. Dehidrasi dengan menggunakan alkohol untuk mengeluarkan air
11. Clearing, yaitu proses penjernihan dengan xylol

7. Perekatan (*Mounting*)

Perekatan atau mounting merupakan sebuah proses penutupan spesimen dengan menggunakan cover glass dengan ditambahkan media mounting sebagai perekat yang dimana bertujuan untuk melindungi spesimen supaya tidak rusak pada saat penyimpanan sehingga sediaan tersebut dapat dibaca kembali (Ravikumar dkk, 2014).

8. Pelabelan (*Labelling*)

Tahap pelabelan merupakan tahap akhir yang harus diperhatikan, pemberian label harus secara lengkap dan akurat. Pelabelan berisi identitas pasien, tanggal, serta sumber spesimen yang digunakan. Pemberian label menggunakan pensil tebal untuk label slide, jangan menggunakan stiker label (Khristian dan Inderiati, 2017).

4. Buah Strawberry (*Fragaria x ananassa*)

Buah strawberry berwarna merah dengan biji berwarna bintik-bintik putih pada bagian kulit, ketika sudah masak strawberry akan berwarna merah dan berwarna hijau jika masih muda. Buah strawberry mengandung antasianin dan elagitanin. Warna merah pada buah strawberry didapatkan dari antasianin yang juga berfungsi untuk melindungi strawberry dari kerusakan oksigen (Harianingsih, 2010).



Sumber : clean, 2022

Gambar 2.3 buah strawberry

Tanaman strawberry diklasifikasikan sebagai berikut (Inggrid dan Santoso, 2015) :

- Kingdom : *Plantae* (tumbuhan)
 Divisi : *Spermatophyta* (tumbuhan berbiji)
 Subdivisi : *Angiospermae*
 Kelas : *Discotyledonae* (biji berkeping dua)
 Subkelas : *Rosidae*
 Ordo : *Rosales*
 Famili : *Rosaceae*
 Genus : *Fragaria*
 Spesies : *Fragaria x ananassa*

Antosianin merupakan pigmen yang memberi warna merah pada strawberry, kandungan antosianin buah strawberry sebanyak 150-600 mg/kg pada buah segar yang dapat dimanfaatkan sebagai pewarna alami (Inggrid dan Santoso, 2015).

Senyawa fitokimia dalam strawberry adalah golongan fenol, dan komponen yang terbanyak yaitu flavonoid (terutama antosianin dan flavonol), asam fenolat (asam hidroksibenzoat dan asam hidroksisinamat), tannin (*ellagitannin* dan *gallotannin*), dan *proanthocyanidin* sebagai komponen minor (Inggrid dan Santoso, 2015). Sifat strawberry adalah polar, karena strawberry mengandung flavonoid yang dimana kandungan tersebut merupakan senyawa polar yang dapat larut dalam air.

Buah strawberry yang digunakan pada penelitian ini yaitu buah strawberry yang sudah masak, segar, dan berwarna merah.

5. Kriteria Penilaian

Tabel 2.1 Kriteria Penilaian Kualitas Pewarnaan HE

No	Parameter	Deskripsi	Skala nominal
1	Inti Sel	Warna biru pada inti sel tidak jelas	1
		Warna biru terang pada inti sel jelas	2
2	Sitoplasma	Warna merah pada sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas	1
		Warna merah pada sitoplasma dan jaringan ikat jelas	2
3	Intensitas pewarnaan	Intensitas ringan menyerap warna kurang	1
		Intensitas kuat menyerap warna baik	2
4	Keseragaman warna	Keseragaman warna tidak baik	1
		Keseragaman warna baik	2

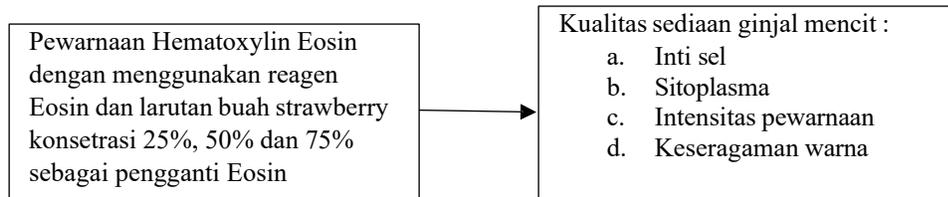
Sumber : Sravya *et al.*, 2018 dari modifikasi BPMPPPI

Tabel 2.2 Skoring Kualitas Pewarnaan HE

No	Deskripsi	Nilai
1	Tidak baik	4-5
2	baik	6-8

Sumber : Sravya *et al.*, 2018 dari modifikasi BPMPPPI

B. Kerangka Konsep



C. Hipotesis

H0 : Tidak ada perbedaan kualitas sediaan histologi jaringan ginjal mencit pada pewarnaan Hematoxylin Eosin dengan menggunakan reagen Eosin dan larutan buah strawberry

H1 : Ada perbedaan kualitas sediaan histologi jaringan ginjal mencit pada pewarnaan Hematoxylin Eosin dengan menggunakan reagen Eosin dan larutan buah strawberry