

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Mencit

Mencit (*Mus musculus*) sering digunakan sebagai subjek uji laboratorium, terutama dalam penelitian biologi, di mana penggunaannya berkisar antara 40% hingga 80% (Suckow et al., 2001). Mencit biasanya digunakan di laboratorium untuk observasi dari pada eksperimen di bidang psikologi. Mereka memiliki banyak keunggulan, seperti siklus hidup yang relatif singkat, variasi sifat yang tinggi, kemudahan penanganan, dan struktur anatomi dan fisiologis yang mirip dengan manusia. Mencit juga sering ditemukan di laboratorium yang berkaitan dengan bidang fisiologi, farmakologi, biokimia, patologi, histopatologi, toksikologi, embriologi, zoologi, komparatif, dan tujuan diagnostik. (Nugroho, 2018).

Kriteria mencit yang akan di gunakan berwarna putih, berjenis kelamin Jantan dewasa dengan usia minimal 2 bulan dan maksimal 3 bulan, mencit dalam keadaan sehat dan memiliki berat sekitar 20-35gram.

Klasifikasi Mencit Menurut (Musser, 2016) adalah sebagai berikut:

1. *Kingdom : Animalia*
2. *Filum : Chordata*
3. *Class : Mamalia*
4. *Ordo : Rodentia*
5. *Famili : Muridae*
6. *Genus : Mus*
7. *Species : Mus musculus Linnaeus*



(Sumber: Medero, 2008)

Gambar 2.1 Mencit (*Mus Musculus*)

a. Hati menciit

Hati atau hepar menciit adalah organ pencernaan terbesar dalam tubuh dengan berat antara 1,2 – 1,8 kg atau lebih kurang 25% berat badan orang dewasa. Hepar merupakan kelenjar terbesar dalam tubuh. Hepar terletak di rongga perut di bawah diafragma dan menempati sebagian besar kuadran kanan atas abdomen. Hepar merupakan pusat metabolisme tubuh dengan fungsi yang sangat kompleks, dimana fungsi hepar dalam sistem sirkulasi adalah untuk menampung, mengubah, menimbun metabolit, menetralisasi dan mengeluarkan substansi toksik yang terbawa oleh aliran darah. Sebagian besar darah yang menuju ke hepar dipasok dari vena porta, dan sebagian kecil dipasok dari arteri hepatica (Amirudin, 2007).



Sumber : (Prasetiawan dkk., 2015)

Gambar 2.2 Hepar menciit

2. Histologi

Histoteknik adalah proses pembuatan sajian histologi dari jaringan tertentu melalui suatu rangkaian proses hingga menjadi sajian yang siap untuk dilihat dan dianalisa. Pemeriksaan histopatologi merupakan pemeriksaan morfologi sel atau jaringan pada sediaan mikroskopik dengan pewarnaan rutin *Hematoksilin Eosin* (HE), *Eosin* yang digunakan sebagai pasangan warna untuk hematoksilin dalam pewarnaan HE. Jaringan diwarnai dengan hematoksilin dan eosin akan menunjukkan sitoplasma memiliki warna merah jambu-jingga dan nukleus berwarna gelap, biru atau ungu (Sari & Hariyanto, 2020).

Untuk membuat persiapan histologis, sembilan prosedur harus diikuti segera setelah jaringan organ yang ditargetkan mulai diisolasi. Jaringan kemudian difiksasi untuk mencegah autolisis terjadi. Dehidrasi mengikuti fiksasi dengan tujuan menghilangkan molekul air untuk agar proses selanjutnya yaitu clearing dapat berlangsung dengan baik. Tujuan clearing adalah untuk membuat jaringan

transparan, sehingga dapat dilihat pada mikroskop. Langkah-langkah penanaman jaringan menjadi parafin cair (*embedding*) dan pemadatan parafin (*blocking*) diselesaikan untuk memotong jaringan dengan ketebalan 4-6 μm . Jaringan yang telah tertanam dalam parafin padat akan membuat pemotongan lebih mudah. Deparafinisasi kemudian dilakukan dengan tujuan menghilangkan molekul parafin, dilanjutkan dengan dehidrasi kembali dan terakhir *staining* atau pewarnaan agar sel sel dapat di bedakan pada mikroskop (Prahanarendra,2015)

3. Proses Pembuatan Preparat Sediaan

a. Pembiusan

Teknik mematikan hewan uji secara manusiawi, mudah mati tanpa merasa sakit dilakukan melalui proses pembiusan. Pembiusan bisa dilakukan menggunakan bahan pembius seperti kloroform secara inhalasi (Nugroho, 2018).

b. Pembedahan dan Pemotongan Organ

Pembedahan dan pemotongan organ adalah dua metode yang dapat digunakan untuk mendapatkan sampel organ hewan uji. Nekropsi atau pembedahan harus dilakukan 6-8 jam setelah kematian untuk meminimalisir kerusakan jaringan atau organ yang akan mengganggu proses identifikasi (Nugroho, 2018).

c. Pelabelan

Pelabelan di berikan keterangan yang jelas, termasuk tanggal pengambilan sampel, jenis organ atau jaringan yang digunakan, dan nama bahan fiksatif. Pelabelan di tulis dengan pensil agar tidak mudah dihilangkan oleh air (Nugroho, 2018).

d. Fiksasi

Tahap pengolahan spesimen jaringan yang dikenal dengan fiksasi melibatkan penambahan 10% Neutral Buffer Formalin (NBF), pengawet yang menjaga jaringan agar tidak membusuk dan mempertahankan jaringan dan struktur sel sehingga menyerupai jaringan hidup (Al-Faaridzi, 2020; Rahmawanti dkk, 2021).

e. Pematangan jaringan

Proses pematangan jaringan yaitu proses mengeluarkan air dan zat fiksatif yang ada di dalam jaringan dan menggantinya dengan media yang dapat mengeras jaringan salah satunya yaitu parafin. Namun air tidak bisa langsung di gantikan oleh parafin (Khristian & Inderiati, 2017). Tahapan perantara dalam proses pematangan jaringan yaitu proses dehidrasi dan penjernihan,

1) Dehidrasi

Proses dehidrasi bertujuan untuk menarik molekul air dari dalam suatu jaringan agar tidak bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Proses ini menggunakan alkohol bertingkat yang bertujuan untuk mengeluarkan air secara bertahap pada organ uji (Dewi, 2020).

2) Penjernihan / *clearing*

Reagen pembeningan bertindak sebagai perantara antara larutan dehidrasi dan infiltrasi. Jika agen dehidrasi telah digantikan semua dengan agen pembeningan, maka jaringan akan memiliki penampilan yang bening dan tembus cahaya. Sebagian besar agen pembeningan adalah cairan yang mudah terbakar, sehingga dalam penggunaannya harus berhati-hati (Khristian & Inderiati, 2017). Cara kerja menggunakan *xylol* yang di pakai sebagai zat pembening, metodenya adalah sebagai berikut:

a) Setelah jaringan dikeluarkan dari cairan dehidrasi (alkohol) jaringan dimasukkan ke dalam *xylol*, I selama 1 jam.

b) Perhatikan jaringan akan menjadi bening, Untuk meyakinkan bahwa seluruh cairan alkohol telah keluar, jaringan kemudian di pindahkan ke cairan *xylol* II. Untuk lama inkubasi di dalam *xylol* itu tergantung pada besarnya jaringan, tetapi biasanya berkisar antara ½ - 1 jam.

3) Infiltrasi

Infiltrasi merupakan suatu proses memasukkan materi/filtrat ke dalam jaringan sehingga jaringan tersebut dapat mengeras akibat filtrat tersebut di suhu ruang. Mekanisme masuknya filtrate ini kedalam sel adalah dengan menggantikan

cairan pembenangan dengan tingkat kelarutannya (Khristian & Inderiati, 2017).

f. **Pembenaman**

Pembenaman adalah proses memasukan parafin kedalam organ atau jaringan untuk menggantikan cairan pembening yang dapat mengkristal sehingga menyebabkan jaringan menjadi mudah robek (Halim, 2018).

g. **Pengeblokan** adalah tahap pengisian parafin cair dan memasukkan organ padat pada basemold agar dapat dipotong menggunakan mikrotom (Halim, 2018).

h. **Pemotongan jaringan**

Pemotongan jaringan adalah proses untuk mengiris blok sediaan dengan ketebalan tertentu. Mikrotom merupakan alat yang digunakan untuk menghasilkan potongan jaringan yang tipis sehingga dapat diamati pada mikroskop. Instrument yang digunakan untuk memperoleh hasil potongan jaringan yang tipis dan dapat teramati secara mikroskopis adalah mikrotom (Khristian & Inderiati, 2017).

1. **Potong kasar (*Trimming*)**

Proses potong kasar merupakan proses awal pemotongan blok jaringan yang bertujuan untuk membuang kelebihan parafin yang menutupi jaringan sehingga jaringan dapat terbuka dan bisa di hasilkan pita jaringan yang utuh. Dikatakan potong kasar karena memiliki ketebalan 15-30 μm (Khristian & Inderiati, 2017).

2. **Potong halus (*sectioning*)**

Proses potong halus bertujuan untuk menghasilkan pita jaringan dengan ketebalan tertentu. Blok jaringan yang akan di potong harus didinginkan terlebih dahulu untuk memberikan suhu yang stabil pada blok parafin dan jaringan, dan ketebalan pita jaringan untuk jaringan hasil pembedahan rutin ialah 3-4 μm (Khristian & Inderiati, 2017).

i. ***Floating***

Tujuan *floating* adalah untuk merekatkan pita paraffin pada kaca objek dengan cara memasukkan kedalam *waterbath* suhu 60 derajat (Juliati, 2017).

j. Pewarnaan sediaan

Pewarnaan HE adalah jenis pewarnaan yang sering digunakan untuk mewarnai inti sel serta sitoplasma. Pewarna ini terdiri dari 2 zat pewarna, yaitu *Hematoxylin* dan *Eosin* (Ravif,2016) .

1) Deparafinisasi

Langkah awal dari proses pewarnaan ini dimulai dengan menghilangkan parafin yang terdapat dalam jaringan dengan merendamnya ke dalam larutan *xylol*. Proses deparafinisasi sempurna dalam 20-30 menit (Sumanto, 2014).

2) Rehidrasi

Pewarna pertama yang digunakan adalah *hematoksilin*. Karena *hematoksilin* larut dalam air, preparat jaringan harus di ubah menjadi bersuasana air . Bahkan dengan aplikasi berulang air, kandungan *xylol* dalam jaringan tidak akan sepenuhnya hilang, sehingga tidak mungkin untuk langsung mengubah *xylol* menjadi bersuasana air. Oleh karena itu , *xylol* dapat dicampur dengan larutan alkohol (Sumanto, 2014).

3) Pewarnaan inti sel (*Hematoxylin*)

Hematoxylin adalah zat pewarna yang diambil dari ekstrak getah pohon *Hematoxylon campechianum*. *Hematoxylin* mempunyai afinitas yang cukup kecil terhadap jaringan, sehingga perlu dikombinasikan dengan bahan lain untuk mempercepat proses pewarnaan inti sel jaringan (Nurnajmina,2020). *Hematoxylin* teroksidasi menjadi hematien dan berikatan dengan ion logam (mordant). Kompleks hematien-mordant bermuatan positif kemudian berikatan dengan fosfat bermuatan negatif dari inti DNA. *Hematoxylin* digunakan sebagai pewarna dasar dengan warna biru keunguan pada struktur jaringan yang terwarnai. Zat yang mengandung asam nukleat akan terwarnai (Khristian & Inderiati, 2017).

4) Pewarnaan sitoplasma (*Eosin*)

Zat pewarna ini adalah pewarna sitoplasma yang sangat baik (Aulina & Iswara, 2019). Eosin merupakan pewarna yang memiliki afinitas terhadap sitoplasma (Alwi, 2016). Eosin bersifat asam sehingga akan mewarnai komponen asidofilik jaringan, salah satunya adalah sitoplasma (menjadi warna merah muda) (Nurnajmina, 2020).

5) Dehidrasi

Proses mengubah suasana jaringan kembali menjadi suasana alkohol disebut dehidrasi. Karena *Eosin* yang digunakan adalah alkohol *Eosin*, yang larut dalam alkohol, prosedur ini diperlukan. Sediaan direndam dalam larutan alkohol yang dikelompokkan dari konsentrasi terendah ke konsentrasi tertinggi 95% untuk mengalami dehidrasi

6) Penjernihan/ *clearing*

Alkohol diekstraksi dari jaringan menggunakan proses yang disebut *clearing* dan diganti dengan larutan yang akan mengikat parafin. Jika beberapa alkohol tersisa setelah proses *clearing*, parafin tidak akan bisa masuk ke dalam jaringan dan tidak akan sempurna dalam pembuatan *blocking*, pemotongan, dan pewarnaan (Sari, 2015).

7) Penutupan Sediaan Preparat (*Mounting*)

Mounting adalah penempelan *coverglass* pada kaca preparat jaringan dengan menggunakan perekat (*entellan*). Proses ini bertujuan agar kaca preparat terlindungi dari lensa mikroskop pada saat pengamatan (Rahmawanti dkk, 2021).

4. *Xylol*

Xylol adalah cairan beraroma minyak bumi, tidak berwarna yang mudah terbakar dan larut dalam lilin parafin dan pelarut organik tertentu. Cocok untuk mengganti alkohol dari jaringan dengan cepat dan sebagai cairan bening dalam blok dengan ketebalan kurang dari 5 μ m. Cairan yang paling sering digunakan di laboratorium histologi adalah *xylol* (Khristian & Inderiati, 2017). Aplikasi yang paling umum untuk reagen *xylol* adalah sebagai agen *clearing* untuk memberikan hasil persiapan histologis yang baik, dan menghasilkan *clearing* yang jelas. *Xylol* digunakan dalam prosedur *deparafinisasi* dan *coverslipping* selain prosedur *clearing* dan dehidrasi. Selain itu, *xylol* memiliki kekurangan, seperti jaringan menjadi kering, mudah rapuh dan beracun. (Khristian, 2018)



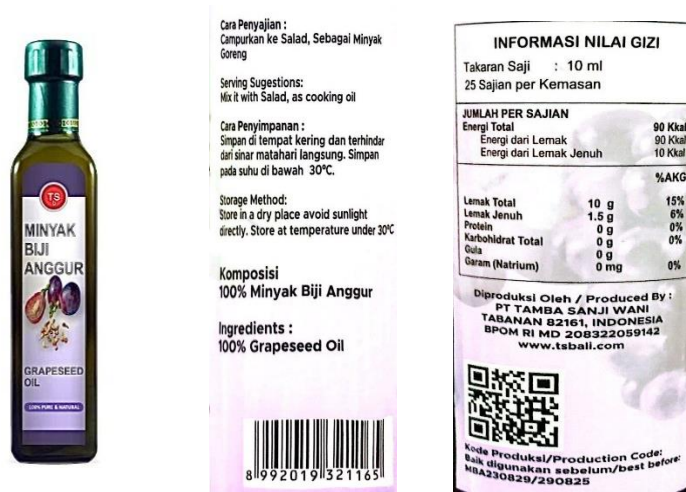
Sumber: (Nerissa, 2009)

Gambar 2.3 Xylol

5. Minyak Biji Anggur (*Grapeseed Oil*)

Minyak biji anggur mengandung minyak dengan kandungan 10-20%. Selain itu, minyak biji anggur juga mengandung asam lemak jenuh seperti asam palmitat dan asam stearat dalam kadar 10-14,4%. Sebagian besar kandungan minyak biji anggur terdiri dari asam lemak tak jenuh, seperti asam oleat, linoleat, EPA, dan DHA (Setyawardhani et al., 2020). Minyak biji anggur memiliki sifat tahan lama dan tidak mudah teroksidasi karena mengandung senyawa antioksidan. Oleh karena itu, minyak biji anggur sering digunakan dalam industri farmasi, kosmetik, kuliner, dan tujuan kesehatan lainnya. Minyak biji anggur termasuk dalam kategori minyak non-edible dan tidak bersaing dengan minyak pangan seperti minyak sawit. Kandungan dalam minyak biji anggur meliputi 75% asam linoleat, 15% asam oleat, 6% asam palmitat, 3% asam stearat, dan 1% asam linolenat (Lubis, 2021; Setyawardhani et al., 2020).

Buah anggur yang digunakan dalam pembuatan minyak biji anggur merupakan jenis anggur hijau (*Vitis vinifera*) yang umumnya diperoleh dengan menggunakan metode *cold-pressed* untuk mengekstrak biji anggur. Metode *cold-pressed* ini dinilai sederhana karena tidak melibatkan zat kimia ataupun proses pemanasan, tetapi memasukkan biji ke alat pengepres, lalu ditekan hingga menghasilkan minyak dan ampas yang tidak tercampur. Pelarut yang dapat digunakan yaitu air atau alkohol rantai pendek seperti etanol dan methanol pada produksi konsentrat asam lemak tak jenuh dengan metode fraksinasi kompleksasi urea, (Setyawardhani et al., 2020). Minyak biji anggur merupakan bagian dari senyawa hidrokarbon yang memiliki sifat nonpolar sehingga bisa menarik alkohol dan bisa memasukkan parafin dalam jaringan sehingga menjadi keras.



Gambar 2.4 minyak biji anggur

6. Penilaian Kualitas Sediaan Mikroskopis

Tabel 2.1 Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan Mikroskopis Pewarnaan *Hematoxylin Eosin*

No.	Kategori	Deskripsi	Ordinal	Skor
1.	Inti sel	Tidak tampak jelas warna biru keunguan pada inti sel	Tidak baik	1
		Tampak jelas warna biru keunguan pada inti sel	Baik	2
2.	Sitoplasma	Tidak tampak jelas warna merah muda pada sitoplasma dan jaringan ikat	Tidak baik	1
		Tampak jelas warna merah muda pada sitoplasma dan jaringan ikat	Baik	2
3.	Intensitas warna	Preparat dengan hasil warna yang redup atau tidak pekat	Tidak baik	1
		Preparat dengan hasil warna yang cerah atau pekat	Baik	2
4.	Keseragaman warna	Pewarnaan preparat tidak seragam dan sediaan tidak bisa didiagnosis	Tidak baik	1
		Pewarnaan preparat seragam	Baik	2

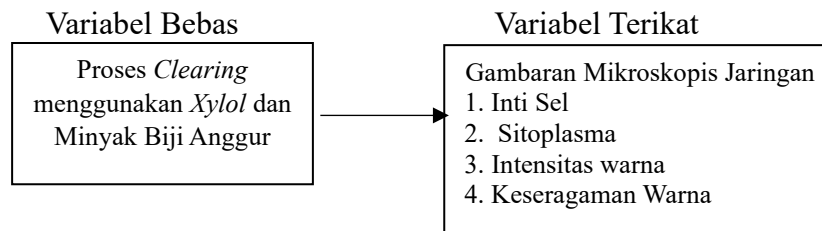
Sumber : (Sravya dkk, 2018) dengan modifikasi BPMPPPI

Tabel 2.2 Skoring Kualitas Sediaan Mikroskopis Pewarnaan *Hematoxylin Eosin*

No.	Deskripsi	Nilai
1.	Tidak Baik	4-5
2.	Baik	6-8

Sumber : (Sravya dkk, 2018) dengan modifikasi BPMPPPI

B. Kerangka konsep



C. Hipotesis

H0: Tidak Ada perbedaan kualitas sediaan histologi jaringan hati mencit (*Mus Musculus*) menggunakan *Xylol* dan Minyak Biji Anggur Pada Proses Pematangan Jaringan

H1: Ada perbedaan kualitas sediaan histologi jaringan hati mencit (*Mus Musculus*) menggunakan *Xylol* dan Minyak Biji Anggur Pada Proses Pematangan Jaringan.