

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Histologi

Histologi adalah cabang anatomi yang mempelajari jaringan hewan dan manusia. Histologi identik dengan anatomi mikroskopis dan mencakup struktur campuran jaringan, sel, organ, dan sistem organ. Berbagai teknik telah dikembangkan agar semirip mungkin dengan kondisi saat jaringan masih hidup. Langkah-langkah yang dilakukan antara lain: fiksasi, dehidrasi, pembedahan, impregnasi, blocking/embedding, pemotongan, penempelan dan pewarnaan (Gartner & Hiatt, 2014).

2. Penilaian Kualitas pewarnaan

Penilaian kualitas pewarnaan sangat penting untuk memastikan bahwa spesimen telah terwarnai dengan baik dan memberikan hasil yang akurat saat analisis mikroskopis. Beberapa penilaian kualitas pewarnaan menurut Sravya *et al.*, (2018) meliputi 5 parameter yaitu inti sel, sitoplasma, keseragaman pewarnaan, kejelasan pewarnaan, dan intensitas pewarnaan, yang masing-masing diberikan skor 0 jika tidak baik dan 1 jika baik. Penilaian kualitas pewarnaan lainnya oleh BPMPPPI (2019) yang meliputi kontras warna hematoxylin dan eosin cukup jelas dan sediaan jernih/bersih akibat dehidrasi dehidrasi pasca eosin yang sempurna.

3. Mencit (*Mus musculus*)

Mencit atau tikus putih merupakan salah satu hewan mamalia yang sering digunakan sebagai hewan percobaan. Mencit memiliki beberapa keunggulan yaitu harganya murah, tingkat reproduksi tinggi dengan jangka waktu hidup yang pendek (2-3 tahun), serta memiliki karakter biologis dan struktur gen yang mirip dengan manusia (Putri, 2018). Hal ini membuat mencit sering digunakan sebagai hewan model untuk beberapa penyakit, seperti artritis rematoid, gastritis, diabetes melitus, kerusakan hati dan ginjal yang kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk mengetahui

kerusakan yang terjadi pada organ atau jaringan akibat suatu penyakit (Handajani, 2021).

Adapun klasifikasi mencit menurut Riskana (1999) sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Class : Mamalia
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Genus : Mus
Species : *Mus musculus*



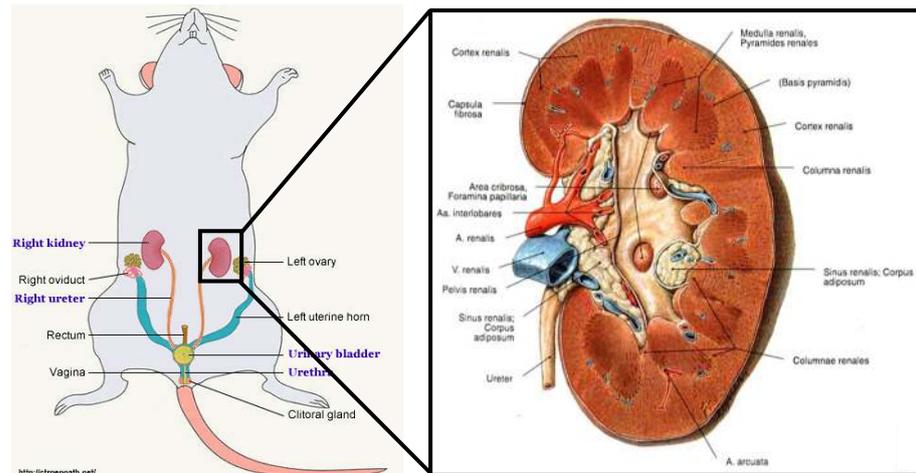
Sumber: Yusuf *et al.*, 2022

Gambar 2.1 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit yang paling sering digunakan untuk penelitian adalah yang berjenis kelamin jantan, karena mencit jantan tidak dipengaruhi oleh hormonal (estrogen), kehamilan dan hal-hal lain yang dapat mempengaruhi hasil, jika dibandingkan menggunakan mencit betina (Yusuf *et al.*, 2022).

a. Ginjal mencit (*Mus musculus*)

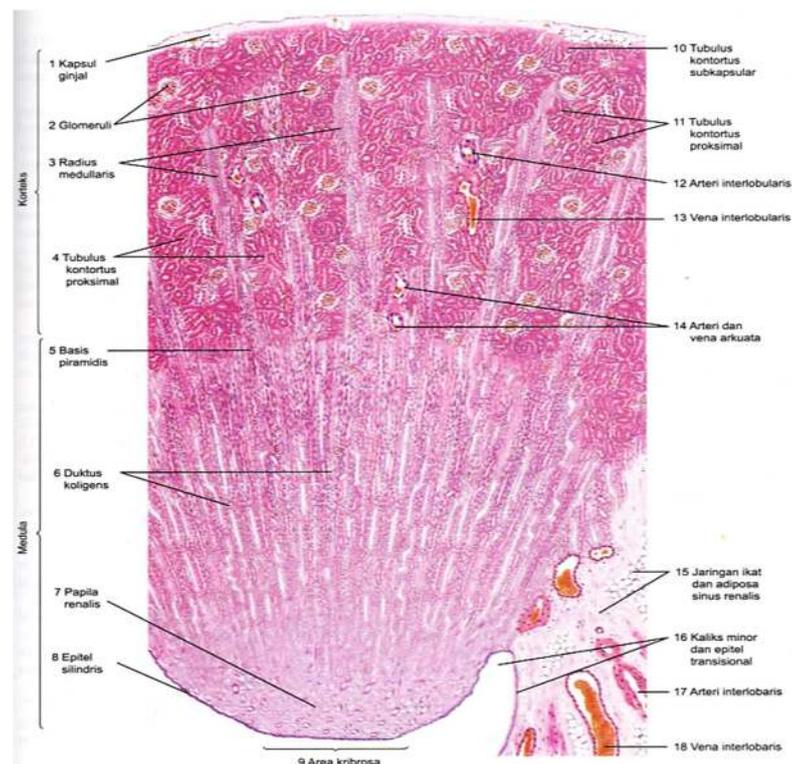
Ginjal merupakan sepasang organ yang sebagian besar berfungsi pada sistem urinalis. Untuk menjalankan fungsinya, ginjal memiliki struktur kompleks yang selalu berkaitan erat dengan pembuluh darah. Struktur makroskopis ginjal secara umum yaitu berbentuk seperti kacang dan mempunyai bagian cekung yang disebut hillus renalis, yang merupakan tempat masuknya pembuluh darah dan tempat keluarnya ureter. Permukaan ginjal dibungkus oleh kapsul tipis yang merupakan sabut kolagen dan sabut elastis, membentuk jaringan ikat padat tidak teratur yang mudah dikelupas dari permukaan ginjal (Hestianah *et al.*, 2014).



Sumber: Generasibiologi, 2016; Putz & Pabst, 2006

Gambar 2.2 Anatomi Ginjal Mencit

Secara mikroskopis, sediaan ginjal dengan perbesaran rendah bisa dibedakan menjadi tiga bagian yaitu bagian korteks, bagian medulla dan saluran keluar urin (Hestianah *et al.*, 2014).

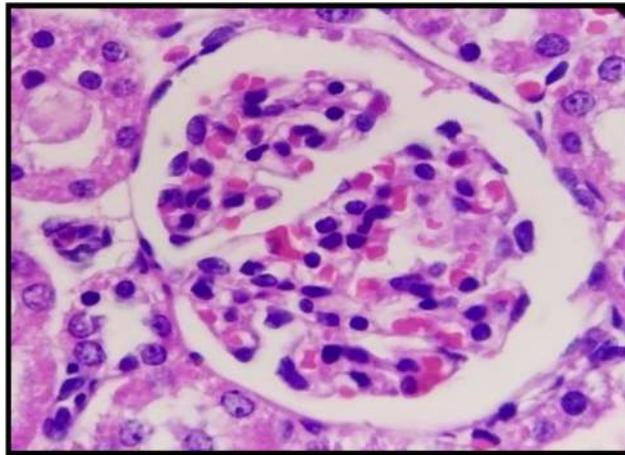


Sumber: Eroschenko, 2008

Gambar 2.3 Korteks dan Medula Ginjal Pulasan HE

Organ ginjal merupakan salah satu organ yang dapat digunakan dalam melakukan kontrol kualitas pewarnaan, karena organ ginjal memiliki keragaman sel yang luas mulai dari sel yang memiliki

kromatin padat (glomerulus) hingga sel yang memiliki kromatin halus (sel kuboidal di tubulus pengumpul) (Khristian & Inderiati 2017).



Sumber : Khristian & Inderiati, 2017

Gambar 2.4 Sediaan ginjal yang diwarnai H&E. Sel dengan kromatin padat terdapat pada glomerulus dan Sel dengan kromatin halus terdapat pada tubulus

4. Ekstraksi (Maserasi)

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana dan paling banyak digunakan. Metode ekstraksi bertujuan untuk menarik semua senyawa metabolit sekunder dalam simplisia. Dasar pemisahan secara ekstraksi yakni perpindahan dari komponen zat padat ke dalam pelarut yang dimulai pada lapisan antar muka dan berdifusi ke dalam pelarut (Ratna Purwandari *et al.*, 2018).

Senyawa golongan flavonoid merupakan senyawa polar dan dapat diekstraksi dengan pelarut yang juga bersifat polar. Beberapa pelarut yang bersifat polar diantaranya etanol, air dan etil asetat. Robinson (1995) dalam Wulaningrum *et al.*, (2013) menyatakan bahwa ekstraksi senyawa golongan flavonoid dianjurkan pada suasana asam karena asam dapat mendenaturasi membran sel tanaman, kemudian melarutkan pigmen antosianin sehingga dapat keluar dari sel serta mencegah oksidasi flavonoid. Sedangkan asam organik yang biasa digunakan untuk ekstraksi antosianin adalah asam sitrat, asam asetat dan asam klorida.

5. Andong Merah (*Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev)

Andong merah (*Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev) merupakan tanaman yang memiliki daun berwarna merah keunguan dan sering dijumpai sebagai tanaman hias Di Indonesia. Tanaman ini sering dikenal dengan nama

Andong, Endong (Jawa), *Hanjuwang Benar, Hanjuwang Berem* (Sunda), *Kayu Urip* (Madura), *Senjuang, Tunjun, Hanjuwang*, dan *Jeluang* (Sumatera), dan *Anderuwang* (Lampung) (Haryoto & Ardiyani, 2021).

Pohon yang dapat memiliki tinggi 5 m, berbatang keras, dengan daun tunggal berwarna merah kecokelatan atau hijau tua dan memiliki daun yang tersebar pada batang, terutama berkumpul di ujung batang dengan letak berjejal dan tersusun spiral membentuk roset batang. Daun Andong merah berukuran panjang 20-60 cm dan lebar 10-15 cm, berbentuk lanset dengan ujung dan pangkalnya runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, dan tangkai daunnya berbentuk talang. Bunga majemuk berbentuk malai, tumbuh diketiak daun dengan tangkai bunga panjang. Bunga berwarna kuning atau kemerahan dan beraroma serta memiliki akar serabut berwarna putih (Napitupulu *et.al.*, 2015).

Berikut klasifikasi tanaman andong merah menurut Adam (2018):

Kingdom : Plantae
Kelas : Liliopsida
Ordo : Liliales
Famili : Agavaceae/Liliaceae
Genus : Cordyline
Spesies : *Cordyline fritocosa* (L.) A. Chev.



Sumber: Haryoto & Ardiyani, 2021

Gambar 2.4 Tanaman Andong Merah

a. Daun Andong Merah

Daun Andong Merah berwarna merah kecokelatan atau hijau tua dan memiliki daun yang tersebar pada batang, terutama berkumpul di ujung batang dengan letak berjejal dan tersusun spiral membentuk roset batang. Daun Andong merah berukuran panjang 20-60 cm dan lebar 10-15 cm, berbentuk lanset dengan ujung dan pangkalnya runcing, tepi rata dengan tulang daun yang menyirip (Napitupulu *et al.*, 2015).

Daun Andong memiliki pigmen warna yang disebut antosianin. Antosianin termasuk senyawa golongan flavonoid yang memberikan pigmen warna merah, ungu dan biru pada tumbuhan, Keberadaan antosianin di alam paling melimpah terutama pada tanaman khususnya pada mahkota bunga, daun, buah, biji-bijian hingga pada umbi-umbian. Antosianin pada media asam akan lebih memaksimalkan kestabilan antosianin dalam bentuk kation flavium merah sehingga menghasilkan warna merah (Utami *et al.*, 2021). Antosianin pada daun andong adalah antosianin jenis sianidin (Utami *et al.*, 2021), sianidin adalah jenis antosianin yang memiliki warna oranye-merah (Priska *et al.*, 2018).

Tabel 2.1 Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Andong Merah

No	Golongan Senyawa Kimia	Hasil Pengamatan	Literatur	Keterangan
1	Alkaloid	Tidak terjadi pemisahan	Endapan Putih	(-)
	(Meyer)	Tidak terjadi pemisahan	Endapan Coklat	(-)
	(Wagner)	Tidak terjadi pemisahan	Endapan jingga	(-)
	(Dragendrof)	Tidak terjadi pemisahan		
2	Flavonoid	Berwarna merah	Merah, jingga dan kuning	(+)
3	Triterpenoid	Berwarna merah	Merah-Ungu (triterpenoid)	(+)
4	Saponin	Terbentuk buih	Terbentuk buih	(+)
5	Tanin	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	(+)

Sumber: Utami *et al.*, (2021)

Tabel 2.2 Uji Pendahuluan Antosianin dari Ekstrak Daun Andong Merah

No	Pengujian	Hasil	
		Hasil Pengamatan	Menurut Harbone (1987)
1	Sampel+HCL 2M dan dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C	Warna tetap merah	Warna tetap merah
2	Sampel ditambahkan larutan NaOH 2M tetes demi tetes	Warna berubah menjadi hijau dan memudar perlahan-lahan	Warna berubah menjadi hijau biru dan memudar perlahan-lahan

Sumber: Utami *et al.*, (2021)

Pigmen antosianin daun andong merah dapat dijadikan sebagai pewarna alami. Penelitian yang dilakukan Nur Endah *et al.*, (2022) menggunakan ekstrak daun Andong Merah (*Cordyline fruticosa (L.) A.Chev.*) dengan pelarut etanol 70% dan asam sitrat 2% sebagai pewarna lipstick menghasilkan warna agak merah pada konsentrasi 15%, merah pada konsentrasi 20% dan merah pekat pada konsentrasi 25%. Penelitian lain yang dilakukan Supriyanto & Linda Triana (2021) menggunakan perasan daun Andong merah dengan pelarut alkohol dapat mewarnai telur cacing nematoda usus.

6. Eosin

Eosin merupakan pewarna asam berwarna merah yang sering digunakan dalam pewarnaan histologis. Eosin yang paling umum digunakan dalam pewarnaan histologis yaitu Eosin Y, yang merupakan turunan tetrabromo dari fluorescein dan memiliki warna agak kekuningan dan dikenal sebagai Eosin Yellowish atau eosin kekuningan. Eosin Y dapat dibagi lagi menjadi eosin Y yang larut dalam air dan eosin Y yang larut dalam etanol. Eosin Y yang larut dalam etanol lebih cepat memberikan noda pada sel jaringan dan memberikan warna merah cerah dibandingkan jenis yang larut dalam air. Eosin dapat digunakan untuk mewarnai sitoplasma, sel darah merah, kolagen, dan serat otot untuk pemeriksaan histologis sehingga paling sering digunakan sebagai pewarna *counterstain* hematoksilin pada pewarnaan Hematoxylin Eosin. Eosin Y biasanya digunakan dalam konsentrasi 0,5–1% (0,5–1 g eosin Y dalam 100 ml air suling atau etanol 75%) (Lai & Lu, 2012).

7. Pembuatan sediaan histologi

Sediaan histologis merupakan metode pemeriksaan yang digunakan untuk pengamatan mikroskopik morfologi dan struktur jaringan. Sumber jaringan untuk pembuatan sediaan histologis dapat berupa hasil biopsi jaringan pasien, hasil pembedahan jenazah, dan hasil nekropsis hewan percobaan. Pembuatan Sediaan histologi diawali dengan fiksasi, selanjutnya melalui proses pematangan jaringan, embedding, mikrotomi, floating dan pewarnaan (Sumiwi *et al.*, 2023).

a. Fiksasi

Fiksasi merupakan tahap awal yang sangat penting dalam pembuatan sediaan histologi. Fiksasi bertujuan untuk mencegah kerusakan jaringan akibat *autolisis* dan pembusukan oleh bakteri (Sumiwi *et al.*, 2023), serta menstabilkan jaringan untuk mempertahankan struktur seluler. Fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan yang sudah dipotong ketebalan 2-4 mm kedalam larutan fiksatif, volume fiksatif harus minimal 10 kali volume spesimen jaringan untuk mencapai hasil yang optimal dan cepat. Fiksasi yang umum digunakan yaitu fiksasi kimiawi menggunakan Neutral Buffer Formalin konsentrasi 10%, penggunaan NBF 10% dapat menghindari pembentukan pigmen formalin dan mengurangi penyusutan pada jaringan dibandingkan menggunakan formalin murni (Bancroft, 2019). Fiksasi yang tidak tepat biasanya disebabkan oleh keterlambatan fiksasi, jumlah fiksatif tidak memadai, fiksatif tidak sesuai (pH atau penyimpanan terlalu lama), penetrasi fiksatif yang buruk karena ukuran jaringan yang terlalu besar, dan durasi fiksasi yang tidak sesuai (Lai & Lu, 2012).

b. Processing jaringan

1) Dehidrasi

Dehidrasi merupakan proses perendaman jaringan menggunakan alkohol bertingkat untuk menggantikan sisa fiksatif serta air bebas pada jaringan dan menjaga air terikat tetap ditempatnya. Dehidrasi yang dilakukan hanya dengan alkohol

konsentrasi tinggi saja maka akan menyebabkan penyusutan yang berlebihan. Dehidrasi yang tidak sempurna ini akan mengganggu penetrasi reagen penjernih ke dalam jaringan, sehingga jaringan menjadi lunak dan tidak mudah menerima infiltrasi lilin paraffin yang membuat jaringan menjadi rapuh pada proses mikrotomi (Bancroft, 2019).

2) Penjernihan (*Clearing*)

Clearing dilakukan untuk menghilangkan sisa dehidran maupun air dalam jaringan dan melarutkan lipid yang dapat menghambat penetrasi paraffin (Bancroft, 2019). Agen pembeningan umumnya memiliki titik didih rendah sehingga akan lebih mudah digantikan dengan lelehan paraffin pada proses infiltrasi seperti *xylena*, atau *toulena*. Pembeningan yang terlalu lama dapat menyebabkan jaringan menjadi rapuh akibat penghilangan air yang berlebihan. Jaringan akan memiliki penampilan yang bening dan tembus cahaya jika proses penjernihan berlangsung dengan baik (Khristian & Inderiati, 2017).

3) Infiltrasi

Infiltrasi merupakan proses yang bertujuan untuk menggantikan agen clearing dan mengisi jaringan dengan paraffin untuk menopang jaringan, sehingga bagian tipis dapat dipotong. Infiltrasi yang tidak sesuai dapat menyebabkan lilin tidak dapat mengeras dengan baik dan mengganggu mikrotomi (Bancroft, 2019). Infiltrasi dilakukan dengan membenamkan spesimen jaringan kedalam paraffin yang sudah dilelehkan kemudian diletakkan dalam oven bersuhu 60°C. Lilin paraffin histologi memiliki titik leleh rendah (56-57°C) sehingga suhu tidak mengubah struktur dan karakteristik morfologi utama jaringan (Slaoui *et al.*, 2017).

c. Embedding (*Blocking*)

Embedding adalah proses pembuatan blok jaringan dengan menggunakan media pendukung eksternal berupa paraffin untuk memudahkan mikrotomi. Media embedding harus kompatibel dengan

media infiltrasi untuk mencegah pemisahan bagian jaringan pada saat mikrotomi (Bancroft, 2019). Tahap penting dalam proses ini yaitu meletakkan jaringan dengan hati-hati pada basemold dengan ukuran yang tepat, agar spesimen jaringan tidak bersentuhan dengan tepian basemold untuk memberikan ketahanan dari segala sisi pada jaringan saat proses mikrotomi (Slaoui *et al.*, 2017).

d. Mikrotomi

Mikrotomi merupakan proses memotong blok parafin menggunakan mikrotom dengan pisau khusus sekali pakai untuk mendapatkan irisan jaringan tipis dari blok paraffin (Slaoui *et al.*, 2017). Mikrotomi diawali dengan proses potong kasar (*trimming*) ketebalan 15-30 μm untuk membuang kelebihan paraffin yang menutupi jaringan sehingga permukaan jaringan dapat terbuka dan bisa dihasilkan pita jaringan yang utuh, kemudian dilakukan potong halus (*sectioning*) yang bertujuan untuk menghasilkan pita jaringan dengan ketebalan tertentu umumnya 3-4 μm (Khristian & Inderiati, 2017). Mekanisme proses ini yaitu gerak maju oleh tuas mikrotom menggerakkan blok paraffin hingga bersentuhan dengan pisau pemotong, blok paraffin bergerak secara vertikal dan menghasilkan potongan jaringan tipis menyerupai pita (Bancroft, 2019).

e. Floating

Floating adalah proses mengapungkan pita jaringan dari hasil pemotongan blok diatas penangas air dengan suhu 45°C untuk meregangkan bagian paraffin, kaca slide ditempatkan dibawah bagian jaringan yang diinginkan dan dikeluarkan dari penangas air. Kaca slide berisi jaringan kemudian dibiarkan kering didalam oven laboratorium suhu 37°C atau dibawah titik leleh paraffin (Slaoui *et al.*, 2017).

f. Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Pewarnaan jaringan sangat diperlukan untuk mewarnai komponen jaringan yang transparan selama proses pematangan jaringan. Pewarnaan dapat memperlihatkan struktur dan morfologi jaringan serta keberadaan dan prevalensi sel jaringan tertentu (Khristian & Inderiati,

2017). Hematoxylin Eosin merupakan pewarna yang umum digunakan untuk mengevaluasi inti sel dan sitoplasma pada jaringan. Pewarna ini digolongkan menjadi pewarna asam dan basa. Istilah basofilik diterapkan pada zat jaringan yang bersifat asam seperti asam nukleat dan musin yang mudah diwarnai dengan pewarna basa seperti hematoxylin. Sebaliknya, istilah asidofilik atau eosinofilik diterapkan pada jaringan yang bersifat basa seperti sitoplasma, keratin dan kolagen yang mudah terwarnai dengan pewarna asam seperti eosin Y. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi pewarnaan antara lain kekuatan ion larutan pewarna, konsentrasi pewarna, fiksasi jaringan, dan pH (Lai & Lu, 2012). Prosedur pewarnaan Hematoxylin Eosin meliputi deparafinisasi, rehidrasi, pewarnaan, dehidrasi, penjernihan dan mounting.

1) Deparafinisasi

Deparafinisasi bertujuan untuk menghilangkan lilin paraffin dari jaringan dan sekitarnya dengan pengulangan sebanyak 3 kali untuk menghilangkan lilin paraffin secara menyeluruh (Lai & Lu, 2012).

2) Rehidrasi

Rehidrasi merupakan proses mencelupkan jaringan ke dalam alkohol konsentrasi tinggi ke rendah dan diakhiri dengan aquades. hal ini dilakukan karena pewarnaan umumnya dilakukan dengan pewarna yang larut dalam air, sehingga ini dilakukan untuk mempermudah penetrasi pewarna kedalam jaringan (Sumiwi *et al.*, 2023).

3) Pewarnaan Hematoxylin

Hematoxylin merupakan pewarna alami histologis yang diekstraksi dari inti kayu pohon *Hematoksilon campechianum*. Hematoxylin adalah pewarna basa yang mewarnai jaringan melalui prinsip reaksi asam basa dan harus digabungkan dengan mordan untuk mendapatkan hasil yang baik sebagai pewarna nukleus. Hematoxylin menghasilkan warna biru pada nukleus yang berisi asam nukleat (Sumiwi *et al.*, 2023).

4) Blueing

Blueing merupakan proses memperjelas warna biru pada jaringan dengan mencelupkan slide jaringan yang telah diwarnai hematoxylin kedalam larutan alkali seperti air keran, scott's tap water, ammonium hidroksida dan larutan litium karbonat (Mohandas *et al.*, 2019). Lai & Lu (2012) menyatakan bahwa blueing juga dapat dicapai hanya dengan mencuci sediaan pada air keran yang mengalir 20-30 menit pada suhu kamar.

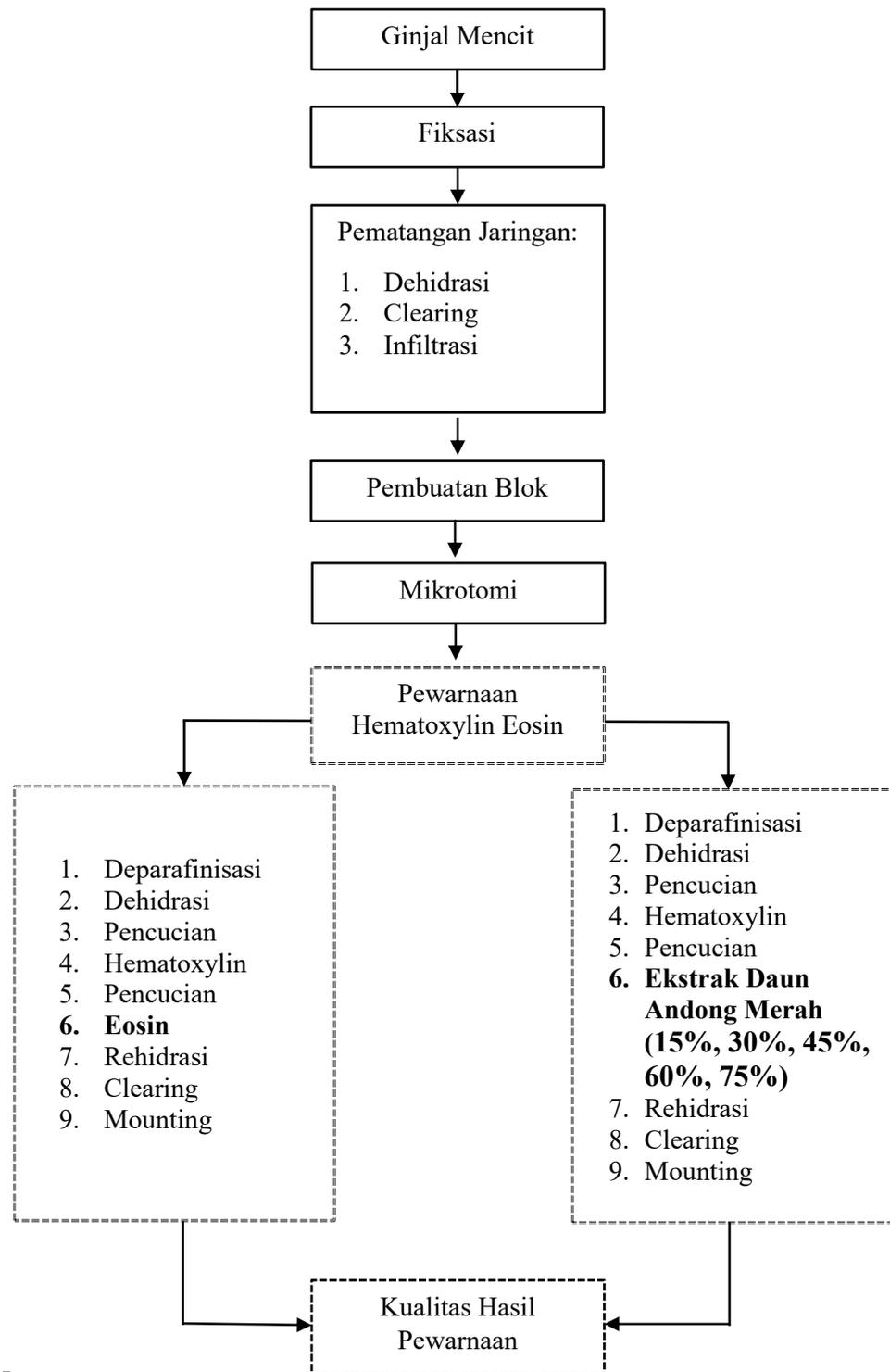
5) Pewarnaan Eosin

Eosin adalah pewarna sintetis merah fluoresen. Eosin yang umum digunakan yaitu eosin Y yang merupakan turunan tetrabromo dari fluorescein dan memiliki warna agak kekuningan. Eosin merupakan pewarna asam yang mewarnai unsur basa seperti sitoplasma, kolagen dan matriks ekstraseluler, eosin juga memiliki kemampuan diferensiasi yang baik yaitu dapat membedakan sitoplasma berbagai jenis sel, serat, dan matriks jaringan ikat berdasarkan perbedaan warna merah hingga merah muda (Bancroft, 2019).

6) Mounting

Mounting merupakan proses penempelan kaca penutup atau deck glass dengan agen mounting diatas sediaan yang telah diwarnai. Proses ini bertujuan untuk melindungi sediaan dan meningkatkan evaluasi optik jaringan serta sebagai pengawet sediaan agar tetap dalam kondisi baik sampai beberapa tahun lamanya. Agen mounting biasanya bersifat tidak larut dalam air, oleh karena itu setelah pewarnaan terakhir (eosin) jaringan harus didehidrasi kembali menggunakan larutan alkohol bertingkat dan xylena/xylol (Slaoui *et al.*, 2017).

B. Kerangka Teori

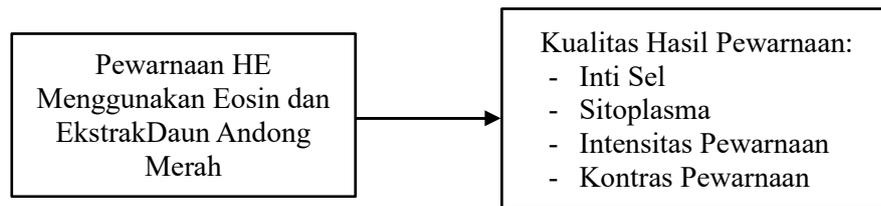


Keterangan :

= Diteliti

= Tidak diteliti

C. Kerangka konsep



D. Hipotesis

H0: Tidak ada perbedaan hasil pewarnaan sediaan histologi ginjal mencit menggunakan ekstrak daun andong merah sebagai pengganti eosin pada pewarnaan Hematoxylin Eosin.

H1: Ada perbedaan hasil pewarnaan sediaan histologi ginjal mencit menggunakan ekstrak daun andong merah sebagai pengganti eosin pada pewarnaan Hematoxylin Eosin.