

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjau Pustaka

1. Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)

Mencit adalah seringkali dipilih sebagai subjek dalam penelitian laboratorium, dengan sekitar 40% penggunaan mereka sebagai model eksperimental. Hal ini dikarenakan beberapa keunggulan yang dimiliki mencit, antara lain siklus hidupnya yang relatif singkat, tingginya jumlah keturunan dalam setiap kelahiran, variasi sifat yang tinggi, kemudahan dalam penanganan, serta kemiripan sifat reproduksi dan produksi dengan hewan mamalia lain seperti sapi, kambing, domba, dan babi. Selain itu, mencit dapat hidup hingga usia 1-3 tahun (Nugroho, 2018).

Mencit umumnya dipilih sebagai subjek penelitian klinis karena kesamaan struktur anatomi dan fisiologinya dengan manusia (Nugroho, 2018).

Taksonomi dari mencit sendiri adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata Sub
Filum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Sub class	: Theria
Ordo	: Rodentia
Sub ordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Sub family	: Murinae
Genus	: <i>Mus</i>
Species	: <i>Mus musculus</i>



Sumber: NCI, 2017

Gambar 2.1. Mencit (*Mus musculus*)

a) Ginjal

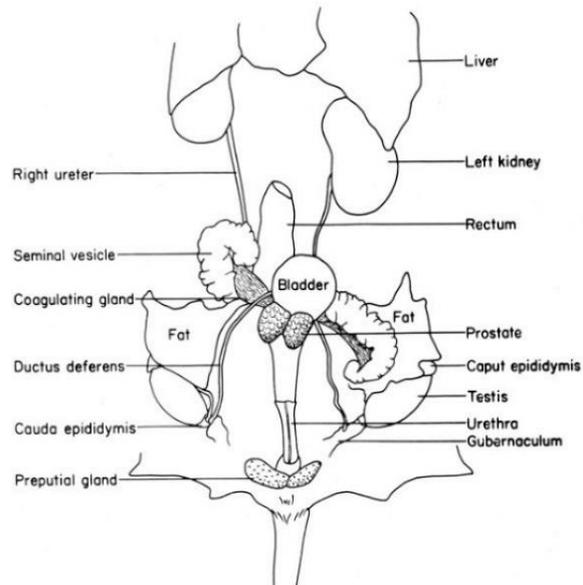
Ginjal merupakan kelenjar tabung yang kompleks, terdiri dari tubulus uriniferus yang terbungkus dalam kapsul jaringan ikat tipis. Jika dilihat pada potongan melintang di bagian tengahnya, ginjal memperlihatkan pembagian menjadi bagian kortikal yang didominasi oleh tubulus yang berkelok-kelok, dan bagian medular yang mengandung tubulus lurus yang tersusun secara radial. Medula berbentuk piramida dengan permukaan yang lebar ke arah luar, dan puncaknya berakhir pada papila yang pipih menyerupai puting tunggal. Kolom-kolom dari tubulus medular lurus menonjol ke dalam korteks di mana mereka membentuk sinar-sinar meduler (Dingle et al., 1941).

Peredaran darah dalam ginjal tikus memiliki kesamaan umum dengan peredaran darah dalam ginjal manusia. (Dingle et al., 1941).

b) Anatomi ginjal mencit

Mencit memiliki ginjal yang sepasang dengan bentuk seperti kacang, yang terletak pada rongga retriperitoneum pada bagian dorsal tubuh yang bersebrangan dengan columna vetrebalis. Kedua ginjal tersebut tidak melekat pada dinding tubuh, namun kedua ginjal tersebut dilapisi oleh lemak. Ukurannya pun berbeda, Ginjal bagian kanan lebih besar, berat dan terletak lebih anterior dibandingkan ginjal

bagian kiri. Perbedaan dalam bentuk dan ukuran ginjal dapat terjadi pada setiap galur, seperti contohnya pada galur C58, di mana sekitar 10-20% dari galur tersebut mengalami kondisi di mana satu atau kedua ginjalnya mengecil atau bahkan hilang (Green, 1966).

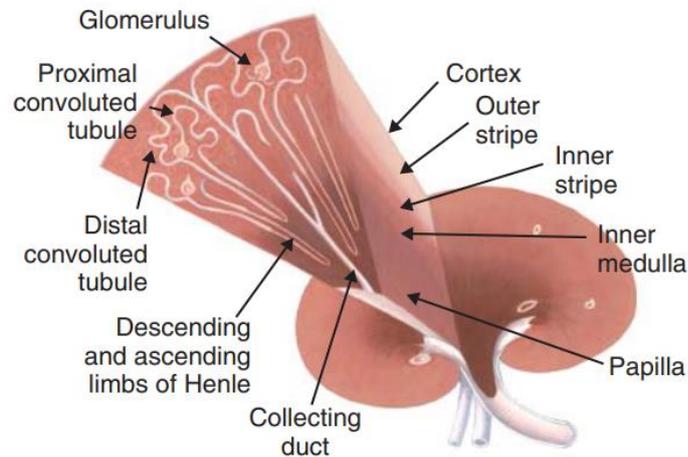


Sumber Cook, 1965
Gambar 2.2 Anatomi Ginjal Mencit

Ginjal pada mencit memiliki orientasi mendatar dorsoventral, dengan permukaan yang cembung menghadap ke arah lateral dan memiliki batas tengah yang cekung. Cekungan ini dikenal sebagai hilus, di mana pembuluh darah dan ureter bergabung. Ginjal terdiri dari dua bagian yang dapat terlihat tanpa bantuan lensa ketika dibelah, yaitu korteks dan medula. Bagian korteks mengikuti tepian yang cembung, sementara medula berbentuk seperti piramida yang lebar dengan bagian bawah yang cembung. Bagian atas piramida disebut papila, dan ujungnya menyerupai corong yang mengarah ke ureter (Green, 1966).

Ginjal tikus dapat terbagi menjadi lima wilayah yang dapat dibedakan berdasarkan struktur jaringan, termasuk korteks, area terluar dari medula luar, area terdalam dari medula luar, medula dalam, dan papila. Nefron, bagian unit fungsional dari ginjal, terdiri dari beberapa komponen seperti glomerulus, tubulus konvolusi

proksimal, lengan menurun dan naik dari Henle, tubulus konvolusi distal, dan sistem saluran pengumpul (Scudamore, 2014).



Sumber: Scudamore, 2014

Gambar 2.3. Histologi ginjal menci

2. Histoteknologi

Histologi adalah ilmu yang mempelajari struktur tubuh dan bagaimana struktur ini membentuk organ-organ. Histologi berasal dari bahasa Yunani, "histo" dapat diterjemahkan sebagai "jaringan" atau "struktur jaringan," karena sebagian besar jaringan terdiri dari filamen dan serat yang saling terhubung, baik dalam bentuk sel maupun non-selular, dengan lapisan membran. Bidang histologi melibatkan seluruh bagian biologi jaringan, dengan fokus pada mekanisme penyusunan dan struktur sel untuk mengoptimalkan fungsi yang khusus bagi setiap organ (Mescher, 2009).

Histoteknik adalah proses membuat sediaan histologi dari spesimen tertentu melalui proses, Fiksasi, Dehidrasi, *Clearing* (Pembeningan), Pembenaman, *Blocking*, *Sectioning* (Pemotongan Jaringan), *Staining* (Pewarnaan), *Mounting* dan *labelling* (pelabelan). Sediaan histologi yang dibuat harus mampu mencerminkan bentuk, ukuran, dan susunan sel yaitu struktur inti sel dan sitoplasma, keberadaan badan inklusi seperti glikogen, tetesan lemak, pigmen, dan sebagainya, susunan serat serta jaringan ikat, dan otot. Sediaan histologi harus menggambarkan jaringan tubuh seperti yang terlihat dalam keadaan hidup (Jusuf, 2009).

3. Pembuatan Sediaan Histologi

a) Fiksasi

Langkah fiksasi adalah faktor paling kritis dalam semua prosedur histopatologi. Tujuannya adalah untuk mempertahankan komponen struktural dan molekuler sebagaimana adanya dalam kondisi hidup. Dalam praktik histopatologi, jaringan direndam dalam formalin (larutan 1:10 formaldehida komersial dalam air, setara dengan konsentrasi 4% dari zat fiksatif (Bussolati, 2022).

Tujuan Fiksasi Jaringan yaitu (Musyarifah & Agus, 2018):

- 1) Menghentikan autolisis jaringan dengan menghambat aktivitas enzim hidrolisis dari lisosom, sehingga memungkinkan peningkatan morfologi seluler yang lebih baik untuk analisis dan menjaga kestabilan struktur di antara sel dengan membuat molekul menjadi tahan terhadap larutan air dan cairan lain.
- 2) Menstabilkan jaringan dan antigen seluler untuk tujuan imunolabeling antigen.
- 3) Meningkatkan persiapan pemotongan sampel histopatologi dengan mengkompres dan mengerasan jaringan.
- 4) Mencegah proses pembusukan, yang merupakan proses kerusakan jaringan yang disebabkan oleh aktivitas bakteri dan seringkali melibatkan pembentukan gas.

b) Dehidrasi

Dehidrasi adalah cara untuk mengeluarkan air dan bahan pengawet dari bagian-bagian jaringan. Bahan dehidrasi yang digunakan bersifat hidrofilik dan sangat baik dalam berinteraksi dengan molekul air dengan membentuk ikatan hidrogen. Penting untuk melakukannya perlahan karena jika kita terlalu cepat, reagen dehidrasi bisa merusak sel dengan meningkatkan arus difusi melalui membran sel. Oleh karena itu, harus menggunakan reagen dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Terlalu banyak dehidrasi bisa membuat jaringan keras, rapuh, dan kusut. Jika dehidrasi tidak sempurna, reagen pembersih tidak dapat meresap ke dalam

jaringan, sehingga sampel akan tetap lembut dan tidak dapat melalui proses infiltrasi. Sebelum melakukan proses ini, pastikan jaringan telah difiksasi dengan baik untuk menghindari kesalahan karena pengawetan dengan alkohol (Khristian, 2017).

c) *Clearing* (Pembeningan)

Pembeningan adalah langkah penting dalam proses pembuatan sediaan histopatologi. Tujuannya adalah untuk menghilangkan cairan dehidrasi dari jaringan yang nanti setelahnya akan diisi oleh Xylol atau cairan-cairan lainnya (Metgud et al., 2013).

d) Pembenanaman

Infiltrasi adalah proses di mana zat atau larutan dimasukkan ke dalam jaringan, yang kemudian jaringan tersebut akan mengeras pada suhu ruangan. Parafin adalah zat yang umum digunakan untuk infiltrasi dan pengawetan jaringan. Parafin yang digunakan hadir dalam berbagai bentuk dengan beragam titik leleh serta bahan tambahan yang digunakan untuk memproduksi potongan jaringan yang berkualitas tinggi. Beberapa ahli merekomendasikan penggunaan parafin dengan titik leleh rendah guna untuk mempercepat proses infiltrasi. Reagen infiltrasi membantu menjaga integritas sel dan struktur sel selama proses pemotongan jaringan (Khristian & Inderiati, 2017).

e) *Blocking*

Blocking adalah penanaman jaringan pada *base mold*. Jaringan yang telah diproses diambil dari kaset dan diletakkan pada *base mold*, kemudian parafin cair dituangkan ke dalamnya. Proses ini memerlukan langkah yang tepat terhadap jaringan untuk memudahkan proses pemotongan selanjutnya. Langkah penting dalam proses ini adalah mengatur posisi atau letak jaringan dengan baik sehingga memudahkan proses pemotongan jaringan. Jaringan dapat diatur posisinya di tepi, ujung, atau permukaan, tergantung pada jenis jaringan yang ditanam (Khristian & Inderiati, 2017).

f) *Sectioning*.

Sectioning adalah langkah pemotongan blok jaringan dengan memanfaatkan alat bernama mikrotom. Mikrotom adalah sebuah peralatan yang digunakan untuk menghasilkan irisan tipis dari jaringan. Saat prosesnya berlangsung, sampel jaringan yang telah ditanam dalam parafin secara manual didorong ke arah pisau dengan ketebalan irisan yang diinginkan. Hasil dari tahap pemotongan ini adalah irisan tipis yang sangat penting karena irisan-irisan tipis ini akan membantu dalam meningkatkan akurasi diagnosis (Pratiwi & Manan, 2015).

g) *Staining* (Pewarnaan)

Pewarnaan merupakan langkah dalam pengolahan preparat mikroskopis yang melibatkan penambahan warna pada jaringan yang telah diiris, sehingga unsur-unsur dalam jaringan tersebut menjadi lebih kontras dan dapat diidentifikasi atau diamati dengan jelas di bawah mikroskop. Proses pemberian warna ini terjadi melalui pembentukan ikatan antara molekul tertentu yang terdapat pada wilayah dan struktur khusus dalam jaringan tersebut (Jusuf, 2009).

Pewarnaan digunakan untuk menyorot karakteristik jaringan yang signifikan dan untuk meningkatkan kontras jaringan. Namun, ada beberapa teknik pewarnaan yang digunakan untuk sel dan komponen spesifik. Pewarnaan digunakan dalam penelitian biologi untuk mengidentifikasi sel, asam nukleat, protein, dan elektroforesis gel untuk memfasilitasi studi mikroskopis. Teknik pewarnaan diferensial, pewarnaan ganda, dan teknik pewarnaan ganda lainnya dapat digunakan dalam keadaan tertentu (Chen, 2022).

Langkah-langkah dalam prosedur pewarnaan hematoxylin eosin pada sampel jaringan termasuk Deparafinisasi, rehidrasi, mewarnai dengan hematoxylin, pewarnaan dengan Eosin, dehidrasi, *clearing*, dan *mounting* (Khristian & Inderiati, 2017).

1) Deparafinisasi.

Proses penghilangan parafin sebelum proses pewarnaan untuk memastikan penyerapan warna yang optimal dalam pewarnaan jaringan disebut deparafinisasi. Bahan kimia yang digunakan seperti Xylol, toluen, benzol, atau kloroform. Bagian jaringan pertama-tama menjalani proses deparafinisasi menggunakan Xylol, lalu dibersihkan dalam serangkaian pengenceran alkohol bertahap untuk menghilangkan parafin serta pelarut organik yang terdapat dalam jaringan (Kalantari et al., 2016).

Proses deparafinisasi merupakan tahap krusial dalam proses pewarnaan jaringan. Sifat utama parafin adalah tidak larut dalam air dan bersifat hidrofobik, sehingga diperlukan pelarut nonpolar untuk melarutkannya. Salah satu pelarut nonpolar yang umum digunakan dalam proses deparafinisasi adalah xylol. Selain dalam proses deparafinisasi, tahap lain dalam pewarnaan yang membutuhkan penggunaan Xylol adalah tahap clearing (Akmalia, 2018).

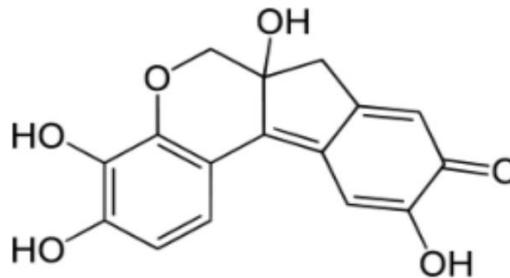
2) Rehidrasi

Rehidrasi merupakan langkah di mana molekul air kembali dimasukkan ke dalam jaringan dengan menggunakan alkohol secara bertingkat dari konsentrasi rendah hingga tinggi sebagai sarana untuk mengirimkan warna ke dalam jaringan (Sastrahidaya, 2014).

3) Pewarnaan dengan Hematoxylin

Hematoxylin berfungsi sebagai zat pewarna yang memberikan warna ungu atau biru tua pada inti sel. (Sumanto, 2014). Hematoxylin, berasal dari kayu hematoxylin campechianum, cenderung melemah dalam ikatan dengan inti sel kecuali diperkaya dengan senyawa lain seperti aluminium, besi, kromium, atau tembaga. Hematin, bentuk oksidasi hematoxylin, dioksidasi dalam proses yang disebut *Ripening*, dipercepat oleh

senyawa oksidator seperti merkuri oksida, hidrogen peroksida, potasium permanganat, dan sodium iodat. Hematin cenderung menarik dan mengikat material kromatis yang bermuatan negatif dalam inti sel, seperti kromatin yang bersifat asam, sehingga hematoxylin terikat pada inti sel (Khristian & Inderiati, 2017).



Sumber: Nuovo, 2020

Gambar 2.4. Struktur hematoxylin

4) Pewarnaan Eosin.

Eosin bersifat asam dan cenderung berikatan dengan molekul protein yang bermuatan positif di sitoplasma dan jaringan ikat. Sebagai pewarna tambahan, eosin berfungsi sebagai *counterstain* (Khristian & Inderiati, 2017). Eosin berperan dalam mewarnai sitoplasma sel dengan warna merah jambu (Sumanto, 2014).

5) Dehidrasi

Dehidrasi merupakan tahap dalam pengolahan sediaan jaringan untuk mengembalikan jaringan ke dalam suasana yang mengandung alkohol. Proses ini penting karena Eosin yang digunakan adalah jenis Eosin alkohol yang larut dalam alkohol. Tahap dehidrasi dilakukan dengan cara merendam sampel jaringan dalam larutan alkohol dengan konsentrasi yang ditingkatkan secara bertahap, dimulai dari konsentrasi terendah hingga mencapai konsentrasi tertinggi (Sumanto, 2014).

6) *Clearing*

Clearing adalah bagian dari proses pengolahan jaringan yang bertujuan untuk mengeluarkan alkohol dan zat pengawet lainnya dari dalam jaringan (Swamy et al., 2015).

7) *Mounting*

Mounting adalah penutupan object glass yang sudah berisi pita jaringan yang telah diwarnai oleh deck glass dengan menggunakan kanada balsam. Preparat yang telah dilakukan clearing atau penjernihan kemudian diberi satu tetes canada balsam (Sari et al., 2016).

8) Pelabelan

Pelabelan berfungsi untuk memberikan informasi jaringan yang berfungsi agar tidak tertukar (Sispita Sari et al., 2019).

4. Penilaian Preparat

Scoring (atau *Grading*) histopatologis merupakan kunci dalam praktik sehari-hari sebagian besar patologis. Penilaian tingkat keparahan penyakit suatu jaringan histologis memungkinkan penilaian kuantitatif dan analisis statistik terhadap efek fenotipe atau pengobatan. Terdapat hampir sebanyak paradigma penilaian seiring dengan model penyakit, namun seringkali diperlukan sistem penilaian yang baru atau dimodifikasi ketika mendekati sebuah model baru atau kejadian toksikologi (Treuting & Boyd, 2019).

Ada beberapa parameter penilaian menurut Sravya (2018), yaitu:

- a) Inti sel
- b) Sitoplasma
- c) Intensitas Pewarnaan
- d) Kontras atau Kejelasan Pewarnaan

5. Xylol

Xylol merupakan cairan tanpa warna yang *flammable* atau mudah terbakar dan memiliki bau seperti minyak bumi. Cairan ini larut dalam sebagian pelarut organik dan lilin parafin. Xylol cocok

untuk digunakan sebagai cairan pembening pada blok jaringan dengan ketebalan kurang dari 5 mm dan memiliki Xylol cepat menggantikan alkohol dalam jaringan. Penggunaan Xylol juga dapat mengerasan jaringan. Secara umum, Xylol adalah zat yang paling umum digunakan dalam laboratorium histologi rutin (Khristian & Inderiati, 2017).

Terdapat tiga fungsi utama Xylol dalam laboratorium histopatologi. Penggunaan pertama Xylol adalah sebagai agen pembersih pada tahapan histoproses. Tujuan dari proses pembersihan adalah untuk menghilangkan agen dehidrasi dari jaringan dan mempersiapkan jaringan tersebut untuk bahan penyematan. Penggunaan kedua adalah sebagai agen penghilang lilin untuk menghapus lilin parafin dari potongan-potongan slide. Penggunaan ketiga adalah untuk menghilangkan alkohol dari slide yang sudah diwarnai sebelum menutupi slide tersebut dengan penutup kaca dan Penggunaan lain yang kurang umum dari Xylol termasuk membersihkan slide mikroskopis dan daur ulang slide yang sudah digunakan (Alwahaibi & Aldughaishi, 2019).

Xylol meskipun sering digunakan di laboratorium, dapat menimbulkan efek toksik terhadap tubuh. Paparan jangka panjang terhadap Xylol memengaruhi sistem saraf pusat dan bisa menyebabkan hilangnya ingatan, kehilangan kesadaran, dan koma. Efek toksik lain yang dilaporkan dari Xylol termasuk cedera jantung dan ginjal, gangguan darah fatal, kemerahan pada kulit, dan infeksi sekunder. Selain itu, Xylol sangat mudah terbakar dan mudah menguap dengan titik didih 137°C–143°C dan titik nyala (25°C) (Alwahaibi & Aldughaishi, 2019).

6. Jeruk Purut

Jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) atau dapat disebut juga *Kaffir Lime*, hidup di daerah tropis dan berasal dari Asia Tenggara. Tumbuhan ini memiliki batang yang keras, kulit batang yang halus dan dengan cabang berduri. Daunnya hijau, aromatic dan memiliki bentuk yang

khas. Buahnya dapat berbentuk Tunggal atau berkelompok. Buahnya berwarna hijau dan jika sudah matang berubah menjadi kekuningan. Jeruk ini sering diggunakan sebagai bahan masakan dan juga sebagai obat obatan tradisional (Pattarachotanant & Tencomnao, 2020). Pohon Jeruk Purut memiliki tinggi 5 sampai 7,5m. Batangnya tegak, bentuknya bulat, bercabang sympodial, berduri dan berwarna hijau (Malinza, 2014).

Taksonomi Jeruk purut adalah (Miftahendarwati, 2014):

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Super Divis	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Sapindales
Famili	: Rutaceae
Genus	: <i>Citrus</i>
Spesies	: <i>Citrus hystrix DC.</i>



Sumber: Blair, 2020

Gambar 2.5. Jeruk purut.

a) Kandungan pada Jeruk Purut

Jeruk purut mengandung berbagai macam kandungan yaitu Asam sitrat, Flavonoids, Polyphenos, Vitamin C, Xantoproteins, anthocyanins, Chlorophylls A dan B phenolic, alkaloid, tannins, glycerolglycolipids, tocopherols dan furanocoumarins (Abirami et

al., 2014; Lubinska-Szczygeł et al., 2023). Kulit Buah Jeruk Sendiri mengandung Zat saponin; Tannin; Steroid; Triterpenoid dan Minyak atsiri yang mengandung asam sitrat, saponin, polifenol, sitronellal, linalool, geraniol, hidroksi sitronellal, linalil asetat, flavonoid, naringin, dan hesperidin (Malinza, 2014). Biji jeruk sendiri mengandung palmitic, stearic, oleic, linoleic, dan *palmitoleic acids* (Rosa et al., 2019).

b) Manfaat Jeruk Purut

Jeruk purut mempunyai banyak manfaat yaitu sebagai antioksidan, antibakteri, antifungal, anticholinesterase, anticancer, cardioprotective dan antidiabetes (Abirami et al., 2014, 2015; Irawaty & Ayucitra, 2018).

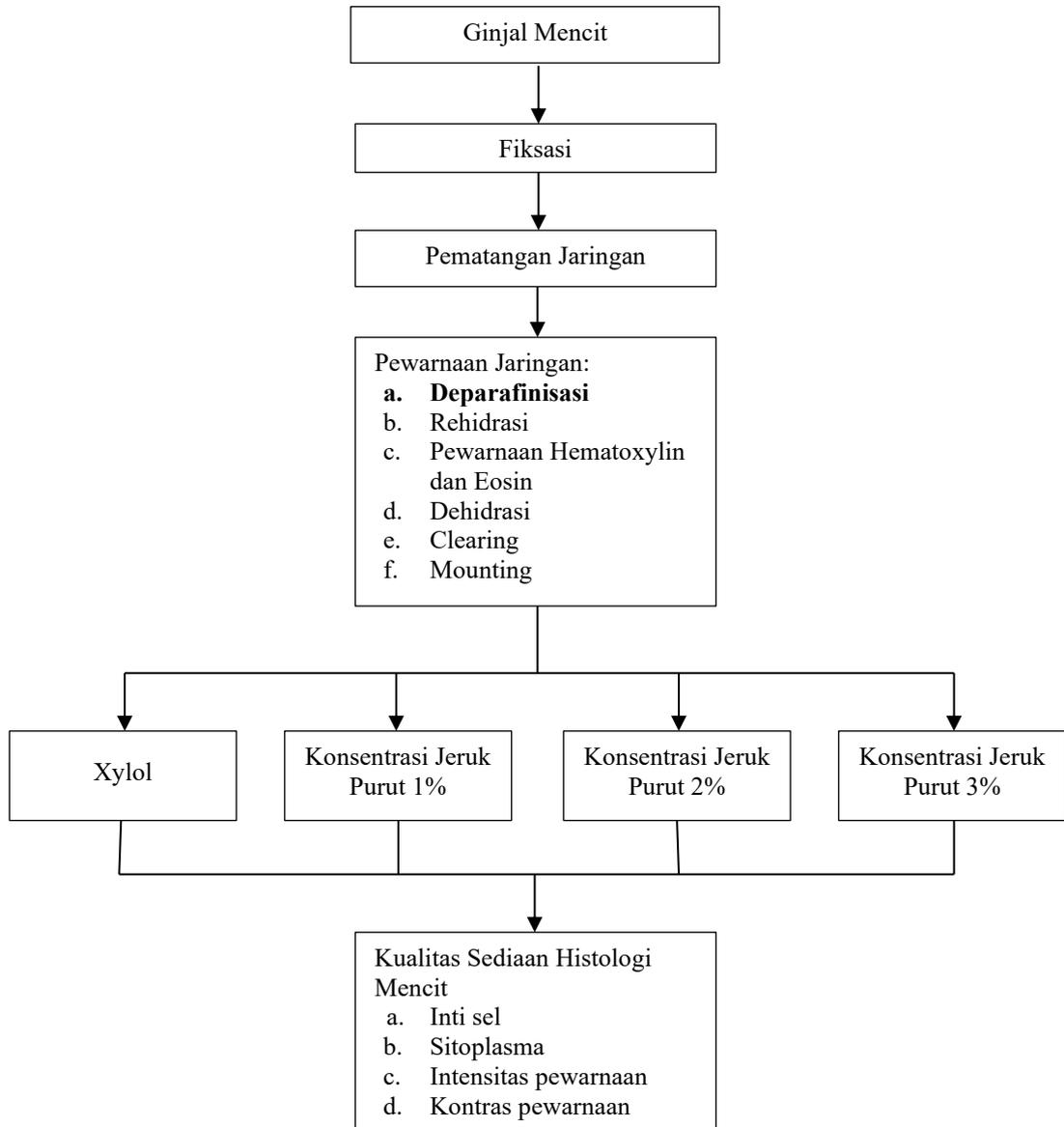
Menurut Susilo (2020) Jeruk purut memiliki beberapa manfaat yaitu:

- a) Untuk mengatasi keseleo, bengkak, atau patah tulang, langkahnya adalah menumbuk daun jeruk purut bersama dengan daun jambu air, lalu mengoleskan ramuan tersebut pada bagian yang sakit.
- b) Untuk mengobati influenza, caranya adalah dengan merebus daun jeruk purut dalam air, kemudian meminum air rebusannya saat hangat. Bisa ditambahkan madu untuk meningkatkan stamina. Konsumsi dua kali sehari.
- c) Jika amandel, bisa menggunakan perasan jeruk purut yang dicampur dengan perasan kunyit dan madu murni, diminum sedikit demi sedikit sebanyak 2 atau 3 sendok makan.
- d) Untuk mengobati sariawan, dapat menggunakan campuran air jeruk purut dengan 25 butir merica yang ditumbuk, kemudian diminum 3 kali sehari selama kurang lebih 1 bulan.
- e) Untuk mengatasi masalah kulit kepala, caranya adalah dengan membelah satu buah jeruk purut yang sudah matang menjadi dua bagian, lalu digosokkan pada kulit kepala.

- f) Dalam tujuan relaksasi, aroma khas dari daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) serta minyak atsiri yang terdapat di dalamnya dapat merilekskan pikiran dan mengurangi stres.
- g) Sebagai sifat antibiotik, dikarenakan sifat farmakologis dari daun jeruk purut yang dapat mencegah masuknya bakteri ke dalam tubuh.
- h) Memiliki sifat anti-inflamasi.

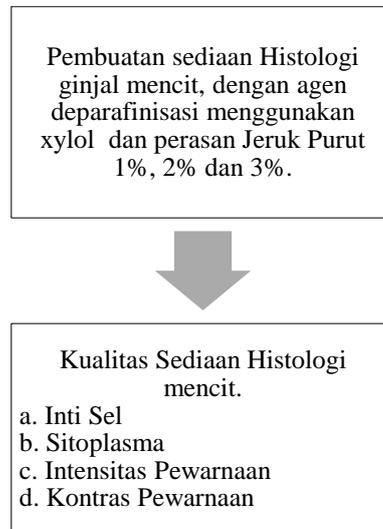
Kandungan asam sitrat yang berada pada jeruk purut juga dapat berfungsi sebagai *Cleaning Solution* dan dapat melunturkan lemak. (Laila Rusdiana et al., 2021)

B. Kerangka Teori



Gambar 2.6. Kerangka Teori

C. Kerangka Konsep



Gambar 2.7. Kerangka Konsep

D. Hipotesis

H0: Tidak Ada perbedaan antara kualitas hasil Pewarnaan Hematoxyline Eosin pada proses deparafinisaasi menggunakan jeruk purut Dengan Xylol.

H1: Ada perbedaan antara kualitas hasil pewarnaan Hematoxyline Eosin pada proses deparafinisaasi menggunakan jeruk purut Dengan Xylol.