

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Pemeriksaan Histopatologi

Histologi adalah cabang ilmu anatomi tentang fungsi fisiologis sel di dalam tubuh manusia, tumbuhan, dan hewan, yang mencakup struktur campuran dari jaringan, sel, dan sistem organ. Histologi dilakukan dengan cara pemotongan jaringan dengan tipis agar mendapat sediaan jaringan yang kemudian diwarnai dan diperiksa di bawah mikroskop (Manan dan Pratiwi, 2015).

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 411/MENKES/PER/III/2010, laboratorium patologi anatomi adalah laboratorium yang mampu melakukan pembuatan sediaan histopatologi, apusan khusus sederhana, sediaan sitologi, dan sediaan dengan teknik potong beku. Pelayanan laboratorium patologi anatomi merupakan gold standard dalam menegakkan diagnosis berdasarkan perubahan morfologi jaringan dan sel (Khristian dan Inderiati, 2017).

2. Hewan Coba

a) Mencit (*Mus musculus*)

Pemanfaatan hewan coba pada penelitian di bidang kesehatan sering dilakukan untuk menguji layak atau tidaknya suatu bahan atau reagen, serta untuk penelitian suatu penyakit. Kriteria hewan dapat dijadikan sebagai hewan coba yaitu apabila hewan tersebut bebas dari mikroorganisme patogen, memiliki reaksi imun yang baik, dan memiliki sistem organ menyerupai manusia. Hewan coba yang banyak dipakai adalah mencit (*Mus musculus*), kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), tikus putih (*Rattus Norvegicus*), dan hamster. Mencit adalah salah satu hewan yang paling banyak dipakai sebagai hewan percobaan laboratorium yaitu sebanyak 40-80% penggunaan mencit. Hal ini disebabkan karena mencit mempunyai siklus hidup yang relatif singkat, variasi sifatnya tinggi, jumlah keturunan per kelahiran banyak, dan memiliki sistem organ yang menyerupai manusia. Mencit mampu hidup di umur 1 hingga 3 tahun, namun ada perbedaan usia khususnya pada kehidupan spesies yang berbeda berdasarkan lingkungannya. Mencit memiliki tingkat kesuburan yang tinggi sehingga

mampu menghasilkan sekitar satu juta keturunan dalam 1 tahun. Mencit jantan sering digunakan dalam penelitian karena tidak terpengaruh oleh faktor hormonal seperti estrogen, kehamilan, dan faktor lain yang dapat memengaruhi hasil, jika dibandingkan dengan mencit betina (Tolistiawaty dkk, 2014).



Sumber: Ad, 2024

Gambar 2. 1 Mencit (*Mus musculus*)

b) Klasifikasi Mencit (*Mus musculus*)

Klasifikasi mencit menurut Nugroho (2018) yaitu:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Sub filum : Vertebrata

Class : Mamalia

Sub class : Theria

Ordo : Rodentia

Sub ordo : Myomorpha

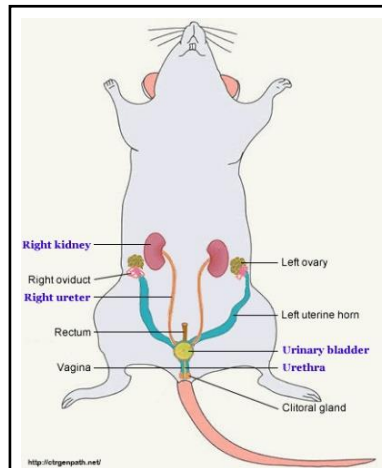
Famili : Muridae

Sub family : Murinae

Genus : Mus

Species : *Mus musculus*

c) Ginjal Mencit (*Mus musculus*)



Sumber: Tamam, 2016

Gambar 2. 2 Letak Ginjal Mencit

Secara umum, ginjal mencit memiliki struktur yang sangat mirip dengan ginjal manusia. Ginjal dalam menjalankan fungsinya, memiliki struktur yang kompleks dan selalu terhubung erat dengan pembuluh darah. Struktur makroskopis ginjal berbentuk seperti kacang dengan bagian cekung yang disebut hillus renalis, yang menjadi tempat pembuluh darah masuk dan keluarnya ureter. Ginjal terdiri dari dua bagian, yaitu korteks dan medulla. Permukaan ginjal dilapisi oleh kapsul tipis yang terdiri dari serat kolagen dan elastis, membentuk jaringan ikat padat yang tidak teratur dan mudah terkelupas dari permukaan ginjal (Hestianah dkk, 2014).

3. Processing Jaringan Histologi

a) Fiksasi

Fiksasi jaringan dapat dilakukan dengan metode fisik ataupun kimia. Metode fisik yaitu seperti pemanasan, pemanasan dengan microwave, dan pengeringan beku. Sebagian besar metode fiksasi yang digunakan untuk pengolahan jaringan dalam diagnosis histopatologi adalah fiksasi kimia dengan fiksatif cair. Konsistensi tampilan mikroskopis jaringan setelah pewarnaan HE adalah persyaratan utama bagi fiksatif yang digunakan dalam patologi (Bancroft *et al.*, 2013).

Tujuan utama dari fiksasi adalah koagulasi atau presipitasi zat-zat sitoplasma (terutama protein, lipid, karbohidrat, dan unsur-unsur anorganik), dan menjaga stabilitas sel serta elemen jaringan untuk langkah-

langkah pemrosesan jaringan berikutnya. Fiksasi jaringan sangat penting untuk penilaian histologi sebagai cara untuk mempertahankan morfologis yang baik dalam jaringan untuk deteksi lebih lanjut. Fiksasi yang tidak sempurna dapat disebabkan oleh faktor faktor seperti keterlambatan dalam fiksasi, pengeringan jaringan, jumlah fiksatif yang tidak memadai (cairan fiksatif), fiksatif yang tidak cocok (termasuk konsentrasi, pH, dan penyimpanan yang terlalu lama), penetrasi fiksatif yang buruk, dan durasi fiksasi yang tidak sesuai (Lai dan Lu, 2012).

Larutan fiksasi memiliki beberapa jenis, yaitu:

1. Formalin

Pada histopatologi, larutan fiksatif yang sering digunakan yaitu larutan 4% formaldehid atau dikenal dengan formalin 10%. pH harus tetap netral saat menggunakan formalin, untuk menetralkan formalin perlu ditambahkan garam, oleh karena itu dinamakan neutral buffered formalin, atau NBF. Ukuran formaldehida dan molekul metilen glikol yang kecil memungkinkan penetrasi yang cepat, sehingga fiksatif ini cocok digunakan untuk spesimen yang berukuran kecil maupun besar (Khristian dan Inderiati, 2017).

2. Larutan Bouin

Larutan Bouin mengandung 10% formaldehid (25% formalin), asam asetat 0,9 M, dan asam pikrat 0,04 M yang dilarutkan dalam air. Larutan Bouin adalah fiksatif umum yang sangat baik untuk pewarnaan jaringan ikat. Penggunaan asam pikrat dapat menyebabkan perubahan warna jaringan menjadi kuning, tetapi warna kuning dapat dihilangkan menggunakan etanol 70%, litium karbonat, atau pewarna asam lainnya, baik secara terpisah maupun selama proses pewarnaan. Larutan Bouin memiliki kisaran pH 1,5–2, dengan kemampuan penetrasi lebih cepat dibandingkan dengan NBF. Tetapi, larutan Bouin dapat merusak membran, yang menyebabkan inti sel yang utuh tidak dapat terlihat jelas dari jaringan dan dapat menyebabkan penyusutan jaringan (Bancroft *et al.*, 2013).

b) Pematangan Jaringan

Langkah-langkah pematangan jaringan yaitu:

1. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan proses menghilangkan air dan larutan fiksatif dari dalam jaringan yang telah difiksasi. Agen yang digunakan untuk dehidrasi harus larut dalam air. Agen dehidrasi yang paling umum digunakan yaitu etanol. Etanol memiliki beberapa keunggulan untuk proses dehidrasi yaitu dapat bercampur dengan air, mampu mengeraskan jaringan, memberikan kapasitas dehidrasi yang kuat, dan mampu menembus jaringan dengan baik. Dehidrasi dilakukan dengan serangkaian larutan etanol dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi (biasanya 70%, 80%, 95%, dan etanol absolut) untuk secara bertahap menggantikan air dalam jaringan agar jaringan tidak keras. Dehidrasi yang baik sangat penting untuk proses pemotongan dan pewarnaan jaringan yang optimal. Dehidrasi yang tidak memadai dapat menghambat penetrasi reagen clearing ke dalam jaringan, sementara dehidrasi berlebih juga menyebabkan jaringan menjadi keras dan rapuh (Lai dan Lu, 2012).

2. Clearing

Reagen clearing bertindak sebagai perantara larutan dehidrasi dan infiltrasi. Sebagian besar reagen clearing adalah hidrokarbon dengan indeks refraktif yang mirip dengan protein. Ketika agen dehidrasi telah sepenuhnya digantikan oleh reagen clearing, jaringan akan tampak bening dan tembus cahaya. Kriteria untuk memilih agen clearing yang cocok yaitu mampu melakukan penetrasi jaringan dengan cepat, mampu menggantikan agen dehidrasi dengan cepat, mudah digantikan dengan parafin cair, tidak mudah terbakar dan tidak bersifat toksik. Jenis larutan clearing contohnya xylol, toluene, kloroform, dll (Bancroft *et al.*, 2013).

3. Infiltrasi

Infiltrasi adalah proses memasukkan bahan atau filtrat ke dalam jaringan, sehingga jaringan mengeras pada suhu ruang karena adanya filtrat. Mekanisme masuknya filtrat ke dalam sel yaitu dengan

menggantikan cairan clearing dengan tingkat kelarutannya. Parafin merupakan filtrat yang paling sering digunakan dalam proses infiltrasi dan penanaman jaringan (Khristian dan Inderiati, 2017).

c) Penanaman Jaringan (Blocking)

Blocking merupakan suatu proses yang bertujuan untuk membentuk blok jaringan dengan memanfaatkan media pendukung eksternal, yang kemudian akan dilanjutkan dengan tahap mikrotomi. Proses ini dilakukan dengan cara membenamkan jaringan ke dalam parafin cair, yang selanjutnya dipadatkan menggunakan alat pendingin atau cryo. Memiliki pemahaman yang mendalam mengenai teknik embedding yang tepat sangat penting agar dapat menghasilkan blok jaringan yang berkualitas dan pada akhirnya menghasilkan sediaan jaringan mikroskopik yang optimal (Bancroft *et al.*, 2013)

d) Mikrotomi

Mikrotomi adalah proses pemotongan jaringan yang kemudian ditempelkan pada objek glass untuk diproses menjadi sediaan yang dapat diamati dengan mikroskop. Mikrotomi biasanya dilakukan pada jaringan yang telah ditanam dalam parafin, menghasilkan blok jaringan yang keras dan padat. Pemotongan ini dilakukan dengan menggunakan alat yang disebut mikrotom, yang menggunakan pisau khusus untuk memotong jaringan secara vertikal, sehingga diperoleh pita jaringan dengan ketebalan yang diinginkan (Khristian dan Inderiati, 2017).

e) Pembuatan Sediaan (Afixing)

Istilah afixing dapat diartikan sebagai proses penempelan jaringan pada kaca objek. Teknik afixing ini dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu menggunakan hotplate atau dengan memanfaatkan air panas dalam waterbath (Sumanto, 2014).

f) Pewarnaan (Staining)

Pewarnaan hematoxylin dan eosin (HE) adalah pewarnaan histologis yang paling banyak digunakan karena didasarkan pada kesederhanaannya yang relatif dan kemampuannya untuk menunjukkan berbagai struktur jaringan yang berbeda dengan jelas. Secara dasar,

komponen hematoxylin mewarnai inti sel menjadi warna biru kehitaman, menunjukkan detail nukleus yang baik, sementara eosin mewarnai sitoplasma sel dan jaringan ikat dengan berbagai nuansa dan intensitas warna merah muda, oranye, dan merah (Bancroft *et al.*, 2013).

Prinsip pewarnaan Hematoxylin Eosin yaitu interaksi antara sifat asam dan basa. Istilah basofilik digunakan pada zat dalam jaringan yang bersifat asam seperti asam nukleat dan musin yang mudah diwarnai dengan pewarna basa seperti hematoxylin. Sebaliknya, istilah asidofilik atau eosinofilik digunakan pada jaringan yang bersifat basa seperti sitoplasma, yang mudah diwarnai dengan pewarna asam seperti eosin. Faktor yang dapat mempengaruhi pewarnaan yaitu seperti konsentrasi pewarna, kekuatan ion larutan pewarna, fiksasi jaringan, dan pH (Lai dan Lu, 2012).

1. Hematoxylin

Hematoksilin merupakan pewarna alami yang paling umum digunakan. Hematoxylin diekstraksi dari kulit batang pohon logwood, *Haematoxylon campechianum*, yang ditemukan di Amerika Tengah. Pewarna ini telah digunakan untuk pewarnaan histologis selama sekitar 150 tahun. Larutan pewarna ini telah digunakan untuk mewarnai inti sel dan struktur mitotik pada berbagai jaringan, musin, serat elastis, dan otot bergaris menjadi berwarna biru kehitaman. Hematoksilin memiliki sedikit afinitas dengan jaringan. Secara umum, untuk meningkatkan afinitasnya, larutan hematoksilin harus mengandung hematein, produk oksidasi, dan mordant logam (Lai dan Lu, 2012).

2. Eosin

Eosin adalah pewarna yang paling cocok untuk dipadukan dengan hematoksilin untuk menunjukkan struktur histologis umum suatu jaringan. Nilai utamanya terletak pada kemampuannya, dengan diferensiasi yang tepat, untuk membedakan antara sitoplasma dengan berbagai jenis sel, dan antara berbagai jenis serat dan matriks jaringan ikat. Eosin mewarnai sitoplasma dan jaringan ikat dalam nuansa merah dan pink (Bancroft *et al.*, 2013).

Kekurangan eosin yaitu mengandung zat kimia sintesis yang sifatnya karsinogenik. Zat karsinogen dalam pewarna sintesis dapat merusak lingkungan dan merusak kesehatan tubuh karena dapat menyebabkan penyakit kanker. Pewarna sistesis perlu diganti dengan pewarna alami untuk dapat mengurangi masalah-masalah tersebut, karena pewarna alami lebih ramah lingkungan (Sa'adiyah, 2015).

g) Mounting

Sediaan yang telah diwarnai dengan baik dapat disimpan untuk waktu yang lama apabila dilakukan penutupan secara permanen. Penutupan permanen berfungsi untuk melindungi sediaan dari kerusakan yang disebabkan oleh jamur atau bakteri, mengingat jaringan yang telah diproses tetap rentan terhadap kerusakan seiring berjalannya waktu jika tidak diawetkan. Proses mounting menggunakan *cover glass* yang umumnya terbuat dari bahan fiberglass tipis. Perekat yang digunakan juga berfungsi sebagai bahan pengawet untuk sediaan tersebut, di mana pilihan yang tersedia antara lain adalah canada balsam atau entelan (Khristian dan Inderiati, 2017).

4. Buah Tomat Ceri (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*)

Tomat ceri adalah jenis tomat yang banyak diminati oleh masyarakat di Indonesia. Tomat ceri adalah sumber mineral, serat, dan vitamin yang penting untuk kesehatan tubuh manusia. Tomat ceri biasa dikonsumsi sebagai buah segar dan sebagai makanan penutup untuk menghilangkan dahaga (Rokhminarsi dkk, 2007). Minat terhadap tomat ceri juga meningkat pesat di kalangan petani kecil dan pekebun khusus di seluruh dunia. Tomat ini memiliki ciri produktivitas lebih tinggi, kualitas lebih unggul, bentuk buah yang lebih kecil dari buah tomat biasa, serta memiliki rasa yang lebih manis daripada buah tomat biasa. Tomat ceri yang berkualitas memiliki ciri-ciri yaitu berwarna kemerahan dan memiliki warna yang tetap (tidak belang-belang), serta memiliki kulit buah yang halus (Abdel-Razzak *et al.*, 2016).

Ekstrak buah tomat ceri sebelumnya telah dilakukan skrining fitokimia menggunakan uji kualitatif meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tannin, dan steroid/triterpenoid oleh Hamida dkk, 2022. Hasil skrining

fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% buah tomat cherry mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan triterpenoid.



Sumber : Putri, 2020

Gambar 2. 3 Buah Tomat Ceri

Klasifikasi buah tomat ceri menurut Cahyono (2008), yaitu:

Kingdom : Plantae
 Divisi : Spermatophyta
 Subdivisi : Angiospermae
 Kelas : Dicotyledonae
 Ordo : Tubiflorae
 Famili : Solanaceae
 Genus : Lycopersicum
 Spesies : *Lycopersicum esculentum var. cerasiforme*

5. Penilaian Kualitas Pewarnaan

Kualitas pewarnaan dinilai dari 4 parameter menurut Sravya (2018), yaitu pewarnaan inti, pewarnaan sitoplasma, intensitas pewarnaan, dan keseragaman warna. Penilaian tersebut masing-masing diberikan skor. Sediaan dinilai baik apabila diperoleh rerata skor 7-8 dan sediaan dinilai tidak baik apabila diperoleh rata-rata skor 4-6. Parameter penilaian kualitas pewarnaan HE dapat dilihat pada tabel 2.1 berikut:

No	Struktur	Deskripsi	Skala Nominal
1	Inti sel	Inti sel tidak jelas	1
		Inti sel jelas	2
2	Sitoplasma	Sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas	1
		Sitoplasma dan jaringan ikat jelas	2
3	Intensitas Pewarnaan	Intensitas ringan menyerap warna dengan lemah atau pudar	1
		Intensitas kuat menyerap warna baik dan jelas	2
4	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik	1
		Kontras pewarnaan baik	2

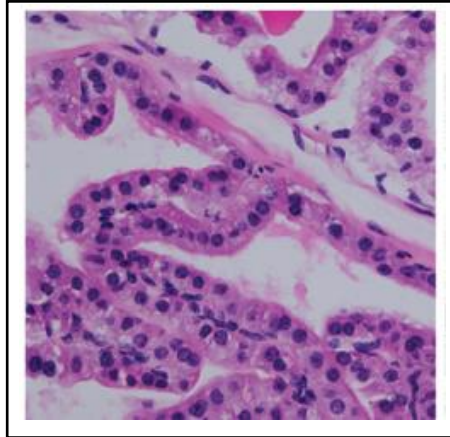
Sumber : (Sravya dkk, 2018) yang dimodifikasi BPMPPi

Tabel 2.2 Skoring Penilaian Kualitas Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No	Deskripsi	Nilai
1	Tidak Baik	4-6
2	Baik	7-8

Sumber : (Sravya dkk, 2018) yang dimodifikasi BPMPPi

Contoh Hasil Pewarnaan Hematoxylin Eosin



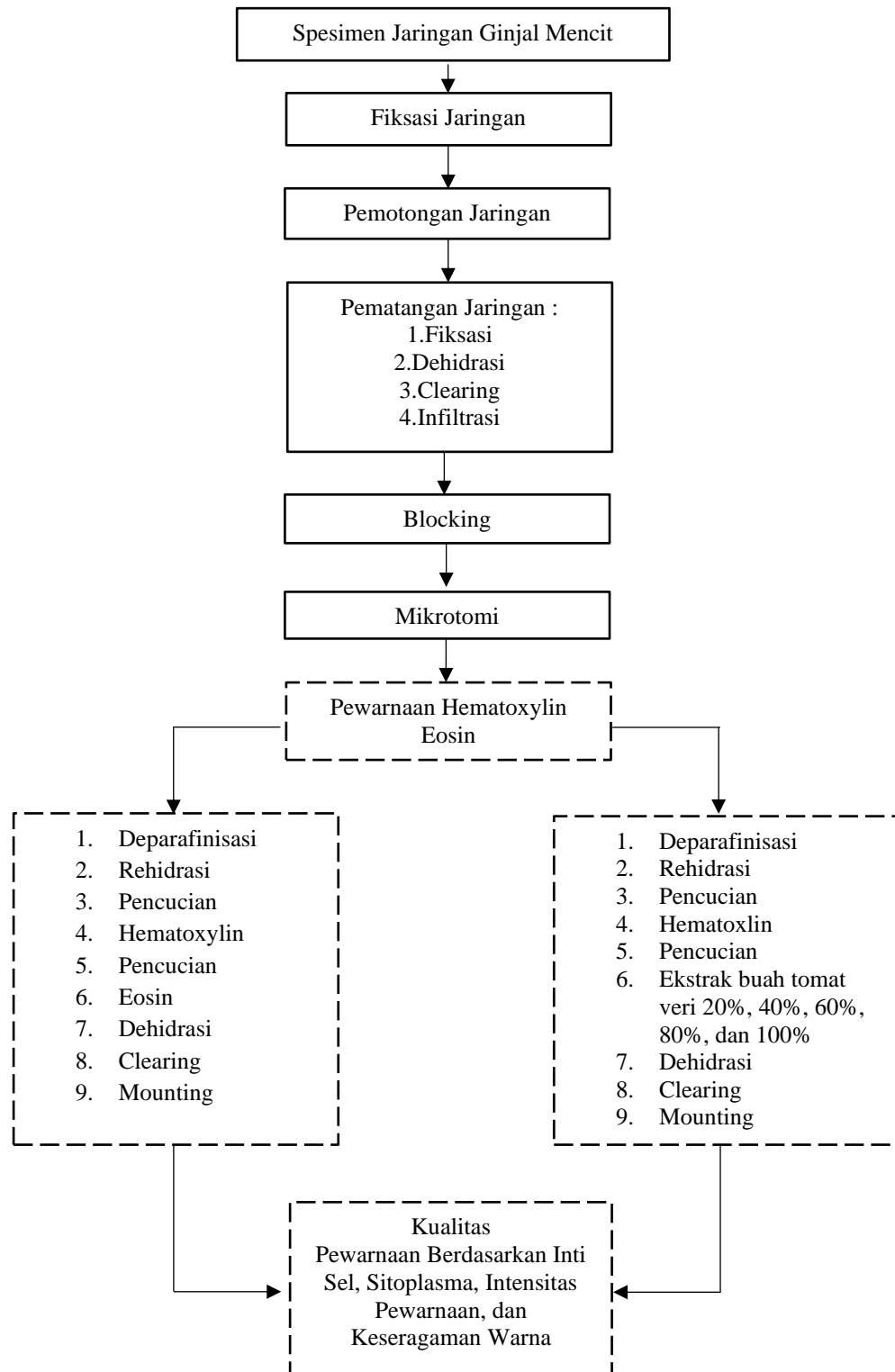
Sumber : Latonen, 2024

Gambar 2. 4 Hasil Pewarnaan Hematoxylin Eosin

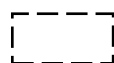
Nukleus atau inti sel berwarna biru kehitaman karena menyerap warna dari hematoxylin, sedangkan sitoplasma berwarna merah muda karena menyerap warna dari eosin.

- Inti sel skor 2 = bentuk jelas, biru keunguan
- Sitoplasma skor 2 = merah muda
- Intensitas warna skor 2 = baik
- Keseragam warna skor 2 = seragam

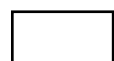
B. Kerangka Teori



Keterangan:

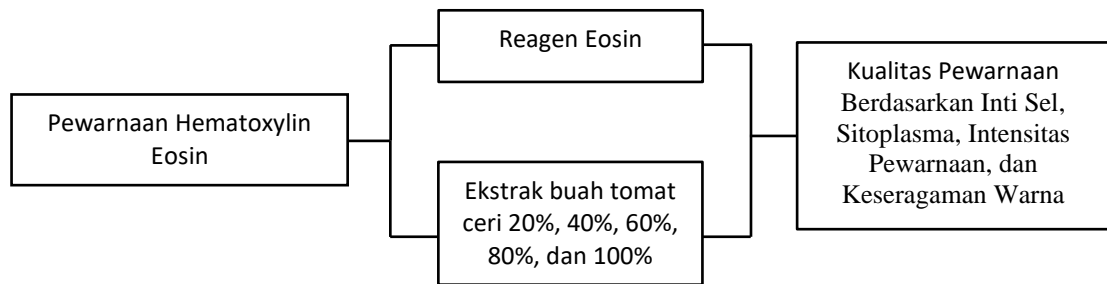


: Diteliti



: Tidak diteliti

C. Kerangka Konsep



D. Hipotesis

H0 : Tidak ada perbedaan kualitas sediaan histologi jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*) pada pewarnaan Hematoxylin Eosin dengan menggunakan reagen Eosin dan ekstrak buah tomat ceri

H1 : Ada perbedaan kualitas sediaan histologi jaringan ginjal mencit (*Mus musculus*) pada pewarnaan Hematoxylin Eosin dengan menggunakan reagen Eosin dan ekstrak buah tomat ceri