

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Mencit

Klasifikasi dari Mencit (*Mus musculus*) menurut Nugroho 2018:

- | | |
|---------------|-----------------------|
| 1) Kingdom | : Animalia |
| 2) Phylum | : Chordata |
| 3) Class | : Mamalia |
| 4) Ordo | : Rodentia |
| 5) Family | : Muridae |
| 6) Sub Family | : Murinae |
| 7) Genus | : Mus |
| 8) Spesies | : <i>Mus musculus</i> |



Sumber: Johanna, 2020

Gambar 2.1 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit adalah kelompok hewan mamalia rodentia (pengerat) yang masuk dalam famili Muridae. Mencit sering ditemukan di dekat pemukiman dengan bentuk seperti tikus kecil. Mencit juga sering dijumpai dengan warna hitam-keabuan sementara untuk hewan uji, warna tikus ini diseleksi yang albino (putih). Hewan mencit sebagai hewan percobaan sering digunakan dalam penelitian biologi, biomedis dan reproduksi (Yusuf *et al.*, 2022).

Mencit yang dapat dijadikan subjek penelitian adalah mencit jantan karena aktif dalam beraktivitas, berusia 1-3 bulan dan memiliki berat

badan antara 20-30 gram. Mencit dikatakan sehat apabila memiliki ciri-ciri, seperti warna bulu putih bersih dan tidak berdiri, mata jernih bersinar, serta berat badan bertambah atau tidak berkurang (Yusuf *et al.*, 2022).

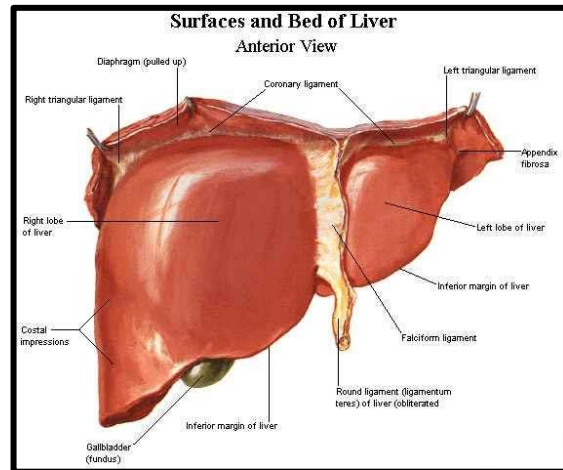
Alasan mencit sebagai hewan percobaan dikarenakan mencit memiliki beberapa sifat yang menguntungkan, antara lain:

- 1) Cepat berkembang biak
- 2) Ukuran tubuhnya relatif lebih kecil dibandingkan berbagai jenis hewan percobaan lainnya
- 3) Mudah dipelihara dalam jumlah banyak
- 4) Karakter anatomi dan fisiologinya mudah diamati
- 5) Mus musculus memiliki aktivitas reproduksi yang panjang (2-14bulan)
- 6) Variasi genetiknya cukup besar (Tamam, 2016).

a. Hepar mencit (*Mus musculus*)

Hepar atau hati merupakan organ atau kelenjar terbesar di dalam tubuh. Hepar memiliki struktur yang halus, lunak dan lentur serta terletak dibagian atas rongga abdomen yang menempati bagian terbesar region hipokondrium. Hepar sebagian besar terletak dibawah arcus costalis kanan dan diaphragm setengah bagian kanan, memisahkan hepar dari pleura, paru-paru, pericardium dan jantung.

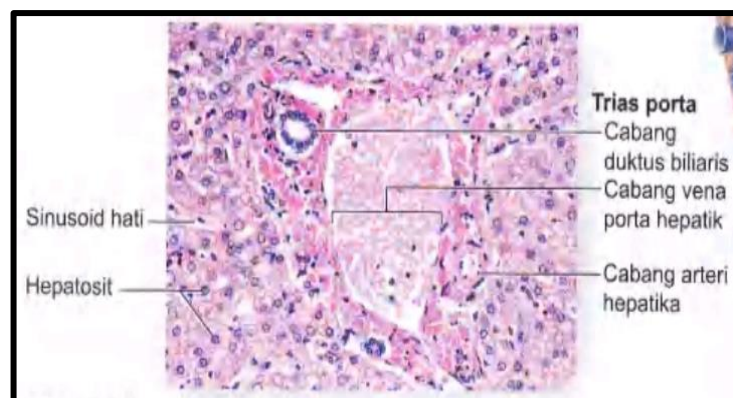
Hepar dibungkus oleh jaringan fibrosa tipis yang tidak elastis yang disebut capusola fibrosa perivascularis (Glisson) dan sebagian tertutupi oleh lapisan peritoneum. Lipatan peritoneum membentuk ligament penunjang yang melekatkan hepar pada permukaan inferior diaphragm. Hepar dalam keadaan segar berwarna merah tua atau kecoklatan yang disebabkan oleh adanya darah yang sangat banyak dalam organ ini. Hepar banyak menghasilkan cairan limfe, pembuluh limfe meninggalkan hepar dan masuk ke dalam sjumlah kelenjar limfe yang ada di dalam porta hepatis (Mescher, 2016).



Sumber: Anonim, 2024

Gambar 2.2 Anatomi Hepar

Sediaan histologi hepar secara mikroskopis dapat membedakan antara sinusoid hati, hepatosit dan bagian dari lobulus hati.



Sumber: Mescher, 2016

Gambar 2.3 Sediaan hepar yang diwarnai HE

2. Histologi

Histologi adalah ilmu tentang jaringan tubuh dan cara jaringan ini menyusun organ organ. Akar kata yunani histo dapat diterjemahkan sebagai jaringan atau jaring karena kebanyakan jaringan merupakan jarring filament dan serat yang saling terjarin, baik selular maupun non-selular, dengan lapisan membranosa. Histologi mencakup semua aspek biologi jaringan, yang berfokus pada mekanisme susunan dan struktur sel dalam mengoptimalkan fungsi yang spesifik untuk setiap organ (Mescher, 2016).

Persiapan jaringan agar dapat diperiksa menggunakan mikroskop mencakup beberapa langkah: fiksasi, dehidrasi, dan pembedahan,

pembenaman, pemotongan, pelekatan dan pewarnaannya sehingga berbagai unsur jaringan dapat dibedakan (Gartner dan Hiatt, 2007).

3. Pembuatan sediaan histopatologi

Sediaan jaringan mikroskopik yang ideal harus dibuat sedemikian rupa sehingga jaringan pada sediaan tersebut tetap memiliki struktur dan komposisi molekul yang sama seperti tubuh. Tahapan-tahapan yang perlu diterapkan pada persiapan jaringan untuk pengkajian histologi antara lain:

a) Fiksasi

Larutan kimia yang mengandung bahan fiksatif pada pH 7,0 ditambahkan ke jaringan. Bahan fiksatif yang paling umum digunakan adalah formaldehida dengan konsentrasi 4%. (Umumnya, pengenceran dibuat dari larutan stok Formalin, yaitu formaldehida 37% atau 40%). Formaldehida berikatan dengan beberapa protein dan membentuk ikatan silang, kemudian mendenaturasi protein lainnya, namun tidak berinteraksi dengan lipid. Efek keseluruhannya adalah untuk memperkeras jaringan dan menginaktivasi enzim, yang mencegah degradasi jaringan serta menempelkan sel ke kaca objek (Mescher, 2016).

b) Pematangan jaringan

Pematangan jaringan adalah proses dimana air dan larutan fiksatif yang ada di dalam jaringan dikeluarkan dan kemudian diganti dengan media yang membuat jaringan menjadi kaku sehingga dapat dipotong menjadi jaringan dengan ketebalan yang sangat tipis (Khristian dan Dewi, 2017). Pematangan jaringan meliputi beberapa tahapan, yaitu:

1) Dehidrasi

Tahap awal pematangan jaringan adalah dehidrasi. Dehidrasi adalah proses dimana air dan zat fiksatif dihilangkan dari komponen jaringan. Dehidrasi harus terjadi secara perlahan. Perbedaan konsentrasi alkohol jika terlalu besar maka dapat meningkatkan kemungkinan kerusakan sel karena sebagian besar jaringan terdiri dari air, oleh karena itu serangkaian rendaman alkohol bertingkat, dimulai dengan konsentrasi rendah dan berlanjut secara bertahap hingga konsentrasi tinggi.

Dehidrasi yang berlebihan dapat menyebabkan jaringan menjadi keras, rapuh, dan berkerut. Dehidrasi yang tidak sempurna juga mengganggu penetrasi pada saat reagen penjernihan ke dalam jaringan, sehingga sampel menjadi lunak dan tidak dapat menjalani proses infiltrasi (Khristian dan Dewi, 2017).

2) Pembeningan (*Clearing*)

Pembeningan merupakan tahapan membuat jaringan menjadi jernih dan transparan menggunakan pelarut organik *xylene* dan *toulene* yang bertujuan untuk mengeluarkan cairan dehidrasi dan menggantikannya dengan larutan. Larutan yang digunakan pada tahap ini menggunakan xylol (Khristian dan Dewi, 2017).

3) Infiltrasi (*Impregnasi*)

Infiltrasi merupakan proses memasukkan suatu filtrat tertentu ke dalam jaringan sehingga larutan tersebut dapat mengeras. Paraffin adalah filtrat yang paling umum digunakan untuk infiltrasi dengan berbagai bentuk, variasi suhu lelehnya dan zat penambahnya sehingga bisa menghasilkan potongan jaringan yang berkualitas (Khristian dan Dewi, 2017).

c) Penanaman jaringan

Setelah proses infiltrasi/impregnasi dengan paraffin cair pada tahap pematangan jaringan, maka selanjutnya adalah tahap penanaman jaringan pada base mold. Jaringan diambil dan diletakkan pada base mold, kemudian dituangkan paraffin cair yang sejenis pada proses infiltrasi/impregnasi. Tahap yang paling penting untuk mempermudah mendapatkan potongan yang baik dengan mengorientasikan jaringan secara tepat (Khristian dan Dewi, 2017).

d) Mikrotomi

Mikrotomi adalah cara pemotongan jaringan dan menempelkannya pada permukaan kaca objek untuk pemeriksaan lebih lanjut. Alat ini memiliki mekanisme penggerak yang menggerakkan objek, blok paraffin, pada jarak tertentu hingga bersentuhan dengan alat pemotong. Spesimen bergerak vertikal melewati permukaan pemotogan ini dan

mendapatkan potongan pita yang berkualitas (Bancroft, 2019). Potongan pita jaringan yang berkualitas memiliki dua tahapan yaitu:

1) Potongan kasar

Potongan kasar atau trimming merupakan proses awal pemotongan blok jaringan yang bertujuan untuk menghilangkan kelebihan paraffin yang menutupi jaringan sehingga permukaan jaringan dapat terlihat dan dapat dibuat pita jaringan secara utuh. Potongan yang disebut kasar karena pada proses ini mikrometer diatur dengan ketebalan yang relatif tinggi yaitu 15-30 μ m. Proses ini harus dilakukan dengan hati-hati karena dapat menyebabkan blok pecah dan menyebabkan artefak terhadap potongan pita jaringan (Khristian dan Dewi, 2017).

2) Potongan halus

Potongan halus bertujuan untuk menghasilkan pita jaringan dengan ketebalan jaringan hasil pembedahan rutin ialah 3-4 μ m, sebelum dilakukan pemotongan blok jaringan harus didinginkan terlebih dahulu untuk memastikan kestabilan suhu blok paraffin dan jaringan. Idealnya, hasil pemotongan yang baik direkatkan sehingga membentuk pita dengan ketebalan yang sama (Khristian dan Dewi, 2017).

e) Floating

Floating merupakan proses memasukkan pita jaringan kedalam waterbath dengan suhu air harus berkisar 10°C dibawah titik leleh paraffin dan air yang digunakan harus bersih bebas dari gelembung untuk menempelkan pita jaringan pada kaca objek glass (Khristian dan Dewi, 2017). Waktu 30 detik sudah cukup lama agar pita menjadi rata, merendamnya lebih lama di dalam air dapat menyebabkan pengembangan berlebihan yang bisa merusak jaringan (Bancroft, 2019).

f) Pewarnaan sediaan jaringan

Pewarnaan dilakukan menghidrasi jaringan dan menghilangkan paraffin untuk mengklasifikasikan komponen sel dan histopatologi pada sampel jaringan yang transparan. Hematoxylin Eosin adalah pewarnaan rutin yang sering digunakan pada pemeriksaan

histopatologi, campuran pewarnaan yang berbeda dengan karakteristik serapan yang berbeda digunakan untuk mengidentifikasi komponen dan struktur jaringan (Hoque et al., 2024).

Prinsip sederhana pewarnaan Hematoxylin Eosin yaitu, sifat asam basa larutan yang kemudian digabungkan dengan komponen jaringan yang cenderung bersifat asam atau basa sehingga menimbulkan ikatan warna antara molekul pewarna dengan komponen jaringan. Pewarnaan hematoxylin tersebut akan mewarnai inti sel menjadi warna biru sedangkan eosin akan mewarnai sitoplasma dan kolagen menjadi warna merah (Khristian dan Dewi, 2017).

Prosedur pewarnaan Hematoxylin Eosin meliputi beberapa tahapan yaitu:

- 1) Deparafinisasi

Agen deparafinisasi yang umum digunakan pada pewarnaan histopatologi adalah xylol. Deparafinisasi bertujuan untuk menghilangkan sisa paraffin, agar penyerapan warna dapat maksimal, sehingga jaringan yang akan diamati akan terfiltrasi dengan baik melalui cairan zat warna yang diberikan (Apriani *et al.*, 2023).

- 2) Rehidrasi

Rehidrasi dengan konsentrasi dari tinggi ke rendah lalu dibilas dengan aquades. Hal ini bertujuan untuk memasukkan air kedalam jaringan menggunakan alkohol betingkat (Apriani *et al.*, 2023), air akan mengisi rongga-rongga jaringan yang kosong (Berliani, 2022).

- 3) Hematoxylin

Hematoxylin adalah pewarna basa, artinya zat ini memulas komponen basofilik jaringan. Struktur basofilik meliputi DNA dalam inti sel, RNA dalam ribosom dan retikulum endoplasma kasar. Komponen jaringan utama yang mengionisasi dan bereaksi dengan pewarna basa akan mengikat zat basa karena adanya asam. Warna yang dihasilkan adalah ungu/biru (Mescher, 2016).

4) Pencucian

Pencucian dilakukan dengan air mengalir hingga pewarnaan tidak luntur (Khristian dan Dewi, 2017).

5) Bluing

Bluing bertujuan untuk mengubah warna biru kemerahan awal hematoxylin dalam inti sel menjadi warna biru yang tidak larut. Tujuan utamanya adalah untuk memperjelas warna biru pada inti sel (Ma'ruf dan Fahmi, 2019). Agen bluing bersifat alkalis dengan pH optimal 7,5-9,0. Agen bluing juga menggunakan Scott's Tap Water, Amonia water, dan Lithium Carbonate (Khristian dan Dewi, 2017).

6) Eosin

Eosin merupakan pewarna sintetis bersifat asam yang menargetkan struktur basa, mengikat garam dengan senyawa eosinofilik yang mengandung mutan positif. Eosin memiliki kemampuan untuk membedakan sitoplasma antara sitoplasma berbagai jenis sel, serat jaringan ikat dan matriks. Eosin Y yang paling banyak digunakan dan larut didalam air dan alkohol (Bancroft, 2019).

7) Dehidrasi

Dehidrasi yang bertujuan untuk menarik atau mengeluarkan air didalam jaringan, dengan menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat dari rendah ke tinggi (Aprianiet *al.*, 2023).

8) *Clearing*

Clearing menggunakan xylol 1 dan xylol 2 untuk menghilangkan zat zat pendehidrasi dari jaringan sehingga menjadi jernih, transparan dan terwarnai dengan baik (Sumanto, 2014)

9) *Mounting*

Mounting adalah tahap akhir dari pewarnaan yang bertujuan untuk mengawetkan jaringan hal ini mempertahankan warna dan jaringan pada mikroorganisme yang dapat merusak sediaan. *Mounting* yang menggunakan deck glass dengan perekat

entelan atau canada balsam harus dalam suasana xylol, hal ini untuk menghindari terbentuknya bintik-bintik hitam gelembung udara yang tampak secara mikroskopis dan juga dapat mengganggu pada saat pembacaan (Sumanto, 2014).

4. Eosin

Eosin adalah pewarna sintetis termasuk golongan xanthene yang bersifat asam dan berikatan dengan molekul protein bermuatan positif di sitoplasma serta jaringan ikat. Pewarna ini berfungsi sebagai counterstain, memberi warna merah hingga oranye pada sitoplasma dan jaringan ikat. Eosin juga mengubah warna inti sel yang telah diwarnai hematoxylin dari biru menjadi ungu. Eosin terdiri dari beberapa jenis, yang tersedia secara komersial meliputi Eosin Y (berwarna kekuningan dan larut dalam air), Etil Eosin (Eosin S, larut dalam alkohol), dan Eosin B (berwarna kebiruan, dikenal juga sebagai eritrosin B), tetapi yang paling sering digunakan dalam kombinasi dengan Hematoxylin adalah Eosin Y. Eosin sebagai pewarna sitoplasma biasanya menggunakan konsentrasi 0,5-1% dalam aquades. Intensitas perpaduan warna Hematoxylin dan Eosin (HE) ditentukan oleh pengamat, dengan keseimbangan warna yang harus jelas saat dilihat di bawah mikroskop (Khristian dan Dewi, 2017).

Penggunaan reagen eosin yang digunakan secara terus menerus dapat menyebabkan iritasi pada mata, kulit dermatitis serta stomatitis. Pewarna sintetis mengandung bahan kimia berbahaya seperti klorat hidrat yang terkandung didalamnya bahkan berpotensi memicu pertumbuhan sel kanker (Rahmawati *et al.*, 2023).

5. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan komponen atau zat aktif pada suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu. Pemilihan metode ekstraksi senyawa ditentukan oleh beberapa faktor antara lain sifat jaringan tanaman, sifat kandungan zat aktif serta kelarutan dalam pelarut yang akan digunakan. Prinsip ekstraksi yaitu melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa nonpolar pada pelarut non polar (Putri, 2019).

Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi yang sering digunakan. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk tanaman dalam pelarut yang sesuai di wadah tertutup pada suhu ruangan (Badaring *et al.*, 2020).

Senyawa antosianin termasuk golongan flavonoid, yaitu golongan fenol yang merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih, maka akan larut dalam pelarut polar seperti ethanol, methanol, aseton, butanol, dan metilsulfoksida (Putri, 2019).

6. Tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium*)

Klasifikasi tanaman pucuk merah menurut Herbarium Medenase (2015) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Devisi	: Tracheophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Mytales
Family	: Mytaceae
Genus	: Syzygium
Spesises	: <i>Syzygium myrtifolium</i>

Tanaman ini sering dikenal dengan nama lain pokok kelat paya (Malaysia), ubah laut (Malaysia Timur), *chinese red-wood (chinese)*, *wild cinnamon*, *red-lip*, *Australia brush cherry* dan kelat oil (Haryati, 2015).



Sumber: Izzati, 2023

Gambar 2.4 Tanaman Daun PucukMerah

Tanaman pucuk merah merupakan tanaman hias yang banyak dimanfaatkan untuk mempercantik halaman rumah. Tanaman ini memiliki

morfologi warna yang spesifik, terdiri dari warna merah menyala, oranye, kuning dan hijau ketika daun sudah dewasa. Pohon yang memiliki diameter mencapai 30cm dengan tinggi mencapai 7 meter. Usia tanaman dapat mencapai umur tahun (Cambaba dan Kasi, 2022)

7. Daun Pucuk Merah

Daun pucuk merah biasanya mengalami perubahan warna, pada saat baru tumbuh berwarna merah menyala, kemudian berubah menjadi cokelat dan jika sudah dewasa daun berubah menjadi hijau. Daun tunggal berbentuk lancip menyerupai jarum, tangkai sangat pendek, tumbuh berhadapan dan permukaan daun bagian atas mengkilap berwarna merah. Panjang daun \pm 6 cm dan lebar daun \pm 2 cm dengan pertulangan daun menyirip (Cambaba dan Kasi, 2022).

Daun pucuk merah memiliki pigmen warna yang disebut antosianin. Antosianin adalah metabolit sekunder dari senyawa flavonoid. Antosianin termasuk pigmen yang larut dalam air secara alami, terakumulasi pada sel epidermis buah-buahan, akar, dan daun yang akan menghasilkan warna merah, ungu, atau biru (Putri, 2019; Syafriana dan Wiranti, 2022).

Tabel 2.1 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Pucuk Merah (*Syzygium myrtifolium*).

Golongan Senyawa Kimia	Hasil pengamatan	Keterangan
Alkaloid		
Mayer	Tidak terbentuk endapan putih	(-)
Dragendorff	Tidak terbentuk endapan merah	(-)
Bouchardat	Tidak terbentuk endapan coklat hitam	(-)
Flavonoid	Terdapat perubahan warna menjadi merah atau jingga	(+)
Tanin	Terbentuk warna hijau kehitaman	(+)
Saponin	Terbentuk busa yang stabil lebih dari 1 cm	(+)
Stroid/Triterpenoid	Terbentuk warna hijau	(+)

Sumber: Syafriana dan Wiranti, (2022)

Penelitian yang dilakukan oleh Syafriana dan Wiranti, (2022) ekstrak daun pucuk merah dengan pelarut etanol 70% menunjukkan ekstrak mengandung flavonoid, tanin, dan saponin. Penelitian selanjutnya yang dilakukan oleh Putri, (2019) menggunakan Ekstrak Daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium*) berdasarkan tingkat daun dengan pelarut aseton menyebutkan bahwa kandungan antosianin pada daun pucuk merah

(*Syzygium myrtifolium*) lebih tinggi pada daun pucuk dibandingkan pada daun muda dan daun dewasa. Zat-zat kimia yang terdapat di daun pucuk merah menghasilkannya dengan pelarut yang memiliki sifat yang sama yaitu sifat polar. Etanol adalah salah satu pelarut ideal bersifat polar yang sering digunakan untuk mengekstraksi senyawa dengan berat molekul rendah seperti saponin dan flavonoid.

8. Penilaian Kualitas pewarnaan

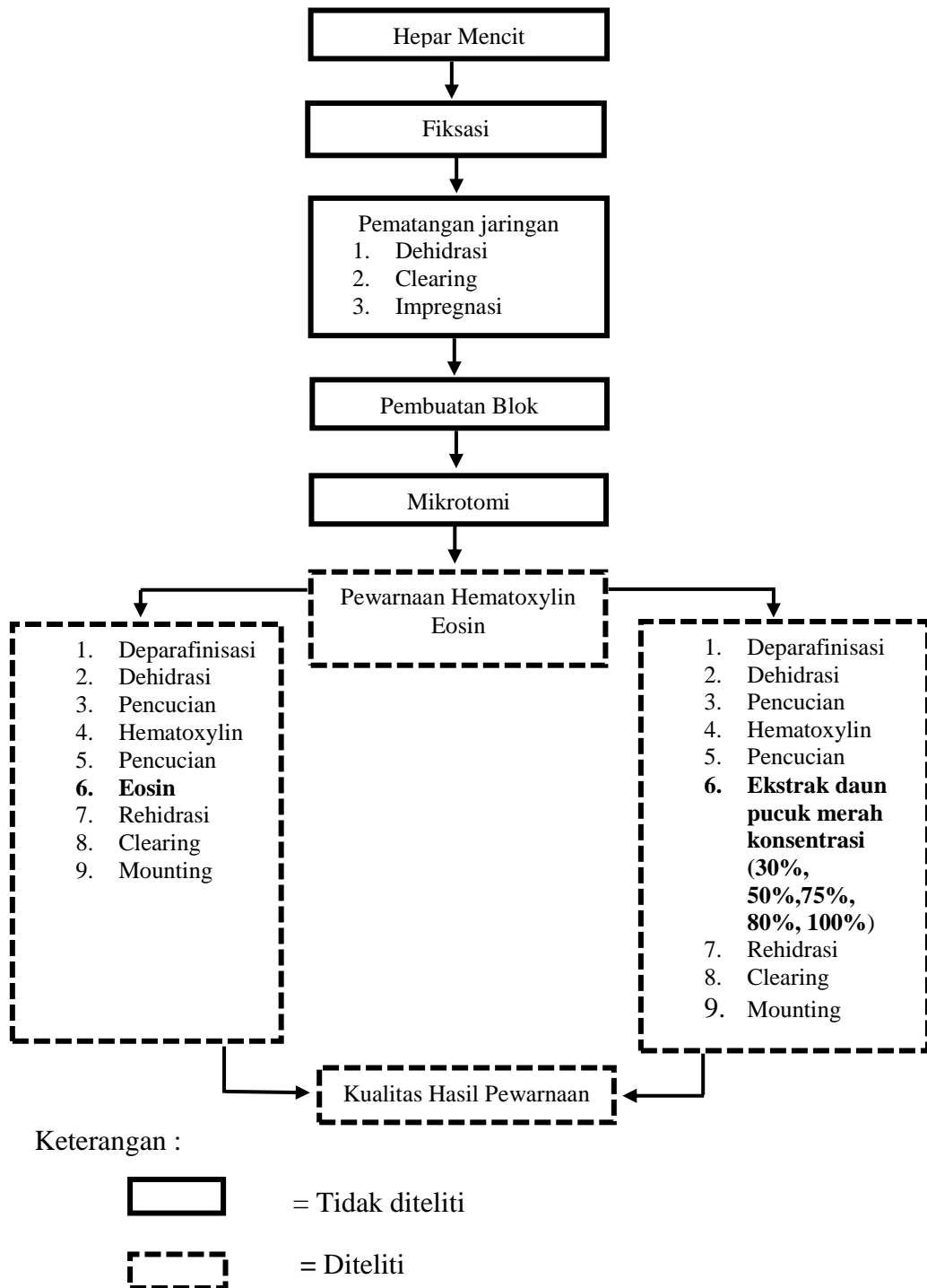
Penilaian kualitas pewarnaan merupakan aspek penting untuk memastikan spesimen terwarnai dengan baik sehingga memberikan hasil analisis mikroskopis yang akurat. Sravya et al., (2018), menyebutkan terdapat lima parameter yang digunakan dalam penilaian kualitas pewarnaan, yaitu inti sel, sitoplasma, keseragaman pewarnaan, kejelasan pewarnaan, dan intensitas pewarnaan. Setiap parameter diberi skor 1 jika hasilnya kurang baik dan 2 jika hasilnya baik. BPMPPi (2019), menyebutkan penilaian kualitas pewarnaan mencakup kejelasan kontras antara warna hematoxylin dan eosin, serta kejernihan sediaan yang menunjukkan proses dehidrasi pasca eosin dilakukan dengan sempurna.

Tabel 2.2 Penilaian Kualitas pewarnaan

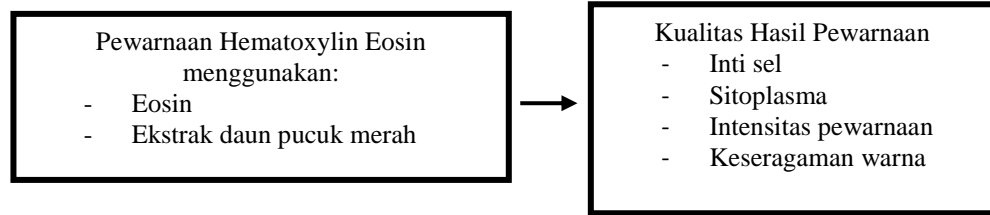
No	Struktur	Deskripsi	Skor
1	Inti sel	Warna ungu kebiruan pada inti sel tidak jelas.	1
		Warna ungu kebiruan pada inti sel jelas.	2
2	Sitoplasma	Warna merah muda pada sitoplasma terlihat tidak jelas.	1
		Warna merah muda pada sitoplasma terlihat tajam dan jelas.	2
3	Intensitas pewarnaan	Tingkat kejelasan warna dari pewarnaan yang tampak lemah/pudar.	1
		Tingkat kejelasan warna dari pewarnaan yang tampak kuat atau padat.	2
4	Keseragaman warna	Tidak ada perbedaan warna yang jelas antara warna ungu kebiruan pada inti sel dan merah muda pada sitoplasma.	1
		Ada perbedaan warna yang jelas antara warna ungu kebiruan inti sel dan merah muda pada sitoplasma.	2

Sumber: Sravya et al., 2018 yang dimodifikasi BPMPPi.

B. Kerangka Teori



C. Kerangka Konsep



D. Hipotesis

- H0: Tidak ada perbedaan hasil kualitas pewarnaan sediaan histologi Hepar Mencit pada proses pewarnaan Hematoxylin Eosin menggunakan pewarna eosin dan ekstrak daun pucuk merah.
- H1: Terdapat perbedaan hasil kualitas pewarnaan sediaan histologi Hepar Mencit pada proses pewarnaan Hematoxylin Eosin menggunakan pewarna eosin dan ekstrak daun pucuk merah.