

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Hewan Coba Mencit

Mus musculus atau yang biasa disebut mencit adalah hewan dari kelas mamalia yang sering digunakan pada saat melakukan penelitian. Penggunaan mencit di laboratorium berkisar 40% - 80% sebagai model hewan coba. Penggunaan mencit ini sering digunakan dalam penelitian ilmiah dalam penelitian biologi, genetika, toksikologi, patologi, histopatologi dan bidang lainnya. Berdasarkan klasifikasinya mencit dapat dilihat :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>



Gambar 1. *Mus musculus*
Sumber: Permatasari, 2019.

Mencit dan manusia memiliki perbedaan secara morfologis dan fisiologis, keduanya memiliki kesamaan genetik yang sangat signifikan. Lebih dari 90% gen manusia ditemukan dalam genom mencit dan sebagian besar fungsi dari gen tersebut sangat mirip di kedua spesies (Khairani dkk., 2024).

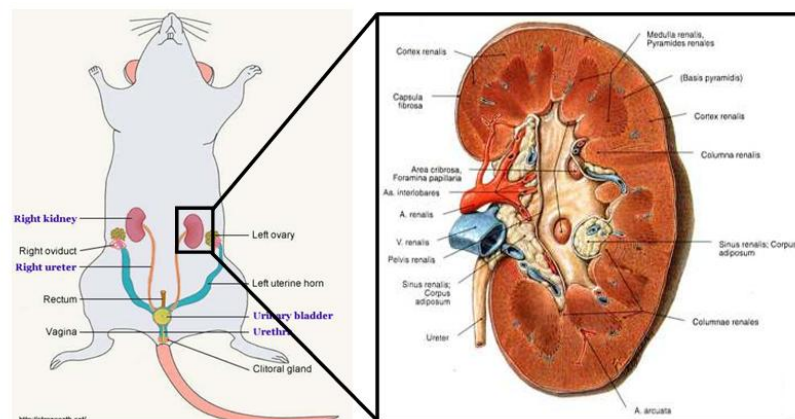
Berdasarkan kemiripan morfologis mencit dan manusia sehingga mencit banyak digunakan dalam hewan uji coba di laboratorium untuk penelitian. Hal-hal yang ingin diamati terhadap suatu perlakuan dapat dilihat dengan perlakuan terhadap mencit. Dengan adanya perkembangan ilmu pengetahuan, penggunaan mencit sebagai hewan uji coba semakin dibutuhkan. Oleh karena itu, penggunaan mencit harus memenuhi seluruh pedoman etika hewan (*animal ethics*) agar tidak menyakiti hewan coba yang dipakai tersebut.

2. Histologi Ginjal

Histologi merupakan ilmu pengetahuan yang mempelajari tentang struktur mikroskopis bahan biologis dan komponen-komponen individual yang

berhubungan secara struktural dan fungsional . Pengetahuan tentang histologi sangat dibutuhkan untuk mengetahui struktur jaringan normal dan abnormal. Meskipun saat ini pengujian genetika sudah canggih namun diagnosis histologis masih menjadi *gold standart* (Lowe J, 2023). Adapun beberapa penyakit ginjal yang terdeteksi dari diagnosis histologis antara lain ISK, Nefritis Akut, Abnormalitas urin, Asimtomatik dan Sindroma Nefrotik.

Ginjal merupakan organ ekskresi yang bertugas mengeluarkan urin, ginjal berbentuk seperti sepasang kacang, terletak pada dinding posterior abdomen, tepatnya didalam daerah lumbal, serta terletak pada sebelah kanan dan kiri tulang belakang peritoneum. Fungsi utama ginjal yaitu mengatur keseimbangan pada cairan di dalam tubuh dengan terdiri dari sepasang organ yaitu ginjal kanan dan kiri (Hapipah dkk., 2022).

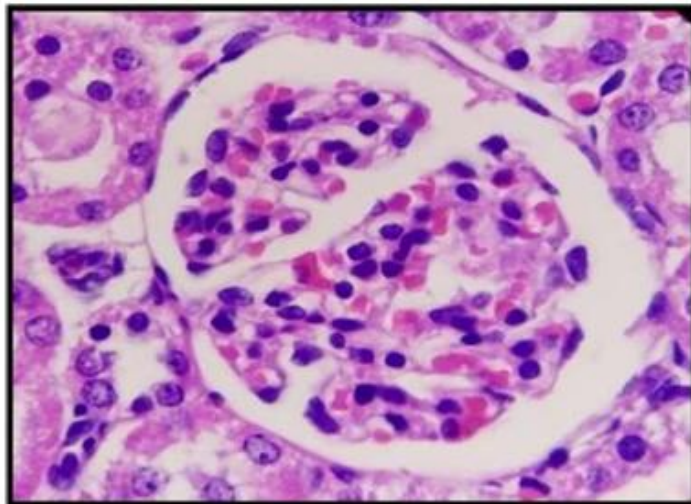


Gambar 2. Anatomi Ginjal Mencit
Sumber: Generasibiologi, 2016; Putz & Pabst, 2006

Dari segi histologi, ginjal memiliki sekitar 1-1,4 juta unit fungsional yang disebut nefron. Tiap nefron terdiri dari sel epitel tunggal yang sederhana dan panjang. Nefron adalah unit fungsional terkecil dalam struktur ginjal.

Komponen-komponen utama dalam nefron terdiri dari glomerulus, kapsula bowman, tubulus kontortus proksimal, tubulus kontortus distal dan lengkung henle segmen tebal (Guyton A & Hall J, 2012).

Sistem kerja ginjal dimulai pada saat dinding kapiler glomerulus melakukan ultrafiltrasi dengan tujuan menyaring darah dari beberapa bagian besar air, ion-ion serta molekul-molekul. Hasil dari ultrafiltrasi dialirkan ketubulus proksimalis untuk direabsorpsi dengan melewati *brush border* dengan mengambil bahan-bahan yang akan diperlukan oleh tubuh contohnya seperti gula, asam amino, vitamin (sebagian besar air, elektrolit, zat terlarut) dan lain sebagainya. Adapun sisa buangan yang sudah tidak diperlukan lagi akan disalurkan ke saluran penampung dan akan diekskresikan menjadi urin. Dari fungsi tersebut akan dilakukan dengan filtrasi pada darah plasma dengan melewati glomerulus yang akan diikuti dengan reabsorpsi pada sepanjang tubulus ginjal (Oktaria, 2017 dikutip dalam (Wahyu Pratama, 2020)).



Gambar 3. Sediaan Ginjal yang Diwarnai HE.
Sumber: Khristian & Inderiati, 2017.

3. Histoteknik

Histoteknik adalah metode yang digunakan untuk membuat sediaan histologi dari spesimen tertentu melalui beberapa proses hingga menjadi preparat yang siap untuk diamati. Spesimen dapat berupa jaringan dari manusia maupun hewan (Khristian & Dewi, 2017). Hasil diagnosis dan kualitas sediaan sangat dipengaruhi oleh proses histoteknik.

Adapun teknik untuk pembuatan sediaan histologi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu sebagai berikut :

a. Fiksasi

Fiksasi merupakan proses yang harus dilakukan baik pada sediaan sitologi maupun histologi. Fiksasi mempunyai fungsi utama yaitu mempertahankan sel dan juga komponen jaringan agar saat sediaan akan diperiksa maka dapat menghasilkan hasil yang sama seperti keadaan disaat jaringan masih hidup (Musyarifah & Agus, 2018). Terdapat beberapa faktor yang dapat merusak tetapi juga dapat mempercepat seperti terlalu lama waktu fiksasi diantaranya suhu, waktu penetrasi, jenis sel, dimensi spesimen, rasio larutan fiksasi berbanding ukuran spesimen dan tingkat keasaman larutan fiksasi (Khristian & Dewi, 2017).

b. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan metode yang digunakan untuk mengeluarkan semua cairan didalam jaringan setelah dilakukan proses fiksasi sehingga dapat dilanjutkan dengan parafin untuk membuat blok

preparat (Rina, 2013). Dehidrasi wajib dilakukan secara perlahan karena dehidrasi yang berlebihan menyebabkan jaringan menjadi rapuh, kusut serta keras.

c. Pembeningan (*clearing*)

Clearing dilakukan untuk menghilangkan sisa dehidran maupun air dalam jaringan dan melarutkan lipid yang dapat menghambat penetrasi parafin (Bancroft, J dan Gamble, 2019). Pada proses clearing ini sangat penting, jika jaringan masih tersisa alkohol walaupun sedikit, parafin tidak akan bisa masuk kedalam jaringan. Proses clearing ini menggunakan bermacam-macam zat penjernih yaitu xylol atau xylene dan toluol atau toluene (U, Waheed dan Asim, 2012).

d. Embedding (*blocking*)

Embedding merupakan teknik pembuatan blok preparat dengan menanamkan atau membenami jaringan kedalam cetakan untuk memudahkan proses pemotongan jaringan menggunakan mikrotom. (Khristian & Dewi, 2017). Proses embedding dilakukan dengan cara mengambil jaringan pada kaset lalu diletakkan pada base mold dan yang terakhir parafin cair dituangkan pada jaringan.

e. Pemotongan (*sectioning*)

Mikrotomi merupakan proses memotong blok parafin menggunakan mikrotom dengan pisau khusus sekali pakai untuk mendapatkan irisan jaringan tipis dari blok paraffin (Slaoui dkk., 2017). Terdapat 2 jenis pemotongan yaitu potong kasar (*trimming*) dan potong

halus (*sectioning*). 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 & Dewi, 2017).

f. Pengapungan (*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 dkk., 2017).

g. Pewarnaan (*staining*)

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga komponen jaringan menjadi kontras dan dapat diamati menggunakan mikroskop. Pewarna yang sering digunakan adalah pewarna yang mewarnai inti dan sitoplasma yaitu pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) (Jusuf.A.A, 2009). 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 hematoksilin. 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. Adapun faktor yang dapat mempengaruhi pewarnaan antara lain kekuatan ion larutan pewarna, konsentrasi pewarna, fiksasi jaringan dan pH (Lai dan Lu, 2012).

h. Perekatan (*mounting*)

Mounting merupakan proses penempelan kaca penutup atau *deck glass* dengan agen mounting diatas sediaan yang telah diwarnai. Proses ini bertujuan untuk untuk melindungi spesimen supaya tidak rusak pada saat penyimpanan sehingga sediaan tersebut dapat dibaca kembali (Khristian & Dewi, 2017).

i. Pelabelan (*labelling*)

Pelabelan berisi identitas pasien, tanggal, serta sumber spesimen yang digunakan. Pemberian label menggunakan pensil tebal untuk label slide, jangan menggunakan stiker label (Khristian & Dewi, 2017).

4. Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Hematoksilin Eosin (HE) merupakan pewarnaan yang sering dipakai pada sediaan histopatologi. Pewarnaan sediaan sangat penting untuk mewarnai komponen jaringan yang transparan setelah proses pematangan jaringan. Dengan melakukan pewarnaan maka akan terlihat morfologi, struktur jaringan, keberadaan dan prevalansi sel-sel jaringan tertentu. Pada proses pewarnaan merupakan proses yang melibatkan banyak air sedangkan jaringan yang telah matang masih mengandung parafin. Jadi parafin harus dilunturkan sebelum proses pewarnaan. Deparafinisasi merupakan proses

pelunturan parafin dari jaringan (Khristian & Dewi, 2017). Pada proses pewarnaan Hematoksilin Eosin menggunakan 2 macam zat warna yaitu Hematoksilin dan Eosin.

a. Hematoksilin

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

b. Eosin

Eosin adalah pewarna sintetis merah flouresen. Eosin yang umum digunakan yaitu eosin Y yang merupakan turunan tetrabromo dari fluorescein dan memiliki warna agak kekuningan. Eosin Y adalah yang paling banyak digunakan dan larut dalam air dan alkohol. Sebagai pewarna sitoplasma, biasanya digunakan sebagai larutan 0,5 atau 1% dalam air suling, dengan tambahan kristal timol untuk menghambat pertumbuhan jamur. Penambahan sedikit asam asetat dikatakan dapat mempertajam pewarnaan. Mayoritas diferensiasi pewarnaan eosin terjadi pada pencucian air keran berikutnya, tetapi sedikit lebih jauh terjadi selama dehidrasi melalui alkohol (Khristian & Dewi, 2017).

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, J dan Gamble, 2019).

c. Mekanisme Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

- 1) Deparafinisasi, yaitu proses menghilangkan parafin larutan yang digunakan adalah xylol selama 3 menit.
- 2) Rehidrasi, yaitu proses untuk menghilangkan xylol dengan menggunakan alkohol bertingkat 100% 2 menit, 95% 2 menit, 80% 2 menit dan 70% 2 menit.
- 3) Pencucian dengan air mengalir.
- 4) Hematoksilin untuk mewarnai inti sel selama 7 menit.
- 5) Pencucian dengan air mengalir.
- 6) Sitoplasma diwarnai dengan Eosin selama 40 detik.
- 7) Dehidrasi dengan menggunakan alkohol untuk mengeluarkan air menggunakan alcohol 70%, 80%, 95%, 100% masing-masing celup.
- 8) *Clearing*, yaitu proses penjernihan dengan xylol1 dan xylol 2 masing-masing 1 celup.
- 9) Mounting menggunakan entelan sebanyak 2 tetes.

d. Mekanisme Pewarnaan dengan Hematoksilin dan Ekstrak Etanol Secang Konsentrasi 50%

- 1) Deparafinisasi, yaitu proses menghilangkan parafin larutan yang digunakan adalah xylol selama 3 menit.
- 2) Rehidrasi, yaitu proses untuk menghilangkan xylol dengan menggunakan alkohol bertingkat 100% 2 menit, 95% 2 menit, 80% 2 menit dan 70% 2 menit.
- 3) Pencucian dengan air mengalir.
- 4) Hematoksilin untuk mewarnai inti sel selama 7 menit.
- 5) Pencucian dengan air mengalir.
- 6) Sitoplasma diwarnai dengan ekstrak etanol kayu secang selama 40 detik.
- 7) Dehidrasi dengan menggunakan alkohol untuk mengeluarkan air menggunakan alcohol 70%, 80%, 95%, 100% masing-masing celup.
- 8) *Clearing*, yaitu proses penjernihan dengan xylol1 dan xylol 2 masing-masing 1 celup.
- 9) *Mounting* menggunakan entelan sebanyak 2 tetes.

5. Maserasi

Flavonoid memiliki sifat tidak tahan terhadap panas dan akan rusak pada suhu tinggi. Oleh karena itu, metode ekstraksi maserasi digunakan karena tidak melibatkan panas dalam prosesnya dengan menambahkan modifikasi praperlakuan gelombang mikro.

Maserasi adalah metode ekstraksi yang paling sederhana dan paling banyak digunakan. Metode ekstraksi maserasi 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 (Purwandari dkk., 2018). (Cacace & Mazza, 2003) mengatakan proses ekstraksi dapat dipengaruhi oleh faktor lama waktu ekstraksi, perbandingan antara bahan dan volume pelarut, jenis polaritas pelarut yang digunakan. 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.

(Daniswara dkk., 2017) mengatakan, penambahan aquades bermanfaat untuk membantu proses penyerapan gelombang mikro dengan optimal. Aquades memegang peran penting karena memiliki konstanta dielektrik tertinggi sebesar 80,4 €" bila dibanding dengan metanol (32,6 €") dan etanol (24,3 €").

6. Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*)

Secang (*Caesalpinia sappan L.*) adalah tumbuhan yang sejak lama tumbuh liar dan biasanya digunakan masyarakat untuk tanaman pagar pembatas dan merupakan perdu yang umumnya tumbuh di tempat terbuka sampai ketinggian 1000 m di atas permukaan laut seperti di daerah pegunungan yang berbatu tetapi tidak terlalu dingin. Tingginya 5 – 10 m. Batangnya berkayu, bulat dan berwarna hijau kecokelatan. Pada batang dan percabangannya terdapat duri-duri tempel yang bentuknya bengkok dan letaknya tersebar.



Gambar 4. Serpihan Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*)
Sumber: Direktorat Obat Asli Indonesia, 2008.

Berikut klasifikasi Tanaman Kayu Secang :

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledona
Bangsa	: Rosales
Suku	: Caesalpiniaceae
Marga	: Caesalpinia
Jenis	: <i>Caesalpinia sappan L.</i>

Kayu secang (*Caesalpinia sappan, L.*) merupakan tanaman yang sudah lama digunakan sebagai obat tradisional, pewarna kain, dan pewarna makanan (Jumardi dkk., 2023). Kayu secang mengandung brazilin yang merupakan komponen terbesar (Sulistiani dkk., 2018), juga mengandung komponen fitokimia seperti flavonoid, lignin, steroid, triterpenoid, dan diterpenoid (Sumardianto dkk., 2021). Adanya senyawa brazilin pada kayu secang yang merupakan kristal berwarna kuning orange, apabila direndam dalam pelarut seperti methanol, etanol atau air akan menghasilkan warna merah (Putri dkk., 2018).

Warna merah yang terdapat pada kayu secang berasal dari senyawa brazilin. Brazilin ($C_{16}H_{14}O_5$) merupakan senyawa antioksidan yang mempunyai katekol dalam struktur kimianya, brazilin memiliki efek sebagai anti radikal kimia. Brazilin diketahui memiliki banyak kegunaan, diantaranya yaitu antiproliferasi, agregasi, antiplatelet, antioksidan, antidiabetes, memperlancar sirkulasi darah, antiinflamasi, brazilin diketahui memiliki aktivitas anti kanker.

Brazilin adalah sumber warna merah yang ada pada kayu secang. Asam tidak berpengaruh terhadap larutan brazilin, tetapi alkali dapat membuatnya bertambah merah. Eter dan alkohol menimbulkan warna kuning pucat terhadap larutan brazilin. Brazilin akan cepat membentuk warna merah jika terkena sinar matahari. Terjadinya warna merah disebabkan oleh terbentuknya brazilein. Brazilin jika teroksidasi akan menghasilkan senyawa brazilein yang berwarna merah kecokelatan dan dapat larut dalam air. Brazilin termasuk senyawa flavonoid yang secara struktur termasuk kelompok isoflavonoid (Robinso T, 1995).

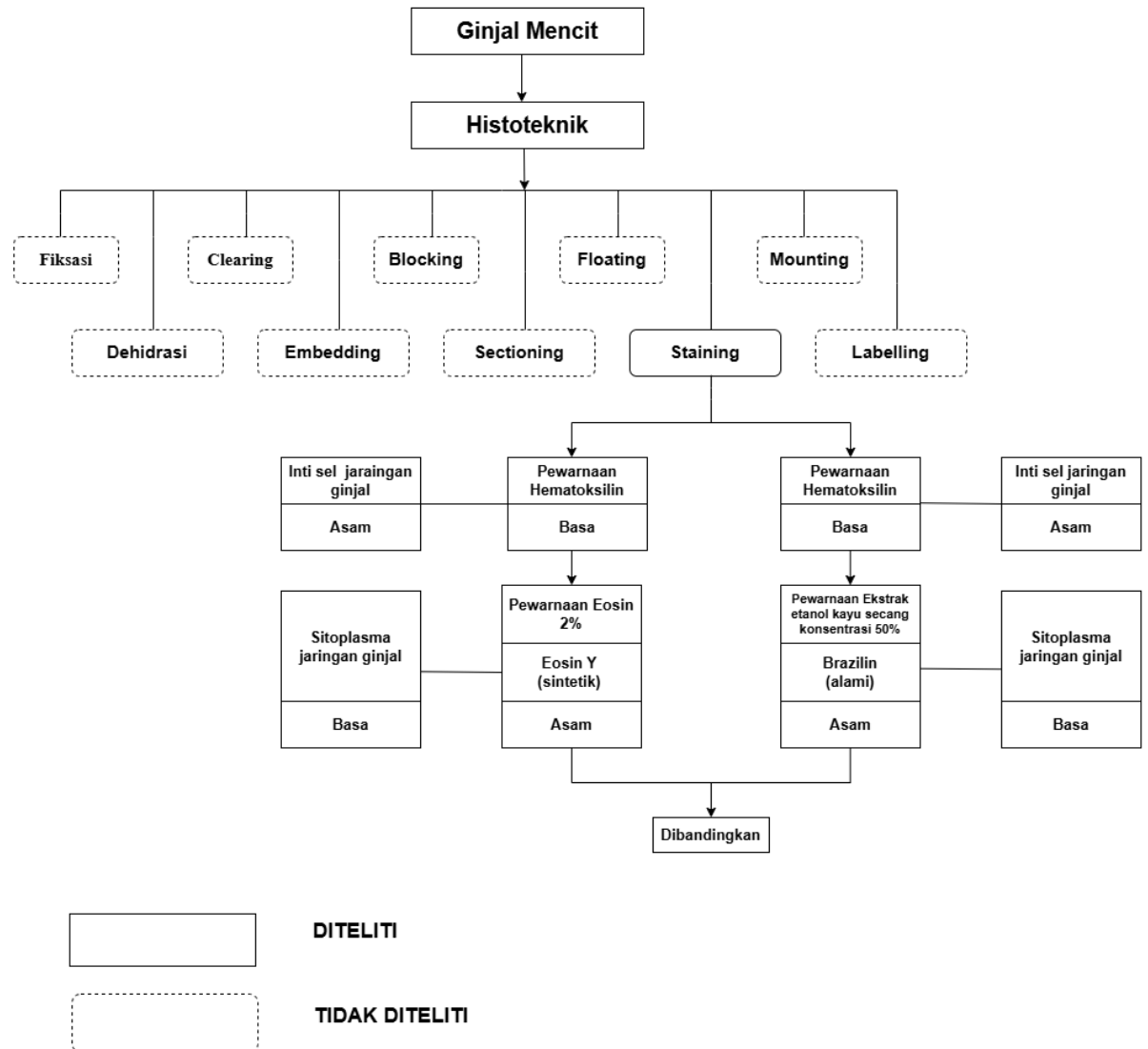
Pigmen brazilein seperti halnya brazilin, memiliki warna berbeda-beda tergantung tingkat keasaman lingkungannya. warna merah tajam dan cerah didapat pada kondisi pH netral (pH 6-7). Warna ini akan bergeser ke arah merah keunguan dengan semakin meningkatnya pH. (Meutia dkk., 2019).

7. Histomorfologi

Histomorfologi merupakan ilmu yang mempelajari suatu ukuran, organ atau bagian jaringan dengan pengamatan mikroskopis (Witri, 2017). Perubahan histomorfologi pada jaringan digunakan sebagai acuan untuk melakukan evaluasi dan diagnosis oleh ahli patologi (Rahmawati dkk., 2023).

Sindy (2022) dalam penelitiannya menggunakan karakteristik histomorfologi seperti intrinsitas pewarnaan inti sel, sitoplasma dan keseragaman warna untuk membandingkan pewarnaan hematoksilin eosin dengan pewarna alternatif buah strawberry sebagai pengganti eosin. Perubahan histomorfologi tersebut menjadi dasar ahli patologi untuk menguji ekstrak pewarna alternatif pada pewarnaan hematoksilin dan eosin.

B. Landasan Teori



Gambar 5. Landasan Teori

C. Hubungan Antar Variabel

1. Variabel Bebas

Perbedaan pewarnaan menggunakan ekstrak etanol kayu secang konsentrasi 50% sebagai pengganti eosin pada pewarnaan hematoksilin. faktor dapat dikontrol oleh peneliti untuk melihat pengaruhnya terhadap variabel terikat.

2. Variabel Terikat

Histomorfologi ginjal mencit (*Mus musculus*) yang menjadi hasil dari variabel bebas untuk diamati hasilnya. Sehingga dengan adanya ekstrak etanol kayu secang yang menjadi pengganti eosin pada pewarnaan hematoksilin tersebut dapat menjadi pengganti eosin yang mewarnai histomorfologi ginjal mencit.

D. Pernyataan Penelitian

Ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*) konsentrasi 50% dapat dijadikan sebagai pengganti eosin pada pewarnaan hematoksilin sediaan histomorfologi ginjal mencit (*Mus musculus*).