

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Hewan Coba Mencit

Mencit merupakan salah satu hewan yang sering dipakai untuk percobaan. Mencit sering digunakan dalam penelitian ilmiah dalam penelitian biologi, genetika, toksikologi, patologi, histopatologi dan bidang lainnya. Penggunaan mencit sebagai model laboratorium berkisar 40%. Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium karena memiliki kelebihan seperti siklus hidup relatif pendek, banyaknya jumlah anak per kelahiran, mudah ditangani, memiliki karakteristik reproduksi mirip dengan hewan mamalia lain, struktur anatomi, fisiologi serta genetik yang mirip dengan manusia (Putri & Sofyanita, 2023).



Gambar 1. Mencit (*Mus musculus*)
Sumber: Fitradayanti, 2016.

Adapun klasifikasi mencit sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Class : Mamalia

Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Genus : Mus

Spesies : *Mus musculus*

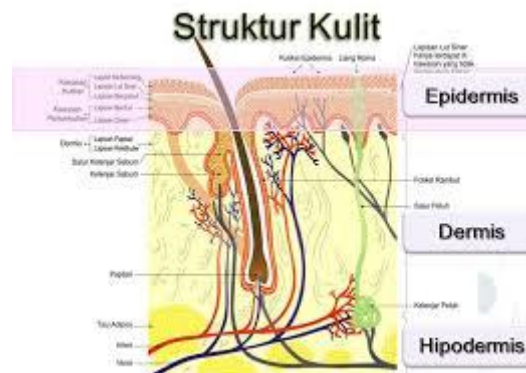
Mencit sering digunakan sebagai subjek penelitian karena kemiripan genetik dengan manusia, yaitu sekitar 90% gen yang identik. Hal ini memungkinkan hasil penelitian pada mencit dapat diaplikasikan dan diprediksikan pada manusia dengan tingkat kesesuaian yang relatif tinggi. Meskipun mencit dan manusia memiliki perbedaan morfologi dan fisiologi, kesamaan genetik ini menjadikan mencit sebagai model hewan coba yang efektif dalam berbagai bidang penelitian (Wati, D. P., Ilyas, S., & Yurnadi 2024).

Mencit banyak digunakan sebagai hewan uji coba di laboratorium sehingga memungkinkan peneliti untuk mengamati efek suatu perlakuan atau intervensi pada sistem biologis yang mirip dengan manusia. Dengan perkembangan ilmu pengetahuan, penggunaan mencit sebagai hewan uji coba penting untuk memastikan bahwa penggunaan mencit tersebut memenuhi prinsip-prinsip etika hewan untuk menghindari penderitaan dan

kesakitan pada hewan, serta memastikan bahwa penelitian dilakukan dengan cara yang bertanggung jawab dan etis.

2. Histologi Kulit Mencit

Kulit merupakan salah satu organ tubuh yang memiliki peranan penting karena selain berfungsi sebagai barier pelindung tubuh, kulit juga memiliki peran dalam menunjang estetika sehingga kontinuitasnya harus selalu dijaga. Kulit juga merupakan organ tubuh yang terbesar dan beratnya sekitar 10% dari berat total tubuh manusia. Dalam menjalankan fungsinya sebagai pelindung tubuh yang letaknya terluar, organ kulit menjadi lebih berisiko memperoleh trauma dari luar (Priscilla, 2017).



Gambar 2. Anatomi Kulit

Sumber: <http://catatanmahasiswafk.blogspot.co.id>

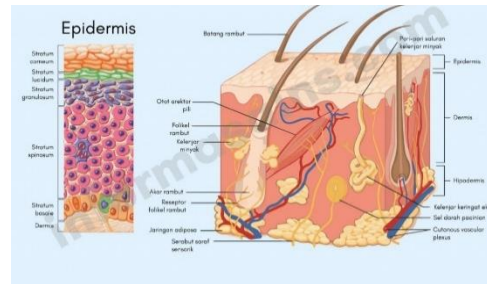
Kulit beserta turunannya, meliputi rambut, kuku, kelenjar sebacea, kelenjar keringat, dan kelenjar mamma disebut juga integumen. Fungsi spesifik kulit terutama tergantung sifat epidermis. Epitel pada epidermis ini merupakan pembungkus utuh seluruh permukaan tubuh dan ada

kekhususan setempat bagi terbentuknya turunan kulit, yaitu rambut, kuku, dan kelenjar-kelenjar (Kalangi, 2014).

Kulit merupakan organ yang tersusun dari 4 jaringan dasar:

- a. Kulit mempunyai berbagai jenis epitel, terutama epitel berlapis gepeng dengan lapisan tanduk. Pembuluh darah pada dermisnya dilapisi oleh endotel. Kelenjar-kelenjar kulit merupakan kelenjar epitelial.
- b. Terdapat beberapa jenis jaringan ikat, seperti serat-serat kolagen dan elastin, serta sel-sel lemak pada dermis.
- c. Jaringan otot dapat ditemukan pada dermis. Contoh jaringan otot polos yaitu otot penegak rambut dan pada dinding pembuluh darah, sedangkan jaringan otot bercorak terdapat pada otot-otot ekspresi wajah.
- d. Jaringan saraf sebagai reseptor sensoris yang dapat ditemukan pada kulit berupa ujung saraf bebas dan berbagai badan akhir saraf. Contoh badan Meissner dan badan Pacini.

Kulit terdiri atas 2 lapisan utama yaitu epidermis dan dermis. Epidermis merupakan jaringan epitel yang berasal dari ektoderm, sedangkan dermis berupa jaringan ikat agak padat yang berasal dari mesoderm. Di bawah dermis terdapat selapis jaringan ikat longgar yaitu hipodermis, yang pada beberapa tempat terutama terdiri dari jaringan lemak.



Gambar 3. Lapisan Epidermis.
Sumber: Ahmad, 2021.

1) Epidermis

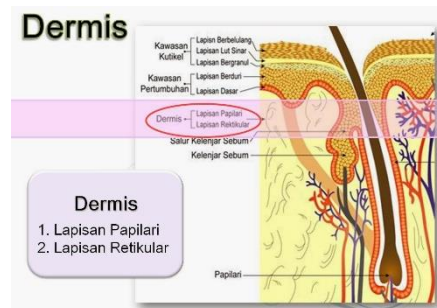
Epidermis merupakan lapisan paling luar kulit dan terdiri atas epitel berlapis gepeng dengan lapisan tanduk. Epidermis hanya terdiri dari jaringan epitel, tidak mempunyai pembuluh darah maupun limfa oleh karenanya semua nutrisi dan oksigen diperoleh dari kapiler pada lapisan dermis (Kalangi, 2014).

Epitel berlapis gepeng pada epidermis ini tersusun oleh banyak lapis sel yang disebut keratinosit. Sel-sel ini secara tetap diperbarui melalui mitosis sel-sel dalam lapis basal yang secara berangsur digeser ke permukaan epitel. Selama perjalanannya, sel-sel ini berdiferensiasi, membesar, dan mengumpulkan filamen keratin dalam sitoplasmanya. Mendekati permukaan, sel-sel ini mati dan secara tetap dilepaskan (terkelupas). Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai permukaan adalah 20 sampai 30 hari. Modifikasi struktur selama perjalanan ini disebut sitomorfosis dari sel-sel epidermis. Bentuknya yang berubah pada tingkat berbeda dalam epitel memungkinkan pembagian dalam

potongan histologic tegak lurus terhadap permukaan kulit (Kalangi, 2014).

Pada Umumnya epidermis terdiri atas 5 lapisan yaitu:

- a) Stratum basal
- b) Stratum spinosum
- c) Stratum granulosum
- d) Stratum lusidum
- e) Stratum korneum

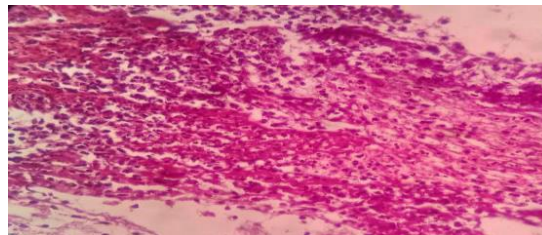


Gambar 4. Lapisan Dermis
Sumber: Febri, dkk, 2014.

2) Dermis

Dermis adalah lapisan kulit di antara epidermis (yang keduanya membentuk kutis) dan hipodermis, yang terdiri dari jaringan ikat yang padat dan melindungi tubuh dari tekanan serta ketegangan. Dermis dibagi menjadi dua lapisan. Lapisan dangkal yang berbatasan dengan epidermis dikenal sebagai daerah papiler, sedangkan lapisan dalam yang tebal dikenal sebagai dermis retikular. Dermis terhubung erat dengan epidermis melalui membran basal. Komponen struktural dari

dermis adalah kolagen, serat elastis, dan *matriks extrafibrillar*. Dermis juga mengandung mekanoreseptor yang peka sentuhan dan termoreseptor yang peka rasa panas. Pada dermis juga terdapat folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar minyak, kelenjar apokrin, pembuluh limfa, dan pembuluh darah. Pembuluh darah menyediakan nutrisi kemudian membuang sisa metabolisme untuk sel-sel dermis dan epidermis (Soesilawati, 2020).



Gambar 5. Gambaran Histopatologi Mencit pewarnaan HE.
Sumber: Meilany, 2017.

Organ kulit mencit sering digunakan sebagai kontrol dalam pewarnaan histologi karenan memiliki beberapa alasan yaitu:

a) Ukuran dan Struktur yang konsisten

Kulit mencit memiliki struktur yang relatif sederhana dan konsisten, sehingga memungkinkan untuk mendapatkan hasil yang dapat diandalkan dalam eksperimen pewarnaan. Ini membuatnya ideal sebagai kontrol untuk memastikan prosedur pewarnaan dilakukan dengan benar (Ummah, 2019).

b) Kemiripan dengan Kulit Manusia

Meskipun lebih kecil, struktur kulit mencit serupa dengan kulit manusia dalam banyak hal, seperti lapisan epidermis, dermis, dan struktur folikel rambut. Hal ini memungkinkan hasil pewarnaan pada kulit mencit dapat memberikan gambaran yang relevan untuk penelitian yang berhubungan dengan kulit manusia (Asiva Noor Rachmayani, 2015).

c) Penyediaan Data referensi

Kulit mencit digunakan untuk memastikan bahwa pewarnaan histologi memberikan hasil yang valid. Misalnya, dalam pewarnaan imunohistokimia, penggunaan kulit mencit sebagai kontrol memungkinkan peneliti untuk membandingkan intensitas pewarnaan dan memastikan bahwa teknik pewarnaan atau antibodi yang digunakan bekerja dengan baik (Janardhan dkk., 2019).

d) Stabilitas dan Pengendalian Variabel

Kulit mencit sebagai kontrol memungkinkan pengendaliannya seperti cara pengambilan sampel atau teknik pemrosesan jaringan. Hal ini membantu meminimalkan kesalahan dan memastikan bahwa hasil yang diperoleh berasal dari variabel yang diinginkan, bukan kesalahan dalam prosedur.

e) Penerimaan yang Luas dalam Penelitian

Mencit adalah hewan model yang banyak digunakan dalam penelitian, sehingga banyak data dan literatur yang dapat dijadikan

referensi untuk interpretasi hasil pewarnaan, baik untuk kontrol negatif maupun positif.

3. Histoteknik

Histoteknik adalah suatu metode dalam proses pembuatan sajian preparat histologi dari suatu spesimen tertentu dengan melalui serangkaian proses hingga menjadi preparat yang dapat diamati atau dianalisa. Tujuan dari histoteknik yaitu untuk mengetahui keadaan patologis serta perubahan suatu sel atau jaringan. Prosesing jaringan dalam histopatologi mencakup serangkaian langkah yang mempersiapkan sampel jaringan untuk pemeriksaan mikroskopik. Proses pembuatan preparat sediaan histologi memiliki beberapa tahap yaitu fiksasi (*fixation*), dehidrasi (*dehydration*), pembersihan (*clearing*), pembedaan (*embedding*), pengecoran (*blocking*), pemotongan jaringan (*sectioning*), pengapungan (*floating*), pewarnaan (*staining*), perekatan (*mounting*), dan pelabelan (*labeling*) (Sumanto, 2014).

a. Fiksasi (*fixation*)

Langkah pertama dan terpenting dalam penanganan spesimen adalah pengawetan atau fiksasi sampel jaringan. Fiksasi dapat dianggap sebagai "serangkaian kejadian kimiawi yang kompleks". Fiksasi adalah suatu usaha untuk mempertahankan komponen-komponen sel atau jaringan agar tidak mengalami perubahan dan tidak mudah rusak. Proses fiksasi ini diharapkan setiap molekul pada jaringan yang hidup tetap

berada pada tempatnya dan tidak ada molekul baru yang timbul. Tujuan fiksasi ini agar jaringan tersebut tetap utuh. Fiksasi harus dilakukan sesegera mungkin setelah pengangkatan jaringan atau setelah kematian agar tidak terjadi autolisis (Alwi, 2020).

Reagen yang paling umum digunakan untuk fiksasi spesimen histologis adalah 10% *neutral buffered formalin* (NBF). Formalin beralkohol dapat digunakan untuk mempercepat laju penetrasi fiksatif dan mempersingkat waktu yang dibutuhkan untuk fiksasi lengkap. Fiksasi setelah pengambilan jaringan harus segera ditempatkan dalam larutan fixatif. Waktu fiksasi dapat berkisar dari beberapa jam hingga beberapa hari, tergantung pada ukuran dan jenis jaringan. Umumnya, jaringan harus difiksasi dalam formalin selama minimal 6 hingga 24 jam. Pentingnya Fiksasi yang tidak tepat atau tidak lengkap dapat menyebabkan perubahan artefak dalam jaringan, yang dapat mempengaruhi interpretasi histopatologis. Oleh karena itu, sangat penting untuk memilih fiksasi yang tepat dan memastikan waktu fiksasi yang cukup (Caron & Markusen, 2023).

b. Dehidrasi (*dehydration*)

Dehidrasi merupakan metode yang digunakan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan setelah dilakukan proses fiksasi sehingga nantinya dapat diisi dengan parafin untuk membuat blok preparat (Alwi, 2020). Hal ini perlu dilakukan

karena air tidak dapat bercampur dengan cairan paraffin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Penarikan air keluar dari sel/jaringan dilakukan dengan cara merendam jaringan dalam bahan kimia yang berfungsi sebagai dehidrator (penarik air) yang secara progresif konsentrasinya meningkat, yakni alkohol (Manan & Pratiwi, 2015).

Proses dehidrasi ini biasanya dimulai dengan alkohol dengan konsentrasi rendah (alkohol 70%) dan kemudian bergerak ke konsentrasi yang lebih tinggi (80%, 90%, 95%, dan akhirnya 100% alkohol). Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa air dihilangkan dari sampel dengan cara yang terkontrol dan perlahan untuk mencegah kerusakan pada struktur jaringan. Prosesnya suatu jaringan akan dicelupkan dimasing-masing alkohol dengan kisaran waktu tertentu sampai prosesnya berakhir (Caron & Markusen, 2023).

c. Pembeningan (*clearing*)

Clearing adalah proses mengeluarkan agen dehidran dan mengganti dengan suatu larutan yang dapat berikatan pada media infiltrasi. Proses clearing sangat penting karena apabila jaringan masih tersisa alkohol sedikit, parafin tidak akan mampu masuk kedalam jaringan. Sehingga jaringan nanti tidak sempurna pada proses pembuatan *blocking*, pembedahan dan pewarnaan.

Xilol merupakan agen clearing yang umum digunakan di laboratorium pembuatan sediaan histologi. Xilol memberikan hasil preparat sediaan yang baik dalam tahapan clearing. Xilol memiliki tingkat kelarutan yang tinggi terhadap agen dehidran dan juga materi paraffin. Xilol yang diberikan pada jaringan tersebut dapat memberikan efek transparan. Pembeningan dilakukan dengan Larutan Xilol I dan Larutan Xilol II selama 30 menit. Larutan Xilol II digunakan untuk mengeluarkan alkohol setelah pembeningan larutan Xilol I (Faridah dkk., 2019).

d. Pembenanaman (*embedding*)

Penanaman (*embedding*) merupakan proses mengeluarkan cairan pembening dari jaringan lalu digantikan dengan paraffin. Jaringan ini harus terbebas dari cairan pembening karena nantinya akan mengkristal dan saat dipotong jaringan akan mudah robek. Berdasarkan metode prosesnya yaitu jaringan akan di benamkan di larutan paraffin selama dalam jangka waktu tertentu sambil dipanaskan agar paraffin tidak membeku. Keuntungan menggunakan paraffin dengan titik lebur rendah yaitu jaringannya tidak mudah menjadi rapuh dan tetap aman.

e. Pengecoran (*blocking*)

Pengecoran merupakan proses pembuatan blok paraffin agar dapat dipotong menggunakan mikrotom dan mudah diiris, jaringan dibentuk kemudian dikeraskan dengan paraffin. Menurut Kurniasih

(2008) pembuatan blok jaringan dilakukan agar menjaga masing-masing bagian jaringan agar tidak berubah pada kondisi tahap awal pemotongan. Proses ini digunakan cetakan anti karat atau *basemold* untuk pembuatan blok paraffin. Proses ini menggunakan zat pembeda paraffin cair panas suhu 70°C (Manan & Pratiwi, 2015).

f. Pemotongan jaringan (*sectioning*)

Pemotongan jaringan adalah proses pemotongan jaringan menggunakan pisau khusus yaitu mikrotom. Mikrotom merupakan alat yang digunakan untuk memotong tipis atau irisan suatu jaringan (Manan & Pratiwi, 2015). Sampel jaringan berparaffin bergerak maju secara manual menuju pisau sesuai dengan ketebalan irisan yang diinginkan. Ketebalan potongan biasanya diatur antara 4-6 mikrometer, tetapi dapat bervariasi tergantung jenis jaringan dan tujuan analisis (Caron & Markusen, 2023).

g. Pengapungan (*floating*)

Floating atau pengapungan dilakukan untuk merekatkan pita paraffin pada kaca objek dengan cara mengembangkan dan meratakan pita paraffin pada permukaan kaca objek dalam waterbath dengan suhu 60°C, sehingga pita paraffin menempel dengan baik pada kaca objek. Proses ini membantu memastikan pita paraffin pada posisinya dan tidak bergeser saat proses selanjutnya.

h. Pewarnaan (*staining*)

Pewarnaan salah satu prosedur yang digunakan pada bidang histoteknik. Pewarnaan merupakan proses pemberian warna jaringan yang telah dipotong bertujuan mempertajam dan memperjelas elemen dalam sel maupun jaringan saat pembacaan di bawah mikroskop.

Prinsip dasar dari pewarnaan histologi berdasarkan pada interaksi antara zat kimia pada pewarna dan komponen tertentu dari sel dan jaringan. Pewarna dapat menarik atau menolak komponen spesifik berdasarkan sifat kimia mereka, seperti asam atau basa, dan struktur mereka, seperti protein atau lipid (Caron & Markusen, 2023). Untuk menganalisis struktur jaringan yang telah diiris, preparat harus diwarnai. Pewarnaan rutin yang sering dikerjakan adalah hematoksilin eosin (HE). Dalam pewarnaan hematoksilin eosin yang merupakan pewarna basa digunakan untuk menstain inti sel yang kaya dengan asam nukleat, sedangkan eosin pewarna asam digunakan untuk menstain sitoplasma dan komponen ekstraseluler (Caron & Markusen, 2023).

i. Perekatan (mounting)

Perekatan (*mounting*) adalah tahap dalam proses histoteknik untuk menempelkan jaringan pada kaca penutup dengan menggunakan bahan perekat kemudian ditutup menggunakan *deck glass*. Proses ini menggunakan entelan yang akan diberikan pada jaringan yang telah diwarnai. Tujuannya agar preparat lebih tahan lama dan mengurangi

faktor kerusakan akibat sel lain seperti jamur pada penyimpanan waktu jangka lama (Ummah, 2019).

j. Pelabelan (*labeling*)

Pelabelan atau *labeling* merupakan tahap terakhir dalam proses histoteknik. Sediaan yang sudah selesai perekatan harus ditulis menggunakan label yang jelas berupa identitas, kode dan tanggal waktu pengambilan. Tujuan dari pelabelan ini agar sediaan tidak tertukar dengan sediaan yang lain. Setelah proses pelabelan sampel siap untuk diamati dibawah mikroskop.

4. Pewarnaan Hematoksilin Eosin (H&E)

Pewarnaan merupakan proses pemberian warna jaringan yang telah dipotong. Pewarnaan jaringan diperlukan untuk mewarnai komponen jaringan yang transparan setelah melalui proses pematangan jaringan. Pewarnaan rutin biasanya digunakan untuk histopatologi adalah pewarnaan Hematoksilin Eosin (H&E).

a. Prinsip dasar Hematoksilin

Hematoksilin diekstrak dari kayu bulat Amerika yaitu *Haematoxylon campechianum*. Hematoksilin berasal dari bahasa Yunani yaitu *haimatodec* (darah) dan *xylon* (kayu). Pewarna mewarnai inti sel menjadi biru atau ungu inti adalah bagian sel yang mengandung DNA yang mengendalikan fungsi sel. Hematoksilin mengikat inti sel secara lemah, kecuali bila ditambahkan senyawa lain seperti

aluminium, besi, krom dan tembaga. Hematoksilin yang berperilaku seperti pewarna basa (basofilik) mengikat dan memberi warna biru ke struktur yang bersifat asam seperti DNA dan RNA dalam inti sel (Caron & Markusen, 2023).

Senyawa hematoksilin yang dipakai adalah bentuk oksidasinya yaitu hematin. Proses oksidasi senyawa hematoksilin dikenal sebagai Ripening yang dapat mempercepat prosesnya menambahkan senyawan bertindak sebagai oksidator seperti merkuri oksida, hidrogen peroksida, potassium permanganat dan sodium iodat. Hematin mengikat molekul bermuatan negatif. Material kromatis dalam inti sel bermuatan negatif, sehingga hematin berikatan dengan material kromatis di dalam inti sel. Secara sederhana, dijelaskan bahwa kromatin pada inti sel mempunyai sifat asam dan akan menarik zat warna yang bersifat basa (Ummah, 2019).

b. Prinsip dasar Eosin

Pewarnaan eosin berasal dari senyawa kimia yang disebut eosin, yang merupakan pewarna sintetis berbasis anilin. Eosin ini sering digunakan dalam teknik pewarnaan histologi untuk memberikan warna merah atau pink pada jaringan atau sel. Eosin bersifat asam mewarnai unsur basa dari sel maka tampak merah muda, karena banyak bagian sitoplasma yang bersifat basa maka pada daerah tertentu sitoplasma terwarna merah muda, unsur ini disebut asidofilik. Eosin bekerja dengan

mengikat komponen tertentu di dalam sel, seperti sitoplasma dan serat kolagen, sehingga memberi warna yang kontras dengan pewarnaan lainnya (Setiawan, 2016).

Pewarna Eosin sampai saat menjadi *gold standard* dan golongan pewarna sintesis dalam golongan *xanthene* dan merupakan *counterstain* yang mewarnai sitoplasma dan jaringan ikat. Dalam reaksinya didapati ikatan molekul protein pada sitoplasma yang bermuatan positif dan jaringan ikat. Eosin mampu memulas inti sel yang telah melewati hematoksin dengan ada perubahan warna yang dari biru menjadi warna ke ungu. Eosin termasuk pewarna anion, dimana berikatan dengan protein yang mengandung ion positif (kation) pada contoh gugus amino (Rahmawati dkk., 2023).

Penggunaan eosin dalam jangka panjang dapat menimbulkan risiko kesehatan dan lingkungan. Eosin dapat bersifat karsinogenik dan berpotensi menyebabkan kanker jika digunakan secara terus-menerus. Selain itu, limbah eosin juga dapat merusak lingkungan. Diperlukan alternatif zat warna untuk mengurangi dampak penggunaan (Jumardi dkk., 2023).

Karsinogen suatu materi yang memicu terjadinya pembentukan sel kanker. Banyak zat menginduksi tumor hewan percobaan dipaparkan dengan dosis yang tidak realistis ketika dikorelasikan dengan lingkungan di sekitar manusia. Agen karsinogen yang diakui

secara resmi harus menunjukkan risiko khusus pada manusia. Kriteria untuk penunjukan karsinogenik sedikit berbeda antar agen, namun pada akhirnya, bahan kimia karsinogenik yang digunakan di dalam laboratorium, patologi anatomi telah diakui secara umum. Berikut beberapa agen karsinogen yang diakui yaitu kloroform, asam kromat, dioksan, formaldehida, nikel klorida, dan kalium dikromat (Caron & Markusen, 2023).

c. Mekanisme Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

- 1) Deparafinisasi, yaitu proses melarutkan paraffin yang ada pada preparat, larutan yang digunakan adalah xylol. Proses ini dilakukan selama 3 menit.
- 2) Rehidrasi, yaitu proses melunturkan xylol menggunakan alkohol bertingkat masing-masing selama 2 menit.
- 3) Pencucian menggunakan aquades
- 4) Hematoxylin digunakan untuk mewarnai intis sel. Proses ini dilakukan selama 7 menit.
- 5) Pencucian dengan air mengalir
- 6) Diferensiasi, yaitu proses untuk menghilangkan warna pada sitoplasma dan mengurangi warna pada inti
- 7) *Blueing*, yaitu proses memperjelas warna biru pada pada inti sel.
- 8) Pencucian dengan air mengalir.
- 9) Pewarnaan sitoplasma menggunakan eosin selama 30 detik.

- 10) Dehidrasi menggunakan alkohol untuk mengeluarkan air.
 - 11) *Clearing*, yaitu proses menjernihkan menggunakan xylol.
- d. Mekanisme Pewarnaan Hematoksilin dan Ekstrak Etanol Kayu Secang konsentrasi 50%
- 1) Deparafinisasi, yaitu proses menghilangkan paraffin pada jaringan, larutan yang digunakan adalah xylol dilakukan selama 3 menit.
 - 2) Rehidrasi, yaitu proses melunturkan xylol menggunakan alkohol bertingkat masing-masing dilakukan selama 2 menit.
 - 3) Pencucian menggunakan aquades.
 - 4) Hematoxylin digunakan untuk mewarnai inti sel. Proses ini dilakukan selama 7 menit.
 - 5) Pencucian dengan air mengalir.
 - 6) Diferensiasi, yaitu proses untuk menghilangkan warna pada sitoplasma dan mengurangi warna pada inti
 - 7) *Blueing*, yaitu proses memperjelas warna biru pada inti sel.
 - 8) Pencucian dengan air mengalir.
 - 9) Sitoplasma diwarnai dengan ekstrak etanol kayu secang konsentrasi 50% selama 30 detik.
 - 10) Dehidrasi menggunakan alkohol untuk mengeluarkan air
 - 11) *Clearing*, yaitu proses penjernihan menggunakan xylol.

5. Klasifikasi Secang

a. Klasifikasi Secang



Gambar 6. Pohon Secang

Sumber: Manfaat Kayu Secang, Menjaga Sistem Imun hingga Mencegah Kanker, 2019.

Kimichi (seorang berkebangsaan Spanyol) pertama kali menemukan Secang di Brazil. Sesuai tempat penemuannya tanaman ini disebut Kayu Brazil (*Brazil Wood*). Walaupun demikian, ada yang mengatakan bahwa asal tanaman secang ini dari India melalui Burma, Thailand, China sampai Malaysia dan menyebar ke Indonesia, Philipina, Srilangka, Taiwan, dan Hawaii. Jenis tanaman secang ini tumbuh subur tersebar di Eropa, Amerika dan Asia (R. Sari & Suhartati, 2016).

Klasifikasi secang yaitu (Tjitrosoepomo, 1994 dalam Fadilah, 2014):

Regnum	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae

Ordo : Rosales
 Family : *Caesalpiniaceae*
 Genus : *Caesalpinia*
 Spesies : *Caesalpinia sappan L.*

b. Nama Ilmiah Secang

Secang memiliki banyak nama daerah di Indonesia, menunjukkan keragaman budaya dan bahasa lokal. Membuktikan bahwa secang digunakan secara luas di berbagai wilayah Indonesia, baik sebagai bahan alami maupun bagian dari tradisi dan pengetahuan lokal. Seperti sebutan seupeng (Aceh), sepang (Gayo), sopang (Batak), cacang (Minangkabau), secang (Sunda), kayu secang (Jawa), kaju secang (Madura), cang (Bali), sepang (Sasak), suang (Bima), sepel (Timor), hong (Alor), kayu sema (Manado), sapang (Makassar), seppang (Bugis), sefen (Halmahera Selatan), sawala, hiniaga, sinyiang, singiang (Halmahera Utara), sunyiha (Ternate), dan roro (Tidore) (R. Sari & Suhartati, 2016).

c. Morfologi

Tumbuhan secang ditemukan pada daerah tropis, tumbuh dengan ketinggian 500 - 1000 m dpl. Batang dan dahannya mempunyai bercak berduri bengkok dan menyebar, batang bulat, warna hijau kecoklatan. Daun majemuk menyirip ganda, panjang 25-40 cm, 10-20 pasang helai daun saling berhadapan. Daun bertangkai, bentuk lonjong,

pangkal rompang, ujung membulat, tepi rata dan hampir sejajar, panjang 10-25 mm, lebar 3-11 mm, warna hijau. Bunganya merupakan bunga majemuk berbentuk malai, keluar dari ujung tangkai panjang 10-40 cm. Mahkotanya berbentuk seperti tabung, warna kuning. Buahnya berupa polong, panjang 8-10 cm, lebar 3-4 cm, ujung paruh berisi 3-4 biji, bila matang berwarna hitam biji bulat memanjang, panjang 15-18 mm, lebar 8-11 mm, tebal 5-7 mm, warna kuning kecoklatan (Alam, 2023).

d. Pigmen Zat Alami Kayu Secang

Kayu secang digunakan sebagai pengobatan tradisional karena dapat mengandung asam galat, tanin, resorsin, brasilin, brasilein, d-alfa-phellandrene, antibakteri, oscimene, alkaloid, flavonoid, saponin, fenil propana, terpenoid, dan minyak atsiri (Hidayat dkk., 2015). Selain itu, tanaman secang digunakan sebagai pigmen alami karena menghasilkan pigmen berwarna merah. Pigmen merah disebut brazilin bersifat mudah larut dalam air panas (Karlina dkk., 2012).

Pigmen zat warna alami dimanfaatkan sebagai keperluan industri, namun demikian untuk mendapatkan arah warna masih banyak diperlukan penelitian yang seksama. Kandungan brazilin pada kayu secang digunakan sebagai arah karena mempunyai warna merah dan bersifat mudah larut dalam air (Karlina dkk., 2012).

e. Brazilin

Brazilin ($C_{16}H_{14}O_5$) memiliki gugus O-H, C-O, C=C, dan CH menghasilkan warna merah pada kayu secang. Warna yang dihasilkan kayu secang dipengaruhi oleh pH, brazilin memiliki warna merah tajam dan cerah pada pH netral ($pH = 6-7$) dan berubah menjadi merah keunguan pada saat pH meningkat ($pH \geq 7$), sedangkan pH yang semakin rendah ($pH = 2-5$) brazilin berubah menjadi warna kuning (Fardhyanti & Riski, 2015). Penelitian lain menyatakan bahwa kayu secang pada larutan asam menghasilkan warna kuning-jingga, larutan netral akan berwarna merah, dan larutan basa berwarna ungu-violet (Saraswati, 2016). Sebagai pewarna alami, zat warna brazilin kayu secang menjadi pigmen utama memberikan warna merah untuk dimanfaatkan sebagai pewarna alami.

f. Ekstraksi Kayu Secang

Zat warna alami diperoleh dengan cara ekstraksi dari berbagai bagian tanaman menggunakan pelarut air suhu tinggi atau rendah juga menggunakan pelarut organik. Pada cara ekstraksi ini dihasilkan senyawa bervariasi tergantung pigmen yang terkandung pada tanaman pembawa warna. Oleh karena itu perlu dilakukan suatu penelitian ekstraksi zat warna alami kondisi suhu tertentu sesuai sifat yang dimilikinya. Senyawa kimia mempunyai sifat berubah dan bereaksi pada kondisi suhu tertentu di lingkungan asam basa. Pada kondisi ini senyawa kimia bereaksi maupun terurai menjadi senyawa jenis lain

yang memberikan warna berbeda dari kondisi awalnya (Effect dkk., 2017).

g. Maserasi

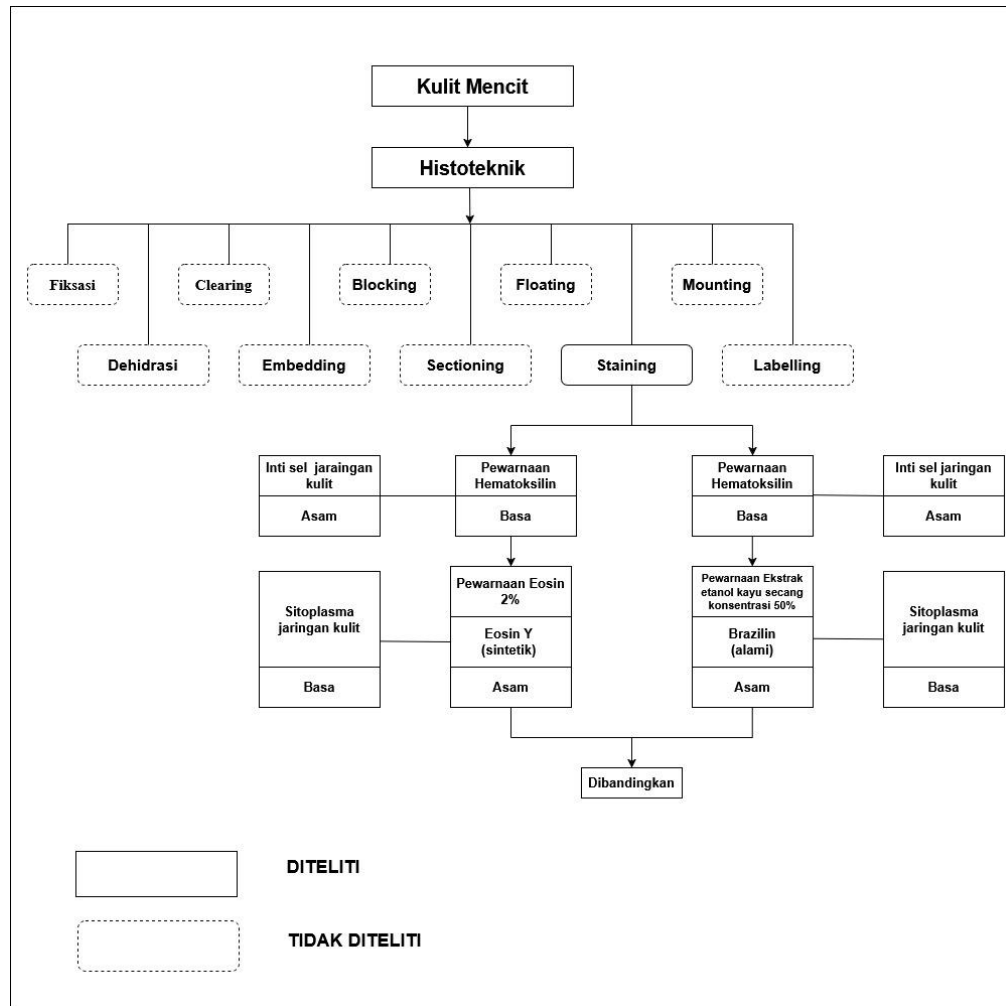
Maserasi adalah proses ekstraksi pewarna dilakukan dengan cara merendam bahan dalam pelarut organik pada suhu ruang. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana dan tidak memerlukan pemanasan, sehingga cocok dengan senyawa yang tidak tahan panas (Rizqiani dkk., 2022). Prinsip maserasi adalah zat terlarut yang dapat larut terhadap perbandingan dua jenis pelarut yang tidak saling bercampur.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses maserasi, yaitu:

- 1) Agar mendapatkan hasil ekstrak maksimal, perlu menggunakan pengeksrak yang cocok dengan sifat zat yang diekstrak.
- 2) Waktu ekstraksi yang semakin lama maka semakin tinggi kandungan tanin yang dihasilkan.
- 3) Waktu maserasi yang baik yaitu adalah hari ke-4 sampai hari ke-8, tergantung sampel yang terekstraksi.

Beberapa jenis pelarut yang digunakan dalam maserasi, antara lain: Air, Etanol, Etanol asam, Metanol, Metanol asam. Pada penelitian ini peneliti melakukan ekstrak kayu secang menggunakan etanol konsentrasi 70%.

B. Kerangka Teori



Gambar 7. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel

1. Variabel Bebas

Perbedaan pewarnaan menggunakan ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*) konsentrasi 50% sebagai pengganti eosin pada

pewarnaan hematoksin, faktor dapat dikontrol oleh peneliti untuk melihat pengaruh terhadap variabel terikat.

2. Variabel Terikat

Histomorfologi kulit 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 Hematoksin tersebut dapat mewarnai histomorfologi kulit mencit.

D. Pernyataan Penelitian

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