

Pengaruh Variasi Lama Waktu Pewarnaan Terhadap Kualitas Preparat Histologis Jaringan Subcutan Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)



Asma' Ridaulharir Abdul Aziz^{a*}, Yunique Kharisma Putri^a, Sri Wahyuni^a

^a Pendidikan Biologi FKIP Universitas Muhammadiyah Malang

* Email penulis korespondensi: yuniquekharismaputri@gmail.com

ABSTRAK

Metode rentang adalah teknik membuat preparat dengan merentangkan jaringan subcutan pada kaca benda dan menghasilkan lapisan tipis yang dapat diamati di bawah mikroskop, sehingga dapat terlihat struktur-struktur pada jaringan tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeskripsikan gambaran struktur histologis jaringan subcutan pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimen. Metode penelitian yang digunakan adalah metode rentang. Metode ini umumnya digunakan untuk jaringan tipis dan sederhana seperti jaringan pengikat. Pewarnaan yang digunakan dalam metode rentang adalah hematoxylin dan eosin. Hematoxylin yang bersifat basa mengikat inti sel yang bersifat asam, memberikan warna ungu atau biru, sedangkan Eosin bersifat asam mengikat sitoplasma yang bersifat basa, memberikan warna merah muda. Penelitian ini menggunakan dua perlakuan berbeda. Pewarnaan pada perlakuan normal Hematoxylin selama 20 menit dan Eosin selama 30 menit, dan pada perlakuan variasi Hematoxylin selama 10 menit dan Eosin selama 20 menit. Analisis data secara deskriptif. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa durasi pewarnaan mempengaruhi kualitas preparat. Pewarnaan dengan Hematoxylin selama 20 menit dan Eosin selama 30 menit menghasilkan warna yang lebih merata, sementara durasi pewarnaan yang lebih singkat menghasilkan warna yang kurang merata. Pada kedua perlakuan ditemukan adanya fibroblast, sabut kolagen, dan sabut elastis. Terdapat kekurangan dalam pembersihan rambut (*Oryctolagus cuniculus*) sebelum pengambilan jaringan, yang berpotensi menyebabkan kontaminasi dan artefak pada preparat, memengaruhi kualitas pengamatan mikroskopis.

Kata kunci: *Eosin*, *Hematoxylin*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rentang*, *Subcutan*

PENDAHULUAN

Histologi merupakan salah satu cabang ilmu pengetahuan yang mempelajari tentang jaringan tubuh penyusun suatu organ, contohnya seperti jaringan ikat, jaringan epitel, jaringan otot, dan jaringan saraf (Soesilawati, 2019). Histologi merupakan metode penting dalam analisis jaringan, terutama dalam penelitian biologi dan kedokteran. Kualitas preparat histologis sangat dipengaruhi oleh tahap pewarnaan, yang bertujuan memberikan kontras pada struktur jaringan sehingga mempermudah pengamatan di bawah mikroskop. Variasi lama waktu pewarnaan merupakan salah satu faktor utama yang memengaruhi hasil akhir preparat histologis, baik dalam hal kejelasan detail maupun akurasi identifikasi struktur jaringan (Junqueira & Carneiro, 2015).

Menurut Wangko (2014) Jaringan ikat terdiri dari dua komponen dasar utama yaitu sel dan matriks intersel. Komponen sel terdiri dari sel tetap dan sel bebas. Yang termasuk

komponen sel tetap antara lain: sel mesenkim/perisit, fibroblas, sel lemak (adiposit), sel mast, dan makrofag; sedangkan yang termasuk komponen sel bebas ialah: sel plasma, limfosit, neutrofil, eosinofil, basofil, monosit, dan makrofag. Sel ini berbentuk bintang, lebih kecil dari fibroblas, biasanya terletak di sepanjang dinding kapiler, dan dikenal sebagai sel perivaskuler/sel adventisia, atau biasa juga dinamakan sel perisit. Sel perivaskuler dapat berdiferensiasi menjadi sel fibroblas, sel lemak dan sel otot polos (bersifat pluripoten). Sel fibroblas merupakan sel yang paling umum ditemui pada jaringan ikat dan mensintesis beberapa komponen matriks ekstraseluler (kolagen, elastin, retikuler), beberapa makromolekul anionik (glikosaminoglikans, proteoglikans) (Sumbayak, 2015). Bentuk dari sel fibroblas adalah sel berukuran agak besar memipih, seringkali berbentuk bulat panjang atau avoid, disertai tonjolan-tonjolan sitoplasma tumpul yang bercabang. Bentuk inti lonjong mengikuti bentuk sel nya (Sumartiningsih, 2007).

Jaringan subkutan merupakan jaringan yang terdapat pada bagian bawah kulit, jaringan subkutan termasuk dalam jaringan ikat longgar. Jaringan subkutan secara umum tersusun atas serabut dan sel mesenkim (Susetyarini, *et.al*, 2019). Jaringan subkutan menjadi salah satu jenis jaringan yang sering dianalisis, terutama dalam penelitian yang melibatkan hewan model seperti kelinci. Metode pewarnaan yang paling umum digunakan adalah pewarnaan hematoksilin-eosin (HE), yang menghasilkan gambaran struktur inti sel berwarna biru dan sitoplasma berwarna merah muda. Namun, lama waktu pewarnaan harus dioptimalkan untuk mencegah pewarnaan berlebih (*overstaining*) atau pewarnaan kurang (*understaining*), yang dapat mengurangi validitas hasil analisis (Suvarna, Layton, & Bancroft, 2018).

Jaringan subkutan kelinci dipilih sebagai model dalam penelitian ini karena karakteristiknya yang representatif dalam analisis histologi. Selain itu, kelinci sering digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian biomedis, sehingga hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam menentukan protokol pewarnaan jaringan yang lebih efisien dan akurat. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh variasi lama waktu pewarnaan terhadap kualitas preparat histologis jaringan subkutan kelinci, yang dapat menjadi dasar untuk meningkatkan kualitas analisis jaringan dalam penelitian histologi. Optimasi prosedur pewarnaan, termasuk durasi pewarnaan, sangat penting untuk memastikan hasil analisis histologis yang akurat. Dengan mengetahui pengaruh variasi waktu pewarnaan terhadap kualitas preparat, penelitian ini diharapkan dapat memberikan pedoman praktis untuk menghasilkan preparat berkualitas tinggi. Hal ini tidak hanya bermanfaat untuk penelitian dasar tetapi juga untuk aplikasi klinis dalam diagnosis histopatologi.

METODE

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimen. Metode penelitian yang digunakan adalah metode rentang. Metode ini umumnya digunakan untuk jaringan tipis dan sederhana seperti jaringan pengikat. Penelitian ini merupakan studi kasus yang menggunakan satu ekor kelinci sebagai sampel dengan kriteria kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan dewasa dengan berat berkisar 4 kg berusia 2,5 tahun dan sehat. Sampel penelitian diambil secara purposif (*purposive sampling*), dengan mempertimbangkan kriteria inklusi antara lain; usia kelinci, berat kelinci, dan kesehatan kelinci. Penggunaan satu kelinci dalam penelitian ini

dimaksudkan untuk eksplorasi awal dan pemahaman mendalam terhadap efek pewarnaan subcutan dalam kondisi terkendali. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu handscoon, papan parafin, section set, kaca benda, cover glass, jarum pentul, pipet tetes, tisu, spuit 10 ml, dan mikroskop. Bahan yang digunakan yaitu subcutan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), campuran Alkohol : Xylol, Xylol murni, alkohol bertingkat (70%, 80%, dan 100% atau absolute), aquades, pewarna Hematoxylin, pewarna Eosin, dan enthellen.

Langkah prosedur pengamatan dengan membedah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), mengambil lapisan subcutan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), merentangkan lapisan subcutan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) pada kaca benda, apabila kurang tipis dan merata dapat dibantu direntangkan dengan jarum pentul, meneteskan spesimen dengan alkohol 70% selama 10 menit secara terus menerus spesimen tidak boleh kering, meneteskan spesimen dengan aquades selama 10 menit secara terus menerus, memberikan pewarna Hematoxylin selama 20 menit pada perlakuan normal dan 10 menit pada perlakuan variasi secara terus menerus, mencuci kelebihan warna menggunakan aquades dan menyerap dengan menggunakan tisu, memberikan pewarna Eosin selama 30 menit pada perlakuan normal dan 20 menit pada perlakuan variasi secara terus menerus, mendehidrasi spesimen dengan alkohol bertingkat (70%, 80% dan 100% atau absolute) selama 10 menit, mendealkoholisasi larutan alkohol : xylol dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing - masing selama 10 menit, meneteskan xylol murni, mengamati spesimen dengan mikroskop, dan meneteskan spesimen dengan enthellen langkah terakhir menutup kaca benda berisi spesimen dengan cover glass.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Klasifikasi Ilmiah

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub Phylum	: Vertebrata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Legomorpha
Family	: Leporidae
Genus	: <i>Oryctogalus</i>
Species	: <i>Oryctogalus cuniculus</i> (Rinanto, <i>et.al.</i> , 2018)

Analisis Hasil Pengamatan

Hasil pengamatan pada struktur jaringan subcutan kelinci (*Oryctogalus cuniculus*) ditemukan adanya fibroblas, sabut kolagen, dan sabut elastis pada kedua perlakuan (Lesson, 2017). Fibroblas merupakan sel yang paling umum ditemui pada jaringan ikat dan mensintesis beberapa komponen matriks (Sumbayak, 2015). Fibrosit adalah sel progenitor mesenkimal yang bersirkulasi yang berpartisipasi dalam respon jaringan terhadap cedera dan invasi (Herzog E. and Bucala R., 2010). Sabut kolagen bersama fibroblas berperan penting dalam penyembuhan

luka (Raharyani, *et.al.* 2015). Kolagen membentuk matriks untuk memperbaiki jaringan yang rusak membentuk kolagen baru mengasilkan jaringan ikat yang menghubungkan tepi - tepi luka dengan erat serta kolagen dapat meningkatkan pertautan antar jaringan baru, sehingga dapat memperkuat area penyembuhan (Ermawati, *et.al.*, 2021). Fungsi fisiologis sabut elastis memberikan elastisitas pada jaringan. Serabut ini berpengaruh terhadap ketegangan dan elastisitas kulit. Ketika diberi tekanan akan meregang dan dapat kembali ke bentuk semula setelah tekanan hilang (Brahmanti, *et.al.*, 2023). Pewarnaan yang digunakan adalah pewarna Hematoxylin dan pewarna Eosin (Apriani, *et.al.*, 2023).

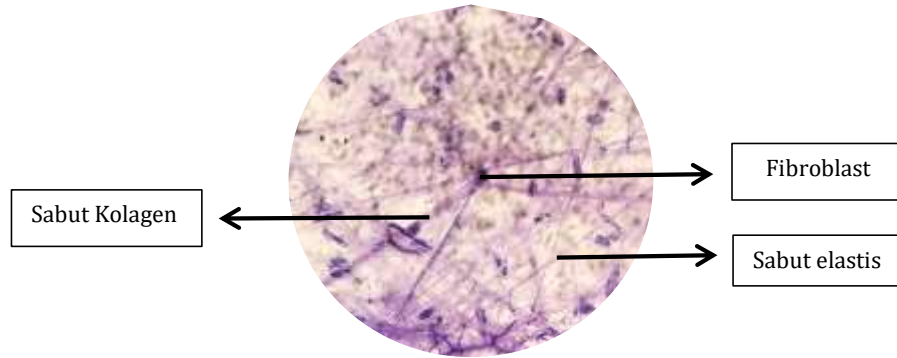
Jaringan subcutan yang terdiri dari adiposa dan jaringan ikat memiliki karakteristik histologis yang penting dalam berbagai penelitian biomedis. Sebagai salah satu lapisan jaringan di bawah kulit, jaringan ini sering digunakan dalam studi eksperimental, termasuk pada hewan model seperti kelinci. Kelinci merupakan hewan model yang sering digunakan karena struktur jaringan subkutannya yang mirip dengan manusia dan kemudahan dalam manipulasi eksperimental (Kumar *et.al.*, 2020).

Pewarnaan komponen jaringan terjadi karena proses reaksi asam basa. Inti sel yang bersifat asam akan menarik zat yang bersifat basa, maka inti akan tampak berwarna ungu atau biru dari Hematoxylin (Annisa and Sofyanita, 2022). Sedangkan sitoplasma bersifat basa akan menarik zat yang bersifat asam, maka sitoplasma akan berwarna merah dari Eosin (Naziifah dan Sofyanita, 2023). Pernyataan diatas juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wahyuni,*et.al.* (2020). Eosin merupakan pewarna yang bersifat asam sehingga memiliki afinitas terhadap sitoplasma sel yang bersifat basa dengan memberikan warna merah muda pada sitoplasma sel dan jaringan penyambung. sedangkan pewarna hematoxylin yang bersifat basa memiliki afinitas terhadap nukleus yang bersifat asam dengan memberikan warna biru/basofilik (Naziifah T. dan Eko N., 2023). Lamanya waktu pewarnaan mempengaruhi hasil. Pada pewarnaan Hematoxylin 20 menit dan Eosin 30 menit hasil preparat menunjukkan warna yang merata sedangkan pada pewarnaan Hematoxylin 10 menit dan Eosin 20 menit didapatkan hasil yang kurang merata (Halim, 2018).

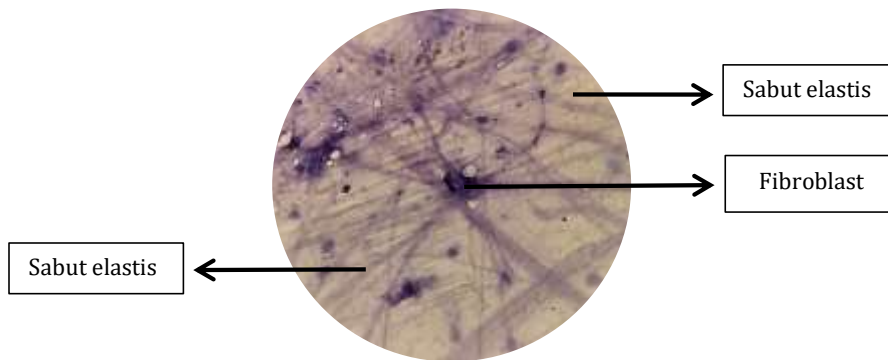
Variasi lama waktu pewarnaan sering kali menjadi penentu utama dalam menghasilkan preparat histologis berkualitas tinggi. Pewarnaan yang terlalu lama (*overstaining*) dapat menyebabkan detail struktur jaringan menjadi buram akibat kelebihan pewarna, sedangkan pewarnaan yang terlalu singkat (*understaining*) dapat menghasilkan preparat yang kurang kontras sehingga sulit untuk dianalisis (Suvarna, Layton, & Bancroft, 2018). Oleh karena itu, diperlukan optimasi terhadap durasi pewarnaan untuk mendapatkan hasil yang optimal.

Tabel 1. Kualitas hasil preparate terhadap perbedaan waktu pewarnaan

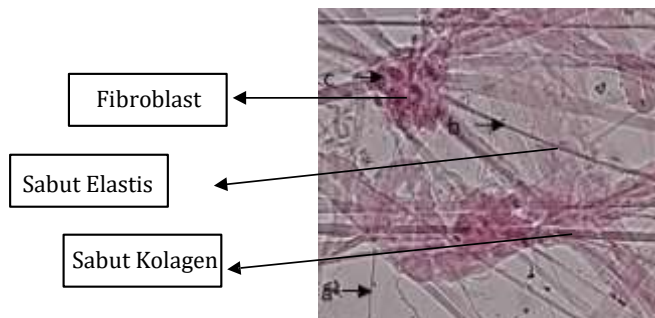
Pewarnaan	Kualitas Preparat		
	Hematoksilin-Eosin	<i>Jernih</i>	<i>Terwarnai</i>
20 menit – 30 menit	jernih	merata	utuh
10 menit – 20 menit	kurang jernih	kurang merata	utuh



Gambar 1. (Pewarnaan Hematoxylin 20 menit dan Eosin 30 menit, perbesaran 400x)



Gambar 2. (Pewarnaan Hematoxylin 10 menit dan Eosin 20 menit, perbesaran 400x)



Gambar 3. (Pewarnaan Hematoxylin dan Eosin perbesaran 400x, Susetyarini, 2019)

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa durasi pewarnaan hematoxylin dan eosin memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kualitas preparat histologis jaringan subkutan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). Pewarnaan dengan hematoxylin selama 20 menit dan eosin selama 30 menit menghasilkan warna yang lebih merata pada preparat, sementara durasi pewarnaan yang lebih singkat (hematoxylin 10 menit dan eosin 20 menit) menghasilkan warna yang kurang merata. Selain itu, penelitian ini berhasil mengidentifikasi komponen jaringan subkutan, termasuk fibroblas, sabut kolagen, dan sabut elastis, yang berperan penting dalam

proses penyembuhan luka dan elastisitas jaringan. Hasil analisis juga mengungkapkan bahwa pewarna hematoxylin memberikan warna biru pada inti sel, sementara eosin memberikan warna merah muda pada sitoplasma. Salah satu tantangan yang ditemukan adalah kurangnya pembersihan rambut kelinci sebelum pengambilan jaringan, yang menyebabkan kontaminasi dan artefak pada preparat. Secara keseluruhan, penelitian ini menegaskan pentingnya optimasi durasi pewarnaan untuk menghasilkan preparat histologis berkualitas tinggi, yang dapat berkontribusi pada penelitian lebih lanjut dalam bidang histologi dan aplikasi klinis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada seluruh asisten laboratorium yang telah memberikan bimbingan dan dukungan teknis selama proses penelitian ini, serta kepada dosen pengampu Ibu Dra. Sri Wahyuni, S.Pd. yang telah memberikan arahan dan ilmu yang sangat berharga dalam pelaksanaan penelitian ini. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak terkait yang telah membantu, baik dalam penyediaan fasilitas, peralatan, maupun dalam memberikan masukan konstruktif yang sangat mendukung kelancaran dan keberhasilan penelitian ini. Tanpa bantuan dan kerjasama dari semua pihak, penelitian ini tidak akan dapat terlaksana dengan baik.

REFERENSI

- Annisa, A.S. dan Sofyanita, E., N. (2022). Pengaruh Penggunaan Minyak Zaitun dengan Pemanasan Sebagai Larutan Penjernih (Clearing) terhadap Kualitas Sediaan Hepar Mencit (*Mus musculus*), *Jurnal Labora Medika*, 7(1), 6-12.
- Apriani et.al. (2023), Ez Prep Concentrate (Ez Prep) Sebagai Alternatif Reagen Deparafinisasi Pada Pewarnaan Hematoksilin Eosin, *Jurnal Teknologi Terapan* 7(1), 96-102.
- Avwioro, O. G. (2011). Staining reactions of microwave processed tissues compared with conventional paraffin wax processed tissues. *Journal of Histotechnology*, 34(1), 22-27.
- Ermawati, T., et.al. (2021). Effectiveness of Robusta Coffe Bean Extract Gel on Collagen Fibers Density in Post-Gingivectomy Wound Healing. *ODONTO Dental Journal*, 8(1), 45-53.
- Gunarso dan Wisnu. (2019). *Dasar-dasar Histologi*. Edisi kedelapan. Jakarta : Erlangga
- Halim, R. (2018). Asam Cuka Sebagai Agen Deparafinisasi Pada Pengecatan Hematoxylin Eosin (HE). Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Herzog, E., L. and Bucala, R. (2010). Fibrocytes in health and disease *Experimental Hematology*, 38(7), 548-556.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2015). *Basic Histology: Text and Atlas*. McGraw-Hill Education.
- Kumar, P., Saini, M., Kumar, V., & Ramesh, V. (2020). Experimental models of wound healing in rabbits: A review. *Veterinary World*, 13(3), 474-481.
- Lesson, C. et.al. (2017). *Buku Ajar Histologi edisi 5*. Jakarta. EGC.
- Nazhiifah, T., S., dan Sofyanita, E., N. (2023). Perbedaan Hasil Pewarnaan Hematoxylin Eosin(HE) Pada Histologi Kulit Mencit (*Mus Musculus*) Berdasarkan Ketebalan Pemetongan 3 Mm, 6 Mm Dan 9 Mm. *Borneo Journal of Medical Laboratory Tecnology*, 6(1), 474-480.
- Raharyani, H., D. et.al. (2015). Peran ekstrak gel daun melati (*Jasminum sumbac*) dalam peningkatan sabut kolagen pada penyembuhan luka sayat pada mencit (*Mus musculus*). *Oral and Maxillofacial Pathology Journal*, 2(1),13-18.

- Rahmawati F. et.al., (2023). Ekstrak Biji Kesumba Keling (*Bixa orellana* L.) sebagai Pewarna Alami Sediaan Jaringan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*), *Jurnal Bios Logos*, 13(3).
- Rinanto, A., et.al. (2018). Pengaruh Penggunaan Tepung Daun Belimbing Manis (*Averrhoa carambola* L.) Sebagai Substitusi Pakan Kelinci Terhadap Performa Kelinci *Hyla Hycole*. *Jurnal Aves*, 12(1), 9-20
- Rudyatmi, E. 2016. Diktat Mikroteknik. Semarang: Jurusan Biologi FMIPA Unnes.
- Soesilawati, P. (2019). *Histologi Kedokteran Dasar*. Surabaya. Airlangga University Press.
- Sofyanita E. et.al., (2024). Perbedaan Hasil Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) pada Histologi Ginjal Mencit (*Mus musculus*) Berdasarkan Ketebalan Mikrotom, *Jurnal Surya Medika* 10(1),362-370.
- Sumbayak, E., M. (2015). Fibroblas: Struktur dan Peranannya dalam Penyembuhan Luka. *Jurnal UKRIDA*, 1(1), 1-6
- Susetyarini, E., et. Al. (2019). Struktur Histologis Tulang Femur dan Jaringan Subkutan Kelinci New Zealand, *Seminar Nasional Pendidikan Sains 2019*, UNS Journal System, Semarang, 17-23.
- Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2018). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier.
- Wangko, S., et.al. (2014). Komponen Jaringan Ikat. *Jurnal Biomedik*, 6(3), 1-7
- Wahyuni, Sri. (2020). *Bahan Ajar Mikroteknik*. Malang: Pendidikan Biologi FKIP. Universitas Muhammadiyah Malang.