

**PERBANDINGAN KUALITAS HASIL PREPARAT HISTOLOGI JARINGAN GINJAL
DENGAN FIKSASI MENGGUNAKAN NEUTRAL BUFFER FORMALIN 10% DAN
ETANOL 50%**

*COMPARISON OF THE QUALITY OF KIDNEY TISSUE HISTOLOGY
PREPARATIONS WITH FIXATION USING NEUTRAL BUFFER FORMALIN 10% AND
ETANOL 50%*

Qatrunnada Salsabila^{1*}, Adang Durachim², Wiwin Wiryanti³, Mamat Rahmat⁴

1*,2,3,4 Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung

*Email: qatrunnadanada25@gmail.com

ABSTRACT

The solution for fixation commonly used is 10% Formalin Neutral Buffer. 50% ethanol contains Formaldehyde which has the ability to preserve tissues. This study aims to find out whether 50% Ethanol fixative solution can be used to fix kidney tissue. The samples in this study were mouse kidneys made into 20 preparation preparations, which came from 10 kidney tissues fixed using 10% Neutral Buffer Formalin as a control and 10 kidney tissues fixed using 50% Ethanol as a comparison which were both fixed for 24 hours. The parameters of this study include measurement of shrinkage in tissue before and after fixation, artifacts and purification caused by the tissue fixation process. The statistical tests used are the Kruskal Wallis if the data are normally distributed and the Mann Whitney test if the data is not normally distributed. The distribution of data on the observation of tissue shrinkage and artifacts is abnormal. Based on the results of the Mann Whitney test value, the Asymp Sig. (2-tailed) value is 1,000 which is both >0.05 which means that there is no significant difference between the use of 10% Formalin Neutral Buffer and 50% Ethanol as a solution for kidney tissue fixation.

Key words: Fixation, Kidney, Ethanol.

ABSTRAK

Larutan untuk fiksasi yang biasa digunakan adalah *Neutral Buffer Formalin* 10%. Etanol 50% memiliki kandungan *Formaldehide* yang memiliki kemampuan untuk mengawetkan jaringan. Penelitian ini bertujuan ialah mengetahui apakah larutan fiksatif Etanol 50% dapat digunakan untuk memfiksasi jaringan ginjal. Sampel pada penelitian ini adalah ginjal mencit yang dibuat menjadi 20 sediaan preparat, yang berasal dari 10 jaringan ginjal difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% sebagai kontrol dan 10 jaringan ginjal yang difiksasi menggunakan Etanol 50% sebagai pembandingan yang sama-sama difiksasi selama 24 jam. Parameter penelitian ini diantaranya pengukuran penyusutan pada jaringan sebelum dan sesudah difiksasi, artefak dan purification yang disebabkan oleh proses fiksasi jaringan. Uji statistik yang digunakan yaitu Kruskal Wallis jika data yang distribusinya normal dan uji Mann Whitney apabila data tidak terdistribusi secara normal. Distribusi data pada pengamatan penyusutan jaringan dan artefak tidak normal. Berdasarkan hasil nilai uji Mann Whitney, didapatkan nilai Asymp Sig. (2-tailed) yaitu 1.000 yang mana keduanya bernilai >0,05 artinya tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara penggunaan *Neutral Buffer Formalin* 10% dan Etanol 50% sebagai larutan fiksasi jaringan ginjal.

Kata kunci: Fiksasi, Ginjal, Etanol.

PENDAHULUAN

Fiksasi adalah tahapan pertama yang dilakukan pada langkah pembuatan preparat histologi. Proses fiksasi ini mempunyai fungsi yaitu untuk mengawetkan struktur dan unsur-unsur jaringan agar dalam keadaan yang sama dengan keadaan asli jaringan (Rusmiatik, 2019). Fiksasi penting untuk dilakukan dengan sebaik mungkin demi menciptakan hasil pewarnaan preparat histologi yang baik. Untuk dapat menciptakan preparat yang baik, dalam proses pembuatan preparat histologi tidak boleh ada kesalahan dalam pembuatannya (Khristian, 2017). Salah satu sumber kesalahan pada pembuatan preparat histologi bisa diakibatkan karena waktu fiksasi yang terlalu lama pada jaringan yang mengakibatkan sel pada jaringan rusak dan tidak dapat dibaca dengan baik secara mikroskopis. Kesalahan lainnya yang dapat terjadi adalah pemotongan organ yang tidak tepat, dan jaringan tidak segera difiksasi dan mengakibatkan larutan fiksatif kurang menyerap pada jaringan (Mescher, 2018).

Ketika kesalahan tersebut terjadi, proses pembuatan preparat jaringan setelah fiksasi menjadi sia-sia karena jaringan yang sudah digunakan tidak bisa diambil kembali secara utuh dan menyebabkan hasil preparat yang kurang baik dan akan terlihat pada akhir proses pembuatan preparat jaringan yaitu pada pemeriksaan secara mikroskopis (Khristian, 2017).

Secara umum, pada fiksasi jaringan menggunakan larutan NBF 10% dapat digunakan untuk memfiksasi jaringan yang lunak maupun jaringan keras. Namun, penggunaan larutan fiksatif *Neutral Buffer Formalin* 10% pada perpanjangan waktu yang lama menyebabkan kerusakan jaringan. Selain itu, terdapat kandungan *Formaldehyde* pada *Neutral Buffer Formalin* 10% yang bersifat toksik untuk tubuh manusia dan lingkungan. Untuk

meminimalisir masalah tersebut, maka diperlukan larutan alternatif pengganti *Neutral Buffer Formalin* 10%. (George E. Howe, 1995 Vo. 57)

Menurut penelitian tentang penggunaan Etanol 50% pada jaringan otak yang merupakan jaringan lunak, Etanol 50% dapat dijadikan larutan fiksasi. Hasil sediaan preparat yang difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% dan Etanol 50% menampakkan ketajaman yang sama pada struktur jaringan sediaan yang diwarnai dengan Hematoksin Eosin dikarenakan pada larutan Etanol terdapat kandungan *Formaldehyde* yang dapat memfiksasi jaringan. (Dewi et al., 2020).

METODE

Jenis dari penelitian ini ialah *quasi experiment*, serta desain penelitian ini adalah fiksasi terhadap ginjal dibedakan menjadi 2 cara, yaitu fiksasi dengan *Neutral Buffer Formalin* 10% dan Etanol 50%. Pemeriksaan hasil fiksasi dilakukan melalui interpretasi hasil kualitas preparat jaringan.

Unit penelitian ini adalah sampel mencit. Sampel yang digunakan adalah jaringan ginjal mencit yang dibagi menjadi dua kelompok jaringan ginjal yang difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% sebagai *gold standard* dan Etanol 50% sebagai pembanding. Jumlah sampel yang digunakan sebagai 20 unit jaringan dengan jumlah pengulangan sebanyak

2 kali yang terdiri dari 10 preparat jaringan ginjal yang akan difiksasi menggunakan NBF 10% selama 24 jam dan 10 preparat jaringan ginjal yang akan difiksasi menggunakan Etanol 50% selama 24 jam.

HASIL

1. Artefak

Terdapat 1 preparat control dan 1 preparat pembanding yang terdapat artefak berupa blok warna kuning

kecoklatan yang diakibatkan oleh proses fiksasi.

Tabel 1. Hasil Statistika Artefak Preparat NBF 10%

	Hasil
Mann-Whitney U	50.000
Wilcoxon W	105.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

Berdasarkan hasil statistika disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan mengenai artefak antara preparat jaringan yang difiksasi menggunakan NBF 10% dan Etanol 50%.

Tabel 2. Hasil penilaian Purifikasi Jaringan Fiksasi NBF 10%

Purification NBF 10%		
Preparat NBF	Nilai	Interpretasi
NBF 1	1	Baik
NBF 2	1	Baik
NBF 3	1	Baik
NBF 4	1	Baik
NBF 5	1	Baik
NBF 6	1	Baik
NBF 7	1	Baik
NBF 8	1	Baik
NBF 9	1	Baik
NBF 10	1	Baik

Didapatkan hasil bahwa seluruh preparat jaringan fiksasi NBF 10% adalah baik.

PEMBAHASAN

Digunakan 10 kontrol jaringan ginjal yang difiksasi menggunakan *Neutral*

Tabel 3. Hasil penilaian Purifikasi Jaringan Fiksasi Etanol 50%

Purification Etanol 50%		
Preparat NBF	Nilai	Interpretasi
NBF 1	1	Baik
NBF 2	1	Baik
NBF 3	1	Baik
NBF 4	1	Baik
NBF 5	1	Baik
NBF 6	1	Baik
NBF 7	1	Baik
NBF 8	1	Baik
NBF 9	1	Baik
NBF 10	1	Baik

Didapatkan hasil bahwa seluruh preparat jaringan fiksasi Etanol 50% adalah baik.

Tabel 4. Hasil Statistika Penyusutan Jaringan

	Hasil
Mann-Whitney U	50.000
Wilcoxon W	105.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

Berdasarkan hasil statistika, dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan mengenai penyusutan jaringan antara jaringan yang difiksasi menggunakan NBF 10% dan Etanol 50%.

Buffer Formalin 10% dan 10 pembanding yang difiksasi menggunakan Etanol 50%. Setiap satuan jaringan ditampung dengan menggunakan tabung pot berukuran 50

mL. Perbandingan antara jaringan dengan larutan fiksatif adalah 1:20 (C. Loomis, 2016). *Formaldehyde* merupakan buffer yang digunakan untuk fiksasi dan pengawetan jaringan yang terdiri dari campuran *natrium hydrogen fosfat* dan *dinatrium hydrogen fosfat*. (Sri Suratmi, 2016)

Pengukuran jaringan dilakukan pada saat sebelum dan sesudah jaringan difiksasi menggunakan instrumen jangka sorong. Pada penelitian ini, digunakan jaringan ginjal mencit jantan, sehat, dan berumur 4 bulan yang rata-rata bervolume 0,24 cm³ berwarna coklat tua dengan kondisi baik. Jaringan yang sudah dipisahkan dari tubuh mencit kemudian dilakukan pencucian dengan menggunakan NaCl fisiologis. Setelah dilakukan pencucian, dilakukanlah pengukuran jaringan dengan jangka sorong, kemudian jaringan dimasukkan kedalam kedua jenis larutan fiksatif selama 24 jam.

Fiksasi jaringan adalah langkah awal dalam pembuatan preparat histologi jaringan. Tujuan dari fiksasi jaringan adalah untuk mencegah terjadinya autolisis, pembusukan pada jaringan, dan mengawetkan sel-sel jaringan agar sama seperti jaringan tersebut masih dalam keadaan hidup, selain itu fiksasi jaringan juga berfungsi untuk menggumpalkan jaringan yang cair agar saat pemotongan blok parafin menjadi lebih mudah. (Zulda Musyarifah, Proses Fiksasi pada Pemeriksaan Histopatologik, 2018)

Penetrasi dari formalin ke dalam jaringan merupakan proses fisika dimana larutan fiksatif berdifusi ke dalam jaringan untuk mencapai lapisan sel terdalam dan mengeluarkan sisa air dari dalam jaringan. (Thavarajah, 2012) Etanol dijadikan larutan alternatif untuk fiksasi jaringan karena koagulasi yang memutus ikatan hidrogen untuk dapat mengendapkan protein dalam jaringan dan dapat menghentikan aktivitas enzim serta dapat mencegah kerusakan sel. (Rahman, 2022)

Jaringan yang sudah dilakukan fiksasi selama 24 jam dengan menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% dan Etanol 50%, kembali dilakukan pengukuran jaringan ginjal dengan menggunakan jangka sorong yang bertujuan untuk mengetahui terjadinya penyusutan pada jaringan. Setelah dilakukan pengukuran, didapatkan hasil bahwa jaringan mengalami penyusutan yang normal, namun terdapat 1 jaringan kontrol dan 1 jaringan pembanding yang mengalami penyusutan tidak normal. Larutan fiksatif berbasis alkohol seperti Etanol 50% merupakan salah satu agen pengawet jaringan yang efisien seperti *buffer formalin*. (Duval, 2010)

Setelah dilakukan fiksasi selama 24 jam dan juga pengukuran jaringan, dilanjutkan dengan tahap pematangan jaringan yang meliputi dehidrasi menggunakan alkohol yang bertingkat mulai dari alkohol 70%, dilanjutkan dengan alkohol 80%, kemudian alkohol 95% dan alkohol 100% yang bertujuan untuk mengeluarkan sisa air dari jaringan (Stadlander, 2018), Proses pematangan jaringan berikutnya adalah proses *clearing* jaringan menggunakan Xylol dengan 3 kali pengulangan, dan dilanjutkan dengan *Embedding* jaringan dengan menggunakan paraffin cair.

Pewarnaan Hematoksilin Eosin dipengaruhi oleh waktu fiksasi dan agen fiksasi dikarenakan larutan fiksasi yang bereaksi dengan jaringan menyebabkan reaksi yang bersifat *reversible*. Semakin lama waktu fiksasi dapat menyebabkan penyusutan dan pengerasan pada jaringan. (Lauralee, 2011)

Berdasarkan hasil penilaian kualitas preparat, tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada hasil preparat jaringan yang difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% dan Etanol 50%. Hasil preparat Etanol 50% dapat dibaca dengan jelas karena tidak merubah struktur pada jaringan ginjal, penyusutan yang terjadi pada 9 jaringan kontrol dan 9 jaringan pembanding sebelum difiksasi dan setelah difiksasi

menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% dan Etanol 50% adalah normal, dimana penyusutan tersebut terjadi pada rentang 4,6% hingga 11,4% (Thu Tran 1. C., 2015). Tidak terdapat artefak pada 9 preparat kontrol dan 9 preparat perbandingan, tidak terdapat bakteri yang dihasilkan oleh proses fiksasi, hanya saja hasil pewarnaan jaringan yang difiksasi dengan Etanol 50% sedikit lebih pucat dibandingkan dengan preparat kontrol, namun hal tersebut tidak mengganggu pembacaan hasil preparat. Etanol merupakan larutan fiksatif koagulan yang dapat membuat jaringan menjadi terlalu rapuh dan keras walaupun dapat menjaga glikogen pada jaringan, namun dapat menyebabkan kerusakan pada inti dan sitoplasma (Zulda Musyarifah, Proses Fiksasi pada Pemeriksaan Histopatologik, 2018). Pada penelitian ini, hal tersebut tidak terjadi, yaitu detail inti dan sitoplasma pada jaringan ginjal tetap terbaca dengan jelas.

Berdasarkan hasil olah data statistika menggunakan Uji Normalitas tidak didapatkan hasil .sig dikarenakan distribusi data penilaian penyusutan, artefak, dan purifikasi yang tidak variatif, sehingga uji statistika tidak dapat dilanjutkan. Pada hasil rata-rata penilaian penyusutan adalah 1, artinya penyusutan yang terjadi pada fiksasi dengan jaringan menggunakan NBF 10% dan Etanol 50% masih berada pada rentang normal yaitu 4,5% sampai 19%. Hasil rata-rata penilaian secara mikroskopis untuk artefak dan bakteri adalah 1, dimana tidak terdapatnya artefak dan juga bakteri pada preparat jaringan yang disebabkan oleh proses fiksasi jaringan.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, hasil preparat jaringan dengan fiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% dan Etanol 50% memiliki hasil yang baik. Hal tersebut dapat ditunjukkan dengan tidak adanya bakteri pada hasil preparat jaringan dan hasil statistik artefak pada Uji Mann Whitney dengan hasil Asymp Sig. (2-

tailed) sebesar 1.000 atau $>0,05$. Pada hasil statistika penyusutan jaringan dengan Uji Mann Whitney yang juga didapat hasil Asymp Sig. (2-tailed) yaitu 1.000 atau $>0,05$ yang berarti hasil pengamatan artefak dan penyusutan jaringan menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang mempengaruhi pada jaringan yang dilakukan fiksasi dengan NBF 10% dan Etanol 50% pada fiksasi jaringan. Pada penelitian ini, Etanol 50% dapat digunakan untuk memfiksasi jaringan ginjal.

SIMPULAN

Hasil penelitian dan pengolahan data menunjukkan hasil bahwa kualitas preparat jaringan ginjal yang difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% dan Etanol 50% adalah baik dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari indikator penyusutan jaringan, artefak dan purifikasi pada hasil kedua jenis preparat jaringan. Disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengukuran penyusutan jaringan dengan metode pengukuran yang lebih akurat.

DAFTAR RUJUKAN

1. *E. Gupta, P. B. (2009). Histopatology for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Indian Journal of Medical Microbiology*, (2009) 27(2): 100-6.
2. Arapahni, S. J., Mahmud, D., Gusnandjar, A., & Durachim, A. (2019). Perbandingan Fiksasi menggunakan NBF 10% dan Madu terhadap keutuhan Komponen Jaringan Hati dengan Pewarnaan HE. *Jurnal Riset Kesehatan Depkes Bandung*.
3. Aulia Candra1, H. F. (2015). Gambaran Histologis Korteks Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*)

4. Blasdale, C. C. (2010). Effect of tissue shrinkage on histological tumour-free margin after excision of basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 162(3), 607-610.
5. C Blasdale 1, F. G. (2010). Effect of tissue shrinkage on histological tumour-free margin after excision of basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology* 162.3 (2010): 607-610.
6. Eurico Fernandes, S. F. (2019). Kidney anatomy, histology and histometric traits associated to renosomatic index in *Gymnotus inaequilabiatus*. *Neotropical Ichthyology*, 17(4): e190107, 2019.
7. Chatterjee, S. (2014). Artefacts in histopathology. *National Library of Medicine*.
8. Cindy Sampias, G. R. (2022). H&E Staining Overview: A Guide to Best Practices.
9. Dewi¹, A. K., & Komohara³, C. A. (2020). Brain Structure Morphology After Being Fixated With Ethanol on Electron Microscope. *Int. J. Morphol.*, 38(2):305-308, 2020.
10. Duval, K. A.-H. (2010). Optimized manual and automated recovery of amplifiable DNA from tissues preserved in buffered formalin and alcohol-based fixative. *Forensic science international: genetics*, 4(2), 80-88.
11. Feldman, A. T. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Histopathology: Methods and Protocols*.
12. Fischer, A. H. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold spring harbor protocols*, 2008(5), pdb-prot4986.
13. Gartner, L. L. (2017). *Textbook of Histology, Fourth Edition*.
14. George E. Howe, L. L. (1995 Vo. 57). Efficacy and Toxicity of Formalin Solutions Containing Paraformaldehyde for Fish and Egg Treatments. *Taylor & Francis Online*.
15. Hector Battifora, M. K. (1986). The Influence of Protease Digestion and Duration of Fixation on the Immunostaining of Keratins A Comparison of Formalin and Ethanol Fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.
16. hem, P. C. (2023, 02 04). *National Library of Medicine*. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>
17. Indonesia, P. D. (2015). *Buku Pedoman Pelayanan Patologi Anatomi Indonesia*.
18. Khristian, I. (2017). *Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medis Sitohistoteknologi*. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
19. Mescher, A. L. (2018). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
20. Nugroho, R. A. (2018). *Mengenal Mencit sebagai Hewan Laboratorium*. Mulawarman University Press.
21. Nur Mujaddidah Mochtar, d. M. (2019). *Buku Petunjuk Praktikum Histologi*. Penerbit UMSurabaya Publishing.

22. Pediatri, S. (2012). Hipertensi Sekunder akibat Perubahan Histologi Ginjal. *Bernadetha Nadeak Vol. 13, No. 5, Februari 2012*.
23. Perbandingan Fiksasi menggunakan NBF 10% dan Madu terhadap Keutuhan Komponen Jaringan Hati dengan Pewarnaan HE. (2019). *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung Vol. 11 No. 2*.
24. Prasetyani, T. (2017). Gambaran Mikroskopis Histologi Bloksel Efusi Pleura dengan Menggunakan Fiksasi Alkohol 70% dan BNF 10% pada Pewarnaan HE. *Diss. Muhammadiyah University of Semarang*.
25. Riwanti, I. A. (2020). Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Etanol pada Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 50, 70, 96% *Sargassum polystum* dari Madura. *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika Vol. 2 No. 2*.
26. Rusmiatik. (2019). Perbandingan Larutan Bouin dan Formalin pada Sediaan Preparat Histologi Testis Marmut. *Jurnal Kedokteran Fakultas Kedokteran Unoversitas Al-Azhar Vol. 4 No. 2*.
27. Samar Khan^{1*}, M. T. (2014). Artifacts in Histopathology: A Potential Cause of Misinterpretation. *Research & Reviews: Journal of Dental Sciences*.
28. Schned, A. R., Wheeler, K. J., Hodorowski, C. A., Heaney, J. A., Ernstoff, M. S., Amdur, R. J., & Harris, R. D. (1996). Tissue-shrinkage Correction Factor in the Calculation of Prostate Cancer Volume. *The American Journal of Surgical Pathology 20(12):p 1501-1506*.
29. Sri Suratmi, M. (2016). Teknik Mencampur Larutan Fiksasi untuk Histologi. *Research Gate*.
30. Syed Ahmed Taqi, I. S. (2018). A review of artifacts in histopathology. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP 22.2 (2018): 279*.
31. Thu Tran, I. C. (2015). Correcting the Shrinkage Effects of Formalin Fixation and Tissue Processing for Renal Tumors: toward Standardization of Pathological Reporting of Tumor Size. *Journal of Cancer 6.8 (2015): 759*.
32. Thu Tran, I. C. (2015). Correcting the Shrinkage Effects of Formalin Fixation and Tissue Processing for Renal Tumors: toward Standardization of Pathological Reporting of Tumor Size. *Journal of Cancer*.
33. Varun Rastogi¹, N. K. (2019). Comparison of Three Alum Hematoxylin—Harris, Mayer's, Ehrlich Hematoxylin Using Different Tissues—A Study of 60 Cases. *Modern Approaches in Dentistry and Oral Health Care Volume 3 - Issue 4*.
34. Yuliana Retnowati¹, T. A. (2009). Pemeriksaan Mikroba dan Patologu. *Universitas Negeri Gorontalo*.
35. Zulda Musyarifah, S. A. (2018). Proses Fiksasi pada Pemeriksaan Histopatologik. *Jurnal FK UNAND*.