

Gambaran Sediaan Histologi Kardiomiosit *Rattus norvegicus* Setelah Difiksasi dengan NBF 10%, Bouin, dan Etanol 50% selama Satu Minggu

Overview of Histological Preparations of *Rattus Norvegicus* Cardiomyocytes after being Fixation with 10% NBF, Bouin, and 50% Ethanol for One Week

Fadyla Rahmanda, Muhammad Anwar Djaelani*, Silvana Tana, Siti Muflichatun Mardiaty

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Jacob Rais, Tembalang, Semarang, 50275

*Email : anwardjaelani1962@gmail.com

Diterima 25 Agustus 2025 / Disetujui 2 Juni 2026

ABSTRAK

Pembuatan preparat jaringan hewan memerlukan serangkaian tahapan, salah satunya adalah fiksasi untuk mencegah autolisis. Penelitian ini menggunakan tiga jenis fiksatif, yaitu NBF 10%, bouin, dan etanol 50%. Pembuatan preparat menggunakan organ *cor R. norvegicus* yang difiksasi selama satu minggu. Proses pencucian (*washing*) dilakukan setelah proses fiksasi untuk mengurangi sisa fiksatif pada jaringan. Tujuan penelitian ini, yaitu menganalisis gambaran sediaan kardiomiosit yang melalui proses pencucian (*washing*) setelah difiksasi dengan menggunakan NBF 10%, bouin, dan etanol 50% selama satu minggu. Kelompok perlakuan yang diujikan pada penelitian ini, yaitu P1 (NBF 10%), P2 (bouin), P3 (Etanol 50%). Hasil uji ANOVA satu arah menunjukkan bahwa hasil berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap ukuran sel kardiomiosit dan ukuran inti sel kardiomiosit. Kesimpulan dari penelitian ini, gambaran sediaan histologi kardiomiosit *R. norvegicus* yang difiksasi dengan NBF 10% selama satu minggu melalui proses pencucian menghasilkan gambaran sediaan yang optimal tanpa kerusakan preparat yang signifikan. Gambaran sediaan histologi kardiomiosit *R. norvegicus* yang difiksasi dengan bouin dan etanol 50% selama satu minggu melalui proses pencucian menghasilkan gambaran sediaan dengan kerusakan yang signifikan.

Kata kunci : fiksasi, kardiomiosit, histologi

ABSTRACT

Making animal tissue preparations requires a series of stages, one of which is fixation to prevent autolysis. This study used three types of fixatives, namely 10% NBF, bouin, and 50% ethanol. Preparation was made using *R. norvegicus* cast organs that were fixed for one week. The washing process was carried out after the fixation process to minimize the residual fixative on the tissue. The purpose of this study was to analyze the picture of cardiomyocyte preparations that went through the washing process after being fixed using 10% NBF, bouin, and 50% ethanol for one week. The treatment groups tested in this study were P1 (10% NBF), P2 (bouin), P3 (50% ethanol). The results of one-way ANOVA test showed that the results were significantly different ($P < 0.05$) on cardiomyocyte size and cardiomyocyte cell nucleus size. In conclusion, the picture of *R. norvegicus* cardiomyocyte histology preparations fixed with 10% NBF for one week through the washing process produces an optimal preparation picture without significant preparation damage. The picture of *R. norvegicus* cardiomyocyte histology preparations fixed with bouin and 50% ethanol for one week through the washing process produces a picture of preparations with significant damage.

Keywords: fixative, cardiomyocytes, histology

PENDAHULUAN

Histologi merupakan cabang ilmu biologi yang mempelajari struktur mikroskopis sel dan jaringan. Struktur jaringan yang mikroskopis menjadi objek kajian dalam histologi untuk diamati di bawah mikroskop (Garcia *et al.*, 2019). Cara terbaik dalam mempelajari histologi adalah dengan menggunakan irisan jaringan yang dibuat dalam suatu sediaan (Wulansari dkk., 2024). Jaringan hewan dibuat dalam bentuk potongan preparat yang kecil, tipis, transparan, dan dapat ditembus oleh cahaya sehingga mempermudah pengamatan di bawah mikroskop (Mustami, 2017). Pembuatan sediaan jaringan hewan melalui beberapa tahapan yang saling mempengaruhi satu dengan lainnya, antara lain isolasi, fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *blocking*, pemotongan, dan pewarnaan. Preparat yang diperoleh dapat memperlihatkan susunan sel, bentuk sitoplasma, inti sel, susunan serat jaringan ikat, dan jaringan otot sesuai dengan gambaran jaringan normal (Wulansari dkk., 2024). Kualitas sediaan jaringan yang optimal diperoleh dari tahap yang dimulai sejak awal, salah satunya adalah fiksasi. Proses pengawetan jaringan berperan penting untuk mencegah dekomposisi atau autolisis (Ellyawati, 2018).

Tahap fiksasi menentukan keberhasilan tahap-tahap lanjutan setelahnya seperti tahap pencucian (*washing*) dan pewarnaan (*staining*). Proses fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan dalam larutan fiksatif. Penggunaan jenis fiksatif disesuaikan dengan komponen jaringan yang akan diamati dan metode pewarnaan yang akan digunakan karena setiap fiksatif memiliki mekanisme pengawetan yang berbeda terhadap komponen jaringan (Thavarajah *et al.*, 2012). Jenis fiksatif yang dapat digunakan dalam pembuatan preparat antara lain, tunggal dan majemuk. Fiksatif tunggal hanya mengandung satu jenis larutan dan yang umumnya digunakan adalah etanol. Fiksatif majemuk mengandung dua atau lebih jenis larutan, yang umumnya digunakan antara lain, *neutral buffered formaline* (NBF) dan bouin. Fiksatif menstabilkan komponen sel dengan membuatnya tidak larut, sehingga mengurangi perubahan dan juga mencegah kerusakan pada jaringan, yang dapat menyebabkan penyusutan atau pembengkakan,

sehingga menjaga struktur sel dan jaringan dalam keadaan seperti aslinya (Howard & Wilson, 2014). Pembuatan preparat pada beberapa literatur tidak melakukan tahap pencucian (*washing*) sehingga dalam pembuatan preparat langsung dilakukan tahap dehidrasi setelah fiksasi (Anthony & Mescher 2016; Harijati dkk., 2017).

Tahap pencucian yang tidak dilakukan dapat menyebabkan residu fiksatif tertinggal di dalam jaringan dan dapat mengganggu proses pewarnaan, sehingga perlu dilakukan pengembangan penelitian melalui proses pencucian jaringan organ (*washing*) sebanyak 4x30 menit. Pencucian preparat histologi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan jenis larutan yang berbeda sesuai dengan jenis pelarut bahan fiksatif yang digunakan. Preparat yang difiksasi menggunakan NBF 10% dicuci dengan akuades, preparat yang difiksasi dengan bouin dicuci dengan alkohol 70%, dan preparat yang difiksasi dengan etanol 50% dicuci dengan alkohol 50%. Penggunaan jenis fiksatif yang berbeda pada pembuatan preparat yang difiksasi dengan waktu yang lama akan menghasilkan beberapa kerusakan yang berbeda-beda, sehingga dapat dilakukan analisis untuk menentukan perbedaan gambaran kardiomiosit pada setiap preparat. Tahap pencucian (*washing*) dapat meminimalisir kerusakan preparat setelah difiksasi, karena tahap pencucian dilakukan untuk membersihkan sisa fiksatif di dalam jaringan (Daningsih & Mardiyanningsih, 2021).

Kondisi ini memerlukan pengembangan penelitian untuk membuktikan pengaruh proses pencucian (*washing*) terhadap kardiomiosit *R. norvegicus* yang difiksasi dengan fiksatif berbeda selama satu minggu. Penelitian ini dilakukan dengan mengamati variabel keutuhan preparat, bentuk sel, ukuran sel, bentuk inti sel, ukuran inti sel, warna inti sel, dan warna sitoplasma (Rukminingsih & Latief, 2020). Penelitian ini berfokus pada gambaran kardiomiosit *Rattus norvegicus* melalui proses pencucian (*washing*) setelah fiksasi dengan NBF 10%, Bouin, dan Etanol 50% selama satu minggu. Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis gambaran kardiomiosit *Rattus norvegicus* melalui proses pencucian (*washing*) setelah fiksasi dengan NBF 10%, Bouin, dan Etanol

50% selama satu minggu. Penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam memberikan informasi ilmiah yang dapat dijadikan acuan referensi untuk penelitian lebih lanjut mengenai gambaran kardiomiosit yang dibuat melalui proses pencucian (*washing*) setelah difiksasi dengan menggunakan fiksatif NBF 10%, bouin, dan etanol 50% selama satu minggu.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan (BSFH), Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro yang beralamatkan di Jl. Prof. Jacub Rais, Tembalang, Kec. Tembalang, Kota Semarang, Jawa Tengah 50275 dan di Laboratorium Kesehatan Hewan Type B Semarang, Jawa Tengah yang beralamatkan di Jl. Setia Budi No.113, Srandol Kulon, Kec. Banyumanik, Kota Semarang, Jawa Tengah 50269. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan.

Isolasi Organ

Isolasi organ adalah tahap pengambilan organ pada hewan coba melalui proses pembedahan. Proses isolasi diawali dengan pembiusan atau anestesi hewan coba secara inhalasi menggunakan kloroform yang sudah ditetesi pada kapas kemudian kapas dimasukkan ke dalam toples. Hewan coba atau tikus dimasukkan ke dalam toples dan ditutup lalu dibiarkan sampai tikus kehilangan kesadaran. Tikus yang sudah terbius, diletakkan di atas bak parafin. Tikus kemudian dibedah dari aksis tubuh bagian posterior ke arah kolateral anterior. Organ yang telah diisolasi, kemudian dimasukkan ke dalam NaCl 0,9% untuk dibersihkan dari darah dan sisa kotoran lainnya.

Fiksasi

Organ yang telah diisolasi kemudian dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil untuk difiksasi. Tebal potongan organ yaitu 5 mm sehingga larutan fiksasi dapat memfiksasi organ lebih cepat karena tebal jaringan sangat menentukan volume larutan dan kecepatan fiksasi yang diperlukan. Organ yang sudah dipotong

menjadi ukuran yang lebih kecil, dimasukkan ke dalam larutan fiksatif yang mempertahankan struktur sel dan jaringan (Anthony & Mescher, 2016).

Potongan-potongan organ *cor* dimasukkan ke dalam 3 *glass jam* yang masing-masing berisi fiksatif NBF 10%, bouin, dan etanol 50% untuk difiksasi selama satu minggu. Organ *cor* yang sudah difiksasi selama satu minggu kemudian dilakukan tahap pencucian (*washing*) yang bertujuan untuk menghilangkan sisa fiksatif dari jaringan yang telah difiksasi.

Pembuatan Preparat

Pembuatan preparat dilakukan dengan menggunakan metode parafin. Tahap pembuatan preparat secara garis besar yaitu pencucian (*washing*), dehidrasi atau menghilangkan air di dalam jaringan (*dehydration*), penjernihan (*clearing*), infiltrasi atau penyusupan parafin ke dalam jaringan (*infiltration*), penanaman parafin (*embedding*), pemotongan (*sectioning*), penempelan (*affixing*), deparafinasi (*deparafination*), rehidrasi (*rehidration*), pewarnaan (*staining*), dehidrasi (*dehydration*), penjernihan (*clearing*) dan penutupan preparat (*mounting*) (Wulansari et al., 2024).

Pencucian (*washing*) adalah tahap yang dilakukan setelah tahap fiksasi, bertujuan untuk mengurangi sisa fiksatif dari jaringan yang telah difiksasi. Larutan yang digunakan untuk proses pencucian (*washing*) disesuaikan dengan jenis fiksatif yang digunakan. Fiksatif NBF 10% dicuci dengan akuades, bouin dicuci dengan alkohol 70% dan etanol 50% dicuci dengan alkohol 50%. Tahap *washing* dilakukan dengan membuang larutan fiksatif kemudian diganti dengan menggunakan larutan *washing*. Proses *washing* pada penelitian ini dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan selama 30 menit.

Dehidrasi (*dehydration*) bertujuan untuk menarik air keluar dari jaringan dan sel menggunakan alkohol dan silol. Jaringan didehidrasi secara bertahap dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi dengan urutan sebagai berikut, alkohol 70% (2x30 menit), alkohol 80% (2x30 menit), alkohol 96% (2x30 menit), alkohol absolut

(2x30 menit). Potongan *cor* dimasukkan ke dalam alkohol dengan konsentrasi tinggi

Penjernihan (*clearing*) dilakukan untuk mengeluarkan alkohol dari dalam jaringan. Proses *clearing* menggunakan silol. Organ yang sudah melewati tahap dehidrasi direndam ke dalam larutan silol sebanyak 2 kali masing-masing selama 10 menit dengan menggunakan wadah kaca.

Infiltrasi (*infiltration*) merupakan tahap pengisian parafin ke dalam jaringan. Tahap infiltrasi dilakukan dengan perendaman dalam parafin cair (60°C). Perendaman dilakukan selama 60 menit, setelah itu *tissue cassette* dikeluarkan dan ditiriskan pada temperature 60°C untuk sementara waktu sebelum pencetakan blok parafin dilakukan (Anthony & Mescher, 2016).

Penanaman (*embedding*) merupakan tahap untuk pembuatan blok parafin. Tahap ini dilakukan dengan disiapkan cetakan yang telah dihangatkan pada suhu 60°C, lalu jaringan dimasukkan sambil diatur letaknya ke dalam setiap cetakan. Parafin cair dituangkan secara perlahan ke dalam cetakan sampai seluruh jaringan terendam. Parafin dibiarkan membeku, selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan di *freezer* (-20°C) sebelum dilakukan pemotongan (Harijati dkk., 2017).

Pemotongan (*sectioning*) merupakan tahap pemotongan organ yang telah dilapisi dengan blok parafin, dilakukan dengan cara blok parafin yang mengandung jaringan, dipotong menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan 5 µm. Potongan tersebut menghasilkan pita parafin yang kemudian diletakkan secara hati-hati dan dirapikan di atas permukaan air dalam waterbath bersuhu 40°C (Iriani & Yusfiati, 2015). Potongan pita parafin diambil dan ditempelkan pada kaca objek yang telah diolesi dengan albumin. Kaca objek dengan jaringan di atasnya kemudian disusun di dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 40°C selama 24 jam agar benar-benar kering dan siap untuk diwarnai (Pawlina & Drake, 2016).

Pewarnaan (*staining*) bertujuan untuk mewarnai komponen jaringan sehingga dapat dibedakan komponen satu sel dan komponen sel lainnya. Tahap pewarnaan diawali dengan

deparafinasi menggunakan silol sebanyak 3 kali selama 5 menit. Rehidrasi dilakukan secara bertahap dengan urutan waktu silol (3x 5 menit), alkohol absolut (1x 1 menit), alkohol 96% (1x 1 menit), alkohol 80% (1x 1 menit), alkohol 70% (1x 1 menit), air mengalir (1 menit), larutan hematoksilin (10 menit), air mengalir (5 menit), larutan eosin (2 menit), air mengalir (1 menit). Dehidrasi dengan alkohol absolut (3x 5 celup). Tahap *clearing* dengan larutan silol sebanyak (3x 5 menit) (Pawlina & Drake, 2016).

Penutupan preparat (*mounting*) dilakukan dengan cara diberi satu tetes cairan perekat (*enthelan*) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup, kemudian hasil pewarnaan atau preparat dapat diamati di bawah mikroskop untuk melihat kerusakan organ yang difiksasi selama satu minggu (Pawlina & Drake, 2016).

Pengambilan Data

Pengamatan preparat histologi kardiomiosit *R. norvegicus* yang telah difiksasi selama satu minggu dilakukan di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan. Preparat histologi diamati dengan menggunakan kamera optilab pada mikroskop fotomikrograf yang sudah terkoneksi dengan laptop perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan dengan mengamati 5 kardiomiosit pada setiap preparat yang dipilih secara acak pada masing-masing irisannya. Pengukuran ukuran sel kardiomiosit dilakukan dengan analisis morfometri. Penghitungan diameter kardiomiosit yaitu dengan mengukur diameter terpanjang ditambah dengan diameter terpendek, kemudian hasil penjumlahan diameter terpanjang dan terpendek dibagi dua (Purba *et al.*, 2023). Variabel keutuhan preparat, bentuk sel, bentuk inti sel, warna inti sel dan warna sel diamati secara deskriptif. Pengamatan dilakukan dengan mengamati preparat secara morfologi untuk mengetahui perbedaan hasil dari setiap perlakuan. Hasil pengamatan dicatat dan dijelaskan dengan jurnal pendukung.

Rancangan Penelitian dan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksplanasi dengan rancangan percobaan Rancangan

Acak Lengkap (RAL) menggunakan 10 potongan organ *cor* yang diambil dari 10 tikus putih dengan 3 kelompok perlakuan larutan fiksatif yaitu kelompok fiksatif NBF 10%, bouin, dan etanol 50%. Perlakuan diulang masing-masing sebanyak 10 kali dan setiap potongan organ dibuat menjadi satu slide preparat sehingga diperoleh total 30 slide preparat.

Analisis Data

Analisis data kualitatif yang digunakan untuk variabel keutuhan preparat, bentuk sel, bentuk inti sel kardiomiosit, dan tampilan zat warna dilakukan secara deskriptif dengan mendeskripsikan hasil penelitian. Analisis data kuantitatif untuk pengukuran variabel ukuran kardiomiosit dan ukuran inti sel kardiomiosit dilakukan validasi data, kemudian data diuji pola distribusinya, dan homogenitas data.

Uji normalitas data dilakukan dengan uji shapiro-wilk. Hasil uji data yang mengikuti pola distribusi normal dan homogen selanjutnya diuji dengan one way ANOVA dengan taraf signifikansi ($\alpha = 5\%$) (Santoso, 2020). Hasil ANOVA yang menunjukkan berbeda nyata antar kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan. Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, di uji dengan Kruskal wallis dan uji lanjut Mann Whitney U (Suyatno & Gio, 2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis variabel penelitian menggunakan uji *Analysis of Varians* (ANOVA) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata mengenai ukuran sel, ukuran panjang inti sel, dan ukuran lebar inti sel yang difiksasi NBF 10% menggunakan pencucian akuades, fiksasi bouin menggunakan pencucian alkohol 70% dan fiksasi etanol 50% menggunakan pencucian etanol 50%.

Gambar histologi kardiomiosit *R. norvegicus* yang difiksasi dengan NBF 10% (Gambar 1.) (P1) menunjukkan keutuhan potongan jaringan tampak utuh dan tidak hancur yang ditunjukkan dengan batas membran sel-sel otot jantung yang jelas dan tidak robek. Sel otot tampak lurik sesuai dengan arah potongan membujur kardiomiosit dengan inti

sel berwarna biru keunguan yang terletak di tengah, sitoplasma berwarna merah muda serta adanya diskus interkalaris sebagai penghubung antar sel jantung. Santana *et al.*, (2019) menyatakan bahwa kardiomiosit memiliki tampilan lurik (begaris-garis) yang berasal dari susunan teratur filamen tipis yang mengandung aktin dan filamen tebal yang mengandung miosin pada sarkomer otot. Bentuk inti sel kardiomiosit pada potongan membujur tampak oval, dan terletak di tengah sel yang merupakan ciri khas kardiomiosit.

Morfologi sel secara keseluruhan tidak mengalami proses penyusutan atau pembengkakan yang signifikan. Stabilitas ini didukung oleh kandungan fiksatif NBF 10% yang memiliki pH netral 7,2-7,4 sehingga mengurangi kerusakan atau perubahan morfologi yang signifikan. Allimi dkk., (2023) menyatakan bahwa NBF 10% memiliki tingkat derajat keasaman yang mendekati netral (pH) sehingga dapat menjaga struktur jaringan tetap utuh. Chung *et al.*, (2018) menyatakan bahwa NBF 10% terdiri dari formalin yang dilarutkan dalam larutan *buffer* fosfat, yaitu campuran sodium fosfat dan disodium fosfat, yang dilarutkan dalam akuades. Formaldehida merupakan agen fiksatif yang bekerja dengan membentuk ikatan silang antara gugus amino protein dan asam nukleat, sehingga mampu menstabilkan struktur jaringan.

Interaksi formaldehida ke dalam sel bereaksi dengan berbagai gugus-gugus kima pada protein, utamanya gugus amino primer ($R-NH_2$) yang banyak ditemukan pada asam amino lisin. Interaksi ini melepaskan molekul air dan secara ireversibel membentuk jembatan metilen ($-CH_2-$) yang stabil dan kovalen, secara efektif dapat mengunci protein-protein tersebut pada posisinya. Khristian & Inderiati (2017) menyatakan bahwa keberadaan *buffer* mempertahankan pH larutan tetap netral untuk mencegah denaturasi protein, hal ini dikarenakan protein memiliki struktur yang sensitif terhadap pH. Stabilitas pH memungkinkan jaringan yang difiksasi dengan NBF 10% mampu menunjukkan bentuk sel dan inti sel yang mendekati kondisi fisiologis normal, dengan batas sel yang jelas serta ukuran sel yang relatif stabil tanpa pembengkakan atau penyusutan yang signifikan.

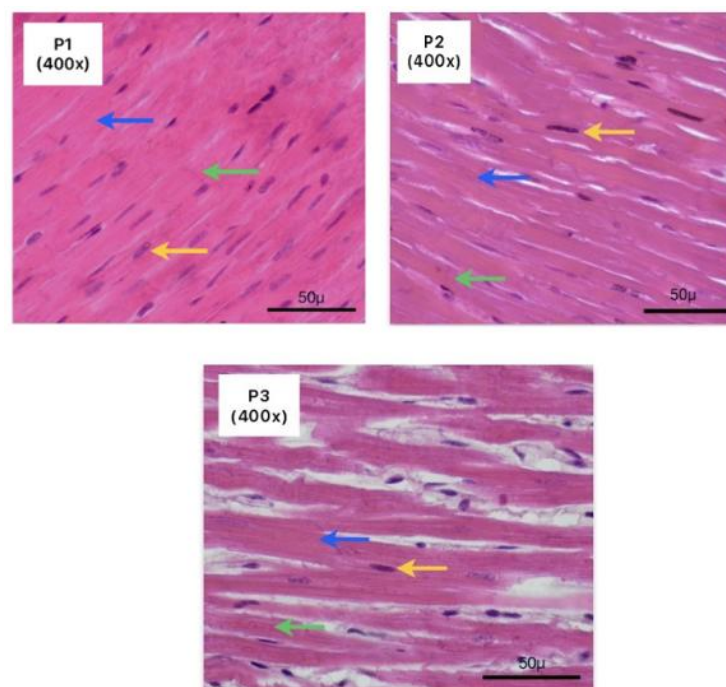
Kardiomiosit yang difiksasi dengan NBF 10% menunjukkan hasil pewarnaan inti sel yang baik berwarna biru keunguan. Warna ini merupakan hasil dari proses pewarnaan hematoxilin yang memiliki kemampuan mewarnai struktur basofilik. Hematoxilin akan berikatan dengan gugus fosfat dari asam nukleat sehingga menghasilkan warna biru keunguan. Rubina *et al.*, (2020) menyatakan bahwa struktur jaringan yang terwarnai biru

keunguan oleh hematoxilin disebut basofilik atau yang menyerap pewarna basa karena mengandung asam nukleat (DNA dan RNA). Sitoplasma kardiomiosit yang difiksasi dengan NBF 10% menunjukkan hasil pewarnaan tampak berwarna merah muda yang merupakan hasil dari pewarnaan eosin yang bersifat asam. Rubina *et al.*, (2020) menyatakan bahwa pewarna eosin bersifat asam yang bermuatan negatif.

Tabel 1. Data hasil analisis rata-rata ukuran sel dan ukuran inti sel melalui tahap pencucian (*washing*) setelah difiksasi dengan NBF 10%, bouin, dan etanol 50% selama satu minggu.

Variabel (μm)	NBF 10% $\bar{x} \pm \text{SD}$	Bouin $\bar{x} \pm \text{SD}$	Etanol 50% $\bar{x} \pm \text{SD}$
Ukuran diameter sel	$17,36^c \pm 0,35$	$30,98^b \pm 0,42$	$11,81^a \pm 0,25$
Ukuran panjang inti sel	$10,86^f \pm 0,34$	$12,92^e \pm 0,53$	$6,85^d \pm 0,35$
Ukuran lebar inti sel	$2,87^i \pm 0,52$	$3,93^h \pm 0,30$	$1,83^g \pm 0,21$

Keterangan : Data ditampilkan dalam bentuk rata-rata $\pm$ standar deviasi. Angka yang diikuti superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata. Hasil uji Anova menunjukkan berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$).



Gambar 1. Histologi sediaan kardiomiosit *R.norvegicus* umur 2 bulan setelah perlakuan fiksasi selama satu minggu dan melalui proses pencucian (*washing*) (pewarnaan HE, perbesaran 400x). Keterangan: P1. Perlakuan difiksasi dengan NBF 10%, P2. perlakuan dfiksasi dengan bouin, P3. perlakuan difiksasi dengan etanol 50%. Panah biru (sel kardiomiosit), panah kuning (inti sel kardiomiosit), panah hijau (diskus interkalaris)

Proses pencucian (*washing*) pada fiksatif NBF 10% menggunakan akuades, karena akuades merupakan air murni yang telah distilasi untuk menghilangkan zat-zat mineral dan garam, akuades juga termasuk pelarut dari NBF 10% yang bersifat netral. Tominik & Haiti (2020) menyatakan bahwa akuades memiliki pH netral dan tidak mengandung logam dan anion. Pencucian ini dapat meminimalisir kerusakan jaringan yang terjadi karena proses fiksasi yang terlalu lama sehingga kardiomiosit tidak rusak dan hasil pewarnaan preparat terlihat jelas.

Gambar histologi kardiomiosit *R. norvegicus* yang difiksasi dengan bouin (Gambar 1.) (P2) menunjukkan keutuhan potongan jaringan tampak utuh dan tidak hancur. Tampilan bentuk inti sel kardiomiosit tampak berbentuk oval. Pewarnaan inti sel tampak berwarna hitam dan beberapa inti sel tampak tidak terwarnai dengan sempurna. Inti sel berwarna gelap disebabkan karena asam pikrat pada bouin yang bereaksi dengan komponen inti sel sehingga menyebabkan tampak hitam. Allimi dkk., (2023) menyatakan bahwa bouin mengandung asam pikrat yang bereaksi dengan protein histon di dalam inti sel. Protein histon dapat menyebabkan struktur kromatin menjadi menggumpal dan dapat menarik lebih banyak pewarna hematoksilin sehingga membuat inti sel berwarna gelap atau kehitaman.

Tampilan bentuk sel kardiomiosit tampak sel utuh namun mengalami pembengkakan, hal ini dapat terjadi karena reaksi asam asetat di dalam bouin yang mampu menarik air ke dalam sel sehingga sel tampak membengkak. Kandungan asam asetat (CH_3COOH) pada bouin bereaksi dengan mengurangi ikatan antara molekul kolagen di dalam sel. Yohana (2017) menyatakan bahwa asam asetat dapat menurunkan pH lingkungan. Penurunan pH ini menyebabkan residu asam amino mengalami gangguan keseimbangan muatan elektrostatis. Gangguan ini membuat struktur kolagen menjadi lebih terbuka dan longgar dan memungkinkan molekul air masuk dan menyebabkan pembengkakan sel. Ami *et al.*, (2014) menyatakan bahwa asam asetat (CH_3COOH) menyebabkan pembengkakan sel karena interaksinya yang mengubah struktur protein dan kolagen sehingga memungkinkan air masuk ke

dalam sel. Tampilan diskus interkalaris pada preparat yang difiksasi dengan bouin tidak tampak jelas, hal ini kemungkinan dapat disebabkan oleh perubahan bentuk sel yang membengkak akibat fiksasi yang berlebihan dan koagulasi protein

Diskus interkalaris dapat mengalami kerusakan atau kehilangan detail struktural dan kontras warna akibat reaksi fiksasi yang terlalu lama. Mitrut *et al.*, (2018) menyatakan bahwa kardiomiosit yang rusak menunjukkan perubahan pada miosit dan komponen interstitial miokardial, terutama di bagian sitoplasma dan nukleus, termasuk hilangnya detail struktur halus seperti diskus interkalaris akibat perubahan morfologi sel. Kualitas pewarnaan sitoplasma menunjukkan hasil pewarnaan eosin yang baik karena adanya tahap pencucian (*washing*) yang dilakukan setelah fiksasi selama satu minggu.

Pencucian sediaan preparat menggunakan alkohol 70% lebih efektif dalam melarutkan dan menghilangkan pigmen kuning dari asam pikrat dibandingkan dengan penggunaan air biasa. Survarna *et al.*, (2019) menyatakan bahwa alkohol 70% membantu menetralkan reaksi kimia dari asam pikrat dan mengurangi risiko *over fixation* yang dapat menyebabkan pengerasan jaringan dan meningkatkan kualitas pewarnaan. Rusmiatik (2019) menyatakan bahwa pencucian dengan alkohol 70% setelah proses fiksasi menggunakan bouin bertujuan untuk menghilangkan residu asam pikrat yang menyebabkan jaringan berwarna kuning sehingga pewarnaan hematoksilin eosin tampak baik dan jelas.

Sediaan histologi kardiomiosit *R. norvegicus* yang difiksasi dengan etanol 50% (Gambar 1.) (P3) menunjukkan keutuhan potongan jaringan utuh dan tidak hancur. Tampilan bentuk sel tampak mengalami penyusutan secara signifikan, ditunjukkan dengan adanya rongga antar sel pada kardiomiosit. Penyusutan signifikan pada bentuk sel merupakan reaksi dari fiksatif etanol 50% dengan komponen sel. Protein memiliki banyak ikatan hydrogen, etanol 50% memiliki gugus hidroksil (OH) yang bersifat polar dan mampu membentuk ikatan hidrogen. Dewi & Komohara (2020) menyatakan bahwa molekul etanol yang masuk ke dalam lingkungan protein akan bersaing dengan gugus-gugus dalam protein untuk

membentuk ikatan hidrogen yang baru, sehingga dapat mengganggu dan merusak pola ikatan hidrogen asli di dalam protein. Gangguan ini menyebabkan perubahan bentuk protein (denaturasi) dan penggumpalan protein, sehingga mengakibatkan pengurangan volume sel dan pengerutan sel.

Tampilan diskus interkalaris pada preparat yang difiksasi dengan etanol 50% tidak tampak jelas, hal ini kemungkinan dapat disebabkan karena perubahan bentuk sel yang menyusut dan dehidrasi yang berlebihan. Murphy & Lazzara (2016) menyatakan bahwa paparan alkohol yang berkepanjangan dapat menyebabkan sel kardiomyosit mengalami perubahan struktur jaringan seperti penyusutan dan hilangnya detail morfologis.

Tampilan bentuk inti sel tampak mengalami perubahan morfologi yang signifikan, hal ini ditunjukkan dengan bentuk inti sel yang bervariasi. Fiksasi etanol 50% dapat menyebabkan dehidrasi sehingga ukuran inti sel lebih kecil dan bentuknya tidak beraturan. Penelitian yang dilakukan Nuralim *et al.*, (2017) menyatakan bahwa sifat denaturasi alkohol dalam preservasi jaringan dapat menyebabkan efek *shrinking* yang menyebabkan kerusakan jaringan dengan perubahan bentuk yang mengerut. Etanol merupakan fiksatif koagulan yang dapat membuat jaringan menjadi terlalu rapuh dan keras dan dapat menyebabkan kerusakan pada inti dan sitoplasma.

Tampilan warna inti sel menunjukkan warna yang lebih gelap atau pekat karena reaksi dehidrasi pada kromatin akibat fiksatif etanol 50% yang terlalu lama, Carson & Cappellano (2015) menyatakan bahwa fiksasi berlebihan dalam alkohol dapat menyebabkan penyusutan inti dan peningkatan intensitas pewarnaan karena dehidrasi kromatin. Tampilan warna sitoplasma yang difiksasi dengan etanol 50% menunjukkan hasil pewarnaan eosin yang baik dengan warna merah muda. Aryadi & Suryono (2017) menyatakan bahwa pewarnaan sitoplasma menggunakan eosin yang berperan sebagai pewarna asam, sehingga menghasilkan pewarnaan pada sel berwarna merah sampai merah muda.

KESIMPULAN

Gambaran sediaan histologi kardiomyosit *R. norvegicus* yang difiksasi dengan NBF 10% selama satu minggu melalui proses pencucian menghasilkan gambaran sediaan yang optimal tanpa kerusakan preparat yang signifikan. Gambaran sediaan histologi kardiomyosit *R. norvegicus* yang difiksasi dengan bouin dan etanol 50% selama satu minggu melalui proses pencucian menghasilkan gambaran sediaan dengan kerusakan yang signifikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas dukungan dana penelitian yang diberikan melalui PNPB DIPA Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro nomor 25.IV.A/UN7.F8/PP/II/2024.

DAFTAR PUSTAKA

- Allimi, H. S., Septhya, S. R. V., Apriliyani, T., Nuriliani, A., Retnoaji, B., Saragih, H., & Rohmah, Z. 2023. Larutan Fiksatif Makromolekul pada Sediaan Histologis. *Berkala Ilmiah Biologi*, 14(3): 41-49.
- Ami, D., Di, S. M., Forcella, M., Meraviglia, V., Baccarin, M., Doglia, S. M., & Terzoli, G. 2014. Role of Water in Chromosome Spreading and Swelling Induced by Acetic Acid Treatment: A FTIR Spectroscopy Study. *European Journal of Histochemistry*, 58(1): 33-39.
- Anthony, L., & Mescher, L. C. U. J. 2016. *Juqueira's Basic Histology Text and Atlas 14th Edition*. Mc Graw Hill Education, New York.
- Aryadi, T., & Suryono, H., 2017. Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode *Microwave* dan *Conventional Histoprocesing* Pewarnaan Hematoksilin Eosin. *Jurnal Labora Medika*, 1(1): 7-11.
- Carson, F. L., & Capellano, C. H. 2015. *Histotechnology. A Self-Instructional Text*. American Society Clinical Pathology, Chicago.
- Chung, J.Y., Song J. S., Ylaya, K., Sears, J. D., Choi, L., Cho, H., Rosenberg, A. Z., & Hewitt, S. M. 2018. Histomorphological and Molecular Assessments of the Fixation

- Times Comparing Formalin and Ethanol-Based Fixatives. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 66(2): 121-135.
- Daningsih, E., & Mardiyanningsih, A. N. 2021. Peningkatan Kompetensi Mahasiswa Prodi Pendidikan Biologi melalui Pembimbingan Pembuatan Preparat Awetan. *Pena Kreatif: Jurnal Pendidikan*, 10(2): 52-59.
- Dewi, A. K., & Komohara, C. A. 2020. Brain Structure Morphology after Being Fixated with Ethanol on Electron Microscope. *International Journal Morphol*, 38(2): 305-308.
- Ellywati. 2018. Penentuan Waktu yang Tepat pada Proses *Staining* dalam Pembuatan Preparat Histologi Hati. *Journal on Biology of Andalas University (JbioUA)*, 1(1): 28-30.
- García, M., Victory, N., Navarro-Sempere, A., & Segovia, Y. 2019. Students' Views on Difficulties in Learning Histology. *Anatomical Sciences Education*, 12(5): 541-549.
- Harijati, N., Samino, S., Indriyani, S., & Soewondo, A. 2017. *Mikroteknik Dasar*. UB Press, Malang.
- Howard, W., & Wilson, B. 2014. Tissue Fixation and the Effect of Molecular Fixatives on Downstream Staining Procedures. *Methods*, 70(1): 12-19.
- Iriani, D., & Yusfiati. 2015. *Buku Ajar Mikroteknik*. UR Press, Pekanbaru.
- Khristian, E., & Inderiati, D. 2017. *Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medis Sitohistoteknologi*. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Mitrut, R., Stepan, A. E., & Pirici, D. 2018. Histopathological Aspects of the Myocardium in Dilated Cardiomyopathy. *Current Health Sciences Journal*, 44(3): 243-249.
- Murphy, C., & Lazzara, R. 2016. Current Concepts of Anatomy and Electrophysiology the Sinus Node. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*, 46(1): 9-18.
- Mustami, M. K. 2017. Validitas Pengembangan Penuntun Praktikum Ilustratif Mikroteknik Hewan Berbasis Guided Inquiry. *Jurnal Ilmiah Pena*, 11(1): 75-83.
- Nuralim, E. R., Rahayu, I. D., & Bkti, R. S. 2017. Comparative Analysis of Fixation Using Carnoy Solution and Formalin Solution in Chicken Embryo's Somites, Neutral Tube, and Vascular Age of 48 Hours with Hematoksilin-Eosin Staining. *Majalah Kesehatan FKUB*, 4(1): 9-16.
- Pawlina, W., & Drake, R. L. 2016. Authentic Learning in Anatomy: A Primer on Pragmatism. *Anatomical Sciences Education*, 9(1): 5-7.
- Purba, E. E. D. A. M., Marbun, D. I., Lubis, A., Harianja, D., Herawati, N., & Sitorus, M. S. 2023. Perbandingan Efektivitas Fiksasi Alami Ekstrak Daun Kelor 75% dan NBF 10% pada Gambaran Makroskopis dan Mikroskopis Organ Manusia. *Maheesa: Malahayati Health Student Journal*, 3(9): 2858- 2875.
- Rubina, M. P., Khrisnan, A. M., Basheer, R., Safeer, M., & Soumya, V. 2020. Assesment of Staining Quality of Curcumin as as Substitute for Eosin in Hematoxyline and Eosin Staining in Histopathology. *Journal of Research in Medical and Dental Science*, 8(5): 146-150.
- Rusmiatik. 2019. Perbandingan Fiksasi Larutan Bouin dan Formalin pada Sediaan Preparat Histologi Testis Marmut. *Jurnal Kedokteran*, 4(2): 5-9.
- Rukminingsih, A. G., & Latief, M. A. 2020. Metode Penelitian Pendidikan. Penelitian Kuantitatif, Penelitian Kualitatif, Penelitian Tindakan Kelas. In *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9): 29-37.
- Santana, G. S., Fabio, A. A., Licinio, E., Maria L. B., Jemima F. R., Alexia, G., Ana L. M., & Katia, C. L. 2019. *Compared Anatomy and Histology between Mus musculus Mice (Swiss) and Rattus norvegicus Rats (Wistar)*. University of Rio de Janeiro, Brazil.
- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. 2019. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, Ophtalmic Pathology: The Evolution of Modern Concepts*. Elsevier, Amsterdam.
- Suyatno., & Gio, P. U. 2017. *Statistika Nonparametrik dengan SPSS, Minitab, dan R*. USU Press, Medan
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V. K., Joshua, E., Umadevi, K. R., & Kannan, R. 2012. Chemical and Physical Basics of Routine Formaldehyde Fixation. *Journal Oral Maxillofac Pathol*, 16(3): 400-405.
- Tominik, V. I. T., & Haiti, M. 2020. Limbah Air AC sebagai Pelarut Media *Sobouraud Dextrose Agar* (SDA) pada Jamur *Candida Albicans*. *Masker Medika*, 8(1): 121-132.
- Wulansari, N., Hasna, D., Rita, H., Tia, W. E., & Erisca, A. U. 2024. Analisis Kualitas Sediaan Histologi menggunakan *Beeswax Super*

Gambaran Sediaan Histologi Kardiomiosit Rattus norvegicus Setelah Difiksasi dengan NBF 10%, Bouin, dan Etanol 50% selama Satu Minggu

Grade sebagai Alternatif Pengganti Parafin dalam Proses *Embedding*. *Journal of Medical Studies*, 4(2): 97-104.

Yohana, W. 2017. Perbandingan Cairan Fiksasi Bouin dengan *Buffer* Formalin terhadap Hepar Tikus Putih. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*, 2(2): 97-101.