

Perbandingan Gambaran Mikroanatomi Lien Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Dengan Fiksatif yang berbeda

Microanatomic Comparison of White Rat Spleen (Rattus norvegicus) with different Fixatives

Lucia Francis, Muhammad Anwar Djaelani*

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Jacub Rais, Tembalang, Semarang

^{*)} Corresponding author(s) email: muhammad.anwar@live.undip.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini pembuatan preparat mikroskopis menggunakan metoda parafin. Fiksasi merupakan tahapan penting dalam pembuatan preparat untuk mempertahankan struktur jaringan mendekati kondisi aslinya. Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh jenis larutan fiksatif terhadap kualitas prepara mikroanatomi lien tikus putih (*Rattus norvegicus*). 10 lien dari 10 ekor tikus digunakan pada pembuatan preparat ini. Tiap lien dibagi 3 yang diperlakukan dengan tiga jenis larutan fiksatif yaitu Buffered Neutral Formalin (BNF) 10%, Bouin, dan etanol 50%, dengan durasi fiksasi selama satu minggu. Organ lien diisolasi kemudian dibuat preparat mikroskopis dengan metode parafin, difiksasi, dicuci (washing) sesuai perlakuan, kemudian diproses menjadi preparat mikroskopis. Rancangan yang digunakan penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap. Variabel yang diamati meliputi ukuran sel, ukuran inti sel dan tingkat kerusakan jaringan. Hasil dianalisis dengan ANOVA dan uji lanjut Duncan dengan menggunakan perangkat lunak SPSS Hasil penelitian menunjukkan menunjukkan bahwa BNF 10% menghasilkan kualitas preparat terbaik, ditandai oleh struktur jaringan dan komponen seluler yang lebih jelas serta integritas organ yang lebih terjaga. Sebaliknya, etanol 50% menghasilkan kerusakan jaringan dan artefak paling nyata. Secara kuantitatif, larutan Bouin menunjukkan penyusutan (shrinkage) ukuran sel dan inti sel paling kecil dibandingkan kedua fiksatif lainnya. Dapat disimpulkan Etanol 50% tidak direkomendasikan untuk fiksasi jaringan jangka panjang karena memicu distorsi dan penyusutan sel yang ekstrem. Durasi fiksasi yang lama membutuhkan modifikasi proses washing untuk meluruhkan sisa bahan fiksatif reaktif. Penambahan waktu washing terbukti efektif menjaga kualitas pewarnaan HE dan keutuhan struktur mikroskopis, di mana BNF 10% yang dikombinasikan dengan pencucian akuades memberikan hasil preparat yang paling optimal pada durasi fiksasi satu minggu.

Kata kunci: BNF 10%, Boiun, Etanol 50 %, ukuran sel

ABSTRACT

This study used the paraffin method to prepare microscopic slides. Fixation is a crucial step in slide preparation to maintain tissue structure close to its original state. This study aimed to analyze the effect of fixative solution types on the quality of microanatomic prepare of white rat (*Rattus norvegicus*) spleens. Ten spleens from ten rats were used in this slide preparation. Each spleen was divided into three sections and treated with three fixative solutions: 10% Buffered Neutral Formalin (BNF), Bouin's, and 50% ethanol, with a fixation duration of one week. The spleen was isolated, then microscopic slides were prepared using the paraffin method, fixed, washed according to the treatment, and then processed into microscopic slides. The design used in this study was a Completely Randomized Design. Observed variables included cell size, cell nucleus size, and the degree of tissue damage. The results were analyzed using ANOVA and Duncan's test using SPSS software. The results showed that 10% BNF produced the best quality preparations, characterized by clearer tissue structure and cellular components, and better preserved organ integrity. In contrast, 50% ethanol produced the most tissue damage and artifacts. Quantitatively, Bouin's solution showed the least shrinkage in cell size and cell nuclei compared to the other two fixatives. It can be concluded that 50% ethanol is not recommended for long-term tissue fixation because it causes extreme cell distortion and shrinkage. Long fixation durations require modifications to the washing process to remove residual reactive fixatives. Increasing the washing time proved effective in maintaining the quality of HE staining and microscopic structural integrity, with 10% BNF combined with aquadest washing producing optimal preparation results at a fixation duration of one week.

Keywords: bouin, cell size, etanol 50%, NBF 10%

PENDAHULUAN

Metode yang digunakan dalam pembuatan preparat histologi memiliki berbagai variasi, dengan metode parafin sebagai teknik yang paling sering digunakan karena mampu menghasilkan irisan tipis secara konsisten. Metode parafin memanfaatkan parafin sebagai media embedding untuk menghasilkan preparat permanen (Faluti dkk., 2022; Wahyuni & Saputra, 2023). Tahapan pembuatan preparat dengan metode parafin secara berurutan mencakup fixation, dehydration, clearing, infiltration, embedding, mikrotomi, serta staining (Faraditha & Nailufar, 2022; Astuti dkk., 2021).

Fiksasi merupakan tahapan krusial yang bertujuan untuk mengawetkan elemen histologis dan sitologis, menghentikan proses metabolisme secara cepat, memberikan konsistensi material lunak melalui koagulasi protoplasma, serta mempertahankan bentuk asli jaringan yang akan diamati (Kusuma dkk., 2021). Efektivitas fiksasi sangat ditentukan oleh jenis larutan fiksatif yang digunakan. Bahan fiksatif dibagi menjadi dua, yaitu bahan fiksatif sederhana yang terdiri dari satu macam zat (seperti etanol dan formalin) dan bahan fiksatif campuran yang terbentuk dari lebih dari satu macam zat (seperti larutan Bouin) (Rusmiatik, 2019; Utami dkk., 2020).

Neutral Buffered Formalin (BNF) 10% merupakan standar emas (gold standard) fiksatif karena mempertahankan morfologi sel dengan baik tanpa menyebabkan distorsi berlebihan. Larutan Bouin sering dipilih untuk mempertahankan struktur jaringan lunak dan pewarnaan nuklear yang tajam, sementara etanol 50% mewakili kelompok fiksatif koagulan berbasis alkohol yang bekerja dengan mendehidrasi dan mendenaturasi protein jaringan (Yuliana dkk., 2021; Lestari & Santoso, 2023). Setelah fiksasi, tahapan washing atau pencucian diperlukan untuk menghilangkan kelebihan cairan fiksatif—khususnya pada fiksatif kuat seperti BNF dan Bouin—guna mencegah terbentuknya artefak kristal atau gangguan pada proses pewarnaan berikutnya (Ihsan dkk., 2018; Pratiwi dkk., 2020).

Organ lien (limpa) merupakan salah satu organ limfoid sekunder yang memiliki peran ganda yang sangat penting, yaitu melakukan hematopoiesis (bersama sumsum tulang belakang) dan mendukung sistem imunitas tubuh (Rizkindra dkk., 2019; Hidayat dkk., 2022). Organ limfoid memiliki struktur parenkim yang kaya akan sel darah merah dan putih serta komponen retikuler yang sangat sensitif terhadap kualitas fiksasi, sehingga perubahan kecil pada metode

fiksasi dapat berdampak besar pada kejelasan mikroanatomi pulpa putih dan pulpa merah.

Berbagai penelitian mengenai fiksasi histologis telah banyak dipublikasikan, telaah mendalam terhadap literatur yang ada menunjukkan adanya beberapa kesenjangan signifikan yang belum terjawab. Sebagian besar penelitian terdahulu umumnya terbatas pada perbandingan dua jenis fiksatif saja (misalnya antara BNF 10% dan formalin biasa) dan hampir selalu menggunakan organ dengan struktur padat seperti hepar atau ginjal (Setiawan dkk., 2022). Belum banyak studi yang secara simultan mengomparasikan efektivitas fiksatif non-koagulan (BNF 10%), fiksatif campuran asam (Bouin), dan fiksatif koagulan ringan (etanol 50%) pada organ limfoid yang kaya sel darah seperti lien tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Mayoritas protokol menetapkan durasi fiksasi standar selama 24 jam, padahal, dalam kondisi nyata di lapangan, ekspedisi spesimen, atau keterbatasan operasional laboratorium, durasi fiksasi sering kali terabaikan dan berlangsung jauh lebih lama (over-fixation). Literatur mengenai dampak paparan fiksatif jangka panjang (mencapai satu minggu) terhadap integritas jaringan limfoid masih sangat terbatas.

Evaluasi mengenai efektivitas penambahan tahap washing (pencucian) untuk meminimalisasi sisa bahan kimia akibat fiksatif kuat berdurasi panjang masih jarang diintegrasikan dalam parameter pengujian kualitas mikroskopis secara komprehensif. Urgensi penggunaan waktu fiksasi selama satu minggu didasarkan pada kebutuhan untuk mengevaluasi dampak fiksasi berkepanjangan terhadap kualitas jaringan lien serta batas toleransi jaringannya (Nugroho dkk., 2023). Berdasarkan uraian kesenjangan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan penggunaan fiksatif BNF 10%, Bouin, dan etanol 50% selama satu minggu pada organ lien tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan penambahan tahapan washing pada BNF 10% dan Bouin. Evaluasi dilakukan secara operasional melalui parameter kualitatif (tingkat kejelasan struktur mikroskopis pulpa putih, pulpa merah, integritas membran sel, dan ada tidaknya artefak fiksasi) serta parameter kuantitatif (tingkat susut atau perubahan dimensi jaringan serta kualitas ketajaman pewarnaan Hematoxylin-Eosin). Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh jenis larutan fiksatif terhadap kualitas preparat mikroanatomi lien tikus putih (*Rattus norvegicus*).

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Mei 2024 di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan, Universitas Diponegoro. Kegiatan penelitian meliputi isolasi organ lien tikus putih (*Rattus norvegicus*), fiksasi jaringan, pembuatan preparat histologis, pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE), dan pengamatan mikroanatomi jaringan.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan gabungan dari penelitian kualitatif dan kuantitatif. Variabel yang diamati pada penelitian ini terbagi menjadi kenampakan jaringan yang mencakup keutuhan potong, bentuk sel dan inti sel, dan tampilan zat warna untuk analisis kualitatif serta diameter sel dan diameter inti sel untuk variabel kuantitatif. Variabel kualitatif dianalisis secara deskriptif sedangkan variabel kuantitatif dianalisis menggunakan uji Anova dengan taraf signifikansi 5% menggunakan perangkat lunak SPSS. Perlakuan pada organ target mencakup: P1 (Perlakuan dengan fiksatif BNF 10% + washing); P2 (Perlakuan dengan fiksatif Bouin + washing); P3 (Perlakuan dengan fiksatif etanol 50%). Dilakukan pengulangan 10 kali terhadap setiap perlakuan.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan meliputi botol sampel, alat bedah, mikrotom, water bath, oven, inkubator, kaca objek, kaca penutup, mikroskop Olympus CX23, kamera Optilab, dan laptop. Bahan yang digunakan meliputi organ lien tikus putih (*Rattus norvegicus*), Buffered Neutral Formalin (BNF) 10%, larutan Bouin, etanol 50%, larutan garam fisiologis, akuades, alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, dan absolut), xilol, parafin dengan titik leleh 56 °C, albumin, Hematoksilin Mayer, Eosin, dan medium mounting Entellan.

Prosedur Penelitian

Pembuatan preparat histologis lien dilakukan menggunakan metode parafin dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE), mengacu pada Wulandari dkk. (2016), Chung et al. (2017), dan Harijati dkk. (2017) dengan modifikasi. Penelitian menggunakan tiga perlakuan, yaitu P1 berupa fiksasi menggunakan BNF 10% yang dilanjutkan dengan pencucian (washing), P2 berupa fiksasi menggunakan larutan Bouin yang dilanjutkan dengan pencucian, dan P3 berupa

fiksasi menggunakan etanol 50% tanpa pencucian. Setiap perlakuan diulang sebanyak 10 kali.

Isolasi dan Fiksasi Organ

Tikus diberikan anestesi inhalasi menggunakan kloroform hingga kehilangan kesadaran, kemudian dibedah untuk mengisolasi organ lien dari bagian kiri atas rongga abdomen. Organ dibersihkan menggunakan larutan garam fisiologis untuk menghilangkan darah dan kotoran yang menempel. Selanjutnya, jaringan direndam dalam larutan fiksatif dengan volume 25–30 kali volume jaringan selama satu minggu pada suhu ruang. Sebanyak sembilan botol sampel disiapkan, masing-masing tiga botol untuk BNF 10%, larutan Bouin, dan etanol 50%.

Pencucian (washing)

Setelah fiksasi, jaringan pada perlakuan BNF 10% dicuci menggunakan akuades, sedangkan jaringan pada perlakuan Bouin dicuci menggunakan alkohol 70%. Pencucian dilakukan sebanyak empat kali, masing-masing selama 30 menit. Jaringan yang difiksasi menggunakan etanol 50% tidak menjalani tahap pencucian.

Pembuatan Preparat Histologis

Jaringan didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, dan 95%, masing-masing selama 30 menit, kemudian direndam dalam alkohol absolut I dan II selama satu jam untuk setiap tahap. Penjernihan (clearing) dilakukan menggunakan campuran xilol dan etanol absolut (1:1) selama 30 menit, dilanjutkan dengan xilol I dan II, masing-masing selama satu jam.

Infiltrasi dilakukan menggunakan parafin dengan titik leleh 56 °C selama 30 menit hingga satu jam di dalam oven. Penggantian parafin dilakukan hingga dua kali. Jaringan kemudian ditanam dalam cetakan blok parafin, diatur sesuai orientasi yang diinginkan, dan didinginkan hingga parafin mengeras. Blok parafin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan irisan [isi ketebalan sebenarnya]. Irisan jaringan direntangkan dalam water bath bersuhu 40–45 °C, ditempelkan pada kaca objek yang telah dilapisi albumin, kemudian dikeringkan selama 60 menit dalam inkubator bersuhu 40 °C.

Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Deparafinisasi dilakukan dengan merendam preparat dalam xilol sebanyak dua kali, masing-masing selama 10 menit. Rehidrasi dilakukan menggunakan alkohol absolut I dan II, masing-masing selama lima menit, dilanjutkan dengan alkohol 95% dan 70%, masing-masing

selama dua menit. Preparat dibilas menggunakan akuades dan diwarnai dengan Hematoksin Mayer selama delapan menit. Selanjutnya, preparat dibilas dengan air mengalir selama 10 menit, dicuci menggunakan akuades, kemudian dicelupkan sebanyak 10 kali ke dalam etanol 95%. Pewarnaan dilanjutkan dengan perendaman dalam Eosin selama satu menit. Preparat kemudian didehidrasi menggunakan alkohol 95% dan alkohol absolut I serta II, masing-masing selama lima menit, dijemur menggunakan xilol sebanyak dua kali selama lima menit, lalu ditutup menggunakan medium mounting Entellan dan kaca penutup.

Pengamatan dan Analisis Data

Preparat histologis diamati menggunakan mikroskop Olympus CX23 yang dilengkapi kamera Optilab dan terhubung dengan laptop. Pengamatan kualitatif meliputi keutuhan potongan jaringan, bentuk sel dan inti sel, serta tampilan pewarnaan. Pengamatan kuantitatif dilakukan dengan mengukur diameter sel dan diameter inti sel. Data kualitatif dianalisis secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif dianalisis menggunakan analisis varians (analysis of variance/ANOVA) pada taraf signifikansi 5% dengan bantuan perangkat lunak SPSS. Setiap potongan organ menghasilkan tiga irisan mikroskopis sehingga total diperoleh 30 preparat. Setiap preparat diamati di lima tempat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Diameter Sel Lien

Hasil pengukuran diameter sel lien tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah fiksasi selama satu minggu menggunakan BNF 10%, larutan Bouin, dan etanol 50% disajikan pada Tabel 1. Hasil analisis one-way ANOVA menunjukkan adanya perbedaan signifikan diameter sel lien antarperlakuan ($p < 0,05$). Diameter sel terbesar ditemukan pada perlakuan Bouin, yaitu $4,19 \pm 0,32 \mu\text{m}$, diikuti BNF 10% sebesar $3,94 \pm 0,31 \mu\text{m}$. Sementara itu, diameter sel terkecil ditemukan pada perlakuan etanol 50%, yaitu $3,64 \pm 0,27 \mu\text{m}$. Berdasarkan notasi superskrip, perlakuan BNF 10% dan Bouin tidak berbeda nyata, tetapi keduanya berbeda nyata dengan etanol 50%. Hasil ini menunjukkan bahwa diameter sel pada perlakuan BNF 10% dan Bouin relatif sebanding secara statistik, sedangkan etanol 50% menghasilkan ukuran sel yang lebih kecil. Hasil pengamatan histologi lien pada berbagai perlakuan fiksatif disajikan pada Gambar 1, 2, dan 3.

Perbedaan diameter sel antarperlakuan dapat berkaitan dengan mekanisme kerja masing-

masing larutan fiksatif. Fiksasi bertujuan mempertahankan struktur jaringan agar mendekati kondisi aslinya sebelum mengalami proses histologis berikutnya. Akan tetapi, setiap fiksatif memiliki mekanisme yang berbeda dalam berinteraksi dengan protein dan komponen seluler sehingga dapat menghasilkan perubahan morfologi yang berbeda pula (Musyarifah & Agus, 2018; Dey, 2018). Oleh karena itu, perbedaan ukuran sel pada penelitian ini perlu diinterpretasikan sebagai salah satu indikator perubahan morfometri akibat keseluruhan prosedur fiksasi dan pemrosesan jaringan.

Perlakuan etanol 50% menghasilkan diameter sel terkecil, yaitu $3,64 \pm 0,27 \mu\text{m}$. Etanol merupakan fiksatif yang bekerja melalui mekanisme dehidrasi dan pengendapan protein. Proses tersebut dapat memengaruhi volume sel dan menyebabkan perubahan struktur jaringan, termasuk penyusutan (shrinkage) (Dey, 2018). Diameter sel yang lebih kecil pada perlakuan etanol 50% diduga berkaitan dengan perubahan tersebut. Namun, penyusutan tidak dapat dipastikan hanya berdasarkan diameter sel karena perubahan ukuran juga dapat dipengaruhi oleh tahap dehidrasi, penjemuran, infiltrasi parafin, dan pemotongan jaringan.

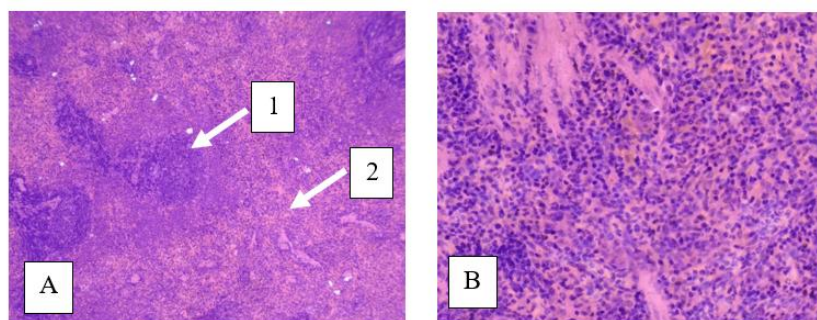
Selain perubahan ukuran, perlakuan etanol 50% menunjukkan kerusakan jaringan yang lebih nyata secara kualitatif. Hal ini menunjukkan bahwa penilaian kualitas preparat tidak cukup hanya berdasarkan hasil pengukuran diameter sel. Keutuhan jaringan, kejelasan batas sel, bentuk inti, dan kualitas pewarnaan juga perlu dipertimbangkan. Preparat dengan diameter sel yang masih dapat diukur belum tentu memiliki struktur jaringan yang terpelihara dengan baik apabila terdapat kerusakan pada komponen seluler lainnya. Larutan Bouin menghasilkan diameter sel terbesar, yaitu $4,19 \pm 0,32 \mu\text{m}$. Nilai tersebut secara numerik lebih tinggi daripada BNF 10% dan etanol 50%, tetapi tidak berbeda nyata dengan BNF 10%.

Larutan Bouin mengandung formaldehida, asam pikrat, dan asam asetat yang berperan dalam proses preservasi jaringan melalui mekanisme berbeda. Kombinasi komponen tersebut dapat membantu mempertahankan karakteristik morfologi tertentu, tetapi hasil akhirnya tetap dipengaruhi oleh durasi fiksasi dan tahapan pemrosesan berikutnya (Singhal et al., 2016; Rusmiatik, 2019). Dengan demikian, diameter sel yang lebih besar pada perlakuan Bouin tidak secara langsung menunjukkan bahwa larutan tersebut merupakan fiksatif terbaik untuk seluruh parameter mikroanatomi.

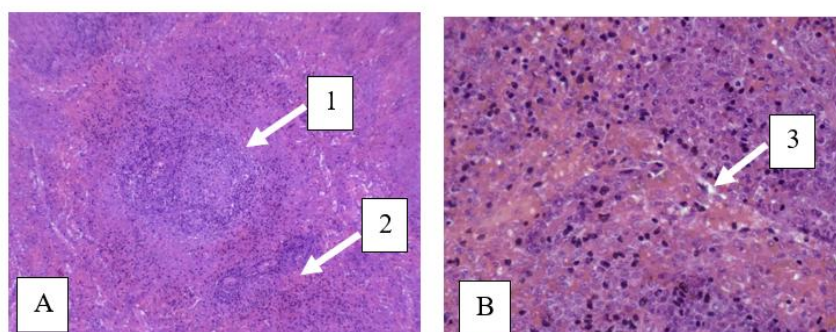
Tabel 1. Diameter Sel Lien Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) pada Berbagai Perlakuan

No.	Perlakuan	Diameter sel (μm)
1	BNF 10%	$3,94^b \pm 0,31$
2	Bouin	$4,19^b \pm 0,32$
3	Etanol 50%	$3,64^a \pm 0,27$

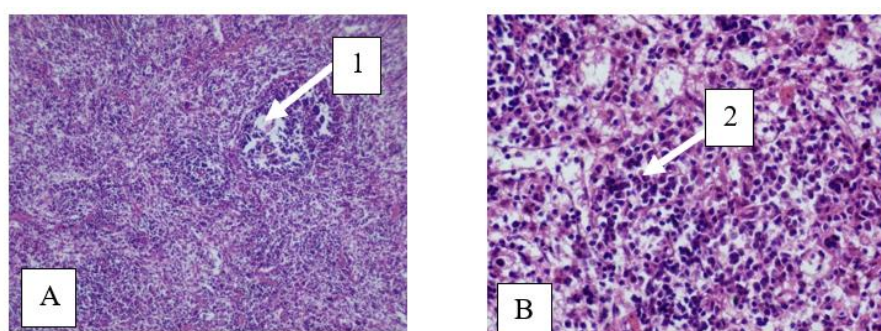
Keterangan: Data ditampilkan dalam rata-rata $\pm$ standar deviasi. Hasil uji ANOVA menunjukkan berbeda signifikan pada taraf signifikan 5% ($P < 0,05$). Angka yang diikuti superskrip berbeda menunjukkan perbedaan signifikan



Gambar 1. Kenampakan preparat jaringan lien tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE pada perlakuan BNF 10%. Keterangan: A. Perlakuan BNF 10% selama satu minggu ditambah washing, perbesaran 100x; B. Perlakuan BNF 10% selama satu minggu ditambah washing, perbesaran 400x; 1. Pulpa putih; 2. Pulpa merah.



Gambar 2. Kenampakan preparat jaringan lien tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE pada perlakuan Bouin. Keterangan: A. Perlakuan Bouin selama satu minggu ditambah washing, perbesaran 100x; B. Perlakuan Bouin selama satu minggu ditambah washing, perbesaran 400x; 1. Pulpa putih; 2. Pulpa merah.



Gambar 3. Kenampakan preparat jaringan lien tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE pada perlakuan Etano 50%. Keterangan: A. Perlakuan Etano 50% selama satu minggu ditambah washing, perbesaran 100x; B. Perlakuan Etanol 50% selama satu minggu ditambah washing, perbesaran 400x; 1. Pulpa putih; 2. Pulpa merah

Secara kualitatif, preparat dengan BNF 10% dan pencucian menggunakan akuades menunjukkan struktur pulpa putih dan pulpa merah lien yang lebih jelas, rongga mikroskopis yang relatif sedikit, serta kontras pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) yang baik. Formaldehida dalam BNF bekerja terutama melalui pembentukan ikatan silang (cross-linking) dengan protein sehingga membantu mempertahankan struktur jaringan. Mekanisme tersebut mendukung preservasi hubungan antarkomponen jaringan selama pemrosesan histologis. Meskipun demikian, fiksasi yang terlalu lama dapat menyebabkan perubahan sifat jaringan, termasuk pengerasan dan perubahan karakteristik pewarnaan (Rahmadani dkk., 2018; Hardi dkk., 2024; Qatrunnada Salsabila et al., 2023).

Durasi fiksasi merupakan faktor penting yang perlu dipertimbangkan dalam interpretasi hasil. Fiksasi yang tidak sesuai dapat memengaruhi arsitektur jaringan dan menimbulkan perubahan morfologi yang berdampak pada pengamatan mikroskopis (Musyarifah & Agus, 2018; Rahmadani dkk., 2018). Virgiawan dkk. (2024) menyatakan bahwa waktu fiksasi berkisar antara 6–24 jam dapat digunakan untuk memperoleh detail sitoplasma dan inti sel

yang baik dalam kondisi penelitian yang mereka lakukan. Fiksasi lebih dari 24 jam juga dapat memengaruhi kualitas morfologi jaringan, bergantung pada jenis fiksatif dan karakteristik sampel (Hardi dkk., 2024; Qatrunnada Salsabila et al., 2023). Akan tetapi, penelitian ini hanya menggunakan durasi fiksasi satu minggu sehingga pengaruh durasi tidak dapat dipisahkan secara langsung dari pengaruh jenis fiksatif dan prosedur pencucian.

Diameter Inti Sel Lien

Hasil pengukuran diameter inti sel disajikan pada Tabel 2. Diameter inti sel pada perlakuan Bouin secara numerik lebih besar, yaitu $1,27 \pm 0,09$ μm , dibandingkan perlakuan BNF 10% sebesar $1,22 \pm 0,11$ μm . Namun, hasil uji Independent Samples T-test menunjukkan bahwa perbedaan tersebut tidak signifikan ($p > 0,05$). Dengan demikian, berdasarkan parameter diameter inti sel, kedua perlakuan tidak menunjukkan perbedaan statistik yang nyata. Hasil tersebut tidak berarti bahwa semua karakteristik inti dan jaringan pada kedua perlakuan identik karena aspek lain, seperti bentuk inti, kejelasan batas inti, integritas jaringan, dan intensitas pewarnaan, tetap dapat menunjukkan perbedaan.

Tabel 2. Diameter Inti Sel Lien Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) pada Berbagai Perlakuan

No.	Perlakuan	Diameter inti sel (μm)
1	BNF 10%	$1,22 \pm 0,11$
2	Bouin	$1,27 \pm 0,09$
3	Etanol 50%	-

Keterangan: Data ditampilkan dalam rata-rata $\pm$ standar deviasi. Hasil uji Independent T test menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan pada taraf signifikansi 5% ($P < 0,05$)

Inti sel merupakan salah satu komponen penting dalam evaluasi kualitas preparat histologis karena bentuk, ukuran, dan batasnya dapat digunakan untuk mengidentifikasi karakteristik sel. Pemeliharaan struktur inti yang baik memungkinkan pengamatan morfologi dilakukan secara lebih akurat. Sebaliknya, perubahan bentuk inti atau hilangnya batas inti dapat menyulitkan identifikasi dan pengukuran morfometri. Oleh karena itu, hasil pengukuran diameter inti sel perlu dipertimbangkan bersama pengamatan kualitatif terhadap bentuk dan kejelasan struktur inti (Dey, 2018; Suvarna et al., 2019).

Pada perlakuan etanol 50%, inti sel mengalami fragmentasi atau karioreksis sehingga diameter inti tidak dapat diukur. Karioreksis merupakan perubahan morfologi berupa

fragmentasi materi inti yang menyebabkan struktur inti tidak lagi tampak utuh. Kondisi tersebut menunjukkan keterbatasan perlakuan etanol 50% dalam menghasilkan preparat yang memungkinkan pengukuran inti sel secara konsisten. Mekanisme dehidrasi dan pengendapan protein akibat etanol dapat berkontribusi terhadap perubahan morfologi sel (Dey, 2018; Anggrawati, 2018). Namun, karena mekanisme kerusakan tidak diukur secara langsung, hubungan tersebut merupakan interpretasi berdasarkan karakteristik fiksatif dan hasil pengamatan, bukan bukti bahwa etanol merupakan satu-satunya penyebab kerusakan inti.

Tidak tersedianya nilai diameter inti sel pada perlakuan etanol 50% juga perlu diperlakukan secara berbeda dari data numerik

yang hilang secara acak. Ketidakmampuan melakukan pengukuran disebabkan oleh kondisi morfologi inti yang tidak memungkinkan batas inti diidentifikasi dengan jelas. Oleh karena itu, nilai tersebut tidak boleh diganti dengan angka perkiraan atau dianggap bernilai nol. Temuan ini justru merupakan hasil pengamatan kualitatif yang relevan untuk menunjukkan keterbatasan perlakuan tersebut dalam mempertahankan struktur inti.

Berdasarkan pengamatan kualitatif dalam penelitian ini, BNF 10% dengan pencucian menggunakan akuades menghasilkan gambaran jaringan yang relatif lebih jelas dan integritas organ yang lebih baik. Kejelasan struktur tersebut mendukung pengamatan komponen mikroanatomi lien. Hasil ini menunjukkan bahwa evaluasi fiksatif perlu mempertimbangkan kemampuan mempertahankan arsitektur jaringan, bukan hanya ukuran morfometrik. Sebagaimana dijelaskan oleh Suvarna et al. (2019), kualitas preparat histologis dipengaruhi oleh berbagai tahapan, mulai dari fiksasi hingga pewarnaan, sehingga hasil akhir perlu dinilai berdasarkan beberapa karakteristik secara bersamaan.

Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) juga berperan penting dalam memperjelas komponen seluler. Hematoksilin terutama mewarnai inti sel, sedangkan eosin memberikan warna pada sitoplasma dan berbagai komponen jaringan. Kontras yang baik membantu membedakan inti dan sitoplasma serta memudahkan pengamatan struktur jaringan. Sebaliknya, pewarnaan yang tidak merata atau perubahan karakteristik jaringan setelah fiksasi dapat mengurangi kejelasan gambaran mikroskopis (Dey, 2018; Suvarna et al., 2019). Oleh sebab itu, kontras pewarnaan yang baik pada perlakuan BNF 10% menjadi salah satu indikator pendukung kualitas preparat secara kualitatif.

Rongga mikroskopis atau artefak yang ditemukan pada preparat Bouin perlu ditafsirkan secara hati-hati. Artefak histologis dapat terbentuk selama pengambilan jaringan, fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, pemotongan, maupun pewarnaan. Dengan demikian, keberadaan rongga tidak selalu menunjukkan bahwa fiksatif merupakan satu-satunya penyebab perubahan tersebut (Dey, 2018; Singhal et al., 2016). Pada penelitian ini, rongga mikroskopis pada perlakuan Bouin menjadi salah satu pertimbangan dalam penilaian kualitas kualitatif, meskipun perlakuan tersebut menghasilkan diameter sel terbesar.

Tahap pencucian dilakukan untuk mengurangi residu fiksatif sebelum jaringan menjalani proses dehidrasi dan pemrosesan selanjutnya. Pada perlakuan BNF 10%, pencucian menggunakan akuades bertujuan mengurangi sisa formalin bebas dalam jaringan (Dey, 2018). Pencucian yang sesuai dapat membantu mempersiapkan jaringan untuk tahap berikutnya, tetapi tidak dapat diasumsikan sepenuhnya menghentikan reaksi fiksasi atau membalikkan kerusakan yang telah terjadi. Oleh karena itu, kualitas preparat BNF 10% dalam penelitian ini perlu dikaitkan dengan keseluruhan prosedur yang digunakan, bukan hanya tahap pencucian.

Pada perlakuan Bouin, pencucian menggunakan alkohol 70% bertujuan mengurangi residu asam pikrat. Residu asam pikrat dapat memengaruhi warna dasar jaringan dan mengganggu interpretasi hasil pewarnaan apabila tidak dihilangkan secara memadai (Rolls, 2024; Suvarna et al., 2019). Pengurangan residu tersebut menjadi salah satu pertimbangan penting dalam menghasilkan preparat dengan kontras warna yang baik. Djaelani dkk. (2025) juga menjadi rujukan yang perlu dipertimbangkan dalam pembahasan mengenai pengaruh pemrosesan jaringan terhadap hasil pewarnaan. Namun, pengaruh pencucian terhadap kualitas preparat belum dapat dinyatakan secara terpisah dalam penelitian ini karena setiap jenis fiksatif menggunakan prosedur pencucian yang berbeda.

Perbedaan prosedur tersebut merupakan keterbatasan rancangan penelitian yang perlu diperhatikan. Perlakuan BNF 10% disertai pencucian menggunakan akuades, Bouin disertai pencucian menggunakan alkohol 70%, sedangkan etanol 50% tidak melalui tahap pencucian. Dengan demikian, perbedaan hasil yang ditemukan merepresentasikan kombinasi jenis fiksatif dan prosedur pencucian. Penelitian ini belum dapat memastikan apakah perbedaan kualitas preparat semata-mata disebabkan oleh jenis fiksatif, prosedur pencucian, atau interaksi antara kedua faktor tersebut.

KESIMPULAN

Etanol 50% tidak direkomendasikan untuk fiksasi jaringan jangka panjang karena memicu distorsi dan penyusutan sel yang ekstrem. Durasi fiksasi yang lama membutuhkan modifikasi proses washing untuk meluruhkan sisa bahan fiksatif reaktif. Penambahan waktu washing terbukti efektif menjaga kualitas pewarnaan HE dan keutuhan struktur mikroskopis, fiksatif BNF 10% yang dikombinasikan dengan pencucian akuades

memberikan hasil preparat yang paling optimal pada durasi fiksasi satu minggu

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, R., Rahmawati, I., & Susilo, B. (2021). *Teknik Pembuatan Preparat Histologi Organ Hewan*. Deepublish.
- Chung, J. Y., Song, J. S., Ylaya, K., Sears, J. D., Choi, L., Cho, H., Rosenberg, A. Z., & Hewitt, S. M. (2017). Histomorphological and molecular assessments of the fixation times comparing formalin and ethanol-based fixatives. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 66(2), 121–135. <https://doi.org/10.1369/0022155417743132>
- Dey, P. (2018). *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytopathology*. Springer Nature.
- Djaelani, M. A., Tana, S., & Mardiaty, S. M. (2025). Gambaran preparat histologis hepar tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) yang dibuat menggunakan beberapa fiksatif dan proses pencucian. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 10(1). <https://doi.org/10.14710/baf.10.1.2025.48-54>
- Faluti, A., Mardawati, V., & Fatmawilda. (2022). Pemanfaatan asam nitrat sebagai larutan pelunak organ tumbuhan pada metode parafin. *Indonesian Journal of Laboratory*, 5(3), 98–104. <https://doi.org/10.22146/ijl.v5i3.78678>
- Faluti, A., Yanti, F., & Marlina, L. (2022). Efektivitas media embedding jaringan hewan dalam pembuatan preparat permanen metode parafin. *Jurnal Biologi Tropis*, 22(1), 112–119. <https://doi.org/10.29303/jbt.v22i1.3190>
- Faraditha, Y. E., & Nailufar, Y. (2022). *Literature review: Perbandingan kualitas preparat jaringan menggunakan xylene dan larutan pencuci piring pada proses deparafinasi* [Naskah tidak dipublikasikan / Manuscript]. Prodi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.
- Hardi, E. H. (2024). Kerusakan arsitektur jaringan akibat durasi fiksasi formalin berlebih. *Jurnal Ilmu Biologi dan Sains*.
- Hardi, Z., Wiryanti, W., Durachim, A., & Rahmat, M. (2024). Efek penggunaan ulang larutan fiksatif formalin pada kualitas preparat histopatologi dan jumlah limbah yang dihasilkan. *Current Biomedicine*, 2(2).
- Harijati, N., Samino, S., Indriyani, S., & Soewondo, A. (2017). *Mikroteknik Dasar*. UB Press.
- Hidayat, M., Syahputra, A., & Handayani, R. (2022). Peran imunologis organ limfoid sekunder pada tikus galur Wistar. *Jurnal Biomedik Indonesia*, 14(1), 88–95.
- Ihsan, M., Arifin, Z., & Handayani, S. (2018). Pengaruh pencucian (washing) setelah fiksasi formalin terhadap kualitas artefak pewarnaan HE. *Jurnal Laboratorium Medik*, 6(1), 15–22.
- Ihsan, M., Istiyati, & Muliasari, H. (2018). Morfologi dan histologi hepatopankreas (midgut gland) lobster hijau pasir. *Biowallacea*, 3(3), 125–129.
- Kusuma, A., Pratama, I., & Wibowo, S. (2021). Perbandingan efektivitas fiksasi terhadap preservasi jaringan lunak mamalia. *Jurnal Sains Hayati*, 9(3), 201–209.
- Lestari, D., & Santoso, H. (2023). Pengaruh jenis fiksatif berbasis alkohol dan formalin terhadap integritas protein jaringan. *Jurnal Ilmiah Biologi*, 11(2), 134–142.
- Musyarifah, S., & Agus, R. (2018). Efek lama fiksasi formalin terhadap kualitas pewarnaan dan struktur histologis jaringan. *Jurnal Laboratorium Medik*, 3(2), 45–52. <https://doi.org/10.29303/jbt.v22i1.3190>
- Musyarifah, Z., & Agus, S. (2018). Proses fiksasi pada pemeriksaan histopatologik. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 7(3), 443–453.
- Nugroho, E., Widiyanti, N., & Kurniawan, T. (2023). Evaluasi over-fixation pada jaringan visceral tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Veteriner dan Biomedis*, 5(1), 50–58.
- Panzacchi, S., Gnudi, F., Mandrioli, D., Montella, R., Stollo, V., Merrick, B. A., Belpoggi, F., & Tibaldi, E. (2019). Effects of short and long-term alcohol-based fixation on Sprague-Dawley rat tissue morphology, protein, and nucleic acid preservation. *Acta*

- Histochemica*, 121(6), 750–760.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.05.011>
- Pratiwi, A., Nuraini, S., & Fitriani, D. (2020). Analisis artefak kristal pada pembuatan preparat histologi lien. *Jurnal Kesehatan dan Sains*, 8(2), 77–84.
- Qatrunnada, S., dkk. (2023). Variasi konsentrasi dan durasi fiksasi terhadap kualitas preparat histologi. *Anakes: Jurnal Ilmiah Analis Kesehatan*, 11(1), 1–11.
- Rahmadani, A. F., Dewi, S. S., & Iswara, A. (2018). *Pengaruh lama fiksasi BNF 10% dan metanol terhadap gambaran mikroskopis jaringan dengan pewarnaan HE (Hematoxylin-Eosin) [Skripsi/Karya Tulis Ilmiah]*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Rizkindra, A. M., Indradji, M., & Yuwono, E. (2019). Hubungan antara presentase berat lien dengan jumlah leukosit dan eritrosit pada ternak kelinci yang terinfeksi koksidirosis. *ANGON: Jurnal Peternakan*, 1(2), 162–167.
<https://doi.org/10.20884/1.angon.2019.1.2.p162-167>
- Rizkindra, M., Dewanti, R., & Suprayogi, A. (2019). Gambaran mikroanatomi organ limfoid sekunder pada tikus putih. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 24(3), 120–128.
- Rolls, G. (2024). *Fixatives and Fixation Mechanisms in Histotechnology*. Leica Biosystems Education Center.
- Rusmiatik, A. (2019a). *Buku Ajar Teknik Histoteknik dan Fiksasi Jaringan*. Airlangga University Press.
- Rusmiatik, A. (2019b). Perbandingan fiksasi larutan Bouin dan formalin pada sediaan preparat histologi testis marmut. *Jurnal Kedokteran*, 4(2), 5–9.
- Sari, D. P., Fatmawati, U., & Prabasari, R. M. (2016). Profil hands on activity pada mata kuliah mikroteknik di Prodi Pendidikan Biologi FKIP UNS. *Proceeding Biology Education Conference*, 13(1), 476–481.
- Setiawan, B., Rahayu, P., & Hartati, S. (2022). Perbandingan durasi fiksasi terhadap kejernihan gambaran mikroskopis organ parenkim. *Jurnal Biologi Eksperimental*, 18(1), 33–41.
- Singhal, P., Singh, N. N., Sreedhar, G., Banerjee, S., Batra, M., & Garg, A. (2016). Evaluation of histomorphometric changes in tissue architecture in relation to alteration in fixation protocol – An in vitro study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(8), 28–32.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/19007.8236>
- Singhal, S., dkk. (2017). Fixation artifacts in histopathology: A comprehensive review. *Journal of Diagnostic Pathology*, 12(2), 88–95.
- Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2019). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (8th ed.). Elsevier.
- Utami, N., Kurnia, R., & Wulandari, S. (2020). Efektivitas penggunaan fiksatif tunggal dan campuran pada sediaan histologis. *Jurnal Riset Biologi*, 7(2), 90–97.
- Virgiawan, A. R., Tandjungbulu, Y. F., Rahman, Widarti, & Armah, Z. (2024). Variasi waktu fiksasi Netral Buffer Formalin 10% terhadap hasil pewarnaan Hematoxylin Eosin pada jaringan prostat. *Jurnal Media Analis Kesehatan*, 15(2).
- Virgiawan, C., dkk. (2024). Optimasi waktu fiksasi jaringan untuk gambaran mikroskopis ideal pada pewarnaan HE. *Jurnal Biomedika dan Histoteknik*, 5(1), 22–29.
- Wahyuni, S., & Saputra, E. (2023). Optimasi teknik embedding parafin pada jaringan lunak mamalia. *Jurnal Laboratorium Klinis Indonesia*, 4(1), 12–19.
- Wulandari, D., Rahmawati, R., Kurniatuhadi, R., & Kurniadi, E. (2016). Microanatomy white rats (*Rattus norvegicus* L.) after giving humic acid from peat soil Kalimantan. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 24(1)
<https://doi.org/10.14710/baf.v24i1.11718>.
- Yuliana, L., Sukmaningsih, A. A. S. A., & Suriani, N. L. (2021). Evaluasi struktur morfologi sel dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin pada fiksatif BNF 10% dan Bouin. *Jurnal Biologi Udayana*, 25(2), 155–163.
<https://doi.org/10.24843/JBIOUNUD.2021.v25.i02.p08>