Literature Review: Perbandingan kualitas pewarnaan histologis Jaringan Hepar Tikus (*Rattus norvegicus)* menggunakan fiksasi formalin metode Intravital dan Konvensional

Muhamad Kamarul Zamad*, Yuyun Nailufar
Tekonologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu kesehatan, Universitas Aisyiyah Yogyakarta
Email; muhamadkamarul606@gmail.com

Abstrak
Kualitas pewarnaan preparat histologis dipengaruhi oleh proses fiksasi. Metode fiksasi yang digunakan adalah metode intravital dan konvensional. Penelitian ini bertujuan membandingkan kualitas pewarnaan preparat jaringan hepar menggunakan fiksasi metode intravital dan metode konvensional. Penelitian ini menggunakan metode *Literature Review* yang bersumber pada artikel dalam *database Pubmed,* Neliti dan *Goggle Scholar*. Hasil didapatkan pada penelitian Suprianto (2014) sitoplasma dan inti sel dengan metode intravital lebih adekuat, pada penelitian Heru (2015) sitoplasma dan inti sel dengan metode intravital lebih adekuat, pada penelitian Alwi (2016) potongan organ yang difiksasi pada minggu kedua terlihat perubahan yang signifikan untuk masing-masing potongan organ. Tekstur potongan organ mengalami pengerasan setelah diberikan cairan fiksatif. Semakin lama waktu fiksasi, semakin keras potongan organ tersebut, pada penelitian Winny Yohana (2017) hasil penelitian dan studi kepustakaan ternyata baik cairan bouin maupun formalin dapat digunakan sebagai cairan fiksasi yang menghasikan detil sel yang baik, pada penelitian putri Junita (2015) fiksasi metode intravital dengan hasil yang baik dengan gambaran organ yang dapat diidentifikasi dan gambaran jaringan yang jelas. Kesimpulan penelitian menunjukkan pada metode intravital lebih adekuat dibandingkan metode konvensional`

Kata kunci: Metode intravital, metode konvensional, hepar, formalin

Literature Review: Comparison of histological staining quality of rat Liver Tissue (Rattus norvegicus) Using intravital and Conventional Formalin Fixation Methods

Abstract
The staining quality of histological preparations is affected by the fixation process. The fixation methods that can be used are intravital and conventional methods. This study aims to compare the staining quality of liver tissue preparations using intravital fixation methods and conventional methods. This study uses the Literature Review method which originates from articles in the Pubmed, Neliti and Goggle Scholar databases. The results obtained in journal 1 cytoplasm and cell nucleus with the intravital method were more adequate, journal 2 cytoplasm and cell nucleus with the intravital method were more adequate, In Alwi's (2016) study, organ pieces that were fixed in the second week showed significant changes for each organ piece. The texture of the organ pieces hardened after being given fixative fluid. The longer the fixation time, the harder the organ pieces were. In Winny Yohana's (2017) study, the results of research and literature studies showed that both Bouin's fluid and formalin could be used as fixation fluids that produced good cell details. In Putri Junita's (2015) study, intravital fixation method had good results with identifiable organ images and clear tissue images. The conclusion of the study showed that the intravital method was more adequate than the conventional method.

Keywords : *Intravital methods, conventional methods, liver, formalin*

1. Pendahuluan

Hepar adalah salah satu organ sistem pencernaan terbesar pada tubuh manusia, dengan berat 1,5 kg atau lebih. Hepar tersusun atas 70-80% hepatosit atau sel hepar, sehingga jaringan hepar cukup mudah untuk diamati dan juga sering dipakai sebagai organ uji coba pada pemeriksaan histopatologi. Jaringan hepar juga merupakan jaringan padat sehingga akan mempengaruhi proses fiksasi jaringan. Hati menampung semua bahan yang diserap dari usus, kecuali lemak, melalui vena porta. Hati merupakan pusat dari metabolisme tubuh (Gao, 2007).

Pemeriksaan histopatologi berperan penting dalam membantu menegakkan diagnosa penyakit. Adapun tahapan dalam pembuatan sediaan adalah pengambilan jaringan, fiksasi, dehidrasi, *clearing, embedding, blocking*, pemotongan dan pewarnaan jaringan (Ariyadi and Suryono, 2017). Dasar dari pembuatan sajian histopatologi yang baik adalah melakukan fiksasi yang benar. Kesalahan yang dilakukan pada tahap fiksasi tidak akan pernah dapat diperbaiki lagi pada tahapan selanjutnya. Jadi hasil akhir sajian histologi yang baik sangat tergantung pada cara melakukan fiksasi dengan baik (Jusuf, 2009).

Fiksasi adalah proses kimia pengawetan jaringan biologis sehingga mencegah autolisis atau proses pembusukan (Ganjali and Gajali, 2013). Tujuan fiksasi jaringan antara lain untuk mencegah terjadinya autolisis dan pembusukan, memelihara atau mengawetkan keadaan sel dan elemen jaringan agar identik dengan keadaan yang masih hidup, serta menggumpalkan jaringan yang cair agar memudahkan pemotongan sediaan (Tripathi, 2013). Fiksasi konvensional yang umum digunakan adalah metode konvensional/imersi yaitu dengan merendam potongan-potongan kecil dalam cairan fiksatif (Jusuf, 2009). Terdapat metode lain yaitu metode fiksasi intravital yaitu dengan cara cairan fiksatif dialirkan ke seluruh tubuh melalui perfusi (Zulham, 2009). Fiksasi metode konvensional memerlukan waktu sebelum jaringan direndam dalam cairan fiksatif. Sebaliknya pada fiksasi metode intravital cairan fiksatif mencapai seluruh jaringan dengan lebih cepat karena cairan fiksatif dialirkan ke seluruh tubuh (Zulham, 2009).

Formaldehid (CH2O) adalah satu-satunya aldehid gas dan mengandung polimer larut yang akan mengalami depolimerisasi pada saat diencerkan. Formaldehid yang dilarutkan dalam air hingga mencapai saturasi pada 37% - 40% umumnya disebut sebagai "formalin" atau "larutan formaldehid pekat". Proses fiksasi, satu bagian formalin biasanya diencerkan dengan sembilan bagian air atau buffer. Larutan formalin 10% yang mengandung sekitar 4% formaldehid, sebuah konsentrasi optimal untuk fiksasi. Formalin juga mengandung sekitar 10 % metanol, yang ditambahkan oleh produsen untuk menghambat pembentukan polimer yang lebih tinggi. Agen fiksatif yang paling sering digunakan untuk histopatologik adalah formalin 10% (Kilicoglu and Erdemli, 2011).

2. Metode

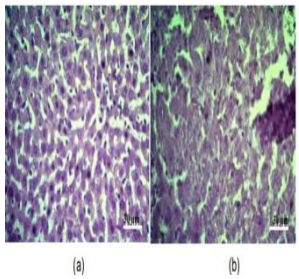
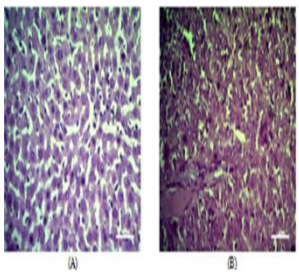
Metode pada penelitian ini adalah metode *Literature Review*, metode ini merupakan metode yang dilakukan dengan mengumpulkan jurnal yang memiliki berbagai data yang dapat digunakan untuk menjadi acuan dalam membuat artikel. Sumber data dalam penelitian adalah subjek asal data diperoleh. Penelitian ini menggunakan sumber pencarian artikel atau *database* sebagai rujukan pencarian yaitu *PubMed* dan *Google Scholar*. Metode pencarian kata kunci yang dapat digunakan sebagai acuan untuk mendapatkan literatur yang relevan dapat menggunakan (*Population in Question, Intervention of Interest, Comparator* dan *Outcome*) "PICO" kerangka kerja PICO dapat membantu mengidentifikasi aspek-aspek yang masih terpisah terkait penerapan intervensi tertentu pada suatu populasi. Berdasarkan judul diatas dapat ditentukan PICO tersebut; P = Hepar tikus, I = Fiksasi formalin, C = Metode intravital dan konvesional dan O = Perbandingan. Penelitian ini menggunakan kriteria inklusi dan kriteria eksklusi.

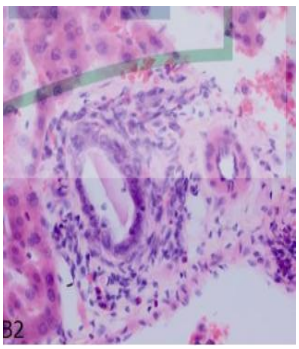
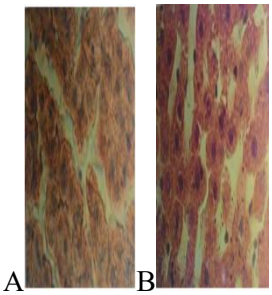
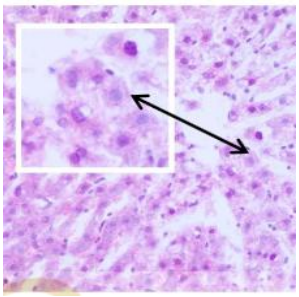
Tabel 1. Pola Kata Kunci Penelitian pada Metode PICO

No.	PICO	Kata Kunci
1	*Population*	Hepar tikus
2	*Intervention*	Fiksasi Formalin
3	*Comparison*	Metode intravital dan konvensional
4	*Outcome*	Perbandingan

3. Hasil dan Pembahasan

Tabel 2. Hasil Penelitian Metode Konvensional dan Intravital

No	Peneliti	Judul Penelitian	Gambar	keterangan
1	Suprianto (2014)	Perbandıngan Efek Fıksası Formalın Metode Intravıtal dengan Metode Konvensıonal pada Kualıtas Gambaran Hıstologıs Hepar Tıkus		(a) Gambaran Histologi Pewarnaan Sitoplasma pada Metode Intravital dengan Pewarnaan HE (perbesaran objektif 40x (b) Gambaran Histologi Pewarnaan Sitoplasma pada Metode Konvensional dengan Pewarnaan HE (perbesaran objektif 40x)
2	Heru Fajar Trianto (2015)	Perbandingan Kualitas Pewarnaan Histologis Jaringan Testis dan Hepar menggunakan Fiksasi Formalin Metode Intravital dan Konvensional		(a) Gambaran Histologi Pewarnaan Sitoplasma pada Metode Intravital dengan Pewarnaan HE (perbesaran objektif 40x (b) Gambaran Histologi Pewarnaan Sitoplasma pada Metode Konvensional dengan Pewarnaan HE (perbesaran objektif 40x)

3	Muhammad azharan alwi (2016)	Fiksasi 2 Minggu pada Gambaran Histologi Organ Ginjal, Hepar, dan Pankreas Tikus *Sprague Dawley* dengan Pewarnaan *Hematoxylin*-Eosin		Gambaran Mikroskopis Jaringan Hepar dengan Metode Konvensional Pewarnaan *Hematoxylin*-Eosin (HE) Perbesaran 40x
4	Winny Yohana (2017)	Perbandingan Cairan Fiksasi Bouin dengan Buffer Formalin terhadap Hepar Tikus Putih	 A B	(A). Gambaran Mikroskopis 450 kali pada Sel Hepar Tikus Difiksasi Buffer Formalin dan (B). Gambaran Mikroskopis 450 kali pada Sel Hepar Tikus Difiksasi Cairan Bouin.
5	Putri Junita (2015)	Histoteknik Perfusi Pbs-Formalin dan Gambaran Histologi Organ Hepar, Pankreas dan Ginjal Tikus Strain *Sprague Dawley*		Gambaran mikroskopis Perfusi PBS-Formalin A dengan Metode Intravital Pewarnaan *Hematoxylin*-Eosin (HE) perbesaran 40x

Berdasarkan jurnal penelitian (Suprianto, 2014) menggunakan hewan uji sebanyak 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus)*, dengan menggunakan fiksasi formalin dengan alasan formalin merupakan cairan yang banyak digunakan secara umum, pH mendekati netral, dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Metode fiksasi formalin pada penelitian ini menggunakan dua cara yaitu metode intravital yaitu tikus yang dibius secara inhalan dibedah mulai dari abdomen bawah hingga rongga thoraks. Insisi bagian *costosterno junction* hingga tampak bagian jantung. Perfusi NaCl 0,9% pada ventrikel kiri jantung menggunakan jarum halus dan gunting atrium kanan jantung dan tikus yang terbius secara inhalan dibedah pada abdomen bawah dan langsung diambil bagian hepar. Organ hati yang diperoleh langsung direndam dalam cairan fiksatif formalin. Setelah itu dilakukan pembuatan preparat yang diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin.* Tiap preparat dilakukan pengamatan pewarnaan inti sel, sitoplasma, kejernihan dan keseragaman (Jusuf, 2012).

Berdasarkan penelitian Suprianto (2014) dengan judul "Perbandingan Kualitas Pewarnaan Histologis Jaringan Testis dan Hepar Menggunakan Fiksasi Formalin Metode Intravital dan Konvensional" menyatakan pewarnaan inti sel menunjukkan bahwa kualitas gambaran histologis dengan metode fiksasi intravital lebih baik dibandingkan dengan metode fiksasi konvensional. Hasil pewarnaan HE, *Hematoxylin* berperan sebagai pewarna dasar. Pewarnaan inti yang tidak adekuat artinya kurang adekuatnya *Hematoxylin* yang mewarnai bagian inti seluler. Hal ini bisa disebabkan

oleh fiksasi yang tidak adekuat atau terjadinya autolisis. Penyebab lainnya adalah proses penghilangan parafin yang tidak sempurna, waktu pewarnaan tidak adekuat, proses penghilangan warna terlalu kuat atau berlebihan, pemotongan yang tipis dan pH nya yang salah (Markus and Sarina, 2014).

Hasil pengamatan pewarnaan sitoplasma menunjukkan bahwa kualitas gambaran histologis dengan metode fiksasi intravital lebih baik dibandingkan dengan metode fiksasi konvensional. Pewarnaan HE, pada pewarnaan ini eosin berperan sebagai pewarna asam yang mewarnai komponen jaringan yang tidak berinti sehingga berwarna merah sampai merah muda. Sebagian besar sitoplasma bersifat asidofilik baik intraseluler ataupun ekstraseluler, fiksasi yang tidak adekuat juga mempengaruhi sitoplasma. Akibat fiksasi yang buruk sitoplasma menjadi lebih pucat dan samar. Sitoplasma yang tidak adekuat terwarnai oleh eosin bisa juga disebabkan oleh pH terlalu tinggi, dehidrasi dengan alkohol terlalu lama, kontaminan ketika dehidrasi dengan alkohol, pemotongan yang terlalu tipis, waktu pewarnaan yang tidak adekuat. Hasil dari pengamatan kejernihan pewarnaan menunjukkan bahwa kualitas gambaran histologis dengan metode fiksasi intravital lebih baik dibandingkan dengan metode fiksasi konvensional. Fiksasi juga membuat kejernihan detail struktur pada jaringan yang kejernihannya kurang mungkin bisa disebabkan oleh fiksasi juga yang tidak adekuat, selain itu hal ini juga bisa disebabkan kesalahan pada pengolahan jaringan (Hayat, 2002).

Penelitian dari jurnal Heru (2015) menggunakan hewan uji sebanyak 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus)*, dengan menggunakan fiksasi formalin. Metode fiksasi formalin pada penelitian ini menggunakan dua cara yaitu metode konvesional yaitu setelah organ diambil dari tubuh tikus langsung di rendam dalam cairan formalin 10% dan metode intravital yaitu dengan melakukan perfusi atau injeksi cairan formalin 10% ke dalam tubuh tikus melalui sistem kardiovaskular (Jusuf, 2012).

Berdasarkan hasil pengamatan Heru (2015) "Perbandingan efek fiksasi formalin metode intravital dengan metode konvesional pada kualitas gambaran histologis hepar tikus" menyebutkan pewarnaan inti sel pada preparat jaringan hepar menunjukkan metode fiksasi intravital menghasilkan pewarnaan inti sel yang lebih adekuat dibandingkan metode fiksasi konvensional. Inti sel pada preparat jaringan yang dilakukan proses perwarnaan menggunakan HE akan berwarna ungu kebiruan karena memiliki komponen basofilik yaitu asam nukleat. Hematoksilin pada metode pewarnaan HE berperan sebagai pewarna dasar. Kemampuan hematoksilin mewarnai inti sel dipengaruhi oleh proses fiksasi jaringan, proses penghilangan paraffin, waktu pewarnaan, pH, dan ketebalan pemotongan jaringan (Qidwai, 2014).

Hasil pewarnaan sitoplasma menunjukkan bahwa preparat hepar kelompok metode fiksasi intravital menghasilkan pewarnaan sitoplasma yang lebih adekuat dibandingkan preparat jaringan pada metode fiksasi konvensional. Kemampuan eosin memberikan warna di sitoplasma sel juga dipengaruhi oleh proses fiksasi jaringan. Kejernihan pewarnaan pada preparat jaringan hepar kelompok metode fiksasi intravital menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan metode fiksasi konvensional. Kejernihan pewarnaan dikatakan baik bila seluruh jaringan dapat diamati tanpa ada bagian yang kabur. Jaringan yang kejernihannya kurang baik dapat diakibatkan oleh fiksasi yang tidak adekuat (Sarma, 2013).

Fiksasi konvensional yang umum digunakan adalah metode konvensional / imersi yaitu dengan merendam potongan-potongan kecil dalam larutan fiksatif. Metode ini, lapisan luarnya cepat terfiksasi namun bagian dalamnya terlambat dan mungkin akan mengalami perubahan pos mortem. Salah satu hal yang mempengaruhi fiksasi adalah waktu. Semakin lama jaringan diawetkan, semakin banyak kehilangan organel sel dan pengerutan nukleus sehingga banyak artefak terbentuk. Metode fiksasi intravital yaitu dengan cara cairan fiksatif dialirkan ke seluruh tubuh melalui perfusi. Fiksasi konvensional memelukan waktu sebelum jaringan direndam dalam ciran fiksatif. Sebaliknya fiksasi metode intrarvital cairan fiksatif mencapai seluruh jaringan dengan cepat karena cairan fiksasi dialirkan ke seluruh tubuh (Suprianto, 2014).

Penelitian Alwi (2016) menggunakan 45 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus)*, dengan menggunakan fiksasi formalin. Metode fiksasi formalin pada penelitian ini menggunakan metode konvesional, dengan potongan organ tersebut direndam ke dalam cairan formalin 10% selama 2 minggu pada suhu sekitar 4^{o}C. Berdasarkan hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis pada potongan organ yang difiksasi pada minggu kedua terlihat perubahan yang signifikan untuk masing-masing potongan organ. Tekstur potongan organ mengalami pengerasan setelah diberikan cairan

fiksatif. Semakin lama waktu fiksasi, semakin keras potongan organ tersebut. Hal ini membuktikan teori bahwa cairan fiksatif menstabilkan sel-sel organ baik ekstraseluler maupun intraseluler. Semakin lama fiksasi berlangsung, ikatan yang dihasilkan antara zat fiksatif dan sel organ semakin kencang. Hal ini menyebabkan potongan organ menjadi semakin keras dan kaku. Gambar struktur umum hepar dapat diidentifikasi, yakni hepatosit pada lobulus hepar dan trias porta. Gambaran lobulus pada perlakuan fiksasi 2 minggu lebih sulit untuk diindentifikasi dan juga terlihat vena porta dan duktus biliaris pada perlakuan 2 minggu tampak kecil dan rusak. Hal ini disebabkan oleh penyusutan akibat fiksasi yang terlalu lama membuat pori-pori membran sel membesar, sehingga ketika dilakukan dehidrasi, alkohol yang bersifat hidrofilik membuat cairan di dalam sel akan mudah keluar ke ekstrasel.

Cairan formalin bersifat asam yang dapat dinetralisir sebelum dipakai dengan menambahkan natrium karbonat. Efek utama formalin terhadap jaringan tubuh adalah pengikatan protein tanpa menimbulkan penggumpalan, serta mengikat lemak dengan tidak mempengaruhi lemak netral (Howat, 2014). Cairan bouin dapat memfiksasi jaringan lebih cepat daripada buffer formalin yaitu 6 sampai 24 jam. Cairan ini mengadakan pengikatan terhadap protein membentuk asam pikrat. Warna kuning pada specimen dapat dihilangkan dengan cara merendamnya pada alkohol 70%. Perbandingan antara hasil penelitian dan studi kepustakaan ternyata baik cairan bouin maupun formalin dapat digunakan sebagai cairan fiksasi yang menghasikan detil sel yang baik. Adapun nekrosis sel yang terjadi pada jaringan yang difiksasi oleh formalin kemungkinan diakibatkan oleh penurunan konsentrasi formalin tersebut. Perbandingan antara hasil penelitian dan studi kepustakaan ternyata baik cairan bouin maupun formalin dapat digunakan sebagai cairan fiksasi yang menghasikan detil sel yang baik. Adapun nekrosis sel yang terjadi pada jaringan yang difiksasi oleh formalin kemungkinan diakibatkan oleh penurunan konsentrasi formalin tersebut.

Penelitian Putri Junita (2015) 45 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus)*, dengan menggunakan fiksasi formalin. Metode fiksasi formalin pada penelitian ini menggunakan metode intravital, dengan cairan melakukan perfusi atau injeksi cairan formalin 10% ke dalam tubuh tikus melalui sistem kardiovaskular. Berdasarkan hasil pengamatan dimana didapatkan hasil yang baik pada hepar yang diperfusi PBS-Formalin. Hal tersebut dapat diakibatkan oleh faktor teknik perfusi. Penelitian ini teknik perfusi dilakukan dengan kecepatan 20 ml/menit dan dengan tekanan yang tidak dapat dibuat konstan. Kecepatan diperoleh dengan ketinggian permukaan larutan terhadap vena kava inferior sekitar 72,5 cm. Kemungkinan cairan perfusi dengan kecepatan dan tekanan tinggi merusak tautan antar sel
sehingga hasil pada preparat jaringan tampak renggang (Gage, 2012).

4. Kesimpulan

Berdasarkan telaah literatur penelitian ini dapat di simpulkan metode intravital lebih adekuat di bandingkan dengan metode konvensional. Karena metode intravital mencapai seluruh jaringan dengan cepat melalui cairan fiksasi yang dialirkan ke seluruh tubuh sedangkan fiksasi metode konvensional memelukan waktu sebelum jaringan direndam dalam cairan fiksatif.

Daftar Pustaka

Ariyadi, T., & Suryono, H. (2017). Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode Microwave Dan Conventional Histoprocessing Pewarnaan Hematoxylin Eosin. *Jurnal Labora Medika Vol*, *1*(1), 7-11.

Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (65), 3564.

Ganjali, H., & Ganjali, M. (2013). Fixation in tissue processing. *Intl J Farm & Alli Sci*, *2*, 686-689.

Gao, B., Jeong, W. I., & Tian, Z. (2007). Liver: an organ with predominant innate immunity. *Hepatology*, *47*(2), 729-736.

Hayat, M. A. (2002). *Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods: for light and electron microscopy*. Springer Science & Business Media.

Howat, W. J., & Wilson, B. A. (2014). Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*, *70*(1), 12-19.

Jusuf, A. A. (2009). Histoteknik dasar. *Bagian Histologi Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta*.

Jusuf, A. A. (2009).Teknik histologi. *Bagian Histologi Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta*.

Kılıçoğlu, S., & Erdemli, E. (2011). Comparing the different fixatives for examination of liver tissue ultrastructure. *Journal of Ankara University Faculty of Medicine*, *64*(2).

Markus, A. R., & Sarina, M. (2014). Histopathology in Hematoxylin & Eosin stained muscle sections (MDC1A_M. 1.2. 004). *Treat-NMD, Neuromuscular Network*, 1-9.

Qidwai, K., Afkhami, M., & Day, C. E. (2014). The pathologist's guide to fixatives. *Histopathology: methods and protocols*, 21-30.

Das Sarma, J. D. S. S., Chatterjee, K., Dalui, T., & Ghosh, S. (2013). Tissue specific optimization of Haematoxylin and eosin stain: an experiment accomplished by varying the period of fixation and duration of stain. *Online Journal of Biosciences and Informatics*, *4*, 64-81.

Suprianto, A. (2014). *Perbandingan Efek Fiksasi Formalin Metode Intravital Dengan Metode Konvensional Pada Kualitas Gambaran Histologis Hepar Tikus* (Doctoral dissertation, Tanjungpura University).

Tripathi, M., Bansal, R., Gupta, M., & Bharat, V. (2013). Comparison of routine fixation of tissues with rapid tissue fixation. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, *7*(12), 2768.

Zulham, A., Saptanto, S., Rahmawati, R. E., Lindawati, L., & Fauzi, T. (2009). *Penuntun praktikum histoteknik biomedik.* Departemen histologi fakultas kedokteran universitas sumatra utara, 1-25.