



Gambaran Fiksasi Jaringan Menggunakan Larutan Bouin dan NBF 10% Pada Hati Mencit Dengan Durasi Fiksasi 4 Dan 16 Jam Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

Ignasius Kalos^{1*}, Erni Yohani Mahtuti², Faisal³

¹⁻²Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Maharani Malang, Indonesia

³Universitas Islam Malang, Indonesia

*Penulis Korespondensi: yohanierni@stikesmaharani.ac.id

Abstract. Histological tissue processing remains the “gold standard” for determining patient therapy and prognosis. One of the stages of tissue processing is fixation. The types of fixative solutions used are 10% NBF and Bouin. The purpose of this study was to determine the histological features of mouse (*Mus Musculus*) liver tissue fixed using 10% NBF and Bouin solutions. This study used a descriptive method. The population in this study were mice. The research sample was mouse liver organs. The research stages began with mouse surgery, fixation with 10% NBF and Bouin, dehydration, clearing, embedding, blocking, cutting, and staining. The results of the histological features of mouse livers fixed using 10% NBF with a time variation of 4 hours obtained good quality preparations of 33.33% and poor quality of 66.67%. In 10% NBF with a time variation of 16 hours, good quality was obtained of 83.33% and poor quality of 16.67%. In liver tissue preparations of mice (*Mus musculus*) fixed using Bouin's 4-hour variation, 83.33% of good quality preparations were obtained and 16.67% of poor quality preparations. In Bouin's 16-hour variation, 33.33% of good quality preparations were obtained, 50.00% of poor quality preparations and 16.67% of poor quality preparations were obtained. Suggestions for further research on the microscopic appearance of tissue fixed using Bouin's solution and other solutions other than 10% NBF with samples other than mouse liver organs (*Mus Musculus*).

Keywords: Bouin; Fixation; Liver; Mice; NBF 10%; Preparation.

Abstrak. Prosesing jaringan histologi masih menjadi “gold standard” penentuan terapi dan prognosis pasien . Salah satu tahapan proses pengolahan jaringan adalah fiksasi. Jenis larutan fiksatif yang digunakan yaitu NBF 10% dan Bouin. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui gambaran histologi jaringan hepar mencit (*Mus Musculus*) yang difiksasi menggunakan larutan NBF 10% dan Bouin. Penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Populasi dalam penelitian ini yaitu mencit. Sampel penelitian organ hati mencit. Tahapan penelitian di mulai dari melakukan pembedahan mencit, fiksasi NBF 10% dan Bouin, dehidrasi, clearing, embedding, blocking, cutting, dan pewarnaan. Hasil gambaran histologi hepar mencit yang difiksasi menggunakan NBF 10 % variasi waktu 4 jam didapatkan preparat kualitas baik sebanyak 33,33% dan kualitas kurang baik sebanyak 66,67%. Pada NBF 10% variasi waktu 16 jam didapatkan kualitas baik sebanyak 83,33% dan kualitas kurang baik sebanyak 16,67%. Pada sediaan jaringan hepar mencit (*Mus musculus*) yang difiksasi menggunakan Bouin variasi 4 jam didapatkan preparat kualitas baik sebanyak 83,33% dan kualitas kurang baik sebanyak 16,67%. Pada Bouin variasi waktu 16 jam didapatkan kualitas baik sebanyak 33,33%, kualitas kurang baik sebanyak 50,00% dan kualitas buruk sebanyak 16,67%. Saran bagi penelitian selanjutnya tentang gambaran mikroskopis jaringan yang difiksasi menggunakan larutan Bouin dan larutan lainnya selain NBF 10% dengan sampel selain organ hepar mencit (*Mus Musculus*).

Kata Kunci: Bouin; Fiksasi; Hepar; Mencit; NBF 10%; Preparat.

1. LATAR BELAKANG

Pewarnaan jaringan juga dikenal sebagai cara untuk melihat struktur dan bagian jaringan di bawah mikroskop. Pewarnaan diperlukan untuk meningkatkan kontras dan membedakan berbagai bagian sel dan jaringan karena jaringan biasanya transparan. Ahli histologi dan patologi dapat menggunakan pewarnaan untuk menentukan jenis jaringan, struktur abnormal, dan berbagai karakteristiknya. Salah satu tahapan penting dalam mikroskopi histologis adalah prosesing jaringan histologis, yang bertujuan untuk menyiapkan jaringan

biologis agar dapat diperiksa di bawah mikroskop. Hasil yang tepat dapat memberikan gambaran yang tepat tentang bentuk, susunan, inti sel, sitoplasma, susunan serat jaringan ikat, otot, dan komponen lainnya seperti jaringan yang masih hidup. Proses seperti suhu, reagen, dan waktu proses jaringan juga dapat memengaruhi hal ini (Risanto et.,al 2019). Dalam proses pengolahan jaringan terdiri dari beberapa tahap yang saling menentukan satu sama lain, dengan urutan yaitu fiksasi, dehidrasi, penjernihan, parafiniasi, perendaman dalam parafin, pemotongan, deparafiniasi, dan pewarnaan (Risanto 2019).

Fiksasi adalah langkah pertama pematangan jaringan untuk mencegah autolisis, yang dapat menghancurkan elemen jaringan, ini juga mempersiapkan jaringan untuk kerasnya reagen yang digunakan dalam langkah-langkah pemrosesan selanjutnya (Muthiawati et al., 2023). Sangat penting untuk tahap fiksasi dalam pembuatan sediaan histologi karena kesalahan pada tahap ini dapat menyebabkan gambaran sediaan histologi yang buruk. Oleh karena itu, hasil akhir sediaan histologi sangat bergantung pada bagaimana fiksasi dilakukan (Sri wahyunizah, 2019). Ada beberapa jenis larutan fiksasi yang digunakan yaitu Formalin 10 %, Neutral Buffer Formalin (NBF) 10 %, Etanol, Bouin dan Helly.

Larutan fiksasi NBF 10% (Neutral Buffer Formalin 10%) dan Alkohol 70% adalah larutan fiksasi yang biasa digunakan untuk mengawetkan jaringan selama pemeriksaan histopatologi. Kelebihan cairan Neutral Buffer Formalin 10% memiliki pH 7 yang merupakan pH yang sangat baik, membuatnya lebih mudah digunakan, dan dapat digunakan untuk mengawetkan jaringan selama waktu yang cukup lama. Namun kekurangannya adalah daya fiksasinya yang lebih lambat, sekitar dua belas hingga empat puluh empat jam (Sri wahyunizah 2018).

Bouin adalah fiksatif pikrat non-koagulan yang efektif untuk memfiksasi embrio dan jaringan lunak atau serat kolagen. Larutan Bouin mengandung 10% formaldehyde (25% formalin), 0,9 mol asam asetat, dan 0,04 mol asam pikrat dalam air. Asam pikrat menembus jaringan dengan sedikit lambat, membekukan protein, dan menyebabkan sedikit penyusutan. Larutan Bouin juga mewarnai jaringan kuning (Salsabila et al., 2023). Asam asetat juga mengentalkan kromatin, menyebabkan penyusutan yang disebabkan oleh asam pikrat. Dengan pH 1,5–2,0, fiksasi larutan Bouin lebih cepat daripada NBF 10 %. Efek komplementer dari tiga bahan bekerja sama dengan baik untuk mempertahankan morfologi. Spesimen biasanya difiksasi dalam larutan Bouin selama 24 jam (Rusmiatik, 2019).

Fungsi fiksasi adalah untuk menghentikan proses pembusukan dan autolisis , pengawetan , pengerasan jaringan , pemanjangan koloid , diferensiasi optik , dan pengaruh pada pewarnaan , serta stabilisasi unsur penting pada jaringan sehingga unsur tersebut tidak larut, berpindah, atau terdistorsi selama prosedur selanjutnya (Oktaviando, 2022). Sehingga fiksasi sangat penting terhadap pemeriksaan histologi jaringan manusia dan hewan. Autolisis disebabkan karena jaringan hewan yang dibiarkan terlalu lama setelah penyembelihan. Selain menyebabkan kualitas daging menurun autolisis juga dapat menyebabkan gangguan terhadap diagnosis jaringan secara histopatologi , karena autolisis memiliki ciri-ciri yang menyerupai nekrosis seperti sel yang mengalami piknosis yang ditandai dengan hiperkromatik dengan inti sel yang mengecil (Oktaviando, 2022). Autolisis adalah pelunakan dan pencairan jaringan yang terjadi dalam keadaan steril melalui proses kimia yang disebabkan oleh enzim intraseluler . Dengan kata lain , autolisis adalah perusakan jaringan atau sel organisme yang disebabkan oleh enzim produk sel itu sendiri. Oleh karena itu, organ yang memiliki banyak enzim akan mengalami autolisis lebih cepat daripada organ yang memiliki sedikit enzim . Lisosome, organella yang berpartisipasi dalam proses autolisis, menghancurkan diri sel dengan membebaskan semua enzim yang terkandung di dalamnya (Oktaviando, 2022).

Hematoxilin dan Eosin merupakan metode pewarnaan yang banyak digunakan dalam pewarnaan jaringan sehingga diperlukan dalam diagnosa medis dan penelitian. Pewarnaan yang sering digunakan dalam pewarnaan histoteknik adalah pewarnaan hematoksilin-eosin (A. Sriwahyunizah, 2019). Hematoxylin Eosin (HE) pewarna yang dapat memulus inti dan sitoplasma serta jaringan penyambungnya, adalah teknik pewarnaan jaringan yang sering digunakan. Eosin berfungsi sebagai pewarna asam, dan hematoxylin berfungsi sebagai pewarna basa (Sofyanita, E. N., Siwi, 2024) Pewarnaan Haematoxylin Eosin merupakan pewarnaan yang sangat umum untuk digunakan dalam membedakan struktur jaringan yang berbeda . Haematoxylin adalah pewarna yang bersifat basa yang akan mewarnai struktur asam . Warna yang dihasil oleh Haematoxylin adalah warna ungu atau ungu kebiruan . Struktur yang diwarnai oleh zat warna ini adalah Basofilik meliputi DNA pada inti sel, RNA pada ribosom, dan retikulum endoplasma kasar (Wahyuni, 2023). Eosin adalah zat warna balasan yang dibuat setelah Haematoxylin dan merupakan zat warna yang bersifat asam yang targetnya adalah struktur dasar dari jaringan. Warna yang dihasilkan adalah merah muda atau merah terang. Struktur yang menarik zat warna eosin ini dinamakan eosinofilik, contohnya sitoplasma (Wahyuni, 2023).

Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh (A. Sriwahyunizah, 2018) Tentang Perbandingan Fiksasi Neutral Buffer Formalin 10% Dan Alkohol 70% Pada Jaringan hati Mencit Dengan Pewarnaan HE (Hematoxilin Eosin) mengatakan bahwa daya fiksasi menggunakan NBF 10% cendrung lambat yakni 12-24 jam. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh (A. Rahmadani, 2019) mengetahui pengaruh lama fiksasi BNF 10% dan metanol terhadap gambaran mikroskopis jaringan dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin. Pada organ hati dan ginjal hewan coba kelinci kemudian difiksasi dengan BNF 10% dan metanol selama 6, 24 jam dan 7 hari.

Hasil penelitian (Rahmadani, 2019) fiksasi BNF 10% dengan menggunakan variasi waktu 6 jam dan 24 jam diperoleh hasil gambaran mikroskopisnya baik . Sedangkan , pada fiksasi 7 hari diperoleh hasil kurang baik . Jaringan yang difiksasi menggunakan metanol dengan variasi waktu 6 , 24 jam dan 7 hari diperoleh hasil gambaran mikroskopis untuk keseluruhan kurang baik . Hasil uji statistik Kruskal-Wallis Test untuk sampel yang difiksasi menggunakan larutan fiksatif BNF 10% dan Metanol masing-masing diperoleh nilai $0,082 > 0,05$ yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan fiksasi menggunakan BNF 10% dan metanol terhadap gambaran mikroskopis.

2. KAJIAN TEORITIS

Fiksasi jaringan adalah suatu usaha untuk mempertahankan komponen-komponen sel atau jaringan agar tidak mengalami perubahan dan tidak mudah rusak . Fiksasi yang benar yaitu dasar dari pembuatan preparat yang baik. Tujuan fiksasi jaringan yaitu agar jaringan tersebut tetap utuh. Fiksasi harus dilakukan sesegera mungkin setelah pengangkatan jaringan atau setelah kematian agar tidak terjadi autolisis (soewondo, 2022). Proses fiksasi sangatlah penting dalam proses pemeriksaan histologi jaringan manusia maupun hewan. Jaringan yang dibiarkan terlalu lama akan mengakibatkan autolisis, sehingga menyebabkan gangguan dalam diagnosis jaringan secara histopatologi. autolisis merupakan perlunakan dan pencairan jaringan yang terjadi dalam keadaan steril melalui proses kimia yang diakibatkan oleh enzim-enzim intraseluler, dengan kata lain autolisis merupakan perusakan jaringan atau sel-sel dari suatu organisme oleh enzim, yang diproduksi oleh sel itu sendiri. Sehingga organ-organ yang kaya enzim akan mengalami proses autolisis lebih cepat dari pada organorgan yang memiliki lebih sedikit enzim. Organella yang berperan dalam proses autolisis adalah lisosom, fungsi lisosom dalam proses autolisis yaitu sebagai bentuk penghancuran atau perusakan diri sel dengan cara membebaskan semua enzim di dalam lisosom itu sendiri (Oktaviando,

2022). Autolisis memiliki ciri-ciri menyerupai nekrosis seperti sel yang mengalami piknosis yang ditandai dengan hiperkromatik dengan inti sel yang mengecil (Oktaviando, 2022).

Bahan yang dapat digunakan dalam proses fiksasi yaitu NBF 10% (*Neutral Buffer Formalin 10%*). NBF 10% (*Neutral Buffer Formalin 10%*) merupakan larutan fiksatif yang baik untuk lemak tetapi tidak memfiksasi karbohidrat yang larut, tidak melarutkan lipoid atau lemak tetapi melarutkan sebagian glikogen dan urea. Kelebihan dalam menggunakan larutan NBF 10% (*Neutral Buffer Formalin 10%*) ialah memiliki pH normal dengan penggunaanya yang lebih mudah dan dapat digunakan untuk mengawetkan jaringan dalam kurun waktu yang cukup lama. Namun kekurangan dari NBF 10% yaitu daya fiksasinya yang lebih lambat (Oktaviando, 2022). Hasil fiksasi yang sangat baik akan memberikan gambaran tentang bentuk, susunan sel, inti sel, dan sitoplasma, serta susunan serat jaringan ikat yang sesuai dengan gambaran jaringan pada saat kondisi masih hidup, sehingga akan memudahkan pada saat proses pembacaan hasil preparat histologi (Oktaviando, 2022).

Neutral Buffer Formalin (NBF) 10 %, telah menjadi fiksatif umum yang digunakan dalam pengaturan diagnostik. Ini lebih baik daripada campuran formalin sederhana seperti garam fosfat; pH netral menghambat pigmen formalin dan mencegah kerusakan eritrosit; fosfat menyesuaikan pH sekitar 7,0 sebagai netral, tetapi tidak perlu menyesuaikannya jika sedikit berbeda (Fitriana & Mushlih, 2020). Meskipun pembentukan pigmen formalin dihambat tidak berhenti sama sekali, dan dapat perlahan-lahan terbentuk di jaringan yang banyak darah, atau dalam jaringan yang disimpan untuk waktu yang lama di NBF 10%. NBF memungkinkan pemulihan warna alami dari spesimen untuk digunakan sebagai fiksatif fotografi dan spesimen museum. Protein jaringan harus diikat silang untuk fiksasi menyeluruh, tetapi campuran formalin sederhana dapat mengubah jaringan sebelum mengikat protein.

Larutan Bouin adalah fiksatif majemuk yang digunakan dalam histologi. Ditemukan oleh ahli biologi Prancis Pol Bouin, larutan ini terdiri dari formaldehida, asam asetat, dan asam pikrat dalam larutan berair. Cairan Bouin khususnya berguna untuk fiksasi biopsi jaringan lunak karena fiksatif ini memungkinkan pewarnaan inti yang lebih tajam dan lebih baik daripada formalin penyanga netral 10% (Alimi et al., 2023). Namun, larutan ini tidak bagus ketika ultrastruktur jaringan dipertahankan untuk mikroskopi elektron, tetapi bagus ketika struktur jaringan yang lembut dan halus dipertahankan. Selain melisik sel darah merah, asam asetat dalam fiksatif ini melarutkan endapan kecil zat besi dan kalsium dalam jaringan

(Fitriana & Mushlih, 2020). Asam format sebagai pengganti asam asetat kurang lazim digunakan sebagai fixatif utama dalam histologi; justru Bouin solution yang terdiri dari asam pikrat, asam asetat, dan formaldehyda lebih sering digunakan untuk fiksasi dan dekalsifikasi jaringan lunak atau jaringan halus karena kombinasi bahan tersebut menghasilkan preservasi struktur yang baik, dan memungkinkan pewarnaan H&E dengan detail nukleus dan sitoplasma yang optimal (Histology Fixatives, 2024; Wax-it Histology Services, 2013). Meskipun fiksasi dengan Formalin (formaldehyda) dapat menyebabkan sitoplasma menjadi basofilik dan membuat pengerasan jaringan, efek ini dapat diimbangi oleh asam pikrat dalam Bouin solution, sehingga menjaga keseimbangan antara pengecilan/pengerasan dan pelunakan jaringan serta membran sel menghasilkan preparat yang tetap representatif untuk studi histologi (Embryology Histology Fixatives, n.d.; Diagnocine, 2020). Namun, beberapa penelitian menunjukkan bahwa untuk jaringan tertentu terutama organ dengan struktur halus. Bouin memberikan preservasi seluler dan arsitektur jaringan yang lebih baik dibanding formalin, meskipun untuk beberapa fitur sitoplasma formalin kadang memberikan hasil yang sedikit lebih baik (Study comparing formalin vs Bouin testis biopsies, 2020).

3. METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif dengan bentuk penelitian kuantitatif. Penelitian deskriptif adalah jenis penelitian yang menggambarkan atau menjelaskan situasi nyata yang terjadi saat penelitian dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk memberikan deskripsi yang sistematis, akurat, dan aktual tentang masalah yang akan dibahas serta menggambarkan kenyataan yang terjadi. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, mencit (*Mus musculus*). Sampel dalam penelitian ini menggunakan organ hati mencit (*Mus musculus*). Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah menggunakan teknik *Purposive sampling* adalah metodologi pengambilan sampel secara acak dimana kelompok sampel ditargetkan. Istrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kapas Alumunium foil Minor set surgeon Zipline plastic bag Gelas ukur (1000 ml, 500 ml) Beaker glass (1000 ml, 500 ml) Corong kaca Incubator Hotplate stirer (sRS 710 HA), dan vials stopper tools neck Cetakan blocking Bunsen Mikrotom geser Korek api gas Waterbath Beaker glass 200 ml Object glass Cover glass Staining jar Spatula kaca Timer Kotak preparat Kamera preparat Mikroskop Olimpus Tisu dan tisu berpori khusus Pot plastic Label Sampel hati mencit (*Mus Musculus*) NBF 10% Larutan Bouin Aquades Alkohol absolut $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ *mallinckrodt chemicals* Alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 96%, dan Alkohol Pro Analis Paraplast *Leica Microsystem* Spiritus Hematoksilin Eosin Xylol Canada balsam H_2SO_4 , alkohol absolut

CH₃CH₂OH Paraffin. Prosedur pengumpulan data dalam penelitian ini adalah pengambilan data Primer meliputi editing, entri data, recheck.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

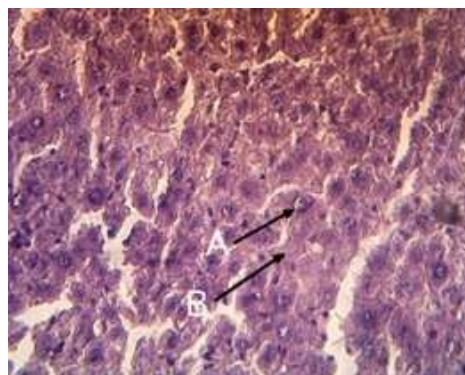
Hasil pengamatan Makroskopis diuraikan pada tabel sebagai berikut :

Tabel 1. Kualitas Makroskopis Hepar Mencit (*Mus Musculus*).

Larutan Fiksasi	Perlakuan	Kualitas Mikroskopis
Bouin 4 Jam	U1	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
	U2	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
	U3	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
	U4	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan sobek.
	U5	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
	U6	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
NBF 4 Jam	U1	Warna coklat pucat, segar, jaringan utuh
	U2	Warna coklat pucat, segar, jaringan utuh
	U3	Warna coklat pucat, segar, jaringan utuh
	U4	Warna coklat pucat, segar, jaringan utuh
	U5	Warna coklat pucat, segar, jaringan utuh
	U6	Warna coklat pucat, segar, jaringan utuh
NBF 16 Jam	U1	Warna coklat mudah, segar, jaringan utuh
	U2	Warna coklat mudah, segar, jaringan utuh
	U3	Warna coklat mudah, segar, jaringan utuh
	U4	Warna coklat mudah, segar, jaringan utuh
	U5	Warna coklat mudah, segar, jaringan utuh
	U6	Warna coklat mudah, segar, jaringan utuh
Bouin 16 Jam	U1	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
	U2	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
	U3	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
	U4	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
	U5	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.
	U6	Warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh.

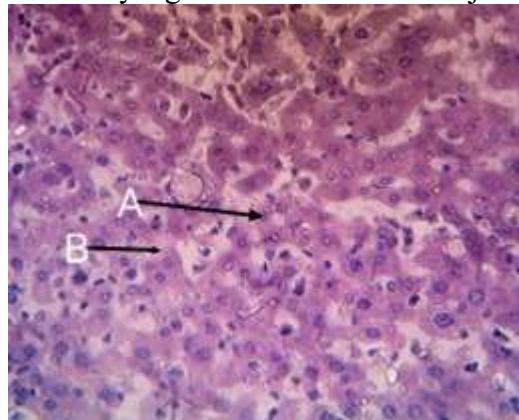
Tabel 2. Hasil Pengamatan Mikroskopis Hepar Mencit Yang Di Warnai Dengan HE.

No	Hasil Pengamatan Mikroskopis	Keterangan
1.	<ul style="list-style-type: none"> • Gambar yang baik Bouin fiksasi 4 jam 	Gambaran Mikroskopis Hepar Mencit yang Difiksasi dengan Bouin 4 jam (400x) (A) Inti sel jelas (B) Sitoplasma jelas Warna seragam
	<ul style="list-style-type: none"> • Gambar yang kurang baik Bouin fiksasi 4 jam 	Gambaran Mikroskopis Hepar Mencit yang Difiksasi dengan Bouin 4 jam (400x) (A) Inti sel kurang jelas (B) Sitoplasma kurang jelas Warna seragam
2.	<ul style="list-style-type: none"> • Gambar yang baik NBF 10% fiksasi 4 jam 	Gambaran Mikroskopis Hepar Mencit yang Difiksasi dengan NBF 10% 4 Jam (400x) (A) Inti sel jelas (B) Sitoplasma jelas Warna seragam
	<ul style="list-style-type: none"> • Gambar yang kurang baik NBF 10% fiksasi 4 jam 	Gambaran Mikroskopis Hepar Mencit yang Difiksasi dengan NBF 10% 4 Jam (400x)



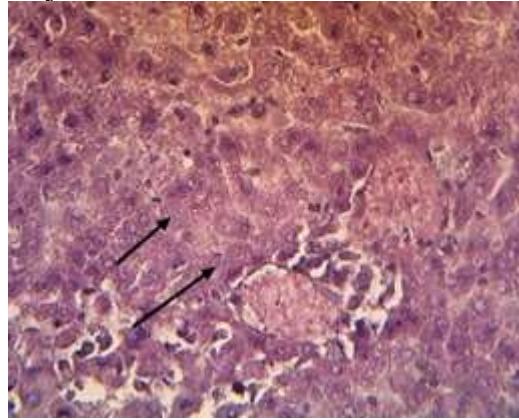
- (A) Inti sel kurang jelas
- (B) Batasan sitoplasmanyanya kurang jelas

3. • Gambar yang baik Bouin fiksasi 16 jam



Gambaran Mikroskopis Hepar Mencit yang Difiksasi dengan Bouin 16 jam (400x)
(A) Inti sel jelas
(B) Sitoplasma jelas Warna seragam

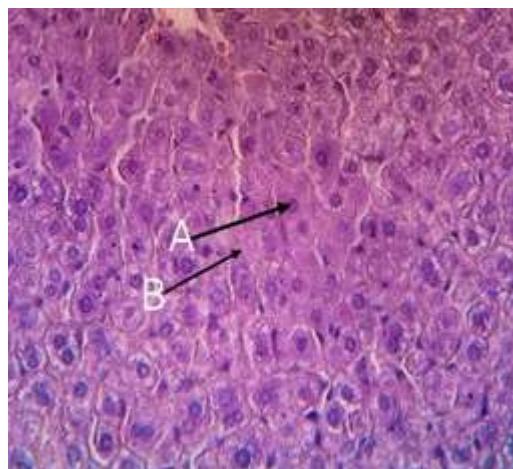
• Gambar yang kurangbaik Bouin fiksasi 16 jam



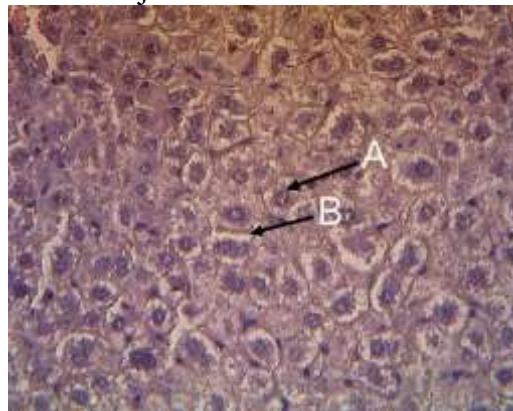
Gambaran Mikroskopis Hepar Mencit yang Difiksasi dengan Bouin 16 jam (400x)
(A) Inti sel kurang jelas
(B) Sitoplasma kurang jelas Warna tidak seragam

4. • Gambar yang baik NBF 10 % fiksasi 16 jam

Gambaran Mikroskopis Hepar Mencit yang Difiksasi dengan NBF 10% 16 jam (400x)
(A) Inti sel jelas
(B) Sitoplasma jelas Warna seragam



- Gambar yang kurang baik NBF 10 % fiksasi 16 jam



Gambaran
Mikroskopis Hepar
Mencit yang
Difiksasi dengan
NBF 10% 16 jam
(400x)
(A) Inti sel pecah
(tidak utuh)
(B) Sitoplasma
warnanya tidak
merata
Warna tidak
seragam

Tabel 3. Skor dan Presentase Kualitas Preparat Ulangan.

Perlakuan Fiksasi	Jumlah Hasil Kualitas Preparat Jaringan						Rata-Rata		
	U1	U2	U3	U4	U5	U6	Baik	Kurang Baik	Buruk
B1	3	2	2	3	2	2	2 (33,33%)	4 (66,67%)	0 (0,00%)
B2	3	3	2	3	3	3	5 (83,33%)	1 (16,67%)	0 (0,00%)
C1	2	3	3	3	3	3	5 (83,33%)	1 (16,67%)	0 (0,00%)
C2	3	2	3	1	2	2	2 (33,33%)	3 (50,00%)	1 (16,67%)

Ket :

- B1 : Perlakuan pertama menggunakan fiksasi NBF 10% selama 4 jam
- B2 : Perlakuan kedua menggunakan fiksasi NBF 10% selama 16 jam
- C1 : Perlakuan ketiga menggunakan fiksasi Bouin selama 4 jam
- C2 : Perlakuan ke empat menggunakan fiksasi Bouin selama 16 jam
- U : Ulangan perlakuan (U1,U2,U3,U4,U5,U6)

Berdasarkan tabel 1 hasil penelitian yang telah didapat secara makroskopis hepar mencit (*Mus musculus*), pada yang difiksasi menggunakan larutan Bouin 4 jam

didapatkan hasil pada pengulangan 1,2,3,5, dan 6 didapatkan hasil warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh sedangkan pada pengulangan 4 didapatkan hasil warna kuning pucat, tekstur keras, jaringan sobek berwarna. Pada fiksasi larutan Bouin 16 jam terlihat berwarna kuning pucat, tekstur keras, jaringan utuh, dan terdapat bintik berwarna gelap yang merupakan eritrosit Sedangkan hasil pengamatan mikroskopis hepar mencit (*Mus musculus*) yang difiksasi menggunakan NBF 10% didapatkan hasil NBF 10% 4 jam didapatkan hasil pada pengulangan 1-6 warna coklat pucat, segar, jaringan utuh sedangkan pada fiksasi 16 jam pada pengulangan 1-6 terlihat warna coklat mudah, segar dan jaringan utuh.

Berdasarkan tabel 2 Gambaran mikroskopis preparat hepar mencit (*Mus musculus*) dengan kriteria penilaian inti sel , sitoplasma , dan keseragaman warna yang difiksasi menggunakan larutan Bouin dan larutan NBF 10% didapatkan hasil Pada preparat yang baik fiksasi dengan larutan bouin selama 4 dan 16 jam di dapat hasil inti sel tampak jelas, sitoplasmanya jelas dan warnanya seragam dimana intisel berwarna ungu akibat dari pewarnaan hematoxilin dan sitoplasma berawrna merah dari hasil pewarnaan dengan eosin yang mewarnai sitoplasma. Sedangkan pada preparat yang kurang baik yang di fiksasi dengan larutan bouin selama 4 dan 16 jam didapatkan hasil intisel yang tidak jelas dan bertumpuk, sitoplasmanya kurang jelas. Pada preparat yang baik fiksasi dengan larutan NBF 10 % selama 4 dan 16 jam di dapat hasil inti sel tampak jelas, sitoplasmanya jelas batas anntara selnya jelas dan warnanya seragam dimana intisel berwarna ungu akibat dari pewarnaan hematoxilin dan sitoplasma berawrna merah dari hasil pewarnaan dengan eosin yang mewarnai sitoplasma. Sedangkan pada preparat yang kurang baik yang di fiksasi dengan larutan NBF 10 % selama 4 dan 16 jam didapatkan hasil intisel yang tidak jelas serta pecah di tengah intiselnya, sitoplasmanya kurang jelas.

Pada tabel 3 Gambaran mikroskopis preparat hepar mencit (*Mus musculus*) dengan kriteria penilaian inti sel, sitoplasma, dan keseragaman warna yang difiksasi menggunakan larutan Bouin variasi waktu 4 jam menunjukkan hasil preparat baik sebanyak 83,33% dan kualitas preparat kurang baik 16,67 %. Hasil ini sama dengan kualitas preparat yang difiksasi dengan menggunakan NBF 10% variasi waktu 16 jam lebih baik dari kualitas preparat yang difiksasi menggunakan NBF 10% selama 4 jam dengan hasil preparat kualitas baik sebanyak 33,33% dan kualitas preparat kurang baik sebanyak 66,67%. Namun terdapat penurunan kualitas pada preparat yang difiksasi menggunakan larutan Bouin dengan variasi waktu 16 jam dengan presentase kualitas preparat baik sebanyak 33,33%, presentase preparat kualitas kurang baik sebanyak 50,00%, dan presentase preparat dalam kondisi buruk sebanyak 16,67%.

Hasil ini menunjukkan bahwa fiksasi menggunakan larutan NBF 10 % variasi waktu 16 jam tidak lebih baik dari fiksasi menggunakan larutan Bouin variasi waktu 4 jam dan fiksasi Bouin variasi waktu 16 jam . Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Afrida Dwi Arit et.al 2021) yang menyatakan bahwa fiksasi menggunakan larutan Bouin variasi waktu 16 jam tidak lebih baik dari fiksasi menggunakan NBF 10%. Dengan demikian didapatkan bahwa preparat hepar mencit (*Mus musculus*) yang difiksasi dengan larutan Bouin variasi waktu 4 jam memiliki kualitas mikroskopis yang lebih baik dari fiksasi dengan larutan NBF 10 % variasi waktu 4 jam dan memiliki kualitas preparat yang sama baiknya dengan fiksasi NBF 10% variasi waktu 16 jam. Fiksasi dengan larutan Bouin variasi waktu 4 jam juga memiliki kualitas terbaik dari semua variasi waktu lainnya.

Setelah mengamati preparat hepar mencit (*Mus musculus*) secara mikroskopis dengan perbesaran 400x, ditemukan bahwa gambaran kualitas inti sel yang difiksasi dengan larutan Bouin secara keseluruhan lebih baik dari NBF 10 % yang dinilai berdasarkan tabel kriteria penilaian kualitas preparat. Inti sel tampak berwarna biru keunguan gelap dan kuat.

Larutan Bouin adalah fiksatif majemuk yang digunakan dalam histologi. Ditemukan oleh ahli biologi Prancis Pol Bouin, larutan ini terdiri dari formaldehida, asam asetat, dan asam pikrat dalam larutan berair. Cairan Bouin khususnya berguna untuk fiksasi biopsi jaringan lunak karena fiksatif ini memungkinkan pewarnaan inti yang lebih tajam dan lebih baik daripada formalin penyanga netral 10% (Alimi et al., 2023). Namun, larutan ini tidak bagus ketika ultrastruktur jaringan dipertahankan untuk mikroskopi elektron, tetapi bagus ketika struktur jaringan yang lembut dan halus dipertahankan. Selain melisik sel darah merah, asam asetat dalam fiksatif ini melarutkan endapan kecil zat besi dan kalsium dalam jaringan (Fitriana & Mushlih, 2020). Asam format sebagai pengganti asam asetat dapat digunakan untuk dekalsifikasi dan fiksasi jaringan. Semua tiga bahan kimia dalam larutan Bouin memiliki efek yang sama. Meskipun formalin menyebabkan sitoplasma menjadi basofilik, efek asam pikrat mengimbanginya, menghasilkan pewarnaan H&E nukleus dan sitoplasma yang sangat baik. Asam pikrat dan asam asetat memfiksasi jaringan lunak, sedangkan efek formalin pada pengerasan jaringan diimbangi oleh efek mereka pada penyusutan jaringan.

Neutral Buffer Formalin (NBF) 10 %, telah menjadi fiksatif umum yang digunakan dalam pengaturan diagnostik. Kandungan dalam NBF 10% Formalin sebagai sumber utama zat aktif yang merupakan gas formaldehida yang dilarutkan dalam air. Buffer Fosfat Garam seperti asam sodium fosfat monohidrat dan disodium fosfat anhidrat yang berfungsi untuk menstabilkan pH larutan agar tetap netral, membantu dalam fiksasi yang optimal, dan mencegah artefak yang merusak jaringan. Air (Aquadest) Digunakan untuk mengencerkan

formalin dan komponen buffer hingga mencapai konsentrasi akhir 10%. Ini lebih baik daripada campuran formalin sederhana seperti garam fosfat; pH netral menghambat pigmen formalin dan mencegah kerusakan eritrosit; fosfat menyesuaikan pH sekitar 7,0 sebagai netral, tetapi tidak perlu menyesuaikannya jika sedikit berbeda (Fitriana & Mushlih, 2020). Meskipun pembentukan pigmen formalin dihambat tidak berhenti sama sekali, dan dapat perlahan-lahan terbentuk di jaringan yang banyak darah, atau dalam jaringan yang disimpan untuk waktu yang lama di NBF 10%. NBF memungkinkan pemulihan warna alami dari spesimen untuk digunakan sebagai fiksatif fotografi dan spesimen museum. Protein jaringan harus diikat silang untuk fiksasi menyeluruh, tetapi campuran formalin sederhana dapat mengubah jaringan sebelum mengikat protein. Oleh karena itu, pengamatan visual tidak menunjukkan tingkat fiksasi, dan perubahan warna tidak dapat dianggap sebagai indikasi lengkap (A. Sriwahyunizah, 2019).

Perbedaan hasil pewarnaan jaringan dengan menggunakan Larutan Fiksatif Bouin dan NBF 10 % (Neutral Buffered Formalin 10 %) disebabkan oleh komposisi kimia dan cara kerja kedua fiksatif.

a. Komposisi Fiksatif

Bouin terdiri dari asam pikrat,formalin,dan asam asetat. Sedangkan larutan NBF 10 % terutama larutan formalin yang dibuffer dengan fosfat agar pH tetap netral.

b. Mekanisme Fiksasi

Bouin Asam pikrat menembus jaringan dengan cepat, memberikan kontras warna kuning yang meningkatkan intensitas pewarnaan. Asam asetat membantu mempertahankan struktur inti sel (nukleus) dengan baik. Kombinasi ini membuat detail inti (chromatin) dan sitoplasma lebih tajam serta lebih mudah diwarnai.

NBF 10 % Formalin bekerja dengan membentuk jembatan silang (cross-linking) protein, sehingga jaringan lebih stabil, tetapi bisa menyebabkan antigen masking (epitop sulit dijangkau pewarna/antibodi). Warna pewarnaan inti kadang lebih pucat, sitoplasma bisa kurang kontras

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Terdapat pengaruh variasi waktu fiksasi menggunakan larutan Bouin dan NBF 10% terhadap kualitas preparat jaringan. Preparat yang difiksasi menggunakan Bouin variasi waktu 4 jam memiliki kualitas lebih baik dari fiksasi menggunakan NBF 10% variasi waktu 4 jam dan sama baiknya dengan kualitas preparat yang difiksasi menggunakan NBF 10% variasi waktu 16 jam . Terdapat penurunan kualitas pada preparat yang difiksasi menggunakan

larutan NBF 10 % dengan variasi waktu 16 jam. Fiksasi menggunakan larutan NBF 10 % variasi waktu 16 jam tidak lebih baik dari fiksasi menggunakan Bouin variasi waktu 4 jam maupun fiksasi Bouin variasi waktu 16 jam. Didapatkan hasil preparat dengan kualitas baik sebanyak 83,33% dan kualitas preparat kurang baik sebanyak 16,67% pada Bouin variasi 4 jam. Pada variasi waktu 16 jam didapatkan kualitas preparat baik sebanyak 33,33%, presentase preparat kualitas kurang baik sebanyak 50,00% dan preparat dalam kondisi buruk sebanyak 16,67%. Didapatkan preparat kualitas baik sebanyak 33,33% dan kualitas preparat kurang baik sebanyak 66,67% NBF 10 % pada variasi waktu 4 jam. Pada NBF 10 % variasi waktu 16 jam didapatkan kualitas baik sebanyak 83,33% dan kualitas preparat kurang baik sebanyak 16,67%.

Perlu memperhatikan tempat penyimpanan preparat untuk menghindari preparat rusak atau pecah sebelum dilakukan pengamatan. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya tentang gambaran mikroskopis jaringan yang difiksasi menggunakan larutan Bouin dan larutan lainnya selain NBF 10% dengan sampel selain organ hepar mencit (*Mus musculus*).

DAFTAR REFERENSI

Alimi, H. S., Sari, R. V. S., Apriliyani, T., Nuriliani, A., Retnoaji, B., Saragih, H., & Rohmah, Z. (2023). Fixative solution for macromolecules in histological preparations. *Berkala Ilmiah Biologi*, 14(3), 41-49. <https://doi.org/10.22146/bib.v14i3.6531>

Diagnocine. (2020). Histological fixatives. [PDF document].

Embryology Histology Fixatives. (n.d.). Bouin's solution. University of New South Wales Embryology.

Fauzi Risanto, M., Dewi Sri, S., & Arya, I. (2018). Perbandingan fiksasi BNF 10% dan aseton pada jaringan dengan pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin). *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 9(4), 1-9.

Fitriana, W. A., & Mushlih, M. (2020). Pengaruh durasi fiksasi buffer formalin 10% terhadap kualitas pewarnaan hematoksilin eosin (HE) pada jaringan terduga kanker payudara. 1-6.

Formalin versus Bouin solution for testis biopsies: Which is the better fixative? (2020). *International Journal of Clinical & Diagnostic Pathology*, 4(4), 113-119.

Histology fixatives. (2024). *Histology.blog - Bouin's Solution & Other Fixatives*.

Muthiawati, S., Wiryanti, W., Durachim, A., & Mulia, Y. S. (2023). Optimasi waktu dan suhu fiksasi spesimen terhadap kualitas preparat jaringan. *Jurnal Kesehatan Siliwangi*, 4(1), 479-484. <https://doi.org/10.34011/jks.v4i1.1508>

Oktaviando, A. Y. (2022). Studi pengaruh lama waktu fiksasi terhadap gambaran mikroskop jaringan dengan pewarnaan hematoxylin-eosin. 25.

Rahmadani, A. F. (2019). Pengaruh lama fiksasi BNF 10% dan metanol terhadap gambaran mikroskopis jaringan dengan pewarnaan HE (Hematoksilin-Eosin). *Universitas Muhammadiyah Semarang*, 1-6.

Rusmiatik, A. (2019). Perbandingan fiksasi larutan Bouin dan formalin pada sediaan preparat histologi testis marmut. *Jurnal Kedokteran*, 4(20), 5-9.

Soewondo. (2022). Gingivitis pada anak. *PT. Alumni*, 1-19.

Sofyanita, E. N., & Siwi, U. P. (2024). 5051-Article text-27492-1-10-20240610. *Jurnal Surya Medika*, 10(1), 362-370. <https://doi.org/10.33084/jsm.v10i1.5051>

Sriwahyunizah, A. (2018). Perbandingan fiksasi neutral buffer formalin 10% dan alkohol 70% pada jaringan dengan pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin). *Jurnal Analis Kesehatan*, 2(4), 1-8.

Wahyuni, A. (2023). Pengaruh penundaan fiksasi buffer netral formalin 10% terhadap gambaran mikroskopis jaringan dengan pewarnaan hematoxylin eosin.

Wax-it Histology Services. (2013). Fixing tissue for optimal results: Part 1. *Wax-it News*.