



THE EFFECTS OF PRE-FIXATION TIME ON KIDNEY TISSUE STRUCTURE OF *Mus musculus*

PENGARUH WAKTU PRA-FIKSASI TERHADAP STRUKTUR JARINGAN GINJAL *Mus musculus*

Fitri Nadifah^{1*}, Yuliana Prasetyaningsih¹, Yaya Tri Alhikmah¹
¹ Prodi Teknologi Laboratorium Medis STIKES Guna Bangsa Yogyakarta
fitri.nadifah@gmail.com
+62 896-0536-7007

ABSTRACT

*Fixation is the most important step in the preparation of histological preparations. One of the factors that can affect the assessment of the preparations is the delay in the fixation stage. The purpose of this study was to determine the effect of pre-fixation time on the kidney tissue structure of white rat *Mus musculus*. Four kidneys from white rats were treated with variations of pre-fixation time: 0, 30, 60 and 90 minutes. After pre-fixation, tissue processing was carried out until staining with Hematoxylin-Eosin. The results showed that the kidneys treated with pre-fixation (30, 60 and 90 minutes) experienced changes in tissue structure such as swelling and vacuolization of the tubular epithelium. The kidney tissue structure without treatment (0 minutes) did not change. From this study, the researchers suggested that the tissue to be made into histology preparations should be fixed immediately or without delay. This is in order to get the best assessment that describe conditions such as being alive.*

Keywords: kidney, pre-fixation, tissue, histology

INTISARI

Fiksasi adalah tahap terpenting dalam pembuatan sediaan histologi. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi penilaian sediaan histologi patologi adalah penundaan tahap fiksasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh waktu pra-fiksasi terhadap struktur jaringan ginjal tikus putih (*Mus musculus*). Empat ginjal dari tikus putih diberi perlakuan variasi waktu pra-fiksasi, yaitu 0, 30, 60 dan 90 menit. Setelah pra-fiksasi, dilakukan prosesing jaringan hingga pewarnaan dengan Hematoxylin-Eosin. Hasil penelitian menunjukkan ginjal yang diberi perlakuan pra-fiksasi (30, 60 dan 90 menit) mengalami perubahan pada struktur jaringan seperti pembengkakan dan vakuolisasi epitel tubulus. Struktur jaringan ginjal tanpa perlakuan (0 menit) tidak mengalami perubahan. Dari penelitian ini, peneliti menyarankan agar jaringan yang akan dibuat sediaan histologi segera difiksasi atau tanpa dilakukan penundaan. Hal ini agar mendapatkan penilaian yang terbaik, yaitu sediaan histologi yang menggambarkan kondisi seperti masih hidup.

Kata kunci: ginjal, pra-fiksasi, jaringan, histologi

PENDAHULUAN

Fiksasi adalah salah satu tahapan penting dalam histoteknologi yang bertujuan untuk mempertahankan morfologi jaringan seperti kondisi awal atau fisiologis. Fiksasi dilakukan segera setelah pengambilan jaringan dilakukan,

yaitu dengan memasukkan jaringan ke dalam cairan fiksasi. Jaringan direndam selama waktu tertentu. Fiksasi bertujuan untuk mempertahankan morfologi jaringan seperti kondisi awal atau sama seperti jaringan hidup



tanpa adanya perubahan bentuk maupun ukuran (Sherwood, 2011).

Proses fiksasi tidak akan membuat kualitas sediaan jaringan menjadi rusak karena proses fiksasi dilakukan untuk menghentikan autolisis jaringan melalui inaktivasi enzim hidrolisis dan untuk mencegah proses pembusukan yang diakibatkan oleh aktifitas bakteri. Fiksasi adalah berbagai perlakuan yang dapat melindungi struktur sel dan komposisi biokimianya. Kualitas fiksasi adalah kunci untuk semua tahap selanjutnya yang penting dalam pembuatan sediaan histopatologik pengolahan jaringan (Jusuf, 2009).

Secara umum fiksasi dilakukan dari 6-24 jam. Waktu fiksasi tergantung dari jenis fiksatifnya. Pengaruh lama fiksasi buffer formalin 10% terhadap gambaran mikroskopis jaringan dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin. Hasil penelitian menggunakan fiksasi buffer formalin 10% dengan menggunakan variasi waktu 6 jam dan 24 jam diperoleh hasil gambaran mikroskopisnya baik. Jaringan yang difiksasi menggunakan metanol dengan variasi waktu 6, 24 jam dan 7 hari mempunyai hasil berbeda yaitu gambaran mikroskopiknya kurang baik. Jika jaringan difiksasi dengan buffer formalin selama 24 jam maka sebagian besar dari buffer formalin tersebut akan luruh, buffer formalin bereaksi sangat cepat dengan komponen jaringan dan sebagian reaksi bersifat *reversible*. Semakin lama fiksasi dengan buffer formalin dapat menyebabkan penyusutan dan pengerasan dari jaringan (Sherwood, 2011).

Inkubasi adalah teknik perlakuan yang digunakan untuk proses pemeliharaan atau penjagaan suatu jaringan agar terjaga dalam kondisi yang baik dan Inkubasi suhu ruang dilakukan pada tahap sebelum tahap fiksasi (Peckham, 2014).

Ginjal tikus putih biasanya sering digunakan dalam berbagai jenis penelitian dikarenakan ukuran jaringan ginjal lebih besar dan tidak terlalu lunak dibandingkan dengan organ-organ lainnya seperti jantung, hati, testis dan lain-lain. Banyak peneliti menggunakan jaringan ginjal dalam penelitian karena jaringan ginjal memiliki tekstur

yang tidak terlalu keras dan tidak terlalu lunak sehingga mempermudah pada proses pemotongan preparat (Ridwan, 2013).

METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah *quasi eksperimental* dengan menggunakan bagian ginjal tikus putih (*Mus musculus*) dengan perlakuan perbedaan waktu pra-fiksasi.

Bahan pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ginjal dari tikus putih (*Mus musculus*), pewarnaan Hematoxylin Eosin, alkohol bertingkat 70%, 80%, 95%, 100%, buffer formalin 10%, NaCl dan kloroform.

Empat organ ginjal dari tikus putih diberi perlakuan berupa waktu pra-fiksasi yang berbeda, yaitu 0, 30, 60 dan 90 menit. Ginjal pertama tanpa waktu pra-fiksasi langsung dimasukkan ke dalam larutan fiksatif buffer formalin 10%. Ginjal kedua, ketiga dan keempat masing-masing diinkubasi terlebih dahulu selama 30, 60 dan 90 menit sebelum tahap fiksasi. Pada tahap pra-fiksasi tersebut ginjal diolesi terlebih dahulu dengan larutan NaCl agar permukaan ginjal tidak kering. Seluruh ginjal difiksasi selama 12 jam.

Setelah proses fiksasi selesai, jaringan ginjal dilanjutkan dengan tahapan dehidrasi. Dehidrasi merupakan tahapan yang di gunakan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan setelah dilakukan proses fiksasi. Pada tahap dehidrasi larutan yang digunakan yaitu larutan alkohol bertingkat, dengan urutan yaitu yang pertama jaringan ginjal direndam dengan alkohol 70% selama 2 jam, alkohol 80% selama 2 jam, alkohol 95% selama 1 jam, alkohol absolut I selama 2 jam, alkohol absolut II selama semalam, dan yang terakhir alkohol absolut III selama 1 jam.

Setelah dilakukan tahap dehidrasi, kemudian jaringan ginjal di lanjutkan dengan tahap clearing. Tahap clearing dilakukan dengan cara memasukkan jaringan ginjal ke dalam larutan xylol I selama 2 jam kemudian xylol II selama 2 jam.

Tahap Infiltrasi Parafin dilakukan dengan memasukkan sampel jaringan ginjal yang telah dilakukan tahap fiksasi, dehidrasi, dan clearing ke



dalam parafin I selama 1 jam dan parafin II selama 2 jam. Setelah jaringan ginjal direndam dengan parafin kemudian jaringan ginjal dimasukkan ke dalam kaset.

Setelah tahap infiltrasi parafin, kemudian dilakukan proses penanaman jaringan ginjal dengan cara mengambil jaringan ginjal didalam kaset menggunakan penjepit yang sebelumnya telah dipanaskan dengan lampu spritus. Kemudian letakkan jaringan ginjal ke dalam kotak karton yang berisi larutan parafin cair, jaringan ginjal sedikit di tekan menggunakan penjepit. Setelah itu disimpan pada suhu 20 °C - 25°C hingga parafin mengeras.

Jika parafin sudah mengeras dengan sempurna, kemudian parafin di potong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 2 mm. Jaringan yang sudah dipotong dimasukkan ke dalam waterbath sehingga jaringan merenggang. Jaringan diambil menggunakan objek gelas dengan cara menempelkan ujung potongan kemudian menggoyangkan ke kanan dan ke kiri dengan hati-hati jangan sampai potongan jaringan sobek dan terlipat. Kemudian sampel dalam objek gelas dikeringkan. Tahap terakhir adalah pewarnaan potongan jaringan dengan Hematoxylin Eosin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparat yang telah diwarnai dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE) dan dimounting dengan satu tetes entelan dan ditutup dengan deck glass kemudian diamati di bawah mikroskop. Dari pengamatan, terlihat adanya perbedaan struktur pada bagian ginjal dengan perlakuan berbagai waktu inkubasi (Gambar 1).

Pemberian NaCl pada proses pra-fiksasi bertujuan untuk mengkondisikan jaringan agar lebih siap untuk diproses sebelum direndam menggunakan larutan fiksatif dan untuk mencegah kekeringan pada ginjal ketika diinkubasi pada suhu ruangan. Tahap dehidrasi pada prosesing jaringan bertujuan untuk proses penarikan molekul air dari dalam jaringan agar seluruh ruang-ruang antar sel dalam jaringan dapat diisi dengan molekul parafin. Tahap clearing

pada prosesing jaringan bertujuan untuk proses penjernihan atau mentransparankan jaringan dan menarik alkohol atau dehidran yang lain dari dalam jaringan agar dapat digantikan oleh molekul parafin. Tahap infiltrasi parafin bertujuan untuk proses pengeluaran xilen dari dalam jaringan yang akan digantikan oleh parafin cair. Tahap blocking bertujuan untuk mempermudah dalam melakukan proses pemotongan atau pengirisan sampel. Tahap pemotongan ini adalah tahap pengirisan jaringan dengan menggunakan mikrotom dan sampel yang dipotong tebalnya sekitar 3-5 mikron (Johnson, 2012).

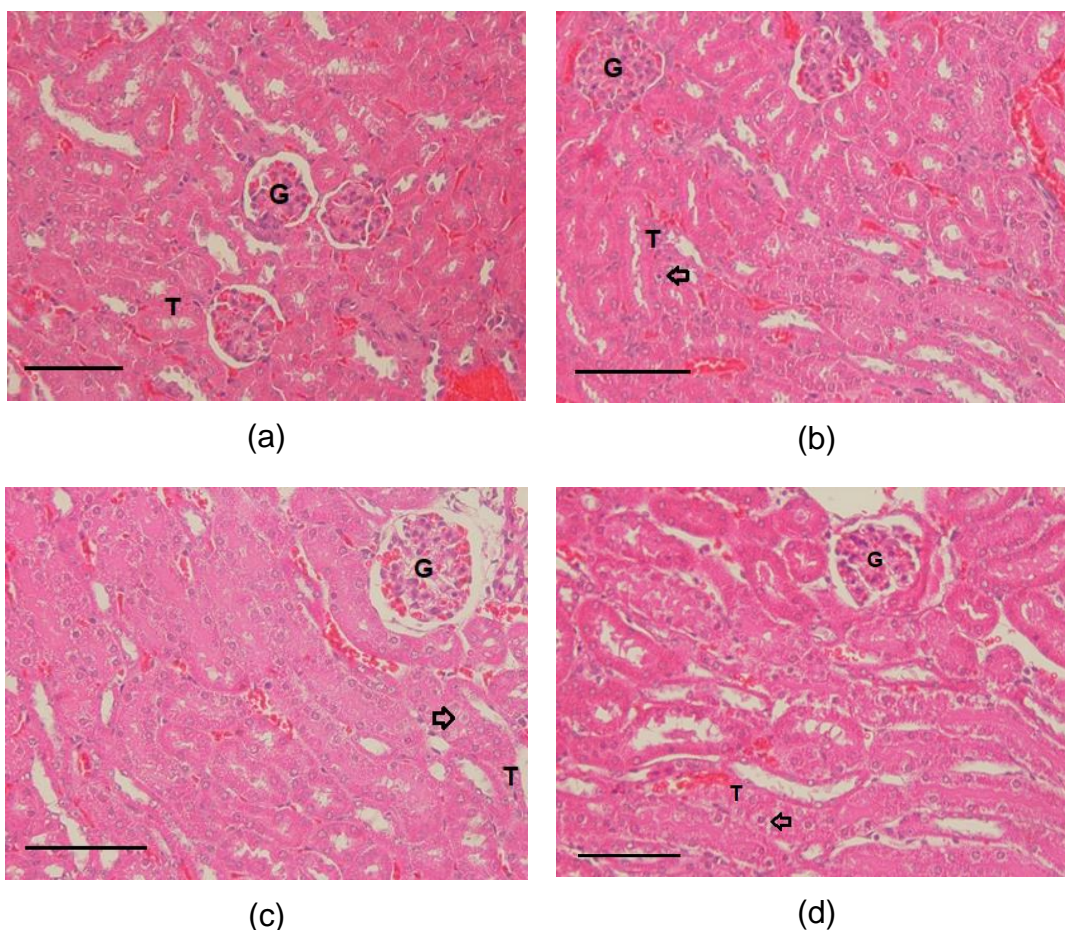
Pewarnaan Hematoxylin-Eosin digunakan dalam penelitian ini karena eosin memberikan zat berwarna merah dan hematoxylin memberikan zat warna ungu dan pewarnaan tersebut jika digunakan secara bersamaan akan sangat memudahkan pengamatan bagian-bagian sel pada jaringan. Fiksasi jaringan pada penelitian ini dilakukan dengan waktu 12 jam karena secara umum waktu fiksasi menggunakan larutan fiksatif buffer formalin 10% sebaiknya hanya 6-24 jam (Mescher, 2015). Jika terlalu lama tekstur jaringan ginjal akan terlalu keras dan apabila kurang dari 6 jam tekstur jaringan ginjal masih terlalu rapuh.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ginjal dengan waktu pra-fiksasi 0 menit tidak mengalami perubahan patologis dan semua bagian pada jaringan ginjal terlihat normal. Jaringan ginjal dengan waktu pra-fiksasi 30 menit menunjukkan bahwa terjadi sebagian kecil pembengkakan ringan pada epitel tubulus sedangkan pada bagian jaringan ginjal yang lain terlihat normal. Begitu pula pada ginjal dengan perlakuan pra-fiksasi 60 menit menunjukkan bahwa sebagian epitel tubulus mengalami pembengkakan dikarenakan jaringan tidak langsung difiksasi. Ginjal dengan waktu inkubasi 90 menit menunjukkan bahwa sebagian besar epitel tubulus mengalami pembengkakan disertai dengan vakuolisasi terbatas tidak jelas di sitoplasma. Pembengkakan jaringan dapat terjadi dikarenakan jaringan tidak langsung dimasukkan kedalam larutan fiksatif buffer formalin 10%. Ternyata semakin lama proses inkubasi pada

jaringan ginjal tikus berpengaruh terjadinya kerusakan pada bentuk dan susunan sel jaringan.

Hasil analisis preparat jaringan ginjal menunjukkan bahwa waktu yang paling optimal dan paling baik dalam tahap pra-fiksasi adalah 0 menit atau tanpa perlakuan pra-fiksasi. Jaringan yang langsung direndam menggunakan buffer formalin 10% tidak terjadi perubahan patologis dan semua bagian sel jaringan masih terlihat normal. Reaksi jaringan ginjal tikus terhadap buffer formalin 10% adalah terjadinya pengerasan tekstur jaringan, penghambatan proses pembusukan dan untuk proses pengawetan jaringan (Peckham, 2014).

Pulasan (pewarna) yang digunakan pada penelitian ini adalah pewarnaan untuk memulas inti dan sitoplasma serta jaringan penyambungannya yaitu pulasan hematoksilin-eosin (HE). Pada pulasan HE digunakan 2 macam zat warna yaitu hematoksilin yang berfungsi untuk memulas inti sel dan memberikan warna biru (basofilik). Eosin yang merupakan counterstaining hematoksilin digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda dengan nuansa yang berbeda (Kuehnel, 2013).



Gambar 1 | Struktur jaringan ginjal dengan pewarnaan HE setelah perlakuan pra-fiksasi **(a)** 0 menit: tidak ada perubahan patologis, baik pada glomerulus dan tubulus di korteks, serta tubulus dan pelvis renalis di medula; **(b)** 30 menit. Anak panah: epitel tubulus mengalami pembengkakan ringan; **(c)** 60 menit. Anak panah: epitel tubulus mengalami pembengkakan ringan; **(d)** 90 menit. Anak panah: sebagian epitel tubulus mengalami pembengkakan disertai vakuolisasi terbatas tidak jelas di sitoplasma. Garis skala: 5 cm

Hasil sesuai dengan penelitian yang mengatakan bahwa jika sampel organ ginjal tikus langsung dilakukan tahap fiksasi maka tidak akan ada perbedaan hasil yang diberikan antara masing-masing perbedaan waktu fiksasi. Berbeda jika sebelum dilakukan tahap fiksasi dilakukan proses pra-fiksasi terlebih dahulu akan terlihat perbedaan pada proses pengamatan hasil pada mikroskop. Selama apapun proses fiksasi hanya akan berpengaruh pada tekstur jaringan yang semakin keras dan tidak berpengaruh pada perubahan patologis pada susunan sel jaringan (Guyton and Hall, 2013).

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam pembuatan preparat jaringan ginjal tikus adalah tebal irisan jaringan 3-5 mm sehingga cairan fiksasi dapat dengan cepat memfiksasi seluruh jaringan. Volume cairan fiksasi sekurang-kurangnya harus 15-20x volume jaringan yang akan difiksasi. Besarnya volume jaringan ginjal menentukan volume fiksasi yang diperlukan sedangkan tebal jaringan ginjal menentukan kecepatan fiksasi yang diperlukan (Gartner and Hiatt, 2014).

KESIMPULAN

Ginjal dengan perlakuan pra-fiksasi menunjukkan perubahan pada struktur jaringan, seperti pembengkakan dan vakuolisasi epitel tubulus. Perubahan ini akan berpengaruh pada penilaian histo-patologi pada praktek klinis. Jaringan yang langsung difiksasi (tanpa pra-fiksasi) adalah perlakuan terbaik untuk mendapatkan struktur jaringan yang sama seperti saat masih hidup.

APRESIASI

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Prodi Teknologi Laboratorium Medis STIKES Guna Bangsa Yogyakarta yang telah memberikan ijin untuk pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Gartner, L. P. and Hiatt, J. L. (2014) *Buku Ajar Berwarna Histologi*. Penerbit Saunders Elsevier Singapore.
- Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2013) *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi ke-9 (terjemahan dari Textbook of Medical Physiology)*. Jakarta: EGC.
- Johnson, K. E. (2012) *Quick Review Histologi dan Biologi Sel*. Binarupa Aksara.
- Jusuf, A. A. (2009) *Histotek Dasar*. Jakarta: Bagian Histologi Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kuehnel, W. (2013) *Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy*. Luebeck: Thieme.
- Mescher, A. L. (2015) *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas, Lange*. Lange.
- Peckham, M. (2014) *At a Glance Histologi Patofisiologi. Edisi 2*. Jakarta: Erlangga.
- Ridwan, E. (2013) *Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan*. Jakarta: J Indon Med Assoc.
- Sherwood, L. L. (2011) *Fisiologi Manusia. Edisi 2*. Jakarta: EGC.

