

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Mikroteknik merupakan sebuah teknik pembuatan preparat dari hewan atau tumbuhan yang dilakukan dengan tujuan untuk mempermudah penelitian serta pengamatan bagian dari hewan atau tumbuhan yang dilihat lewat mikroskop (Faluti dkk., 2022). Salah satu proses penting pada pembuatan preparat dalam mikroteknik hewan adalah fiksasi. Fiksasi dilakukan untuk mengawetkan elemen histologis dan sitologis, menghentikan dengan cepat proses metabolisme, memberikan konsistensi material lunak secara koagulasi, dari protoplasma dan material-material lain yang dibentuk oleh protoplasma, dan mengawetkan bentuk asli jaringan yang akan diamati. Banyak masalah yang sering dijumpai pada tahapan fiksasi, salah satu diantaranya adalah kesulitan mengambil organ di dalam flakon yang mungkin terjadi jika terdapat kesalahan dalam ukuran memotong atau kesalahan dalam pemilihan pinset (Sari dkk., 2016). Preparat histologi yang baik bisa didapatkan melalui teknik fiksasi yang benar karena kesalahan pada tahap fiksasi tidak dapat diperbaiki lagi pada tahap selanjutnya, sehingga proses fiksasi merupakan tahapan krusial untuk dilaksanakan dengan baik (Triwahyuni dkk., 2021).

Proses fiksasi memanfaatkan senyawa-senyawa yang disebut dengan bahan fiksatif. Bahan fiksatif dibagi menjadi dua, yaitu bahan fiksatif sederhana yang terdiri dari satu macam zat (contoh: sublimat, etanol,

dan formalin) dan bahan fiksatif campuran yang terbentuk dari lebih dari satu macam zat (contoh: bouin). Bahan yang umum digunakan dalam proses fiksasi adalah formalin dan larutan bouin. Kedua bahan ini memiliki manfaat masing-masing. Formalin memiliki kemampuan untuk membuat protein dalam jaringan bersifat lebih asam daripada jika menggunakan alkohol yang dapat menyebabkan afinitas protein menjadi lebih baik terhadap zat-zat warna basa sedangkan Bouin dapat melakukan penetrasi ke dalam jaringan lebih cepat pada nukleus dan jaringan ikat sehingga akan terpulas dengan baik. Kelemahan fiksatif Bouin yaitu jaringan akan menjadi rapuh dan sukar diiris jika waktu fiksasi terlalu lama (Rusmiatik, 2019). Hasil fiksasi menggunakan formalin didapatkan melalui *cross-linking* antara protein dan asam nukleat dengan cara membuat jembatan metilen di antara dua kelompok yang reaktif ini sedangkan fiksasi dengan alkohol mengkoagulasi substansi berprotein dengan cara menghilangkan air dari protein (Chung *et al.*, 2017).

Tahap fiksasi merupakan satu faktor yang sangat penting dari seluruh prosedur histopatologis. Penyelesaian proses ini dengan tepat (sesuai dengan implikasi dari namanya) adalah untuk memblok (“*fix*”) struktur dan komponen molekuler sehingga keadaannya hampir sama persis dengan kondisi yang sebenarnya pada makhluk hidup (Bussolati, 2022). Fiksasi dilakukan untuk melindungi jaringan, sel, dan komponen sel dari autolisis. Melalui deteksi, dapat dipastikan bahwa jaringan dan sel diawetkan dengan kondisi yang paling mendekati dengan kondisi saat

hidup, autolisis dan heterolisis dapat diatasi, menghindari hilangnya substansi yang mudah terdifusi (lisosom, dsb.), dan dapat memfasilitasi pewarnaan jaringan dengan zat warna atau reagen lain. Fiksasi jaringan harus dilakukan langsung setelah kematian untuk menghindari autolisis yang biasanya secepat mungkin terjadi setelah pemindahan jaringan pada proses pembedahan (Dağdeviren *et al.*, 2024). Fiksatif yang baik dan ideal memiliki kemampuan untuk mengeraskan komponen jaringan, tidak mendenaturasi protein penting dalam analisis histopatologis, mempertahankan morfologi sel, serta melindungi jaringan dari kerusakan ekstrinsik yang disebabkan oleh kontaminasi mikroorganisme pada jaringan. Pemilihan fiksatif dapat dilakukan dengan mempertimbangkan komponen jaringan yang akan diamati karena setiap fiksatif mempunyai mekanisme pengawetan yang berbeda terhadap komponen jaringan (Allimi dkk., 2023).

Jenis fiksatif dan lama waktu fiksasi mempengaruhi kualitas biomolekul meskipun histomorfologinya memadai. Waktu yang terlalu sebentar atau terlalu lama dalam proses fiksasi akan mengakibatkan hasil yang buruk pada spesimen uji imunohistokimia dan kualitas RNA. Banyak studi melaporkan hasil yang tidak konsisten pada seberapa lama waktu maksimal fiksasi sedangkan waktu minimal fiksasi juga kurang dapat dipahami dengan baik (Chung *et al.*, 2017). Waktu berbeda diperlukan untuk memfiksasi jaringan-jaringan yang berbeda. Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah ketebalan jaringan.

Jaringan yang lebih tebal membutuhkan waktu yang lebih lama dalam proses fiksasi jika dibandingkan dengan jaringan yang lebih tipis. Perpanjangan waktu fiksasi dapat mengakibatkan kerapuhan pada jaringan yang disebabkan oleh *cross-linking* yang berlebihan. Waktu fiksasi diperpendek dapat mengakibatkan kurangnya penetrasi bahan fiksatif pada jaringan dan *cross-linking* tidak akan terjadi. Secara optimal, fiksasi semalaman lebih dipilih untuk mendapatkan hasil preparat jaringan yang lebih maksimal (Bhat & Hussein., 2021).

Lien atau lebih dikenal sebagai limpa adalah salah satu organ di dalam tubuh yang memiliki fungsi penting dalam proses hematopoiesis dan imunologis. Fungsi utamanya mencakup proses fagositosis eritrosit abnormal, sintesis terhadap imunoglobulin G (IgG), dan pembersihan mikroorganisme serta antigen. Lien juga berperan dalam sistem imun properdin dan tuftsin dengan mensintesis peptida (Selvia & Wahyuni, 2021). Lien merupakan organ jaringan lunak rapuh yang memiliki bentuk baji (44%), tetrahedral (42%), atau bentuk yang kurang umum seperti segitiga (14%). Lien terletak pada hipokondria bagian kiri, namun ekstremitas superiornya meluas ke bagian epigastrium yang terletak di antara fundus lambung dan diafragma. Lien merupakan kelenjar terbesar yang tidak memiliki saluran. Lien memiliki dua permukaan, yaitu permukaan diafragma yang cembung dan permukaan visceral yang cekung. Lien juga memiliki dua ujung, yaitu anterior (lateral) dan posterior (medial) (Abass *et al.*, 2024).

Preparat yang baik merupakan kunci dalam analisis pengamatan yang hasilnya paling mirip dengan jaringan pada makhluk yang masih hidup, untuk itulah fiksasi yang baik dan benar adalah tahap krusial yang akan mempengaruhi kualitas dari preparat yang dibuat. Seringkali peneliti tidak sempat memproses preparat yang akan diteliti sehingga jaringan dibiarkan dalam larutan fiksatif dalam jangka waktu yang lama. Hal ini dapat menyebabkan perubahan pada jaringan yang akan dibuat menjadi preparat, apapun jenis fiksatifnya. Rusmiatik (2019) menjelaskan bahwa lamanya waktu fiksasi juga memberikan pengaruh terhadap kualitas jaringan akibat dari daya penetrasi masing-masing bahan yang berbeda tergantung dengan organ yang digunakan. Preparat yang baik juga dapat ditentukan oleh sebuah tahapan selama proses fiksasi, yaitu tahapan pencucian atau *washing*.

Washing atau pencucian merupakan sebuah proses yang dilakukan dengan tujuan menghilangkan efek fiksatif pada jaringan (Ihsan dkk., 2018). Yerpasheva *et al.* (2023) menyatakan bahwa mencuci sel setelah fiksasi dan menyimpannya pada buffer dinilai bermanfaat dalam prosedur baik sebelum dan sesudah fiksasi. Prosedur *washing* dapat meningkatkan kualitas pewarnaan selanjutnya secara signifikan dengan cara menghilangkan elemen asam atau alkali dan pigmentasi dari fiksatif. *Washing* pada tahap *post-fixation* dengan air mengalir penting dalam berbagai keadaan untuk berbagai macam fiksatif, mencakup formaldehida, asam pikrat, osmium tetraoksida, kromium trioksida, dan asam asetat. Pengecualian untuk

washing menggunakan air mengalir dilakukan pada jaringan berukuran kecil atau jaringan yang difiksasi dengan alkohol (Mondello *et al.*, 2012). Penelitian terdahulu jarang menyertakan proses *washing* dalam tahap pembuatan preparat, tetapi pada penelitian ini proses *washing* diikutsertakan setelah mempertimbangkan manfaatnya.

Belum ada penelitian yang membahas tentang efek dari penggunaan fiksatif BNF 10%, Bouin, dan etanol 50% pada lien tikus selama satu minggu hingga sekarang. Penelitian terdahulu biasanya hanya membandingkan dua fiksatif dan tidak menggunakan organ lien tikus sebagai objek pengamatannya. Salah satu penelitian terdahulu yang relevan dengan topik pada penelitian ini adalah pada jurnal yang ditulis oleh Panzacchi *et al.* (2019), yang membahas bahwa penggunaan fiksatif berupa BNF 10% dan 70% alkohol pada preparat jaringan tikus (lien, hati, dan ginjal) menunjukkan hasil dimana penggunaan fiksatif berupa alkohol 70% memberikan hasil yang lebih baik dalam hal kuantitas dan kejernihan asam nukleat yang diekstraksi dari blok parafin. Jurnal tersebut hanya membandingkan penggunaan dua jenis fiksatif, yaitu BNF 10% dan alkohol 70%. Mempertimbangkan hal tersebut, peneliti ingin mengetahui perbandingan penggunaan fiksatif berupa BNF 10%, Bouin, dan etanol 50% selama satu minggu pada organ lien tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.2. Rumusan Masalah

1.2.1. Bagaimana kerusakan pada preparat lien tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang difiksasi selama satu minggu dengan larutan BNF 10%, Bouin, dan etanol 50%?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Menganalisis kerusakan yang tampak pada preparat histologi lien tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang difiksasi dengan BNF 10%, Bouin, dan etanol 50% selama satu minggu.

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini dilakukan agar dapat memberikan informasi ilmiah terkait dengan penggunaan bahan fiksatif berupa BNF 10%, Bouin dan etanol 50%, dampak yang terjadi bila fiksasi dilakukan selama satu minggu, serta manfaat *washing*. Penelitian ini diharap dapat digunakan sebagai pertimbangan dalam pelaksanaan pembuatan preparat histologis jaringan mikroteknik hewan.