

PERBANDINGAN FIKSASI MENGGUNAKAN NBF 10% DAN MADU TERHADAP KEUTUHAN KOMPONEN JARINGAN HATI DENGAN PEWARNAAN HE

Arapahni, Sita Jumin¹; Mahmud, Dani¹; Gusnandjar, Agus¹; Durachim, Adang¹

¹ Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Poltekkes Kemenkes RI Bandung
Email: bonjoursita@gmail.com

ABSTRAK

Formaldehida bersifat karsinogen dalam bentuk 10% *Neutral Buffered Formaline* (NBF) adalah larutan yang paling banyak digunakan pada proses fiksasi untuk diagnosis Patologi. Madu memiliki sifat antioksidan, antimikroba, antiautolitik dan dapat mengeraskan jaringan. Madu mudah didapatkan dan tanpa toksisitas telah dieksplorasi sebagai alternatif untuk formalin. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui perbedaan fiksasi rutin dengan menggunakan NBF 10% dan madu terhadap keutuhan komponen jaringan hati dengan pewarnaan HE. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen *Static Group Comparison*. Data primer diperoleh dari tahap scoring dan dianalisis menggunakan uji statistik Non Parametrik Kruskal Wallis, hasilnya terdapat perbedaan fiksasi rutin yang dinilai dari keutuhan komponen jaringan hati antar berbagai kelompok ($p < 0.05$). Kemudian data dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney, menunjukkan pada kelompok perlakuan madu 15% tidak ada perbedaan fiksasi rutin yang dinilai dari keutuhan komponen jaringan hati dengan nilai signifikansi 0.065 ($p > 0.05$). Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa terdapat perbedaan fiksasi rutin antara NBF 10% dan madu. Dan kelompok madu konsentrasi 15% dapat digunakan sebagai alternatif larutan fiksasi.

Kata Kunci : Fiksasi, madu sebagai alternatif, NBF 10%, glukosa

ABSTRACT

Formaldehyde which is carcinogenic in the form of 10% *Neutral Buffered Formaline* (NBF) is the solution most widely used in the fixation process for pathological diagnosis. Honey has antioxidant, antimicrobial, antiautolytic and can harden tissue properties. Honey is easily available and without its toxicity has been explored as an alternative to formalin. The purpose of this study was to determine the differences in routine fixation by using NBF 10% and honey on tissue component integrity by HE staining. This study used the *Static Group Comparison* experimental method. Data were obtained from the scoring and analyzed using the Kruskal Wallis Non Parametric statistical test, the results of which were differences in routine fixation assessed from liver tissue component integrity among various groups ($p < 0.05$). Then the data were analyzed using the Mann-Whitney test, indicating that in the honey treatment group 15% there was no difference in routine fixation which was assessed from liver tissue component integrity with a significance value of 0.065 ($p > 0.05$). From these results it was concluded that there were differences in routine fixation between 10% NBF and honey. And a group of honey with a concentration of 15% can be used as an alternative fixation solution.

Key words: fixation, honey as alternative, NBF 10%, glucose

PENDAHULUAN

Fiksasi adalah proses mengawetkan jaringan dengan tujuan agar jaringan awet sehingga struktur selnya masih sama dengan keadaan hidup.⁽¹⁾ NBF 10% yang digunakan untuk fiksasi mengandung sekitar 4% dari volume formaldehida.⁽²⁾

Occupational Safety and Health Administration telah menyatakan formaldehida sebagai bahan yang memiliki potensi bahaya bagi kesehatan. Badan Internasional untuk Penelitian tentang Kanker (IARC) mengklasifikasikan formaldehida sebagai bahan karsinogen kelas 1 yang berpotensi menghasilkan neoplasma yang berbeda termasuk karsinoma nasofaring.⁽³⁾

Laboratorium mencoba mengganti formalin dengan bahan yang kurang beracun tetapi hasilnya tidak terlalu memuaskan, karena perubahan dalam morfologi seluler dan antigenisitas⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengevaluasi potensi penggantian formalin dengan madu. Hasil penelitian Almaaini & Bryant (2006) dan Ozkan et al (2011) menunjukkan bahwa madu terbukti menjadi fiksatif yang aman dan pengganti yang *acceptable* untuk formalin untuk pewarnaan HE dan konsentrasi 20% madu adalah konsentrasi yang sangat optimum sehingga konsentrasi ini direkomendasikan untuk fiksasi rutin.⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Dibandingkan dengan formalin, madu adalah produk organik alami yang tidak berbahaya. Maka perlu dilihat perbedaan fiksasi rutin dengan menggunakan NBF 10% dan madu sebagai alternatif.

METODE

Jenis penelitian ini menggunakan metode eksperimen

Static Group Comparison. Yang menjadi kelompok eksperimen adalah madu dengan variasi konsentrasi 10%, 15%, 20%, dan yang menjadi kontrol adalah NBF 10%.

Dalam penelitian ini yang menjadi fokus yaitu fiksasi rutin menggunakan larutan madu dengan variasi konsentrasi 10%, 15%, 20% dan dibandingkan dengan kontrol yaitu NBF 10% lalu dinilai keutuhan komponen jaringan hati melalui parameter jumlah vena sentralis dan *bile ductules*. Preparat yang diamati yaitu dari hati kelinci dengan pewarnaan HE.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Sitohistoteknologi, Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung. Pada bulan Maret sampai dengan April 2019.

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer, yaitu dengan melakukan percobaan organ hati kelinci. Jaringan diproses mulai dari tahap fiksasi rutin sampai penempelan jaringan pada *object glass*. Sebelum preparat diwarnai menggunakan HE dilakukan fiksasi rutin menggunakan NBF 10% sebagai kontrol dan madu dengan variasi konsentrasi 10%, 15% dan 20% dengan waktu fiksasi 24 jam. Tahap akhir dilakukan skoring.

Lalu data diolah menggunakan uji statistik yaitu Kruskal-Wallis. Hasil dari uji Kruskal – Wallis adalah apabila nilainya <batas yaitu 0,05 dan dilanjutkan Uji Mann-Whitney.

HASIL

Fiksasi

Setelah 24 jam fiksasi secara fisik, ketiga kelompok larutan uji yaitu madu 10%, madu 15% dan madu 20% mempunyai konsistensi jaringan lebih lembek dibandingkan kelompok kontrol yaitu NBF 10%

dan warna jaringan dari kelompok madu terlihat pucat.

Pewarnaan HE

Untuk dapat menilai apakah madu dapat diterapkan sebagai alternatif NBF 10% maka perlu dilihat secara mikroskopis. Sediaan jaringan hati diwarnai dengan *Hematoxylin – Eosin* (HE). Kriteria penilaian dapat dilihat pada tabel 1 dan hasil penelitian dapat dilihat dari skor yang diperoleh pada gambar 1 untuk kelompok koontrol NBF 10% dan gambar 2 untuk kelompok madu.

Perbandingan hasil pewarnaan HE dari proses fiksasi menggunakan NBF 10% dan madu dapat dilihat pada gambar 3 dan gambar 4.

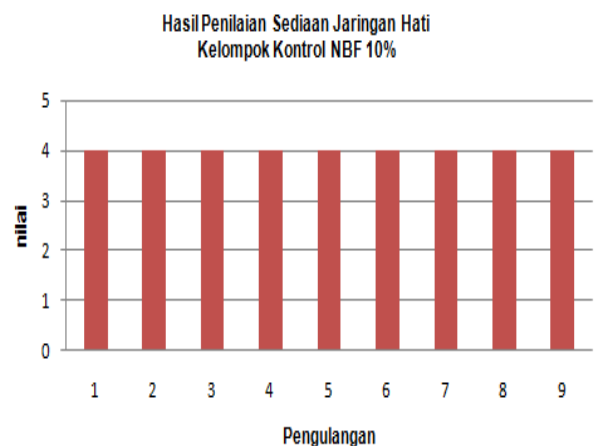
Pada gambar 4 terlihat bahwa semua kelompok fiksasi menggunakan madu mempertahankan vena sentralis dan hepatosit. Namun, sediaan jaringan hati yang difiksasi oleh madu 20% secara visual kurang mempertahankan sinusoid, terlihat dari jarak antar hepatosit yang berdekatan tanpa adanya sinusoid.

Uji Statistik

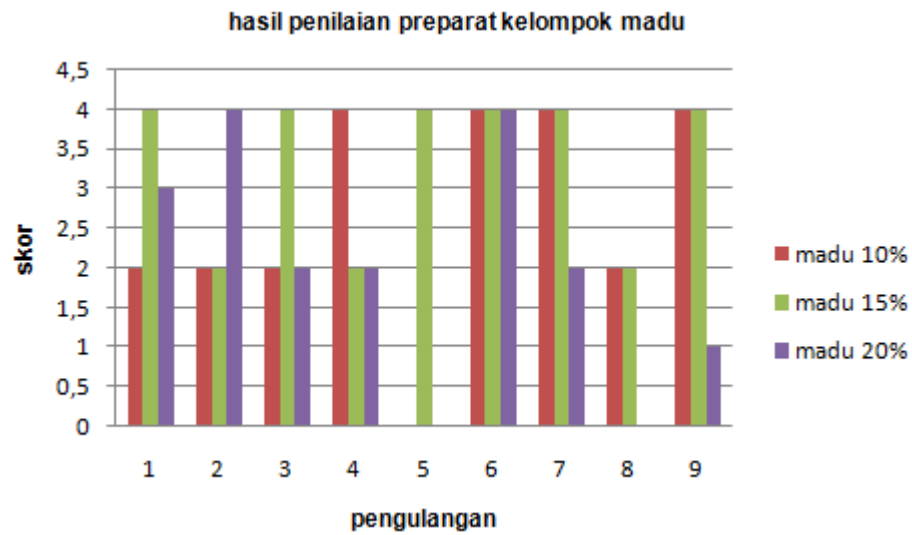
Nilai hasil uji Kruskal Wallis dapat dilihat pada tabel 2 menunjukkan rata-rata masing perlakuan. Peringkat rata-rata fiksasi rutin menggunakan NBF 10% dan madu berturut – turut yaitu 26.00 untuk NBF 10%, urutan kedua yaitu kelompok madu 15% dengan nilai 20.50, urutan selanjutnya adalah madu 10% dengan *mean rank* 16.00 dan kelompok madu 20% memiliki *mean rank* paling rendah yaitu 11.50. Berdasarkan hasil uji statistik non parametrik Kruskal-wallis diperoleh nilai Asymp.Sig atau

signifikansi $0.007 < 0.05$ sehingga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna diantara keempat perlakuan. Untuk melihat kelompok mana yang terdapat perbedaan maka diperlukan uji lanjut yaitu uji statistik Mann-whitney. Berdasarkan hasil uji statistik Mann-whitney kelompok kontrol dan madu 10% memiliki nilai rata-rata masing-masing sebesar 12.00 dan 7.00. Kelompok madu 10% memiliki perbedaan fiksasi rutin dengan menggunakan kontrol NBF 10% hal ini ditunjukkan dengan nilai Asymp sig yang didapat 0.011 yang kurang dari 0.05.

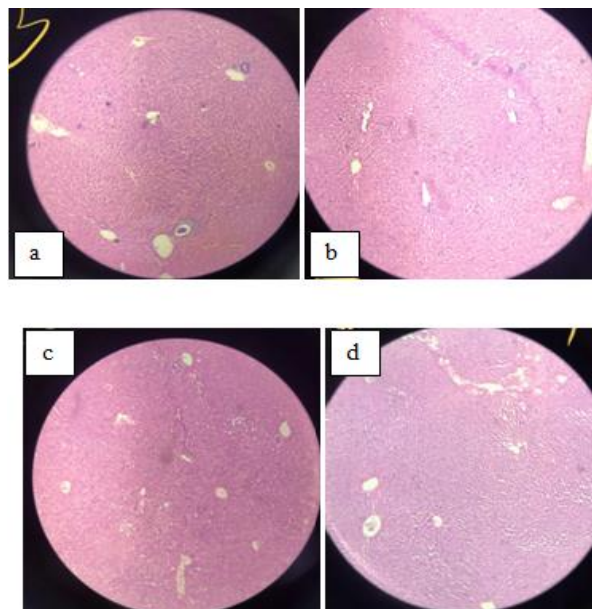
Hasil uji statistik Mann-whitney antara kelompok kontrol NBF 10% dan madu 15% memiliki nilai rata-rata sebesar 11.00 dan 8.00 dengan nilai Asymp sig yang didapat 0.065. Hasil uji statistik Mann-whitney kelompok kontrol NBF 10% memiliki nilai rata-rata sebesar 13.00 dan kelompok madu 20% memiliki nilai rata-rata yaitu 6.00 dengan nilai Asymp sig yang didapat 0.02.



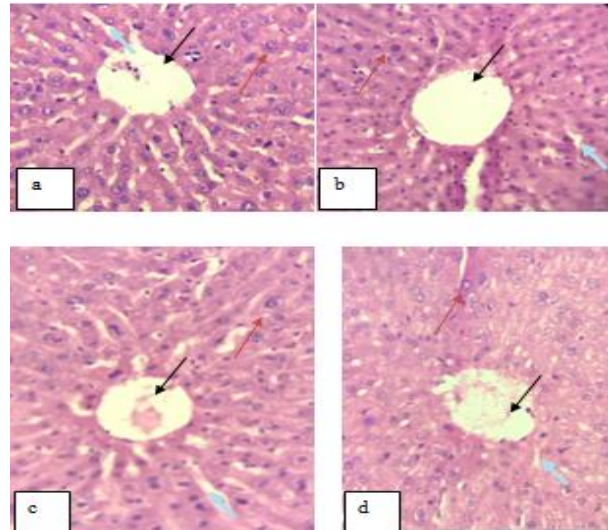
Gambar 1. Skor Kelompok NBF 10%



Gambar 2. Skor Kelompok Madu



Keterangan gambar: a. NBF 10%; b. Madu 10%; c. Madu 15%; d. Madu 20%.
Gambar 3. Mikroskopis jaringan hati diwarnai oleh pewarnaan HE perbesaran 10x



Keterangan gambar: a. NBF 10%; b. Madu 10%; c. Madu 15%; d. Madu 20%.; tanda panah hitam menunjukkan vena sentralis; biru menunjukkan sinusoid; merah menunjukkan hepatosit.

Gambar 4. Mikroskopis jaringan hati diwarnai oleh pewarnaan HE perbesaran 40x

Tabel 1. Kriteria penilaian sediaan

	Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3	Skor 4
Vena Sentralis	Tidak dapat diidentifikasi	Jumlah 25% dari jumlah pada kontrol	Jumlah 50% dari jumlah pada kontrol	Jumlah 75% dari jumlah pada kontrol	Jumlah 100% dari jumlah pada kontrol
<i>Bile ductules</i>	Tidak dapat diidentifikasi	Dapat diidentifikasi (jumlah BD 1)	Dapat diidentifikasi (jumlah BD 2)	Dapat diidentifikasi (jumlah BD 3)	Dapat diidentifikasi (jumlah BD \geq 4)

PEMBAHASAN

Tahap pertama dari proses fiksasi menggunakan NBF 10% adalah proses penetrasi. Cairan NBF 10% masuk ke dalam jaringan dan berdifusi ke dalam sel membentuk metilen hidrat, proses ini memerlukan waktu 6 jam. Selanjutnya, metilen hidrat yang terbentuk berikatan dengan rantai protein dari sel untuk membentuk rantai hidroksimetil yang reaktif. Rantai ini terbentuk selama 24 jam fiksasi dan merupakan reaksi primer yang terbentuk untuk fiksasi yang dilakukan selama 24 jam. Jika fiksasi

dilakukan lebih 24 jam maka dilanjutkan pada proses *cross link* atau reaksi silang yang merupakan reaksi yang *irreversible* dan mengakibatkan jaringan mengeras dan sulit untuk dipotong.⁽²⁾⁽⁸⁾

Kelompok kontrol difiksasi selama 24 jam oleh NBF 10% dan hasilnya secara makroskopis jaringan tampak memadat konsistensinya tetapi masih mudah dipotong. Hal ini menunjukkan bahwa cairan NBF 10% sudah berdifusi ke dalam sel dan membentuk reaksi primer yaitu

rantai hidroksimetil. Pada kelompok perlakuan fiksasi madu tampak pucat, hal ini dikarenakan madu memiliki mekanisme yang berbeda dari formalin untuk memfiksasi jaringan⁽⁹⁾

Madu mudah didapat dan tanpa toksisitas telah dieksplorasi sebagai alternatif untuk formalin⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾. Madu terdiri dari larutan jenuh kental gula terutama glukosa dan fruktosa dan sekitar 20% hampir semua air terikat dengan molekul gula⁽¹²⁾.

Pada pH asam, gula dalam fiksatif ini diubah menjadi aldehida yang diduga melakukan tindakan serupa sebagai formaldehida⁽¹³⁾. Al-Maaini dan Bryant mempelajari sifat fiksatif madu dan menemukan bahwa konsentrasi madu yang rendah, pada suhu kamar, bisa memfiksasi jaringan yang mana sebanding dengan fiksasi jaringan yang dihasilkan oleh formalin. Dalam penelitian Almaaini dan Bryant telah menyatakan bahwa konsentrasi 20% untuk madu pada pH 4,5-5,5 bisa memfiksasi jaringan dan mampu memberikan hasil yang *acceptable* sebagai alternatif formalin.⁽¹⁴⁾

Pada penelitian ini, variasi konsentrasi yang digunakan adalah 10%, 15% dan 20% dimana untuk membuat larutan tersebut madu harus diencerkan dan ketika diencerkan perlahan, menghasilkan hidrogen peroksida karena aktivasi enzim, oksidase glukosa, yang mengoksidasi glukosa menjadi asam glukonat dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida memiliki antibakteri properti yang dapat mencegah bakteri dan mikroba lainnya memakan jaringan⁽¹⁵⁾.

Kehadiran asam amino dan asam organik lainnya memberikan pH madu sekitar 4,0. Bahkan pada konsentrasi rendah, madu memiliki pH kurang dari 5,5 yang berperan

dalam memperlambat dan menghambat pertumbuhan bakteri. pH yang rendah juga mencegah aksi enzim glukosa oksidase. pH menurun dalam madu dengan konsentrasi tinggi yang hasilnya adalah enzim tidak bekerja. Ketika madu dilarutkan, pH meningkat, dan aktivitas enzim meningkat dengan pelepasan sifat antiseptiknya tetapi tidak merusak jaringan.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

Berdasarkan hasil statistik dapat diketahui bahwa pada konsentrasi madu 15% memberikan hasil yang lebih baik daripada konsentrasi madu 10% dan 20%. Kelompok madu 15% memiliki nilai signifikansi 0.065 yang artinya tidak ada perbedaan hasil fiksasi dengan kontrol NBF 10%. Kelompok madu 10% mempunyai hasil yang baik tetapi tidak lebih baik dari kelompok madu 15% karena madu 15% dapat mempertahankan keutuhan jaringan seperti vena sentralis dan *bile ductules* lebih banyak. Yang terpenting dari fiksatif adalah dapat menjaga kualitas pewarnaan dan konsisten dengan pewarnaan HE, baik sebelum dan setelah penyimpanan blok parafin dalam waktu yang lama. Fiksatif harus memiliki kemampuan untuk mencegah penghancuran dalam jangka pendek dan panjang dan menghentikan aktivitas enzim katabolik dan mencegah autolisis, meminimalkan difusi molekul terlarut dari lokasi aslinya. Yang penting lainnya adalah membantu menjaga integritas jaringan dan seluler⁽¹⁸⁾.

Kelompok madu 20% memberikan hasil yang paling buruk karena sel-sel terlihat mengerut dan adanya kesalahan teknik dalam cutting berakibat pada buruknya sediaan jaringan hati tersebut sehingga vena sentralis, *bile ductules*, dan sinusoid sulit untuk dikenali. Penyebab lain kelompok

madu 20% mendapatkan skor paling buruk adalah konsentrasi 20% terlalu kental sehingga osmolaritas gula yang ditemukan di madu tersebut menjadi tinggi yang menyebabkan jaringan dehidrasi dan menyusut.⁽¹⁹⁾

SIMPULAN

Konsentrasi madu 15% dapat digunakan sebagai alternatif untuk fiksasi ketika NBF 10% tidak tersedia.

DAFTAR RUJUKAN

1. Durachim A, Mahmud D. 2017. Sitohistoteknologi. Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Bandung
2. Bancroft JD, Gamble M. 2007. Theory and Practice of Histological Techniques . 6th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh
3. IARC.1995. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In: Wood dust and Formaldehyde – evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 62. Lyon.
4. Binetti R, Costamagna FM, Marcello I. 2006. Development of carcinogenicity classifications and evaluations: the case of formaldehyde. Ann Ist Super Sanita.
5. Paavilainen L, Edvinsson A, Asplund A, Hober S, Kampf C, Pontén F, et al. 2010. The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells. J HistochemCytochem.
6. Al-Maaini R, Bryant P. 2006. The Effectiveness of Honey as a Substitute for Formalin in the Histological Fixation of Tissue. The Journal of Histotechnology Vol 29, No 3
7. N Ozkan, E Salva, F Cakalagaoglu, B Tuzuner. 2011. Honey as a substitute for formalin?. The biological stain commission biotechnic & histochemistry.
8. Buesa R, Peshkov M. 2012. How much formalin is enough to fix tissues?. Russian Federation. Annals of Diagnostic Pathology.
9. Mescher AL. 2010. Junqueira's Basic Histology Text & Atlas. USA: The McGraw-Hill Companies
10. Molan PC.2001. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. Am J ClinDermatol.
11. Sabarinath B, Sivapathasundharam B, Sathyakumar M.2013. Fixative properties of honey in comparison with formalin. J Histotechnol.
12. White, JW, Jr. 1975. Physical characteristics of honey. In: Crane, E., editor. Honey: a comprehensive survey. London: Heinemann.
13. Patil S, Premalatha B, Rao RS, Ganavi B. 2013. Revelation in the field of tissue preservation – a preliminary study on natural formalin substitutes. J Int Oral Health
14. Barnali M,Roopa SR,Shankargouda Patil. 2016. Tissue Preservation with Natural Fixatives:An Immunohistochemical Evaluation. World Journal of Dentistry
15. Diana Kuriachan et al. 2017. Analysis of Fixative Properties of Three Eco-friendly Substances: A Comparison with Formalin. Oral and Maxillofacial Pathology Journal
16. Ananthalakshmi Ramamoorthy et al. 2016. Natural Alternatives for Chemicals Used in Histopathology Lab- A Literature Review. Journal of Clinical and Diagnostic Research
17. Sona M et al .2017.A comparative study on the efficacy of honey and ethanol as cytological

- fixatives. International Journal of Advances in Medicine
18. Leong, A.S.-Y., 2005. Microwave technology for light microscopy and ultrastructural studies. Milestone, Bangkok.
19. Bansal V, Medhi B, Pandhi P. 2005. Honey -A remedy rediscovered and its therapeutic utility. Kathmandu Univ Med J