

Efek penggunaan ulang larutan fiksatif formalin pada kualitas preparat histopatologi dan jumlah limbah yang dihasilkan

(The effect of reusing formaldehyde fixative solution on the quality of histopathological slides and the amount of waste produced)

Zon Hardi^{1*}, Wiwin Wiryanti², Adang Durachim², Mamat Rahmat²

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medik, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Indonesia

²Bidang Sitohistoteknologi, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Indonesia

Diterima: 7 Februari 2024 | Direvisi: 20 Maret 2024 | Disetujui: 25 Maret 2024

Terbit daring: 15 Juni 2024

Abstrak

Larutan fiksatif *neutral buffered formalin* (NBF) 10% banyak digunakan dalam pembuatan preparat histopatologi. Proses fiksasi menghasilkan limbah cair NBF 10% dan limbah padat sisa jaringan. Penelitian bertujuan menguji efek penggunaan ulang larutan fiksatif NBF 10% pada kualitas preparat histopatologi dan menghitung jumlah limbah yang dihasilkan. Perlakuan berupa penggunaan larutan fiksatif tanpa berulang (kontrol), berulang 1 kali, 2 kali, dan 3 kali, masing-masing perlakuan terdiri atas 10 preparat sampel, yaitu preparat jaringan usus, mioma uterus, prostat, uterus, kista ovarium, porsio serviks, tiroid, rektum, *fibroadenoma mammae*, dan kantong empedu. Jaringan difiksasi dengan NBF 10% dan diproses secara histologis dengan pewarnaan hematoksin-eosin. Limbah cair NBF 10% dan limbah padat sisa jaringan dihitung. Kualitas preparat histopatologi diukur secara mikroskopis pada kejelasan inti dan sitoplasma, keseragaman pewarnaan, dan intensitas warna. Preparat kontrol memiliki kualitas baik dengan inti yang jelas berwarna biru, sitoplasma berwarna merah muda, tanpa penumpukan warna, serta pewarnaan seragam dan merata pada setiap lapang pandang. Preparat penggunaan ulang NBF 10% mengalami penurunan kualitas dibandingkan kontrol, tetapi masih dapat digunakan untuk diagnosis. Preparat penggunaan ulang NBF 10% 2 kali dan 3 kali memiliki kualitas yang buruk sehingga sulit untuk diagnosis. Fiksasi menghasilkan 299,0 L limbah cair NBF 10% dan 64,9 kg limbah padat sisa jaringan. Dapat disimpulkan bahwa penggunaan ulang NBF 10% menurunkan kualitas preparat histopatologi, tetapi penggunaan ulang NBF 10% 1 kali masih dapat digunakan untuk diagnosis. Penggunaan ulang NBF 10% untuk fiksasi jaringan berpotensi mengurangi jumlah limbah cair sisa larutan fiksatif dan limbah padat sisa jaringan.

Kata kunci: formalin | larutan fiksatif | limbah | penggunaan ulang | preparat histopatologi

Abstract

Neutral buffered formalin (NBF) 10% fixative solution is widely used in histopathological slides. The fixation process generates liquid waste of NBF 10% and solid waste of tissue remnants. The research aimed to assess the reuse of NBF 10% fixative solution on the quality of histopathological slides and calculate the amount of waste produced. Treatments included single-use of fixative solution (control), reuse for 1, 2, and 3 times. Ten sample slides were prepared for each treatment, consisting of intestinal tissue, uterine fibroids, prostate, uterus, ovarian cyst, *portio vaginalis cervicis*, thyroid, rectum, breast fibroadenoma, and gallbladder tissues. Tissues were fixed with NBF 10% and processed histologically

* Penulis korespondensi: E-mail: zonhardi82@gmail.com.

© The Author(s) 2024. This article is licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, and indicate if changes were made.

with hematoxylin-eosin staining. Liquid waste of NBF 10% and solid waste of tissue remnants were quantified. Histopathological slide quality was measured under a microscope for nuclear and cytoplasmic clarity, staining intensity, and color uniformity. Control slides exhibited good quality with clearly blue-stained nuclei, pink cytoplasm, no color accumulation, and uniform staining across fields of view. Reused NBF 10% slides experienced a decrease in quality compared to the control but were still usable for diagnosis. Slides reused 2 and 3 times showed poor quality, making diagnosis difficult. Fixation resulted in 299.0 liters of liquid waste of NBF 10% and 64.9 kilograms of solid tissue remnants. In conclusion, reusing NBF 10% decreases histological slide quality, though reuse once still allows for diagnosis. Reusing 10% NBF for tissue fixation can reduce the liquid waste of fixative solution and solid tissue waste.

Keywords: fixative solution | formalin | histopathological slides | reuse | waste

Pendahuluan

Pengelolaan spesimen jaringan merupakan suatu proses yang dilakukan untuk mengumpulkan, memproses, dan menyimpan spesimen jaringan yang diperoleh dari berbagai jenis tindakan medis di rumah sakit. Pengelolaan jaringan harus dilakukan dengan baik untuk mempertahankan supaya struktur jaringan dan morfologi sel tetap sama dengan kondisi ketika masih hidup. Salah satu bagian penting dari pengelolaan spesimen jaringan adalah proses pengawetan yang disebut dengan teknik fiksasi (Maescher, 2016).

Fiksasi berfungsi untuk mempertahankan struktur jaringan dan mencegah degradasi yang disebabkan oleh enzim yang dilepaskan oleh sel atau mikroorganisme. Fiksasi merupakan faktor yang sangat penting sehingga tidak boleh ada kesalahan pada tahap ini. Jika terjadi kesalahan maka tidak dapat diperbaiki pada tahapan selanjutnya. Pada saat ini, larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10% merupakan larutan fiksatif yang terbaik untuk pemeriksaan histopatologi (Khristian & Inderiati, 2017; Musyarifah & Agus, 2018).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan di Amerika Serikat, didapatkan bahwa 81% laboratorium histologi menggunakan larutan NBF 10% untuk proses fiksasi (Buesa, 2008). Dari jumlah tersebut didapat 15% laboratorium yang melakukan daur ulang limbah NBF 10% agar dapat digunakan kembali. Pada saat pemakaian ulang, konsentrasi formalin dalam NBF 10% akan mengalami penurunan menjadi sekitar 7%–8% yang disebabkan oleh kontaminan dan kandungan

garam pada larutan bufer. Untuk mengembalikan konsentrasi seperti semula, maka perlu dilakukan daur ulang dengan proses penyaringan atau proses distilasi. Selain menghasilkan limbah cair, proses pengelolaan jaringan juga menghasilkan limbah padat berupa sisa jaringan (Buesa, 2008; Abacus, 2022).

Penggunaan ulang larutan fiksatif NBF 10% adalah praktik yang umum dilakukan di laboratorium patologi anatomi. Dengan menggunakan ulang NBF 10% dapat menghemat biaya dan mengurangi produksi limbah kimia larutan fiksatif. Penggunaan ulang NBF 10% juga dapat menyebabkan perubahan morfologi sel dan struktur jaringan sehingga memengaruhi kualitas sampel dan hasil analisis preparat histopatologi (Kiernan, 2000; Al-Janabi *et al.*, 2012).

Informasi awal yang diperoleh dari Instalasi Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. M. Yunus dan RSUD UMMI Bengkulu menunjukkan penggunaan NBF 10% rata-rata sekitar 80–100 liter per bulan. Penggunaan fiksasi jaringan larutan NBF 10% sekali pakai menghasilkan limbah yang membutuhkan tempat penyimpanan dan penanganan khusus sehingga akan menambah pengeluaran rumah sakit untuk biaya penanganan limbah. Dalam penanganan dan pengelolaan limbah medis, termasuk limbah laboratorium, rumah sakit telah bekerja sama dengan pihak perusahaan yang berizin dan berpengalaman dalam pengelolaan limbah medis. Pengelolaan limbah di rumah sakit tersebut dikenakan tarif sebesar Rp19.000/kg limbah medis padat maupun limbah cair. Untuk mengurangi

biaya tersebut dapat dilakukan dengan menerapkan praktik daur ulang (*recycle*) atau penggunaan ulang (*reuse*). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek penggunaan ulang NBF 10% pada kualitas preparat histopatologi dan menghitung jumlah limbah larutan fiksatif dan limbah padat sisa jaringan yang dihasilkan di Instalasi Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. M. Yunus dan RSUD UMMI Bengkulu.

Metode

Etik dan desain penelitian

Penelitian ini sudah dinyatakan layak etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan, Bandung dengan nomor layak etik No.79/KEPK/EC/XII/23. Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Quasi Experimental*, yaitu memberikan perlakuan pada sampel pada tahapan fiksasi dengan menggunakan NBF 10% penggunaan ulang 1 kali, 2 kali, dan 3 kali serta menghitung jumlah produksi limbah cair NBF 10% dan limbah padat sisa jaringan. Penelitian ini didesain untuk membandingkan kualitas preparat histopatologi yang difiksasi menggunakan larutan fiksatif NBF 10% baru (penggunaan pertama) sebagai kontrol dengan preparat yang difiksasi menggunakan larutan fiksatif setelah digunakan sebanyak 1 kali, 2 kali, dan 3 kali. Selain itu, penelitian ini juga menghitung jumlah limbah cair NBF 10% dan limbah padat berupa sisa jaringan hasil proses fiksasi jaringan.

Perlakuan pada sampel

Larutan NBF 10% yang baru disiapkan untuk fiksasi jaringan sampel. Ukuran jaringan adalah 15×15×3 mm³. Rasio volume jaringan dan larutan fiksatif ialah 1:20. Setelah 48 jam direndam dalam larutan NBF 10%, jaringan diproses menjadi preparat histopatologi melalui tahapan proses dehidrasi, *clearing*, *embedding* (pembuatan blok parafin), disayat dengan mikrotom dengan ketebalan 4 µm, deparafinisasi, rehidrasi, dan diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE). Preparat

yang dibuat menggunakan larutan NBF 10% yang baru ini selanjutnya menjadi kontrol dalam penelitian ini. Kemudian preparat dinilai kejelasan inti dan sitoplasma, keseragaman pewarnaan secara mikroskopis, dan intensitas warna inti dan sitoplasmanya diukur dengan aplikasi *ImageJ*.

Larutan NBF 10% dari fiksasi sampel pertama ditampung dan disaring untuk digunakan kembali pada fiksasi sampel selanjutnya yang disebut sebagai sampel perlakuan penggunaan ulang NBF 10% 1 kali. Setelah difiksasi selama 48 jam, jaringan diproses, diwarnai, dan diamati dengan metode yang sama dengan preparat kontrol. Demikian seterusnya dilakukan dengan metode yang sama hingga pengamatan preparat untuk sampel perlakuan penggunaan ulang NBF 10% 2 kali dan 3 kali.

Pembuatan preparat pada semua kelompok (kontrol dan perlakuan) dilakukan pada 10 sampel yang terdiri atas jenis jaringan usus, mioma uterus, prostat, uterus, kista ovarium, porsio serviks, tiroid, rektum, *fibroadenoma mammae* (FAM), dan kantong empedu. Total preparat yang dibuat ialah 10 preparat pada kelompok kontrol dan 30 preparat pada kelompok perlakuan dengan penilaian kualitas masing-masing dilakukan secara *duplo*.

Semua sisa jaringan dikumpulkan, ditimbang, dicatat, dan dilaporkan sebagai jumlah produksi limbah padat laboratorium. Semua sisa larutan fiksatif NBF10% ditampung, volume diukur, lalu dicatat dan dilaporkan sebagai jumlah produksi limbah cair laboratorium.

Penilaian kualitas preparat histopatologi

Kualitas preparat histopatologi diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40×. Intensitas warna diukur menggunakan aplikasi *ImageJ* dengan kriteria penilaian berupa kejelasan inti sel dan sitoplasma: jelas (skor 3), kurang jelas (skor 2), dan tidak jelas (skor 1); keseragaman warna: seragam (skor 3), kurang seragam (skor 2), tidak seragam (skor 1); serta intensitas warna: baik (skor 3), kurang baik (skor 2), dan buruk (skor 1).

Pada pengukuran intensitas warna dengan aplikasi

ImageJ, nilai intensitas warna preparat kontrol dijadikan standar pembandingan dengan preparat uji yang diberi perlakuan. Pengukuran menggunakan metode *color deconvolution* dengan *vectors* H&E yang mengukur besaran penurunan intensitas warna. Nilai pengukuran dihitung selisih dari nilai perlakuan dikurangi nilai kontrol. Intensitas warna dikatakan baik (skor 3) jika selisih intensitas warna <10.000, kurang baik (skor 2) jika selisih intensitas warna 10.000–20.000, buruk (skor 1) jika selisih intensitas warna 20.000–30.000; dan buruk sekali (skor 0) jika selisih intensitas warna >30.000. Nilai pengukuran yang semakin besar menunjukkan penurunan intensitas warna pada preparat yang semakin besar pula.

Gabungan ketiga kriteria penilaian yang didapatkan dinyatakan sebagai hasil akhir kualitas preparat histopatologi yang selanjutnya dikategorikan sebagai kualitas baik jika skor total adalah 9, kategori sedang jika skor total adalah 6–8, dan kategori buruk jika skor total adalah 3–5.

Analisis data

Semua data yang didapat diuji secara statistik menggunakan perangkat lunak komputer *statistical product and service solution* (IBM SPSS Statistics 25). Uji statistik yang digunakan adalah uji Mann-Whitney. Pengaruh penggunaan ulang NBF 10% pada kualitas preparat histopatologi ditunjukkan jika pada uji Mann-Whitney didapat nilai *Asymp. Sig (2-tailed)* atau *p-value*<0,05.

Hasil

Penilaian kualitas preparat histopatologi

Penilaian secara mikroskopis pada 40 preparat sampel dari 10 jaringan dapat dilihat pada **Tabel 1**. Semua preparat kontrol dan penggunaan ulang NBF 10% 1 kali memiliki rata-rata skor penuh (3 ± 0) pada penilaian kejelasan inti dan sitoplasma serta keseragaman warna. Kriteria berkualitas baik ditunjukkan dengan inti yang jelas berwarna biru, sitoplasma berwarna merah muda dan memiliki

keseragaman warna, tidak ditemukan penumpukan warna, dan pewarnaan seragam dan merata pada setiap lapang pandang (beberapa contoh jaringan dapat dilihat pada **Gambar 1–4 A & B**). Preparat penggunaan ulang NBF 10% 2 kali menunjukkan rata-rata skor $2,4 \pm 0,5$, yaitu hanya 3 dari 10 preparat yang memiliki skor 3 dengan kriteria berkualitas baik, sedangkan 7 preparat memiliki skor 2 dengan kriteria berkualitas kurang baik dengan inti yang sebagian mulai tidak jelas berwarna biru pudar, sitoplasma berwarna merah muda pudar, pewarnaan tidak seragam, dan ditemukan penumpukan warna (beberapa contoh jaringan dapat dilihat pada **Gambar 1–4 C**). Preparat penggunaan ulang NBF 10% 3 kali menunjukkan rata-rata skor paling rendah, yaitu $1,7 \pm 0,5$, di mana 3 dari 10 preparat memiliki skor 2 dengan kriteria berkualitas kurang baik, sedangkan 7 preparat memiliki skor 1 dengan kriteria berkualitas buruk dengan inti yang tidak jelas berwarna biru pucat, sitoplasma tidak jelas berwarna merah muda pucat, pewarnaan tidak seragam, ditemukan penumpukan warna, dan ditemukan juga ada robekan pada preparat (beberapa contoh jaringan dapat dilihat pada **Gambar 1–4 D**).

Intensitas warna inti dan sitoplasma semua preparat sampel diukur menggunakan aplikasi *ImageJ* dan didapatkan hasil pengukuran seperti pada **Tabel 2**. Pada uji statistik preparat penggunaan ulang 1 kali didapatkan nilai *Sig.*>0,05, yaitu 0,67 yang bermakna bahwa secara statistik tidak ada perbedaan yang signifikan antara preparat kontrol dan preparat penggunaan ulang 1 kali. Pada preparat penggunaan ulang 2 kali didapatkan nilai *Sig.*<0,05, yaitu 0,02 yang bermakna bahwa secara statistik ada perbedaan yang signifikan antara preparat kontrol dan preparat penggunaan ulang 2 kali. Pada preparat penggunaan ulang 3 kali didapatkan nilai *Sig.*<0,05, yaitu 0,00 yang bermakna bahwa secara statistik ada perbedaan yang signifikan antara preparat kontrol dan preparat penggunaan ulang 3 kali.

Penggabungan data penilaian mikroskopis (kejelasan inti dan sitoplasma dan keseragaman

Tabel 1 Hasil penilaian mikroskopis preparat histopatologi dengan penggunaan ulang larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10%

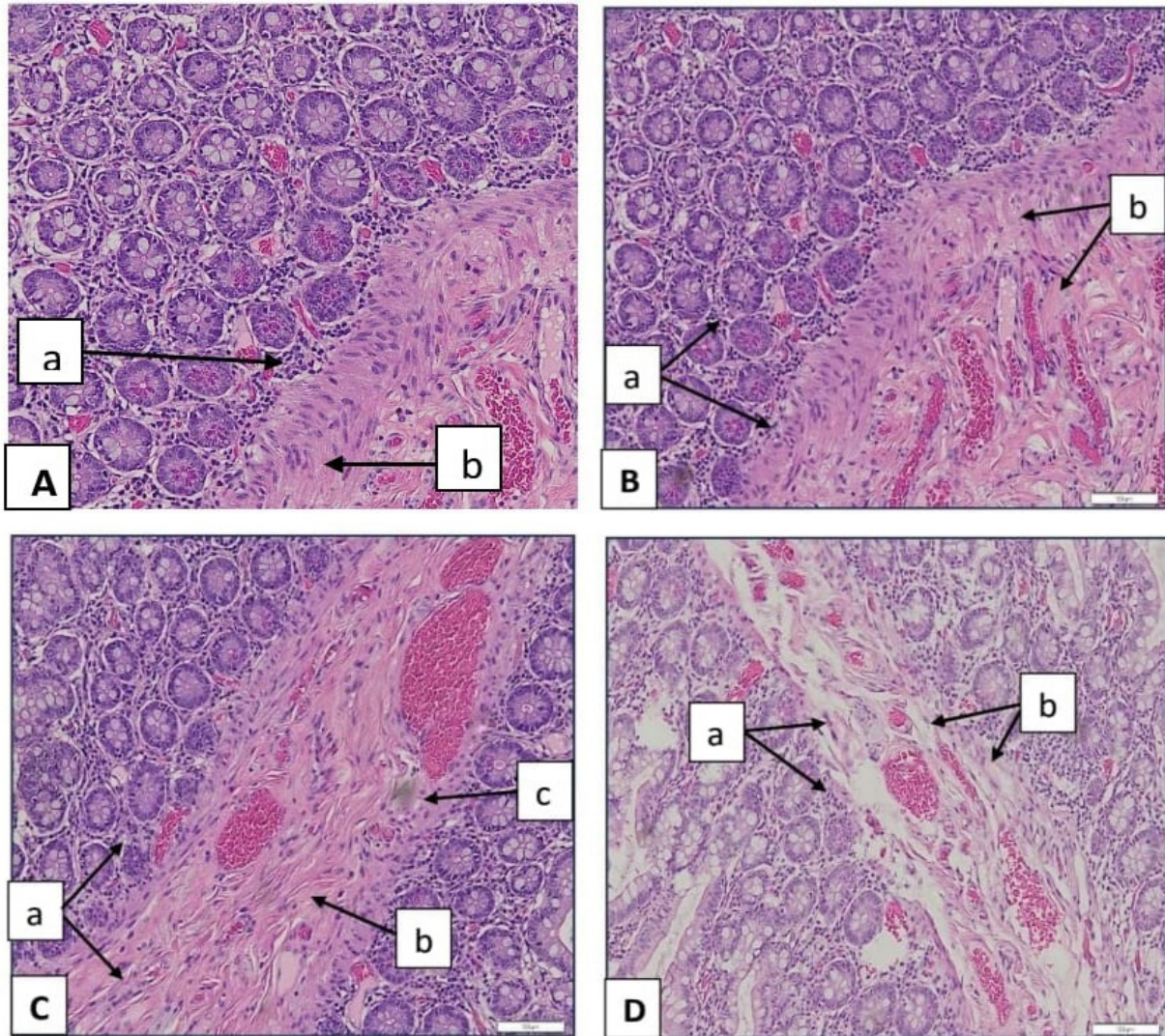
Jaringan	Parameter Penilaian	Skor kualitas preparat histopatologi			
		Kontrol	Penggunaan ulang larutan fiksatif NBF 10%		
			1 kali	2 kali	3 kali
Usus	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	3	2
	Keseragaman warna	3	3	3	2
Mioma uterus	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	3	2
	Keseragaman warna	3	3	3	2
Prostat	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	2	2
	Keseragaman warna	3	3	2	2
Uterus	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	2	2
	Keseragaman warna	3	3	2	1
Kista ovarium	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	2	2
	Keseragaman warna	3	3	2	1
Porsio serviks	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	2	2
	Keseragaman warna	3	3	2	1
Tiroid	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	2	2
	Keseragaman warna	3	3	2	1
Rektum	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	3	2
	Keseragaman warna	3	3	3	2
Fibroadenoma mammae	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	3	2
	Keseragaman warna	3	3	3	1
Kantong empedu	Kejelasan inti dan sitoplasma	3	3	2	2
	Keseragaman warna	3	3	2	1
Rata-rata skor penilain mikroskopis		3 ± 0 ^a	3 ± 0 ^a	2,4 ± 0,5 ^b	1,7 ± 0,5 ^b

Kejelasan inti sel dan sitoplasma: jelas (skor 3), kurang jelas (skor 2), tidak jelas (skor 1); Keseragaman warna: seragam (skor 3), kurang seragam (skor 2), tidak seragam (skor 1). Huruf superskrip (^{a,b}) yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata (P<0,05).

pewarnaan) dan data pengukuran intensitas warna menjadi hasil akhir penilaian kualitas preparat histopatologi yang dapat dilihat pada **Tabel 3**. Preparat sampel kontrol semuanya memiliki skor 9 yang masuk kategori berkualitas baik. Preparat sampel dengan larutan fiksatif NBF 10% penggunaan ulang 1 kali didapatkan 7 preparat sampel memiliki skor 9 dan 3 preparat memiliki skor 8 dengan rata-rata skor 8,7. Setelah dilakukan uji statistik didapatkan nilai *Sig.*>0,05, yaitu 0,67 yang bermakna bahwa secara statistik tidak ada perbedaan yang signifikan antara preparat kontrol dan preparat penggunaan ulang 1 kali.

Pada preparat penggunaan ulang 2 kali didapatkan 1 preparat memiliki skor 9, 2 preparat memiliki skor 8, 3 preparat memiliki skor 7, 2 preparat memiliki skor 6, dan 2 preparat memiliki skor 5, dengan skor rata-rata 6,8. Setelah dilakukan uji statistik didapatkan nilai *Sig.*<0,05, yaitu 0,00 yang bermakna bahwa secara statistik ada perbedaan yang signifikan antara preparat kontrol dan preparat penggunaan ulang 2 kali.

Pada preparat penggunaan ulang 3 kali didapatkan 1 preparat memiliki skor 6, 5 preparat memiliki skor 5, dan 4 preparat memiliki skor 3, dengan skor rata-rata 4,3. Setelah dilakukan uji statistik didapatkan



Gambar 1 Perbandingan preparat kontrol dan perlakuan penggunaan ulang larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10% pada jaringan usus. **A.** Preparat kontrol, inti terlihat jelas berwarna biru (a) dan sitoplasma berwarna merah muda terang (b), warna secara keseluruhan terlihat terang dan merata. **B.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 1 kali, inti masih terlihat jelas berwarna biru (a) dan sitoplasma berwarna merah muda (b), warna secara keseluruhan terlihat jernih dan merata. **C.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 2 kali, inti mulai tidak jelas berwarna biru agak pudar (a) sitoplasma berwarna merah muda agak pucat (b), dan ditemukan artefak (c). **D.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 3 kali, inti tidak jelas berwarna biru sangat pudar (a) dan sitoplasma sangat pucat (b), warna secara keseluruhan terlihat sangat pucat. Perbesaran objektif 40×.

nilai $Sig.<0,05$, yaitu 0,00 yang bermakna bahwa secara statistik ada perbedaan yang signifikan antara preparat kontrol dan preparat penggunaan ulang 3 kali.

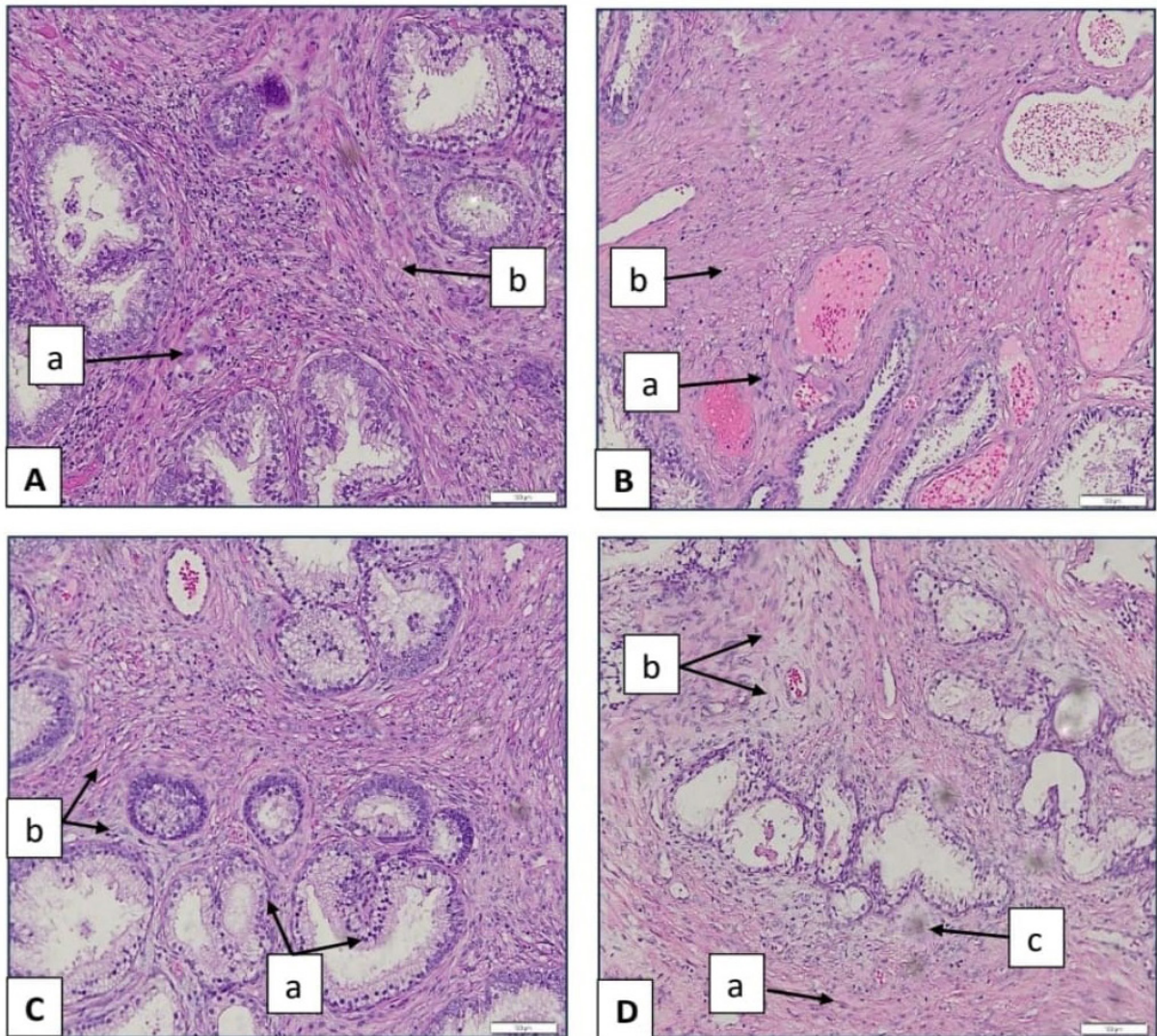
Jumlah limbah fiksasi jaringan

Hasil penghitungan jumlah total limbah fiksasi jaringan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. M. Yunus dan RSUD Ummi Bengkulu selama periode September–Oktober 2023 ditunjukkan

Tabel 4 Jumlah total limbah fiksasi jaringan selama bulan September–Oktober 2023

Laboratorium patologi anatomi	Limbah cair NBF 10% (L)	Limbah padat sisa jaringan (kg)
RSUD Dr. M. YUNUS Bengkulu	177,8	40,4
RSU UMMI Bengkulu	121,2	24,5
Total	299,0	64,9
Estimasi rata-rata/bulan/laboratorium	74,8	16,2

NBF: *neutral buffered formalin*



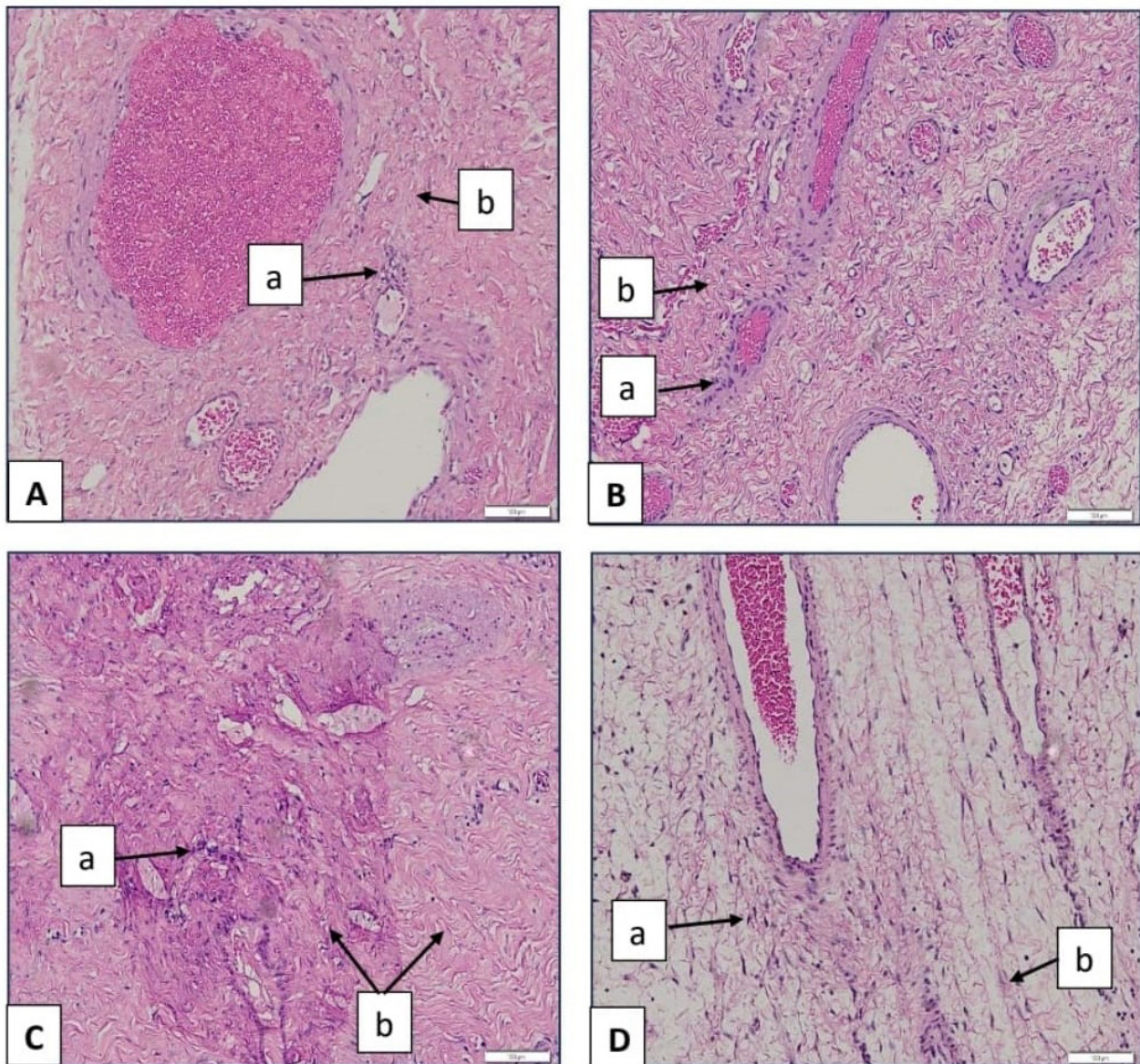
Gambar 2 Perbandingan preparat kontrol dan perlakuan penggunaan ulang larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10% pada jaringan prostat. **A.** Preparat kontrol, inti terlihat jelas berwarna biru (a) dan sitoplasma berwarna merah muda terang (b), warna secara keseluruhan terlihat terang dan merata. **B.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 1 kali, inti masih terlihat jelas berwarna biru (a) dan sitoplasma berwarna merah muda (b), warna secara keseluruhan terlihat jernih dan merata. **C.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 2 kali, inti mulai tidak jelas berwarna biru agak pudar (a) dan sitoplasma berwarna merah muda agak pucat (b). **D.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 3 kali, inti tidak jelas berwarna biru sangat pudar (a), sitoplasma sangat pucat (b), dan ditemukan artefak (c), warna secara keseluruhan terlihat sangat pucat. Perbesaran objektif 40×.

pada **Tabel 4**. Jumlah total limbah yang dihasilkan pada kedua rumah sakit tersebut selama dua bulan adalah 299,0 L limbah cair sisa NBF 10% dan 64,9 kg limbah padat sisa jaringan, dengan estimasi rata-rata per bulan per laboratorium sebesar 74,8 L untuk limbah cair dan 16,2 kg untuk limbah padat.

Pembahasan

Proses fiksasi menggunakan larutan fiksatif merupakan salah satu tahapan yang sangat penting

dalam pembuatan preparat histopatologi. Formalin sampai saat ini masih merupakan larutan fiksatif terbaik yang banyak digunakan. Pada kebanyakan parameter pengujian, Shetty *et al.* (2020) menunjukkan bahwa formalin masih yang terbaik dibandingkan metanol dan aseton (Shetty *et al.*, 2020). Praktik di laboratorium patologi anatomi menunjukkan penggunaan NBF mampu mencegah asidifikasi (pengasaman atau penurunan pH) akibat kecenderungan formalin teroksidasi asam format

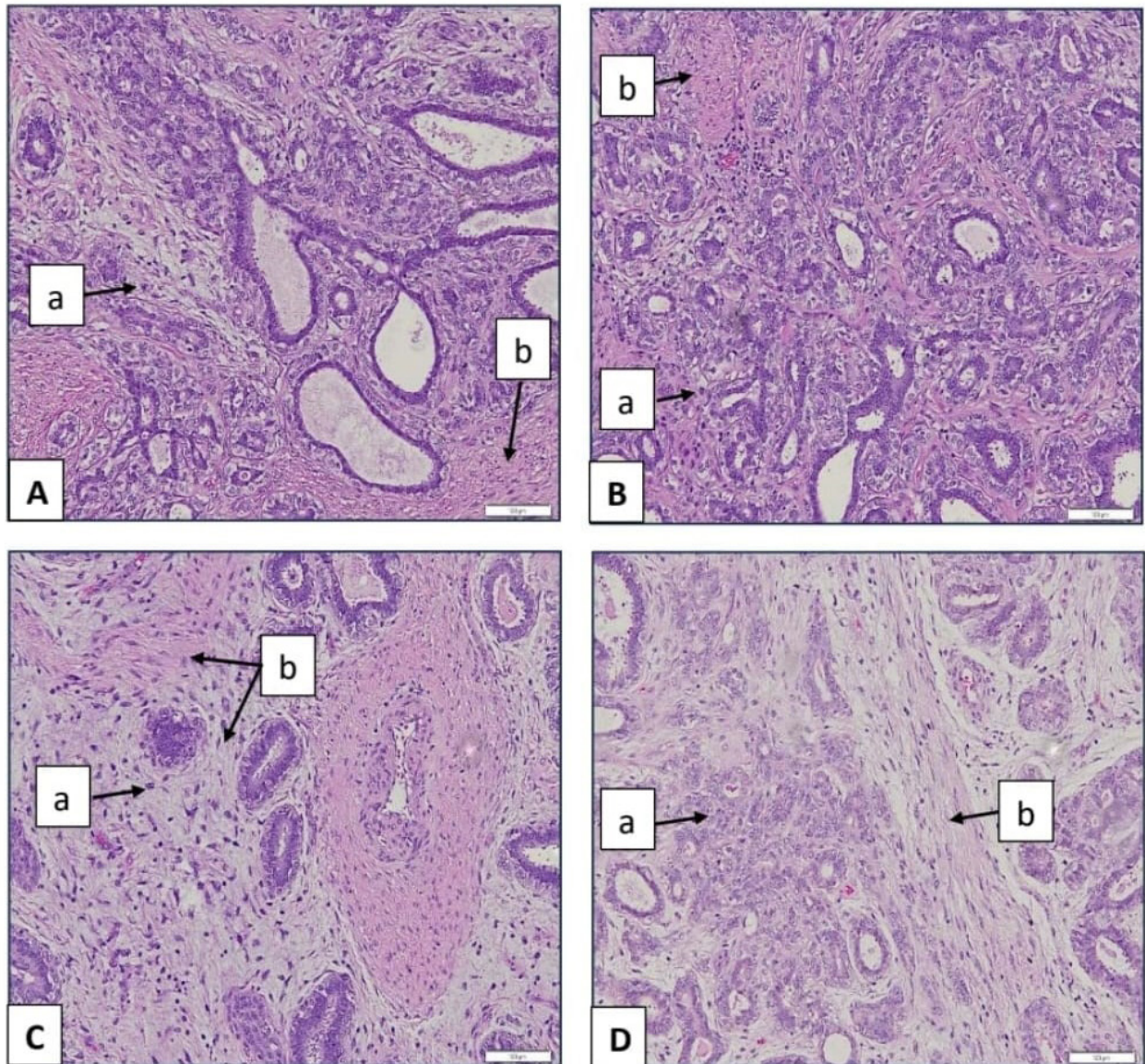


Gambar 3 Perbandingan preparat kontrol dan perlakuan penggunaan ulang larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10% pada jaringan kista ovarium. **A.** Preparat kontrol, inti terlihat jelas berwarna biru (a) dan sitoplasma berwarna merah muda terang (b), warna secara keseluruhan terlihat terang dan merata. **B.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 1 kali, inti masih terlihat jelas berwarna biru (a) dan sitoplasma berwarna merah muda (b), warna secara keseluruhan terlihat jernih dan merata. **C.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 2 kali, inti mulai tidak jelas berwarna biru agak pudar (a) dan sitoplasma berwarna merah muda agak pucat (b). **D.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 3 kali, inti tidak jelas berwarna biru sangat pudar (a) dan sitoplasma sangat pucat (b), warna secara keseluruhan terlihat sangat pucat. Perbesaran objektif 40×.

(formic acid), karena NBF mengandung bufer yang dapat berfungsi mempertahankan pH larutan (Dimenstein, 2009).

Hasil penilaian kualitas preparat sampel penggunaan ulang NBF 10% 1 kali menunjukkan bahwa 87% preparat masih berkualitas baik. Hasil ini dikarenakan larutan NBF 10% penggunaan ulang 1 kali memiliki konsentrasi dan komposisi larutan

yang masih baik serta belum banyak mengalami kontaminasi. Larutan fiksatif masih terlihat jernih dan volumenya tidak banyak berkurang. Larutan NBF 10% merupakan larutan fiksatif terbaik untuk pemeriksaan histopatologi karena bersifat stabil, mempunyai komposisi ion hidrogen (pH) netral, serta memiliki kemampuan penetrasi 0,5–1 mm/jam (Musyarifah & Agus, 2018).



Gambar 4 Perbandingan preparat kontrol dan perlakuan penggunaan ulang larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10% pada jaringan *fibroadenoma mammae* (FAM). **A.** Preparat kontrol, inti terlihat jelas berwarna biru (a) dan sitoplasma berwarna merah muda terang (b), warna secara keseluruhan terlihat terang dan merata. **B.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 1 kali, inti masih terlihat jelas berwarna biru (a) dan sitoplasma berwarna merah muda (b), warna secara keseluruhan terlihat jernih dan merata. **C.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 2 kali, inti mulai tidak jelas berwarna biru agak pudar (a) dan sitoplasma berwarna merah muda agak pudat (b). **D.** Preparat penggunaan ulang NBF 10% 3 kali, inti tidak jelas berwarna biru sangat pudar (a) dan sitoplasma sangat pudat (b), warna secara keseluruhan terlihat sangat pudat. Perbesaran objektif 40 \times .

Hasil penilaian preparat pada penggunaan ulang NBF 10% 2 kali mengalami penurunan kualitas. Hal ini disebabkan oleh penurunan konsentrasi larutan fiksatif sehingga larutan tidak bisa memfiksasi jaringan dengan adekuat yang berakibat jaringan tidak terfiksasi dengan sempurna. Semakin sering larutan NBF 10% digunakan kembali untuk proses fiksasi jaringan, semakin buruk kualitas

preparat yang dihasilkan. Temuan ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Xie *et al.* (2011) yang menunjukkan bahwa konsentrasi NBF 10% dapat mengalami penurunan akibat berbagai faktor, di antaranya penguapan, oksidasi, kontaminasi, paparan cahaya, perubahan suhu, dan penyimpanan yang lama.

Hasil penelitian oleh Likhithaswamy *et al.*

Penggunaan ulang fiksatif formalin pada histopatologi

Tabel 2 Hasil pengukuran intensitas warna bagian sel berdasarkan aplikasi *ImageJ* pada preparat histopatologi dengan penggunaan ulang larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10%

Preparat	Bagian sel	Intensitas warna berdasarkan <i>ImageJ</i>						
		Kontrol	Penggunaan ulang larutan fiksatif NBF 10%					
			1 kali	Selisih*	2 kali	Selisih*	3 kali	Selisih*
Usus	Inti	178.295	188.119	9.824	194.692	16.397	205.855	27.560
	Sitoplasma	148.556	149.468	912	151.653	3.097	175.636	27.080
	Rata-rata			5.368		9.747		27.320
	Skor	3		3		3		1
Mioma uteri	Inti	223.554	226.750	3.196	227.960	4.406	234.716	11.162
	Sitoplasma	141.016	154.109	13.093	162.320	21.304	162.767	21.751
	Rata-rata			8.145		12.855		16.457
	Skor	3		3		2		2
Prostat	Inti	178.228	189.624	11.396	201.849	23.621	207.433	29.205
	Sitoplasma	158.620	169.119	10.499	173.451	14.831	175.357	16.737
	Rata-rata			10.948		19.226		22.971
	Skor	3		2		2		1
Uterus	Inti	168.662	184.654	15.992	197.464	28.802	219.274	50.612
	Sitoplasma	157.133	158.121	988	159.276	2.143	188.091	30.958
	Rata-rata			8.490		15.473		40.785
	Skor	3		3		2		0
Kista ovarium	Inti	172.633	192.613	19.980	201.459	28.826	223.212	50.579
	Sitoplasma	155.132	163.283	8.151	173.135	18.003	181.103	25.971
	Rata-rata			14.066		23.415		38.275
	Skor	3		2		1		0
Porsio serviks	Inti	195.768	217.218	21.450	228.919	33.151	231.665	35.897
	Sitoplasma	139.563	156.240	16.677	157.692	17.930	196.232	56.669
	Rata-rata			19.064		25.541		46.283
	Skor	3		2		1		0
Tiroid	Inti	212.503	212.882	379	217.218	4.715	228.785	16.282
	Sitoplasma	151.177	152.321	1.144	156.240	5.063	166.232	15.055
	Rata-rata			762		4.889		15.669
	Skor	3		3		3		2
Rektum	Inti	164.412	172.006	7.594	174.865	10.453	189.187	24.775
	Sitoplasma	153.226	157.493	4.213	167.457	14.231	172.640	19.414
	Rata-rata			5.904		12.342		22.095
	Skor	3		3		2		1
Fibroadenoma mammae	Inti	174.959	184.487	9.528	207.355	32.396	209.087	34.128
	Sitoplasma	168.023	177.339	9.316	180.080	12.057	196.741	28.718
	Rata-rata			9.422		22.227		31.423
	Skor	3		3		1		0
Kantong empedu	Inti	205.939	206.831	892	208.744	2.805	212.677	6.738
	Sitoplasma	161.547	167.032	5.485	175.668	14.121	185.733	24.186
	Rata-rata			3.189		8.463		15.462
	Skor	3		3		3		2
Rata-rata skor pengukuran intensitas warna		3,0 ± 0 ^a		2,7 ± 0,5 ^a		2,0 ± 0,8 ^b		0,9 ± 0,8 ^b

* Selisih dari nilai perlakuan dikurangi nilai kontrol. Intensitas warna: baik (skor 3) jika selisih intensitas warna <10.000, kurang baik (skor 2) jika selisih intensitas warna 10.000–20.000, buruk (skor 1) jika selisih intensitas warna 20.000–30.000; dan buruk sekali (skor 0) jika selisih intensitas warna >30.000. Huruf superskrip (^{a,b}) yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata (P<0,05). FAM: *fibroadenoma mammae*.

Tabel 3 Hasil total penilaian kualitas preparat histopatologi dengan penggunaan ulang larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10%

Preparat	Skor total kualitas preparat histopatologi			
	Kontrol	Penggunaan NBF 10% berulang		
		1 kali	2 kali	3 kali
Usus	9	9	9	5
Mioma uterus	9	9	8	6
Prostat	9	8	6	5
Uterus	9	9	6	3
Kista ovarium	9	8	5	3
Porsio serviks	9	8	5	3
Tiroid	9	9	7	5
Rektum	9	9	8	5
Fibroadenoma mammae	9	9	7	3
Kantong empedu	9	9	7	5
Rata-rata skor total	9,00 ± 0 ^a	8,70 ± 0,5 ^a	6,80 ± 1,2 ^b	4,30 ± 1,1 ^b

Kualitas preparat histologi: baik (9), kurang baik (6–8), dan buruk (3–5). Huruf superskrip (^{a,b}) yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($P < 0,05$). FAM: *fibroadenoma mammae*.

(2022) menyebutkan bahwa perendaman dalam waktu yang lama pada jaringan menyebabkan kehilangan integritas dan arsitektur jaringan, kesulitan dalam pemotongan, terjadi perubahan warna dan konsistensi, serta penurunan detail inti dan sitoplasma. Pada penelitian ini, waktu (lama) perendaman jaringan dalam larutan NBF 10% yang baru dan yang dipakai berulang dibuat sama. Perubahan yang terjadi pada kualitas preparat dikarenakan kemungkinan besar oleh berkurangnya konsentrasi formalin dalam larutan fiksatif NBF 10% yang digunakan.

Penurunan kualitas preparat juga dipengaruhi oleh suhu fiksasi jaringan. Pada penelitian ini, penulis melakukan fiksasi pada suhu ruang (25°C), sedangkan menurut penelitian yang dilakukan oleh Muthiawati *et al.* (2023) bahwa suhu optimal fiksasi jaringan adalah 37°C sehingga dengan suhu fiksasi yang tidak optimal dapat menyebabkan fiksasi jaringan yang tidak optimal yang secara langsung berpengaruh pada kualitas preparat histopatologi pada penelitian ini. Untuk proses histopatologi rutin, disarankan bahwa ketebalan blok jaringan berada dalam kisaran 20 mm sehingga penetrasi optimal terjadi selama 24 jam pada suhu 25°C atau

selama 18 jam pada suhu 37°C (Fox *et al.*, 1985).

Penggunaan bufer dalam larutan formalin memberikan ketahanan pada perubahan pH. Formalin dengan bufer secara konsisten menembus jaringan lebih cepat daripada yang tidak mengandung bufer. Selain itu, faktor-faktor seperti kemampuan larutan bufer menjaga pH, kedalaman penetrasi larutan fiksatif, konsentrasi, dan interval waktu juga dapat memengaruhi kualitas fiksasi jaringan (Thavarajah *et al.*, 2012).

Jumlah limbah hasil fiksasi jaringan yang diperoleh cukup besar. Limbah ini membutuhkan manajemen penanganan yang memenuhi standar kesehatan lingkungan dan peraturan yang berlaku agar terhindar dari sanksi pembatasan kegiatan operasional dan denda atas pelanggaran kesehatan lingkungan. Limbah padat berupa sisa jaringan dimusnahkan dengan insinerasi (pembakaran) menggunakan *incinerator* (Buesa, 2008; Abacus, 2022).

Rumah sakit yang berkomitmen pada manajemen limbah yang baik dapat meningkatkan reputasi dan citra rumah sakit di mata masyarakat dan pemangku kepentingan yang lain. Dengan menerapkan manajemen penanganan limbah yang baik, rumah

sakit membantu melindungi lingkungan sekitar dan karyawan dari risiko paparan bahan-bahan beracun dan berbahaya, dalam kasus ini seperti formalin, serta dapat meningkatkan efisiensi biaya operasional terkait pemusnahan, pengangkutan, dan pengolahan limbah.

Rumah sakit dalam mengelola limbah medis menghadapi beban biaya yang signifikan (Yenti *et al.*, 2020). Besaran biaya yang dikeluarkan oleh tiap rumah sakit bervariasi, dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti letak geografis, serta volume dan jenis limbah medis yang dihasilkan.

Rumah sakit diharapkan mencari metode inovatif untuk mengurangi jumlah limbah yang dihasilkan, seperti upaya daur ulang limbah dan penerapan metode analisis yang lebih bersih (Waruwu & Santoso, 2015). Selain itu, rumah sakit yang belum mempunyai peralatan pengelolaan dan pemusnahan limbah medis sendiri harus menjalin kerja sama dengan perusahaan penyedia layanan pengelolaan limbah sehingga akan mengakibatkan timbulnya beban biaya tambahan. Purwohandoyo (2016) menyatakan bahwa biaya pengelolaan limbah medis dengan sistem *outsourcing* kepada pihak ketiga cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan sistem swakelola.

Penggunaan ulang dan daur ulang limbah medis rumah sakit dapat memberikan manfaat yang signifikan, baik bagi lingkungan maupun bagi rumah sakit. Penggunaan ulang dapat mengurangi konsumsi sumber daya baru, sedangkan daur ulang dapat mengurangi jumlah limbah yang dibuang ke lingkungan. Penelitian oleh Purwanti (2018) menunjukkan bahwa rumah sakit yang melakukan daur ulang maupun penggunaan ulang limbah medis dapat mengurangi biaya.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa limbah NBF 10% dapat digunakan ulang untuk fiksasi jaringan. Larutan NBF 10% yang biasanya digunakan untuk satu kali pemakaian dapat digunakan menjadi dua kali pemakaian dalam proses fiksasi jaringan. Tindakan ini tidak hanya

berdampak pada pengurangan limbah, tetapi juga berpotensi mengurangi biaya yang dikeluarkan untuk pengelolaan limbah di rumah sakit.

Simpulan

Penggunaan ulang NBF 10% untuk proses fiksasi berpengaruh pada kualitas preparat histopatologi. Pada penggunaan ulang 1 kali mengalami sedikit penurunan kualitas, tetapi masih dapat digunakan untuk diagnosis; sedangkan pada penggunaan ulang 2 kali dan 3 kali kualitas preparat sudah buruk dan menyulitkan untuk diagnosis. Penggunaan ulang NBF 10% berpotensi mengurangi jumlah limbah cair dari sisa larutan fiksatif dan limbah padat dari sisa jaringan yang dihasilkan dan mengurangi biaya untuk pengelolaan limbah tersebut.

Ucapan terima kasih:

Penulis mengucapkan terima kasih kepada RSUD dr. M Yunus dan RSUD UMMI Bengkulu yang telah mengizinkan pelaksanaan penelitian. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kartika Sari yang telah membantu penilaian kualitas preparat secara mikroskopis, serta Amri dan Fadillah yang telah membantu pengumpulan informasi/data.

Pendanaan: Penelitian ini didanai oleh Kementerian Kesehatan melalui Beasiswa Tubel SDMK.

Konflik kepentingan: Semua penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam penelitian ini.

Kontribusi penulis: ZH, WW, dan AD merancang penelitian; ZH, AD, dan MR menulis naskah; serta ZH dan MR mengolah data.

Referensi

- Abacus DX. 2022. Histology, formalin recycling 101. Link: <https://www.abacusdx.com/histology/formalin-recycling-101/> . Download: August 26, 2023.
- Al-Janabi S, Huisman A, Van Diest PJ. 2012. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*, 61(1): 1–9: DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03814.x .
- Buesa RJ. 2008. Histology without formalin? *Annals of Diagnostic Pathology*, 12(6): 387–396. DOI:

- 10.1016/j.anndiagpath.2008.07.004 .
- Dimenstein IB. 2009. A pragmatic approach to formalin safety in anatomical pathology. *Laboratory Medicine*, 40(12): 740–746. DOI: 10.1309/LMQ1HJFD4UN0WWBP .
- Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. 1985. Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(8): 845–853. DOI: 10.1177/33.8.3894502 .
- Khristian E, Inderiati D. 2017. Sitohistoteknologi. Jakarta (ID): Kementerian Kesehatan RI.
- Kiernan JA. 2000. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscopy Today*, 8(1): 8–13. DOI: 10.1017/S1551929500057060 .
- Likhithaswamy HR, Madhushankari GS, Selvamani M, Kumar KM, Kokila G, Mahalakshmi S. 2022. Assessing the quality of long-term stored tissues in formalin and in paraffin-embedded blocks for histopathological analysis. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 10(1): 23–29. DOI: 10.4103/JMAU.JMAU_53_20 .
- Maescher AL. 2016. Junqueira's basic histology text and atlas. 4th ed. New York (US): McGraw Hill Education.
- Musyarifah Z, Agus S. 2018. Proses fiksasi pada pemeriksaan histopatologik. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 7(3): 443–453. DOI: 10.25077/jka.v7i3.900 .
- Muthiawati S, Wiryanti W, Durachim A, Sundara Y. 2023. Otimasi waktu dan suhu fiksasi spesimen terhadap kualitas preparat jaringan. *Jurnal Kesehatan Siliwangi*, 4(1): 479–484. DOI: 10.34011/jks.v4i1.1508 .
- Purwanti AA. 2018. Pengelolaan limbah padat bahan berbahaya dan beracun (B3) rumah sakit di RSUD dr. Soetomo Surabaya. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*, 10(3): 291–298. DOI: 10.20473/jkl.v10i3.2018.291-298 .
- Purwohandoyo A. 2016. Analisis perbandingan biaya pengelolaan limbah medis padat antara sistem swakelola dengan sistem outsourcing di Rumah Sakit Kanker “Dharmais”. *Jurnal Administrasi Rumah Sakit Indonesia*, 2(3): 183–193. DOI: 10.7454/arsi.v2i3.2206 .
- Shetty JK, Babu HF, Laxminarayana KPH. 2020. Histomorphological assessment of formalin versus nonformalin fixatives in diagnostic surgical pathology. *Journal of Laboratory Physicians*, 12(4): 271–275. DOI: 10.1055/s-0040-1722546 .
- Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. 2012. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 16(3): 400–405. DOI: 10.4103/0973-029X.102496 .
- Waruwu YM, Santoso H. 2015. Upaya minimasi limbah padat Rumah Sakit Umum Pusat Dokter Kariadi Semarang dengan penerapan strategi cleaner production. *Industrial Engineering Online Journal*, 4(2): 1–7.
- Xie R, Chung JY, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N, Hewitt SM. 2011. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(4): 356–365. DOI: 10.1369/0022155411398488 .
- Yenti E, Candra R, Juliati RA. 2020. Penerapan akuntansi lingkungan terhadap biaya operasional pengelolaan limbah pada RSUD Prof. dr. M.A. Hanafiah SM Batusangkar. *IMARA Jurnal Riset Ekonomi Islam*, 4(1): 67–77. DOI: 10.31958/imara.v4i1.2081.