

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Mencit (*Mus musculus*)

Mencit merupakan hewan yang sering digunakan sebagai hewan laboratorium. Penggunaan mencit sebagai model laboratorium berkisar 40%. Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium karena memiliki kelebihan seperti siklus hidup relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah ditangani, serta sifat produksi dan karakteristik reproduksinya mirip hewan mamalia lain, seperti sapi, kambing, domba, dan babi. Selain itu, mencit dapat hidup mencapai umur 1-3 tahun (Rudy Agung Nugroho, 2018).

Mencit memiliki banyak keunggulan sebagai hewan percobaan, yaitu siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan mudah dalam penanganannya. Mencit memiliki bulu pendek halus berwarna putih serta ekor berwarna kemerahan dengan ukuran lebih panjang dari pada badan dan kepala. Ciri-ciri lain mencit secara umum adalah tekstur rambut lembut dan halus, bentuk hidung kerucut terpotong, bentuk badan silindris agak membesar ke belakang warna rambut putih, mata merah, ekor merah muda. Mencit merupakan hewan yang termasuk dalam famili Muridae. Mencit liar atau mencit rumah adalah hewan satu spesies dengan mencit laboratorium. Semua galur mencit laboratorium sekarang ini merupakan keturunan dari mencit liar sesudah melalui peternakan selektif (Rudy Agung Nugroho, 2018).



Sumber: Fitri Handajani, 2021

Gambar 2.1 Mencit (*Mus musculus*)

Menurut Guneberg (1943) mengklasifikasikan sistem orde mencit sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Murinane
Genus	: Mus
Spesies	: Mus musculus

a) Ginjal Mencit (*Mus musculus*)

Kedua ginjal terletak di dinding posterior perut, di luar rongga peritoneum. Parenkim setiap ginjal memiliki konteks ginjal luar, dan medula ginjal bagian dalam sebagian besar tubulus linear dan saluran. Medula ginjal pada manusia terdiri dari 8-15 struktur kerucut disebut piramida ginjal. Ginjal Masing-masing berisi 1-4 juta unit fungsional yang disebut nefron, masing-masing terdiri dari sel dan tubulus ginjal epitel yang Panjang dan sederhana dengan tiga bagian utama. Divisi utama masing-masing nefron adalah sel ginjal, tubulus proksimal, *loop henle (atau loop nefron)*, tubulus distal (Mescher, 2016).

2. Pemeriksaan Histopatologi

Histologi yaitu bagian dari ilmu kedokteran dengan yang dipelajari yakni struktur serta sifat jaringan terkait dengan adanya penyakit (Sumanto, 2014). Pemeriksaan Histopatologi dapat dilakukan dengan metode histoteknik. Histoteknik adalah metode pembuatan sediaan dari spesimen tertentu yang terfiksasi kemudian ditanam ke parafin lalu dipotong diletakkan pada slide, diwarnai dengan hemaxtoxylin-eosin lalu diinterpretasikan oleh dokter Spesialis Patologi Anatomi. Preparat Histopatologi ini dapat melihat perubahan patalogis jaringan dan perubahan suatu sel pada jaringan (Kemenkes RI, 2015).

Langkah-langkah pembuatan preparate , yaitu meliputi:

a. Penerimaan Spesimen

Ketika penerimaan spesimen, sesudah staff loket selesai dengan administrasinya yakni data diri (nama lengkap, jenis kelamin, usia, jumlah spesimen) kemudia akan menyerahkannya pada petugas kamar potong. Petugas kamar potong melakukan pemeriksaan berulang yang disesuaikan antar spesimen dan keterangan pada form pengantarnya. Selanjutnya petugas melakukan pemeriksaan benarkah fiksasi telah tepat, apabila fiksasi belum tepat kemudian melakukan perbaikan kembali.

b. Pemotongan dan Pemeriksaan

Melakukan proses pemotongan supaya dapat diambil unsur dari jaringan dengan representatif. Pelaksanaan pemotongan melalui tebal maksimal dengan tanpa lebih tebal dari kaset jaringan serta memasukkannya pada kaset jaringan yang telah diberikan penomoran yang disesuaikan pada nomor formulir. Proses selanjutnya potongan disesuaikan pada jenis jaringan dan besarnya jaringan. Kemudian memasukkan jaringan pada kaset serta ditutupkan, selanjutnya memasukkan kaset didalam tempat dengan bersisi formalin 10% buffer fosfat ataupun alkohol, dikarenakan kaset jaringan itu tidak diperbolehkan untuk dibiarkan kering dengan udara. memerlukan perlakuan tambahan pada bahan dengan jaringan tulang melalui teknik perendaman tulang pada cairan dekalsifikasi, misalnya HNO₃, EDTA untuk menghilangkan kalsiumnya (IAPI, 2008).

c. Fiksasi Jaringan

Fiksasi jaringan adalah tahap awal dalam pengolahan jaringan yang merupakan suatu usaha atau upaya untuk mengawetkan komponen sel atau jaringan agar tidak berubah dan tidak mudah rusak. Dasar dari pembuatan sediaan histologi yang baik untuk penilaian kualitas sediaan maka jaringan yang akan dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi yaitu harus melakukan fiksasi yang baik dan benar. Fiksasi yang baik dapat menghasilkan sediaan yang berkualitas baik yang dinilai oleh patologi (Musyarifah & Agus, 2018).

Tujuan dari fiksasi adalah untuk mengawetkan jaringan agar dapat mempertahankan susunan jaringan supaya mendekati kondisi seperti sewaktu hidup dan mengeraskan jaringan terutama pada jaringan lunak agar mudah dalam pembuatan irisan tipis. Pada sel atau jaringan yang akan difiksasi tersusun atas sel dan komponen ekstraseluler yang terdiri dari elemen peptida dan protein, lipid dan fosfolipid (membran), karbohidrat dan kompleks karbohidrat, berbagai jenis RNA dan DNA dan sebagainya. Elemen-elemen ini akan bereaksi selama proses fiksasi dan akan tergantung pada jenis fiksasi yang digunakan, baik itu akan dihilangkan atau dipertahankan (Khristian *et al.*, 2017).

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pembuatan jaringan histologi adalah tebal irisan jaringan, volume larutan fiksasi dan jenis cairan fiksasi. Tebal irisan jaringan adalah 3-5 mm sehingga larutan fiksasi tersebut dapat dengan cepat masuk ke seluruh jaringan. Apabila irisan terlalu tebal maka hanya permukaan luar yang terfiksasi dengan baik, sedangkan bagian tengah jaringan akan membusuk sebelum larutan fiksasi masuk ke dalam jaringan. Volume larutan fiksasi sekurang-kurangnya harus 10-20x dari jumlah volume jaringan atau sediaan yang akan difiksasi. Banyaknya volume jaringan akan menentukan berapa jumlah volume larutan fiksasi yang diperlukan dan ketebalan jaringan akan menentukan kecepatan fiksasi. Panjang dan lebarnya suatu jaringan ditentukan oleh jenis mikrotom yang digunakan (Jusuf, 2009).

1) Prinsip-Prinsip Fiksasi

Untuk menghasilkan pengaruh fiksasi yang baik, maka suatu proses fiksasi harus memenuhi beberapa prinsip, yaitu meliputi:

a) Koagulasi

Koagulasi merupakan suatu proses penggumpalan dari partikel koloid yang terdapat didalam sel karena terjadinya penambahan bahan kimia atau memberikan suatu perlakuan fisik sehingga partikel-partikel tersebut menjadi netral dan akan membentuk endapan. Proses koagulasi pada fiksasi dapat terjadi pada protein yang terdapat didalam sel atau kandungan lainnya yang perlu

dipertahankan akibat degenerasi yang terus terjadi (Khristian *et al.*, 2017).

b) Presipitasi

Presipitasi yaitu pengendapan yang terjadi akibat koagulasi yang terjadi pada sebelumnya. Presipitasi yang diinginkan ketika proses fiksasi yaitu presipitasi protein, yang mana protein inilah yang akan menjadi salah satu faktor utama dalam pembusukan jaringan (Khristian *et al.*, 2017).

2) Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Fiksasi

Faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat efektivitas dan kecepatan suatu fiksasi jaringan, yaitu meliputi:

a) Suhu/Temperatur

Peningkatan suhu dapat mempercepat reaksi kimia yang terjadi antara unsur fiksatif dengan sel atau jaringan dan akan meningkatkan kecepatan fiksasi serta dapat meningkatkan laju degenerasi jaringan dibagian yang mudah dihentikan. Fiksasi yang menggunakan teknik pemanasan sebaiknya dimulai dari suhu kamar kemudian ditingkatkan secara perlahan sampai mencapai suhu 45°C hingga suhu yang lebih tinggi sampai 65°C, tapi waktu yang digunakan harus lebih singkat (Khristian *et al.*, 2017).

b) Kemampuan Penetrasi dan Ketebalan Pemotongan

Penetrasi jaringan bergantung pada kemampuan difusi dan berat molekul masing-masing cairan fiksatif. Formalin dan alkohol mempunyai kemampuan penetrasi yang terbaik (Musyarifah & Agus, 2018). Agar jaringan dapat terpenetrasi dengan baik maka jaringan diiris dengan ketipisan 3-5 mm. Jaringan yang tipis akan lebih mudah dipenetrasi daripada jaringan tebal. Dengan ketebalan inilah diharapkan cairan fiksasi tersebut dapat dengan cepat memfiksasi seluruh jaringan. Apabila irisan jaringan terlalu tebal, maka bagian yang terfiksasi hanya dipermukaan luarnya saja yang dapat difiksasi sedangkan bagian tengah jaringan membusuk sebelum bahan cairan fiksasi masuk ke jaringan. Untuk pemeriksaan

mikroskopi, ketebalan irisan jaringan yaitu 1 mm (Jusuf, 2009).

c) Tingkat Keasaman/(Ph)

Tingkat keasaman suatu larutan (pH) dapat menjadi penting ketika larutan yang digunakan dalam fiksasi mengandung formaldehid pH yang diberikan diharapkan sesuai dengan pH sel yaitu 6,8-7,2. Ketika kondisi larutan fiksasi mengandung Formaldehid akan membentuk asam format dan menghasilkan larutan asam yang akan bereaksi dengan hemoglobin dan menghasilkan pigmen artefak (asam Hematin Formaldehid). Namun ketika larutan fiksasi memiliki pH basa, maka kemungkinan yang terjadi adalah sel yang mengalami pembengkakan. Pada kasus tertentu asam kadang-kala diperlukan seperti penggunaan asam asetat maupun asam pikrat (Bouin). Hal ini biasa dilakukan ketika waktu fiksasi diharapkan lebih cepat dibanding penggunaan formalin atau karena penggunaan lainnya seperti peningkatan kontras, namun perlu diperhatikan ketika pemberian larutan yang bersifat asam dalam waktu yang lama, akan membuat sel lebih rentan terhadap kerusakan fisik (Khristian *et al.*, 2017).

d) Waktu Penetrasi

Perhitungan waktu dalam penetrasi larutan atau cairan fiksatif menjadi hal penting dalam mengejar waktu autolisis dari sel ataupun jaringan yang terdapat di bagian terdalam jaringan (Khristian *et al.*, 2017).

e) Dimensi Spesimen

Dimensi spesimen atau sampel berkaitan erat dengan waktu optimal jaringan difiksasi dari semua sisi, proses difusi dan larutan yang digunakan untuk pematangan suatu jaringan (Khristian *et al.*, 2017).

f) Volume Larutan fiksasi

Volume larutan fiksasi sebaiknya adalah 10x volume jaringan yang akan difiksasi. Ukuran jumlah volume jaringan akan menentukan jumlah volume fiksasi yang akan diperlukan sedangkan

tebalnya jaringan menentukan lamanya proses fiksasi. Panjang dan lebarnya suatu jaringan akan ditentukan oleh jenis mikrotom yang digunakan (Jusuf, 2009).

g) Durasi/Waktu

Waktu fiksasi tergantung dari jenis fiksatifnya, larutan formalin harus bertahan setidaknya 24 jam sebelum terjadi dehidrasi. Ketika jaringan difiksasi menggunakan formalin selama 24 jam, maka sebagian besar formalin larut, tetapi formaldehida bereaksi dengan komponen jaringan dengan sangat cepat dan sebagian reaksi lainnya akan bersifat *reversible*. Semakin lama menggunakan formalin untuk larutan fiksasi maka dapat mengakibatkan penyusutan jaringan serta pengerasan jaringan (Kumar & Kiernan, 2010).

d. Prosesing/Pematangan Jaringan

Pemrosesan jaringan dapat dilakukan secara manual ataupun menggunakan mesin. Pemrosesan jaringan adalah serangkaian prosedur untuk mengganti unsur air dan fiksatif dalam jaringan dengan parafin agar diperoleh penyatuan yang sempurna antara jaringan dan parafin dalam satu blok. Jika penyatuan tidak sempurna akan diperoleh blok parafin yang tidak homogen dan akan mudah pecah dalam pemotongan atau proses selanjutnya. Penggantian dilakukan dengan cara menarik air dari jaringan dengan dehidran alkohol bertahap sehingga air digantikan oleh alkohol (dehidrasi). Kemudian dilanjutkan oleh xylol yaitu media perantara yang dapat larut dalam air dan paraffin, sehingga alkohol digantikan oleh xylol (clearing). Setelah itu direndam dalam parafin cair (impregnansi/infiltrasi). Sehingga seluruh ruang jaringan yang semula berisi xylol diganti oleh parafin. Sebaiknya digunakan yang titik leburnya 60°C dan temperatur parafinnya tidak melebihi 60°C (IAPI, 2015).

e. Pembuatan Blok Parafin (*Embedding*)

Dalam pembuatan blok parafin, sangat penting untuk diperhatikan orientasi jaringan dengan benar, sehingga akan diperoleh potongan yang representatif. Melakukan *embedding* jaringan kerokan juga harus diyakini bahwa seluruh keping jaringan berada di permukaan sehingga

akan muncul secara utuh dalam pemotongan dengan mikrotom. Sebelum dilakukan pemotongan blok parafin didinginkan pada lempeng pendingin/es batu/lemari es (IAPI, 2015).

f. Proses Pemotongan (*Cutting*)

Pemotongan jaringan hanya dapat dilakukan dengan mikrotom. Untuk hasil yang baik pemotongan jaringan seyogyanya blok jaringan di kondisikan simetris antara sisi kanan kirinya sehingga pita potongan jaringan yang dihasilkan dapat tersusun rapi berderet. Pemotongan blok jaringan yang benar akan menghasilkan pita potongan jaringan yang panjang dan terpotong seri dari bagian jaringan terluar hingga paling dalam. Pengangkatan pita potongan jaringan juga menjaga agar pita jaringan tidak rusak akibat interfensi benda keras sebagai pengambil pita (Sumanto, 2014).

Ada dua tahap dalam proses pemotongan, yaitu:

1) Potong Kasar

Proses potong kasar atau trimming merupakan proses awal pemotongan blok jaringan yang bertujuan untuk membuang kelebihan paraffin yang menutupi jaringan sehingga permukaan jaringan dapat terbuka dan bisa dihasilkan pita jaringan yang utuh. Dikatakan potong kasar, dikarenakan pada proses ini mikrometer diatur pada ketebalan yang cukup tinggi yaitu pada 15-30 μ m. Pada proses ini perlu dilakukan dengan teliti karena jika tidak dapat mengakibatkan artefak pada pita jaringan. Pastikan blok jaringan sudah diseting di belakang pisau sehingga blok tidak langsung terpotong tebal, karena dapat menyebabkan blok pecah dan merusak jaringan di dalamnya (Geoffrey, 2013).

2) Potong Halus

Proses potong halus ini bertujuan untuk menghasilkan pita jaringan dengan ketebalan tertentu. Blok jaringan yang akan dipotong harus didinginkan terlebih dahulu untuk memberikan suhu yang stabil pada blok paraffin dan jaringan. Ketebalan pita jaringan untuk jaringan hasil pembedahan rutin ialah 3-5 μ m. Idealnya hasil

pemotongan yang baik akan saling menempel satu sama lain membentuk pita dengan ketebalan yang sama. Namun pita yang terbentuk dapat memiliki ketebalan yang bervariasi meskipun dipotong pada skala yang sama. Variasi ketebalan pita jaringan ini dipengaruhi banyak factor seperti suhu, sudut penempatan pisau, dan kecepatan pemotongan, juga pengalaman teknisi. Perlu dilakukan pelatihan berulang-ulang untuk dapat konsisten menghasilkan pita jaringan yang baik secara dan efisien (Geoffrey, 2013).

g. Proses Pengembangan Pita Parafin (*Floating*)

Proses pengembangan pita parafin spesimen dengan menggunakan waterbath berisi air hangat dengan suhu tidak lebih dari 60°C (titik didih parafin-lihat petunjuk produsen) dan ditempelkan pada slide. Slide yang telah tertempel pita parafin perlu ditiriskan dengan posisi miring secukupnya untuk mencegah gelembung udara yang akan membuat lubang (BPSDM, 2017).

Proses ini bertujuan untuk membantu mengurangi lipatan pada pita jaringan. Pada proses ini pastikan air yang digunakan bersih, suhu air tidak terlalu panas dan tidak terlalu lama dibiarkan mengambang diatas air karena dapat menimbulkan atefak pada jaringan (Rahmadani, 2018).

h. Proses Pemanasan dengan Menggunakan *Hotplate*

Setelah pita menempel pada kaca objek, hal yang selanjutnya dilakukan adalah mengeringkan sediaan untuk menghilangkan sisa air yang masih terperangkap di bawah pita jaringan. Proses pengeringan bisa dilakukan didalam oven atau di atas hotplate. Suhu pemanasan harus dijaga tidak terlalu panas, cukup pada titik leleh parafin. Suhu yang terlalu panas dapat menyebabkan adanya perubahan struktur pada jaringan. Pengeringan untuk berbagai jaringan juga dianjurkan dilakukan pada suhu 37°C selama satu malam (BPSDM, 2017).

i. Proses Pewarnaan (*Staining*)

Mewarnai jaringan bisa melalui beberapa cara yang disesuaikan pada maksud diakukannya memeriksa serta tipe jaringan pada pewarnaan. Mewarnai ruin sediaan jaringan patologi anatomi biasanya

menggunakan pewarnaan HE. Zat warna hematoxylin memiliki peran pada pewarnaan inti sel yang tampilannya berwarna ungu ataupun biru tua sementara zat warna eosin bisa memberi pewarnaan di sitoplasma sel yang berwarna merah jambu (Sumanto, 2014).

Pewarnaan jaringan dalam pewarnaan bagian-bagian jaringan transparan dengan melewati kegiatan pematangan jaringan. serta prevalensi sel-sel suatu jaringan. Pewarnaan secara berulang kali dan biasa digunakan sebagai Histopatologi yaitu Hematoxylin Eosin (HE). Pewarnaan jaringan sudah melewati aktivitas pematangan jaringan tetapi tetap ada banyaknya kandungan parafin, selain itu aktivitas pewarnaan ialah aktivitas dengan banyaknya kandungan air, menyebabkan sebelum aktivitas perwarnaan, parafin diharuskan untuk lebih dulu dilakukan pelunturan. Kegiatan tersebut pada parafin pada jaringan dinamai defarafinisasi. Setelah itu ialah menarik air dikatakan dengan rehidrasi (Khristian *et al.*, 2017).

1) Prosedur Pewarnaan

Prosedur pewarnaan menggunakan hematoxylin eosin waktu yang di tentukan, penentuan bergantung dengan berdasarkan penggunaan larutan apakah masi baru dibuat atau sebelumnya telah dipergunakan.

2) Hematoxylin

Hematoxylin dihasilkan dengan kayu bulat Amerika yakni haematoxylon campechianum. Hematoxylin berdasarkan asalnya yakni bahasa Yunani, merupakan haimatodec (darah) serta xylon (kayu). Hematoxylin bisa mengikat inti sel dengan lemah, selain jika ditambah senyawa yang lain misal alumunium, besi, krom serta tembaga. Senyawa hematoxylin yang dipakai ialah bentukan dari oksidasi yakni hematin. aktivitas oksidasi senyawa hematoxylin diketahui dengan repening serta mampu mempercepat proses melalui penambahan senyawa yang bertindak menjadi oksidator (Khristian *et al.*, 2017).

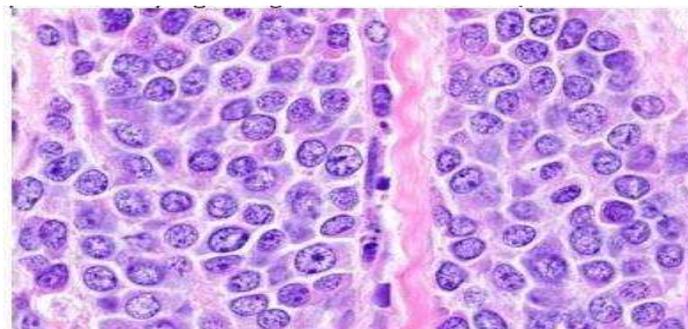
3) Eosin

Pewarna Eosin merupakan pewarna yang memiliki sifat asam dan bermuatan negatif yang digunakan untuk mewarnai sitoplasma. Eosin memberikan warna merah muda ketika berikatan dengan struktur basa dalam sel struktur sel yang terpulas meliputi sebagian besar protein yang terdapat dalam sitoplasma dan beberapa serabut ekstraseluler. Pewarna asam mempunyai afinitas terhadap sitoplasma sel dan pada hematoxilyn mempunyai afinitas terhadap nukleus. Eosin lebih aman digunakan dibandingkan dengan hematoxilyn (Khristian *et al.*, 2017).

Tabel 2.1 Tahap Pewarnaan Hematoxylin Eosin

No	Reagensia	Waktu
1	Xylol I	5 Menit
2	Xylol II	5 Menit
3	Xylol III	5 Menit
4	Alkohol absolut I	5 Menit
5	Alkohol absolut II	5 Menit
6	Alkohol 95%	5 Menit
7	Alkohol 95%	5 Menit
8	Alkohol 90%	5 Menit
9	Alkohol 90%	5 Menit
10	Aquades	1 Menit
11	Hematoxylin	5 Menit
12	Aquades	15 Menit
13	Eosin	2 Menit
14	Alkohol 90%	3 Menit
15	Alkohol 90%	3 Menit
16	Alkohol 95%	3 Menit
17	Alkohol 95%	3 Menit
18	Alkohol absolut	3 Menit
19	Alkohol absolut	3 Menit
20	Xylol IV	5 Menit
21	Xylol V	5 Menit
22	Dimounting dengan Permount	

Sumber: Manual Standar Balai Veteriner Lampung (2023)



Sumber : BPSDM, 2017

Gambar 2.2 Hasil Pewarnaan Sediaan Jaringan Dengan Hematoxillin Eosin

j. Proses Penutupan Sediaan (*Mounting*)

Proses mounting memerlukan sebuah kaca penutup yang biasanya dibuat dari bahan fiberglass tipis dan merekat. Proses mounting harus dilakukan dalam kondisi sediaan basah larutan xylol agar perekat benar-benar menyatu dengan jaringan. Pemberian perekat dalam kondisi sediaan kering akan menyebabkan timbulnya bintik-bintik kehitaman yang dapat mengganggu tampilan mikroskopis sehingga sediaan terkesan banyak kotoran (Khristian *et al.*, 2017).

3. Penilaian Sediaan

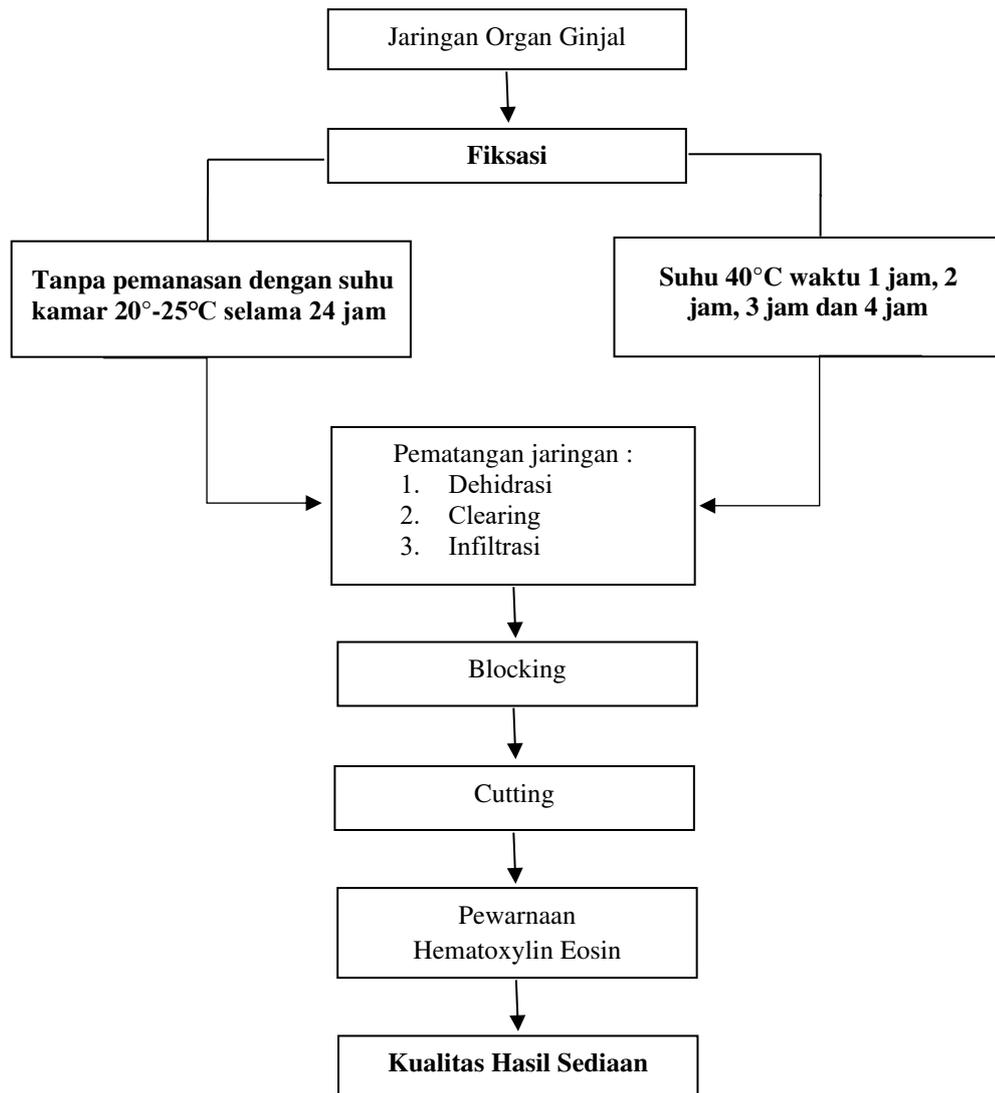
Menurut BPMPPPI 2019, penilaian kualitas sediaan ada beberapa yaitu antara lainnya ada 6 parameter, dan masing-masing diberikan skor yang dimodifikasi Sravya *et al.*, 2018. Skor maksimum yang mungkin diperoleh untuk satu kasus dengan mempertimbangkan keenam faktor. Sediaan dinilai baik apabila rerata skor antara 10-12, kurang baik 8-9 dan tidak baik 6-7.

Adapun parameter penilaian dapat dilihat pada tabel 3 berikut:

Tabel: 2.2 Kriteria Penilaian Kualitas Sediaan

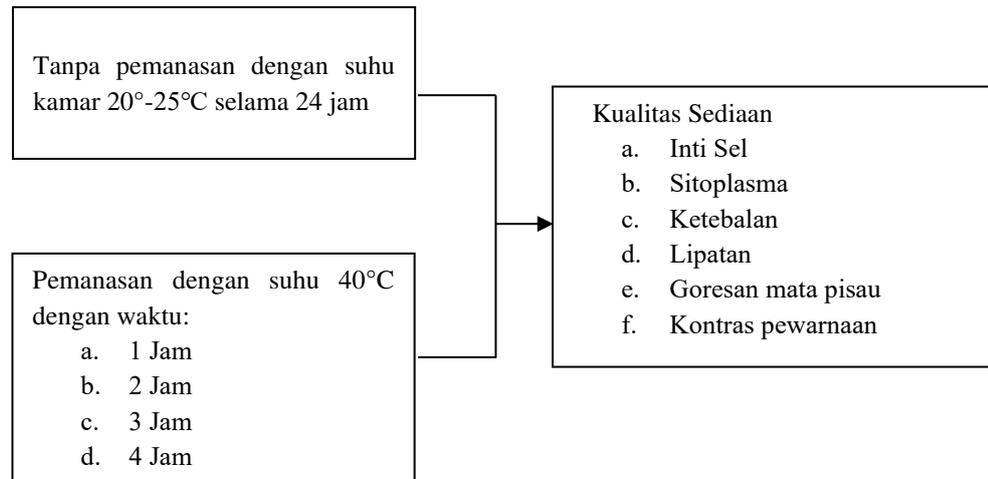
No	Parameter penilaian	Deskripsi	Skor
1	Inti sel	Inti sel tidak jelas	1
		Inti sel jelas	2
2	Sitoplasma	Sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas	1
		Sitoplasma dan jaringan ikat jelas	2
3	Ketebalan	Tidak merata	1
		Merata	2
4	Lipatan	Ada lipatan	1
		Tanpa lipatan	2
5	Goresan mata pisau	Tidak merata	1
		Merata	2
6	Kontras pewarnaan	Kontras pewarnaan tidak baik	1
		Kontras perwarnaan baik	2

Sumber : BPMPPPI, 2019 yang dimodifikasi Sravya *et al.*, 2018

B. Kerangka Teori

Keterangan : Cetak tebal variabel yang diteliti.

C. Kerangka Konsep



D. Hipotesis

H0 : Tidak ada perbedaan kualitas sediaan pada proses fiksasi dengan pemanasan suhu 40°C dalam waktu 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam dan tanpa pemanasan.

H1 : Adanya perbedaan kualitas sediaan pada proses fiksasi dengan pemanasan suhu 40°C dalam waktu 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam dan tanpa pemanasan.