

**PENGARUH KONSENTRASI ASAM NITRAT SEBAGAI REAGEN
DEKALSIFIKASI TERHADAP KUALITAS PEWARNAAN SAFRANIN O
PADA TULANG**
**THE EFFECT OF NITRIC ACID CONCENTRATION AS A
DECALCIFICATION REAGENT ON THE QUALITY OF SAFRANIN O
STAINING IN BONE**

Rita Permatasari, Fuji Verdian Putra, Benny Yoharli

Fakultas Ilmu Kesehatan dan Fakultas Farmasi, Universitas Perintis
Indonesia

Jl. Adinegoro, KM. 15, Simpang Kalumpang, Lubuk Buaya, Padang, Sumatera
Barat, Indonesia.

Corresponding author : permatasari36@gmail.com

Abstrak

Dalam histoteknologi, tulang mendapatkan peran tertentu dalam diagnosis penyakit. Dilema yang dialami oleh seorang teknisi laboratorium patologi anatomi dalam pembuatan sediaan tulang atau sediaan yang mengandung garam kalsium yang tinggi. Untuk dapat mengatasi kekerasan pada jaringan karena adanya garam kalsium maka diperlukan teknik khusus yang disebut dekalsifikasi. Asam kuat seperti asam klorida atau nitrat merupakan larutan dekalsifikasi yang paling cepat dalam proses dekalsifikasi. Safranin adalah pewarna kationik yang digunakan dalam histologi dan sitologi untuk membedakan dan mengidentifikasi berbagai jaringan dan sel. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh konsentrasi asam nitrat sebagai reagen dekalsifikasi terhadap kualitas pewarnaan safranin O pada tulang. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tulang iga sapi kemudian spesimen di dekalsifikasi dengan asam nitrat 5 %, 10% dan 15%. Hasil penelitian menunjukkan agen dekalsifikasi asam nitrat pada konsentrasi 5% dan 10 % di dapatkan hasil konsistensi 1 artinya konsistensi sampel tulang iga sapi tidak lunak, sedangkan Asam Nitrat 15% didapatkan hasil konsistensi 3 artinya konsistensi sampel tulang iga sapi lunak. Kemudian pada penilaian histologis sediaan jaringan tulang yang telah diwarnai dengan Safranin O didapatkan pada konsentrasi 5% intensitas pewarnaan dengan grade skor akhir 0 artinya kualitas buruk. Pada konsentrasi 10% intensitas pewarnaan dengan skor akhir 1 artinya kualitas buruk, dan penilaian histologi konsentrasi 15% intensitas pewarnaan dengan skor akhir 2 artinya kualitas baik. Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan gambaran hasil pewarnaan safranin O pada tulang iga sapi memperlihatkan perbedaan kualitas pewarnaan pada perbedaan konsentrasi *decalcifying agent*.

Kata kunci : Dekalsifikasi, asam nitrat, pewarnaan safranin o

Abstract

In histotechnology, bones play a certain role in the diagnosis of disease. The dilemma experienced by an anatomical pathology laboratory technician in making bone preparations or preparations containing high calcium salts. To overcome the hardness of the tissue due to the presence of calcium salts, a special technique called decalcification is needed. Strong acids such as hydrochloric or nitric acid are the fastest decalcification

solutions in the decalcification process. Safranin is a cationic dye used in histology and cytology to differentiate and identify various tissues and cells. This study aims to determine the effect of nitric acid concentration as a decalcification reagent on the quality of safranin O staining in bones. This study uses an experimental method. The samples used in this study were beef ribs, then the specimens were decalcified with 5%, 10% and 15% nitric acid. The results showed that the nitric acid decalcification agent at concentrations of 5% and 10% obtained a consistency result of 1, meaning that the consistency of the beef rib bone sample was not soft, while 15% Nitric Acid obtained a consistency result of 3, meaning that the consistency of the beef rib bone sample was soft. Then, in the histological assessment of bone tissue preparations that have been stained with Safranin O, it was obtained at a concentration of 5% staining intensity with a final score grade of 0, meaning poor quality. At a concentration of 10% staining intensity with a final score of 1, meaning poor quality, and histological assessment of a concentration of 15% staining intensity with a final score of 2, meaning good quality. From this study, it can be concluded that the results of safranin O staining on beef ribs show differences in staining quality at different concentrations of decalcifying agents.

Kata kunci : Decalcification, nitric acid, safranin staining o

Pendahuluan

Dalam dunia histoteknologi, tulang mendapatkan peran tertentu dalam suatu diagnosis penyakit. Penyakit yang menyerang jaringan tulang salah satunya adalah osteosarcoma atau yang biasa disebut dengan tumor tulang. Untuk mendiagnosis seseorang dikatakan osteosarcoma maka perlu dilakukan suatu pemeriksaan mikroskopis tulang. Dilema yang dialami oleh seorang teknisi laboratorium patologi anatomi dalam pembuatan sediaan tulang atau sediaan yang mengandung garam kalsium yang tinggi seperti pada necrotic Tuberculosis adalah kondisi yang sangat keras dalam mtanpa spasielakukan pematangan dan juga pemotongan jaringan tersebut hingga tidak jarang kegagalan dalam proses pembuatan jaringan mengalami kegagalan hingga rusaknya pisau mikrotom. Untuk dapat mengatasi kekerasan pada jaringan karena adanya garam kalsium maka diperlukan teknik khusus yang disebut dengan dekalsifikasi (Made Maharani Calistha Ghanaputri, I Gedde Eka Wiratnaya, I Ketut Suyasa 2023)

Pemilihan larutan dekalsifikasi sangatlah penting, mengingat tujuan dari dekalsifikasi. Kriteria larutan dekalsifikasi yang baik adalah larutan yang dapat menghilangkan garam kalsium dengan sempurna, tidak menyebabkan kerusakan sel-sel, jaringan atau serat yang ada disekitar area yang mengandung garam kalsium, waktu yang dibutuhkan sesingkat mungkin, tidak mempengaruhi pewarnaan yang dilakukan (Rakhmawati et al. 2019) Berbagai larutan kimia telah digunakan untuk proses dekalsifikasi, antara lain larutan asam (asam kuat dan asam lemah), agen dekalsifikasi seperti etylene diamenotetraacetic acid (EDTA), dan larutan modifikasi seperti TBD-1® yang mengandung EDTA dan asam klorida (HCL) (Bumalee et al. 2023)

Asam kuat seperti asam klorida atau nitrat pada konsentrasi hingga 10% merupakan larutan dekalsifikasi yang paling cepat dalam proses dekalsifikasi. Namun jika penggunaan larutan ini menggunakan waktu yang berlebihan akan menyebabkan hilangnya pewarnaan inti dan dapat menyebabkan jaringan menjadi lebih basah sehingga sulit untuk dilakukan pematangan jaringan (Hegde, Archana, and Nagpal 2016).

Ada metode pewarnaan alternatif yang memberikan perbedaan yang baik

antara tulang dan tulang iga; misalnya, pewarnaan Safranin O untuk tulang iga (Asfiya, Novalina, and Astuti 2024) dan metode van Gieson untuk kolagen dan jaringan ikat lainnya (Sikarwar et al. 2018). Namun, untuk mencapai evaluasi histologis yang optimal dari sendi yang meradang, metode pewarnaan yang berbeda harus digunakan pada slide yang berurutan (Bergmann, Mölne, and Gjerthsson 2015).

Safranin adalah pewarna kationik yang digunakan dalam histologi dan sitologi untuk membedakan dan mengidentifikasi berbagai jaringan dan sel. Pewarnaan safranin bekerja dengan mengikat proteoglikan asam pada jaringan tulang iga dengan afinitas tinggi membentuk kompleks jingga kemerahan. Pengikatan membuat jaringan tulang iga tampak merah saat diamati di bawah mikroskop. Pewarnaan safranin membantu para peneliti mendeteksi tidak hanya jaringan tulang iga tetapi juga semua jaringan dan organ tubuh (Krumshabel et al. 2014). Pewarnaan safranin adalah salah satu pewarnaan laboratorium yang paling menjanjikan yang digunakan untuk penelitian histopatologi dan sitologi (Asfiya, Novalina, and Astuti 2024).

Reagen dekalsifikasi yang sering digunakan salah satunya adalah menggunakan Asam Nitrat dengan konsentrasi yang belum terstandar sehingga penggunaan larutan ini menggunakan waktu yang berbeda-beda. Tujuan penelitian ini yaitu "Pengaruh Konsentrasi Asam Nitrat Sebagai Reagen Dekalsifikasi Terhadap Kualitas Pewarnaan Safranin O Pada Tulang".

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. M. Djamil Padang. Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan pada bulan Mei sampai September Tahun 2023.

Prosedur Kerja

Dekalsifikasi Tulang

Sampel specimen tulang yang dipakai adalah tulang iga yang di potong dengan ketebalan ± 5 mm, kemudian di Fiksasi dengan menggunakan larutan dekalsifikasi menggunakan asam nitrat dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15%, kemudian diamkan selama 24 Jam. Kemudian dinilai konsistensi sampel tulang dan dinilai.

Prosesing Jaringan

Setelah dekalsifikasi sampel tulang 24 jam, dilakukan Grossing TUP pada sampel tulang dengan ketebalan 2-3 mm, kemudian dimasukkan ke dalam prosesing kaset dan diberi label, lalu kemudian dilakukan prosesing jaringan ke dalam alat tissue processing LEICA TP 1020 dengan tahapan sebagai berikut :

Tabel 1. Tahapan Prosesing Jaringan

Tahapan	Reagen	Waktu	Suhu (°C)
1	NBF 10%	1 Jam 20 Menit	38°C
2	NBF 10%	1 Jam 20 Menit	38°C
3	Alkohol 7%	1 Jam 20 Menit	38°C
4	Alkohol 80%	1 Jam 20 Menit	38°C
5	Alkohol 95%	1 Jam 20 Menit	38°C
6	Alkohol 100%	1 Jam 20 Menit	38°C
7	Alkohol 100%	1 Jam 20 Menit	38°C
8	Xylol	1 Jam 20 Menit	38°C
9	Xylol	1 Jam 20 Menit	38°C
10	Parafin	1 Jam 20 Menit	60°C
11	Parafin	1 Jam 20 Menit	60°C

(Caron and Markusen 2023)

Pewarnaan dengan Safranin O

Blok jaringan yang sudah dipotong dengan ketebalan 3-4 μm di ditempelkan pada objek glas kemudian dipanaskan pada hotplate dengan suhu 60°C. kemudian dilakukan deparafinisasi dengan menggunakan dalam xylol 2x 3 menit. Setelah itu dilakukan proses rehidrasi dengan memasukkan preparat jaringan ke dalam ethanol bertingkat, yaitu ethanol 100% selama 3 menit, ethanol 96% selama 3 menit, ethanol 70% selama 3 menit, lalu direndam dengan aquades selama 3 menit. Berikutnya dilakukan pewarnaan menggunakan hematoksilin selama 5 menit kemudian bilas dengan air mengalir kurang lebih 10 menit, kemudian sediaan dimasukan kedalam larutan Fast green (FCF) solution selama 3 menit, Bilas cepat dengan 1% acetic acid solution (5 detik) tidak boleh lebih dari 10 –15 detik. Kemudian preparat dimasukkan ke dalam larutan safranin O 0.1% selama 3 menit. Setelah itu dilakukan proses dehidrasi dengan memasukkan preparate kedalam ethanol 95%, ethanol 96%, ethanol 100% masing-masing selama 3 menit. Kemudian dilanjutkan dengan proses *clearing* menggunakan xylol selama 2 menit. Langkah selanjutnya adalah *mounting* dengan cara meneteskan preparate dengan entellan kemudian ditutup dengan dengan deck glass (Jia et al. 2013), (Zhou et al. 2024).

Interprestasi Penilaian Hasil Preparat tulang menggunakan pewarnaan safranin, sebagai berikut :

Nucleus	:	kehitaman
Sitoplasma	:	biru kehijauan
Tulang iga, musin, granul sel mast	:	oranye-merah

Tabel 2. Pembuatan Larutan Kerja

Larutan	Jumlah bahan	Aquadest	Total
0.1% Safranin O Solution	0,1 gr	100 ml	100 ml
0.05% Fast Green (FCF) Solution	0,05 gr	100 ml	100 ml
1% Acetic Acid Solution	1 ml	99 ml	100 ml

Data hasil penilaian dilakukan secara makroskopis, sampel tulang dinilai berdasarkan konsistensi atau kelunakan sampel, kriteria penilaian berdasarkan skor 1 tidak lunak, skor 2 kurang lunak dan skor 3 lunak (Widiawati, Widi et al. 2025) dan penilaian secara mikroskopis menggunakan pewarnaan Safranin O pada mikroskop dengan pembesaran 40x dilakukan pembacaan hasil berdasarkan penilaian Intensitas pewarnaan pada sampel dari hasil yang didapatkan, dikelompokkan sesuai dengan skor 1 tidak baik, skor 2 kurang baik dan skor 3 baik (Ariyadi and Suryono 2017). Data yang didapat dikumpulkan dan dicatat.

Analisis Statistik

Data yang diperoleh berupa non parametrik maka ditabulasikan dan dianalisa menggunakan program statistik komputer SPSS 15.0 yaitu metode pengumpulan data ini diperoleh dari sampel tulang yang yang didekalsifikasi menggunakan asam nitrat 5%, 10% dan 15% dilakukan prosesi jaringan dan diwarnai dengan Safranin O, lalu diberi skor sesuai dengan kriteria pada tabel penelitian. Langkah pertama *Uji Normalitas* data jika didapat normal dilanjutkan dengan *Uji Anova* jika tidak normal maka dipakai *Uji Kruskal Wallis*.

Hasil dan Pembahasan

Penilaian Hasil Dekalsifikasi Sampel

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr.M.Djamil Padang pada bulan Mei – September 2023. Penelitian ini menggunakan sampel tulang iga sapi. Sampel tulang iga sapi menggunakan agen dekalsifikasi dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dengan konsentrasi Asam Nitrat 5%, 10% dan 15%, dengan sampel tulang masing-masing 1 sampel disetiap perlakuan. Secara makroskopis yang dinilai berdasarkan konsistensi tulang didapatkan hasil seperti table dibawah ini:

Tabel 3. Hasil Konsistensi Sediaan Jaringan Tulang

No	Dekalsifikasi	Skor Konsistensi Sampel	Keterangan
1	Asam Nitrat 5 %	1	Tidak Lunak
2	Asam Nitrat 10%	1	Tidak Lunak
3	Asam Nitrat 15%	3	Lunak

Keterangan :

1= tidak lunak (tidak mudah ditusuk)

2= kurang lunak (mudah ditusuk tetapi tidak tembus)

3= lunak (ditusuk dengan jarum tanpa kekuatan bagian tulang sampai tembus)

Berdasarkan tabel 3 didapatkan hasil bahwa agen dekalsifikasi Asam Nitrat pada konsentrasi 5% dan 10 % di dapatkan hasil konsistensi adalah 1 artinya konsistensi sampel tidak lunak, sedangkan Asam Nitrat 15% didapatkan hasil konsistensi adalah 3 artinya konsistensi sampel lunak.

Penilaian Histologis Integritas Jaringan

Sampel tulang yang telah di dekalsifikasi menggunakan Asam Nitrat 5%, 10% dan 15% selanjutnya dilakukan prosesing jaringan. Kemudian blok jaringan tulang dipotong menggunakan mikrotom, masing-masing kelompok perlakuan dekalsifikasi dibuat 5 slide jaringan tulang, setelah itu dilakukan pewarnaan dengan Safranin O. Penilaian secara histologis berdasarkan integritas jaringan pada tulang iga sapi dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 4. Hasil Kualitas Perwanaaan Safranin O

No	Perlakuan	Skor Bern					Rerata Kualitas
		Slide 1	Slide 2	Slide 3	Slide 4	Slide 5	
1	Asam nitrat 5 %	0	0	0	1	0	Buruk
2	Asam nitrat 10 %	1	0	1	1	1	Buruk
3	Asam nitrat 15 %	2	2	2	2	2	Baik

Keterangan :

Grade 0 dan 1 = Pewarnaan dan morfologi sel tulang iga buruk

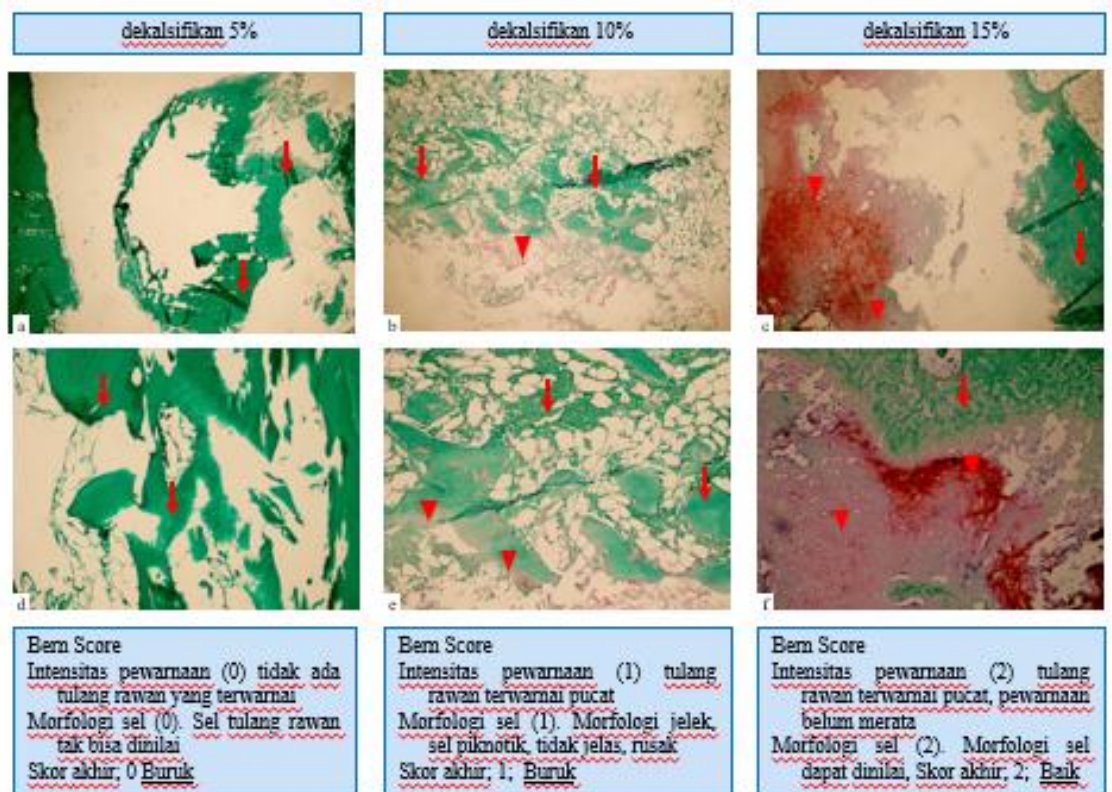
Grade 2 dan 3 = Pewarnaan dan morfologi sel tulang iga baik

Berdasarkan tabel 4 diatas, penilaian histologis pewarnaan safranin O terhadap 5 preparat jaringan didapatkan hasil pada perlakuan dekalsifikasi dengan Asam Nitrat 5% dengan grade rata-rata 0,2 dan pada perlakuan dekalsifikasi dengan Asam Nitrat 10% dengan grade rata-rata 0,8 artinya kualitas pewarnaan safranin O adalah buruk secara histologis integritas jaringan dan intensitas pewarnaan safranin O Pada tulang sapi. Sedangkan pada perlakuan dekalsifikasi dengan Asam Nitrat 15% didapatkan hasil grade rata-rata 2 artinya secara histologis integritas jaringan dan intensitas pewarnaan safranin O Pada Tulang sapi baik.

Penilaian Histologis Intensitas pewarnaan safranin O

Pada penelitian ini yang dinilai adalah intensitas hasil pewarnaan Safranin O yaitu kuat lemahnya penyerapan zat warna oleh jaringan. Pembacaan slide dilihat dibawah mikroskop oleh dr. Sp.PA dengan ajuan kriteria penilaian mengaju ke penelitian yang sudah ada (Aryadi et al, 2017). Adapun langkah – langkah pembacaan slide pertama dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 10x dan dilanjutkan dengan pembesaran 40x.

Hasil preparat sampel tulang sapi dengan pewarnaan safranin O dilakukan penilaian berdasarkan Bern score secara mikroskopis (Rutgers et al. 2010). Gambar kualitas jaringan tulang iga sapi dengan pewarnaan safranin O dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 40x dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 1. Penilaian Kualitas Jaringan Tulang Iga Sapi dengan Pewarnaan Safranin O berdasarkan Bern score (Sumber : Primer, 2023).

Pada Gambar 1 diatas didapatkan histologi sendi dan tulang hewan coba memperlihatkan trabekula tulang, terwarnai hijau (↓) dan tulang iga, terwarnai jingga-kemerahan.. Perlakuan dengan dekalsifikasi asam nitrat 5%, (a, d). dekalsifikasi asam nitrat 10%, (b, e). dekalsifikasi asam nitrat 15%, (c, f). Perlakuan dekalsifikasi asam nitrat dengan kualitas pewarnaan rendah, potongan jaringan tidak baik, tulang iga dan jaringan lunak terlepas. Perlakuan dekalsifikasi 15% memperlihatkan pewarnaan paling baik dengan tulang iga dan jaringan lunak dapat terpotong dan ditempelkan dengan baik, pewarnaan tulang dan tulang iga intensitas cukup. Safranin O. Panel atas objective 4x, tengah objective 10x, bawah objective 40x.

Tabel 5. Hasil Penilaian Histologis Intensitas Pewarnaan Safranin O

No	Perlakuan	Skor Bern						Rerata Kualitas
		Slide 1	Slide 2	Slide 3	Slide 4	Slide 5	Rerata	
1	Asam Nitrat 5%	0	0	0	1	0	0,2	Buruk
2	Asam Nitrat 10%	1	0	1	1	1	0,8	Buruk
3	Asam Nitrat 15%	2	2	2	2	2	2	Baik

Berdasarkan tabel 5 penilaian histologis pada intensitas pewarnaan safranin O didapatkan hasil pada konsentrasi 5% intensitas pewarnaan 0 tidak ada tulang iga terwarnai morfologi sel ,sel tulang iga tak bisa dinilai dengan grade skor akhir 0 artinya kualitas buruk. Penilaian histologis konsesentrasi 10% intensitas pewarnaan 1 tulang iga terwarnai pucat,morfologi sel 1 ,morfologi jelek,sel piknotik tidak jelas dan rusak,skor akhir 1 artinya kualitas buruk, Penilaian histologi konsentrasi 15% intensitas pewarnaan 2 tulang iga terwarnai pucat,pewarnaan belum merata,morfologi sel 2,morfologi sel dapat dinilai,skor akhir 2 artinya kualitas baik.

Data yang didapat dari penelitian merupakan data yang memiliki skala ordinal. Setelah dilakukan uji normalitas, didapatkan hasil bahwa distribusi data tidak normal. sehingga pengujian dilakukan menggunakan analisis *Kruskal-wallis* untuk menguji ada tidaknya perbedaan dari 3 kelompok perlakuan. Pengujian tersebut mendapatkan nilai signifikansi atau didapatkan hasil p value 0,004 ($p < 0,05$) yang artinya ada pengaruh dari konsentrasi asam nitrat sebagai reagen dekalsifikasi terhadap kualitas pewarnaan safranin O pada tulang, sehingga dinyatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara Asam Nitrat 5%, Asam nitrat 10% dan Asam nitrat 15%. Dimana hasil kualitas pewarnaan safranin O paling baik ditemukan pada konsentrasi asam nitrat 15%.

Pembahasan

Penilaian Histologis Integritas Jaringan

Hasil penilaian agen dekalsifikasi Asam Nitrat pada konsentrasi 5% dan 10 % di dapatkan hasil konsistensi adalah 1 artinya konsistensi sampel tidak lunak, sedangkan Asam Nitrat 15% didapatkan hasil konsistensi adalah 3 artinya konsistensi sampel lunak. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hegde, et al., (2016) menyatakan bahwa agen dekalsifikasi nitric acid atau HNO_3 menunjukkan hasil yang paling efisien karena menyeimbangkan integritas jaringan dan faktor waktu sehingga dapat digunakan sebagai agen dekalsifikasi yang stabil untuk diagnosis histopatologi rutin (Gupta 2014), (Hegde, Archana, and Nagpal 2016). Faktor-faktor yang mempengaruhi proses dekalsifikasi untuk diagnostik antara lain ketebalan tulang, kerapatan atau densitas tulang, suhu, agitasi, vakum atau tekanan, dan volume larutan dekalsifikasi. Prinsip dekalsifikasi adalah menghilangkan kation kalsium dengan mekanisme anion. Anion diperoleh dari larutan dekalsifikasi yang biasanya mengandung larut asam. Larutan asam yang digunakan untuk proses dekalsifikasi jaringan tulang antara lain asam nitrat 5%, Parenyi's 10%, asam klorida (HCL) 5 sampai 10%, Larutan Von Ebner's, asam format 10%, Evans dan Krajian, Kristensen, dan netral etilen diamin tetra asetat (EDTA)(Widiawati, Widi et al. 2025).

Penilaian Histologis Intensitas Pewarnaan Safranin O

Gambaran hasil pewarnaan safranin O pada tulang iga sapi memperlihatkan perbedaan kualitas pewarnaan pada perbedaan konsentrasi *decalsifying agent*. Pada kelompok perlakuan dengan asam nitrat 5%, tampak jaringan tidak terpotong sempurna, sebagian besar jaringan terlepas. Hanya sedikit jaringan trabekula tulang yang dapat dinilai, jaringan lunak terlepas akibat kerusakan saat pemotongan oleh karena jaringan keras dan kesan dekalsifikasi tak sempurna. Tulang rawan tak terwakili kemungkinan rusak dan terlepas saat pemotongan. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Widiawati, Widi et al., (2025) menemukan bahwa agen dekalsifikasi terbaiknya yaitu menggunakan asam nitrat 5 % dalam waktu perendaman 24 jam pada jaringan tulang femur marmut, namun dari kualitas preparat dari masing-masing perlakuan tidak berbeda.

Pada kelompok perlakuan dengan asam nitrat 10%, jaringan lebih terdekalsifikasi. Jaringan lunak dan tulang rawan dapat dipotong dan ditempelkan. Namun sebagian tulang rawan masih tampak rusak pada pewarnaan. intensitas pewarnaan safranin O rendah. Pada kelompok perlakuan dengan asam nitrat 15%, jaringan jaringan dapat dipotong dengan baik. Jaringan lunak dan tulang rawan dapat dipotong dan ditempelkan. Tulang rawan dapat diwarnai dengan intensitas pewarnaan sedang (jingga-kemerahan). Masih terdapat area dengan tulang rawan tidak terwarnai sempurna.

Perlakuan dekalsifikasi asam nitrat dengan kualitas pewarnaan rendah yaitu konsentrasi 5%, potongan jaringan tidak baik, tulang iga dan jaringan lunak terlepas. Perlakuan dekalsifikasi 15% memperlihatkan pewarnaan paling baik dengan tulang iga dan jaringan lunak dapat terpotong dan ditempelkan dengan baik, pewarnaan tulang dan tulang iga intensitas cukup. Efektivitas dekalsifikasi sangat bergantung pada durasi waktu perendaman spesimen dalam larutan dekalsifikasi. Semakin lama suatu jaringan tulang direndam dalam larutan tersebut, semakin banyak ion kalsium yang dilepaskan, sehingga tulang menjadi lebih lunak dan siap untuk proses pemotongan dengan mikrotom. Namun, waktu dekalsifikasi harus disesuaikan dengan ukuran dan jenis jaringan yang digunakan, karena setiap spesimen memiliki ketebalan dan kepadatan mineral yang berbeda-beda. Tulang yang lebih tebal atau lebih padat membutuhkan waktu lebih lama untuk mengalami dekalsifikasi sempurna dibandingkan dengan tulang yang lebih tipis atau kurang padat. Oleh karena itu, pemantauan berkala diperlukan untuk memastikan bahwa dekalsifikasi berlangsung dengan optimal tanpa menyebabkan kerusakan jaringan(Widiawati, Widi et al. 2025). Dalam penelitian saat ini, EDTA juga menunjukkan hasil yang hampir sama dengan 10% HNO₃ dengan sedikit perubahan pada arsitektur jaringan, alasan untuk perubahan ini bisa jadi adalah waktu yang lama yang diperlukan untuk penyelesaian dekalsifikasi. Oleh karena itu, lebih baik menggunakan agen dekalsifikasi yang menyeimbangkan waktu untuk dekalsifikasi dan integritas jaringan. Selain itu, telah ditemukan dalam penelitian yang dilakukan oleh Gupta (2014) bahwa hasil keseluruhan paling baik ditunjukkan oleh HNO₃, menunjukkan pengawetan jaringan dan kualitas pewarnaan yang lebih baik(Gupta 2014).

Safranin adalah pewarna kationik yang digunakan dalam histologi dan sitologi untuk membedakan dan mengidentifikasi berbagai jaringan dan sel. Pewarnaan safranin bekerja dengan mengikat proteoglikan asam pada jaringan

tulang iga dengan afinitas tinggi membentuk kompleks jingga kemerahan. Pengikatan membuat jaringan tulang iga tampak merah saat diamati di bawah mikroskop. Pewarnaan safranin membantu para peneliti mendeteksi tidak hanya jaringan tulang iga tetapi juga semua jaringan dan organ tubuh. Pewarnaan safranin adalah salah satu pewarnaan laboratorium yang paling menjanjikan yang digunakan untuk penelitian histopatologi dan sitologi(Choi et al. 2020).

Kesimpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,004 ($p < 0,05$) sehingga dinyatakan bahwa didapatkan perbedaan yang signifikan antara Asam Nitrat 5%, Asam nitrat 10% dan Asam nitrat 15% dan kualitas pewarnaan safranin O paling baik ditemukan pada konsentrasi asam nitrat 15%.

Daftar Pustaka

- Ariyadi, Tulus, and Hadi Suryono. 2017. "Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode Microwave Dan." *Jurnal Labora Medika Vol 1*(1): 7–11.
- Asfiya, Nida Azki, Dhiah Novalina, and Tri Dyah Astuti. 2024. "Potensi Dan Uji Stabilitas Ekstrak Lawsonia Inermis Sebagai Cat Penutup Pada Gram Staining Dengan Variasi Suhu Potency and Stability Test of Lawsonia Inermis Extract as Counterstain on Gram Staining with Temperature Variation." *Borneo Journal Of Medical Laboratory Technology* 6(2): 540–46. <http://journal.umpalangkaraya.ac.id/index.php/bjmlt>.
- Bergmann, Berglind, Johan Mölne, and Inger Gjertsson. 2015. "The Bone-Inflammation-Cartilage (BIC) Stain: A Novel Staining Method Combining Safranin O and Van Gieson's Stains." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 63(9): 737–40. doi:10.1369/0022155415591599.
- Bumalee, Dusit, Puangwan Laphanasupkul, Khumpee Songkampol, Natchalee Srimaneekarn, Nakarin Kitkumthorn, and Tawepong Arayapisit. 2023. "Qualitative Histological Evaluation of Various Decalcifying Agents on Human Dental Tissue." *European Journal of Dentistry* 17(3): 818–22. doi:10.1055/s-0042-1755615.
- Caron, Justin, and James R Markusen. 2023. *Panduan Prosesing Dan Pewarnaan Jaringan Dalam Histopatologi*.
- Choi, Beom-rak, Su-jin Kang, Jong-lae Kim, and Young-joon Lee. 2020. "Anti-Osteoarthritic Effects of a Mixture of Dried Pomegranate Concentrate Powder, Eucommiae Cortex, and Achyranthis Radix 5:4:1 (g/g) in a Surgically Induced Osteoarthritic Rabbit Model." 1.
- Gupta, Sonia. 2014. "Qualitative Histological Evaluation of Hard and Soft Tissue Components of Human Permanent Teeth Using Various Decalcifying Agents - A Comparative Study." *Journal of Clinical and Diagnostic Research*: 1–4. doi:10.7860/jcdr/2014/10195.4874.
- Hegde, Usha, Srinivasyaiah Archana, and Bhuvan Nagpal. 2016. "Decalcification of Biopsy Tissue." (July): 1–64.
- Jia, Min, Sixu Chen, Bo Zhang, Huaping Liang, Jianquan Feng, and Zhaowen Zong. 2013. "Effects of Constitutive β -Catenin Activation on Vertebral Bone Growth and Remodeling at Different Postnatal Stages in Mice." *PLoS ONE* 8(9). doi:10.1371/journal.pone.0074093.
- Krumschnabel, Gerhard, Andrea Eigentler, Mario Fasching, and Erich Gnaiger. 2014.

- 542 *Methods in Enzymology Use of Safranin for the Assessment of Mitochondrial Membrane Potential by High-Resolution Respirometry and Fluorometry*. 1st ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-416618-9.00009-1.
- Made Maharani Calistha Ghanaputri, I Gedde Eka Wiratnaya, I Ketut Suyasa, Anak Agung Gde Yuda Asmara. 2023. "Karakteristik Osteosarkoma Di Rumah Sakit Umum Pusat Prof. Dr. I.G.N.G. Ngoerah Denpasar." 12(10): 38–41.
- Rakhmawati, Handina, Adrian Situmeang, Nurhidayat Nurhidayat, Andri Maruli Tua Lubis, Harry Murti, and Arief Boediono. 2019. "Efektivitas Larutan Dekalsifikasi Pada Os Tibia Domba Garut (Ovis Aries) (The effectiveness of decalcifying solutions on the tibial of garut sheep (ovis aries))." *Jurnal Veteriner* 20(3): 403. doi:10.19087/jveteriner.2019.20.3.403.
- Rutgers, M., M. J.P. van Pelt, W. J.A. Dhert, L. B. Creemers, and D. B.F. Saris. 2010. "Evaluation of Histological Scoring Systems for Tissue-Engineered, Repaired and Osteoarthritic Cartilage." *Osteoarthritis and Cartilage* 18(1): 12–23. doi:10.1016/j.joca.2009.08.009.
- Sikarwar, S., R. Mathur, S. Joshi, P. Thanvi, and A. Dangi. 2018. "Histological Studies on the Capsule of Testes in Large White Yorkshire Pig (Sus Scrofa)." *Veterinary Practitioner* 19(2): 209–10. doi:10.22271/j.ento.6.1.257.1.
- Widiawati, Widi et al. 2025. "Pengaruh Waktu Dekalsifikasi Jaringan Tulang Menggunakan Larutan Asam Nitrat 5% Terhadap Tingkat Kelunakan Dan Kualitas Preparat." 2(1): 78–92.
- Zhou, Hong Su, Jing Li, Yi Huan Guan, Hua He, and Li Ren Huang Fu. 2024. "Experimental Study of Different Dehydration Methods in the Process of Preparing Frozen Brain Sections." *Ibrain* 10(2): 164–71. doi:10.1002/ibra.12075.