

Proses Fiksasi pada Pemeriksaan Histopatologik

Zulda Musyarifah, Salmiah Agus

Abstrak

Proses fiksasi adalah tahap pertama dalam pembuatan sediaan histopatologik. Banyak faktor yang mempengaruhi proses fiksasi sehingga dapat menghasilkan sediaan histopatologik yang baik. Tujuan penulisan ini adalah untuk mengetahui proses fiksasi agar menghasilkan sediaan yang baik pada pemeriksaan histopatologik. Tujuan utama fiksasi adalah untuk menjaga sel dan komponen jaringan pada keadaan "life-like state". Secara umum terdapat dua tipe fiksasi untuk spesimen biologi yaitu fiksasi fisik dan fiksasi kimia. Mekanisme yang penting dalam fiksasi kompleks protein yaitu denaturasi dan *cross-linking* atau gabungan keduanya. Banyak faktor yang mempengaruhi proses fiksasi antara lain konsentrasi ion hidrogen (pH netral), temperatur fiksasi (suhu kamar), kemampuan penetrasi (*penetration rate*) dan ketebalan pemotongan (3-4 mm), konsentrasi larutan, volume fiksasi (20:1) dan durasi fiksasi. Pemilihan larutan fiksatif yang digunakan tergantung kepada jenis pewarnaan dan jenis molekul yang ingin dilindungi. Saat ini larutan netral buffer formalin merupakan fiksatif yang paling baik dipakai untuk pemeriksaan histopatologik.

Kata kunci: fiksasi, histopatologik, netral buffer formalin

Abstract

Fixation is the first step in tissue processing for histopathology. Many factors can influence the fixation process to achieve a good result. The objective of this literature review was to understand the fixation process in order to produce a good preparation for histopathological examination. The main objective is to maintain the cellular structure and network components in a "life-like state". Generally, there are two types of fixation for biological specimens, namely physical and chemical fixation. An important mechanism in the fixation of a protein complex is denaturation and cross-linking or a combination of both. Factors affecting the fixation process include hydrogen ion concentration (pH neutral), fixation temperature (room temperature), penetration (penetration rate) and cutting thickness (3-4 mm), solution concentration, volume fixation (20:1) and the duration of fixation. The selection of the fixative solution used depends on the type of staining and the type of molecules to be protected. Currently, neutral buffered formalin solution is the most excellent fixative used for histopathological examination.

Keywords: fixation, histopathology, neutral buffered formalin

Affiliasi penulis: Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang/ RSUP Dr.M.Djamil Padang

Korespondens: Zulda Musyarifah, Email: zulda_lubis@yahoo.com Telp: (0751-21176)

PENDAHULUAN

Pemeriksaan histopatologik merupakan pemeriksaan rutin yang dilakukan untuk setiap jaringan yang dikirim ke laboratorium patologi anatomik. Pengolahan jaringan yang baik akan memberikan kualitas hasil sediaan yang memuaskan untuk dinilai oleh patologi. Kualitas sediaan hasil

pengolahan jaringan dipengaruhi oleh banyak faktor, terutama dari tahap-tahap pengolahan jaringan itu sendiri.^{1,2} Fiksasi adalah tahap awal dalam pengolahan jaringan yang merupakan proses yang krusial agar dapat membuat slide sediaan histopatologi yang layak untuk dibaca.

Isi

Proses pengolahan jaringan dimulai dari proses pengiriman status dan jaringan ke laboratorium patologi anatomik, pemotongan jaringan, fiksasi

jaringan, proses pembuatan blok parafin dan pewarnaan. Masalah dapat terjadi disebabkan oleh banyak hal antara lain pemotongan yang tidak tepat, fiksasi yang tidak sempurna, potongan yang terlalu tebal, pisau yang tidak tajam, pewarnaan yang tidak sempurna dan lainnya. Kebutuhan pemeriksaan imunohistokimia dalam proses mendiagnosis sediaan yang dikirim ke laboratorium patologi anatomik semakin rutin dilakukan. Kualitas sediaan blok parafin yang baik sangat menentukan hasil pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan.³

Fiksasi adalah langkah dasar di balik studi patologi dan sangat penting untuk mencegah autolisis dan degradasi jaringan serta komponen jaringan sehingga mereka dapat diamati baik secara anatomis dan mikroskopis.⁴ Sekitar awal 400 tahun sebelum masehi, Hippocrates telah mendiskusikan efek biologik merkuri dan alkohol sebagai cairan fiksatif, meskipun keingintahuan tentang struktur histologik dimulai sejak penemuan mikroskop cahaya.¹

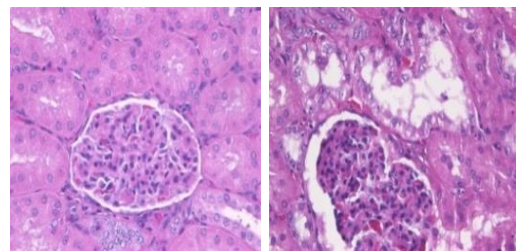
Proses fiksasi biasanya merupakan tahap pertama dalam pembuatan sediaan histopatologi. Fiksasi adalah berbagai perlakuan yang dapat melindungi struktur sel dan komposisi biokimianya.³ Tentu saja kualitas fiksasi adalah kunci untuk semua tahap selanjutnya yang penting dalam pembuatan sediaan histopatologik, oleh karena itu pengawetan sel dengan perubahan morfologi yang minimal dan secara kasat mata tanpa adanya kehilangan molekul sangat penting dalam pengolahan jaringan. Fiksasi diharapkan dapat melindungi spesimen biologi dari efek denaturasi dehidrasi dan semua proses pengolahan jaringan.³

Studi sistematis tentang fiksatif dimulai pada pertengahan abad 19. Fiksasi itu sendiri dapat menimbulkan artefak dalam sediaan agar tercipta efek protektif.^{1,2} Cairan fiksatif yang ada saat ini memiliki kelebihan dan kekurangan. Sejumlah cairan fiksatif yang ada, seperti formaldehid dapat mengurangi reaksi pengenalan antigen ketika dikombinasikan dengan pengolahan jaringan pada blok parafin. Saat ini telah diciptakan dan dipakai berbagai larutan fiksatif lainnya dalam waktu 10 tahun terakhir.⁵ Banyak faktor yang mempengaruhi proses fiksasi sehingga menghasilkan sediaan histopatologi yang baik.

Tujuan Fiksasi

Tujuan utama fiksasi adalah untuk menjaga sel dan komponen jaringan pada keadaan "*life-like state*". Selama proses fiksasi dan tahap-tahap yang menyertainya terdapat perubahan substansial pada komposisi dan penampakan sel serta komponen jaringan dan keadaan ini dapat mengubah keadaan dari "*life-like state*" yang ideal.⁶ Fiksasi yang baik akan menghasilkan kualitas sediaan yang baik untuk dinilai oleh patolog (Gambar 1).

Fiksasi bertujuan untuk mencegah atau menahan proses degeneratif yang dimulai segera setelah jaringan kehilangan pasokan darah. Proses autolisis akan menyebabkan jaringan dicerna dengan enzim intraseluler yang dilepaskan ketika membran organel pecah. Salah satu proses yang harus dicegah adalah bakteri pengurai atau pembusukan yang disebabkan oleh mikroorganisme yang mungkin sudah ada dalam spesimen. Kehilangan dan difusi zat terlarut harus dihindari sebisa mungkin dengan cara presipitasi atau koagulasi atau dengan melakukan *cross-linking* dengan komponen struktural tidak larut lainnya. Jaringan harus sebagian besar terlindungi dari efek buruk pengolahan jaringan termasuk infiltrasi dengan lilin panas, tapi yang paling penting, jaringan harus mempertahankan reaktivitas untuk pewarnaan dan reagen lainnya termasuk antibodi dan probe asam nukleat.⁵



Gambar 1. Perbedaan kualitas sediaan antara fiksasi yang baik(kiri) dan yang buruk (kanan).⁷

Teknik histopatologi adalah seni dan ilmu pengetahuan yang dilakukan oleh teknisi untuk membuat potongan jaringan dengan kualitas yang baik sehingga memungkinkan patologis untuk mendiagnosis ada atau tidaknya suatu kelainan.⁶ Fiksasi adalah faktor kunci pertama untuk memastikan kualitas sediaan histopatologi. Pemilihan cairan fiksatif

dan protokol fiksasi tergantung kepada tambahan tahap pengolahan jaringan dan analisis akhir yang direncanakan.⁴

Struktur jaringan ditentukan oleh bentuk dan ukuran makromolekul di dalam dan sekitar sel. Makromolekul utama dalam sel adalah protein dan asam nukleat. Sel dan komponen ekstraseluler mengandung peptida, protein, lipid dan fosfolipid (membran), karbohidrat kompleks dan berbagai jenis RNA, DNA dan sebagainya. Karbohidrat bersifat hidrofilik, mereka mengikat banyak air di ruang ekstraseluler dengan ikatan hidrogen. Terdapat banyak air di dalam sel, di mana jumlahnya sekitar 60% dari berat tubuh manusia.⁸ Pada tulang dan hidroksiapatit gigi, kristal mineral yang mengandung kalsium dan ion fosfat, mendominasi domain ekstraseluler bersama-sama dengan kolagen.⁹

Bagian yang penting dalam semua teknik histologi maupun sitologi adalah bagaimana menjaga sel dan jaringan seperti bentuknya yang biasa. Fiksatif dapat menstabilkan sel dan jaringan agar dapat melindungi dari kekakuan pada saat proses pengolahan dan teknik pewarnaan selanjutnya.²

Ada empat tujuan dari fiksasi jaringan yaitu:^{4,10}

1. Menghentikan autolisis jaringan dengan inaktivasi enzim hidrolisis dari lisosom dan dengan demikian dapat memberikan morfologi seluler yang lebih baik untuk dianalisis serta menstabilkan struktur baik di dalam maupun di antara sel dengan membuat molekul menjadi resisten terhadap disolusi air dan cairan lainnya.
2. Mengimobilisasi jaringan dan antigen seluler untuk *imunolabelling* dari antigen.
3. Persiapan yang lebih baik dalam pematangan sampel histopatologi dengan cara memadatkan dan mengeraskan jaringan.
4. Mencegah proses pembusukan yaitu proses penghancuran jaringan yang diakibatkan oleh aktifitas bakteri dan biasanya dengan pembentukan gas.

Jenis fiksasi

Secara umum terdapat dua tipe fiksasi untuk spesimen biologi yaitu fiksasi fisik dan fiksasi kimia.¹¹

Fiksasi secara fisik menggunakan temperatur yang sangat rendah (*cryo-fixation*) atau yang sangat tinggi (*boiling* dan *microwave*). Fiksasi panas jarang digunakan untuk spesimen jaringan, biasanya digunakan untuk pemeriksaan *smears* atau mikroorganisme, meskipun saat ini fiksasi *microwave* telah banyak digunakan pada pemeriksaan rutin di laboratorium. Berbeda dengan *cryo-fixation* yang digunakan pada pewarnaan histokimia tapi jarang digunakan untuk diagnostik jaringan.¹²

Fiksasi kimia biasanya dilakukan dengan merendam jaringan pada larutan fiksatif atau pada sebagian kecil organ seperti paru dengan memasukkan cairan fiksatif pada sistem vaskuler.¹² Fiksasi kimia menjalankan perannya dalam memproteksi sel dan jaringan dengan mendenaturasi protein menggunakan cara koagulasi (fiksasi non-aditif), *cross-linking* (membentuk senyawa aditif) atau dengan kombinasi keduanya.^{1,4,9} Fiksatif kimia adalah yang paling umum digunakan untuk sediaan yang dilihat menggunakan mikroskop.

Tabel 1. Rincian metode fiksasi pada fiksatif yang berbeda.⁴

Fiksatif	Metode fiksasi	Kandungan
B5	Denaturasi	5.4% Mercuri Chlorida (w/v), 1.1% Sodium Asetat (w/v), 4% Formaldehid (v/v), Water
Bouin's	Denaturasi, cross-linking	25% of 37% lautan formaldehid, 70% picric acid, 5% acetic acid
Carnoy's	Denaturasi	60% etanol, 30% chloroform, 10% Glacial acetic acid
Glutaraldehid	Cross-linking	2% v/v dari glutaraldehid dalam air/PBS
Methacam	Denaturasi	60% metanol, 30% chloroform, 10% Glacial acetic acid
Neutral buffered formalin (NBF)	Cross-linking	10% of 37% larutan formaldehid pada pH netral
Paraformaldehid	Cross-linking	4% w/v dari paraformaldehid dalam air/PBS
Zenker's	Denaturasi	5% Mercuri Chloride (w/v), 2.5% Potassium Dichromate (w/v), 5% Glacial acetic acid (v/v), Air

Mekanisme fiksasi

Secara garis besar terdapat dua mekanisme yang penting dalam fiksasi kompleks protein yaitu denaturasi dan *cross-linking* atau gabungan keduanya.¹¹

1. Denaturasi

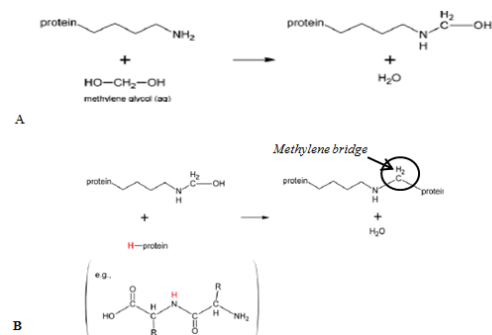
Efek denaturasi paling umum disebabkan oleh dehidran seperti alkohol dan aseton contohnya adalah larutan Carnoy's dan Methacam.⁴ Reagen ini mengubah komposisi jaringan dan menstabilkan jaringan dengan menghilangkan ikatan H⁺ pada kelompok tertentu dalam molekul protein seperti ikatan carboxyl bebas, hydroxyl, amino, amido dan imino dari protein yang menyebabkan perubahan pada struktur tersier protein dengan mendestabilisasi ikatan hidropobik. Hal ini akan menyebabkan perubahan pada solubilitas protein dimana protein yang larut dalam air menjadi tidak larut, koagulasi protein dan penyusutan sel.^{4,10} Larutan fiksatif Carnoy's menambahkan chloroform dan acetic acid ke dalam campuran yang dapat melawan efek penyusutan sel oleh etanol dan mengakibatkan terfiksasinya jaringan melalui ikatan hidrogen sedangkan pada larutan Methacam, dimana etanol digantikan oleh metanol yang bekerja dengan cara yang sama.⁴

2. Cross-linking

Larutan fiksatif ini secara kimiawi bereaksi dengan protein serta komponen sel dan jaringan dimana suatu ikatan kimia larutan fiksatif diambil dan menjadi bagian dari jaringan dengan cara mengisi dan membentuk *cross-link* inter-molekul atau intra-molekul.^{4,9,10} Zat fiksatif ini adalah senyawa reaktif yang dapat mengikat berbagai komponen kimia di jaringan sehingga sering mempengaruhi komponen pada tempat ia berikatan (Gambar 2).¹⁰ Hal ini mempunyai efek pada karakteristik pewarnaan berikutnya dari partikel protein sehingga mengganggu konformasi molekul dan kelarutannya. Reaksi utama dari cross-link terjadi antara bagian kelompok amino dari lysine yang akan membentuk *methylene bridges* (gambar 2).^{9,13}

Hasil dari ikatan *cross-linking* ini adalah perubahan konformasi pada struktur protein dan selanjutnya inaktivasi dari enzim.⁹ Kompleks yang

baru terbentuk berbeda dari protein yang tidak terdenaturasi pada profil antigenik dan kimia. Menurut definisi, fiksatif mengubah komposisi kimia yang asli dari jaringan yang terlibat serta menyebabkan perubahan fisik pada komponen seluler dan ekstraseluler. Sel yang *viable* dilapisi oleh membran yang impermeabel. Fiksasi merusak barrier ini dan memungkinkan molekul yang besar untuk melakukan penetrasi atau melepaskan diri, selanjutnya sitoplasma menjadi permeabel untuk makromolekul dan membentuk jaringan protein yang cukup berpori untuk memungkinkan penetrasi molekul besar lebih lanjut.^{2,9}



Gambar 2. Reaksi utama dari cross-link pada formaldehid. A: grup aldehyd dapat bereaksi dengan nitrogen dan beberapa atom protein, penambahan formaldehid (methylene glycol) pada bagian rantai lysine. B: Bentuk dari *methylene bridge* yang berdekatan dengan atom nitrogen.⁹

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses fiksasi

1. Konsentrasi ion hidrogen (pH)

Fiksasi sebaiknya dilakukan dengan pH netral, sekitar 6-8. Hipoksia pada jaringan dapat menurunkan pH, sehingga harus ada fungsi buffering pada cairan fiksatif untuk mencegah keasaman yang berlebihan. Keasaman dapat mempengaruhi pembentukan pigmen formalin-heme yang muncul sebagai warna hitam yang dideposit dalam jaringan.¹⁴ Buffer yang umum digunakan meliputi fosfat, bikarbonat, cacodylate dan veronal. Formalin yang biasa digunakan menggunakan buffer dengan fosfat pada pH 7. Fiksatif yang hipertonik akan menyebabkan sel menjadi menyusut sedangkan fiksatif hipotonik akan mengakibatkan pembengkakan sel.^{11,14}

2. Temperatur fiksasi

Peningkatan suhu pada semua reaksi kimia, akan meningkatkan kecepatan fiksasi dan akan meningkatkan dilusi dari agen fiksatif ke dalam jaringan. Formalin dengan suhu tinggi akan memperbaiki jaringan yang lebih cepat dan ini sering sebagai langkah pertama pada proses jaringan otomatis. Namun, tetap dibutuhkan perhatian untuk menghindari spesimen terlalu 'masak'. Fiksasi untuk mikroskop cahaya secara rutin dilakukan pada suhu kamar dan ini harus dilanjutkan dengan fiksasi selanjutnya pada suhu sampai 45°C selama pengolahan jaringan.^{10,14}

3. Kemampuan penetrasi (*penetration rate*) dan ketebalan pematangan

Penetrasi jaringan tergantung pada kemampuan berdifusi dan berat molekul dari setiap cairan fiksatif, dimana formalin dan alkohol mempunyai kemampuan penetrasi terbaik dan glutaraldehid yang terburuk. Merkuri dan yang lainnya berada di antara keduanya. Salah satu cara untuk mengatasi masalah ini dengan pematangan jaringan tipis (2 sampai 3 mm). Penetrasi pada potongan tipis akan terjadi lebih cepat daripada bagian tebal.¹⁴ Seperti yang didefinisikan oleh Medawar bahwa $d = K\sqrt{t}$, dimana d adalah dalamnya penetrasi, K adalah koefisien difusi (spesifik pada tiap agen fiksatif) dan t adalah waktu.¹⁵ Secara praktis, ini berarti bahwa koefisien difusi (K) adalah jarak dalam milimeter dimana agen fiksatif telah berdifusi ke jaringan dalam waktu satu jam, contohnya formalin 10% mempunyai $K=0,78$, ini berarti bahwa formalin tidak dapat diharapkan untuk melakukan penetrasi lebih dari 1 mm dalam satu jam.¹⁰ Ketebalan sebuah spesimen tidak boleh lebih dari 4 mm. Idealnya spesimen dengan tebal 3 mm dapat menghasilkan fiksasi dan pengolahan jaringan yang baik.¹³

4. Konsentrasi larutan

Konsentrasi larutan fiksatif harus disesuaikan sampai ke tingkat serendah mungkin, karena dapat menghemat dalam pembuatan cairan fiksatif tersebut. Formalin adalah yang terbaik di 10 %, glutaraldehid umumnya 0,25% - 4% dan etanol pada konsentrasi 70%.⁹ Konsentrasi terlalu tinggi dapat mempengaruhi jaringan dan menghasilkan artefak serupa dengan panas yang berlebihan.¹⁰

5. Volume fiksasi

Rasio yang tinggi antara larutan fiksatif dengan jaringan akan memastikan proses fiksasi yang baik. Rasio optimal volume larutan fiksasi dengan jaringan adalah 20:1. Dalam praktek sehari-hari masih didapatkan rasio yang lebih rendah dari ini. Dalam hal ini, yang terbaik adalah untuk mengganti cairan fiksatif secara periodik beberapa kali selama proses fiksasi.¹⁴

6. Durasi fiksasi

Fiksasi dilakukan secepatnya setelah jaringan di eksisi. Waktu fiksasi optimal tergantung pada beberapa faktor dan bervariasi tergantung dengan jenis agen fiksatif yang digunakan, contohnya: ketebalan spesimen jaringan dan sebagian besar fitur yang disebutkan di atas dari proses fiksasi (suhu, kapasitas buffering, penetrasi zat fiksatif, rasio volume).¹⁴ Fiksasi berkepanjangan dapat menyebabkan hilangnya reaktivitas antigen, penyusutan dan pengerasan spesimen.¹⁶

Adapun karakteristik cairan fiksatif yang baik adalah murah dan mudah didapat, stabil, aman, mempunyai daya penetrasi yang kuat, dapat memfiksasi secara keseluruhan, menghambat dekomposisi bakteri dan autolisis, memproduksi kerutan yang minimal pada jaringan dan bekerja cepat dalam melakukan penetrasi jaringan.¹² Formaldehid menjadi fiksatif yang paling mendekati ciri-ciri tersebut walaupun sampai saat ini belum ada larutan fiksatif yang sempurna.¹³

Zat Fiksatif

Berdasarkan komposisi dan cara kerjanya, fiksatif dibagi menjadi :

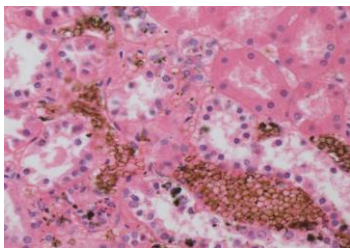
1. Aldehid

a. Formaldehid

Formaldehid (CH₂O) adalah satu-satunya aldehid gas dan mengandung polimer larut yang akan mengalami depolimerisasi pada saat diencerkan. Formaldehid yang dilarutkan dalam air hingga mencapai saturasi pada 37% - 40% w/v umumnya disebut sebagai "formalin" atau "larutan formaldehid pekat". Untuk fiksasi, satu bagian formalin biasanya diencerkan dengan sembilan bagian air atau buffer. Ini menghasilkan larutan formalin 10% yang mengandung sekitar 4% formaldehid w/v, sebuah konsentrasi optimal untuk fiksasi. Formalin juga mengandung

sekitar 10 % metanol, yang ditambahkan oleh produsen untuk menghambat pembentukan polimer yang lebih tinggi. Paraformaldehid, merupakan bentuk dengan polimer yang lebih tinggi dapat disimpan sebagai endapan putih dalam solusi formaldehid pekat.⁷

Agen fiksatif yang paling sering digunakan untuk histopatologi adalah formalin 10%.² Larutan formalin tanpa buffer secara perlahan akan mengalami oksidasi menjadi asam formik sehingga akan menurunkan pH larutan.¹⁷ Kondisi ini menyebabkan asam formik akan bereaksi dengan *hemoglobin forming acid formaldehyde hematin*, sebuah artefak pigmen granular berwarna coklat-kehitaman yang dideposit pada jaringan yang mengandung banyak darah (Gambar 3).⁷



Gambar 3. Pigmen formalin

Pigmen ini dapat meragukan dengan mikroorganisme atau pigmen patologis lainnya. Pigmen ini dapat dihilangkan dengan *saturated aqueous picric acid* sebelum pewarnaan, tapi sebaiknya hal tersebut dihindari dari awal. Pencegahan hal tersebut dan karena formaldehid bereaksi paling efektif pada pH netral, penambahan buffer diperlukan untuk menjaga agar pH mendekati netral (6,8 – 7,2) dan tekanan osmotik hampir sama dengan cairan ekstraseluler atau yang lebih dikenal dengan *neutral buffer formalin* (NBF).^{2,7} Saat ini berbagai merk larutan *neutral buffered formalin* telah dikemas dan siap digunakan dengan harga terjangkau

b. Glutaraldehid

Glutaraldehid atau dialdehid glutarat ($\text{CHO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$) dianggap sebagai aldehid bifungsional, memiliki kelompok aldehid di kedua ujung molekul yang memiliki potensi untuk bereaksi dengan kelompok kimia yang sama seperti formaldehid. Fiksasi jaringan menggunakan

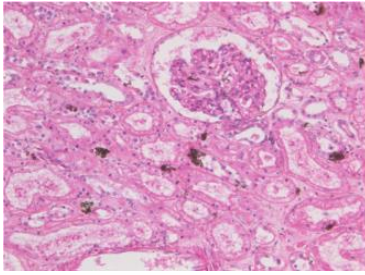
glutaraldehid akan lebih ekstensif melakukan *cross-linked* daripada formalin sehingga menyebabkan efek yang kurang baik pada pewarnaan imunohistokimia tapi ia dapat memfiksasi sangat cepat serta memberi detail terbaik pada sitoplasma dan inti dan menjaga ultrastruktural dengan sangat baik sehingga digunakan sebagai fiksatif utama untuk mikroskop elektron (gambar 5).^{7,14} Glutaraldehid sangat buruk dalam penetrasi dan direkomendasikan pada jaringan dengan ketebalan pemotongan < 1 mm.⁷ Glutaraldehid secara perlahan akan terurai membentuk asam glutarik dan akan berpolimerisasi menjadi bentuk cyclic dan oligomerik. Glutaraldehid biasanya ditambahkan buffer yang sesuai pada pH 7,2 – 7,4 (biasanya cacodylate, phosphate atau maleate) menghasilkan konsentrasi larutan glutaraldehid 3%.¹⁴



Gambar 4. Spesimen yang difiksasi dengan glutaraldehid. Sebuah mikroskop elektron menunjukkan incisura *Schmidt-Lanterman* pada serabut saraf bermielin.⁷

2. Merkuri Chlorida

Merkuri Chlorida (HgCl_2) adalah salah satu reagen yang digunakan pertama kali untuk fiksasi jaringan. Mekanisme fiksasi belum sepenuhnya dipahami, merkuri chlorida bereaksi dengan amina, amida, asam amino dan kelompok sulphydryl. Selama fiksasi menggunakan larutan yang mengandung merkuri dapat terbentuk pigmen merkuri yaitu artefak amorf berwarna coklat-kehijauan yang secara acak dideposit di jaringan (gambar 5).^{7,9} Pigmen tersebut dapat dihilangkan menggunakan iodine dan larutan sodium thiosulfat sebelum pewarnaan. Contoh larutan yang mengandung merkuri chlorida adalah larutan B-5 dan Zenker's. Ada beberapa kelemahan menggunakan larutan fiksatif yang mengandung merkuri yaitu harganya yang lebih mahal dibandingkan larutan fiksatif lainnya, sangat korosif, sangat toksik, diabsorpsi kulit dan berakumulasi menjadi racun.^{9,10}



Gambar 5. Pigmen merkuri.¹²

3. Zinc Salt

Zinc sulphate ($ZnSO_4$) dan zinc chloride ($ZnCl_2$) telah digunakan sebagai pengganti untuk merkuri chlorida. Garam ditambahkan ke larutan formalin 10% dengan konsentrasi sekitar 1%, tapi terdapat beberapa masalah yang dilaporkan terkait dengan presipitasi dari zinc atau garam buffer selama persiapan. Zinc salts akan bereaksi dengan grup akhir dari jaringan meliputi amino, carboxyl dan sulphhydryl, membentuk produk reaksi reversibel yang dapat dihilangkan dengan sitrat atau EDTA. Zinc dikatakan dapat meningkatkan fiksasi dan pewarnaan, khususnya inti sel dengan cara yang mirip dengan merkuri klorida. Zinc diklaim memiliki keunggulan dalam menjaga immuno-reaktivitas bila dibandingkan dengan formalin saja dalam menghindari kebutuhan untuk pengambilan antigen pada beberapa epitop.⁷

4. Acrolein

Acrolein atau acrylic aldehyd ($H_2C=CH.CHO$) bereaksi dengan molekul makro seperti formaldehid melakukan cross-links yang reversibel. Acrolein bereaksi dengan asam lemak melalui ikatan ganda. Penetrasi acrolein ke jaringan secara cepat, tapi jarang dipakai sebagai larutan fiksatif karena tidak nyaman digunakan, pH alkaline yang tidak stabil dan siap membentuk polimer. Acrolein biasanya digunakan untuk enzim histokimia dan untuk fiksasi tanaman.⁷

5. Glyoxal

Glyoxal atau diformyl ($CHO.CHO$) merupakan dialdehid sederhana dimana kedua rantainya dapat membentuk *cross-links*.^{7,9} Glyoxal bereaksi hampir sama dengan formaldehid menghasilkan gambaran morfologi yang sama. Glyoxal dianggap sebagai

pengganti formalin karena dianggap kurang toksik dibandingkan formaldehid.⁷

Larutan ini harus ditambahkan buffer sampai pH sekitar 4 agar stabil dan mengandung sedikit metanol yang dapat mengkatalisis reaksi glyoxal dengan protein. Fiksasi adekuat dengan glyoxal adekuat pada spesimen kecil dapat dicapai dalam satu jam. Saat ini belum ada bukti yang sudah dipublikasikan mengenai keefektifan larutan fiksatif campuran dengan menggunakan glyoxal sebagai bahan utama.⁹

Larutan glyoxal yang paten biasanya digunakan untuk histologi secara umum dan imunohistokimia. Ada beberapa perbedaan glyoxal dengan formaldehid (NBF) yaitu glyoxal dapat menekan pewarnaan pada jaringan dengan protein arginin yang banyak, hanya sedikit menguap pada suhu kamar karena mempunyai tekanan uap yang sangat rendah pada suhu kamar dan *biodegradable* sehingga lebih mudah terurai dibandingkan formalin.^{7,9}

6. Oxidizing Agent

Oxidizing agents meliputi larutan fiksatif permanganate (potassium permanganate), dichromate (potassium dichromate) dan osmium tetroxide. Mereka merupakan fiksatif *cross-links* tapi menyebabkan denaturasi yang ekstensif.¹⁴

7. Picric Acid

Picric acid atau trinitro phenol ($C_6H_2(NO_2)_3OH$) adalah kristalin berwarna kuning cerah yang harus disimpan basah dengan air untuk menghindari risiko meledak oleh panas dari material yang kering.⁷

Picric acid sebagai larutan fiksasi yang selalu digunakan secara kombinasi dengan agen fiksatif lainnya (contohnya larutan Bouin's dan Hollande's). Picric acid adalah fiksatif koagulan yang mengubah muatan pada rantai protein yang berion dan mengganggu elektrostatis dan ikatan hidrogen. Hal tersebut akan membentuk garam (picrates) dengan grup utama dari protein yang mengakibatkan koagulasi. Picric acid tidak digunakan untuk lipid atau karbohidrat tapi direkomendasikan sebagai komponen fiksatif untuk mempertahankan glikogen.⁷

8. Alkohol

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dan metanol (CH_3OH) adalah fiksatif koagulan yang mendenaturasi protein. Mereka mengganti ikatan air pada jaringan sehingga mengganggu ikatan hidropobik dan hidrogen kemudian mengekspos bagian hidropobik internal dari protein dan mengganggu struktur tersiernya dan solubilitasnya di air.^{7,9}

Metanol berinteraksi lebih kuat pada area hidropobik daripada etanol. Fiksasi dimulai dari konsentrasi 50-60% untuk etanol dan >80% untuk metanol.⁷ Keduanya tidak digunakan secara rutin untuk jaringan karena mereka menyebabkan jaringan menjadi terlalu rapuh dan keras.¹⁴ Etanol kadang-kadang digunakan untuk menjaga glikogen tapi akan menyebabkan kerusakan pada detail inti dan sitoplasma. Metanol biasanya digunakan untuk fiksasi *blood film* dan kultur sel sedangkan etanol 95% digunakan sebagai fiksatif untuk apusan sitologi tetapi biasanya dikombinasikan dengan reagen lain ketika digunakan sebagai fiksatif untuk spesimen jaringan (contoh : larutan Carnoy dan Methacarn).^{9,10,14}

9. Aseton

Aseton (CH_3COCH_3) memiliki kerja yang sama dengan alkohol dan telah digunakan sebagai fiksatif dan dehidran pada pengolahan jaringan, terutama

pengolahan cepat manual dari spesimen yang kecil. Aseton direkomendasikan sebagai fiksasi untuk histokimia dengan suhu yang rendah (4°C). Karena sangat mudah menguap dan mudah terbakar umumnya tidak digunakan pada pengolahan jaringan otomatis.⁷

10. Asam asetat

Asam asetat (CH_3COOH) adalah koagulan yang bereaksi dengan asam nukleat tetapi umumnya tidak memfiksasi protein. Umumnya aseton tergabung dalam larutan fiksatif lainnya untuk membantu mencegah hilangnya asam nukleat dan karena dapat membuat kolagen membengkak, asam asetat digunakan untuk mengurangi penyusutan yang disebabkan oleh bahan-bahan lain seperti etanol. Asam asetat penetrasinya sangat cepat tapi fiksatif ini dapat melisis eritrosit.⁷

Berbagai formulasi telah dibuat untuk berbagai larutan fiksatif dan telah ditulis pada buku acuan standar histokimia. Formulasi ini memiliki variasi yang berbeda antara buku yang satu dengan yang lainnya, tapi variasi ini tidak menyebabkan masalah dalam pemakaiannya. Berbagai formulasi larutan fiksatif dapat dilihat pada Tabel 2.¹¹

Tabel 2. Formulasi larutan fiksatif

Larutan fiksatif	Komposisi	Waktu fiksasi	Rekomendasi penggunaan
Phosphate buffered formalin	<ul style="list-style-type: none"> • 40% formaldehyde: 100 ml • Distilled water: 900 ml • Sodium dihydrogen phosphate monohydrate: 4 g • Disodium hydrogen phosphate anhydrous 6.5 g • pH of 6.8 	12-24 jam	Paling banyak digunakan untuk pemeriksaan rutin histopatologi.
Formal calcium	<ul style="list-style-type: none"> • 40% formaldehyde: 100 ml • Calcium chloride: 10 g • Distilled water: 900 ml 	12-24 jam	Untuk mempertahankan lipid terutama fosfolipid
Formal Saline	<ul style="list-style-type: none"> • 40% formaldehyde: 100 ml • Sodium chloride: 9 g • Distilled water: 900 ml 	12-24 jam	Campuran formaldehid di dalam isotonic saline, biasa digunakan pada pemeriksaan histopatologi rutin dan membentuk pigmen formalin
Zinc formalin (tanpa buffer)	<ul style="list-style-type: none"> • Zinc sulphate: 1 g • Deionised water: 900 m • Aduk sampai larut kemudian tambahkan 40 % formaldehid : 100 ml 	4-8 jam	Dirancang sebagai alternatif larutan merkuri klorida. Larutan ini dikatakan memberikan hasil yang lebih baik dengan imunohistokimia

Larutan fiksatif	Komposisi	Waktu fiksasi	Rekomendasi penggunaan
Larutan Zenker's	<ul style="list-style-type: none"> • Distilled water: 950 ml • Mercuric chloride: 50 g • Potassium dichromate: 25 g • Glacial acetic acid: 50 ml 	4-24 jam	Baik dalam pengawetan inti sel tapi melisis sel darah merah karena adanya acetic acid. Direkomendasikan untuk spesimen padat dan memberikan hasil yang baik dengan pewarnaan Ptah dan trichrome
Methacam	<ul style="list-style-type: none"> • Methanol absolute: 60 ml • Chloroform: 30 ml • Acetic acid glacial: 10 ml 	1-4 jam	Sifat yang mirip dengan Carnoy tetapi kurang menyebabkan pengerasan dan penyusutan jaringan
Larutan Carnoy	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol absolute: 60 ml • Chloroform: 30 ml • Acetic acid glacial: 10 ml 	1-4 jam	Bereaksi cepat, mempertahankan inti sel dengan baik dan menahan glikogen. Melisis eritrosit dan melarutkan lipid. Menghasilkan pengerasan berlebihan dan penyusutan
Larutan Carnoy	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol absolute: 60 ml • Chloroform: 30 ml • Acetic acid glacial: 10 ml 	1-4 jam	Bereaksi cepat, mempertahankan inti sel dengan baik dan menahan glikogen. Melisis eritrosit dan melarutkan lipid. Menghasilkan pengerasan berlebihan dan penyusutan
Larutan Bouin's	<ul style="list-style-type: none"> • Picric acid saturated aqueous solution. (2.1%): 750 ml • 40% formaldehyde: 250 ml • Acetic acid glacial: 50 ml 	4-8 jam	Memberikan hasil yang sangat baik untuk jaringan yang akan diwarnai dengan trichrome. Mempertahankan glikogen tapi biasanya melisis eritrosit. Kadang-kadang dianjurkan untuk biopsi saluran gastro intestinal, embrio hewan dan kelenjar endokrin
Larutan Hollande's	<ul style="list-style-type: none"> • Copper acetate: 25 g • Picric acid: 40 g • 40% formaldehyde: 100 ml • Acetic acid: 15 ml • Distilled water: 1000 ml • Larutkan bahan dalam <i>distilled water</i> tanpa panas 	4-8 jam	Direkomendasikan untuk spesimen saluran gastro-intestinal dan fiksasi jaringan endokrin. Menghasilkan lisis yang lebih sedikit dari Bouin. Memiliki beberapa sifat dekalsifikasi. Fiksatif harus dicuci dari jaringan jika akan dimasukkan ke dalam fosfat buffered formalin pada mesin pengolahan karena akan membentuk endapan fosfat yang tidak larut
Larutan B5	<ul style="list-style-type: none"> • Stok Larutan: • Mercuric chlorida: 12 g • Sodium acetate anhydrous: 2,5g • Distilled water ; 200 ml • Larutan yang disiapkan segera sebelum digunakan: • B-5 larutan stok : 20ml • 40% formaldehid ; 2 ml 	4-8 jam	untuk fiksasi jaringan hematopoietik dan limfoid . Ini menghasilkan detil inti yang sangat baik, dan direkomendasikan untuk imunohistokimia
Larutan Clarke's	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol (absolute): 75 ml • Acetic acid glacial: 25 ml 	3-4 jam	Digunakan untuk frozen section dan smear. Mempertahankan asam nukleat tetapi mengekstrak lipid. Jaringan dapat ditransfer langsung ke etanol 95%

Larutan fiksatif	Komposisi	Waktu fiksasi	Rekomendasi penggunaan
Alcoholic formalin	<ul style="list-style-type: none"> • 40% Formaldehyde: 100 ml • 95% Ethanol: 900 ml • 0.5 g calcium acetate can be added to ensure neutrality 	12 - 24 jam	Kombinasi fiksatif denaturasi dengan aditif dan. Kadang-kadang digunakan selama pengolahan jaringan untuk menyempurnakan fiksasi. Dapat digunakan sebagai fiksatif atau post fiksatif untuk spesimen besar yang berlemak (contohnya mammae) karena akan memudahkan KGB untuk dideteksi
Formol acetic alcohol	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol absolute: 85 ml • 40% formaldehyde: 1 – 6 hours 10 ml • Acetic acid glacial: 5 ml 	1-6 jam	Kadang-kadang digunakan untuk diagnostik potongan cryostat. Jika digunakan sebagai fiksatif uataadapat dipindahkan langsung ke etanol 95% untuk pengolahan jaringan
Helly's fixative	<ul style="list-style-type: none"> • Distilled water: 1000 ml • Potassium dichromate: 25 g • Sodium sulphate: 10 g • Mercuric chloride: 50 g <p>Ditambah 40% formaldehyde: 50 ml sebelum digunakan</p>	4 – 24 jam	Bagus untuk sumsum tulang, hematopoiesis ekstramedular dan diskus interkalaris otot jantung. Menghasilkan pigmen merkuri yang harus dihapus sebelum pewarnaan. Dapat menghasilkan pigmen krom jika jaringan tidak dicuci dalam air sebelum pengolahan, setelah dicuci, jaringan harus disimpan dalam etanol 70 %. Karena pH rendah pigmen formalin dapat terbentuk

SIMPULAN

Banyak faktor yang mempengaruhi proses fiksasi antara lain konsentrasi ion hidrogen (pH netral), temperatur fiksasi (suhu kamar), kemampuan penetrasi (*penetration rate*) dan ketebalan pemotongan (3-4 mm), konsentrasi larutan, volume fiksasi (20:1) dan durasi fiksasi. Pemilihan larutan fiksatif yang digunakan tergantung kepada jenis pewarnaan dan jenis molekul yang ingin dilindungi. Saat ini larutan netral buffer formalin merupakan fiksatif yang paling baik dipakai untuk pemeriksaan histopatologik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1961–71.
2. Holliday JM. Guide to special stains. Wulff S, editor. California, USA: DakoCytomation; 2004.hlm.17-21.
3. Ganjali H. Tissue processing: An overview. *Ann Biol Res.* 2012;3(11):5374–8.
4. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods.* Elsevier Inc. 2014;70(1):12–9.
5. Eltoun I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J Histotechnol.* Taylor & Francis; 2001 Sep 18;24(3):173–90.
6. Bindhu P, Krishnapillai R, Thomas P, Jayanthi P. Facts in artifacts. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2013 Sep;17(3):397–401.
7. Rolls G. Process of fixation and the nature of fixatives [serial online] 2017 (diunduh 23 Juli 2018). Tersedia dari: <https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-1-the-process-of-fixation-and-the-nature-of-fixatives/>
8. Khonsary S. Guyton and Hall: Textbook of Medical physiology. Vol. 8, Surgical Neurology International. Philadelphia: WB Saunders; 2017. hlm. 275.
9. Nowacek J. Special stains and H & E. Edisi ke-2 Kumar G, editor. California, USA: DakoCytomation; 2010. hlm 141-152.
10. Woods AE, Ellis RC. Laboratory histopathology : a complete reference. Newyork: Churchill Livingstone; 1994. hlm 1-29.
11. Gamble M, Bancroft JD. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 6th Edisi ke-6. Philadelphia: Churcill Livingstone; 2013. hlm 536.
12. Rolls G, Farmer Veville J HJB. Artifacts in histological and cytological preparations. *Scientia Leica;* 1994;21–6.

13. Grizzle WE. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem.* 2009; 84(5):185–93.
14. Ganjali H, Ganjali M. Fixation in tissue processing. *Int J Farming Allied Sci.* 2013;2(18):686–9.
15. Medawar; P B. The rate of penetration of fixatives. *Comp Anat.* 1947; 61(7):46–57.
16. Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E, Mani A, Farnaz H. Minimum Formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2. 2003;120:86–92.
17. Rastogi V, Puri N, Arora S, Kaur G, Yadav L, Sharma R. Artefacts: a diagnostic dilemma - a review. *J Clin Diagn Res.* 2013; 7(10):2408–13.