

Larutan Fiksatif Makromolekul pada Sediaan Histologis

Macromolecular Fixative Solution in Histological Preparations

Hayu Swari Allimi¹, Ria Vinola Septhya Sari¹, Tia Apriliyani¹, Ardaning Nuriliani^{1*},
Bambang Retnoaji¹, Hendry Saragih¹, Zuliyati Rohmah¹

¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Selatan, Sinduadi, Mlati, Sleman
Yogyakarta, 55281, Indonesia.

*Corresponding Author: ardaning@ugm.ac.id

Abstrak: Salah satu proses penting dalam pembuatan preparat histologis adalah fiksasi. Fiksasi bertujuan untuk menjaga agar sel, jaringan, dan komponennya tidak berubah sehingga struktur dapat dipertahankan seperti saat sel masih hidup serta mencegah autolisis. Kajian pustaka ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan larutan fiksatif yang sesuai untuk beberapa makromolekul seperti protein, lipid, karbohidrat, dan asam nukleat. Data kajian pustaka berupa data sekunder yang diperoleh dari buku, jurnal, ataupun artikel yang berkaitan dengan larutan fiksatif tanpa batasan tahun penerbitan. Basis data bersumber dari Google Scholar, PubMed, NCBI, Science Direct, Springerlink, Research Gate, dan Nature. Kata kunci untuk pencarian buku yaitu *tissue processing, pathology, dan histology*. Kata kunci untuk pencarian jurnal atau artikel yaitu *proteins fixation, formaldehyde fixation lipid, fixative for nucleic acid, glyo-fixx fixative, mercury chloride fixative lipid, formalin fixed carbohydrate, dan ethanol or methanol for fixative lipid*. Berdasarkan kajian pustaka yang dilakukan, diketahui bahwa larutan fiksatif yang disarankan untuk protein yaitu glyo-fixx dan HOPE, fiksatif lipid adalah osmium tetroksida dan Champy's *fluid*, fiksatif karbohidrat adalah etanol 80%, larutan Bouin, dan Gendre's *fluid*, fiksatif asam nukleat adalah larutan EDTA, fiksatif carnoy, methacarn, dan Bouin. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa setiap makromolekul memiliki sifat yang berbeda, sehingga pemilihan larutan fiksatif berdasarkan pada makromolekul yang akan diamati.

Kata kunci: asam nukleat, fiksatif, karbohidrat, lipid, protein.

Abstract: One of the important processes in histological preparations is fixation. Fixation aims to keep cells, tissues, and their components unchanged so that the structure can be maintained as when the cell is alive and prevent autolysis. This literature review aims to determine the use of fixative solutions that are suitable for several macromolecules such as proteins, lipids, carbohydrates, and nucleic acids. Literature review data in the form of secondary data obtained from books, journals, or articles related to fixative solutions without limitation of publication year. The database was sourced from Google Scholar, PubMed, NCBI, Science Direct, Springerlink, Research Gate, and Nature. The keywords for searching books are tissue processing, pathology, and histology. Keywords for journal or article searches are protein fixation, formaldehyde fixation lipid, fixative for nucleic acid, glyo-fixx fixative, mercury chloride fixative lipid, formalin fixed carbohydrate, and ethanol or methanol for fixative lipid. Based on the literature review, it is known that the recommended fixatives for protein are glyo-fixx and HOPE, fixatives for lipid are osmium tetroxide and Champy's fluid, fixatives for carbohydrate are 80% ethanol, Bouin solution and Gendre's fluid, fixatives for nucleic acid are EDTA solution, carnoy, methacarn and Bouin fixatives. It can be concluded that each macromolecule has different properties, thus the selection of fixative solution should meet the properties of the macromolecule to be observed.

Keywords: nucleic acid, fixatives, proteins, lipids, carbohydrates.

Pendahuluan

Fiksasi adalah upaya untuk mencegah terjadinya autolisis atau degradasi komponen jaringan dengan cara menghentikan aktivitas enzim lisosom sehingga dapat mempertahankan kondisi jaringan seperti pada saat masih hidup. Fiksasi bersifat toksik terhadap enzim sehingga mampu menghentikan reaksi enzimatik dan aktivitas metabolisme (Cook, 2000). Fiksatif yang ideal dapat mengeraskan komponen jaringan, mempertahankan morfologi sel, tidak mendenaturasi protein yang penting untuk analisis histopatologis, dan melindungi jaringan dari kerusakan ekstrinsik akibat mikroorganisme yang mungkin mengkontaminasi jaringan (Thavarajah *et al.*, 2012).

Fiksasi merupakan langkah kunci dalam prosedur pembuatan preparat histologis. Pemilihan fiksatif dilakukan berdasarkan komponen jaringan apa yang akan diamati karena setiap fiksatif memiliki mekanisme pengawetan yang berbeda terhadap komponen jaringan. Secara umum, terdapat 4 kelompok fiksatif yang digunakan dalam pembuatan preparat histologis, yaitu aldehid, agen oksidasi, fiksatif berbahan dasar alkohol, dan fiksatif metalik. Aldehid dan agen oksidasi memfiksasi jaringan dengan cara pengikatan silang protein (*cross-linking proteins*). Fiksatif berbahan dasar alkohol merupakan agen pendenaturasi protein dan fiksatif metalik bekerja dengan cara membentuk endapan logam yang tidak larut seperti merkuri klorida dan asam pikrat (Thavarajah *et al.*, 2012). Fiksatif berbahan alkohol dapat menyebabkan denaturasi protein melalui koagulasi atau kombinasi proses koagulasi dan aditif. Senyawa tertentu dapat ditambahkan pada fiksatif tersebut untuk menstabilkan struktur fiksatif sehingga lebih efektif jika berikatan dengan makromolekul tertentu (Nowacek, 2013).

Pembuatan preparat histologis dapat menggunakan fiksatif tunggal dan majemuk. Fiksatif tunggal yang umum digunakan untuk pewarnaan rutin pada bidang histologis adalah NBF (*Neutral Buffered Formalin*). Fiksatif majemuk yang umum digunakan adalah fiksatif Zenker dan fiksatif Bouin (Bhat and Hussein,

2021). NBF terdiri dari campuran formalin, sodium fosfat, dan disodium fosfat, yang dilarutkan dalam aquades. Formaldehid/formalin akan mengeraskan jaringan lebih baik dari fiksatif lain, mampu bereaksi dengan asam nukleat dan protein dengan membentuk ikatan yang stabil, serta penyusutan jaringan yang terjadi lebih rendah. NBF dapat juga memfiksasi lipid dan beberapa jenis karbohidrat khususnya glikogen. Selain itu, NBF dapat merusak struktur RNA dan DNA organisme, berdampak buruk bagi kesehatan, dan mengurangi reaktivitas imunohistokimia (Singh *et al.*, 2019, Chung *et al.*, 2018). Zenker merupakan fiksatif yang mengandung merkuri klorida, potasium dikromat, sodium sulfat, dengan penambahan asam asetat glasial sebelum digunakan. Fiksatif ini memberikan penetrasi jaringan yang cukup cepat dan merata, namun endapan merkuri yang tertinggal pada jaringan menyulitkan proses pengamatan (Bhat and Hussein, 2021). Bouin dikenal sebagai fiksatif pikrat non-koagulan yang baik untuk memfiksasi embrio dan jaringan yang lunak atau serat kolagen. Bouin menyebabkan denaturasi dan ikatan silang protein serta tidak dapat digunakan pada sampel hibridisasi *in situ* yang menyebabkan kurangnya kepadatan hibridisasi (Singh *et al.*, 2019).

Berdasarkan uraian di atas, dapat diketahui bahwa penggunaan fiksatif tunggal maupun majemuk harus disesuaikan dengan komponen atau makromolekul yang akan diamati. Oleh karena itu, kajian pustaka ini bertujuan untuk membahas larutan fiksatif makromolekul pada sediaan histologis.

Metode

Kajian pustaka ini menggunakan data sekunder yang berasal dari buku, artikel dan jurnal yang relevan tanpa batasan tahun terbit. Basis data bersumber dari Google Scholar, PubMed, NCBI, Science Direct, Springerlink, Research Gate, dan Nature. Pencarian data dari buku menggunakan kata kunci *tissue processing*, *pathology*, dan *histology*. Pencarian artikel dan jurnal menggunakan kata kunci *proteins fixation*, *formaldehyde fixation lipid*, *fixative for nucleic acid*, *glyo-fixx fixative*, *mercury chloride fixative lipid*, *formalin fixed carbohydrate*, dan *ethanol*

or methanol for fixative lipid. Sumber data pada kajian pustaka ini terdiri dari 6 buku, 2 artikel, dan 18 jurnal. Pada basis data yang digunakan diperoleh 52 literatur dan diperoleh 26 literatur yang sesuai dengan kriteria.

Hasil & Pembahasan

1. Fiksatif Protein

Protein atau polipeptida merupakan makromolekul yang tersusun atas rantai asam amino panjang yang tidak bercabang dan saling berhubungan melalui ikatan peptida kovalen. Protein dapat mengalami denaturasi ketika struktur 3 dimensi protein mengalami perubahan. Selain itu, denaturasi protein dapat terjadi ketika struktur sekunder dan tersier protein diubah sehingga protein tidak mampu lagi menjalankan fungsinya. Kerusakan protein terjadi secara cepat dan menyebabkan perubahan komposisi sel serta bersifat ireversibel (Stewart *et al.*, 2006).

Perubahan struktur protein dapat disebabkan oleh mutasi, paparan lingkungan yang berpengaruh terhadap proses pelipatan protein, termasuk panas, logam berat metaloid, zat pengoksidasi, dan perubahan pH yang mengganggu ikatan hidrogen dalam protein (Hanna *et al.*, 2019). Ketersediaan dan kualitas protein dalam jaringan tergantung pada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil akhir. Faktor tersebut meliputi jangka waktu sebelum spesimen difiksasi, jenis fiksatif, waktu fiksasi, dan suhu selama penyimpanan protein, serta protokol untuk deteksi dan ekstraksi protein (Stewart *et al.*, 2006). Protein terdegradasi dengan cepat, sehingga memerlukan komponen yang dapat mengawetkan protein dengan baik (Paavilainen *et al.*, 2010). Berikut ini adalah fiksatif yang dapat digunakan untuk fiksasi protein:

a. Glyo-fixx

Glyo-fixx merupakan fiksatif turunan dari aldehyd yang lebih ramah lingkungan dari formalin, non-karsinogenik, non-sensitisasi, dan memberikan fiksasi komponen sel yang lebih jelas (Bussolati *et al.*, 2017). Glyo-fixx mulai digunakan sebagai fiksatif pada tahun 1993 dan di distribusi oleh

Thermo Electron Corporation (Paavilainen, *et al.*, 2010). Bahan aktif glyo-fixx terdiri dari glioksal, dua karbon dialdehyd yang mengawetkan jaringan dengan cara mengikat gugus metil, amida, amina, dan hidroksil. Glioksal merupakan aldehyd terkecil setelah formaldehida/formalin dan asetaldehida yang mengandung atom karbon (Dapson, 2007).

Glyo-fixx memberikan hasil fiksasi yang lebih baik daripada NBF 10% dan mampu memfiksasi sebagian antigen tanpa merusak imunoreaktivitas. Selain itu, glyo-fixx bekerja dengan sangat baik untuk pewarnaan konvensional seperti PAS (*Periodic Acid-Schiff*), Alcian blue, trichrome, Verhoeff-Van Gieson, dan mucicarmine (Bussolati *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil pengamatan sel dan jaringan dengan fiksatif berbeda menunjukkan fiksatif glyo-fixx lebih baik dibandingkan dengan fiksatif non-aldehyd seperti FINE-fix, HOPE, dan NEO-Fix. Fiksasi jaringan menggunakan ZBF (*Zinc Based Fixative*) diketahui menyebabkan peningkatan penyusutan sel yang terlihat pada sitoplasma. Fiksatif glyo-fixx menunjukkan struktur histologis jaringan dengan lebih jelas meskipun terdapat beberapa sel yang terkondensasi (Paavilainen *et al.*, 2010).

Penelitian oleh Paavilainen *et al.* (2010) menunjukkan bahwa di antara fiksatif turunan aldehyd yang diujikan (NBF, ZnF dan glyo-fixx), fiksatif glyo-fixx dapat mengawetkan protein pada jaringan hati, ginjal, dan lambung pada metode imunohistokimia. Beberapa protein dan antibodi di ginjal menunjukkan imunoreaksi yang lebih kuat pada sampel yang difiksasi dengan glyo-fixx dibandingkan fiksatif NBF. Fiksatif NBF menghasilkan immunostaining lemah atau negatif.

b. HOPE

HOPE (*Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection*)

Effect) merupakan fiksatif yang dapat mempertahankan struktur protein pada uji histokimia atau uji histopatologis pada berbagai jenis jaringan lunak manusia. Komponen HOPE terdiri dari *hepes glutamic acid buffer* yang dicampurkan dengan aseton sebagai salah satu buffer organik dan agen dehidrasi jaringan yang dapat memberikan efek perlindungan serta hasil fiksasi yang mendekati hasil fiksasi dengan menggunakan formalin. Fiksatif HOPE mengawetkan protein dan struktur antigenik yang dapat digunakan untuk analisis enzim atau imunohistokimia dan memiliki kemampuan yang sangat rendah dalam mendegradasi asam nukleat (DNA dan RNA), serta dapat dikombinasikan dengan metode hibridisasi in situ untuk memperoleh hasil uji yang sangat baik (Olert *et al.*, 2001).

Penelitian Paavilainen *et al.* (2010) menunjukkan bahwa sel yang difiksasi menggunakan fiksatif HOPE menunjukkan distribusi homogen tetapi beberapa sel mengalami penyusutan sitoplasma. HOPE memberikan imunoreaktivitas sitoplasma yang kuat dengan pola retikulum endoplasma positif pada limfosit tonsil. Hasil ekstraksi protein pada berbagai jaringan berbeda menunjukkan bahwa fiksatif HOPE memiliki ekstraksi protein yang tinggi dibandingkan fiksatif NBF, NEO-fixx, ZBF, glyo-fixx, dan Fine-fix (Paavilainen *et al.*, 2010).

Protein memiliki struktur yang mudah berubah sehingga memerlukan agen fiksatif yang dapat dengan cepat mempertahankan struktur sel. Fiksatif di atas dapat digunakan untuk fiksasi protein karena tidak banyak mengubah struktur protein dan antibodi. Umland *et al.* (2003) menunjukkan bahwa fiksatif HOPE memiliki kemampuan dalam memberikan perlindungan untuk protein dan asam nukleat.

Beberapa fiksatif yang tidak dianjurkan untuk memfiksasi protein adalah merkuri klorida, etanol, dan metanol. Fiksasi protein dengan merkuri klorida mengakibatkan merkuri klorida akan bereaksi dengan amina, amida, kelompok *sulphydryl*, dan garam amonium yang akan mengakibatkan jaringan mengeras. Fiksasi menggunakan merkuri klorida berjalan lambat dan dapat bereaksi dengan asam amino sehingga menyebabkan ikatan silang dan denaturasi protein (Singh *et al.*, 2019). Menurut Suvarna *et al.*, (2018), penggunaan merkuri klorida menimbulkan *artefak* amorf berwarna coklat kehijauan yang secara acak terdeposit di jaringan, meskipun *artefak* juga dapat disebabkan oleh faktor selain fiksatif. Kelemahan lain dalam penggunaan merkuri klorida adalah harga yang lebih mahal, sangat korosif dan toksik, serta dapat terakumulasi dalam kulit menjadi racun. Fiksatif yang mengandung ethanol atau methanol tidak dapat digunakan sebagai fiksatif protein. Hal ini karena ethanol ataupun methanol bersifat koagulan yang menyebabkan denaturasi protein. Fiksatif ini akan mengubah ikatan hidrogen dan bersifat hidrofobik dengan menghilangkan air dari gugus karboksil, hidroksil, serta amino yang mengakibatkan koagulasi protein dan penyusutan jaringan (Singh *et al.*, 2019).

2. Fiksatif Lipid

Lipid adalah sekelompok molekul yang ditandai dengan kelarutannya dalam pelarut organik dan ketidak larutannya dalam air. Lipid sangat penting untuk berbagai fungsi dalam organisme seperti struktural, metabolisme, dan endokrin. Beberapa bagian dalam organisme yang memiliki lipid dalam jumlah besar adalah kelenjar adiposa, kelenjar sebaceous, adrenal, dan selubung myelin saraf (Mills, 2007). Lipid dapat dipengaruhi oleh berbagai kondisi patologis sehingga identifikasi histokimia lipid dapat digunakan untuk diagnosis penyakit (Kumar *et al.*, 2013). Pada kajian histopatologis, keberhasilan pewarnaan lipid sangat penting. Oleh karena itu, untuk mendapatkan pewarnaan lipid yang baik diperlukan

pemilihan larutan fiksatif yang sesuai (Kiernan, 2015).

Pemilihan larutan fiksatif pada lipid dapat menggunakan fiksatif tunggal dan majemuk (Bhat and Hussein, 2021). Larutan fiksatif tunggal yang bisa digunakan untuk fiksasi lipid adalah osmium tetroksida. Penggunaan osmium tetroksida untuk fiksasi lipid biasa digunakan pada pengamatan dengan mikroskop elektron. Osmium tetroksida bereaksi dengan dua atom karbon tak jenuh dari lipid dan membentuk jembatan silang sehingga dapat mempertahankan struktur lipid (Dey, 2018). Sedangkan fiksatif majemuk yang dapat digunakan untuk memfiksasi lipid, yaitu Champy's *fluid*. Champy's *fluid* adalah salah satu fiksatif majemuk yang digunakan untuk memfiksasi komponen sitoplasma. Champy's *fluid* mengandung kromium tetroksida, potasium dikromat, dan osmium tetroksida. Osmium tetroksida merupakan salah satu larutan yang bagus digunakan untuk memfiksasi lipid. Fiksatif ini memiliki daya penetrasi yang rendah sehingga jaringan yang akan difiksasi menggunakan Champy's *fluid* sebaiknya berukuran kecil dengan dipotong terlebih dahulu (Bhat and Hussein, 2021).

Beberapa larutan fiksatif yang tidak dianjurkan untuk digunakan dalam fiksasi lipid yaitu formalin, glutaraldehid, etanol, metanol, aseton, dan asam pikrat, serta untuk fiksatif majemuk adalah Bouin, Clarke's *fluid*, dan formol kalsium. Formalin walaupun umum digunakan untuk memfiksasi jaringan, tetapi formalin tidak bereaksi pada lipid. Lipid tidak terfiksasi oleh formalin dan akan larut (Bhat and Hussein, 2021). Glutaraldehid tidak dapat bereaksi dengan lipid, sehingga tidak mampu memfiksasi lipid (Dey, 2018). Metanol, etanol, dan aseton tidak dapat memfiksasi lipid karena ketiganya merupakan alkohol. Alkohol adalah pelarut lemak sehingga tidak dianjurkan untuk digunakan sebagai fiksasi lipid (Bhat and Hussein, 2021). Larutan Bouin tidak dianjurkan karena mengandung larutan asam pikrat jenuh. Asam pikrat tidak dianjurkan untuk digunakan sebagai larutan

fiksatif lipid karena dapat menghancurkan lipid dan komponen sitoplasma (Singh *et al.*, 2019). Clarke's *fluid* tidak dianjurkan untuk digunakan pada fiksasi lipid karena dapat menghancurkan lipid. Clarke's *fluid* mengandung alkohol absolut yang dapat melarutkan lipid. Formol kalsium tidak dianjurkan untuk memfiksasi lipid karena mengandung formalin yang tidak dapat bereaksi dengan lipid sehingga lipid tidak terfiksasi dan akan larut (Bhat and Hussein, 2021).

3. Fiksatif Karbohidrat

Karbohidrat adalah salah satu makromolekul banyak ditemukan di tubuh. Karbohidrat menjadi komponen utama pada organisme (Su *et al.*, 2021). Karbohidrat merupakan penyusun berbagai macam komponen di tubuh seperti membran sel dan mukus. Identifikasi karbohidrat dalam bidang histologis dapat menjadi salah satu cara untuk mendeteksi kondisi patologis. Pada kajian histopatologis, keberhasilan pewarnaan karbohidrat sangat penting dan untuk mendapatkan pewarnaan karbohidrat yang baik diperlukan pemilihan larutan fiksatif yang sesuai (Kiernan, 2015).

Fiksatif tunggal yang dapat digunakan untuk fiksasi karbohidrat yaitu formalin, asam pikrat, dan etanol. Formalin dapat mengikat karbohidrat secara kimiawi sehingga karbohidrat akan terfiksasi dan tidak terdegradasi (Sullivan *et al.*, 2015). Asam pikrat biasa digunakan dengan kombinasi dengan larutan lain. Asam pikrat sebenarnya tidak dapat memfiksasi beberapa jenis karbohidrat, tetapi dapat memfiksasi glikogen. Asam pikrat bekerja dengan prinsip koagulasi sehingga disebut fiksatif koagulan yaitu dengan protein dan kandungan lain seperti glikogen akan dikoagulasi untuk mempertahankan kondisi sel (Suvarna *et al.*, 2018). Pada penelitian Abdalraheem *et al.* (2020), jenis fiksatif yang paling bagus digunakan untuk fiksasi glikogen adalah etanol 80% yang terlihat dari hasil glikogen yang berwarna merah magenta dan merata.

Fiksatif majemuk yang dapat digunakan untuk fiksasi karbohidrat adalah larutan Bouin dan Gendre's *fluid*. Larutan Bouin bagus digunakan untuk fiksasi berbagai jenis karbohidrat. Penggunaan larutan Bouin sangat dianjurkan apabila ingin memfiksasi karbohidrat. Larutan Bouin merupakan larutan fiksatif dengan komponen asam pikrat, formalin, dan asam asetat glasial. Komponen dalam larutan Bouin yaitu asam pikrat dan formalin bagus digunakan untuk fiksasi karbohidrat (Bhat and Hussein, 2021). Gendre's *fluid* adalah salah satu fiksatif majemuk yang bagus untuk memfiksasi makromolekul karbohidrat. Gendre's *fluid* adalah larutan yang berguna untuk mencegah kerusakan alami sel. Gendre's *fluid* terdiri dari komponen asam pikrat yang dilarutkan alkohol, formalin, dan asam asetat glasial (Bhat and Hussein, 2021).

Beberapa larutan yang tidak dianjurkan digunakan untuk fiksasi makromolekul karbohidrat adalah merkuri klorida dan osmium tetroksida untuk fiksatif tunggal. Fiksatif majemuk yang tidak disarankan untuk digunakan untuk fiksasi karbohidrat adalah Champy's *fluid*. Merkuri klorida tidak dianjurkan untuk fiksasi karbohidrat karena walaupun merkuri klorida dapat mempenetrasi jaringan dengan cepat tetapi tidak bisa memfiksasi karbohidrat. Osmium tetroksida tidak dianjurkan untuk memfiksasi karbohidrat karena osmium tetroksida memiliki laju reaksi dan penetrasi ke dalam jaringan yang lambat, sehingga tidak mampu memfiksasi karbohidrat. Champy's *fluid* tidak disarankan digunakan untuk fiksasi karbohidrat karena mengandung osmium tetroksida yang tidak dapat memfiksasi karbohidrat (Bhat and Hussein, 2021).

4. Fiksatif Asam Nukleat

Larutan formalin yang mengandung asam etilen diamin tetra asetat (EDTA) adalah fiksatif terbaik untuk mengawetkan asam nukleat karena memiliki sifat sebagai penawar DNase yang berfungsi sebagai

penghambat enzim sehingga asam nukleat (seperti DNA dan RNA) yang ada dalam sampel dapat diawetkan dengan baik tanpa mengalami degradasi yang cepat (Tokuda *et al.*, 1990). Cara kerja formalin sebagai larutan fiksatif terhadap asam nukleat yaitu formalin mendenaturasi DNA (memutus ikatan hidrogen antar rantai basa agar tidak tertumpuk) di daerah kaya AT (adenin dan timin) dalam untai ganda DNA. DNA memiliki empat interaksi dengan formalin yaitu:

- 1) Reaksi adisi. Formalin ditambahkan ke basa asam nukleat untuk membentuk gugus hidroksi metil.
- 2) Serangan elektrofilik N-metilol yang lebih lambat pada basa amino untuk membentuk jembatan metilen antara dua gugus amino.
- 3) Perlakuan formalin dapat menghasilkan situs AP (apurinat dan aprimidinat) melalui hidrolisis ikatan N-glikosilat, meninggalkan residu pirimidin dan purin bebas. Situs AP memiliki ion karboksonium siklik yang sangat tidak stabil dan terhidrolisis dengan cepat untuk menghasilkan 2-deoksi-D-ribosa.
- 4) Formalin juga dapat menyebabkan hidrolisis lambat ikatan fosfodiester yang mengarah ke rantai pendek poli deoksiribosa dengan pirimidin utuh. Hampir 40% adenin dalam sintesis RNA memperoleh penambahan monomethylol setelah diinkubasi dalam buffer formalin selama 61 jam pada suhu 4°C, karena adenin adalah yang paling rentan terhadap serangan elektrofilik. Modifikasi DNA yang diinduksi formalin tergantung pada konsentrasi, suhu, dan pH fiksatif. Ketika bereaksi pada suhu 5°C di bawah suhu leleh, laju denaturasi DNA meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi bentuk aldehida.

Ada yang perlu diperhatikan saat menggunakan formalin sebagai fiksatif asam nukleat yaitu: 1) jeda waktu prefikasi minimal 2 jam; 2) menggunakan formalin netral 10%; 3)

konsentrasi garam rendah; 4) fiksasi pada suhu 4°C; 5) durasi fiksasi berkisar 3 hingga 6 jam; 6) asam etilen diamin tetra asetat (EDTA) dengan konsentrasi 20 mmol/L untuk mengawetkan DNA dan RNA dengan berat molekul tinggi (Douglas, 1998).

Selain formalin, fiksatif tunggal yang dapat digunakan untuk memfiksasi asam nukleat adalah fiksatif golongan alkohol. Etanol dan metanol merupakan fiksatif alkohol yang baik untuk asam nukleat (Leong *et al.*, 1996.). Pengukuran fisik-kimiawi menunjukkan bahwa sebagian besar DNA terurai dalam etanol (65% v/v) dan metanol (Bhat and Hussein, 2021).

Aseton merupakan salah satu golongan alkohol telah digunakan sebagai fiksatif dalam teknik aseton metilbenzoat-xilena (AMeX). Metode ini melibatkan fiksasi semalaman (*overnight*) jaringan dalam aseton pada suhu 20°C, kemudian dibersihkan dalam metilbenzoat dan xilena sebelum infiltrasi parafin (Sato *et al.*, 1990). Jaringan yang diproses dengan teknik aseton metilbenzoat-xilena menghasilkan morfologi DNA yang berkualitas dan cocok untuk analisis molekuler. Asam nukleat juga dapat difiksasi menggunakan fiksatif majemuk yaitu menggunakan:

a. Fiksatif Carnoy

Fiksatif Carnoy terdiri dari campuran etanol 60%, kloroform 30%, dan asam asetat glasial 10%. Fiksatif Carnoy menghasilkan lebih sedikit degradasi molekul RNA dibandingkan fiksatif NBF (*Neutral Buffer Formalin*).

b. Fiksatif Methacarn

Fiksatif methacarn (methanol-Carnoy) terdiri dari metanol 60%, kloroform 30%, dan asam asetat glasial 10%. Methacarn merupakan fiksatif terbaik untuk mempertahankan morfologi asam nukleat. Methacarn lebih unggul dari

NBF dalam mempertahankan imunoreaktivitas antigen dan tidak memerlukan antigen. Methacarn menyebabkan pengendapan protein ribosom di sel dan menonaktifkan RNases endogen mRNA dari aksi RNase.

c. Fiksatif Bouin

Fiksatif Bouin adalah campuran senyawa dan terdiri dari formalin, asam pikrat, dan asam asetat glasial. Setiap komponen memiliki fungsi tertentu yang saling melengkapi. Peran asam pikrat dalam larutan ini adalah untuk secara perlahan menembus ke dalam jaringan dan menyebabkan koagulasi asam nukleat. Namun, hal ini dapat menyebabkan beberapa penyusutan jaringan. Asam pikrat adalah komponen larutan Bouin yang menghasilkan warna kuning yang khas.

Kesimpulan

Pemilihan larutan fiksatif sangat menentukan hasil pembuatan preparat histologis. Penggunaan larutan fiksatif disesuaikan dengan makromolekul yang akan diamati. Fiksatif yang disarankan untuk fiksasi protein yaitu HOPE dan Glyo-Fixx. Larutan fiksatif yang disarankan untuk fiksasi lipid adalah osmium tetroksida dan Champy's *fluid*. Larutan fiksatif yang disarankan untuk fiksasi karbohidrat adalah etanol 80%, larutan Bouin dan Gendre's *fluid*. Fiksatif yang disarankan untuk fiksasi asam nukleat yaitu larutan EDTA, fiksatif Carnoy, methacarn dan Bouin. Berdasarkan review yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa setiap makromolekul memiliki sifat yang berbeda sehingga penggunaan fiksatif akan menentukan keberhasilan dari proses fiksasi.

Referensi

Abdalraheem, A. B., A. M. Gubara, Y. M. A. Zakout, and S. A. E. Batran. 2020. Hydrogen peroxide as an oxidizing agent for glycogen demonstration using Schiff's reagent in rabbit liver fixed with alcoholic

- and aqueous fixatives. *Journal of Histotechnology*. 44(1):20-26. DOI: [10.1080/01478885.2020.1816010](https://doi.org/10.1080/01478885.2020.1816010).
- Bhat, A., and S. Hussein. (2021). Fixation and different type of fixatives: Their role and function: A review. *International Journal of Clinical and Diagnostic Pathology*. 4(4):113-119. DOI: [10.1055/s-0039-1693098](https://doi.org/10.1055/s-0039-1693098).
- Bussolati G, Annaratone L, Berrino E, Miglio U, Panero M, and Cupo M. (2017). Acid-free Glyoxal as a Substitute of Formalin for Structural and Molecular Preservation in Tissue Samples. *PLOS ONE*. 12(8):1-16. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182965>.
- Chung, J.Y. Song J. S. Ylaya, K. Sears, J. D. Choi, L. Cho, H. Rosenberg, A. Z. and Hewitt, S. M. (2018). Histomorphological and Molecular Assessments of the Fixation Times Comparing Formalin and Ethanol-Based Fixatives. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 66 (2):121-135. DOI: [10.1369/0022155417741467](https://doi.org/10.1369/0022155417741467).
- Cook, D.J. (2000). *Cellular Pathology*. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd.
- Dapson, RW. (2010). Glyoxal fixation: How it Works and Why it Only Occasionally Needs Antigen Retrieval. *Biotechnic & Histochemistry*, 82(3). DOI: [10.1080/10520290701488113](https://doi.org/10.1080/10520290701488113)
- Dey, P. (2018). Fixation of Histology Samples: Principles, Methods and Types of Fixatives. In: Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Singapore: Springer. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_1.
- Douglas M.P. and Rogers S. O. (1998). DNA Damage Caused by Common Cytological Fixatives. *Mutat Res*. 401(5):77– 88. DOI: [10.1016/s0027-5107\(97\)00314-x](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00314-x).
- Ellenburg JL, Kolettis P, Drwiega JC, et al. (2020) Formalin Versus Bouin Solution for Testis Biopsies: Which Is the Better Fixative? *Clinical Pathology*;13. DOI: [10.1177/2632010X19897262](https://doi.org/10.1177/2632010X19897262)
- Hanna, J. Angel, G.M., Jessie, A. dan Yagmur, M. (2019). REVIEW Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease. *The American Journal of Pathology*. 189(1):94-103. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.09.004>.
- Kiernan, J. A. (2015). *Histological and histochemical methods: theory and practice* 5th edn. Banbury: Scion.
- Kumar, V. A. K. Abbas, and J. Aster. (2013). *Robbins basic pathology* 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Leong A. S. Y., James C. L. and Thomas A. C. (1996). *Handbook of Surgical Pathology*. New York: Churchill Livingstone.
- Mills, S. E. (2007). *Histology for Pathologists* 3rd edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Nowacek, J. M. (2013). *Chapter 16: Fixation and Tissue Processing*. https://lidoc.paginas.ufsc.br/files/2013/10/about-fixations_DAKO.pdf.
- Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Kühl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Müller AM, Müller-Navia J. (2001). HOPE Fixation: a Novel Fixing Method and Paraffin-embedding Technique for Human Soft Tissues. *Pathol Res Pract*, 197(12):823-826. DOI: [10.1078/0344-0338-00166](https://doi.org/10.1078/0344-0338-00166).
- Paavilainen L, Edvinsson A, Asplund A, Hober S, Kampf C, Pontén F, Wester K. (2010). The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells. *J Histochem*

- Cytochem.* 58(3):237-46. DOI: [10.1369/jhc.2009.954321](https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954321).
- Sato Y, Mukai K, Matsuno Y, Furuya S, Kagami Y, Miwa M, Shimosato Y. (1990). The AMeX Method: a Multipurpose Tissue-processing and Paraffin Embedding Method. II. Extraction of Spooled DNA and its Application to Southern Blot Hybridization Analysis. *Am J Pathol.* 136(2):267–271. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1877407/>
- Singh, H., Bishen, K.A. Garg, D. Sukhija, H. Sharma, D. and Tomar, U. (2019). Fixation and Fixatives: Roles and Functions—A Short Review. *Dental Journal of Advance Studies.* 7(2):51-55. DOI: <https://doi.org/07.10.1055/s-0039-1693098>.
- Stewart H.L., Alfred L. and William E. M. (2006). Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J Am Soc Nephrol.* 17(7):1807-1819. DOI : [10.1681/ASN.2006010083](https://doi.org/10.1681/ASN.2006010083).
- Su, L., Y. Feng, K. Wei, X. Xu, R. Liu, and G. Chen. (2021). Carbohydrate-Based Macromolecules Biomaterials. *Chemical Reviews.* 121(2021): 10950-11029. DOI: [10.1021/acs.chemrev.0c01338](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01338).
- Sullivan, M. A., S. Li, S. T. N. Aroney, B. Deng, C. Li, E. Roura, B. L. Schulz, B. E. Harcourt, J. M. Forbes, and R. G. Gilbert. (2015). A Rapid Extraction Method of Glycogen from Formalin-fixed Liver. *Carbohydrate Polymers.* 118(2015):9-15. DOI : [10.1016/j.carbpol.2014.11.005](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.005).
- Suvarna K. S., C. Layton, J. D. Bancroft. 2018. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier Health Sciences.
- Thavarajah, R., Vidya, KM., Joshua, E., Umadevi, K., dan Kannan, R. (2012). Chemical and Physical Basics of Routine Formaldehyde fixation. *Journal of Oral & Maxillofacial Pathology*, 16(3): 400-405. DOI: <https://doi.org/10.4103%2F0973-029X.102496>
- Tokuda Y, Nakamura T, Satonaka K, Maeda S, Doi K, Baba S, Sugiyama T. (1990). Fundamental Study on the Mechanism of DNA Degradation in Tissues Fixed in Formaldehyde. *J Clin Pathol*, 43:748 – 751. DOI : [10.1136/jcp.43.9.748](https://doi.org/10.1136/jcp.43.9.748).
- Umland, O., Artur, J.U., Ekkehard, V., dan Torsten, G. 2003. HOPE Fixation of Cytospin Preparations of Human Cells for In Situ Hybridization and Immunocytochemistry. *J. Histochem Cytochem*, 51(7). DOI: <https://doi.org/10.1177/002215540305100714>