

OPTIMASI WAKTU DAN SUHU FIKSASI SPESIMEN TERHADAP KUALITAS PREPARAT JARINGAN

Optimization Of Specimen Fixation Time and Temperature On Tissue Slides Quality

Shofia Muthiawati ^{1*}, Wiwin Wiryanti ², Adang Durachim ³, Yuliansyah S. M. ⁴

^{1*} Poltekkes Kemenkes Bandung, Email: muthiawati.shofia@gmail.com

² Poltekkes Kemenkes Bandung, Email: wiwinwiryanti@yahoo.com

³ Poltekkes Kemenkes Bandung, Email: adangdurachim65@gmail.com

⁴ Poltekkes Kemenkes Bandung, Email: yules_11@yahoo.com

ABSTRACT

Fixation is an important step in tissue maturation that prevents autolysis and prepares the tissue for later stages of processing. A commonly used fixative solution is 10% neutral buffered formalin. Fixation temperature can affect tissue morphology, where an increase in temperature can increase the rate of fixation, but also increase autolysis and diffusion of cellular elements. This study aims to determine the optimal fixation time and temperature to obtain good quality tissue preparations. Samples were taken from 6 right rat liver organs which were cut into 4 sections resulting in 24 tissue blocks, each tissue block producing 2 tissue preparations. The method used was quasi-experiment. In this study, 48 rat liver tissue preparations were divided into 6 groups fixed at room temperature and 37°C for 1.5 hours, 1 hour and 30 minutes with fixation at room temperature for 1.5 hours as control. The parameter used to evaluate the quality of the preparation is the contrast of the color intensity of the nucleus and cytoplasm measured using ImageJ software. The results showed that fixation of tissue maturation at 37°C for 1.5 hours gave the best results in terms of preparation quality. Further research is needed to understand the effect of fixation time and temperature on other tissues, such as fat tissue or bone tissue and a standard Optical Density (OD) value for Hematoxylin-Eosin staining using ImageJ is needed.

Key words: fixation, time variation, temperature variation.

ABSTRAK

Fiksasi merupakan langkah penting dalam pematangan jaringan yang mencegah autolisis dan mempersiapkan jaringan untuk tahap-tahap pemrosesan selanjutnya. Larutan fiksatif yang umum digunakan adalah neutral buffer formalin 10%. Suhu fiksasi dapat mempengaruhi morfologi jaringan, di mana peningkatan suhu dapat meningkatkan laju fiksasi, tetapi juga meningkatkan autolisis dan difusi elemen seluler. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu dan suhu fiksasi yang optimal untuk mendapatkan kualitas preparat jaringan yang baik. Sampel diambil dari 6 organ hati tikus bagian kanan yang dipotong menjadi 4 bagian sehingga dihasilkan 24 blok jaringan, masing-masing blok jaringan menghasilkan 2 preparat jaringan. Metode yang digunakan adalah kuasi eksperimen. Dalam penelitian ini, 48 preparat jaringan hati tikus dibagi dalam 6 kelompok yang difiksasi pada suhu ruang dan suhu 37°C selama 1,5 jam, 1 jam dan 30 menit dengan fiksasi pada suhu ruang selama 1,5 jam sebagai kontrol. Parameter yang digunakan untuk mengevaluasi kualitas preparat adalah kekontrasan intensitas warna inti dan sitoplasma yang diukur menggunakan perangkat lunak *ImageJ*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fiksasi pematangan jaringan pada suhu 37°C selama 1,5 jam memberikan hasil yang terbaik dalam hal kualitas preparat. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami pengaruh waktu dan suhu fiksasi terhadap jaringan lain,

seperti jaringan lemak atau jaringan tulang serta diperlukan standar nilai *Optical Density* (OD) untuk pewarnaan Hematoksilin-Eosin menggunakan *ImageJ*.

Kata kunci: fiksasi, variasi waktu, variasi suhu.

PENDAHULUAN

Diagnosis penyakit kanker ditentukan berdasarkan pemeriksaan patologi anatomi. Pemeriksaan patologi anatomi adalah pemeriksaan mikroskopis terhadap perubahan sel atau jaringan organ akibat penyakit. Pemeriksaan histopatologi merupakan diagnosis pasti (baku emas) dalam diagnosis kanker¹.

Hasil diagnosis yang akurat sangat dipengaruhi oleh kualitas preparat jaringan yang dibuat. Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kualitas preparat tersebut. Salah satunya faktornya adalah pada saat proses fiksasi pada tahap pematangan jaringan. Fiksasi merupakan tahap awal dalam pengolahan jaringan dan proses yang krusial agar dapat membuat preparat histopatologi yang layak untuk dibaca².

Fiksasi merupakan langkah pertama pematangan jaringan yang sangat penting untuk mencegah autolisis yang dapat menghancurkan elemen diagnostik, serta mempersiapkan jaringan untuk kerasnya reagen yang digunakan dalam langkah-langkah pemrosesan selanjutnya. Protein didenaturasi selama fiksasi, membuat sel dan komponennya tahan terhadap autolisis lebih lanjut. Jaringan yang tidak terfiksasi secara memadai dapat menunjukkan fiksasi zonal sebagai hasil dari larutan dehidrasi yang menyelesaikan proses fiksasi menuju bagian dalam jaringan. Hal ini dapat mengubah morfologi jaringan dan mempengaruhi sifat pewarnaannya³.

Waktu fiksasi jaringan merupakan salah satu hal yang perlu diperhatikan pada saat pemrosesan jaringan⁴. Pada proses pematangan jaringan waktu fiksasi bervariasi. Tidak ada jadwal pemrosesan jaringan "standar"

meskipun produsen memiliki program mereka sendiri yang dirancang untuk berjalan secara khusus pada prosesor mereka. Waktu fiksasi pematangan jaringan bervariasi dari 30 menit hingga 1 jam 45 menit³.

Suhu saat fiksasi dapat memengaruhi morfologi jaringan. Peningkatan suhu meningkatkan laju fiksasi juga meningkatkan laju autolisis dan difusi elemen seluler⁴. Difusi molekul meningkat dengan naiknya suhu karena gerakan dan getarannya yang lebih cepat menyebabkan laju penetrasi jaringan oleh formaldehida lebih cepat³. Saat ini proses fiksasi jaringan dapat menggunakan bantuan prosesor jaringan dan *microwave* dengan prinsip menggunakan suhu yang lebih tinggi yaitu sekitar 45°C, proses dengan cara tersebut tidak mempengaruhi morfologi jaringan⁴.

Untuk mendapatkan hasil diagnosis histopatologis dibutuhkan waktu sekitar 5 hari⁵. Salah satu proses yang memakan waktu yang cukup lama ialah pada tahap fiksasi. Beberapa metode yang berbeda untuk mengurangi waktu fiksasi telah dieksplorasi untuk mendapatkan hasil laboratorium patologi yang cepat. Salah satu strategi tersebut adalah mempercepat laju penetrasi fiksatif dengan meningkatkan suhu fiksasi⁶.

Pada penelitian yang dilakukan Fox (1985), menunjukkan bahwa pada suhu 37°C, reaksi formaldehida lebih cepat dan keseimbangan tercapai setelah 18 jam atau kurang dibandingkan dengan fiksasi pada suhu kamar yang memerlukan waktu 24 jam untuk mencapai keseimbangan. Selain itu pada penelitian Elzabbal (2013)⁷ menunjukkan bahwa kualitas jaringan yang diwarnai dengan Ehrlich hematoksilin ketika jaringan difiksasi dalam Neutral Buffer Formaldehida 10%

memberikan hasil terbaik pada suhu 37°C. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu dan suhu fiksasi yang optimal untuk mendapatkan kualitas preparat jaringan yang baik.

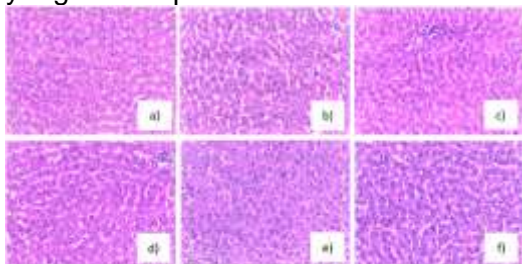
METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian kuasi eksperimen. Dalam penelitian ini 6 organ hati tikus bagian kanan masing-masing dipotong menjadi 4 bagian, lalu dilakukan fiksasi selama 24 jam. Setelah itu, pada saat pematangan jaringan, organ hati tikus difiksasi dalam durasi yang berbeda, yaitu 1,5 jam, 1 jam, dan 30 menit. Terdapat 2 variasi suhu larutan fiksatif yang digunakan, yaitu suhu ruangan dan 37 °C. Fiksasi pada suhu ruang selama 1,5 jam sebagai kontrol.

Parameter yang digunakan untuk mengevaluasi kualitas preparat adalah kekontrasan intensitas warna inti dan sitoplasma. Intensitas warna diukur menggunakan perangkat lunak ImageJ. Data yang didapat kemudian dilakukan analisis deskriptif menggunakan *software* SPSS dan selisih intensitas warna inti dan sitoplasma dihitung selisihnya untuk menentukan kekontrasan warnanya.

HASIL

Jaringan hati tikus yang telah diproses dibuat preparat dan diwarnai dengan pewarnaan hematoksin eosin. Setelah itu dilakukan pengambilan citra digital dengan kamera mikroskop seperti yang terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1 Hasil dokumentasi preparat jaringan hati tikus yang telah diwarnai

Keterangan gambar : Hasil dokumentasi preparat jaringan hati tikus yang telah

diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin Eosin. a) suhu ruang 1,5 jam, b) suhu ruang 1 jam, c) suhu ruang 30 menit, d) suhu 37°C 1,5 jam, e) suhu 37°C 1 jam, f) suhu 37°C 30 menit

Tabel 1 menunjukkan sebaran data dilihat dari data terendah (min), data tertinggi (max), dan rata-rata (mean) nilai intensitas warna (OD) inti dan sitoplasma. Nilai inti terendah terdapat pada suhu 37°C 30 menit dan nilai sitoplasma terendah terdapat pada suhu 37°C 1,5 jam. Nilai inti tertinggi terdapat pada suhu 37°C 30 menit dan nilai sitoplasma terendah terdapat pada suhu ruang 1,5 jam. Nilai rata-rata tertinggi terdapat pada suhu ruang 30 menit dan nilai sitoplasma tertinggi terdapat pada suhu 37°C 1 jam. Nilai rata-rata terendah inti terdapat pada suhu 37°C 1 jam dan nilai rata-rata sitoplasma terendah terdapat pada 37°C 1,5 jam.

Uji deskriptif digunakan untuk melihat rata-rata nilai intensitas warna (OD) inti dan rata-rata nilai intensitas warna (OD) sitoplasma. Hasil rata-rata nilai OD inti dan rata-rata nilai OD sitoplasma dihitung selisihnya. Hasil dikatakan optimum apabila nilai intensitas warna (OD) inti dan sitoplasma memiliki selisih yang lebih tinggi dari kontrol.

Uji deskriptif digunakan untuk melihat rata-rata nilai intensitas warna (OD) inti dan rata-rata nilai intensitas warna (OD) sitoplasma. Hasil rata-rata nilai OD inti dan rata-rata nilai OD sitoplasma dihitung selisihnya. Hasil dikatakan optimum apabila nilai intensitas warna (OD) inti dan sitoplasma memiliki selisih yang lebih tinggi dari kontrol.

Berdasarkan Tabel 2, fiksasi pematangan jaringan pada suhu ruang selama 30 menit dan 37°C selama 1,5 jam memiliki nilai selisih antara nilai OD inti dan sitoplasma yang lebih besar dari kontrol sehingga dikatakan optimum. Fiksasi pada suhu 37°C selama 1,5 jam memiliki nilai selisih antara nilai OD inti dan sitoplasma yang paling tinggi, sehingga dapat dikatakan bahwa waktu dan suhu tersebut optimum untuk fiksasi

pematangan jaringan. Suhu dan waktu fiksasi jaringan dikatakan optimum jika memiliki selisih nilai OD inti dan nilai OD

sitoplasma yang tinggi sehingga menghasilkan warna yang kontras.

Tabel 1 Hasil Uji Deskriptif Intensitas Warna (OD) Inti Dan Sitoplasma

Variabel	Inti			Sitoplasma		
	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean
Suhu Ruang 1,5 jam	234.431	245.196	239.936	126.416	150.375	139.483
Suhu Ruang 1 jam	232.294	239.960	235.555	153.932	138.324	145.573
Suhu Ruang 30 menit	235.613	247.007	241.146	130.370	146.922	138.306
Suhu 37°C 1,5 jam	230.984	245.243	238.305	128.967	140.017	135.279
Suhu 37°C 1 jam	221.018	242.704	229.208	140.437	156.946	146.314
Suhu 37°C 30 menit	218.793	237.775	231.906	132.079	151.195	139.717

Tabel 2 Selisih Intensitas Warna (OD) Inti dan Sitoplasma

Variabel	Rata-rata OD		Selisih Rata-rata OD	Kualitas Preparat
	Inti	Sitoplasma		
Suhu Ruang 1,5 jam	239.936	139.483	100.453	Kontrol
Suhu Ruang 1 jam	235.555	145.573	89.982	Tidak optimum
Suhu Ruang 30 menit	241.146	138.306	102.840	Optimum
Suhu 37°C 1,5 jam	238.305	135.279	103.206	Optimum
Suhu 37°C 1 jam	229.208	146.314	82.894	Tidak optimum
Suhu 37°C 30 menit	231.906	139.717	92.189	Tidak optimum

PEMBAHASAN

Fiksasi merupakan langkah awal dalam histoteknologi. Sumber kesalahan yang dominan di laboratorium histologi disebabkan oleh jaringan yang tidak difiksasi dengan benar, hal ini mengakibatkan penurunan intensitas warna dan morfologi yang buruk⁸. Fiksasi formalin yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan kualitas pewarnaan dengan menggunakan H&E rutin⁹. Ketika suhu fiksatif dinaikkan atau diturunkan, laju difusi larutan fiksatif kedalam spesimen terpengaruh. Peningkatan suhu akan mempercepat proses fiksasi. Panas yang berlebihan, terutama jika

berlangsung lama, dapat merusak sel dan menyebabkan penyusutan dan pengerasan yang substansial pada spesimen¹⁰.

Setelah melalui tahapan pematangan jaringan dilakukan pewarnaan hematoksilin eosin. Hematoksilin eosin merupakan pewarnaan rutin yang digunakan pada pemeriksaan histopatologi. Salah satu ciri kualitas preparat yang baik ditandai dengan pewarnaan inti dan sitoplasma¹¹. Kualitas pewarnaan pada penelitian ini dinilai berdasarkan kekontrasan inti dan sitoplasma yang didapat dari selisih nilai OD inti dan sitoplasma.

Optical Density (OD) adalah ukuran absorbansi cahaya yang melalui sampel. OD sebanding dengan intensitas warna. Semakin besar intensitas warna, semakin besar pula densitas optiknya. Penggunaan analisis gambar digital berbasis OD memberikan cara yang efisien dan cepat untuk meningkatkan peningkatkan standardisasi hasil pewarnaan¹². Pada *ImageJ* intensitas warna diukur dengan nilai 0 sebagai warna yang paling gelap dan 255 sebagai warna yang paling terang. Semakin kecil nilainya semakin gelap warnanya dan semakin besar nilainya semakin terang warnanya. Selisih nilai OD inti dan nilai OD sitoplasma yang tinggi menunjukkan kekontrasan warna yang tinggi, artinya satu warna lebih terang atau lebih gelap dari warna yang lain. Warna kontras adalah warna yang berkesan berlawanan satu dengan lainnya¹³.

Pada hasil di atas, nilai inti lebih besar dibandingkan dengan nilai sitoplasma. Hal ini sesuai dengan kisaran OD normal yang diamati oleh Chlipala et al (2020)¹² dimana nilai OD lebih tinggi untuk inti dibandingkan dengan sitoplasma pada sediaan dengan ketebalan 4 μm yang menggunakan protokol pewarnaan standar. OD hematoksilin dan eosin bervariasi berdasarkan jenis jaringan¹². Pada pewarnaan H&E sebagian besar organel seluler dan matriks ekstraseluler bersifat eosinofilik¹⁴.

Pada penelitian ini digunakan jaringan hati tikus. Jaringan hati terdiri dari sel hepatosit. Hepatosit adalah sel epitel berbentuk kubus atau polihedral yang besar, dengan inti pusat yang besar, bulat, dan sitoplasma eosinofilik yang kaya akan mitokondria¹⁵. Mitokondria bersifat eosinofilik dan nampak sebagai butiran merah muda tua dengan ukuran yang seragam¹⁴. Jaringan hati yang kaya akan mitokondria mampu menyerap warna eosin dengan kuat sehingga intensitas warnanya lebih kecil dibandingkan dengan inti.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian di atas, maka dapat disimpulkan bahwa fiksasi pematangan jaringan pada suhu 37°C selama 1,5 jam memberikan hasil yang terbaik dalam hal kualitas preparat. Hasil ini dinilai dari segi kekontrasan warna inti dan sitoplasma. Hal ini menunjukkan bahwa waktu dan suhu berpengaruh terhadap kualitas preparat jaringan. Optimasi waktu dan suhu fiksasi ini dapat membantu dalam peningkatan kualitas preparat jaringan yang berpengaruh pada hasil analisis histologi yang akurat.

DAFTAR RUJUKAN

1. Pohan, M. Y. H., Akurasi pemeriksaan sitologi dan histopatologi pada pasien kanker paru di beberapa Rumah Sakit Jakarta tahun 2000-2005. 2006. Tesis. Universitas Indonesia.
2. Musyarifah Z, Agus S. Proses Fiksasi pada Pemeriksaan Histopatologik. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2018;7(3):443. doi:10.25077/jka.v7i3.900
3. Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed. Elsevier; 2019. doi:10.1016/C2015-0-00143-5
4. Carson FL, Hladik C. *Histotechnology A Self-Instructional Text*. 3rd ed. American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
5. Laboratorium Patologi Anatomi. Accessed January 28, 2023. <https://sippn.menpan.go.id/pelayanan-publik/8012970/pemerintah-kab-buleleng/laboratorium-patologi-anatomi>
6. Compton CC, Robb JA, Anderson MW, et al. Preanalytics and Precision

- Pathology: Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(11):1346-1363. doi:10.5858/arpa.2019-0009-SA
7. Elzabbal MHE, Ahmed HG, Abedellaziz MS, Sadik IA, Abdalhmeed M. Effect of Fixatives' Temperatures on Subsequent Histochemical Staining. *Sudan Journal of Medical Sciences*. 2013;8(3):147-150.
 8. Bauer DR, Leibold T, Chafin DR. Making a science out of preanalytics: An analytical method to determine optimal tissue fixation in real-time. *PLoS One*. 2021;16(10):e0258495. doi:10.1371/journal.pone.0258495
 9. Likhithaswamy HR, Madhushankari GS, Selvamani M, Kokila G, Mohan Kumar KP, Chethana K. Comparison of staining adequacy between tissues stored in formalin and paraffin embedded blocks for prolonged duration. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020;24(3):586. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_49_20
 10. Rolls G. Fixation and Fixatives (5) – Practical Procedures to Optimize Quality, the Effects of Heat, and Microwaves. Accessed June 6, 2023. <https://www.leicabiosystems.com/en-in/knowledge-pathway/fixation-and-fixatives-5-practical-procedures-to-optimize-quality-the-effects-of-heat-and-microwaves/>
 11. Khristian E, Inderiati D. *Sitohistoteknologi*. Kementrian Keshatan Republik Indonesia; 2017.
 12. Chlipala E, Bendzinski CM, Chu K, et al. Optical density-based image analysis method for the evaluation of hematoxylin and eosin staining precision. *J Histotechnol*. 2020;43(1):29-37. doi:10.1080/01478885.2019.1708611
 13. Nugroho E. *Pengenalan Teori Warna*. Andi; 2008.
 14. Chan JKC. The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. *Int J Surg Pathol*. 2014;22(1):12-32. doi:10.1177/1066896913517939
 15. Mescher AL, Junqueira LCU. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 14th ed. McGraw-Hill Education