

GAMBARAN HISTOLOGI USUS HALUS MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN TIDAK BERHUBUNGAN DENGAN PERBEDAAN WAKTU FIKSASI MENGGUNAKAN LARUTAN *NEUTRAL BUFFERED FORMALIN* 10%

Ryadh Kamil Hasyimi¹, Nurul Hasanah^{2*}, Khairunnida Rahma³, Hadi Irawiraman⁴

¹Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman

²Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, Indonesia

³Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, Indonesia

⁴Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, Indonesia

*Korespondensi: nazhifa_nadira@yahoo.co.id

ABSTRACT

*Histotechnique is a technique to make specimens. These specimens can be used to analyze pathological conditions and changes in cells or tissues. Fixation is the most important factor that affects the histotechnique process. This study aim to determine whether there is a correlation between histological imagery of male mice (*Mus musculus*) intestine with different fixation times using Neutral Buffered Formalin 10% solution. The research was conducted using the true experimental method on 9 male adult Swiss Webster mice. The experimental design that used was 3 sample groups with 3 times replications. The used sampling technique was simple random sampling technique. The data on specimen quality obtained from the research were analyzed bivariately using the Kruskal-Wallis test. The group with the highest percentage of excellent specimen quality is the sample group fixated for 48 hours, with the percentage of 40%. The group with the highest percentage of poor specimen quality is the sample group fixed for 3 hours, with the percentage of 86.7%. The Kruskal-Wallis statistical test yielded a result of $p = 0.217$. Based on the findings, it can be inferred that there is no statistically significant correlation between histological characteristics of the small intestine of male mice (*Mus musculus*) intestine and variations in fixation duration when utilizing a 10% Neutral Buffered Formalin solution.*

Keywords: Fixation, Histotechnique, Intestine, Mice.

PENDAHULUAN

Histoteknik adalah teknik untuk membuat preparat dari spesimen tertentu melalui serangkaian proses untuk memperoleh preparat histopatologi yang siap untuk dianalisis. Preparat ini dapat digunakan untuk menganalisis keadaan patologis dan perubahan pada sel atau jaringan (Juliati, 2017). Proses pembuatan preparat histopatologi melalui beberapa tahap yaitu fiksasi, dehidrasi, infiltrasi, pelekatan (*embedding*) dan, pemotongan (*trimming*) (Mescher &

Junqueira, 2013). Fiksasi adalah faktor paling penting yang mempengaruhi proses histoteknik (Ganjali, 2012). Tujuan dari fiksasi adalah untuk membuat struktur jaringan menjadi stabil dan tidak terpengaruh oleh perubahan setelah kematian (*post-mortem*). Larutan fiksatif yang sering digunakan adalah formalin dan larutan bouin. Formalin dapat membuat protein dalam jaringan menjadi lebih asam dibandingkan dengan fiksatif alkohol, sehingga protein yang difiksasi

dengan formalin memiliki afinitas yang lebih baik terhadap zat pewarna basa (Atik, 2019). Selain itu *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10% telah menjadi cairan fiksatif standar dalam laboratorium histologi selama beberapa dekade. Formalin memiliki beberapa kelebihan seperti pH mendekati normal, tidak terbentuknya pigmen formalin di sediaan serta bisa disimpan dalam waktu yang lama (Suprianto *et al.*, 2014). Hewan coba adalah hewan yang digunakan sebagai contoh atau model dalam penelitian dan pengamatan laboratorium untuk membantu pembelajaran dan pengembangan dalam berbagai bidang ilmu. Hewan coba yang sering digunakan adalah mencit (*Mus musculus*), tikus putih (*Rattus norvegicus*), kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), dan hamster (*Mesocricetus auratus*). Sekitar 40-80% hewan coba laboratorium adalah mencit karena memiliki siklus hidup yang singkat, jumlah anak per kelahiran banyak, memiliki variasi sifat yang tinggi, mudah ditangani, dan anatomi dan fisiologinya terdeskripsi dengan baik (Tolistiawaty *et al.*, 2014). Mencit sering digunakan untuk mempelajari secara sistematis dampak diet dan faktor lingkungan lainnya serta genotipe penjamu pada keragaman mikroba di traktus intestinal untuk dihubungkan kembali dengan kondisi pada manusia. Meskipun mencit dan manusia memiliki banyak fitur anatomi, histologis, dan fisiologis yang serupa di usus mereka, ada perbedaan yang sangat besar dalam ukuran, kecepatan metabolisme, dan kebiasaan makan. Tidak mengherankan jika ada perbedaan besar dalam mikrobiota usus tidak hanya dalam representasi kualitatif taksa tetapi terutama dalam kontribusi kuantitatifnya. Meskipun

begitu tidak ada alternatif yang lebih baik dari mencit (Hugenholtz & de Vos, 2018).

Penelitian sebelumnya pada tahun 2018 oleh Musyarifah & Agus, menyatakan waktu fiksasi optimal tergantung pada beberapa faktor dan bervariasi tergantung dengan jenis agen fiksatif yang digunakan, contohnya ketebalan spesimen jaringan, suhu, kapasitas *buffering*, penetrasi zat fiksatif, dan rasio volume. Fiksasi berkepanjangan dapat menyebabkan hilangnya reaktivitas antigen, penyusutan dan pengerasan spesimen. Penelitian sebelumnya oleh Rahmadani tahun 2018 menyimpulkan jaringan hepar dan ginjal yang difiksasi dengan NBF 10% selama 6 dan 24 jam diperoleh hasil sediaan yang baik, sedangkan pada fiksasi 7 hari didapatkan hasil yang tidak baik karena terjadi fiksasi berlebihan. Jaringan yang difiksasi menggunakan metanol selama 6, 24 jam, dan 7 hari secara keseluruhan mendapatkan hasil yang kurang baik. Selain itu dilakukan uji non parametrik *Kruskal Wallis Test* terhadap sampel dan didapatkan hasil bahwa tidak ada pengaruh lama fiksasi NBF 10% dan metanol terhadap gambaran mikroskopis.

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, peneliti tertarik untuk meneliti tentang pengaruh perbedaan waktu fiksasi khususnya pada periode 3, 24, dan 48 jam saat pembuatan sediaan histologi usus halus mencit jantan menggunakan larutan *Neutral Buffered Formalin* 10% terhadap kualitas gambaran histologi dari sediaan histologi yang dibuat.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *true experimental*.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman Samarinda dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Ibu dan Anak Jimmy Medika Borneo Samarinda pada bulan Mei 2023. Populasi dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur *Swiss Webster* didapat dari Rumah Boni Petstore Banjarbaru yang memiliki berat badan normal yaitu 20–40 gram, dan usia yang telah mencapai maturitas seksual yaitu >49 hari. Sampel pada penelitian ini adalah sediaan usus halus dari mencit (*Mus musculus*) jantan yang diberikan perlakuan perbedaan waktu fiksasi sesuai dengan kriteria penelitian. Metode pengambilan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *probability sampling* dengan teknik *simple random sampling*. Bahan dan alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain ketamine, NBF 10%, kaset *embedding*, alkohol dengan konsentrasi bertingkat, xylol, parafin, alat *tissue processing*, mikrotom, pewarna Hematoksin-Eosin (HE), dan mikroskop.

Penelitian dimulai dengan aklimatisasi mencit selama 7 hari, dilanjutkan dengan pengambilan usus halus mencit yang dimulai dengan euthanasia pada mencit menggunakan ketamine. Selanjutnya usus halus yang didapat dipotong hingga hanya menyisakan bagian duodenum, lalu usus halus dimasukkan ke dalam wadah berisi larutan NBF 10%. Perbedaan perlakuan dilakukan pada fase ini di mana tiga wadah yang masing-masing berisi tiga usus halus mencit akan didiamkan pada suhu ruangan dengan durasi yang berbeda. Satu

wadah akan merepresentasikan satu kelompok di mana Kelompok 1 akan difiksasi dengan durasi 3 Jam, Kelompok 2 dengan durasi 24 Jam, dan Kelompok 3 dengan durasi 48 Jam. Setelah masing-masing kelompok memenuhi durasi fiksasi, sediaan usus halus tersebut akan diolah lebih lanjut ke proses histoteknik selanjutnya yaitu dehidrasi, infiltrasi, *embedding*, *trimming*, *coloring*, dan *labelling*. Setelah didapatkan preparat hasil pengolahan sediaan usus halus, preparat akan diobservasi menggunakan mikroskop dengan perbesaran total 400x dalam 5 lapangan pandang pada setiap sediaan untuk melakukan interpretasi kualitas sediaan dengan kriteria yang diadopsi dari Ariyadi & Suryono (2017) yaitu: Tidak Baik (1): Warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat tidak jelas, serta warna pada preparat tidak seragam. Sediaan tidak bisa didiagnosis. Kurang Baik (2): Warna biru pada inti sel kurang, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat kurang, serta keseragaman warna pada preparat kurang. Tetapi masih bisa didiagnosis. Baik (3): Warna biru terang pada inti sel, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan jaringan ikat serta warna pada preparat seragam. Hingga didapatkan hasil interpretasi 45 lapangan pandang yang selanjutnya diolah menggunakan *Microsoft Excel* dan *IBM SPSS Statistics 26*. Uji statistik yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui apakah data terdistribusi dengan normal. Apabila data terdistribusi dengan

normal maka akan dilakukan uji t tidak berpasangan, tetapi apabila data tidak terdistribusi normal maka akan dilakukan transformasi data, jika hasil transformasi data juga tidak terdistribusi normal maka akan

dilakukan uji *Kruskal-Wallis* untuk menguji data ordinal pada >2 kelompok tidak berpasangan. Hubungan antara kedua variabel dapat dikatakan berhubungan dan bermakna jika nilai $p < 0,05$.

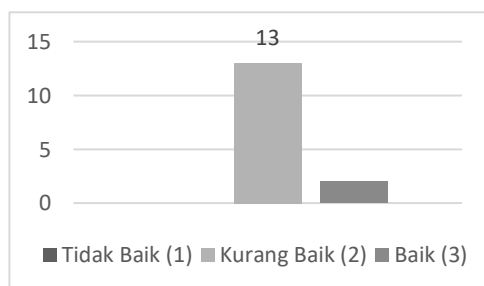
HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Analisis Data Hasil Observasi Sediaan

Lama Fiksasi	Kualitas Sediaan			Total	<i>p-value</i> <i>Kruskal-Wallis</i>
	Baik	Kurang Baik	Tidak Baik		
3 Jam	2	13	0	15	0,217
24 Jam	3	12	0	15	
48 Jam	6	9	0	15	
Total	11	34	0	45	

Sumber: Olahan Data Primer

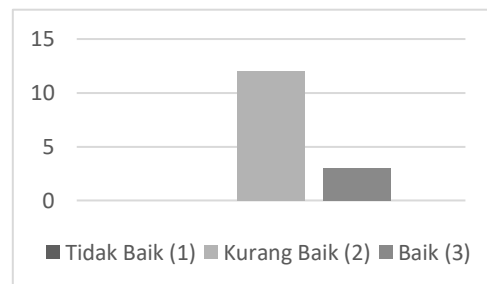
Berdasarkan hasil observasi yang ditunjukkan oleh Tabel 1. Karakteristik yang terlihat pada kelompok sampel sediaan yang difiksasi selama 3 jam menunjukkan kualitas baik terlihat dalam 2 lapangan pandang (13,3%) dan kualitas kurang baik terlihat dalam 13 lapangan pandang (86,7%), Tidak terdapat sediaan dengan kualitas tidak baik.



Gambar 1. Kualitas Sediaan Kelompok 3 Jam.

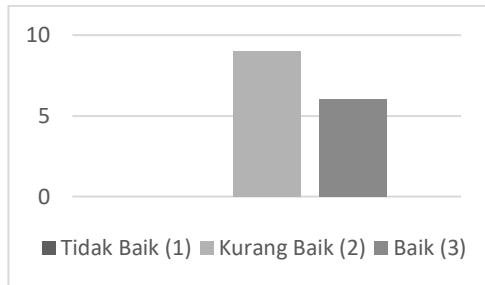
Kelompok sampel sediaan yang difiksasi selama 24 jam menunjukkan karakteristik berupa kualitas baik terlihat dalam 3 lapangan pandang (20%) dan kualitas kurang baik terlihat dalam 12 lapangan pandang (80%).

Sementara itu tidak terdapat sediaan dengan kualitas tidak baik.



Gambar 2. Kualitas Sediaan Kelompok 24 Jam.

Hasil pengolahan data kelompok sampel 48 jam menunjukkan kualitas baik terlihat dalam 6 lapangan pandang (40%) dan kualitas kurang baik terlihat dalam 9 lapangan pandang (60%). Sementara itu tidak terdapat sediaan dengan kualitas tidak baik.



Gambar 3. Kualitas Sediaan Kelompok 48 Jam.

Dari total 45 lapangan pandang yang diperiksa, hanya 11 (24,4%) lapangan pandang yang memiliki kualitas baik, dan 34 (75,6%) lapangan pandang lainnya memiliki kualitas kurang baik. Hasil ini tidak sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Jahira (2018) terhadap ginjal dan hati kelinci dengan metode yang sama yaitu menggunakan NBF 10% dan pewarna HE yang menyatakan fiksasi organ ginjal dan hati kelinci dengan menggunakan larutan NBF 10% dan menggunakan pewarnaan Hematoksin-Eosin dengan waktu fiksasi 8, 16, dan 24 jam hasil gambar rata-rata baik yaitu warna biru terang pada inti sel, warna merah (eosin) pada sitoplasma dan warna pada preparat seragam. Di sisi lainnya hasil ini mendekati hasil dari penelitian Buesa & Peshkov (2012) yang menggunakan 60 sampel dari payudara, uterus, hati, kulit dan lemak abdominal yang difiksasi selama 8, 24, dan 48 jam pada temperatur 20-22°C menggunakan NBF dengan rasio volume banding jaringan meningkat, pada penelitian tersebut didapatkan hasil yang menunjukkan peningkatan kualitas seiring meningkatnya waktu fiksasi dan bertambahnya rasio volume NBF banding jaringan.

Uji statistik yang dilakukan untuk menentukan signifikansi hubungan antara kedua variabel adalah uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* terlebih dahulu untuk mengetahui apakah data terdistribusi

dengan normal, didapatkan hasil signifikansi = 0,000 yang berarti data tidak berdistribusi normal, maka dilakukan lagi Uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan fungsi transformasi data menggunakan Ln pada komputasi variabel *IBM SPSS Statistics 26*, didapatkan hasil yang sama yaitu signifikansi = 0,000 yang berarti data tidak terdistribusi normal. Uji t tidak berpasangan tidak dilakukan karena data tidak terdistribusi normal, maka Uji *Kruskal-Wallis* dilakukan untuk mengetahui hubungan antara lama waktu fiksasi menggunakan NBF 10% dan kualitas sediaan histologi usus halus mencit jantan. Nilai *p-value* yang didapatkan adalah $p = 0,217$ ($p > 0,005$) sehingga dapat disimpulkan tidak terdapat hubungan yang bermakna antara lama waktu fiksasi menggunakan NBF 10% dan kualitas sediaan histologi usus halus mencit jantan. Hal ini sejalan dengan penelitian Rahmadani, *et al.* (2018) yang menyatakan tidak ada pengaruh lama fiksasi NBF 10% dan metanol terhadap gambaran mikroskopis.

Tidak ditemukannya hubungan yang bermakna antara waktu fiksasi dan kualitas dari sediaan sendiri kemungkinan disebabkan oleh sifat fiksasi yang multifaktorial sehingga satu faktor saja tidak dapat menentukan kualitas sediaan dengan signifikan. Faktor-faktor tersebut antara lain temperatur, durasi, jenis larutan fiksatif, ukuran jaringan, dan pH larutan akan mempengaruhi hasil (Pawitra Miranti, 2010). Hal ini sesuai dengan pernyataan Buesa & Peshkov (2012) yang menyatakan fiksasi dengan NBF dan dilanjutkan oleh infiltrasi parafin tergantung oleh waktu dan temperatur. Penggunaan NBF dengan rasio volume 2:1

dengan jaringan setebal 3 mm seharusnya cukup untuk memastikan *cross-linking* dalam waktu 48 jam pada suhu yang umum di kebanyakan laboratorium yaitu 25°C. Waktu fiksasi selama 48 jam akan meningkatkan *turnaround time* (TAT) atau waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan hasil melebihi batas yang dapat diterima, maka idealnya setiap laboratorium harus mengembangkan protokol fiksasi dalam 45°C untuk mengurangi waktu fiksasi menjadi 10 jam.

Cara temperatur mempengaruhi waktu fiksasi dapat dijelaskan oleh sifat NBF sendiri yang melakukan fiksasi dengan mekanisme *cross-linking*. Musyarifah & Agus (2018) menjelaskan larutan fiksatif yang menggunakan mekanisme *cross-linking* bereaksi dengan protein serta komponen sel dan jaringan di mana suatu ikatan kimia larutan fiksatif diambil dan menjadi bagian dari jaringan dengan cara mengisi dan membentuk *cross-link* inter-molekul atau intra-molekul. Hasil dari ikatan *cross-linking* ini adalah perubahan konformasi pada struktur protein dan selanjutnya inaktivasi dari enzim. Peningkatan suhu pada semua reaksi kimia, akan meningkatkan kecepatan fiksasi dan akan meningkatkan dilusi dari agen fiksatif ke dalam jaringan. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa semakin tinggi suhu maka akan semakin cepat reaksi kimia yang terjadi, dalam konteks ini semakin tinggi suhu akan mempercepat proses *cross-linking* yang menjadi mekanisme fiksasi NBF sehingga TAT yang didapatkan semakin singkat. Perlu diingat bahwa dalam penelitian ini, peneliti menggunakan suhu ruangan dalam proses fiksasi, maka kecepatan fiksasi dari penelitian ini akan memberikan hasil

dan membutuhkan waktu fiksasi yang berbeda dari penelitian yang menggunakan suhu 45°C. Hal ini juga menjelaskan hasil dari masing-masing kelompok yang kualitasnya terus meningkat seiring semakin lamanya waktu fiksasi. Selain faktor yang telah disebutkan sebelumnya, penetrasi merupakan faktor yang tak kalah pentingnya dalam mempengaruhi kualitas dari suatu sediaan. Menurut Khristian & Inderiati (2017) fiksasi dipengaruhi oleh penetrasi larutan yang dapat dihitung dengan rumus:

$$d = K\sqrt{t}$$

Keterangan:

d = jarak penetrasi

K = koefisien difusi (bervariasi tergantung jenis larutan)

t = waktu

Jadi (K) adalah jarak dengan skala milimeter yang dapat ditempuh oleh suatu larutan dalam waktu 1 jam. Jadi dengan (K) dari formalin = 0,79. Maka apabila kita mengambil contoh dari Kelompok I yang memiliki perlakuan lama waktu fiksasi 3 jam kita dapat memperkirakan seberapa dalamnya penetrasi larutan NBF ke dalam jaringan usus halus mencit sebagai berikut:

$$d = 0,79 \times \sqrt{3}$$

$$d = 1,37$$

Jarak penetrasi dalam 3 jam hanya 1,37 mm, sementara itu usus halus mencit yang diperoleh memiliki ketebalan yang bervariasi dari 1 mm hingga 1,5 mm. Maka kemungkinan penetrasi larutan yang tidak adekuat menyebabkan kurangnya kualitas dari kelompok 3 jam di samping faktor lainnya seperti suhu. Ini didukung oleh pernyataan Werner, *et al.* (2000) yang menyatakan interupsi pada proses formaldehid sebelum selesai akan menyebabkan *cross-linking* hanya terjadi di bagian perifer dari blok jaringan.

Penelitian ini tentu memiliki keterbatasan, di antaranya adalah adanya jarak waktu antara fase fiksasi dengan fase dehidrasi dengan interval sekitar 1 jam, hal ini disebabkan kesalahpahaman pada proses penelitian. Hal ini tentu saja mempengaruhi hasil penelitian. Tetapi, untuk meminimalkan dampak dari keterbatasan ini yaitu over-fiksasi, larutan NBF 10% akan dikeluarkan dari wadah berisi jaringan yang sudah memenuhi waktu yang ditentukan untuk masing-masing kelompoknya (3, 24, dan 48 Jam) sebelum dilanjutkan ke proses selanjutnya. Keterbatasan penelitian lainnya adalah alat penelitian yang cenderung sudah tua dan memiliki mekanisme manual sehingga sangat bergantung pada ketelitian laboran dalam pengerjaannya, hal ini dapat menyebabkan hasil penelitian yang diperoleh tidak memiliki kualitas sebaik penelitian serupa yang menggunakan alat-alat termutakhir yang tersedia, contoh alat yang kemungkinan mempengaruhi hasil penelitian ini adalah alat *tissue processing*, alat mikrotom, dan mikroskop. Mikroskop yang digunakan sebagai alat bantu dokumentasi memiliki garis penunjuk yang tidak digunakan untuk menunjukkan struktur tertentu seperti sel ataupun kelenjar karena pada penelitian ini hal yang menjadi fokus observasi adalah kualitas sediaan secara umum. Selain alat-alat yang digunakan dalam penelitian, peneliti juga tidak dapat memastikan bahan-bahan yang digunakan setelah proses fiksasi memiliki kualitas yang prima untuk digunakan dalam penelitian.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang telah diuraikan, dapat disimpulkan tidak ada hubungan yang signifikan antar lama waktu fiksasi menggunakan NBF 10% dengan kualitas sediaan histologi usus halus mencit jantan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyadi, T., & Suryono, H. (2017). Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode Microwave dan Conventional Histoprocessing Pewarnaan Hematoxylin Eosin. *Jurnal Labora Medika*, 1(1), 7–11.
- Atik, R. (2019). Perbandingan Fiksasi Larutan Bouin dan Formalin pada Sediaan Preparat Histologi Testis Marmut. *Jurnal Kedokteran: Media Informasi Ilmu Kedokteran Dan Kesehatan*, 4(2), 5–9.
- Buesa, J. R., & Peshkov, M. V. (2012). How Much Formalin is Enough to Fix Tissues. *Annals of Diagnostic Pathology*, 16, 202–209.
- Ganjali, Hamed, (2012). Tissue processing: An Overview. *Annals of Biological Research*, 3(11): 5374-5378.
- Hugenholtz, F., & de Vos, W. M. (2018). Mouse Models for Human Intestinal Microbiota Research: a Critical Evaluation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(1), 149–160.
- Jahira. (2018). *Pengaruh Lama Fiksasi terhadap Gambaran Mikroskopis dengan Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Juliati. Darmawati, S. & Ariyadi, T. (2017). *Gambaran Mikroskopis Carcinoma Mammae Yang Difiksasi Dengan Netral Buffer Formalin 10% dan Alkohol*

- 70% pada pewarnaan
Hematoxylin – Eosin.
Universitas Muhammadiyah
Semarang.
- Khristian, E., & Inderiati, D. (2017).
Sitohistoteknologi.
Kementerian Kesehatan
Republik Indonesia.
- Mescher, A., & Junqueira, L. (2013).
*Junqueira's Basic Histology:
Text and Atlas*. 13th Edition.
McGraw-Hill Education.
- Musyarifah, Z., & Agus, S. (2018).
Proses Fiksasi pada
Pemeriksaan Histopatologik.
Jurnal Kesehatan Andalas,
7(3), 443–453.
- Pawitra Miranti, I. (2010).
Pengolahan Jaringan untuk
Penelitian Hewan Coba.
Media Medika Muda, (4).
- Rahmadani, A. F., Dewi, S. S., &
Iswara, A. (2018). *Pengaruh
Lama Fiksasi BNF 10% dan
Metanol terhadap Gambaran
Mikroskopis Jaringan dengan
Pewarnaan HE (Hematoxylin-
Eosin)*. Universitas
Muhammadiyah Semarang.
- Suprianto, A., In'am Ilimiawan, M., &
Trianto, H. F. (2014).
*Perbandingan Efek Fiksasi
Formalin Metode Intravital
Dengan Metode
Konvensional pada Kualitas
Gambaran Histologis Hepar
Tikus*. Universitas
Tanjungpura. Pontianak.
- Tolistiawaty, I., Widjaja, J.,
Sumolang, P. P. F., &
Octaviani. (2014). Gambaran
Kesehatan pada Mencit (*Mus
musculus*) di Instalasi Hewan
Coba. *Jurnal Vektor Penyakit*,
8(1), 27–32.
- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., &
Battifora, H. (2000). Effect of
Formalin Tissue Fixation and
Processing on
Immunohistochemistry. *The*

