

Perbedaan Kualitas Preparat Jantung Tikus Pada Proses Deparafinisasi Menggunakan Xylol dan Minyak Pinus pada Pewarnaan HE

*Differences in the Quality of Rat Heart Preparations in the Deparaffinization Process Using
Xylol and Pine Oil in HE Staining*

Ilham Maulana Mahendra¹, Meutia Srikandi Fitria²

^{1,2} Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang

Corresponding author: meutia@unimus.ac.id

Abstrak

Proses pewarnaan jaringan diawali dengan proses deparafinisasi dengan tujuan melunturkan sisa paraffin pada jaringan. Larutan yang sering digunakan adalah xylol, tetapi xylol memiliki efek toksik sehingga diperlukan larutan bahan alam yang aman untuk digunakan. Minyak pinus memiliki kandungan senyawa terpenoid yang berpotensi sebagai pengganti xylol. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui perbedaan kualitas preparat jaringan tikus pada proses deparafinisasi menggunakan xylol dan minyak pinus pada pewarnaan HE. Jenis penelitian ini adalah eksperimental. Sampel yang digunakan sebanyak 30 preparat sediaan jantung tikus dengan pewarnaan HE. Metode penelitian diawali dengan pembedahan tikus, preparasi jaringan, pewarnaan HE dengan dua jenis deparafinisasi yaitu dengan xylol, minyak pinus tanpa pemanasan dan minyak pinus dengan pemanasan 60°C, dan pengamatan menggunakan mikroskop. Hasil preparat yang dideparafinisasi menggunakan xylol didapatkan hasil baik sebesar 100%, preparat dengan minyak pinus tanpa pemanasan didapatkan hasil baik sebesar 90%, dan preparat minyak pinus dengan pemanasan didapatkan hasil baik sebesar 70%. Hasil uji normalitas menunjukkan data tidak berdistribusi normal sehingga diuji non parametrik Kurskal-Wallis Test dengan nilai signifikansi 0,000 maka p value <0,05. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat perbedaan kualitas preparat antara xylol dengan minyak pinus.

Kata Kunci : alternatif, deparafinisasi, xylol, minyak pinus

Abstract

The tissue staining process begins with deparaffinization to dissolve the remaining paraffin in the tissue. The solution that is often used is xylol, but xylol has a toxic effect so a natural material solution that is safe to use is needed. Pine oil contains terpenoid compounds that have the potential to replace xylol. This study aimed to determine the difference in the quality of rat tissue preparations in the deparaffinization process using xylol and pine oil in HE staining. This type of research is experimental. The samples used were 30 preparations of rat heart preparations with HE staining. The research method begins with rat dissection, tissue preparation, HE staining with two types of deparaffinization: xylol, pine oil without heating and pine oil with 60 ° C heating, and observation using a microscope. The results of preparations deparaffinized using xylol obtained good results of 100%, preparations with pine oil without heating obtained good results of 90%, and pine oil preparations with heating obtained good results of 70%. The results of the normality test showed that the data were not normally distributed so that the non-parametric Kurskal-Wallis Test was tested with a significance value of 0.000, so the p value <0.05. This study concludes that there is a difference in the quality of preparations between xylol and pine oil.

Keywords : alternative, deparaffinization, xylol, pine oil

PENDAHULUAN

Pewarnaan yang umum digunakan untuk sediaan histologi jaringan adalah hematoksilin eosin (HE) (Ellyawati, 2018). Hematoksilin akan memberi warna biru pada nukleus dan eosin akan memberi warna merah muda pada sitoplasma (Mescher, 2016). Prosedur awal pewarnaan HE adalah deparafinisasi. Deparafinisasi yaitu suatu tahap untuk menghilangkan parafin dari preparat. Larutan yang digunakan untuk proses deparafinisasi harus dapat menyatu dengan larutan alkohol sehingga dapat mendesak keluar dan menggantikan suasana jaringan. Larutan yang biasa digunakan adalah xylol atau toluol untuk melarutkan parafin yang berupa lemak (Sumanto, 2014).

Xylol biasa digunakan untuk proses clearing dan deparafinisasi dalam histopatologi dan imunohistokimia, akan tetapi xylol memiliki kekurangan yaitu harganya relatif mahal dan berbahaya untuk tubuh (Sari, 2021). Efek toksik xylol apabila digunakan terus-menerus antara lain dapat merusak jantung dan ginjal, neurotoksisitas akut, hepatotoksisitas, diskrasia darah yang fatal, kulit kering, eritema kulit, dan memiliki sifat karsinogenik (Pandey *et al.*, 2014). Oleh karena itu, diperlukan bahan alam sebagai alternatif pengganti xylol yang lebih aman digunakan.

Bahan alam yang dapat digunakan antara lain minyak zaitun, minyak wortel, minyak mawar, dan minyak pinus dapat digunakan sebagai pengganti xylol pada proses clearing (Swamy *et al.*, 2015; Sermadi *et al.*, 2019; Tsamiya *et al.*, 2021). Minyak pinus merupakan salah satu bahan alam yang memiliki komponen tinggi asam lemak tak jenuh. Minyak pinus tergolong senyawa hidrokarbon dan bersifat non polar (Shufyani *et al.*, 2018). Kandungan senyawa minyak pinus yaitu terpenoid yang termasuk dalam kategori minyak atsiri hidrokarbon yang mempunyai sifat-sifat seperti larut dalam alkohol, eter, kloroform, asam asetat glasial, serta bersifat optis aktif. Minyak pinus memiliki banyak manfaat pada bidang industri cat seperti sebagai pengencer (*thiner*), sebagai perekat, dan pelarut lilin, industri farmasi digunakan sebagai obat luar (Amini dkk., 2014).

Penelitian Udonkang *et al.* (2014) menyebutkan bahwa minyak mineral yang dipanaskan dengan suhu 60°C dapat digunakan sebagai pengganti xylol. Pemanasan dapat mengurangi rantai karbon pada larutan. Asam lemak pada minyak pinus memiliki ikatan atom karbon yang lebih banyak dibandingkan xylol karena asam lemak mudah teroksidasi sehingga minyak pinus akan kehilangan rantai karbon lebih cepat dibandingkan xylol dan dapat membantu menyetarakan ikatan karbon antara xylol dan minyak pinus (Cahyono *et al.*, 2018).

Objek dari penelitian ini adalah organ jantung karena terdapat berbagai selaput serta minyak sebagai pelumas yang dapat mempengaruhi penyerapan parafin pada jaringan serta mempengaruhi proses deparafinisasi sehingga perlu diteliti. Penelitian tentang penggunaan minyak pinus sebagai pengganti *xylol* dalam proses deparafinisasi belum pernah dilakukan sebelumnya. Oleh karena itu diperlukan penelitian tentang perbedaan kualitas preparat jantung pada proses deparafinisasi menggunakan xylol dan minyak pinus pada pewarnaan HE.

METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sitohistoteknologi Universitas Setia Budi Surakarta pada bulan Januari 2024. Jenis penelitian ini adalah eksperimental. Alat yang digunakan adalah mikrotom, kaset pengolahan jaringan, *chamber cat*, pinset, *stain jar*, *waterbath*, *object glass*, *deck glass*, *base mold* cetakan *blocking*, alat *embedding* dan *stopwatch*. Bahan-bahan yang digunakan pada proses pengolahan dan pengecatan

histologi jaringan adalah sampel jaringan jantung tikus, NBF 10%, NaCl fisiologis, alkohol (70%, 80%, 95%, 100%), larutan *xylol*, etanol, minyak pinus, hematoksin eosin, aquadest, parafin, eter dan entelan.

1. Prosesing Jaringan dan Pembuatan Preparat

Prosesing jaringan diawali dengan anestesi tikus dengan menggunakan larutan eter. Pada proses pembedahan tikus dimulai dari rongga perut bawah dan diambil organ jantung tikus yang dibutuhkan untuk pembuatan preparat. Setelah pengambilan organ jantung tikus segera dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis untuk membersihkan jaringan dari sisa-sisa darah yang menempel. Setelah tahap pembersihan organ jantung kemudian dilakukan pemotongan dengan ukuran 2x1 dengan ketebalan 5 mm. jaringan yang sudah dipotong lalu dimasukkan ke dalam kaset *embedding* kemudian dilakukan proses fiksasi menggunakan larutan NBF 10% selama 24 jam.

Jaringan yang telah difiksasi kemudian dilanjutkan ke tahap dehidrasi yaitu merendam jaringan ke dalam alkohol bertingkat (70%, 80%, 96%, dan alkohol absolut) secara berurutan dari konsentrasi terendah ke konsentrasi tertinggi. Alkohol 70% I dan alkohol 70% II masing-masing selama 30 menit, kemudian alkohol 80% I dan alkohol 80% II masing-masing selama 30 menit, lalu alkohol 96% selama 30 menit yang selanjutnya alkohol 96% lagi akan tetapi selama satu malam (12 jam). Setelah itu dimasukan dalam alkohol absolute (100%) I dan alkohol absolute II masing-masing selama 30 menit. Tahap dehidrasi digunakan untuk menarik cairan fiksasi dan air keluar.

Selanjutnya jaringan dilakukan tahap *clearing* menggunakan *xylol* I 60 menit dan *xylol* II 60 menit. Setelah *clearing* dilakukan tahap *embedding* dilakukan menggunakan parafin padat yang dicairkan pada suhu 50-60°C. Jaringan dimasukkan ke dalam parafin I selama 60 menit dan paraffin II selama 60 menit. Parafin cair dituang ke dalam cetakan blok (*base mold*) kemudian jaringan dimasukan ke dalam cetakan yang berisi paraffin di tutup dengan *cassette*. Setelah blok parafin mengeras kemudian dilanjutkan ke tahap pemotongan jaringan menggunakan mikrotom dengan ketebalam 3 µm. hasil potongan dari blok parafin berupa pita dimasukan ke dalam *waterbath* yang sudah diisi dengan air yang dihangatkan ± 45°C kemudian jaringan diambil dengan *object glass* lalu preparat diinkubasi di oven selama 15 menit pada suhu ± 60°C dan dilanjutkan pada proses pewarnaan Hematoksin Eosin (HE).

2. Pewarnaan Hematoksin Eosin

Jaringan dipotong menjadi 30 preparat yang dibagi menjadi 3 perlakuan masing-masing 10 preparat. Perlakuan 1 dengan *xylol*, perlakuan 2 dengan minyak pinus tanpa pemanasan, dan perlakuan 3 dengan minyak pinus dengan pemanasan. Setiap tahapan dijelaskan dalam prosedur.

Tahap pewarnaan jaringan menggunakan HE diawali dengan tahap deparafinisasi untuk menghilangkan sisa parafin serta menjernihkan jaringan. Preparat jaringan sebanyak 10 di rendam dalam *xylol* I selama 10 menit, *xylol* II selama 10 menit, dan *xylol* III 10 menit. Pada 10 jaringan lainnya dilakukan deparafinisasi menggunakan minyak pinus I, minyak pinus II, minyak pinus III masing- masing 10 menit tanpa pemanasan. Pada 10 jaringan lainnya dilakukan deparafinisasi menggunakan minyak pinus yang sudah dipanaskan dengan suhu 60°C selama 45 menit minyak pinus I, minyak pinus II, minyak pinus III masing-masing 10 menit. Setelah dilakukan deparafinisasi kemudian keringkan setiap preparat percobaan dengan *hair dryer*. Rehidrasi preparat dengan mencelupkan preparat pada alkohol absolute (100%) sebanyak 30 celup, alkohol (96%,

80%, 70%) masing-masing 15 celup dan aquadest 15 celup. Preparat yang sudah melalui tahapan deparafinisasi dan rehidrasi kemudian selanjutnya dimasukan dalam pewarna hematoxylin selama 5 menit untuk deparafinisasi menggunakan *xylol*, dan 5 menit untuk deparafinisasi menggunakan minyak pinus tanpa pemanasan dan dengan pemanasan 60°C. Setelah itu preparat dibilas dengan air mengalir 5 menit untuk preparat yang dideparafinisasi dengan *xylol*, dan 5 menit untuk preparat yang di deparafinisasi menggunakan minyak pinus tanpa pemanasan dan dengan pemanasan 60°C.

Selanjutnya preparat dicelupkan pada alkohol 70% I sebanyak 15 celup dan alkohol 70% II sebanyak 15 celup. Tahap berikutnya preparat dimasukan ke dalam eosin selama 1 menit. Setelah itu dilakukan dehidrasi dengan cara mencelupkan preparat pada alkohol 70% sebanyak 15 celup, alkohol 80% sebanyak 15 celup, alkohol 96% sebanyak 15 celup, alkohol 100% sebanyak 15 celup. Kemudian preparat dilakukan clearing dengan *xylol* I dan *xylol* II masing-masing selama 10 menit untuk deparafinisasi menggunakan *xylol*, dan 10 menit untuk deparafinisasi menggunakan minyak pinus tanpa dan dengan pemanasan. Tahap terakhir yaitu *mounting* dengan menutup preparat dengan entelan dengan cara satu tetes etelan diteteskan pada preparat kemudian ditutup *deck glass*.

3. Teknik Pengumpulan data dan Analisis Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini menggunakan data primer. Hasil yang terkumpul disajikan secara deskriptif sesuai tabel kriteria penilaian kualitas mikroskopis sediaan jantung tikus (*Rattus novergicus*) yang dideparafinisasi dengan minyak pinus dan *xylol* dan skoring.

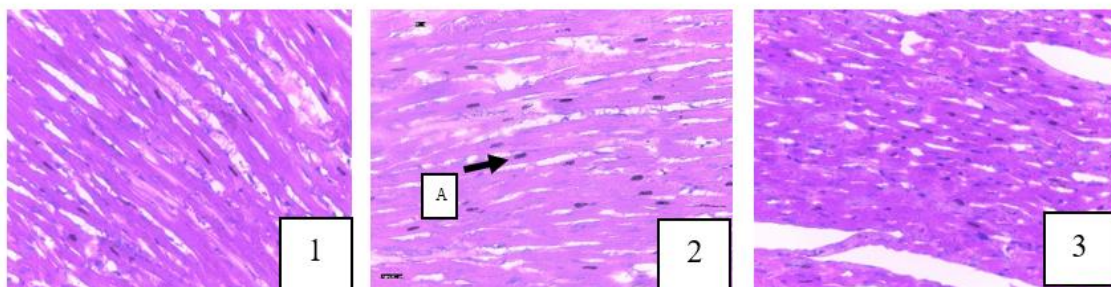
Tabel 1. Kriteria Penilaian Kualitas Pengecatan

No.	Deskripsi	Skor
1.	Warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma tidak jelas, warna preparat tidak terdapat keseragaman.	1 (tidak baik)
2.	Warna biru pada inti sel kurang jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma kurang jelas, warna preparat kurang seragam.	2 (kurang baik)
3.	Warna biru pada inti sel jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma jelas, warna preparat terdapat keseragaman.	3 (baik)

Data skoring kemudian dianalisis dengan uji normalitas menggunakan Uji Shapiro Wilk kemudian dilakukan uji perbedaan menggunakan uji non parametrik Kurskal-Wallis Test.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan sediaan otot jantung tikus secara mikroskopis dengan perbesaran objektif 40x diperoleh hasil sebagai berikut:



Gambar 1. Preparat jantung tikus yang dideparafinisasi dengan xylol (1), deparafinisasi dengan minyak pinus tanpa pemanasan (2), deparafinisasi dengan minyak pinus pemanasan 60°C. Ket: (A) inti sel

Berdasarkan gambar 1, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan preparat secara mikroskopis yaitu pada preparat yang dideparafinisasi dengan xylol, minyak pinus tanpa pemanasan, dan minyak pinus dengan pemanasan. Inti sel terlihat lebih jelas pada yang dideparafinisasi dengan xylol dan minyak pinus tanpa pemanasan.

Tabel 2. Penilaian Kualitas Preparat Jaringan Jantung

Perlakuan	Penilaian					
	Skor 1 (Tidak baik)		Skor 2 (Kurang baik)		Skor 3 (Baik)	
	Jumlah	%	Jumlah	%	Jumlah	%
Xylol	0	0	0	0	10	100%
Minyak pinus tanpa pemanasan	0	0	1	10%	9	90%
Minyak pinus dengan pemanasan 60°C	0	0	3	30%	7	70%

Berdasarkan tabel 2, penilaian yang dilakukan menunjukkan bahwa minyak pinus tanpa pemanasan memiliki penilaian yang lebih baik yaitu 90% dibandingkan dengan minyak pinus dengan pemanasan 60°C yaitu 70%. Hasil uji statistik ditunjukkan pada tabel berikut ini:

Tabel 3. Hasil Uji Statistik

Uji Statistik	Nilai Sig
<i>Shapiro-Wilk Test</i>	0,000
<i>Kruskal-Wallis Test</i>	0,000

Data yang diperoleh dari pembacaan secara mikroskopis pada preparat jantung dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk Test*. Berdasarkan hasil pengujian data diperoleh nilai signifikansi 0,000 yang berarti nilai *p value* <0,05 menunjukkan hasil berdistribusi tidak normal sehingga dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis Test*. Hasil uji tersebut didapatkan hasil signifikansi 0,000 maka *p value* <0,05, sehingga didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan kualitas sediaan jaringan jantung pada proses deparafinisasi menggunakan xylol dengan deparafinisasi menggunakan minyak pinus.

PEMBAHASAN

Deparafinisasi adalah tahapan awal untuk proses pewarnaan sebelum melakukan pewarnaan HE. Tujuannya adalah untuk melunturkan sisa parafin setelah prosesing jaringan, selain itu juga untuk menjernihkan jaringan dari beberapa komponen biokimia yang dapat mengganggu pewarnaan preparat. Larutan yang digunakan untuk proses deparafinisasi harus menyatu dengan larutan alcohol sehingga dapat menggantikan larutan xylol dan toluol untuk melarutkan parafin yang berupa lemak (Sumanto, 2014; Bancroft, 2012). Larutan deparafinisasi yang baik bersifat non polar, kemampuan melunturkan parafin cepat, dan dampak kerusakan terhadap jaringan kecil.

Pada umumnya, paraffin yang dipakai adalah dapat mencair sempurna pada suhu dibawah 60°C. Paraffin yang terkandung dalam jaringan seharusnya dilarutkan dalam *xylol*, pada penelitian ini minyak *xylol* di ganti dengan minyak atsiri pinus. Minyak pinus mengandung senyawa terpenoid yang didalamnya mengandung limonen yang sifatnya sama dengan *xylol*. Pada penelitian (Dewi, 2020) menyebutkan bahwa asam sitrat dan limonen dapat digunakan sebagai agen deparafinisasi. Cairan minyak pinus bersifat asam dengan pH 6.5-7.5 yang dapat membantu memperjelas inti sel jaringan pada proses pewarnaan hematoxylin. Kandungan limonen memiliki sifat non polar yang hanya larut dalam alkohol dan pelarut organik. Minyak pinus yang digunakan murni 100% dengan konsentrasi paling tinggi 50% tanpa adanya campuran bahan lainnya.

Kualitas preparat otot jantung yang di deparafinisasi menggunakan *xylol* pada 10 preparat otot jantung menunjukkan hasil yang baik sebesar 100% yang dapat dilihat pada gambar 1 dengan warna inti dan sitoplasma terwarnai dengan jelas. *Xylol* disebut sebagai agen deparafinisasi yang baik karena sifat mudah larut dalam alkohol dan membuat jaringan menjadi transparan (Kandyala *et al.*, 2010). Pada penelitian yang dilakukan (Amilia, 2022) menyatakan bahwa *xylol* dapat digantikan dengan minyak atsiri atau minyak atsiri jeruk bali (*Citrus maxima*) tanpa pemanasan dan yang dipanaskan pada suhu 60°C bertujuan untuk menghilangkan sisa paraffin yang masih terdapat dalam jaringan pada proses deparafinisasi, sehingga pada penelitian ini juga melakukan perbandingan kualitas preparat yang dideparafinisasi menggunakan minyak atsiri pinus yang dilakukan tanpa pemanasan dan pemanasan pada suhu 60°C. Kualitas sediaan jaringan ginjal tikus yang telah dideparafinisasi menggunakan Minyak pinus tanpa pemanasan menunjukkan gambaran mikroskopis yang sama baiknya dengan yang dideparafinisasi menggunakan *xylol* dengan densitas warna inti dan sitoplasma serta warna sediaan yang seragam

Pada 10 sediaan jantung tikus yang dideparafinisasi menggunakan minyak pinus tanpa pemanasan didapat hasil penilaian baik sebesar 90%, dan didapat nilai kurang baik sebesar 10% karena warna biru pada inti kurang jelas dan sitoplasma dominan merah (eosin) namun masih bisa dibedakan. *Xylol* dapat digantikan sebagai agen deparafinisasi dengan minyak atsiri yang dipanaskan pada suhu 60°C (Swamy, 2015). Hasil pewarnaan HE dengan menggunakan minyak pinus tanpa pemanasan didapat hasil 90% baik karena minyak pinus dalam kandungannya mengandung *limonene* yang memiliki sifat non polar yang dapat melarutkan lemak atau paraffin yang terdapat pada jaringan pada gambar 1. Hasil 10% menunjukkan hasil kurang baik pada gambar 1 yang lebih dominan warna merah. Faktor yang mungkin dapat mempengaruhi deparafinisasi yaitu ketebalan jaringan, larutan yang digunakan, dan waktu pada saat perendaman didalam larutan agen deparafinisasi (Mayangsari, 2019).

Hasil pewarnaan HE dengan menggunakan 10 preparat yang di deparafinisasi menggunakan minyak pinus dengan pemanasan 60°C didapat hasil 70% baik, 30% kurang baik, dapat dilihat pada gambar 1. Faktor yang menyebabkan hasil kurang baik dan tidak baik disebabkan karena paraffin tidak luntur dengan sempurna, waktu pewarnaan tidak sesuai, proses menghilangkan warna yang terlalu kuat serta zat warna kurang terserap dengan baik (Sari dan Rahmawati, 2021). Hasil kurang baik disebabkan oleh proses deparafinisasi belum sempurna sehingga cat tidak masuk pada jaringan. Selain itu terdapat faktor lain menyebabkan pewarnaan *hematoxylin* eosin kurang baik yaitu penghilangan terhadap paraffin yang tidak sempurna, waktu pewarnaan yang tidak sesuai, proses menghilangkan warna yang terlalu kuat, pemotongan jaringan terlalu tebal sehingga zat warna kurang terserap dengan baik (Widyastani dkk., 2021).

Pada penelitian ini preparat yang dideparafinisasi terdapat perbedaan antara tanpa pemanasan dan dengan pemanasan 60°C. Mekanisme yang mempengaruhi terjadinya perbedaan hasil pada penelitian ini yaitu peningkatan suhu. Peningkatan suhu dapat menyebabkan pada proses pewarnaan penyerapan warna terlalu banyak dan warna pada inti sel dan sitoplasma tidak terlihat jelas. Minyak pinus tidak mempunyai kemampuan untuk melunturkan lemak atau paraffin pada suhu pemanasan 60°C (Amilia, 2022).

Pengecatan HE terdapat dua cat wana yaitu *hematoxylin* dan eosin. Inti sel yang bersifat asam akan menarik *hematoxylin* yang bersifat basa sehingga inti sel berwarna biru, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan menarik cat eosin yang bersifat asam sehingga sitoplasma berwarna merah (Kristian & Inderiati, 2017). Keberhasilan dari suatu pewarnaan tergantung dari proses awal yang dilakukan, proses awal salah satunya yang sangat menentukan keberhasilan pewarnaan adalah deparafinisasi (Aulia dkk., 2017). Mekanisme senyawa terpena dapat melunturkan parafin salah satunya yaitu terpen dapat melelehkan parafin karena sifat lipofiliknya, sehingga memungkinkannya berdifusi secara pasif melalui membran dan berinteraksi dengan molekul parafin (Xin, 2021)

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat perbedaan hasil pada deparafinisasi tanpa pemanasan dan dengan pemanasan 60°C. Berdasarkan uji *Kruskal-Wallis Test* dengan nilai sig $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan terhadap kualitas preparat jaringan jantung tikus pada proses deparafinisasi menggunakan xylol dan minyak pinus.

DAFTAR PUSTAKA

- Amini, R.W., Masruri, dan Rahman, M.F. 2014. Analisis Minyak Terpentin (Pinus merkusii) Hasil Produksi Perusahaan Lokal dan Perdagangan Menggunakan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (KG-SM) Serta Metode Pemurniannya. *Kimia Student Journal* Vol. 1 No. 1 (Hal 147-153). <https://media.neliti.com/media/publications/247560-analisis-minyak-terpentin-pinus-merkusii-9b74a884.pdf>
- Aulia, R.S., Hafy, Z., dan Subandrate, S. 2017. Hubungan Metode Deparafinisasi dengan Kuantitas dan Kualitas Ekstrak DNA Hasil Isolasi dari Sampel Arsip Jaringan dalam Blok Parafin Terfiksasi Formalin. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan* Vol. 4 No. 1 (Hal 32-39). <https://ejournal.unsri.ac.id/index.php/jkk/article/view/6093>
- Bancroft, J.D. 2012. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 7th ed., China: Book.
- Cahyono, B.E., Misto, M., Mukaroomah, L. 2018. Sifat Histerisis Pada Konstanta Dielektrik dan Indeks Bias Minyak Zaitun dengan Variasi Suhu. *Jurnal Pendidikan Fisika dan Keilmuan (JPFK)* Vol. 4 No. 2 (Hal 48-54). <https://doi.org/10.25273/jpfk.v4i2.2179>
- Dewi, T.M.K. 2020. Perbedaan Kualitas Sediaan Ginjal Marmut Pada Proses Deparafinisasi Menggunakan Minyak Kayu Putih Pada Pewarnaan HE (Hematoxylin Eosin). *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Ellywati. 2018. Penentuan Waktu yang Tepat pada Proses Staining dalam Pembuatan Preparat Histologi Hati. *Jurnal TEMAPELA* Vol. 1 No. 1 (Hal 28-30). <https://doi.org/10.25077/temapela.1.1.28-30.2018>

- Amilia, F.R. 2022. Perbandingan Kualitas Preparat Ginjal Menggunakan Xylol dan Minyak Atsiri Jeruk Bali (*Citrus maxima*) Pada Proses Deparafinisasi Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). *KTI*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Kandyala, R., Raghavendra, S.P.C. and Rajasekharan, S.T. Xylene: An Overview of Its Health Hazard and Preventive Measure. *Journal Oral Maxillofac Pathology* Vol 14 No. 1 (hal 1-5). <https://doi.org/10.4103/0973-029X.64299>
- Khristian, E. dan Inderiati, D. 2017. *Buku Ajar Teknologi Laboratorium Medis (TLM) Sitohistoteknologi*. Jakarta: Kemenkes.
- Mayangsari, M.A. 2019. Perbedaan Kualitas Preparat Ginjal Marmut Pada Proses Deparafinisasi Menggunakan Xylol dan Minyak Zaitun pada Pewarnaan HE. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Mescher, A.L. 2016. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. USA: McGraw Hill.
- Pandey, P., Dixit, A., Tanwar, A., Sharma, A., and Miftal, S. 2020. A Comparative Study to Evaluate Liquid Dish Washing Soap as an Alternative to Xylene and Alcohol in Deparaffinization and Hematoxylin and Eosin Staining. *Journal of Laboratory Physicians* Vol. 6 No. 2 (Hal 84-90). DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-2727.141504>
- Sari, Y.N. dan Rahmawati, Y. 2021. Literature Review: Perbandingan Perasan Jeruk (*Citrus* sp.) dan Xylol sebagai Agen Deparafinisasi pada Sediaan jaringan dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin. *Skripsi*. Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.
- Sermadi, W.Z.M, Niranjana, K.C., Acharya, S., Prabhu, S., and Killedar, S. 2019. Olive oil as an xylene substitute. *Journal of Oral Medicine, Oral Surgery, Oral Pathology, and Oral Radiology* Vol. 5, No. 2 (Hal 46-51). <http://doi.org/10.18231/j.joooo.2019.013>
- Shufyani, F., Pratiwi, A., dan Siringoringo, W.P. 2018. Koefisien Fenol Produk Desinfektan yang Beredar di Salah Satu Supermarket Kota Lubuk Pakam. *Jurnal Penelitian Farmasi Herbal* Vol. 1 No. 1 (Hal 11-16). <http://ejournal.delihusada.ac.id/index.php/JPFH>
- Sumanto, D. 2014. Belajar Sitohistoteknologi Untuk Pemula. Semarang: IAKIS.
- Swamy, S.R.G., Nandan, S.R.K., Kulkarni, P.G., Rao, T.M., and Palakurthy, P. 2015. Bio-Friendly Alternatives for Xylene-Carrot Oil, Olive Oil, Pine Oil, Rose Oil. *Journal Clinical and Diagnostic Research* Vol. 9 No. 11 (Hal 16-18). <http://doi.org/10.7860/JCDR/2015/16384.6731>
- Tsamiya, R.I., Muhammad, H.T., M.O. Mohammed, U. Abubakar, I. Muhammaed, A.T. Muhammad, and A.S. Ajayi. Comparative Evaluation of Clove, Olive, and Groundnut Oil's Clearing Ability in Tissue Processing. *Journal of Medical Laboratory Science* Vol 31 No. 1 (hal 43-53). <http://doi.org/10.5281/zenodo.4641412>
- Udonkang, M., Eluwa, M., Ekanem, A., Sharma, T. B., Asuquo, O. R., Akpantah, A. O. (2014). Bleached palm oil as substitute for xylene in histology. *J Pharm Clin Res*. Vol. 8 (Hal 8-17). www.arpapress.com/Volumes/JPCS/Vol8/JPCS_8_02.pdf
- Widyastani, F.A., Widyaningtyas, N.A., dan Tarius, A. 2021. Pemanfaatan Belimbing Wuluh sebagai Alternatif Larutan Deparafinisasi Mikro Pada Jaringan Mammae. *Jurnal Nurse* Vol. 4 No. 2 (Hal 74-83). <https://ejournal.stikeskesosi.ac.id/index.php>
- Xin, A. and Herburger, K. 2021. Mini Review: Transport of Hydrophobic Polymers Into The Plant Apoplast. *Frontier in Plant Sciece* Vol. 11 (Hal 1-8). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.590990>