

Perbandingan Kualitas Sediaan Jaringan Hepar Mencit Menggunakan Xylene dan Minyak Zaitun dengan Pemanasan 60°C sebagai Larutan Penjernih (Clearing)

Comparison of the Quality of Mouse Hepar Tissue Preparations Using Xylol and Olive Oil with 60°C Heating as Clearing Solution

Putri Purnama Sari¹, Meutia Srikandi Fitria²

^{1,2} Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang

Corresponding author : meutia@unimus.ac.id

Abstrak

Clearing (tahap penjernihan) merupakan salah satu langkah penting pada proses pewarnaan. *Xylene* biasanya digunakan sebagai larutan clearing rutin, namun paparan jangka panjang memiliki efek toksik bagi penggunaannya. Bahan alam yang digunakan untuk alternatif pengganti *xylene* salah satunya adalah minyak zaitun yang memiliki kelebihan tidak beracun. Penelitian ini berprinsip Bernoulli dengan menerapkan metode pemanasan yang bertujuan untuk menurunkan viskositas larutan dan mempercepat proses penjernihan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbandingan kualitas sediaan jaringan hepar mencit menggunakan *xylene* dan minyak zaitun dengan pemanasan 60°C sebagai alternatif larutan penjernih. Metode penelitian dilakukan secara eksperimental dan desain penelitian *cross sectional* dengan dua kelompok perlakuan yaitu penjernihan menggunakan *xylene* dan minyak zaitun dengan pemanasan. Prosedur diawali dengan pembedahan mencit dan diambil jaringan hepar, lalu dilakukan processing jaringan, kemudian pewarnaan dilakukan dengan Hematoksilin eosin lalu diamati kualitas mikroskopisnya. Data diolah dengan uji *Shapiro wilk* dan uji *Kruskal walis*. Kualitas preparat kelompok *xylene* didapatkan skor baik sebanyak 10 preparat, sedangkan kelompok minyak zaitun diperoleh skor baik 6 preparat dan skor kurang baik 4 preparat. Uji normalitas menunjukkan hasil p-value <0,05 yaitu 0,00 dengan sebaran tidak normal, dilanjutkan dengan uji *Kruskal walis* menunjukkan bahwa p-value > 0,05 dengan nilai signifikansi 1,000 sehingga menunjukkan tidak ada perbedaan. Kesimpulan dari penelitian ini adalah minyak zaitun dengan pemanasan 60°C dapat digunakan sebagai alternatif penjernihan jaringan.

Kata Kunci : alternatif, minyak zaitun, penjernihan, *xylene*

Abstract

Clearing is one of the important steps in the dyeing process. Xylene is usually used as a routine clearing solution, but long-term exposure to xylene has toxic effects on users. One of the natural materials used as an alternative to xylene is olive oil, which is non-toxic. This research applies the Bernoulli principle with heating to reduce the viscosity of the solution and accelerate the purification process. This study aimed to compare the quality of mice hepatic tissue preparations using xylene and olive oil with 60 ° C heating as an alternative clarifying solution. The research method was conducted experimentally and cross-sectional research design with two treatment groups: clearing using xylene and olive oil with heating. The procedure begins with dissection of mice and hepatic tissue is taken, then tissue processing is carried out, then staining is carried out with Hematoxylin eosin and then observed for microscopic quality. Data were processed with the Shapiro-Wilk test and the Kruskal walis test. The quality of the xylene group preparations obtained a good score of 10 preparations, while the olive oil group obtained a good score of 6 preparations and a poor score of 4 preparations. The normality test shows the results of p-value <0.05 which is 0.00 with abnormal distribution, followed by the Kruskal walis test showing that p value > 0.05 with a significance

value of 1.000 so that it shows no difference. This study concludes that olive oil with 60 ° C heating can be used as an alternative to tissue clearing.

Keywords: *alternative, olive oil, clearing, xylene*

PENDAHULUAN

Hewan coba mencit memiliki anatomi fisiologinya mirip seperti manusia (Tolistiawati *et al.*, 2014). Mencit sering digunakan penelitian karena dapat dibeli dalam jumlah banyak, murah, jinak, dan penanganan mudah. Hepar mencit merupakan salah satu organ yang sering digunakan karena pengambilannya mudah dan sel hepatosit lebih besar sehingga mudah diidentifikasi pada sediaan histologinya (Maschel *et al.*, 2012). Histopatologi merupakan ilmu yang mempelajari tentang jaringan biologis yang digunakan untuk menilai kualitas dan kondisi jaringan menggunakan mikroskop. Prosesing jaringan memiliki tahapan seperti proses fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi, *embedding*, *sectioning* dan pewarnaan. Pewarnaan berfungsi agar sediaan tersebut dapat diamati dibawah mikroskop (Ramamoorthy *et al.*, 2016). Tahap penjernihan (*clearing*) adalah tahapan penting histoteknik, karena *xylene* sering digunakan sebagai larutan penjernih. Namun, paparan jangka pendek serta jangka panjang *xylene* dapat merusak sistem imun tubuh manusia dan memiliki efek racun bagi penggunaannya. Hal ini yang menyebabkan peneliti terdahulu mengidentifikasi kemampuan minyak nabati yang bersifat lebih aman sebagai alternatif pengganti *xylene* (Annisa *et al.*, 2023; Alwahaibi & Aldughaisi, 2019).

Tsamiya *et al.*, (2021) menyatakan bahwa terdapat beberapa minyak nabati seperti minyak kacang tanah, minyak mawar, minyak cadar, minyak kelapa, minyak pinus, dan minyak zaitun memiliki efektifitas untuk menggantikan *xylene*. Minyak nabati tersebut dapat tidak mengurangi kualitas sediaan, penyusutan jaringan, memiliki sifat *non-hazard*, stabil terhadap panas, dan menghasilkan kualitas pewarnaan baik. Minyak zaitun adalah minyak nabati yang memiliki komponen asam lemak tak jenuh yang tergolong dalam senyawa hidrokarbon dan bersifat nonpolar. Kesamaan antara minyak zaitun dan *xylene* adalah pada senyawa hidrokarbon dan fenol yang berfungsi untuk menghilangkan larutan dehidrasi (alcohol) serta sebagai perantara larutan infiltrasi pada jaringan (Boskou, 2015). Penelitian Annisa *et al.* (2023) menyatakan bahwa penjernihan (*clearing*) menggunakan *xylene* dan minyak zaitun dengan pemanasan 45°C menunjukkan nilai $p=0,382$ sehingga didapatkan hasil kualitas sediaan yang tidak ada beda. Minyak zaitun dengan pemanasan dapat menjernihkan jaringan serta menghasilkan kualitas sediaan yang baik dengan rata-rata hasil penilaian hampir setara dengan *xylene*.

Pewarnaan sediaan memiliki kualitas yang baik dengan menunjukkan hasil preparat tampak jelas pada morfologi jaringannya, sitoplasma dan jaringan ikat berwarna kemerahan, serta inti sel berwarna biru pada pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE). Kualitas pewarnaan dari pengganti larutan penjernih (*clearing*) hampir seluruhnya setara dengan *xylene*. Tahap pewarnaan dapat dilakukan setelah melewati proses pematangan jaringan (Swamy *et al.*, 2015).

Faktor yang mempengaruhi proses pematangan jaringan adalah suhu dan viskositas. Viskositas minyak tergantung pada suhu, jika suhu *clearing* dinaikan maka viskositas minyak menurun dan laju penetrasi minyak meningkat seperti prinsip Bernoulli (Swamy *et al.*, 2015). Penggunaan minyak zaitun murni dalam proses *clearing* tidak dapat digunakan di suhu kamar, sehingga harus dilakukan pemanasan pada suhu 30°C, 60°C, dan 90°C. Suhu yang ditingkatkan dapat menyebabkan mudahnya pengeluaran alkohol sehingga jaringan dapat dijernihkan dengan baik. Selain peningkatan suhu, energi kinetik dan laju difusi molekul minyak meningkat, sehingga menyebabkan penurunan viskositas (Ghosh *et al.*, 2016). Oleh karenanya, peneliti akan melakukan penelitian tentang pengaruh pemanasan minyak zaitun pada suhu 60°C terhadap kualitas sediaan.

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti ingin melakukan penelitian tentang perbandingan kualitas sediaan jaringan hepar mencit menggunakan xylene dan minyak zaitun dengan pemanasan 60°C sebagai larutan penjernih (*Clearing*).

METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2024 di Laboratorium Sitohistotenologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Jenis penelitian yang dilakukan adalah metode experimental dengan rancangan penelitian cross sectional. Alat yang digunakan adalah pisau jaringan (*micro knife*), kaset cut mate jaringan, chamber, mikrotom, water bath, objek glass, deck glass, *embedding station*, mikroskop. Bahan yang digunakan adalah *neutral buffered formalin* 10%, alkohol 70%, 80%, 96% absolute, *xylene*, etanol, paraffin cair, Hematoksilin eosin.

1. Prosedur pemotongan

Dua potong jaringan hepar yang dipilih dari bagian yang sama (identik) diiris dengan ukuran 2 x 1 cm dan ketebalan 2 mm, lalu dimasukkan kedalam 4 kaset.

2. *Processing* jaringan

Tahap-tahap prosesing jaringan dengan menggunakan pewarnaan Hematoksilin eosin terdiri dari beberapa langkah seperti persiapan alat dan bahan yang digunakan. Kaset dimasukkan ke dalam tabung dengan menggunakan buffer formalin 10% dan dibiarkan selama 24 jam untuk proses fiksasi. Kemudian jaringan mengalami tahap dehidrasi dengan merendam dalam alkohol bertingkat (70%, 80%, 96%, alkohol absolut 1, 2, dan 3) selama masing-masing 30 menit. Proses *clearing* dilakukan dengan menggunakan reagen *xylene* pada tabung selama 45 menit. Setelah itu tahapan infiltrasi dilakukan dengan memasukkan jaringan ke dalam tabung berisi parafin cair selama 45 menit. Kemudian proses pengeblokan menggunakan parafin cair dituangkan ke dalam cetakan (*base mold*), dan jaringan dimasukkan ke dalam cetakan yang telah diisi parafin cair. Cetakan kemudian ditekan agar jaringan semakin menempel pada dasar cetakan. Tutup cetakan kaset diambil, diletakkan di atas cetakan, dan ditekan. Nomor sampel atau etiket ditulis di pinggir kaset. Proses ini dibiarkan hingga parafin membeku, setelah itu dikeluarkan dari cetakan. Kemudian pemotongan Blok Parafin, Blok parafin ditempatkan

pada penjepit kaset mikrotom, dan dipotong dengan ketebalan 3 μm dan sudut 30° diatur secara pasif. Pemutar mikrotom diputar menggunakan tangan kanan sampai jaringan terpotong menjadi lembaran pita dengan ketebalan 3 μm . Lembaran jaringan diambil dan diletakkan di waterbath yang sudah di setting dengan suhu 50° C, sampai mengembang. Lembaran jaringan diambil menggunakan objek glass untuk proses selanjutnya (Sumarno, 2012).

3. Pewarnaan Hematoksilin eosin

Prosedur yang digunakan melibatkan beberapa langkah, pertama deparafinisasi dengan xylene 2 kali selama 2 menit. Kemudian dihidrasi dengan alkohol bertingkat Alkohol 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 80%, 70% selama 2 menit, distilled water selama 3 menit. Setelah itu, preparat diinkubasi dalam larutan hematoksilin selama 15 menit. Preparat dicuci di air mengalir selama 15-20 menit. Setelah itu dilakukan observasi di bawah mikroskop, bila masih terlalu biru cuci lagi di air mengalir selama beberapa menit. Bila sudah cukup warnanya dilanjutkan ke langkah selanjutnya. *Counterstaining* dilakukan menggunakan Eosin *working solution* selama 15 detik hingga 2 menit tergantung dari lama eosin pernah digunakan dan kedalaman warna yang diinginkan. Dehidrasi dilakukan dengan alkohol berseri dengan gradasi meningkat perlahan mulai 70% hingga 100% masing-masing 2 menit. Penjernihan dan dealkoholisasi dilakukan dengan xylene dua kali selama 2 menit (Jusuf, 2009).

4. Skoring Jaringan

Kualitas sediaan jaringan hepar dibagi menjadi 3 kategori yaitu :

Tabel 3.

Skoring Jaringan

No.	Deskripsi	Nilai
1.	Warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma tidak jelas, warna preparate tidak sama.	1 (Tidak baik)
2.	Warna biru pada inti sel kurang jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma kurang jelas, warna preparate kurang sama.	2 (Kurang baik)
3.	Warna biru pada inti sel jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma jelas, warna preparate sama.	3 (Baik)

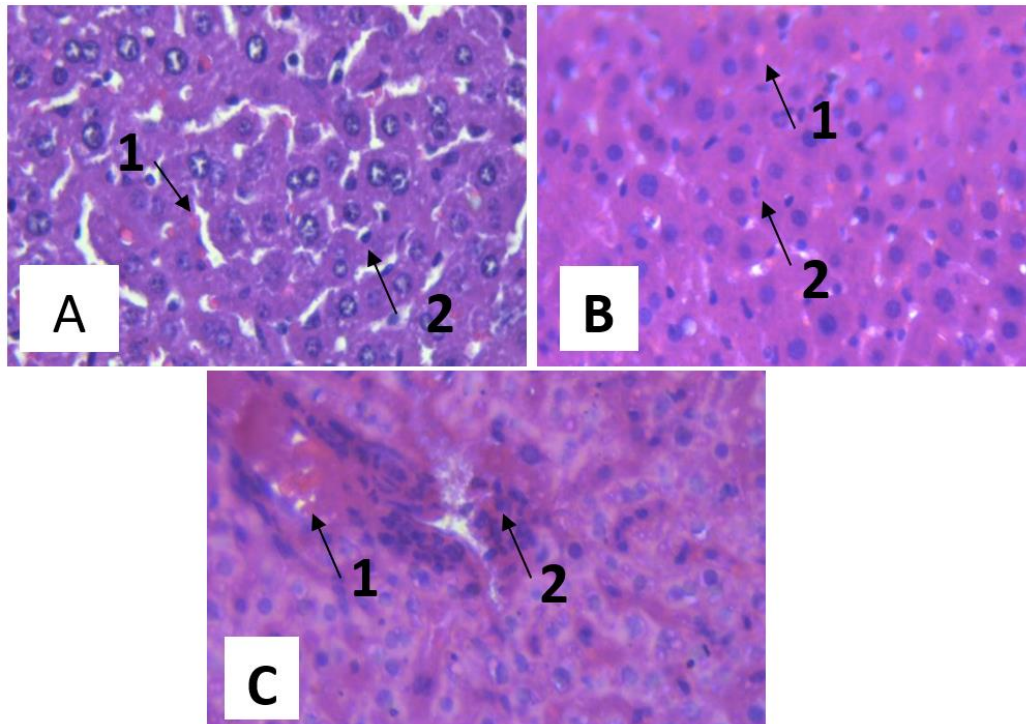
5. Analisis Data

Data hasil skoring jaringan dibaca oleh dokter Spesialis patologi anatomi dan dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Selanjutnya dilakukan uji *Kruskal wallis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pewarnaan hepar mencit diamati dan dinilai oleh dokter spesialis PA di Rumah Sakit Panti Wilasa Dr. Cipto Semarang. Hasil pengamatan hepar mencit dapat dilihat pada gambar 1.

Gambar 1 :
Hasil Pewarnaan Hepar Mencit



Gambar 1. Hasil sediaan jaringan hepar mencit dengan 3 penilaian. Keterangan A) xylene dengan skor 3, B) minyak zaitun dengan pemanasan 60°C dengan skor 3, C) minyak zaitun dengan pemanasan 60°C dengan skor 2. Keterangan: 1 = sitoplasma, 2= inti sel.

Pada gambar tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan hasil antara hasil clearing dengan xylene dan minyak zaitun. Hasil menunjukkan bahwa clearing dengan xylene mendapatkan hasil skor 3 (baik) untuk semua sediaan sedangkan untuk minyak zaitun dengan pemanasan ada yang memiliki skor 3 (baik) dan 2 (kurang baik).

Tabel 2.
Data Hasil penilaian sediaan secara mikroskopis

Perlakuan dan Kode	Kategori Poin		
	(1) Tidak Baik	(2) Kurang Baik	(3) Baik
Menggunakan <i>Xylene</i> (X)	0	0	10
Menggunakan Minyak Zaitun dengan pemanasan 60°C (MZ)	0	4	6

Pada tabel 2 menunjukkan bahwa terdapat 10 sampel dengan nilai baik pada sediaan dengan *xylene*. Sedangkan, pada sediaan dengan minyak zaitun dengan pemanasan 60°C terdapat 4 sediaan dengan nilai kurang baik dan 6 sampel dengan nilai baik.

Tabel 3.
Uji Normalitas data dengan uji *Shapiro wilk*

Kualitas Preparat	Shapiro Wilk Sig.
<i>Xylene</i>	0.000
Minyak Zaitun dengan pemanasan 60°C	

Berdasarkan tabel 4 hasil uji normalitas data menggunakan *shapiro wilk* didapatkan signifikansi $p=0.000$ yang berarti seluruh variable memiliki sebaran data tidak normal ($p < 0.05$), karena sebaran data tidak normal maka dilanjut uji *Kruskal wallis*.

Tabel 4.
Hasil Uji *Kruskal wallis*

	Pain Score
Chi-Square	.000
	1
Asymp. Sig	1.000

Hasil uji *Kruskal wallis* diatas diperoleh berdasarkan nilai signifikansi 1.000 ($p>0.05$) yang mana H_0 dan H_a diterima. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan kualitas preparat jaringan hepar mencit pada proses *clearing* menggunakan *xylene* dan minyak zaitun dengan pemanasan 60°C.

Pembahasan

Preparat histologi yang baik memiliki sitoplasma terwarnai merah muda dan inti sel berwarna biru yang terlihat jelas (Bancroft, 2018; Jusuf, 2009). Preparat jaringan pada proses *clearing* menggunakan *xylene* didapatkan skor 3 (baik) sedangkan menggunakan minyak zaitun dengan pemanasan 60°C didapatkan skor 3 (baik) dan 2 (kurang baik), hal tersebut disebabkan oleh beberapa faktor seperti pada penelitian Ariyadi *et al.*, (2017) dan Erick *et al.*,(2017) karena pemotongan jaringan terlalu tipis, proses deparafinasi yang kurang sempurna serta masih terdapat sisa parafin pada jaringan yang membuat zat warna tidak dapat mengikat dan menyerap pada jaringan. Selain itu dapat dipengaruhi oleh waktu pewarnaan eosin yang terlalu singkat sehingga perlu ditingkatkan waktu pewarnaannya atau kualitas eosin yang menurun sehingga pergantian eosin yang baru diperlukan. Hal lain yang menyebabkan hasil kurang baik adalah dekolonisasi zat warna eosin terlalu berlebihan.

Hasil uji *kruskal wallis* diperoleh signifikansi 1,000 yang berarti $p\text{-value} > 0,05$ maka H_0 dan H_a diterima sehingga tidak ada perbedaan kualitas preparat jaringan hepar pada proses *clearing* menggunakan *xylene* dan minyak zaitun dengan pemanasan 60°C. Kualitas preparat baik pada kelompok *xylene* disebabkan oleh beberapa faktor, seperti yang pada penelitian Faridah (2019) yang menyatakan bahwa *xylene* adalah larutan *clearing* rutin yang mempunyai tingkat kelarutan yang tinggi terhadap larutan dehidran dan media infiltrasi. *Xylene* membuat efek transparan pada preparat sehingga dapat menghasilkan kualitas pewarnaan dan preparat yang baik.

Kualitas preparat yang menggunakan minyak zaitun dengan pemanasan diperoleh hasil baik dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti dapat meningkatkan pH komponen sel sitoplasma. Pada sitoplasma tersebut memiliki sifat basa sehingga akan mengikat eosin yang bersifat asam dan dapat memperkuat intensitas warna sitoplasma. Menurut Ghosh *et al.* (2016) kualitas sediaan yang baik pada minyak zaitun dengan pemanasan dipengaruhi oleh adanya pemanasan. Penggunaan suhu seperti 30°C, 60°C, dan 90°C dapat mempermudah proses *clearing* karena minyak zaitun murni tidak dapat digunakan pada suhu kamar. Peningkatan suhu dapat menyebabkan pengeluaran alkohol dengan mudah sehingga jaringan dapat dijernihkan dengan baik. Selain peningkatan suhu tersebut, energi kinetik dan laju difusi molekul minyak meningkat, sehingga menyebabkan penurunan viskositas. Pemanasan dapat melisiskan lemak pada jaringan yang menyebabkan pelebaran celah atau pori-pori jaringan. Penurunan viskositas larutan yang disebabkan karena proses pemanasan menyebabkan peningkatan kinetik molekul larutan dalam menetrasi jaringan (Khristian, 2017).

Minyak zaitu memiliki ikatan atom karbon yang lebih banyak dibandingkan *xylene* karena pemanasan tersebut rantai karbon dapat berkurang. Hal tersebut menyebabkan asam lemak mudah teroksidasi dan minyak zaitun akan kehilangan rantai karbon lebih cepat dibandingkan *xylene*. Pemanasan juga membantu menyetarakan ikatan karbon antara *xylene* dengan minyak zaitun (Sermadi *et al.*, 2019).

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah tidak ada perbedaan antara clearing atau penjernihan dengan xylene atau dengan minyak zaitun dengan pemanasan 60° C.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyadi, T. dan Suryono, H. 2017. Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode Microwave dan Conventional Histoprocessing Pewarnaan Hematoxylin Eosin. *Jurnal Labora Medika* Vol. 1 No. 1 (Hal 7-11).
<https://core.ac.uk/download/pdf/234037908.pdf>
- Alwahaibi, N. Y., & Aldughaishi, S. H. (2019). A substitute to xylene in deparaffinization and clearing prior to coverslipping in histopathology. *Journal of Laboratory Physicians*, 11(02), 118–122. doi: [10.4103/JLP.JLP.169.18](https://doi.org/10.4103/JLP.JLP.169.18)
- Annisa, A.S. dan Sofyanita, E.N. 2023. Pengaruh Penggunaan Minyak Zaitun dengan Pemanasan sebagai Larutan Penjernih (Clearing) Terhadap Kualitas Sediaan Jaringan Hepar Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Labora Medika* Vol. 7 No. 1 (hal 6-12). [10.26714/jlabmed.7.1.2023.6-12](https://doi.org/10.26714/jlabmed.7.1.2023.6-12)
- Bancroft JD. 2018 *Theory and Practice of Histological Techniques*. 18th ed. New York: Elsevier.
- Boskou Dimitrios, editor., 2015. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*. 1st Woodhead.
- Erick, K., Inderati, D. 2017. BPPSDM SITO HISTOTEKNOLOGI (Vol. 148).
- Faridah, Tulus, A., Fitri, N. (2019). Perbedaan Densitas Warna Inti dan Sitoplasma Preparat Ginjal Marmut pada Proses Clearing Menggunakan Xylol dengan Minyak Gandapura (*Gaultheria fragrantissima*) pada Pembuatan Sediaan Jaringan. *Prosiding Mahasiswa Seminar Nasional Unimus* Volume 2, 1–7. <http://prosiding.unimus.ac.id>
- Ghosh, S., Roopa, S.R., Shwetha, N., Vanisri, C.H., Dominic, A., Sowmya., and Shankargouda, P. 2016. *Quest for Biofriendly Xylene Substitutes in Histopathology: A Comparative Study*. 8 (hal 1101-1104).
- Jusuf A.A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Jakarta. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Khristian, E. dan Inderiati, D. 2017. *Buku Ajar Teknologi Laboratorium Medis (TLM) Sitohistoteknologi*. Jakarta: Kemenkes.
- Meschel AL. 2012. *Histologi Dasar Junqueira*. 12th. Jakarta: EGC. (hal 396–398).
- Ramamoorthy, A., Shivani, R., Nadeem, J., Radhika, T., and Sunitha, J. 2016. Natural Alternatives for Chemicals Used in Histopathology Lab-A. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Vol. 10 No. 11 (Hal 1-4).
[10.7860/JCDR/2016/23420.8860](https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/23420.8860)
- 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.joo.2019.013>

-
- 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. 2021. 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>
- Tolistiawaty I, Widjaja J, Sumolang PPF, Octaviani., 2014. Gambaran Kesehatan pada Mencit (*Mus musculus*) di Instalasi Hewan Coba. *Journal Vektro Penyakit*.8th (hal 27–32). [10.22435/VEKTORP.V8I1.7527.27-32](https://doi.org/10.22435/VEKTORP.V8I1.7527.27-32)