

## POTENSI MINYAK GANDAPURA SEBAGAI PENGGANTI XILOL DALAM PEMBUATAN SEDIAAN MIKROSKOPIS OTAK MENCIT

**Erick Khristian**

*Program Studi Analis Kesehatan, Stikes Jenderal Achmad Yani Cimahi*

### ABSTRAK

Xilol merupakan suatu bahan yang berbahaya dan bersifat toksik. Penggunaan xilol di laboratorium Patologi Anatomi sangatlah umum untuk tahap “clearing” baik untuk proses pematangan jaringan maupun pewarnaan. Xilol digunakan di laboratorium Patologi Anatomi karena sifatnya yang dapat larut dengan agen dehidrasi dan dapat melarutkan paraffin sebagai agen pengeras. Xilol merupakan bagian dari hidrokarbon layaknya minyak Gandapura. Penelitian bertujuan untuk mencari alternative pengganti xilol telah dilakukan dengan menggunakan minyak Gandapura menggunakan metode eksperimental. Sampel menggunakan otak hewan uji mencit yang dapat menunjukkan adanya celah pembuluh darah dengan jaringan ikat akibat penggunaan agen “clearing”. Parameter yang digunakan adalah deskripsi sediaan dan pewarnaan, intensitas warna inti, warna sitoplasma dan artifak berupa sisa paraffin dan celah pada pembuluh darah terhadap jaringan ikat. Hasil penelitian menunjukkan penggunaan minyak gandapura secara deksripsi tidak berbeda dalam sediaan jaringan. Minyak gandapura disinyalir dapat merubah tingkat keasaman sel menuju basa yang ditandai dengan menurunkan intensitas inti dan meningkatnya intensitas sitoplasma. Artifak yang muncul pada penggunaan minyak gandapura masih menunjukkan adanya celah pembuluh darah dengan jaringan ikat. Pengembangan untuk kesempurnaan minyak gandapura adalah dengan menentukan waktu yang optimal dan perlu ada perlakuan lainnya guna menghilangkan aroma yang menyengat dari minyak Gandapura.

**Kata kunci:** Intensitas Inti, Intensitas Sitoplasma, Artifak, Tingkat Keasaman.

### ABSTRACT

*Xylol is a dangerous and toxic material. Xylol reagent in the Anatomy Pathology laboratory is very common for the "clearing" stage both for tissue processing and staining. Use of xylol in the Anatomic Pathology laboratory because of it is soluble with dehydration agents and can dissolve paraffin as a hardening agent. Xylol is part of hydrocarbons like gandapura oil. The aim of the research to find alternative substitutes for xylol had been carried out using gandapura oil. The method for this research is an experimental method. Sample for this research are animal brains of mice that can showing the presence of vessel shrinkage due to the use of "clearing" agents. The parameters this research are nucleus intensity, cytoplasm intensity and artifaks of paraffin residu and vessel shrinkage in connective tissue. The results showed that the use of gandapura oil produced good nucleus and cytoplasmic qualities compared to the use of xylol. Artifaks that appear in the use of gandapura oil is vessel shrinkage. The development for the perfecting of gandapura oil are determine the optimal time and need for other treatments to eliminate the pungent aroma of gandapura oil.*

**Keywords:** Nuclear Density, Cytoplasm, Contrast, Artifaks

### PENDAHULUAN

#### Tahap Pembuatan Sediaan Jaringan

Sediaan jaringan saat ini masih menjadi *gold standard* dalam penentuan terapi dan prognosis pasien khususnya dengan diagnosis kanker. metode pembuatan sediaan jaringan terdiri dari berbagai cara salah satunya adalah Teknik parafinisasi. Pembuatan sediaan jaringan Teknik parafinisasi perlu dilakukan tahapan-tahapan tertentu seperti fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi, embedding, mikrotomi dan perwarnaan sediaan. Hasil dari

keseluruhan tahapan tersebut dapat memberikan gambaran tentang bentuk, susunan sel, kualitas pewarnaan inti, sitoplasma dan lain sebagainya. Hasil tersebut diharapkan sesuai dengan gambaran jaringan dalam kondisi pada waktu masih hidup yang tahap akhirnya akan dibandingkan dengan kontrol kualitas (Mescher, 2016).

Fiksasi merupakan suatu tahapan awal yang wajib dilalui bak untuk sediaan sel maupun jaringan (Fajar 2015). Adapun setelah

tahap fiksasi dilakukan, tahap selanjutnya adalah tahapan yang sering diistilahkan dengan tahap “pematangan jaringan”. Tahapan pematangan jaringan terdiri dari tahapan dehidrasi, *clearing* dan infiltrasi. Proses pematangan jaringan yang dilakukan dengan baik akan mudah untuk menghasilkan sediaan jaringan yang tipis yang berkualitas baik serta tidak terjadi *artifak* di dalamnya (Khristian & Inderiati, 2017).

Tahapan dehidrasi adalah tahapan untuk menghilangkan air dan zat fiksatif dari komponen jaringan. Agen dehidrasi bersifat hidrofilik (suka air), memiliki kutub yang kuat berinteraksi dengan molekul air dengan cara mengikat hidrogen. Dehidrasi harus dilakukan secara perlahan. Jika gradien konsentrasi agen terlalu berlebihan, maka arus difusi osmosis dalam melintasi membran sel dapat menyebabkan terjadi kerusakan pada sel. Tahap dehidrasi ini, spesimen diproses menggunakan agen dengan konsentrasi meningkat dari konsentrasi terendah hingga absolut. Agen dehidran absolut dilakukan agar tahapan selanjutnya tidak akan akan mengganggu penetrasi agen “*clearing*” ke dalam jaringan (Khristian & Inderiati, 2017).

Tahap setelah dehidrasi adalah tahapan “*clearing*”. Tahapan “*clearing*” merupakan proses mengeluarkan agen dehidran dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan media infiltrasi. Agen “*clearing*” harus memiliki kemampuan penetrasi jaringan yang cepat, menghilangkan agen dehidrasi dengan cepat, mudah digantikan oleh agen infiltrasi, menimbulkan kerusakan jaringan yang minimal, tidak mudah terbakar, tidak bersifat toksisitas rendah dan relative murah (Khristian & Inderiati, 2017). Agen “*clearing*” yang umum digunakan saat ini adalah xilol dimana xilol ini baik dalam tahapan “*clearing*” namun tidak baik dalam tidak keamanan baik secara umum ataupun pekerja (teknisi laboratorium).

Tahapan setelah “*clearing*” adalah tahapan infiltrasi. Infiltrasi ini adalah suatu

tahapan memasukkan materi yang bersifat padat pada suhu ruang (teknik parafinisasi). Materi yang umum digunakan dalam tahapan ini adalah paraffin atau paraplast. Tahap ini dilakukan menggunakan alat bantu berupa oven yang berfungsi membuat materi menjadi bentuk cair pada suhu tertentu. Suhu yang digunakan tergantung dari titik leleh materi yang akan dimasukkan.

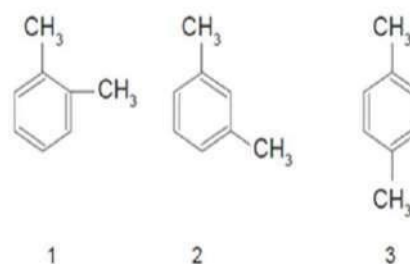
Setelah tahapan pematangan selesai dilakukan maka jaringan yang tahapan selanjutnya adalah penanaman pada suatu media yang sesuai dengan alat potong mikrotom. Tahapan ini harus memperhatikan posisi dari jaringan sehingga orientasi sel dapat terlihat sesuai dengan yang diharapkan.

## B. Xilol

Xilol merupakan suatu agen yang umum digunakan di laboratorium pembuatan sediaan histologi. Xilol memiliki tingkat kelarutan yang tinggi terhadap agen dehidran dan juga materi parafin. Xilol yang diberikan pada jaringan tersebut dapat memberikan efek transparan.

Xilol atau kadang disebut xylene atau dimetilbenzene memiliki rumus mulekul  $C_8H_{10}$  yang tertampil pada gambar 1. Berdasarkan indeks sifatnya, cilol diklasifikasikan ke dalam ABNT NBR 14725-

Klasifikasi tersebut menunjukkan bahwa xilol merupakan substansi yang mudah terbakar, cairan tidak berwarna, tidak larut dalam air, larut dalam alcohol absolut, ether dan senyawa organic lainnya (Hernandes, et al., 2017).



Gambar 1. Ortho Xilol (1); Mete Xilol (2); Para Xilol (3). Sumber: Xylene: Features, Risks and Management of Waste, 2017

Teknisi laboratorium pembuatan sediaan histologi merupakan seseorang yang secara rutin bersentuhan dengan pelarut yang terkontaminasi xilol. Aturan Keselamatan dan Kesehatan Kerja saat ini menyebutkan bahwa paparan xilol dalam suatu ruangan hanya diperbolehkan pada batas rata-rata 100 ppm selama 8-10 jam (Time-Weighted Average (TWA)). Namun untuk seorang teknisi yang bekerja dalam kondisi tersebut (100 ppm) hanya diperkenankan bekerja 40 jam selama seminggu, dan hanya 3-5 menit pada kondisi ruangan terpapar 200 ppm (Khristian & Inderiati, 2017; Rajan & Malathi, 2014; Kandyala, et al., 2010).

Selain paparan kerja, jalur utama kontak dengan manusia adalah melalui kontaminasi xilol yang masuk ke tanah, air permukaan atau air tanah. Xilol dapat bertahan selama berbulan-bulan atau lebih sebelum terurai menjadi bahan kimia lainnya. Namun, karena

mudah menguap, sebagian besar akan masuk ke udara dan dipecah oleh sinar matahari (Kandyala, et al., 2010).

### **Minyak Gandapura**

Minyak gandapura merupakan bagian dari minyak atsiri yang berasal dari tanaman gandapura. Gandapura merupakan salah satu tanaman yang dapat tumbuh pada dataran tinggi, 1300 – 3300 meter dpl dan penghasil minyak atsiri yang masuk dalam daftar Komoditi Binaan Direktorat Jenderal Perkebunan berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian nomor 511/kpts/pd.310/9 /2006 (Hernani, 2004). Minyak gandapura memiliki kandungan metil salisilat dengan konsentrasi sebesar 93-98%. Namun untuk minyak gandapura yang dihasilkan di Indonesia hanya memiliki kandungan metil salisilat sekitar 82,23% (Kusumo, et al., 2015)

## **METODE PENELITIAN**

### **Jalannya Penelitian**

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode eksperimen dengan membandingkan 2 kelompok yang berbeda. Kelompok pertama adalah kelompok yang diproses menggunakan xilol pada tahap pematangan dan pewarnaan, dan kelompok kedua adalah kelompok yang diproses menggunakan minyak gandapura tahap pematangan dan pewarnaan. Organ yang digunakan pada kelompok uji adalah organ otak mencit galur Balb/C normal.

Kelompok uji terdiri dari 16 potongan organ otak yang dipotong dengan ketebalan 4 mm dan volume relative sebesar 168 mm<sup>3</sup> (4x6x7 mm). Setiap kelompok direndam dalam setiap tahapan pematangan jaringan dengan perbandingan organ : reagen = 1 : 20.

Adapun tahapan pematangan jaringan terlihat pada Tabel 1, dan tahap pewarnaan terlihat pada Tabel 2 berikut:

Tabel 1. Tahap Pematangan Jaringan Kelompok Uji

No	Tahap	Reagen		Waktu	Suhu	
		Kelompok 1	Kelompok 2		Kelompok 1	Kelompok 2
1	Fiksasi	Neutral Buffer Formalin		Overnight	Suhu ruang	Suhu ruang
2	Dehidrasi	Alkohol 70%		30 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
		Alkohol 95%		30 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
		Alkohol absolut		45 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
		Alkohol absolut		30 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
3	Clearing	Xilol 1	Minyak Gandapura	45 menit	Suhu ruang	60 <sup>0</sup> C
		Xilol 2	Minyak Gandapura	30 menit	Suhu ruang	60 <sup>0</sup> C
4	Infiltrasi	Parafin (3x)		@45 menit	60 <sup>0</sup> C	60 <sup>0</sup> C

Tabel 2. Tahap Pewarnaan Sediaan Jaringan Kelompok Uji

No	Tahap	Reagen		Waktu	Suhu	
		Kelompok 1	Kelompok 2		Kelompok 1	Kelompok 2
1	Deparafinisasi	Xilol (2x)	Minyak Gandapura (2x)	15 menit	Suhu ruang	60 <sup>0</sup> C
2	Dehidrasi	Alkohol absolut		5 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
		Alkohol 95%		5 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
		Alkohol 70%		5 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
		Aquades		30 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
3	Pewarnaan Inti	Hematoxylin Mayer		45 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
4	Pencucian	Air mengalir		30 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
5	Blueing	Larutan Amonia 0,2%		1 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
6	Netralisasi	Aquades		3 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
7	Pewarnaan Sitoplasma	Eosin		5 Menit	Suhu ruang	Suhu ruang
8	Pencucian	Alkohol 95% (2x)		@3 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
9	Dehidrasi	Alkohol Absolut		3 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
10	Clearing	Xilol (2x)	Minyak Gandapura (2x)	@ 3 menit	Suhu ruang	Suhu ruang
11	Mounting	Entelan				

### Analisis Data

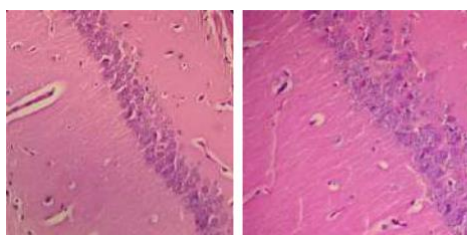
Pada penelitian ini, data yang diperoleh dari hasil pematangan dan pewarnaan dengan menggantikan xylol menggunakan minyak gandapura adalah parameter kualitas pewarnaan inti, parameter kualitas pewarnaan sitoplasma, distorsi jaringan dan kemunculan artifak. Data yang didapat terbagi menjadi 2 yaitu parametrik dan non parametrik. Data Parametrik adalah data kualitas pewarnaan inti dan sitoplasma. Dimana data kualitas inti

dan sitoplasma didapat dari pengukuran menggunakan perangkat lunak image-J untuk menghasilkan gambaran rata-rata densitas warna dan histogram warna dari hasil citra digital mikroskopis. Analisa data parametrik menggunakan perangkat lunak SPSS v.25. Adapun data non parametrik adalah data distorsi jaringan dan kemunculan artifak yang dilihat secara visualisasi mikroskopik.

## HASIL PENELITIAN

### A. Gambaran Mikroskopis

Hasil digitalisasi kualitas pewarnaan inti dan sitoplasma terlihat pada Gambar 2.

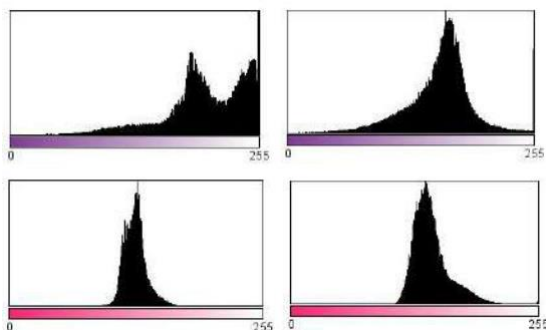


Gambar 2. Hasil visualisasi kelompok uji. Kelompok xilol (1); Kelompok minyak gandapura (2)

Pada Gambar 2 diatas menunjukkan hasil pembuatan sediaan jaringan menggunakan minyak gandapura menunjukkan kualitas yang sebanding bahkan relative lebih kontras jika dibandingkan dengan penggunaan xilol untuk tahapan clearing pada tahapan pematangan, deparafinisasi dan clearing pada pewarnaan. Hasil ini menunjukkan bahwa minyak gandapura berpotensi sebagai reagen alternative dalam mengganti xilol yang bersifat toksik dan mudah terbakar.

## B. Densitas Warna Inti dan Sitoplasma

Pengumpulan data dengan parameter penilaian densitas warna inti dan warna sitoplasma dilakukan dengan cara digitalisasi sediaan menggunakan perangkat lunak *image-J*. Sediaan yang telah diambil citra digitalnya kemudian dipisahkan warnanya berdasarkan target pewarnaan inti maupun pewarnaan sitoplasma. Hasil pengolahan citra digital tersebut kemudian menghasilkan bentuk histogram baik untuk warna inti maupun warna sitoplasma. Adapun hasil dari histogram sediaan terdapat pada Gambar 3 berikut.



**Gambar 4.2** Histogram warna inti dan sitoplasma. (a) adalah histogram dari inti pada kelompok xilol, (b) histogram dari inti pada kelompok minyak gandapura, (c) histogram dari sitoplasma pada kelompok xilol, (d) histogram dari sitoplasma pada kelompok minyak gandapura.

Pada Gambar 3 diatas menunjukkan grafik histogram warna inti yang menggunakan minyak gandapura (b) terlihat lebih homogen dibandingkan dengan grafik histogram warna inti yang menggunakan xilol (a). Hasil histogram warna sitoplasma yang menggunakan minyak gandapura (d) terlihat lebih rapat dibandingkan dengan grafik histogram warna inti yang menggunakan xilol (c). Data hasil pengukuran histogram

## C. Artifak Sediaan

Artifak merupakan suatu hal yang secara sengaja ataupun tidak sengaja terbentuk pada saat pembuatan sediaan jaringan sehingga dapat mengganggu pengamatan. Hasil penelitian menunjukkan secara mikroskopik

kemudian diolah menggunakan uji beda dua kelompok untuk melihat data univariat dan bivariat. Adapun hasil dari uji tersebut terlihat pada Tabel 2 berikut.

**Tabel 4.2** Hasil uji Statistik Densitas Warna Sel (Inti dan Sitoplasma)

Parameter Uji	$\pm$ SD	P Value (T-test)
<b>Kualitas inti</b>		
a. Kelompok Xilol	196,52 $\pm$ 5,24	<0,001
b. Kelompok Minyak Gandapura	154,66 $\pm$ 4,12	
<b>Kualitas Sitoplasma</b>		
a. Kelompok Xilol	134,27 $\pm$ 4,76	<0,001
b. Kelompok Minyak Gandapura	147,85 $\pm$ 2,42	

Hasil uji densitas warna inti dan warna sitoplasma dari kelompok yang menggunakan xilol menunjukkan bahwa rata-rata intensitas warna inti sebesar 196,52 OD dengan standar deviasi sebesar 5,24. Nilai rata-rata densitas warna inti pada kelompok yang menggunakan minyak gandapura adalah 134,27 OD dengan standar deviasi intensitas sebesar 4,12. Hasil rata-rata nilai densitas warna sitoplasma pada kelompok xilol adalah 134,27 OD dengan standar deviasi sebesar 4,76 Nilai rata-rata densitas warna sitoplasma pada kelompok minyak gandapura sebesar 147,85 dengan simpangan deviasi sebesar 2,42. Hasil tersebut menunjukkan rata-rata densitas warna inti lebih besar pada kelompok xilol sedangkan untuk rata-rata densitas warna sitoplasma lebih besar pada kelompok minyak gandapura.

tidak terbentuk artifak yang disebabkan karena tahapan pematangan maupun pewarnaan dengan menggantikan xilol dengan minyak gandapura.

## PEMBAHASAN

Hasil menunjukkan bahwa minyak gandapura dapat dijadikan alternatif menggantikan xilol dalam pembuatan sediaan jaringan. Hal ini dikarenakan minyak gandapura memiliki sifat yang non polar sehingga dapat menghilangkan sisa parafin yang terdapat pada jaringan. Hasil ini didukung oleh jurnal Udonkang et al. (2014) menyebutkan bahwa xilol dapat digantikan dengan minyak mineral yang dipanaskan sampai suhu 60°C yang bertujuan untuk menghilangkan protein yang terkandung pada jaringan sehingga membuat jaringan tersebut tampak transparan dalam tahapan “clearing”. Minyak gandapura yang bersifat non polar dapat melarutkan lemak yang terkandung dalam jaringan sehingga pori-pori jaringan terbuka dan energi kinetik dari molekul tingkat difusi jaringan menurun. Dengan penurunan tersebut maka cairan dehidrasi yang telah masuk ke dalam sel akan larut sehingga dapat tergantikan oleh lilin parafin yang berfungsi untuk memadatkan jaringan.

Pada penelitian Udonkang et al. (2014) menyebutkan pula hasil pemrosesan menggunakan minyak mineral menunjukkan intensitas warna inti dan sitoplasma yang baik seperti sediaan yang diproses dengan xilol. Pada penelitian ini intensitas pewarnaan inti untuk kelompok minyak gandapura menunjukkan nilai yang lebih rendah dan berbeda bermakna dengan kelompok xilol. Inti yang terwarnai merupakan mekanisme asam basa. Inti merupakan suatu materi yang memiliki pH yang sangat asam dengan rentang 2,0 - 3,0. Inti mengandung muatan negatif dan memiliki afinitas yang kuat dalam mengikat zat warna hematoxylin yang mempunyai ikatan basa. Perbedaan ini menunjukkan jika minyak gandapura dapat merubah pH dari inti menuju kearah basa sehingga intensitas menjadi menurun. Namun jika secara deskripsi hasil kelompok minyak gandapura masih bias menunjukkan inti yang jelas bersama

komponennya lainnya seperti anak inti, kromatin dan komponen yang dapat berikatan dengan hematoxylin.

Untuk hasil intensitas warna sitoplasma pada kelompok minyak gandapura menunjukkan warna sitoplasma yang lebih kuat dibanding dengan kelompok yang menggunakan xilol. Sejalan dengan penelitian diatas menunjukkan bahwa minyak gandapura dapat merubah kondisi pH dari komponen sel, dimana mekanisme pewarnaan sitoplasma adalah eosin yang bersifat asam akan mengikat komponen sel yang bersifat basa. Hal ini menunjukkan pula bahwa dengan meningkatnya pH sitoplasma menuju ke arah basa dapat meningkatkan intensitas sitoplasma.

Kualitas lainnya yang perlu diperhatikan adalah kemunculan *artifak*. Pada penelitian Choudhari et al. (2016) menyebutkan bahwa berbagai macam *artifak* yang dapat ditemukan pada pembuatan sediaan antara lain *artifak* pra-fiksasi, *artifak* fiksasi, *processing artifak*, *microtomy artifak* dan *staining artifak*.

*Artifak* yang mungkin dapat terjadi ketika xilol digantikan dalam tahap pematangan maupun pewarnaan adalah distorsi jaringan, *vessel shrinkage* maupun tersisanya paraffin dalam jaringan. Distorsi jaringan merupakan kerusakan yang terjadi akibat kesalahan dalam tahapan pematangan jaringan. Distorsi terjadi pada sediaan jaringan jika proses yang dilakukan masih kurang maksimal, baik waktu maupun fungsi dari tahapan tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan minyak gandapura masih menunjukkan *vessel shrinkage*. *Vessel shrinkage* umum ditemukan ketika jaringan syarat atau organ otak diproses menggunakan xilol. Kelompok minyak gandapura selain dari *vessel shrinkage* tidak menunjukkan adanya *artifak* lainnya baik pada tahap pematangan maupun pewarnaan. Hal ini menunjukkan bahwa minyak gandapura layak digunakan dalam pematangan dan pewarnaan sediaan jaringan.

## KESIMPULAN

Hasil dari penggunaan minyak gandapura pada tahap pematangan maupun pewarnaan dengan menggunakan minyak gandapura secara deskriptif tidak berbeda dengan kelompok perbandingan menggunakan xilol. Pada parameter intensitas minyak gandapura cenderung merubah pH kearah basa sehingga

intensitas warna inti berkurang dan intensitas warna sitoplasma meningkat. Artifak yang masih ditemukan pada kelompok minyak gandapura adalah *vessel shrinkage* yang umum ditemukan pada jaringan syaraf atau organ otak yang diproses maupun diwarnai menggunakan xilol sebagai salah satu reagensya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Choudhary, S. et al., 2016. Artefact & Classification. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, Volume Vol-2, pp. 141-145 .
- Fajar , H., 2015. Perbandingan Kualitas Pewarnaan Histologis Jaringan Testis dan Hepar Menggunakan Fiksasi Formalin Metode Intravital dan Konvensional. *Jurnal Kesehatan*, pp. 1-5.
- Hernandes, E. P., Schoffen, R. . P. & Conte, H., 2017. Xylene: Features, Risks And Management Of Waste. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, pp. Vol.17,n.2,pp.68-73.
- Hernani, 2004. Gandapura: pengolahan, fitokimia, minyak atsiri dan daya herbisida. *Buletin TRO XV* (2), Volume Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Penelitian.
- Kandyala, R., Raghavendra, P. C. S. & Rajasekharan, S. T., 2010. Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. *J Oral Maxillofac Pathol.*, Volume 14(1), p. 1–5.
- Khristian, E. & Inderiati, D., 2017. *Sitohistoteknologi*. Jakarta: DEPKES.
- Khristian, E. & Inderiati, D., 2017. *Sitohistoteknologi*. Jakarta: Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Kusumo, P., Mulyaninggih, S. & Yulianto, M. E., 2015. *Proses Inaktivasi Enzim Gaultherase Melalui Mixed-Drying Extraction untuk Pengambilan Gaultherin Sebagai Antikanker*. Yogyakarta, Program Studi Teknik Kimia, FTI, UPN “Veteran” Yogyakarta.
- Mescher, A. L., 2016. *Basic Histology*. Indiana : University Bloomington.
- Rajan, S. T. & Malathi, N., 2014. Health Hazards of Xylene: A Literature Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.*, Volume Vol-8(2), pp. 271-274 .
- Rolls, G., Farmer , N. & Tarbet, F., 2008. Assessing the Quality of Tissue Processing and the Performance of Peloris. *Journal of Health*, pp. 95-102.
- Udonkang, M. et al., 2014. Bleached Palm Oil As Substitute For Xylene In Histology. *JPCS*, Volume Vol(8), pp. pp 8-17.

