

# Analisis Kualitas Sediaan Histologi Menggunakan *Beeswax Super Grade* sebagai Alternatif Pengganti *Paraffin Wax* dalam Proses *Embedding*

Nadia Wulansari<sup>1</sup>, Hasna Dewi<sup>2</sup>, Rita Halim<sup>3</sup>  
Tia Wida Ekaputri<sup>4</sup>, Erisca Ayu Utami<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Sarjana Pendidikan Dokter, FKIK Universitas Jambi

<sup>2</sup>Bagian Histologi Program Studi Pendidikan Dokter, FKIK Universitas Jambi

<sup>3</sup>Bagian Gizi Program Studi Pendidikan Dokter, FKIK Universitas Jambi

<sup>4</sup>Bagian Biomedik Program Studi Pendidikan Dokter, FKIK Universitas Jambi

e-mail: nadiawulansari22@gmail.com

## ABSTRACT

**Background:** One of the procedures in making histological preparations is histotechnics. This tissue processing procedure consists of fixation, dehydration, clarification, embedding, blocking, block cutting, and coloring. The media commonly used for embedding and embedding is paraffin. However, paraffin wax contains up to 11 carcinogenic compounds, so an alternative is needed by using beeswax. This study aims to determine whether super grade beeswax can be used as an alternative to paraffin wax in the embedding process. **Methods:** This study uses a quantitative method with a descriptive analytic research design of an experimental type. The subject of this research was the long-tailed monkey (*Macaca Fascicularis*) organ. Samples were made of 10 preparations using paraffin and 10 beeswax preparations which would be assessed by the parameters of cell nucleus staining, cytoplasmic staining, color clarity and staining uniformity. The results of all parameters are summed and analyzed using the Mann Whitney differential test. **Results:** The quality of histological preparations using beeswax showed adequate staining. The results were analyzed using the Mann Whitney statistical test on samples using paraffin and beeswax each obtained ( $p > 0.05$ ) which showed that there was no difference. **Conclusion:** Beeswax can be used as an alternative to paraffin. Further research on block storage resistance and research on other tests such as immunohistochemistry is necessary.

**Keywords:** Embedding, Beeswax, Paraffin

## ABSTRAK

**Latar belakang:** Salah satu prosedur dalam membuat sediaan histologi adalah histoteknik. Prosedur pengolahan jaringan ini terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, *embedding*, *blocking*, pemotongan blok, dan pewarnaan. Media yang biasa digunakan untuk *embedding* dan penyematan adalah parafin. Namun, Lilin parafin mengandung hingga 11 senyawa karsinogenik sehingga diperlukan alternatif dengan menggunakan *beeswax*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah *beeswax super grade* dapat digunakan sebagai alternatif pengganti *paraffin wax* dalam proses *embedding*. **Metode:** Penelitian ini menggunakan metode kuantitatif dengan desain penelitian deskriptif analitik yang berjenis eksperimental. Subjek penelitian ini berupa organ hewan coba monyet ekor panjang (*Macaca Fascicularis*). Sampel dibuat 10 preparat menggunakan parafin dan 10 preparat beeswax yang akan dinilai dengan parameter pewarnaan inti sel, pewarnaan sitoplasma kejernihan warna dan keseragaman pewarnaan. Hasil seluruh parameter dijumlahkan dan dianalisis menggunakan uji beda *Mann Whitney*. **Hasil:** Kualitas sediaan histologi menggunakan *beeswax* menunjukkan pewarnaan

adekuat. Hasil penelitian dianalisis menggunakan uji statistik *Mann Whitney* pada sampel yang menggunakan parafin dan *beeswax* masing-masing diperoleh ( $p > 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan. **Kesimpulan:** *Beeswax* dapat digunakan sebagai alternatif pengganti parafin. Penelitian lebih lanjut mengenai ketahanan penyimpanan blok dan perlu dilakukan penelitian pada tes lain seperti imunohistokimia.

**Kata kunci:** *Embedding, Beeswax, Parafin*

---

## PENDAHULUAN

Histologi merupakan cabang ilmu kedokteran yang mempelajari tentang struktur jaringan menggunakan mikroskop yang tercakup didalamnya mempelajari fungsi fisiologi sel-sel dalam tubuh, baik manusia, hewan, serta tumbuhan. Cara terbaik untuk mempelajari histologi adalah dengan menggunakan irisan jaringan yang dibuat dalam suatu sediaan. Sediaan jaringan diperoleh dengan membuat irisan tipis dari jaringan yang telah dipotong kecil, kemudian dilekatkan di atas object glass dan ditutup dengan kaca penutup.<sup>1</sup>

Salah satu prosedur yang diperlukan dalam membuat sediaan histologi adalah histoteknik. Histoteknik merupakan beberapa prosedur yang memungkinkan fitur mikroskopis sel dan visualisasi jaringan sehingga mudah mengenali perubahan struktural mikroskopis. Hasil dari prosedur histoteknik menunjukkan gambaran tentang susunan sel, bentuk, sitoplasma, inti sel, susunan serat jaringan ikat, jaringan otot dan lain sebagainya sesuai dengan gambaran jaringan normal pada umumnya.<sup>2,3</sup>

Prosedur pengolahan jaringan terdiri dari beberapa prosedur yang saling mempengaruhi satu dengan lainnya, yang

terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, *embedding, blocking*, pemotongan blok, dan pewarnaan. Tujuan dari beberapa prosedur tersebut untuk menghasilkan jaringan yang dipotong setebal 2-5  $\mu$  dan diwarnai dengan pewarnaan.<sup>2</sup>

Media yang paling sering digunakan untuk *embedding* atau penyematan yaitu lilin parafin. Lilin parafin adalah campuran hidrokarbon rantai panjang yang terbentuk saat minyak mineral terurai. Lilin parafin dengan titik leleh yang lebih tinggi cocok untuk jaringan yang lebih keras seperti tulang, memungkinkan pemotongan bagian yang lebih tipis, tetapi sulit dalam proses pembuatan pita. Lilin parafin, yang memiliki titik leleh rendah, lebih lembut tetapi tidak mendukung jaringan keras<sup>4</sup>

Lilin parafin dikenal juga dengan berbagai bahaya bagi kesehatan. Lilin parafin mengandung hingga 11 senyawa karsinogenik. Keracunan untuk manusia, termasuk karsinogenisitas, toksisitas reproduksi dan perkembangan, neurotoksisitas, dan toksisitas akut 2, serta kontak dalam waktu lama dapat menyebabkan iritasi. Oleh karena itu, diperlukan alternatif lain untuk menggantinya dengan menggunakan *beeswax* atau lilin lebah. Lebah madu

menghasilkan lilin menggunakan proses yang benar-benar alami dengan memanfaatkan enzim dalam pencernaan, metabolisme, dan proses biologis kompleks lainnya.<sup>5</sup>

Keuntungan lain dari *beeswax* adalah lebih mudah bagi teknisi dalam memotong jika dibandingkan dengan parafin. Sampel yang tertanam lilin lebah tidak menempel pada bilah mikrotom dan lebih mudah untuk memotong sampel. Pada saat diwarnai, jaringan yang tertanam lilin lebah terlihat bagus dan memiliki detail morfologi yang jernih dan tajam. Lilin lebah lebih ramah lingkungan, tersedia, murah, tidak mudah terbakar dan tidak beracun.<sup>5,6</sup>

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Antony dkk dari *Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Saveetha University, India* membuktikan bahwa *beeswax* memiliki sifat *embedding* dan penyematan yang baik jika dibandingkan dengan parafin. Integritas bagian tersebut baik dan tidak ada distorsi pada bagian tersebut jika dibandingkan dengan parafin karena ukuran kristal *beeswax* dan peningkatan kohesi. Slide yang diresapi lilin lebah menunjukkan kerusakan jaringan yang minimal jika dibandingkan dengan lilin parafin karena kepadatan lilin lebah.<sup>6</sup>

Berdasarkan uraian di atas, penelitian mengenai perbandingan kualitas sediaan histologi menggunakan *paraffin wax* dan *beeswax* memerlukan observasi lebih lanjut karena belum pernah dilakukan di Indonesia. Oleh karena itu, penulis

tertarik untuk mengetahui apakah *beeswax super grade* dapat digunakan sebagai alternatif pengganti *paraffin wax* dalam proses *embedding*.

## METODE

Penelitian ini menggunakan metode kuantitatif dengan desain penelitian deskriptif analitik yang berjenis eksperimental. Penelitian ini telah dilakukan pada April-Desember 2021 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi.

Penelitian ini menggunakan subjek penelitian berupa organ hewan coba monyet ekor panjang (*Macaca Fascicularis*) yang terdiri atas otak, mata, lidah, mammae, paru-paru, jantung, ginjal, hepar, ovarium, caecum, dan colon yang di *embedding* dengan *paraffin wax* dan *beeswax*, sedangkan objek penelitiannya berupa sediaan jaringan histologi yang telah diberi pewarnaan *hematoxylin* dan *eosin*. Seluruh prosedur yang dilakukan telah layak penelitian oleh komisi etik penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi.

Data yang diolah menggunakan data primer yang diperoleh dari sampel pada saat memproses jaringan yang mencakup proses fiksasi, dehidrasi, *embedding*, blocking, pematangan blok dan pewarnaan. Hasil penilaian diberi skor sesuai dengan kriteria pada table penilaian. Data yang diperoleh di uji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk*. Jika hasil uji tersebut menyatakan data

tidak normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji statistik *Mann Whitney*.

## HASIL

Hasil pengamatan mikroskopis kualitas sediaan menggunakan parafin dan *beeswax* diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 100x pada 10 lapang pandang. Pengamatan dilakukan oleh dokter spesialis Patologi Anatomi yang tidak mengetahui sediaan yang menggunakan lilin parafin dan *beeswax*

yang diteliti. Parameter yang diamati pada setiap lapang pandang adalah pewarnaan inti sel (adekuat = skor 1, tidak adekuat = skor 0), pewarnaan sitoplasma sel (adekuat = skor 1, tidak adekuat = skor 0), kejernihan pewarnaan (ya = skor 1, tidak = skor 0), dan keseragaman pewarnaan (ya = skor 1, tidak = skor 0). Skor pada setiap parameter dijumlahkan dan diberi skor, bila total nilai  $\leq 2$  = pewarnaan tidak adekuat, dan bila total nilai  $> 2$  = pewarnaan adekuat.<sup>7</sup>

**Table 1** Hasil Pengamatan Mikroskop pada Sediaan Parafin dan Beeswax

	Pewarnaan inti sel		Pewarnaan sitoplasma		Kejernihan warna		Keseragaman warna	
	Parafin	Beeswax	Parafin	Beeswax	Parafin	Beeswax	Parafin	Beeswax
Otak	1	1	1	1	1	1	1	1
Lidah	1	1	1	1	1	1	1	1
Mata	1	1	1	1	1	1	1	1
Mammae	1	1	1	1	1	1	1	1
Paru-paru	0	1	1	1	0	1	1	1
Hepar	1	1	1	1	1	1	1	1
Ginjal	1	1	1	1	1	1	1	1
Ovarium	1	0	1	1	1	1	1	1
Caecum	1	1	1	1	1	1	1	1
Colon	1	1	1	1	1	1	1	1

Berdasarkan rekapitulasi table 1 di atas menunjukkan bahwa sediaan yang menggunakan parafin setelah dilakukan penilaian kemudian dijumlahkan didapatkan total nilai  $> 2$  yang berarti pewarnaan adekuat kecuali pada sediaan paru-paru total nilai  $\leq 2$  yang berarti pewarnaan tidak adekuat. Sediaan yang menggunakan *beeswax* didapatkan total nilai  $> 2$  yang berarti pewarnaan adekuat.

Data yang dianalisis uji normalitas

menggunakan *Shapiro-Wilk Test*. Berdasarkan hasil uji data yang dihasilkan tidak normal dengan nilai signifikan  $0,00 < 0,05$ , sehingga dilakukan uji *Mann Whitney*. Hasil pada sampel yang menggunakan parafin dan *beeswax* diperoleh nilai  $p > 0,05$  yang berarti tidak ada perbedaan menggunakan parafin dan *beeswax* terhadap gambaran mikroskopis. Hasil uji beda kualitas sediaan bisa dilihat pada tabel.

**Tabel 2** Perbedaan Kualitas Sediaan Menggunakan Parafin dan Beeswax

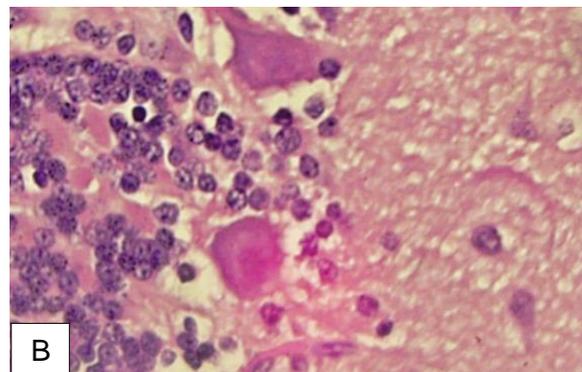
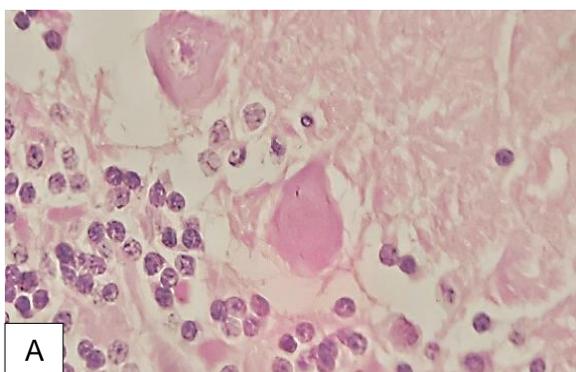
	Parafin		Beeswax		Total	P value
	Adekuat	Tidak adekuat	Adekuat	Tidak adekuat		
Pewarnaan inti sel	8	2	9	1	20	0,542
Pewarnaan Sitoplasma	10	0	10	0	20	1,000
Kejernihan pewarnaan	9	1	10	0	20	0,317
Keseragaman pewarnaan	10	0	10	0	20	1,000

*Embedding* adalah teknik yang digunakan dalam proses mempersiapkan suatu jaringan untuk analisis mikroskopis. Proses ini memerlukan penempatan jaringan dalam massa padat saat dipotong menggunakan mikrotom. Massa harus cukup keras untuk menopang jaringan, tetapi cukup lunak untuk dipotong dengan mudah menjadi beberapa bagian.<sup>8</sup>

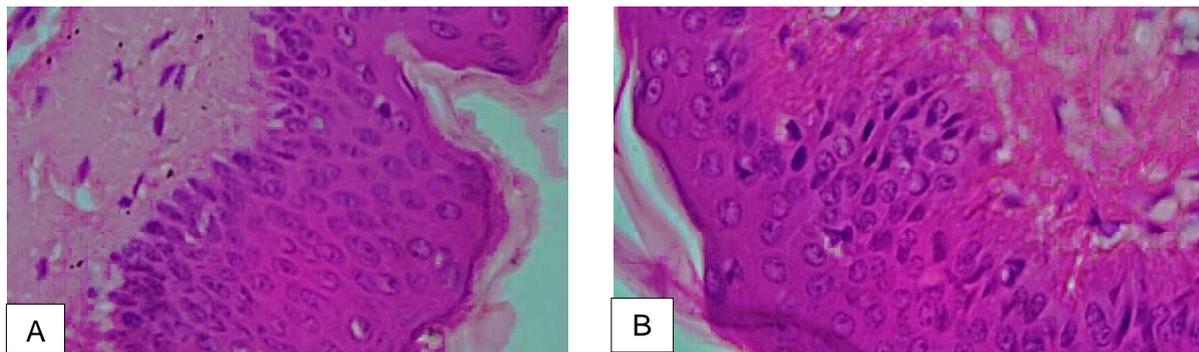
Salah satu media penyisipan yang banyak digunakan adalah lilin parafin. Lilin parafin adalah turunan minyak bumi yang terdiri dari campuran hidrokarbon lurus dan bercabang. Namun, kurang larut dalam alkohol, dan untuk alasan ini, hanya dapat digunakan untuk penyisipan infiltrasi dalam kombinasi dengan reagen perantara. Salah satu dari banyak sifat yang berguna

dari lilin parafin adalah bahwa bagian tipis (5-7 m) cenderung menempel satu sama lain dalam pita saat dipotong, memungkinkan beberapa bagian untuk dipasang pada slide dalam satu tindakan. Namun ada beberapa efek jangka panjang yang dapat terjadi dalam penggunaan parafin karena mengandung senyawa karsinogenik.<sup>8</sup>

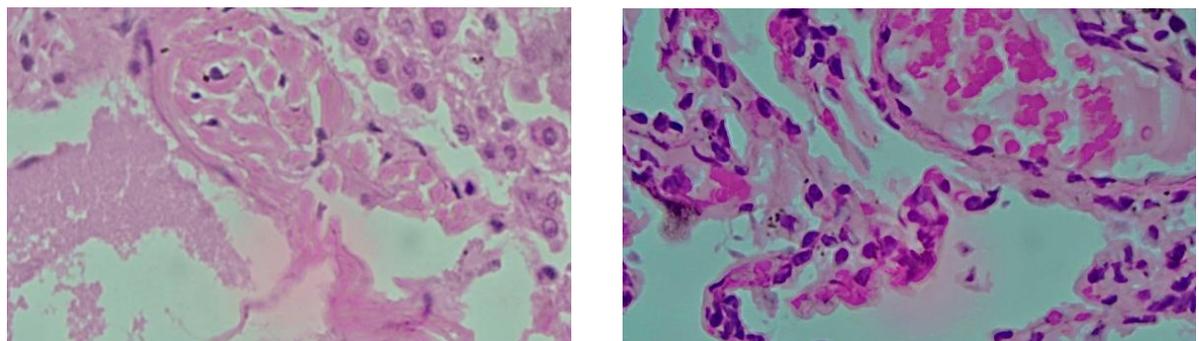
*Beeswax* adalah lilin hewan alami yang diproduksi oleh spesies *Apis mellifera* dari lebah madu. *Beeswax* diperoleh dari sisir madu setelah madu dihilangkan. Lilin disekresikan oleh empat pasang kelenjar yang terletak di sisi ventral perut lebah pekerja. Lilin lebah memiliki warna dan aroma yang khas. Warna lilin lebah bervariasi dari kuning keputihan hingga coklat kekuningan.<sup>9</sup>



**Gambar 1.** Perbandingan gambaran mikroskopis pada sediaan otak. (A) hasil mikroskopis menggunakan parafin (100x), (B) hasil mikroskopis menggunakan *beeswax* (100x)



**Gambar 2.** Perbandingan gambaran mikroskopis pada sediaan mammae. (A) hasil mikroskopis menggunakan parafin (100x), (B) hasil mikroskopis menggunakan *beeswax* (100x)



**Gambar 3.** Perbandingan gambaran mikroskopis pada sediaan paru-paru. (A) hasil mikroskopis menggunakan parafin (100x), (B) hasil mikroskopis menggunakan *beeswax* (100x)

## PEMBAHASAN

Hasil pengamatan gambaran mikroskopis inti sel pada parafin kurang adekuat pada sediaan paru-paru hal tersebut dikarenakan pewarnaan inti pada preparat yang menggunakan parafin kurang adekuat. *Hematoxylin-eosin* berguna sebagai pewarna dasar yang mewarnai struktur yang mengandung asam nukleat, seperti inti sel yang tampak berwarna ungu kebiruan. Hasil pewarnaan yang kurang adekuat atau tidak baik pada pewarnaan *hematoxylin* yang mewarnai bagian inti sel, disebabkan karena proses deparafinisasi yang tidak sempurna dan proses pewarnaan yang manual sehingga pewarnaan kurang adekuat karena waktu pewarnaan berbeda. Selain itu, penyebab lainnya disebabkan oleh fiksasi yang tidak

adekuat, proses penghilangan warna terlalu kuat atau berlebihan serta pemotongan yang tipis.<sup>10</sup>

Hasil pengamatan gambaran mikroskopis sitoplasma pada *beeswax* dan parafin terlihat baik dan jelas. Pewarnaan sitoplasma menggunakan *eosin* yang berperan sebagai pewarna asam yang mewarnai komponen jaringan tidak berinti sehingga berwarna merah sampai merah muda. Pada pewarnaan sitoplasma bisa dipengaruhi oleh fiksasi yang tidak adekuat sehingga sitoplasma terlihat pucat dan samar. Selain itu, Sitoplasma yang tidak adekuat bisa disebabkan oleh pH yang terlalu tinggi, pemotongan terlalu tipis, dehidrasi dengan alkohol terlalu lama serta waktu pewarnaan yang tidak adekuat.<sup>10</sup>

Hasil penelitian ini hampir sama dengan yang dilakukan oleh J Vini Mary Antony dari Department of Oral and Maxillofacial Pathology, University, Chenna, India pada tahun 2017, membuktikan bahwa lilin lebah menunjukkan integritas bagian yang baik jika dibandingkan dengan lilin parafin. Integritas bagian itu baik dan tidak ada distorsi di bagian jika dibandingkan dengan lilin parafin karena ukuran kristal lilin lebah dan peningkatan kohesi. Selain itu, sediaan yang diresapi lilin lebah menunjukkan kerusakan jaringan minimal jika dibandingkan dengan lilin parafin karena kepadatan lilin lebah. Pewarnaan bagian jaringan yang tertanam dalam lilin lebah sangat baik dan menunjukkan detail morfologis yang tajam dan jelas dibandingkan dengan lilin parafin. Pewarnaan sitoplasma sangat baik pada lilin lebah. Selain itu, pewarnaan lebih seragam pada bagian yang diresapi dan tertanam dalam lilin lebah dibandingkan dengan lilin parafin. Namun, lilin lebah menunjukkan pewarnaan latar belakang yang relatif lebih banyak dibandingkan dengan lilin parafin. Hal ini sedikit berbeda dengan hasil penelitian yang telah dilakukan peneliti karena menggunakan impregnasi dan penanaman serta pewarnaan manual.<sup>6</sup>

Proses pembedaan *beeswax* secara manual tidak menghasilkan bau

sehingga lebih nyaman dibandingkan pembedaan parafin, kemudian pada proses pendinginan blok dan pemotongan menggunakan mikrotom *beeswax* lebih mudah. Hasil penelitian ini secara keseluruhan membuktikan bahwa *beeswax* bisa digunakan sebagai alternatif pengganti *paraffin wax*. Selain lebih mudah didapat dan ramah lingkungan, keuntungan lainnya dari *beeswax* ialah memudahkan teknisi dalam pemotongan blok. Sampel jaringan yang ditanam pada *beeswax* tidak menempel pada pisau mikrotom. Hal ini karena *beeswax* meningkatkan daya rekat jaringan, kerapuhan berkurang, dan lebih mudah pembentukan lembaran pita tipis pada sediaan.<sup>11</sup>

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan pada penelitian kualitas sediaan menggunakan parafin dan *beeswax* dapat disimpulkan bahwa gambaran mikroskopis sediaan *beeswax* pada pewarnaan inti sel terlihat baik, pewarnaan sitoplasma yang baik, namun gambaran latar belakang lebih jernih pada lilin lebah dibandingkan lilin paraffin, dan pewarnaan seragam pada lilin parafin dan *beeswax*. Penelitian lebih lanjut mengenai ketahanan blok dan pengaruh pada tes lain seperti imunohistokimia

**REFERENSI**

1. Anggrawati H. *Histologi dan Anatomi Fisiologi Manusia*. Kemenkes RI; 2017. 208 hlm.
2. Mescher AL. *Histologi Dasar Junqueira*. 13 ed. Jakarta: ECG; 2013. 1–10 hlm.
3. Slaoui M, Fiette L. *Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation*. *Methods Mol Biol*. 2011;691(January):69–82.
4. Khristian, Erick, Inderiati D. *Sitohistoteknologi*. 1 ed. Jakarta: Kemenkes RI; 2017. 235 hlm.
5. Hossain ME. *Comparative pathway analysis of paraffin wax and beeswax for industrial applications. Characterization and Development of Novel Materials*. 2012;1(February):1–13.
6. Antony J V, Ramani P, Anuja N, Sherlin HJ, Gheena S, Abilasha R, Jeyaraj G, Don K R AS. *Impregnation and Embedding using Bees Wax and Paraffin Wax in Oral Tissue Samples: A Comparative Study*. *Int J Orofac Biol [Internet]*. 2017;1(1):13–5. Available from: <https://www.ijofb.org/text.asp?2017/1/1/13/213293>
7. Ankle MR, Joshi PS. *A study to evaluate the efficacy of xylene-free hematoxylin and eosin staining procedure as compared to the conventional hematoxylin and eosin staining: An experimental study*. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2011;15(2):161–7.
8. van der Lem T, de Bakker M, Keuck G, Richardson MK. *Wilhelm His Sr. and the development of paraffin embedding*. *Pathologie*. 2021 Nov;42(S1):55–61.
9. Bogdanov S, Science BP. *Beeswax: Production, Properties, Composition, Control*. *Bee Product Science*. 2016;(June).
10. Ariyadi T dan , H. *KUALITAS SEDIAAN JARINGAN KULIT METODEMICROWAVE DAN CONVENTIONAL HISTOPROCESSINGPEWARNAANHEMATOXYLIN EOSIN*. *Jurnal Labor Medika [Internet]*. 2017 Jul 31;1(1):7–11. Available from: 23/10/2022<http://jurnal.unimus.ac.id/index.php/JLabMed>
11. Dewi H, Quzwain F, Wulansari N. *HISTOLOGY SLIDE QUALITY COMPARATIVE STUDY ; IMPREGNATION AND EMBEDDING USING BEESWAX AND PARAFFIN*. *JMC*. 2021;(Special Issues):291–8.