

Minyak Zaitun sebagai Pengganti *Xylene* pada Prosesing Jaringan Histologis untuk Pewarnaan Kulit dan Hepar Mencit dengan *Hematoxylin Eosin*: Sebuah Studi Perbandingan

Olive Oil as a Substitute for Xylene in Histological Tissue Processing for Mice's Skin and Liver by Hematoxyline Eosin Staining: A Comparative Study

EKO NANING SOFYANITA¹
ARYA ISWARA²
DJOKO PRIYATNO³

Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Semarang^{1,3}
Jl. Wolter Monginsidi Pedurungan Tengah Semarang
Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang²
Jl. Kedungmundu Raya No. 18 Tembalang Semarang
Email: en.sofyanita@gmail.com

Abstrak

Clearing dapat dipengaruhi hasilnya karena faktor kepadatan jaringan dan viskositas agen *clearing*. *Xylene* merupakan pelarut aromatik yang paling umum digunakan untuk agen *clearing* dan agen deparafinisasi di laboratorium histopatologi, namun *xylene* salah satu bahan kimia berbahaya yang ditemukan di laboratorium histologi. Berdasarkan dari bahaya yang ditimbulkan oleh *xylene*, maka diperlukan bahan penggantinya. Beberapa pengganti *xylene* seperti reagensia yang berasal dari limonene, hidrokarbon alifatik, minyak nabati dan minyak mineral telah dikembangkan secara komersial, namun pengganti *xylene* yang tersedia masih kurang efektif, lebih mahal, dan tidak jauh lebih berbahaya daripada *xylene* itu sendiri. Pengganti yang dianggap lebih aman adalah dari minyak nabati, salah satunya minyak zaitun yang memiliki kesamaan dengan *xylene* yaitu pada senyawa hidrokarbon dan fenol. Penelitian ini menggunakan dua jenis jaringan, yaitu kulit dan hepar dari mencit (*Mus musculus*) yang dipotong menjadi dua bagian; bagian pertama menggunakan *xylene* sebagai dan bagian lainnya dari menggunakan minyak zaitun sebagai agen *clearing*. Penilaian hasil pewarnaan hematoxylin eosin yang ditentukan berdasarkan kategori penilaian terhadap struktur sel, seperti inti sel, sitoplasma, dan keseragaman warna yang di lakukan oleh tiga pembaca dan lima lapang pandang tiap preparat pada perbesaran lensa objektif 40X. Perbandingan hasil pengamatan kelompok *xylene* pada jaringan kulit dan hepar 100% mendapatkan skor baik pada inti sel, sitoplasma, serta keseragaman warna. ($p=1.000$). Kelompok minyak zaitun memiliki sedikit perbedaan pada keseragaman warna pada jaringan hepar bila dibandingkan pada kulit, namun tidak berbeda secara statistik ($p=0.773$). Perbandingan keseluruhan pembacaan dari kelompok *xylene* dan minyak zaitun pada jaringan kulit dan hepar juga menunjukkan tidak berbeda secara statistik ($p=0.262$). Sehingga dapat disimpulkan minyak zaitun sebagai minyak nabati dapat disarankan untuk pengganti *xylene* pada proses *clearing* di prosesing jaringan histologi.

Kata Kunci: Prosesing Jaringan ; Clearing ; *xylene* ; Minyak Zaitun ; Pewarnaan Histologis ; *Hematoxyline Eosin*

Abstract

Clearing results in histological processing can be affected due to tissue density and viscosity of the clearing agent. Xylene is the most commonly used aromatic solvent for clearing agents and deparaffinizing agents in histopathology laboratories, but xylene is one of the most dangerous chemicals found in histology laboratories. Based on the dangers posed by xylene, a replacement material is needed. Several xylene substitutes such as reagents derived from limonene, aliphatic hydrocarbons, vegetable oils and mineral oils have been commercially



developed, but the available xylene substitutes are still less effective, more expensive, and still as dangerous as xylene itself. Substitutes that are considered safer are from natural oils, one of which is olive oil which has similarities with xylene, namely in hydrocarbon and phenol compounds. This study used two types of tissue, namely skin and liver from mice (*Mus musculus*) which were cut into two parts; the first part uses xylene as and the other part uses olive oil as a clearing agent. The assessment of hematoxylin eosin staining results were determined based on the category of assessment of cell structure, such as the cell nucleus, cytoplasm, and color uniformity carried out by three readers and five fields of view for each microscopic slide at 40X magnification of the objective lens. Comparison of observations of the xylene group in skin and liver tissue 100% got a good score on the cell nucleus, cytoplasm, and color uniformity. ($p=1,000$). The olive oil group had a slight difference in color uniformity in liver tissue when compared to skin, but not statistically different ($p=0.773$). The comparison of the overall readings of the xylene and olive oil groups on skin and liver tissue also showed no statistically different ($p=0.262$). So it can be concluded that olive oil can be recommended as a substitute for xylene in the clearing process in histological tissue processing.

Keywords: Tissue Processing ; Clearing ; Xylene ; Olive Oil ; Histological Staining ; Hematoxyline Eosin

1. Pendahuluan

Teknologi dan teknik biologis yang canggih banyak diperkenalkan di bidang patologi dalam beberapa dekade terakhir yang membantu dalam penegakan diagnosis yang presisi. Akan tetapi, prosedur yang paling banyak digunakan untuk prosedur diagnosis rutin adalah pewarnaan *Hematoxylin and Eosin* (HE) (Ravindran et al., 2018). Pewarnaan HE telah lebih dari 150 tahun sejak pertama kali diperkenalkan, namun masih merupakan pewarnaan yang banyak digunakan dalam dunia patologi (Pandey et al., 2014). Pewarnaan tersebut harus didukung oleh prosesing jaringan untuk menjadi acuan penegakan diagnosis patologis. Prosesing jaringan merupakan proses yang melibatkan larutan kimia yang bereaksi dengan spesimen biologis (Janardhanam et al., 2019). Tujuan utama dari prosesing jaringan adalah untuk menanamkan jaringan dalam media padat, sehingga cukup kuat untuk menopang jaringan dan memberikan kekakuan yang cukup untuk memungkinkan dalam didaparkannya potongan tipis dari bagian yang akan dipotong, namun cukup lunak untuk tidak merusak pisau mikrotom dan jaringan (Falkeholm et al., 2001).

Clearing adalah tahap penting dalam prosesing jaringan histopatologi untuk pengamatan dengan mikroskop cahaya. Tujuan clearing adalah untuk menghilangkan bahan dehidrasi dari jaringan dan untuk mempersiapkan jaringan untuk impregnasi dengan bahan embedding dalam hal ini adalah paraffin. *Xylene* adalah agen clearing yang paling umum digunakan di seluruh dunia. *Xylene* merupakan hidrokarbon aromatik berbau manis, tidak berwarna, dalam bentuk cair atau gas yang ditemukan secara alami dalam batubara, minyak bumi, dan tar dari kayu (Alwahaibi et al., 2018; Metgud et al., 2013). Agen clearing adalah salah satu bahan kimia berbahaya yang ditemukan di laboratorium histologi. Efek toksik dari *xylene* termasuk neurotoksisitas akut, cedera jantung dan ginjal, beberapa diskrasia darah yang fatal, dan gangguan lain yang lebih ringan seperti eritema kulit, kulit kering dan kulit bersisik. Berdasarkan dari bahaya yang ditimbulkan oleh *xylene*, maka diperlukan bahan penggantinya. (Killedar et al., 2019).

Beberapa pengganti *xylene* seperti reagensia yang berasal dari limonene, hidrokarbon alifatik, minyak nabati dan minyak mineral telah dikembangkan secara komersial dalam beberapa tahun terakhir (Adeniyi et al., 2016; Buesa, 2000; Lyon et al., 1995). Namun pengganti *xylene* yang tersedia secara komersial masih kurang efektif, lebih mahal, dan tidak jauh lebih berbahaya daripada *xylene* itu sendiri. Minyak zaitun adalah minyak nabati yang umum digunakan dan tersedia di seluruh dunia terutama di iklim tropis (Pratiwi & Armalina, 2021) dan ramah lingkungan (Mayangsari et al., 2019). Minyak zaitun tidak beracun, stabil

terhadap panas, lambat teroksidasi dan memiliki ketahanan tertinggi untuk berubah menjadi tengik (Okoro & Sambo, 2011; Tanilgan et al., 2007). Minyak zaitun merupakan salah satu minyak nabati dengan komponen asam lemak tak jenuh yang tergolong dalam senyawa hidrokarbon dan bersifat non-polar (Nurasri et al., 2019). Minyak zaitun memiliki kesamaan dengan *xylene* yaitu pada senyawa hidrokarbon dan fenol yang nantinya dapat menghilangkan larutan dehidrasi serta sebagai perantara larutan infiltrasi pada jaringan.

Proses clearing dapat dipengaruhi oleh sifat jaringan. Agen *clearing* harus dapat membersihkan sisa-sisa alkohol pada celah-celah jaringan dari proses dehidrasi sehingga jaringan dapat menerima media infiltrasi. Jaringan kulit dan hepar memiliki kepadatan yang tidak sama, sehingga mungkin akan mempengaruhi hasil *clearing* (Sermadi et al., 2014) apalagi jaringan kulit tikus lebih longgar bila dibandingkan dengan manusia (Sofyanita & Iswara, 2021). Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menggantikan *xylene* dengan minyak zaitun sebagai agen clearing dalam prosesing jaringan dan untuk mengamati pengaruhnya terhadap karakteristik pewarnaan selama pewarnaan HE rutin pada jaringan kulit dan hepar.

2. Metode

Sebanyak dua buah sampel jaringan kulit dan hepar dari mencit (*Mus musculus*) sehat yang didapatkan dari Laboratorium hewan coba IBL Universitas Sultan Agung untuk kemudian dipotong menjadi dua bagian; bagian pertama akan dilakukan tahap prosesing jaringan rutin untuk menghasilkan blok paraffin dengan menggunakan *xylene* sebagai agen *clearing* dan bagian lainnya dari jaringan menggunakan minyak zaitun sebagai agen clearing. Lama waktu clearing untuk *xylene* dan minyak zaitun menggunakan durasi yang sama. 60 menit dengan 2 kali penggantian. Ukuran spesimen adalah $0,5 \times 1$ cm atau lebih besar dan ketebalan 3-5 mm diambil untuk prosesing jaringan (untuk penetrasi agen clearing yang lebih baik). Jaringan yang telah melalui tahap clearing diinfiltrasi dalam dua kali pergantian parafin cair masing-masing selama 1 jam 30 menit. *Embedding* dilakukan dalam lilin parafin cair menggunakan kaset dan dibiarkan memadat sebelum dipotong tipis menggunakan mikrotom. Blok jaringan semuanya dipotong dengan ketebalan 4-5 mikrometer. Semua irisan jaringan diwarnai dengan *hematoxylin* dan *eosin* untuk evaluasi detail histologis.

Preparat yang telah diwarnai diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran berdaya tinggi (lensa objektif 40X) dan dilakukan fotomikrograf.

Karena kategori evaluasi bersifat subjektif, penilaian dan pemberian skor dilakukan oleh tiga pengamat yang berbeda dan hasil penilaian akan dirata-rata, sehingga akan mencegah bias antarpengamat dan intrapengamat. Pengamatan dilakukan pada 5 lapang pandang berbeda. Data yang diperoleh dianalisis statistik dengan SPSS ver.25 menggunakan uji *One way anova* dan *Kruskal Wallis* untuk membandingkan penilaian antar kategori dari pembaca dari seluruh lapang pandang dan uji *T-test* untuk membandingkan hasil antar kelompok *xylene* dan minyak zaitun.

3. Hasil dan Pembahasan

Penilaian hasil pewarnaan hematoxylin eosin yang ditentukan berdasarkan kategori penilaian terhadap struktur sel, seperti inti sel, sitoplasma, dan keseragaman warna preparat sediaan kulit dan hepar mencit (*Mus musculus*) dalam bentuk tabel. Tabel data penelitian berisikan kategori skoring penilaian kualitas sediaan hepar mencit (*Mus musculus*) seperti tabel di bawah ini:

Tabel 1. Kriteria penilaian kualitas preparat hasil pewarnaan hematoxylin eosin

No.	Kategori	Deskripsi	Kualitas	
			Ordinal	Skor
1.	Inti Sel	Tidak tampak jelas warna biru pada inti sel	Tidak Baik	1
		Kurang jelas warna biru pada inti sel	Kurang Baik	2
		Tampak jelas warna biru pada inti sel	Baik	3
2.	Sitoplasma	Tidak tampak jelas warna merah muda pada sitoplasma	Tidak Baik	1
		Kurang jelas warna merah muda pada sitoplasma	Kurang Baik	2
		Tampak jelas warna merah muda pada sitoplasma	Baik	3
3.	Keseragaman Warna	Pewarnaan preparat tidak seragam	Tidak Baik	1
		Pewarnaan preparat kurang seragam	Kurang Baik	2
		Pewarnaan preparat seragam	Baik	3

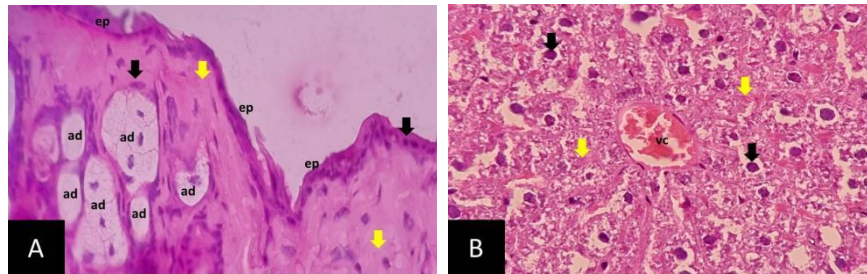
Setelah dilakukan prosesi jaringan, kedua jenis jaringan (kulit dan hepar) dari kelompok *xylene* dan kelompok minyak zaitun tidak mengalami perubahan struktur (pengerutan ataupun mengembang) saat embedding di paraffin. Pembedahan setebal 4-5 mikrometer dengan mikrotom dilakukan untuk pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. Hasil pewarnaan diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran lensa objektif 40X yang diamati pada 5 lapang pandang yang berbeda.

Hasil pengamatan mikroskopis dari kelompok *xylene* pada jaringan kulit dan hepar menunjukkan hasil kualitas baik (tabel 2). Seluruh pembaca memberikan penilaian dengan kriteria baik di seluruh lapang pandang dan kategori penilaian.

Tabel 2. Rerata hasil penilaian pewarnaan hematoxylin eosin kelompok *xylene*

Kelompok <i>xylene</i>						
Preparat	Pembaca	Skor			Rerata Total Skor	p
		Inti Sel	Sitoplasma	Keseragaman Warna		
Kulit	1	3	3	3	9	1.000
	2	3	3	3	9	
	3	3	3	3	9	
Hepar	1	3	3	3	9	1.000
	2	3	3	3	9	
	3	3	3	3	9	

Gambaran histologis pada inti sel, sitoplasma dan keseragaman warna pada kelompok *xylene* disajikan pada gambar 1. Penilaian mendapatkan skor baik karena inti sel menunjukkan warna biru yang jelas, sitoplasma menunjukkan warna merah muda yang jelas, serta dalam setiap lapang pandang menghasilkan intensitas warna yang tidak serupa bila dibandingkan dengan lapang pandang lain.



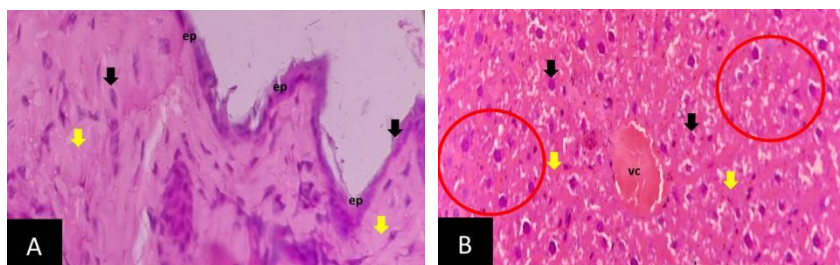
Gambar 1. A. Fotomikrograf specimen kulit dengan pewarnaan hematoxylin eosin pada perbesaran lensa objektif 40X. (Panah hitam menunjukkan inti sel; panah kuning menunjukkan sitoplasma; “ep” menunjukkan lapisan epithelium; “ad” menunjukkan jaringan adiposa). B. Fotomikrograf specimen hepar dengan pewarnaan hematoxylin eosin pada perbesaran lensa objektif 40X. (Panah hitam menunjukkan inti sel; panah kuning menunjukkan sitoplasma; “vc” menunjukkan vena centralis)

Hasil baik pada kelompok ini sudah dapat diperkirakan, karena penggunaan *xylene* merupakan *gold standard* dalam pembuatan preparat histologi. Hasil yang hampir serupa juga didapat pada kelompok minyak zaitun (tabel 3). Hasil penilaian preparat kulit dengan minyak zaitun sebagai agen clearing, tiga pembaca pada lima lapang pandang dari setiap preparat menunjukkan hasil skor baik. Walaupun haya sedikit, terdapat warna yang dihasilkan kurang seragam. Perbedaan ini secara statistik tidak signifikan dengan nilai $p=0.773$

Tabel 3. Rerata hasil penilaian pewarnaan hematoxylin eosin kelompok minyak zaitun

Preparat	Pembaca	Kelompok minyak zaitun			Rerata Total Skor	p
		Inti Sel	Sitoplasma	Keseragaman Warna		
Kulit	1	3	3	3	9	1.000
	2	3	3	3	9	
	3	3	3	3	9	
Hepar	1	3	3	3	8.8	0.773
	2	3	3	3	8.8	
	3	3	3	3	8.6	

Hasil pada preparat hepar yang menjadi pembeda dari kelompok *xylene*, tercatat terdapat lapang pandang yang menunjukkan hasil keseragaman warna yang kurang baik (Gambar 2 di bawah ini).



Keterangan Gambar 2. A. Fotomikrograf specimen kulit dengan pewarnaan hematoxylin eosin pada perbesaran lensa objektif 40X. (Panah hitam menunjukkan inti sel; panah kuning menunjukkan sitoplasma; “ep” menunjukkan lapisan epithelium). B. Fotomikrograf

specimen hepar dengan pewarnaan hematoxylin eosin pada perbesaran lensa objektif 40X. (Panah hitam menunjukkan inti sel; panah kuning menunjukkan sitoplasma; lingkaran merah menunjukkan zona pewarnaan tidak merata; "vc" menunjukkan vena centralis)

Perbandingan dari kedua kelompok *xylene* dan minyak zaitun dari seluruh jaringan bila diperbandingkan maka menunjukkan hasil yang berbeda secara hasil skor, namun perbedaan tersebut tidak berbeda secara statistik dengan nilai $p=0.262$, sehingga mengindikasikan bahwa tidak ada perbedaan dalam kualitas pewarnaan.

Jaringan kulit menunjukkan hasil yang sama antara kelompok *xylene* dan zaitun. Hasil ini mengindikasikan bahwa menggunakan minyak zaitun dapat menggantikan *xylene* untuk proses clearing pada jaringan kulit. *Clearing* dengan minyak zaitun dapat berhasil karena sifat non-polar yang dimilikinya. Sifat non-polar ini dapat berkerja untuk clearing karena berawal dari lipid pada jaringan sifatnya bervariasi dari non-polar (cadangan lemak) atau agak polar/moderate polar (gliserol) sampai yang bersifat sangat polar (fosfolipid). Oleh karena itu reagen dengan sifat polar dan nonpolar diperlukan untuk prosesing jaringan. Parafin untuk embedding bersifat nonpolar, dan agar dapat menyusup masuk ke dalam jaringan, air dan lemak harus dihilangkan karena dianggap sebagai "kotoran" yang akan menghambat proses embedding. Etanol atau alkohol bertingkat (bersifat polar) proses dehidrasi dan menghilangkan lemak/lipid dari jaringan. Setelah etanol atau alkohol yang bersifat polar menghilangkan lemak/lipid harus disingkirkan dari jaringan, sehingga diperlukan zat bersifat non-polar untuk menggantikan etanol dan alkohol di dalam jaringan yang nantinya akan digantikan juga dengan paraffin yang juga bersifat non-polar (Buesa, 2000).

Hasil sedikit berbeda ditemukan pada jaringan hepar, walaupun tidak berbeda signifikan secara statistic, namun masih ditemukan sedikit ketidak seragaman warna. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kepadatan jaringan hepar yang lebih sedikit memiliki rongga dan jaringan adiposa. Hal ini sejalan dengan Sermadi et al 2014 yang menyatakan bahwa kepadatan objek untuk clearing akan mempengaruhi hasil clearing.

Selain kepadatan jaringan, perbedaan dalam ketidak seragaman warna juga dipengaruhi oleh viskositas agen *clearing*. Definisi dari viskositas adalah ketebalan dari suatu bahan cair dan dapat diukur waktu yang dibutuhkan oleh cairan untuk melewati atau menerobos suatu celah (Okoro & Sambo, 2011). Minyak zaitun memiliki viskositas yang lebih tinggi dari *xylene*, sehingga menyebabkan minyak zaitun memerlukan lebih banyak waktu untuk menyusup ke jaringan hepar yang lebih padat dalam proses clearing menghilangkan sisa etanol/alkohol.

xylene, pelarut aromatik yang paling umum digunakan untuk agen *clearing* dan agen deparafinisasi di laboratorium histopatologi, sangat beracun (Stockert et al., 2012). Penelitian ini membuktikan bahwa menggunakan minyak zaitun sebagai minyak nabati yang tidak berbahaya bila dibandingkan dengan minyak mineral lainnya, mudah didapat, dapat menjadi pengganti yang baik untuk *xylene* sebagai agen *clearing*. Hasil penelitian ini yang berhasil melibatkan penggantian *xylene* dalam prosesing jaringan maupun pewarnaan jaringan sejalan dengan peneliti terdahulu seperti larutan pencuci piring dan air lemon (Ananthaneni et al., 2014), sabun cuci (Ankle & Joshi, 2011; Negi et al., 2013; Ramulu et al., 2012), dan refined mineral oil (Premalatha et al., 2013). Penelitian ini memberikan hasil minyak zaitun sebagai minyak nabati dapat menggantikan *xylene*. Selain efektifitas yang hampir sama dengan *xylene*, minyak zaitun juga memiliki keuntungan lain dalam lebih aman saat penggunaan bagi pekerja atau peneliti di laboratorium.

4. Simpulan dan Saran

Simpulan

Hasil pewarnaan *Hematoxylin Eosin* pada jaringan kulit dan hepar dari kelompok minyak zaitun menunjukkan hasil yang serupa dengan kelompok *xylene*. Hasil pembacaan

dari tiga pembaca pada inti sel dan sitoplasma menunjukkan warna yang sama baiknya pada kedua kelompok. Sedikit berbeda pada keseragaman warna, terdapat sedikit lapang pandang dari total seluruh pandang yang menunjukkan skor kurang baik pada kelompok minyak zaitun, yang hasilnya berkebalikan dengan *xylene*. Perbedaan tersebut terjadi pada kedua jenis jaringan karena disebabkan oleh perbedaan kepadatan jaringan dan viskositas dari agen *clearing*. Berdasar hasil yang diperoleh, minyak zaitun sebagai minyak nabati dapat disarankan untuk pengganti *xylene*. Selain efektifitas yang hampir sama, minyak zaitun juga lebih aman dalam penggunaan

Saran

Berdasarkan hasil yang didapat, prosesing jaringan dan pewarnaan hematoksilin dapat dicoba sebagai pengganti *xylene* karena hasil yang serupa dan memiliki tingkat keamanan yang lebih tinggi. Hasil penelitian tentang minyak zaitun dalam menggantikan *xylene* akan lebih kuat lagi apabila bisa dilanjutkan dengan membandingkan jaringan lain yang memiliki kepadatan yang berbeda lagi serta mencoba untuk menggantikan *xylene* dengan minyak zaitun pada tahap lain.

5. Daftar Pustaka

- Adeniyi, I. M., Adejoba, O. R., Akinlabi, F. M., & Alao, O. J. (2016). Vegetable Oils as Clearing Agents. *Achievements in the Life Sciences*, 10(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.05.001>
- Alwahaibi, N., Aljaradi, S., & Alazri, H. (2018). Alternative to xylene as a clearing agent in histopathology. *Journal of Laboratory Physicians*, 10(02), 189–193. https://doi.org/10.4103/jlp.jlp_111_17
- Ananthaneni, A., Namala, S., Guduru, V. S., Ramprasad, V. V. S., Ramisetty, S. D., Udayashankar, U., & Naik, K. K. (2014). Efficacy of 1.5% Dish Washing Solution and 95% Lemon Water in Substituting Perilous Xylene as a Deparaffinizing Agent for Routine H and E Staining Procedure: A Short Study. *Scientifica*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/707310>
- Ankle, M. R., & Joshi, P. S. (2011). 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*, 15(2), 161–167. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.84482>
- Buesa, R. J. (2000). Mineral oil: The best xylene substitute for tissue processing yet? *Journal of Histotechnology*, 23(2), 143–149. <https://doi.org/10.1179/his.2000.23.2.143>
- Falkeholm, L., Grant, C. A., Magnusson, A., & Möller, E. (2001). Xylene-free method for histological preparation: A multicentre evaluation. *Laboratory Investigation*, 81(9), 1213–1221. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780335>
- Janardhanam, D., Saranya, M., Tamilthangam, P., Swathiraman, J., Shanmathee, K., & Preethi, R. (2019). Kerosene as an Alternative to Xylene in Histopathological Tissue Processing and Staining: An Experimental Study. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 11(2), S376-9. <https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS>
- Killedar, S., Sermadi Z M, W., K.C, N., Acharya, S., & Prabhu, S. (2019). Olive oil as xylene substitute. *Journal of Oral Medicine, Oral Surgery, Oral Pathology and Oral Radiology*, 5(2), 46–51. <https://doi.org/10.18231/j.jooo.2019.013>
- Lyon, H., Holm, I., Prentø, P., & Balslev, E. (1995). Non-hazardous organic solvents in the paraffin-embedding technique: a rational approach - Aliphatic monoesters for clearing and dewaxing: butyldecanoate. *Histochemistry and Cell Biology*, 103(4), 263–269. <https://doi.org/10.1007/BF01457410>
- Mayangsari, M. A., Nuroini, F., Ariyadi, T., & Semarang, U. M. (2019). Perbedaan Kualitas Preparat Ginjal Marmut pada Proses Deparaffinasi Menggunakan Xylol dan Minyak Zaitun pada Pewarnaan HE. *Prosiding Mahasiswa Seminar Nasional Unimus*, 2, 190–194.

- Metgud, R., Astekar, M. S., Soni, A., Naik, S., & Vanishree, M. (2013). Conventional xylene and xylene-free methods for routine histopathological preparation of tissue sections. *Biotechnic and Histochemistry*, 88(5), 235–241. <https://doi.org/10.3109/10520295.2013.764015>
- Negi, A., Puri, A., Gupta, R., Chauhan, I., Nangia, R., & Sachdeva, A. (2013). Biosafe alternative to xylene: A comparative study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 17(3), 363–366. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.125199>
- Nurasri, R., Wachidah Yuniwanti, E. Y., & Djaelani, M. A. (2019). Pengaruh Pemberian Virgin Coconut Oil (VCO) dan Olive Oil terhadap Mikroanatomi Ren Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 20(2), 133. <https://doi.org/10.14710/bioma.20.2.133-139>
- Okoro, L. N., & Sambo, F. I. (2011). Thermodynamic and viscometric evaluation of biodiesel and blends from olive oil and cashew nut oil. *Research Journal of Chemical Sciences*, 1(August 2015), 90–97.
- Pandey, P., Dixit, A., Tanwar, A., Sharma, A., & Mittal, S. (2014). 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*, 6(02), 084–090. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.141504>
- Pratiwi, E. N., & Armalina, D. (2021). Mikroskopis Preparat Mus Musculus Ginjal Dideparafinisasi dengan Minyak Zaitun pada Pewarnaan Eosin (HE) Hematoxylin (HE) Microscopic of Mus Musculus Kidney Preparation Deparaffinized with Olive Oil in ELA NUR PRATIWI DESY ARMALINA Laboratorium Klinik. *Jaringan Laboratorium Medis*, 03(01), 61–66.
- Premalatha, B. R., Patil, S., Rao, R. S., & Indu, M. (2013). Mineral oil-A biofriendly substitute for xylene in deparaffinization: A novel method. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 14(2), 281–286. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1314>
- Ramulu, S., Ravikumar, S., Sharma, P., Koneru, A., Patil, R., & Ramesh, D. N. S. V. (2012). Liquid dish washing soap: An excellent substitute for xylene and alcohol in hematoxylin and eosin staining procedure. *Journal of Orofacial Sciences*, 4(1), 37. <https://doi.org/10.4103/0975-8844.99890>
- Ravindran, R., Sruthi, A. K., Ameena, M., & Harish, R. N. K. D. (2018). Bleached Palm Oil as a Bio-friendly Substitute for Xylene: A Comparative Study. *Oral & Maxillofacial Pathology Journal*, 9(2), 63–69.
- Sermadi, W., Prabhu, S., Acharya, S., & Javali, S. B. (2014). Comparing the efficacy of coconut oil and xylene as a clearing agent in the histopathology laboratory. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 18(5), 49–53. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.141348>
- Sofyanita, E. N., & Iswara, A. (2021). Rasio Penutupan Luka pada Tikus Diabetes Diinduksi Streptozotocin dengan Perlakuan Dressing Tipe Pasif dan Interaktif (Penelitian Pendahuluan) Pilo. 03(02), 67–71.
- Stockert, J. C., López-Arias, B., Del Castillo, P., Romero, A., & Blázquez-Castro, A. (2012). Replacing xylene with n-heptane for paraffin embedding. *Biotechnic and Histochemistry*, 87(7), 464–467. <https://doi.org/10.3109/10520295.2012.701764>
- Tanilgan, K., Özcan, M. M., & Ünver, A. (2007). Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L.) varieties and their oils. *Grasas y Aceites*, 58(2), 142–147. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i2.78>