

Ez Prep Concentrate (Ez Prep) Sebagai Alternatif Reagen Deparafinisasi Pada Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Apriani^{1✉}, Andrianus², Stephanie Marisca³, Patricia Diana⁴

^{1,2} Prodi D-III Teknologi Laboratorium Medis, STIK KESOSI, Jakarta, Indonesia

^{3,4} Laboratorium Patologi Anatomi, Siloam Hospital Lippo Village, Tangerang, Indonesia

Informasi Artikel

Riwayat Artikel

Diserahkan : 17-11-2022

Direvisi : 30-11-2022

Diterima : 02-12-2022

Kata Kunci:

Agens deparafinisasi, Ez prep concentrate, xylol

Keywords :

Deparaffinizing agent, Ez prep Concentrate, Xylol

ABSTRAK

Xylol adalah agens deparafinisasi yang umum digunakan di tiap tahapan deparafinisasi pada pewarnaan histologi jaringan. Namun karena sifat toksisitas tinggi dan harga yang mahal, maka diupayakan mencari alternatif yang lebih aman dan murah. *Ez Prep concentrate* adalah salah satu agens deparafinisasi yang umum digunakan pada alat *Ventana Medical Systems, Inc (Ventana)*. Produk ini dirancang untuk digunakan sebagai pewarna slide otomatis *BenchMark Series*. Selain harga nya lebih murah dibanding xylol, toksisitasnya juga rendah. Perlu dibuktikan efektifitas reagen *EZ Prep concentrate* agar dapat digunakan sebagai alternatif pengganti xylol. Penelitian ini bersifat eksperimen yang dilaksanakan pada bulan September – November 2022 di Laboratorium Patologi Anatomi Siloam Hospital Lippo Village. Sampel yang digunakan jaringan miom dan payudara. Hasil penelitian menunjukkan semua sampel yang dideparafinasi dengan *EZ prep concentrate* memberikan kualitas hasil mikroskopis yang baik (skor 3). Maka, *EZ Prep concentrate* dapat dipertimbangkan penggunaannya sebagai pengganti xylol.

ABSTRACT

Xylol is a deparaffinizing agent that is commonly used in each deparaffinization step in tissue histology staining. However, due to its high toxicity and high price, efforts have been made to find alternatives that are safer and cheaper. Ez Prep concentrate is one of the most commonly used deparaffinizing agents in Ventana Medical Systems, Inc (Ventana) devices. This product is designed for use as a BenchMark Series automated slide stainer. Besides being cheaper than xylol, its toxicity is also low. It is necessary to prove the effectiveness of the EZ Prep concentrate reagent so that it can be used as an alternative to xylol. This research is experimental in nature and will be carried out from September to November 2022 at the Siloam Hospital Lippo Village Anatomical Pathology Laboratory. The sample used is myoma and breast tissue. The results showed that all samples deparaffined with EZ prep concentrate gave good quality microscopic results (score 3). Thus, EZ Prep concentrate can be considered as a substitute for xylol.

Corresponding Author :

Apriani

Prodi D-III Teknologi Laboratorium Medis, STIK KESOSI, Jakarta

Jln Bojong raya no.58 Kelurahan Rawabuaya, Kecamatan Cengkareng Jakarta Barat

Email: aapriani1504@gmail.com

PENDAHULUAN

Pada pembuatan preparat jaringan diperlukan tiga tahapan proses, yaitu proses pembuatan blok parafin, proses pemotongan dan proses pewarnaan (Anthony L. Mescher, 2016; Titford, 2009). Tahapan dimana menjadi penentu keberhasilan proses pembuatan jaringan ini adalah teramatinya dengan jelas dibawah mikroskop bagian-bagian jaringan seperti sitoplasma dan inti sel yang sudah diberi pewarnaan. Tahap ini dinamakan dengan tahapan pewarnaan. Pewarnaan digunakan untuk mempertegas bagian-bagian penting dari jaringan serta untuk meningkatkan kontras jaringan. Dalam kasus diagnosis medis tumor, pewarnaan adalah proses medis umum yang dilakukan. Pewarnaan tersebut dapat menjelaskan batasan posterior dan anterior jaringan sampel untuk menemukan sel yang sakit atau tumor atau sel patologis lainnya (Musumeci, 2014). Dalam studi biologi, pewarnaan digunakan untuk menandai sel dan menandai asam nukleat, protein, atau elektroforesis gel untuk membantu pemeriksaan mikroskopis (Yadav et al., 2019). Dalam beberapa kasus, dapat digunakan berbagai metode pewarnaan ganda seperti pewarnaan diferensial, *double staining* atau *multiple staining* (Avwioro, 2011).

Pada tahap pewarnaan, pewarna umum yang digunakan adalah Hematoksilin-Eosin (HE). Hematoksilin adalah pewarnaan lemah dan umumnya digunakan dalam bentuk kombinasi larutan lain yang teroksidasi (Shostak, 2013). Pewarna hematoksilin akan memberikan warna biru (basofilik) pada inti sel (nucleus). Sedangkan eosin merupakan pewarna bersifat asam yang memiliki afinitas terhadap sitoplasma sel. Ketika afinitas eosin bekerja, maka sitoplasma sel dan jaringan penyambung akan terwarnai dengan warna merah muda (Alturkistani et al., 2015; Anthony L. Mescher, 2016).

Tahap pewarnaan dengan Hematoksilin-Eosin pada preparat jaringan akan melewati beberapa proses yaitu deparafinisasi, rehidrasi, pewarnaan hematoksilin, dehidrasi, pewarnaan eosin, clearing, dan mounting. Tahap awal yang dilalui pada proses pewarnaan adalah deparafinisasi. Deparafinisasi merupakan tahapan penting dalam pewarnaan jaringan. Tujuan proses ini adalah untuk menghilangkan parafin dari jaringan dan kaca objek sebelum proses pewarnaan dilakukan agar penyerapan warna dapat maksimal. Parafin adalah campuran hidrokarbon yang tidak larut dalam air (hidrofobik), maka untuk dapat melarutkan harus menggunakan pelarut non polar. Pelarut non polar yang umum untuk deparafinisasi adalah xylol (Khristian & Inderiati, 2017). Xylol termasuk kelompok benzene yang dibuat melalui metilasi toluene dan benzene. Sebagai pelarut yang mudah dan sering digunakan dalam bentuk cairan yang tidak bewarna,

Beberapa peneliti sudah ada yang mencari alternatif penggunaan larutan untuk deparafinisasi selain xylol. Deparafinisasi dengan minyak zaitun pada jaringan ginjal mencit didapatkan hasil dengan kualitas preparat yang baik sebesar 87% (Pratiwi & Armalina, 2021). Begitupun yang dilakukan Mayangsari et al, mendapatkan hasil yang sama baiknya dengan deparafinisasi jaringan ginjal marmot menggunakan xylol (Mayangsari et al., 2019). Deparafinisasi dengan alternatif lain pernah dilakukan menggunakan UltraclearTM, yaitu larutan berbasis isoparafin yang tidak bewarna dan berbau, berasal dari fraksinasi dan perengkahan minyak mentah, ramah lingkungan dan tidak ada efek toksik pada manusia (Alwahaibi & Aldughaishi, 2019). Larutan lain yang bisa juga dijadikan alternatif penggunaan xylol adalah larutan *EZ Pre Concentrate* (10X) (*EZ Prep*). Larutan ini umumnya digunakan pada alat Ventana Medical Systems, Inc (Ventana). Produk ini dirancang untuk digunakan sebagai pewarna slide otomatis *BenchMark Series*. Keunggulan produk ini dibandingkan xylol sebagai pelarut kimia yaitu mudah didapatkan dipasaran dengan harga yang lebih ekonomis dibandingkan xylol. Satu botol kemasan larutan *EZ Prep* (10X) (2 Liter) berisi larutan detergen berbasis air dengan kandungan ProClin 300 (0,5%) sebagai pengawet. Komposisi *EZ Prep* sebanyak 2 L dalam satu kemasaannya dapat diencerkan penggunaannya menggunakan akuades menjadi sebanyak 20 L. Bila dibandingkan xylol dari sisi harga bisa lebih ekonomis dan pemakaian yang lebih lama dengan perhitungan jumlah pemakaian standar 250 ml dalam 1 minggu (tergantung sampel yang digunakan setiap laboratorium). Beberapa keunggulan larutan *EZ Prep* dibandingkan xylol adalah meskipun keduanya merupakan bahan kimia namun memiliki efek toksik yang rendah (kategori

1). Menurut status peraturan OSHA *EZ Prep* tidak dianggap berbahaya oleh Standar Komunikasi Bahaya OSHA (29 CFR 1910.1200).

Dengan mempertimbangkan sisi ekonomis dari larutan *EZ Prep* (10X) perlu dilakukan pengujian dengan melihat apakah deparafinisasi menggunakan *EZ Prep* dapat memberikan hasil yang optimal seperti penggunaan larutan xylol. Maka penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efektifitas reagen *EZ Prep* agar dapat digunakan sebagai alternatif pengganti xylol.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini bersifat ekperimental. Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi anatomi pada bulan September – November 2022. Subjek penelitian adalah jaringan miom dan jaringan payudara. Masing masing sampel jaringan miom dan payudara dibuat preparat sebanyak 15 yang dideparafinisasi menggunakan *EZ Prep* dan 15 preparat dideparafinisasi menggunakan xylol sebagai kontrol. Alat yang digunakan yaitu pisau bedah, pinset, kaset jaringan, mikrotom, pisau potong blok parafin, mikroskop, kaca objek, deck glass, waterbath dan oven. Bahan yang digunakan yaitu *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10%, Alkohol (70%, 80%, 90%, 96%, absolut), Xylol (1,2 dan 3), lilin parafin cair, Hematoxylin-eosin, Entelan dan Jaringan sampel miom dan payudara pasien. Larutan *EZ Prep* dan akuades.

Prosedur penelitian diawali dengan mempersiapkan sampel jaringan. Sampel jaringan (miom dan payudara) di fiksasi dengan larutan NBF 10% (2 jam) (fiksasi ini digunakan untuk pematangan jaringan setelah mikroskopis, karena jaringan telah terfiksasi 30 menit pasca bedah). Selanjutnya tahap dehidrasi menggunakan etanol absolut (dilakukan sebanyak 6 kali, masing masing selama 1 jam). Lalu dilakukan *clearing* menggunakan xylol (sebanyak 3 kali, masing-masing dilakukan 1 jam). Selanjutnya infiltrasi parafin (57-59°C) (dilakukan 3 kali, masing-masing selama 1 jam). Tahap *embedding*, dilakukan pencetakan dengan parafin cair dan kaset yang didinginkan. Potongan jaringan dibenamkan dalam blok parafin, lalu dipotong tipis (3-5 mikron) menggunakan mikrotom lalu diletakkan di slide. Tahap pewarnaan diawali dengan deparafinisasi, masing-masing jaringan dideparafinisasi menggunakan xylol (kontrol) sebanyak 3 kali selama masing-masing 5 menit. Pada sampel jaringan miom dan payudara dideparafinisasi menggunakan *EZ Prep* sebanyak 3 kali, selama masing-masing 5 menit. Tahap selanjutnya rehidrasi dengan alkohol absolut (5 menit), alkohol 96% (5 menit), alkohol 80% (5 menit) dan alkohol 70% (5 menit) lalu dibilas akuabides (1 menit). Tahap pewarnaan hematoxilin (5 menit), bilas air mengalir (3 menit), bilas *bluing* reagen (1 menit) dan diwarnai dengan eosin (30 detik – 1 menit). Tahap selanjutnya dehidrasi dengan mencelupkan kedalam alkohol 70 %, 80%, 96%, dan 100% (masing-masing 5 kali celup). Dilanjutkan dengan tahap *clearing* dengan xylol sebanyak 3 kali (masing-masing 5 menit). Tahap akhir preparat ditutup (*mounting*) dan diamati dibawah mikroskop (perbesaran 40x)

Pengamatan dilakukan pada beberapa lapang pandang. Pada setiap lapang pandang dilakukan kualitas mikroskopis dengan mengamati inti sel, sitoplasma, dan keseragaman warna pada preparat jaringan miom dan payudara. Kemudian dihitung bobot skor kualitas mikroskopis sediaan dari 10 lapang pandang disetiap preparat menggunakan model skoring kualitas sediaan histologis. Skoring (1, tidak baik) bila kualitas warna pada jaringan, warna biru pada inti sel tidak jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma tidak jelas dan kualitas preparat tidak baik. Skoring (2, kurang baik) bila kualitas warna pada jaringan, warna biru pada inti sel terlihat samar/ kurang jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma kurang, serta warna preparat kurang baik tetapi masih dapat didiagnosa. Skoring (3, baik) bila kualitas warna pada jaringan, warna biru pada inti sel terlihat sangat jelas, warna merah (eosin) pada sitoplasma, serta warna pada preparate dan sediaan dapat didiagnosa dengan jelas. Hasil pengamatan terhadap skoring tersebut di hitung presentase nya lalu disajikan dalam bentuk tabel dan dideskripsikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

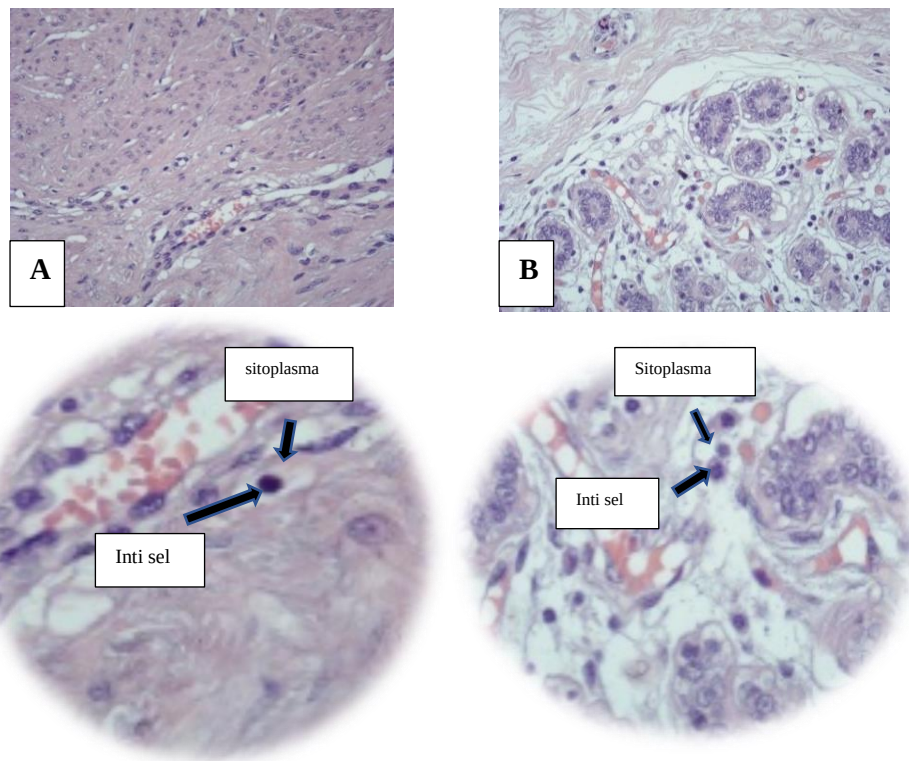
Berdasarkan hasil proses deparafinisasi dengan *EZ Prep* pada pewarnaan Hematoksilin-Eosin pada sampel jaringan payudara dan miom yang diamati secara mikroskopik seluruh sampel (100%) menunjukkan gambar dengan hasil yang baik (skor 3). Sehingga sediaan dapat didiagnosis dengan jelas (Tabel 1). Hasil pengamatan pada sediaan jaringan payudara dan miom pada kontrol menggunakan deparafinisasi xylol terlihat inti sel bewarna biru dan sitoplasma bewarna merah sangat jelas terlihat (Gambar 1). Begitupun hasil yang dideparafinisasi menggunakan *EZ prep* pada jaringan payudara dan miom, seluruh nya (100%) menunjukkan hasil dengan skor (3) baik (Gambar 2).

Tabel 1. Hasil Pewarnaan Hematoksilin – Eosin menggunakan alternatif agen deparafinisasi *EZ Prep concentrate* pada sampel payudara dan miom

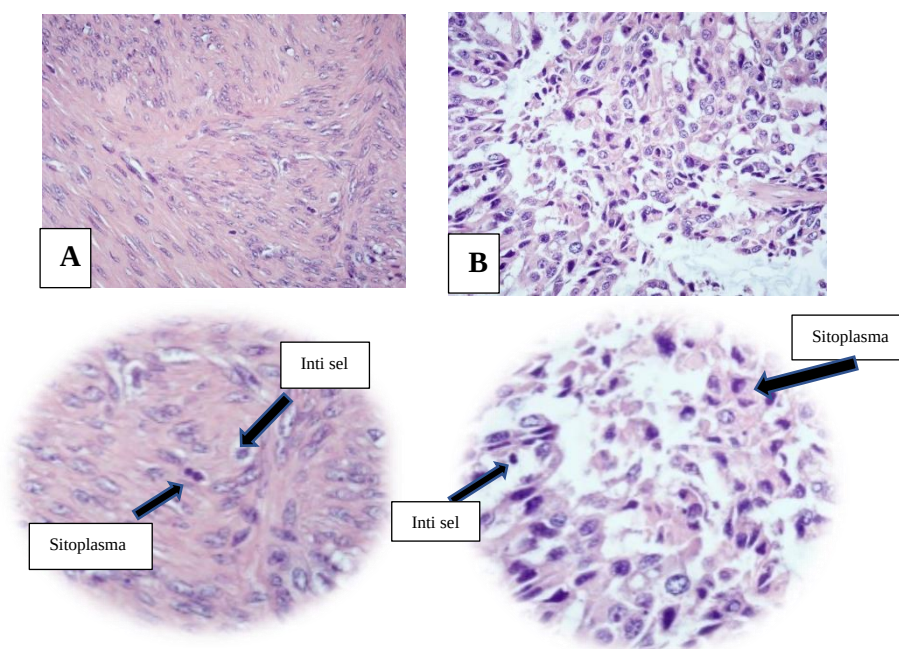
Kategori	Skor	Xylol (kontrol)	Sampel payudara	Sampel miom
<i>Tidak baik</i>	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Kurang baik</i>	2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Baik</i>	3	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)

Tahap deparafinisasi pada pewarnaan Hematoksilin - Eosin adalah tahapan penting yang tidak boleh terlewatkan dalam pembuatan preparat jaringan. Tahapan ini berguna untuk menghilangkan atau melarutkan paraffin, agar penyerapan warna dapat maksimal. Sehingga jaringan yang akan diamati secara mikroskopik akan terfiltrasi dengan baik dengan cairan zat warna yang diberikan (Feldman & Wolfe, 2014; Ross & Pawlina, 2006; Sumanto & Didik, 2014).

Beberapa penelitian banyak dilakukan untuk mengantisipasi pengaruh buruk jangka panjang terhadap penggunaan xylol di laboratorium. Paparan jangka panjang akan menyebabkan sejumlah besar akumulasi xylol di jaringan adiposa dan otot (Rajan & Malathi, 2014). Beberapa larutan kimia yang direkomendasikan untuk tahap deparafinisasi seperti Aqua-DePar, EZ-Dewax, dan Skip Dewax terbukti dapat memperlihatkan hasil yang sama baiknya dengan xylol. Pabrikan yang memproduksi alat pewarnaan jaringan otomatis (Dako, Leica dan Ventana) menambahkan reagen deparafinisasi dalam alatnya salah satunya yaitu *EZ Prep Concentration* (10x). Reagen ini tentunya akan bekerja maksimal bila dikondisikan didalam alatnya, namun setelah diuji penggunaannya diluar mesin otomatisnya tersebut, ternyata dapat bekerja maksimal dengan hasil yang sama baiknya seperti penggunaan di dalam mesin, dan kualitas pewarnaan jaringan juga sama baiknya dengan menggunakan deparafinisasi xylol. Hal tersebut terindikasi dengan teramatinya dengan jelas bagian-bagian jaringan seperti inti sel dan sitoplasma secara mikroskopis.



Gambar 1. Hasil pengamatan pada sediaan jaringan payudara dan miom menggunakan deparafinisasi xylol sebagai kontrol, (A) jaringan miom, (B) Jaringan payudara



Gambar 2. Hasil pengamatan pada sediaan jaringan payudara dan miom menggunakan deparafinisasi Ez Prep concentrate, (A) jaringan miom, (B) Jaringan payudara

Berdasarkan hasil penelitian ini, penggunaan *EZ Prep* sebagai alternatif agen deparafinisasi pengganti xylol dapat dipertimbangkan penggunaannya di laboratorium patologi anatomi karena memberikan kualitas hasil yang sama baiknya dengan xylol. Terdapat beberapa pertimbangan yang dapat dijadikan alasan untuk memilih *EZ Prep* sebagai pengganti xylol. Selain tentunya xylol juga memiliki banyak kelebihan dalam pelarut paraffin yang umum digunakan selama ini dalam

proses deparafinisasi (Buesa & Peshkov, 2009). Dibandingkan dengan xylol yang memiliki komposisi 90,5% karbon dan 9,5% hydrogen (Smidt & Friedrich, 1978), Larutan *EZ Prep* hanya mengandung larutan detergen berbasis air dengan Proclin 300 (0,5%) yang berfungsi sebagai pengawet. Kelemahan dari campuran ProClin 300 yang digunakan sebagai pengawet dalam larutan *EZ Prep* adalah sifatnya sebagai suatu iritan yang dapat menyebabkan sensitisasi melalui kontak kulit (Ventana, Medical, 2011). Secara kimiawi efek toksik xylol berada pada level 4 (Roth, 2021), lebih toksik sifatnya daripada *EZ prep* yang dianggap tidak berbahaya oleh standar komunikasi bahaya OSHA (29 CFR 1910.1200) (United States Departement of labor, 2013). Xylol juga diketahui memiliki resiko bahaya baik secara kimiawi, biologis, mekanis maupun lingkungan (Smidt & Friedrich, 1978). Selain memiliki efek serius bagi kesehatan tubuh, harga xylol juga relatif cukup mahal.

Keunggulan lain *EZ Prep* dibandingkan xylol adalah harga reagen nya yang relatif lebih murah. Perhitungan sisi ekonomisnya dapat digambarkan apabila komposisi *EZ Prep* sebanyak 2 L dalam satu kemasannya, dapat diencerkan penggunaannya menggunakan akuades menjadi sebanyak 20 L. Artinya pemakaian dapat lebih lama dibandingkan xylol (yang satu kemasannya hanya sebanyak 2L). Hal tersebut disesuaikan dengan perhitungan jumlah pemakaian standar 250 ml dalam 1 minggu (tergantung sampel yang digunakan setiap laboratorium).

Selain *EZ Prep*, penelitian lain yang memberikan alternatif pengganti agen deparafinisasi selain xylol adalah Ultraclear™ (Alwahaibi & Aldughaishi, 2019). Kualitas hasil mikroskopis yang dihasilkan sama baiknya dengan xylol, namun dari harga lebih mahal dua kali lipat daripada harga xylol.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *EZ Prep concentrate* adalah agen deparafinisasi yang dapat dipertimbangkan penggunaannya sebagai pengganti xylol. Selain unggul dalam biaya, karena harganya lebih murah dibandingkan xylol, keselamatan pekerja laboratorium histopatologi juga dapat dijaga karena toksisitasnya juga lebih rendah dibandingkan xylol.

Saran

Analisis laboratorium Patologi Anatomi dapat menggunakan reagen *Ez Prep concentrate* sebagai alternatif agen deparafinisasi pengganti xylol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada pihak laboratorium Patologi Anatomi Siloam Hospital lippo Village atas dukungan fasilitas dan kerjasamanya untuk kelancaran penelitian ini.

REFERENSI

- Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2015). Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science*, 8(3), 72–79. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>
- 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. https://doi.org/10.4103/jlp.jlp_169_18
- Anthony L. Mescher, L. C. U. J. (2016). *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas 14th Edition*.pdf. *Mc Graw Hill*, 544.
- Avwioro, G. (2011). Histochemical uses of Haematoxylin - A review. *Jpcs*, 1(April-June), 24–34. http://www.arpapress.com/Volumes/JPCS/Vol1/JPCS_1_05.pdf
- Buesa, R. J., & Peshkov, M. V. (2009). Histology without xylene. *Annals of Diagnostic Pathology*, 13(4), 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2008.12.005>
- Feldman, T., & Wolfe, D. (2014). Tissue Processing and hematoxylin and Eosin Staining. *Springer Science*, 1180, 31–42. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2>

- Khristian, E., & Inderiati, D. (2017). *Sitohistoteknologi*. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Mayangsari, M. A., Nuroini, F., Ariyadi, T., & Semarang, U. M. (2019). Perbedaan Kualitas Preparat Ginjal Marmut pada Proses Deparafinisasi Menggunakan Xylol dan Minyak Zaitun pada Pewarnaan HE. *Prosiding Mahasiswa Seminar Nasional Unimus*, 2, 190–194.
- Musumeci, G. (2014). Past, present and future: overview on histology and histopathology. *Journal of Histology and Histopathology*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.7243/2055-091x-1-5>
- 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 Deparafinized with Olive Oil in ELA NUR PRATIWI DESY ARMALINA Laboratorium Klinik. *Jaringan Laboratorium Medis*, 03(01), 61–66. <https://ejournal.poltekkes-smg.ac.id/ojs/index.php/JLM/article/view/8005/pdf>
- Rajan, S. T., & Malathi, N. (2014). Health hazards of xylene: A literature review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(2), 271–274. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7544.4079>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *HISTOLOGY A TEX AND ATLAS WITH CORRELATED CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.
- Roth. (2021). *Safety data sheet according to regulation (EC) No. 1907/2006 (REACH)* (pp. 1–21).
- Shostak, S. (2013). Histology's Nomenclature: Past, Present and Future. *Biological Systems: Open Access*, 02(04). <https://doi.org/10.4172/2329-6577.1000122>
- Smidt, P. G., & Friedrich, U. (1978). THE MUTAGENIC EFFECT OF BENZENE, TOLUENE AND XYLENE STUDIED BY THE SCE TECHNIQUE. *Mutation Research*, 58, 313–316.
- Sumanto, & Didik. (2014). *Belajar Sitohistoteknologi Untuk Pemula*. IAKIS.
- Titford, M. (2009). Progress in the development of microscopical techniques for diagnostic pathology. *Journal of Histotechnology*, 32(1), 9–19. <https://doi.org/10.1179/his.2009.32.1.9>
- United States Departement of labor. (2013). *Hazard communication; Occupational Safety and health Standards*.
- Ventana, Medical, S. (2011). *Roche Diagnostics GmbH*.
- Yadav, S., Pereira, T., Kumar, S., Jadhav, A., Wankhede, M., Birje, S., Pathology, O., Mumbai, N., Pathology, O., Mumbai, N., Pathology, O., Mumbai, N., Student, P. G., Pathology, O., & Patil, D. Y. (2019). HISTOPATHOLOGICAL STAINS - A REVIEW. *International Journal of Current Research*, 11(11), 8163–8167.