

# HISTOLOGY SLIDE QUALITY COMPARATIVE STUDY; IMPREGNATION AND EMBEDDING USING BEESWAX AND PARAFFIN

Hasna Dewi<sup>1</sup>, Fairuz Quzwain<sup>2</sup>, Nadia Wulansari<sup>3</sup>

Department of Histopathology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Jambi University

Email: [hasna\\_dewi@unja.ac.id](mailto:hasna_dewi@unja.ac.id)

## ABSTRACT

**Background:** Paraffin is the most popular infiltration and embedding medium in histopathology laboratories to date. It is a white or colorless soft solid derived from petroleum, coal or oil shale. Its limitations and calls to return to nature for better sustainability and safety, prompting the search for alternative materials to replace paraffin. The aim of this study is to compare paraffin that is used as routine embedding media and beeswax as alternative in impregnation and embedding of various tissues. **Methods:** Ten tissue specimens were impregnated and embedded in beeswax and paraffin. After manual processing, all sections were stained with Hematoxylin Eosin to compare the effect of beeswax and paraffin based on the features of the integrity of the section, uniformity of the staining which includes nuclear details, cytoplasmic details, and background staining.

**Result:** Beeswax showed well impregnation and embedding of the tissues as well as the preservation of the nuclear details, good cytoplasmic appearance, good tissue architecture and no bad effect on staining characteristics of the tissue.

**Conclusion:** Beeswax could be an alternative to paraffin. Further research on the resistance of the block during storage and whether it affects other tests such as immunohistochemistry needs to be done.

**Keywords:** Beeswax, Embedding, Impregnation, Paraffin

## ABSTRAK

**Pendahuluan:** Parafin merupakan media infiltrasi dan *embedding* yang paling populer digunakan laboratorium histopatologi hingga saat ini dalam membuat preparat histologi. Parafin merupakan lilin putih tidak berwarna yang berasal dari minyak bumi atau batu bara. Keterbatasannya dan seruan untuk kembali ke alam demi keberlanjutan dan keamanan yang lebih baik, mendorong pencarian bahan alternatif untuk menggantikan parafin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan parafin yang digunakan sebagai media tanam rutin dan lilin lebah sebagai alternatif dalam *impregnasi* dan *embedding* berbagai jaringan.

**Metode:** Sepuluh spesimen jaringan dibuat menjadi preparat histologi, ditanam dalam lilin lebah dan paraffin. Setelah proses manual, semua preparat diwarnai dengan Hematoxylin Eosin untuk membandingkan efek lilin lebah dan paraffin berdasarkan fitur integritas bagian, keseragaman pewarnaan yang meliputi detail inti, detail sitoplasma, dan pewarnaan latar belakang preparat.

**Hasil:** Beeswax menunjukkan impregnasi dan embedding jaringan yang baik serta pelestarian detail inti, penampilan sitoplasma yang baik, arsitektur jaringan yang baik dan tidak ada efek buruk pada karakteristik pewarnaan jaringan.

**Kesimpulan:** Lilin lebah bisa menjadi alternatif pengganti paraffin. Penelitian lebih lanjut tentang ketahanan blok selama penyimpanan dan apakah itu mempengaruhi tes lain seperti imunohistokimia perlu dilakukan.

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

## PENDAHULUAN

Parafin digunakan sebagai media infiltrasi dan *embedding* paling populer dalam membuat sediaan preparat histopatologi di laboratorium-laboratorium histopatologi. Sifatnya bervariasi tergantung pada titik leleh yang digunakan, berkisar antara 47 hingga 64°C. Lilin parafin ini dapat menembus jaringan dalam bentuk cair dan mengeras dengan cepat ketika didinginkan. Jaringan diresapi dengan media, membentuk matriks dan mencegah distorsi struktur jaringan selama proses mikrotomi selanjutnya.<sup>1</sup>

Spesimen jaringan yang akan dibuat menjadi sediaan preparat histologi, setelah dipotong sesuai ukuran kaset, kemudian diorientasikan dengan benar dalam media pendukung yang dapat memberikan dukungan eksternal selama proses mikrotomi. Media penyisipan harus mengisi matriks di dalam jaringan dan mendukung komponen seluler. Media harus pula memberikan elastisitas, mencegah distorsi dan juga memfasilitasi pemotongan blok menjadi lembaran-lembaran tipis pada mikrotomi. Lilin parafin tidak terlalu mahal, namun selama ini mampu memberikan hasil yang berkualitas dan mudah disesuaikan untuk berbagai penggunaan. Lilin parafin juga kompatibel dengan sebagian besar pewarnaan rutin dan khusus, serta pemeriksaan imunohistokimia.<sup>1</sup>

Lilin parafin dikenal memiliki beberapa bahaya kesehatan. Lilin parafin mengandung hingga 11 senyawa karsinogenik. Bahaya kesehatan biasanya akan lebih meningkat ketika paraffin dicampur dengan parfum dan diperparah dengan cairan fiksatif kimia dan cairan kimia lainnya. Setiap turunan minyak mineral dapat terkontaminasi dengan Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH), salah satu penyebab kanker. Bahan kimia berbahaya dari parafin dilepaskan sepanjang waktu, bukan hanya saat pembakaran lilin. Hal ini karena proses oksidasi adalah proses yang berkelanjutan di lingkungan alami.<sup>2</sup>

Bahan lain lilin yang mirip paraffin adalah lilin lebah (Beeswax), merupakan lilin alami yang diproduksi oleh lebah madu dari genus *Apis*. Secara kimiawi, lilin lebah terdiri dari ester asam lemak dan berbagai alkohol rantai panjang. Lilin lebah memiliki kisaran titik leleh yang relatif rendah 62 ° C – 64 ° C (144 ° F – 147 ° F). Lilin ini melembut saat dipegang di tangan, dan meleleh pada suhu 62 ° C – 66 ° C (143,6 ° F – 150,8 ° F); mengeras pada 60,5 ° C – 63 ° C (140,9 ° F – 145,4 ° F).<sup>3,4,5</sup> Penelitian ini adalah yang pertama di Indonesia untuk membandingkan lilin lebah (beeswax) dan lilin parafin sebagai media *impregnasi* dan *embedding* spesimen jaringan dalam pembuatan preparat histologi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi. Pengambilan sampel specimen dilakukan secara acak dari eksisi jaringan monyet ekor panjang betina (*Macaca fascicularis*). Penelitian ini sudah mendapat surat keterangan layak penelitian (Ethical Clearance) dari komisi etik penelitian kesehatan FKIK UNJA. Sepuluh jaringan acak tersebut adalah jaringan otak, paru, hepar, ginjal, kelenjar mammae, mata, usus, jaringan lemak dan tuba fallopi. Dari 10 jaringan dibagi menjadi 2 kelompok yang terdiri dari 10 spesimen kelompok paraffin dan 10 spesimen kelompok beeswax. Kelompok A termasuk 10 spesimen yang diresapi dan tertanam dengan paraffin. Kelompok B termasuk 10 spesimen yang diresapi dan tertanam dengan beeswax. Semua spesimen mengalami proses fiksasi dan pemrosesan jaringan yang sama hingga pewarnaan hematoxilin-eosin, hanya berbeda pada saat impregnasi lilin dan embedding. Paraffin yang digunakan adalah merk Synergy wax-histology grade dari Medipath Biosains, sedangkan beeswax dari merk Elie Moise Cera Alba / Beeswax White – high grade.

Sepuluh pasang spesimen jaringan diresapi dan ditanam dalam paraffin dan

beeswax. Setelah proses manual, semua sediaan preparat diwarnai dengan Hematoxilin dan Eosin secara konvensional. Evaluasi kualitas sediaan histologi dilakukan oleh seorang ahli patologi yang *independent* dan tidak mengetahui sediaan merupakan kelompok paraffin atau beeswax. Evaluasi sediaan histologi meliputi kejelasan bentuk sel dan inti, pewarnaan sitoplasma dan nukleus, kromatin, dan intensitas pewarnaan, menjadi skor 3 baik, 2 sedang dan 1 buruk. Uji-U Mann whitney dilakukan untuk memeriksa apakah ada perbedaan yang signifikan antara paraffin dan beeswax dengan nilai P yang ditetapkan pada <0,05. menggunakan analisis statistik Chi-square.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan enam kategori penilaian, yaitu kejelasan bentuk sel, pewarnaan sitoplasma, kejelasan inti sel (nukleus), pewarnaan inti sel, kromatin inti sel dan intensitas pewarnaan; Di antara sediaan, pewarnaan sitoplasma yang sangat baik terlihat di kelompok A (paraffin) yaitu 11.5 dibandingkan dengan kelompok B (beeswax) 9.5. Kejelasan bentuk sel, pewarnaan inti sel, kromatin inti sel dan intensitas pewarnaan antara dua kelompok tidak berbeda (Tabel 1).

**Tabel 1. Mean rank masing-masing kategori tiap kelompok**

| No | Mean rank perkategori       |            |
|----|-----------------------------|------------|
| 1  | <b>Kejelasan bentuk sel</b> |            |
|    | kelompok A                  | kelompok B |
|    | 10.5                        | 10.5       |
| 2  | <b>Pewarnaan sitoplasma</b> |            |
|    | kelompok A                  | kelompok B |
|    | 11.5                        | 9.5        |
| 3  | <b>Kejelasan inti sel</b>   |            |
|    | kelompok A                  | kelompok B |
|    | 11                          | 10         |
| 4  | <b>Pewarnaan inti sel</b>   |            |
|    | kelompok A                  | kelompok B |
|    | 10.5                        | 10.5       |
| 5  | <b>Kromatin inti sel</b>    |            |
|    | kelompok A                  | kelompok B |
|    | 10.5                        | 10.5       |
| 6  | <b>Intensitas pewarnaan</b> |            |
|    | kelompok A                  | kelompok B |
|    | 10.5                        | 10.5       |

Dari hasil penelitian ini, beeswax menunjukkan impregnasi dan embedding yang baik terhadap spesimen jaringan sama dengan hasil yang diberikan oleh parafin (gambar 1). Hasil uji statistik, menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan yang diamati pada karakteristik pewarnaan antara sediaan parafin dan beeswax. Berdasarkan Uji-U Mann whitney tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara

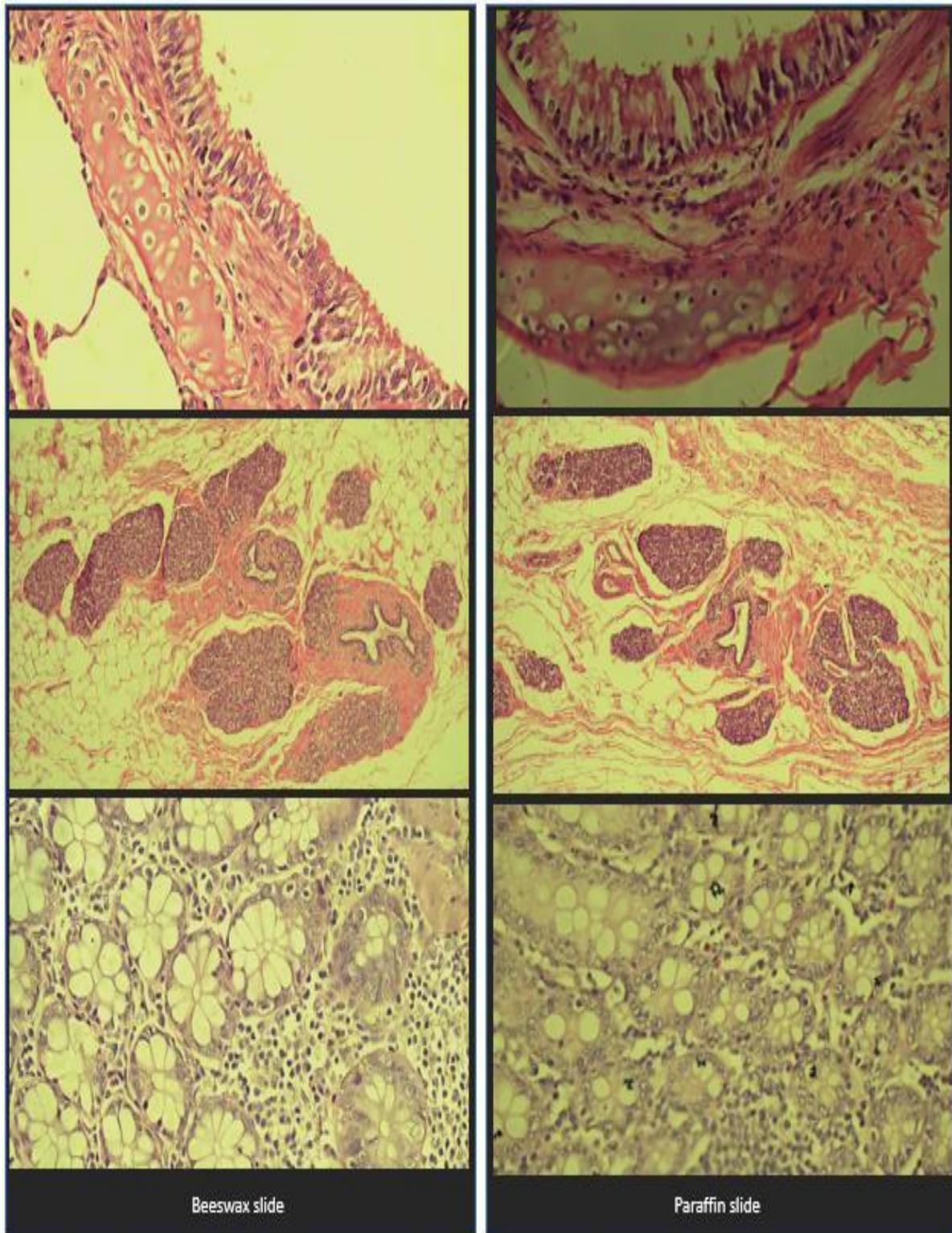
sediaan beeswax dan parafin dengan nilai  $P > 0,05$  untuk semua kategori (Tabel 2).

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa beeswax menunjukkan integritas yang bagus dan tidak ada distorsi. Pewarnaan bagian jaringan yang tertanam dalam beeswax sangat baik (Gambar 1) dan menunjukkan ketajaman dan kejelasan detail morfologi.

**Tabel 2. Uji statistik**

|                                | Kejelasan bentuk sel | Pewarnaan sitoplasma | Kejelasan inti sel | Pewarnaan inti sel | Kromatin inti sel  | Intensitas pewarnaan |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Mann-Whitney U                 | 50,000               | 40,000               | 45,000             | 50,000             | 50,000             | 50,000               |
| Wilcoxon W                     | 105,000              | 95,000               | 100,000            | 105,000            | 105,000            | 105,000              |
| Z                              | ,000                 | -1,090               | -1,000             | ,000               | ,000               | ,000                 |
| Asymp. Sig. (2-tailed)         | 1,000                | ,276                 | ,317               | 1,000              | 1,000              | 1,000                |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | 1,000 <sup>b</sup>   | ,481 <sup>b</sup>    | ,739 <sup>b</sup>  | 1,000 <sup>b</sup> | 1,000 <sup>b</sup> | 1,000 <sup>b</sup>   |

b. Not corrected for ties.



**Gambar 1.** Sediaan Beeswax dan Paraffin dari jaringan bronkus (400 X), kelenjar mammae (100 x) dan usus (400 X)

Dalam proses pembuatan preparat histologi, spesimen dapat ditempelkan hanya setelah difiksasi dan kemudian diseimbangkan dengan pelarut yang dapat bercampur dengan lilin. Ini biasanya dilakukan dengan mengganti air dalam spesimen, pertama dengan alkohol dan kemudian dengan pelarut parafin (zat pembersih) seperti xilen.<sup>6</sup> Impregnasi adalah proses penghilangan reagen pembersih dengan substitusi parafin atau media serupa seperti beeswax. Setelah impregnasi lengkap dengan media yang sesuai, blok padat dari media yang sesuai yang mengandung jaringan impregnasi diperoleh dengan proses yang disebut embedding.<sup>7</sup>

Media yang paling umum digunakan untuk impregnasi dan embedding adalah lilin parafin. Parafin adalah media yang paling umum digunakan dalam melekatkan dan impregnasi jaringan selama bertahun-tahun. Ini adalah campuran hidrokarbon yang dihasilkan oleh perengkahan minyak bumi. Lilin ini adalah campuran dari lilin parafin murni dan berbagai aditif yang mungkin termasuk resin seperti stirena atau polietilen. Lilin berbentuk cair pada 60 ° C dan dapat disusupkan ke dalam jaringan pada suhu ini dan kemudian dibiarkan dingin hingga 20 ° C di mana ia membeku menjadi konsistensi yang memungkinkan bagian untuk dipotong secara konsisten. Jaringan tertanam dengan lilin parafin dipotong pada ketebalan 2-3 µm, untuk

membentuk lembaran pita tipis hasil potongan dengan mikrotom dan mempertahankan spesimen dengan elastisitas yang cukup baik.<sup>1</sup>

Kebanyakan lilin parafin untuk histologi meleleh pada 52-58°C. Titik leleh dapat bervariasi dengan mencampur lilin dengan bahan lain; titik leleh yang lebih tinggi memberikan blok yang lebih keras. Sifat lilin parafin dikatakan ditingkatkan dengan menambahkan bahan tambahan. Sebagian besar laboratorium membeli paraffin yang dijual khusus untuk histologi. Dalam hal ini, parafin dicampur dengan polimer sintetik (kadang-kadang poliisobutilena, tetapi identitasnya jarang diungkapkan oleh pabrikan). Lilin harus disimpan sekitar 2°C di atas titik lelehnya; suhu yang lebih tinggi (di atas 60 ° C) dikatakan menurunkan konsentrasi zat aditif.<sup>6</sup>

Lebah membutuhkan lilin sebagai bahan konstruksi untuk sarangnya. Mereka memproduksinya di kelenjar lilinnya, yang sepenuhnya berkembang pada lebah pekerja berusia 12 hingga 18 hari. Pada lebah yang lebih tua, aktivitas kelenjar lilin berkurang. Namun dalam situasi darurat, sintesis lilin dapat diaktifkan kembali. Bahan baku utama untuk pembentukan lilin ini adalah karbohidrat, yaitu gula madu fruktosa, glukosa dan sukrosa.<sup>8</sup>

Warna beeswax yang baru diproduksi adalah putih, kemudian berubah menjadi kuning. Warna kuning yang khas

berasal dari pewarna propolis dan polen. Namun, tergantung pada jumlah relatif dari serbuk sari dan pigmen propolis yang berbeda, warna lilin dapat bervariasi. Warna kuning karena pewarna yang berasal dari propolis dan polen, sedangkan warna coklat karena pigmen kotoran larva. Beeswax memiliki bau yang khas. Rasa beeswax biasanya menyenangkan dan tidak spesifik – rasa yang tidak enak merupakan tanda penurunan kualitas karena benda asing. Beeswax memiliki struktur kristal yang tergantung pada penyimpanan. Proses kristalisasi meningkat pada penyimpanan lilin hingga 3-4 bulan, sementara pada saat yang sama, kekakuan dan elastisitasnya meningkat. Kekerasan lilin lebah merupakan faktor kualitas yang penting – semakin keras lilin, semakin baik kualitas lilinnya. Lilin ini merupakan bahan inert dengan plastisitas tinggi pada suhu yang relatif rendah (sekitar 32 °C). Setelah pemanasan, sifat fisik lilin berubah. Pada 30-35 °C menjadi plastik-padat, pada 46-47 °C struktur mulai hancur dan antara 60-70 °C mulai meleleh. Setelah pendinginan beeswax menyusut sekitar 10%. Beeswax tidak larut dalam air dan tahan terhadap banyak asam, tetapi larut dalam sebagian besar pelarut organik seperti aseton, eter, benzena, xylol, toluena, benzena, kloroform, etrklormetana.<sup>8</sup>

Selain untuk alas bedak, yang mungkin merupakan kegunaan utamanya, beeswax juga digunakan untuk keperluan

berikut: kosmetik 25-30%, farmasi 25-30%, lilin: 20% dan keperluan lain: 10-20%. Beeswax telah digunakan dalam berbagai produk dan proses mulai dari pengemasan hingga pemrosesan dan pengawetan, sebagai komponen dari banyak aplikasi dalam teknologi industri: misalnya sebagai komponen bahan isolasi.<sup>9</sup>

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa beeswax dapat menjaga integritas spesimen yang baik dan tidak ada distorsi sama baiknya dengan parafin. Selanjutnya, pewarnaan jaringan yang tertanam dalam beeswax juga cukup baik dan menunjukkan detail morfologi yang tajam dan jelas sama dengan paraffin (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Antony JV tahun 2017. Pewarnaan sitoplasma dan detail inti dalam lilin parafin lebih baik jika dibandingkan dengan beeswax. Hasil ini sedikit berbeda dengan penelitian sebelumnya dimana pada penelitian Antony JV, pewarnaan sitoplasma sangat baik pada beeswax.<sup>10</sup> Hal ini mungkin dikarenakan pada penelitian ini, proses pewarnaan dilakukan secara manual.

Selama proses manual impregnasi, beeswax tidak menimbulkan bau kurang nyaman, begitu pula dalam proses pemotongan dengan mikrotom dan penyimpanan blok. Hasil keseluruhan terbukti bahwa beeswax dapat menjadi alternatif penggunaan parafin. Selain lebih *ecofriendly*, keuntungan lain dari beeswax

adalah lebih nyaman bagi teknisi dalam pemotongan. Spesimen jaringan yang tertanam beeswax tidak menempel pada pisau mikrotom ini karena meningkatkan daya rekat beeswax, mengurangi kerapuhan dan membuat pembentukan lembaran pita tipis selama pemotongan menjadi lebih mudah.

## KESIMPULAN

Saat ini, penggunaan bahan organik dan natural adalah hal yang penting. Walaupun ada beberapa kategori, parafin masih unggul dibandingkan beeswax, akan tetapi dengan manfaat tambahan ramah

lingkungan, mudah tersedia, hemat biaya, tidak beracun dan tidak mudah terbakar, beeswax dapat digunakan sebagai bahan alternatif yang efektif. Proses pewarnaan yang otomatis dapat menghasilkan hasil penelitian yang lebih baik. Penelitian ini perlu diperluas dengan protokol yang tepat untuk menetapkan beeswax dapat menggantikan parafin. Penelitian lebih lanjut berupa ketahanan blok selama penyimpanan dalam jangka waktu lama dan apakah mempengaruhi pemeriksaan lebih lanjut seperti imunohistokimia masih perlu dilakukan.

## REFERENSI

1. Bancroft JD, Gamble M, editors. *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier health sciences; 2008.
2. Hossain ME, Khan MI, Ketata C, Islam MR. *Comparative pathway analysis of paraffin wax and beeswax for industrial applications*. *International Journal of Characterization and Development of Novel Materials*. 2010;1(4):1-3.
3. Sanford MT, Dietz A. *The fine structure of the wax gland of the honey bee (Apis mellifera L.)*. *Apidologie* 1976;7:197-207.
4. Coggs Hall, William L Morse, Roger A. *Beeswax: Production, Harvesting, Processing, and Products*. USA: Wicwas Press; 1984.
5. *A Dictionary of Applied Chemistry*, Sir Edward Thorpe. Revised and enlarged edition. Longmans, Green, and Co. Vol. 5. London: Waxes, Animal and vegetable. Beeswax; 1916; p. 737.
6. Kmiec Z, JA Kiernan. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. Scion Publishing, 2015.
7. Lillie RD. *Histopathologic Technique and Practice Histochemistry*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Book Co; 1965.
8. WAX BP. *Beeswax: Production, Properties Composition and Control*. 2009. Cited <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.567.4441&rep=rep1&type=pdf>
9. Bogdanov S. *Beeswax: uses and trade*. *The Beeswax Book*. 2009 Sep:1-6. Cited <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.545.8239&rep=rep1&type=pdf>
10. Antony JV, Ramani P, Anuja N, Sherlin HJ, Gheena S, Abilasha R, Jeyaraj G, Don KR, Archana S. *Impregnation and embedding using bees wax and paraffin wax in oral tissue samples: A comparative study*. *International Journal of Orofacial Biology*. 2017 Jan 1;1(1):13.