

Perbandingan Kualitas Pewarnaan Histologis Jaringan Testis dan Hepar Menggunakan Fiksasi Formalin Metode Intravital dan Konvensional

Heru Fajar Trianto,¹ Muhammad In'am Ilmiawan,² Sari Eka Pratiwi,² Abang Suprianto³

¹ Departemen Histologi Medik, Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

² Departemen Biologi dan Patobiologi, Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

³ Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

Abstrak

Latar Belakang: Kualitas pewarnaan preparat histologis dipengaruhi oleh proses fiksasi.. Salah satu metode fiksasi yang dapat digunakan adalah metode intravital atau perfusi. Penelitian ini bertujuan membandingkan kualitas pewarnaan preparat jaringan hepar dan testis menggunakan fiksasi metode intravital dan metode konvensional. **Metode:** Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus yang dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok metode fiksasi intravital dan metode konvensional. Organ testis dan hepar dibuat preparat histologis menggunakan pewarnaan HE. Parameter yang dinilai pada setiap preparat adalah pewarnaan inti sel, sitoplasma, kejernihan pewarnaan, dan keseragaman pewarnaan. Data dianalisa menggunakan uji Fisher. **Hasil :** Kualitas pewarnaan jaringan testis pada metode fiksasi intravital lebih adekuat dibandingkan dengan metode konvensional dan memiliki beda bermakna ($p < 0,05$). Kualitas pewarnaan jaringan hepar metode fiksasi intravital lebih baik dibandingkan metode konvensional, tetapi secara statistik tidak menunjukkan perbedaan antara kedua kelompok ($p = 0,211$). **Kesimpulan :** Metode fiksasi formalin intravital dapat menghasilkan kualitas pewarnaan yang lebih baik pada organ testis dan hepar, meskipun kualitas pewarnaan pada hepar tidak berbeda signifikan secara statistik.

Kata kunci: Fiksasi intravital, formalin, hepar, testis

Background : Histological staining quality is influenced by the fixation process. One of the fixation methods is intravital or perfusion method. This study aimed to compare the staining quality of liver and testis tissue between intravital and conventional fixation method. **Method:** Twenty rats were divided into two groups: intravital fixation method and the conventional method. Liver and testis histological preparations were stained using HE staining. The staining of nuclei and cytoplasm as well as the clarity and uniformity of staining were assessed on each preparation. Data were analyzed using Fisher's exact test. **Results :** Testis tissue staining quality of intravital fixation method group was more adequate than the conventional method group ($p < 0.05$). Liver tissue staining quality of intravital fixation method group was better than the conventional method group, but there was no significant difference ($p = 0.211$). **Conclusion:** Intravital fixation method can produce better quality staining on testis and liver tissue although the quality of staining of the liver do not differ significantly.

Key words: Intravital fixation, formalin, liver, testis

PENDAHULUAN

Histoteknik merupakan suatu cara membuat preparat jaringan melalui suatu rangkaian proses hingga bisa diamati. Preparat jaringan yang baik dapat digunakan untuk metode pembelajaran, penelitian, dan penegakkan diagnosis.¹ Salah satu tahapan yang penting dalam proses pembuatan preparat jaringan adalah proses fiksasi. Proses fiksasi yang baik harus mampu menjaga gambaran sel dan jaringan dengan baik tanpa mengalami perubahan struktur selama proses pembuatan preparat.² Tujuan dari proses fiksasi adalah mengawetkan jaringan, membuat jaringan menjadi keras agar memudahkan proses pemotongan jaringan, dan mempengaruhi proses pewarnaan.¹

Formalin merupakan salah satu bahan yang digunakan dalam proses fiksasi. Formalin dipilih sebagai bahan fiksatif dalam proses pembuatan sediaan patologi dan imunohistokimia yang keduanya merupakan dasar pemeriksaan untuk diagnosa penyakit dan penelitian.³ Kelebihan penggunaan formalin sebagai bahan fiksatif karena merupakan cairan yang banyak digunakan secara umum, pH mendekati netral, dan dapat digunakan dalam jangka waktu lama. Salah satu kekurangan dari formalin adalah memerlukan waktu perendaman jaringan lebih lama dibandingkan bahan lainnya agar dapat dilakukan proses selanjutnya.^{1,3}

Proses fiksasi tergantung dari kecepatan difusi cairan fiksatif dan kecepatan reaksi dengan komponen

jaringan. Proses difusi cairan fiksatif ke jaringan lebih cepat dan lebih kuat dapat membuat proses fiksasi yang lebih baik.² Beberapa metode yang dapat digunakan agar cairan fiksatif berdifusi dengan baik adalah dengan cara memotong jaringan yang akan difiksasi dengan irisan yang tipis (5mm – 1cm) atau dengan metode perfusi cairan fiksatif melalui pembuluh darah (metode intravital).^{1, 2,}

4

Berbagai macam organ dapat diamati struktur mikroskopisnya melalui pembuatan preparat histologis jaringan, salah satunya adalah organ testis dan hepar. Testis merupakan salah satu organ yang memiliki struktur histologis yang kompleks karena terdiri dari beberapa ruang dan berbagai macam sel di dalamnya.^{5, 6}

Hepar merupakan salah satu organ sistem pencernaan terbesar. Hepar tersusun atas 70-80% hepatosit/ sel hepar, sehingga jaringan hepar cukup mudah untuk diamati. Jaringan hepar juga merupakan jaringan padat sehingga akan mempengaruhi proses fiksasi jaringan.^{7, 8}

Berdasarkan paparan diatas, maka penelitian ini bertujuan untuk membandingkan metode fiksasi intravital dengan metode konvensional terhadap kualitas pewarnaan histologis jaringan testis dan hepar tikus menggunakan cairan fiksatif formalin.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan di Laboratorium Mikroskopik Fakultas Kedokteran

Universitas Tanjungpura dan Bagian Patologi Anatomi RSUD dr. Soedarso Pontianak. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar usia 10-12 minggu dengan berat antara 180-220 gram. Hewan coba dibagi menjadi dua kelompok secara acak yaitu kelompok metode fiksasi konvensional (10 ekor) dan kelompok metode fiksasi intravital (10 ekor).

Sebelum dilakukan proses pembedahan, hewan coba dilakukan euthanasia menggunakan inhalasi eter. Pada kelompok metode konvensional dilakukan pembedahan pada dinding abdomen untuk mengangkat jaringan hepar dan testis. Pada metode fiksasi intravital hewan coba dibedah secara vertikal dari abdomen bawah hingga

rongga thoraks. Perfusi NaCl 0,9% pada ventrikel kiri jantung menggunakan jarum halus dan gunting atrium kanan jantung. Darah hewan coba digantikan dengan Nacl yang ditandai dengan perubahan hepar menjadi pucat. Perfusi formalin 10% di tempat yang sama, tanda formalin telah tersebar ke jaringan adalah kaku ekor dan ekstremitas. Seluruh kelompok perlakuan dilakukan pembedahan untuk mengangkat hepar dan testis kanan, kemudian direndam dalam larutan formalin 10%.⁹ Organ kemudian dilakukan proses pembuatan preparat jaringan dengan tahapan yaitu dehidrasi, pembedahan, pencetakan, dan pengecoran. Setelah menjadi blok paraffin, organ dipotong menggunakan mikrotom setebal 5 μ m dan dilakukan pewarnaan preparat jaringan menggunakan Hematoksilin-

Eosin(HE). Seluruh tindakan yang dilaksanakan pada penelitian ini telah disetujui oleh Divisi Kaji Etik Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura (No: 1759/UN22.9/DT/2014).

Preparat jaringan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 40x dan piranti komputer *Axio Cam* pada 10 lapang pandang. 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 dari setiap parameter dijumlah dan dinilai, bila total nilai ≤ 2 = pewarnaan tidak adekuat, dan bila total nilai > 2 = pewarnaan adekuat.¹⁰

Pengamatan dilakukan oleh dua orang ahli histopatologis secara acak dan tertutup. Data hasil pengamatan di analisa menggunakan uji Fisher.¹¹

HASIL

Pengamatan Preparat Testis

Pada pengamatan preparat testis didapatkan data, hasil pewarnaan inti sel pada kedua kelompok adalah sama adekuat. Sedangkan pada pewarnaan sitoplasma menunjukkan kelompok intravital lebih adekuat dibandingkan kelompok konvensional. Pada pengamatan kejernihan pewarnaan menunjukkan hasil preparat kelompok intravital lebih baik dibandingkan kelompok konvensional. Dan pada pengamatan keseragaman pewarnaan menunjukkan preparat hasil fiksasi intravital lebih baik

dibandingkan preparat metode fiksasi konvensional. Hasil prosentase penilaian berbagai parameter pewarnaan pada preparat testis dari kedua kelompok dapat dilihat pada tabel 1.

Berdasarkan hasil analisa pengamatan jumlah total penilaian berbagai parameter pewarnaan pada jaringan testis menunjukkan metode fiksasi intravital lebih adekuat dibandingkan metode konvensional, dan terdapat

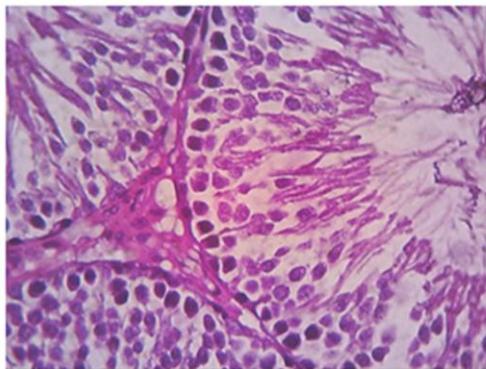
Tabel 1. Pengamatan Kualitas Pewarnaan Pada Preparat Jaringan Testis

	<u>Pewarnaan Inti Sel</u>		<u>Pewarnaan Sitoplasma</u>		<u>Kejernihan Pewarnaan</u>		<u>Keseragaman Pewarnaan</u>	
	<u>Intravital</u>	<u>Konvensional</u>	<u>Intravital</u>	<u>Konvensional</u>	<u>Intravital</u>	<u>Konvensional</u>	<u>Intravital</u>	<u>Konvensional</u>
<u>Adekuat</u>	100%	100%	62%	45%	55%	30%	70%	49%
<u>Tidak Adekuat</u>	0%	0%	38%	55%	45%	70%	30%	51%

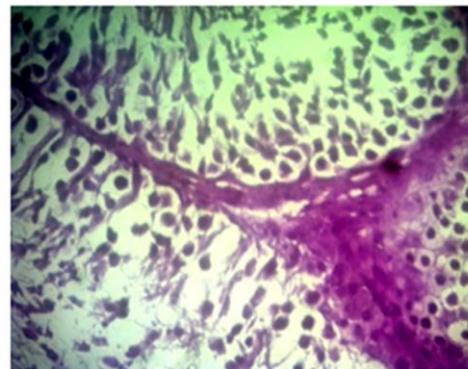
Tabel 2. Perbandingan Metode Fiksasi Intravital dengan Metode Fiksasi Konvensional pada Pengamatan Total Seluruh Parameter Pewarnaan Preparat Jaringan Testis

No	Total Parameter Pewarnaan	Metode Fiksasi		Fisher Exact Test	
		<u>Intravital</u> F (EC)	<u>Konvensional</u> F (EC)		
1	Adekuat	10(7.5)	5(7.5)	0.033	0.016
2	Tidak Adekuat	0 (2.5)	5 (2.5)		
<u>Jumlah</u>					

F: Frekuensi, EC: Expected Count



(A)



(B)

Gambar 1. Perbandingan Kualitas Gambaran Histologi Preparat Jaringan Testis. Metode Intravital (A), Metode Konvensional (B). Pewarnaan HE, objektif 40x.

perbedaan bermakna secara statistik antara kedua kelompok ($p < 0,05$).

Hasil analisa pengamatan jumlah total penilaian berbagai parameter pewarnaan preparat testis antara kedua kelompok dapat dilihat pada tabel 2.

Pengamatan Preparat Hepar

Hasil pengamatan preparat jaringan hepar menunjukkan kelompok intravital memiliki pewarnaan inti yang lebih adekuat dibandingkan kelompok konvensional.

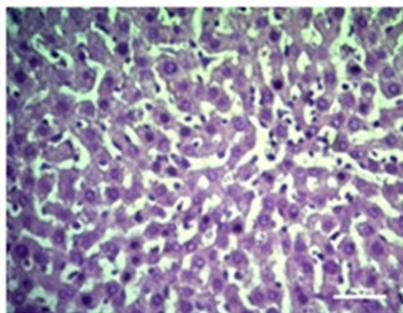
Tabel 3. Pengamatan Kualitas Pewarnaan Pada Preparat Jaringan Hepar

	Pewarnaan Inti Sel		Pewarnaan Sitoplasma		Kejernihan Pewarnaan		Keteragaman Pewarnaan	
	Intravital	Konvensional	Intravital	Konvensional	Intravital	Konvensional	Intravital	Konvensional
Adekuat	99,5%	79%	94%	72,5%	97,5%	62%	94,5%	72,5%
Tidak Adekuat	0,5%	21%	6%	27,5%	2,5%	38%	5,5%	27,5%

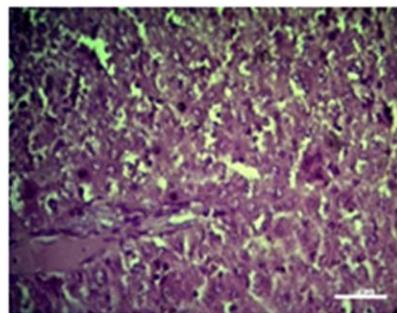
Tabel 4. Perbandingan Metode Ekskasi Intravital dengan Metode Ekskasi Konvensional pada Pengamatan Total Seluruh Parameter Pewarnaan Preparat Jaringan Hepar

No	Total Parameter Pewarnaan	Metode Ekskasi		Fisher Exact Test	
		Konvensional F (EC)	Intravital F (EC)		
1	Adekuat	7 (8.5)	10(8.5)	0.211	0.105
2	Tidak Adekuat	3 (1.5)	0 (1.5)		
Jumlah					

F: Frekuensi, EC: Expected Count



(A)



(B)

Gambar 2. Perbandingan Kualitas Gambaran Histologi Preparat Jaringan Hepar. Metode Intravital (A), Metode Konvensional (B). Pewarnaan HE, objektif 40x.

Kelompok intravital juga memberikan hasil pewarnaan sitoplasma yang lebih adekuat dibandingkan kelompok konvensional. Kelompok metode fiksasi intravital juga menghasilkan kejernihan pewarnaan yang lebih baik dibandingkan kelompok konvensional. Dari penilaian keseragaman pewarnaan, kelompok intravital juga menunjukkan keseragaman pewarnaan yang lebih baik dibandingkan kelompok konvensional. Hasil prosentase penilaian berbagai parameter pewarnaan preparat hepar dari kedua kelompok dapat dilihat pada tabel 3.

Dari hasil pengamatan preparat hepar, jumlah total penilaian berbagai parameter pewarnaan menunjukkan metode fiksasi intravital lebih adekuat dibandingkan metode konvensional,

tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik antara kedua kelompok ($p = 0,211$). Hasil analisa pengamatan jumlah total penilaian berbagai parameter pewarnaan preparat hepar antara kedua kelompok dapat dilihat pada tabel 4.

PEMBAHASAN

Fiksasi merupakan langkah awal dalam pembuatan preparat jaringan yang dapat digunakan dalam penelitian dan diagnosa suatu penyakit. Fiksasi bertujuan mencegah proses autolisis dan pembusukan jaringan, sehingga struktur sel dan jaringan dapat diamati seperti dalam kondisi hidup.^{2, 12} Proses fiksasi juga akan berpengaruh pada kualitas dari pewarnaan preparat jaringan. Pada

proses fiksasi terdapat berbagai faktor yang mempengaruhi kualitas hasil fiksasi antara lain dapar, kemampuan penetrasi cairan fiksatif, volume cairan fiksatif, konsentrasi cairan fiksatif, interval waktu, suhu dan jenis cairan fiksatif. Fiksasi yang buruk bisa disebabkan oleh pemotongan spesimen yang tebal, waktu fiksasi yang kurang, tingkat penetrasi yang rendah karena ketebalan seperti adanya fascia atau kapsul, suhu yang terlalu tinggi sehingga mempercepat proses autolisis jaringan, dan adanya darah sehingga menyebabkan terbentuknya pigmen formalin.¹³

Pada penelitian ini menggunakan cairan fiksatif formalin dengan alasan formalin merupakan cairan yang banyak digunakan secara umum, pH mendekati netral, dan dapat

digunakan dalam jangka waktu lama. Formalin juga memiliki keunggulan memiliki kemampuan penetrasi ke dalam jaringan dengan baik dan tidak banyak menyebabkan penyusutan jaringan.¹⁻³

Metode fiksasi formalin pada penelitian ini menggunakan dua cara yaitu metode konvensional yaitu setelah organ diambil dari tubuh tikus langsung di rendam dalam cairan formalin 10% dan metode intravital yaitu dengan melakukan perfusi cairan formalin 10% ke dalam tubuh tikus melalui sistem kardiovaskular. Metode fiksasi intravital dilakukan dengan cara memasukkan cairan fiksatif melalui sistem kardiovaskular sehingga cairan fiksatif dapat secara cepat dan merata masuk ke dalam jaringan melalui pembuluh darah. Hal tersebut berguna

bagi fiksasi organ dengan ukuran besar dan sulit dijangkau.⁹ Setelah proses fiksasi selesai dilakukan, organ testis dan hepar di proses menjadi preparat jaringan yang dapat diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan pewarnaan HE.

Hasil pengamatan pewarnaan inti sel pada preparat jaringan testis di dalam penelitian ini menunjukkan kedua metode menghasilkan pewarnaan inti sel yang adekuat. Sedangkan pada pewarnaan inti sel pada preparat jaringan hepar menunjukkan metode fiksasi intravital menghasilkan pewarnaan inti sel yang lebih adekuat dibandingkan metode fiksasi konvensional. Inti sel pada preparat jaringan yang dilakukan proses perwarnaan menggunakan HE akan berwarna ungu kebiruan karena

memiliki komponen basofilik yaitu asam nukleat. Hematoksilin pada metode pewarnaan HE berperan sebagai pewarna dasar. Kemampuan hematoksilin mewarnai inti sel dipengaruhi oleh proses fiksasi jaringan, proses penghilangan paraffin, waktu pewarnaan, p H, dan ketebalan pemotongan jaringan.^{14, 15}

Hasil pewarnaan sitoplasma menunjukkan bahwa preparat testis dan hepar kelompok metode fiksasi intravital menghasilkan pewarnaan sitoplasma yang lebih adekuat dibandingkan preparat jaringan pada metode fiksasi konvensional. Kemampuan eosin memberikan warna di sitoplasma sel juga dipengaruhi oleh proses fiksasi jaringan. Akibat fiksasi yang buruk sitoplasma menjadi lebih pucat dan samar. Batas antar sel kabur

dan sulit untuk diamati. Sitoplasma yang tidak adekuat terwarnai oleh eosin bisa juga disebabkan oleh pH terlalu tinggi, dehidrasi dengan alkohol terlalu lama, kontaminan ketika dehidrasi dengan alkohol, pemotongan yang terlalu tipis, waktu pewarnaan yang tidak adekuat.^{15, 16}

Kejernihan pewarnaan pada preparat jaringan testis dan hepar kelompok metode fiksasi intravital menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan metode fiksasi konvensional. Kejernihan pewarnaan dikatakan baik bila seluruh jaringan dapat diamati tanpa ada bagian yang kabur. Pada jaringan yang kejernihannya kurang baik dapat diakibatkan oleh fiksasi yang tidak adekuat, selain itu hal ini juga bisa disebabkan kesalahan pada pengolahan jaringan.¹⁷

Preparat yang memiliki keseragaman pewarnaan yang dikatakan baik bila menghasilkan intensitas warna yang merata pada seluruh lapang pandang. Hasil penelitian ini menunjukkan preparat jaringan testis dan hepar kelompok metode fiksasi intravital memiliki keseragaman pewarnaan yang lebih baik dibandingkan kelompok metode fiksasi konvensional. Keseragaman pewarnaan dipengaruhi oleh proses fiksasi jaringan. Hasil fiksasi yang ideal diperlihatkan dengan semua sel yang seragam. Pada fiksasi intravital mampu menjaga keseragaman struktur jaringan yang lebih baik dibandingkan metode perendaman. Hal tersebut terjadi karena metode fiksasi intravital memungkinkan cairan fiksasi mencapai seluruh jaringan dengan lebih cepat karena cairan fiksasi

dialirkan ke seluruh tubuh melalui perfusi.⁹

Hasil pengamatan dari total penilaian berbagai parameter kualitas pewarnaan menunjukkan preparat testis kelompok fiksasi metode intravital menghasilkan kualitas pewarnaan yang lebih adekuat dibandingkan kelompok fiksasi metode konvensional dan berbeda secara bermakna ($p < 0,05$). Sedangkan hasil pengamatan pada preparat jaringan hepar menunjukkan bahwa kualitas gambaran histologis dengan metode fiksasi intravital lebih baik dibandingkan dengan metode fiksasi konvensional. Tetapi pada analisis statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,211$). Hal tersebut menunjukkan bahwa metode fiksasi intravital memiliki pengaruh terhadap kualitas hasil pewarnaan pada preparat

jaringan testis yang lebih kuat dibandingkan pada preparat jaringan hepar.

Perbedaan hasil fiksasi pada preparat hepar dan testis kemungkinan dipengaruhi oleh ukuran dan struktur yang berbeda pada kedua organ. Hepar memiliki jaringan yang padat sehingga kurang mendukung difusi cairan fiksatif. Pemilihan metode fiksasi pada jaringan ini sangat penting untuk mempermudah pengamatan. Hal ini dikarenakan fiksasi juga diperlambat oleh ukuran dan ketebalan spesimen jaringan. Sedangkan jaringan testis tersusun dari lobulus yang tersusun atas tubulus seminiferus yang terpendam dalam jaringan ikat longgar yang banyak mengandung pembuluh darah.¹⁸ Hal tersebut membuat difusi cairan fiksatif di jaringan testis lebih baik.

Faktor lain yang mempengaruhi proses fiksasi adalah dapar, penetrasi, volume cairan fiksatif, konsentrasi cairan fiksatif, interval waktu, suhu dan jenis larutan fiksasi.¹ Pada penelitian ini faktor yang paling berpengaruh adalah interval waktu dan kemampuan penetrasi cairan fiksatif. Hal ini dikarenakan semakin lama jaringan menunggu untuk diawetkan, semakin banyak kehilangan organel sel dan pengerutan nukleus sehingga banyak artefak terbentuk. Pada fiksasi metode konvensional memerlukan waktu sebelum jaringan direndam dalam cairan fiksatif. Sebaliknya pada fiksasi metode intravital cairan fiksatif mencapai seluruh jaringan dengan lebih cepat karena cairan fiksatif dialirkan ke seluruh tubuh.⁹ Kualitas pewarnaan preparat jaringan juga dipengaruhi oleh proses dehidrasi,

pembeningan, pemotongan serta pewarnaan dari preparat tersebut.¹

KESIMPULAN

Penggunaan metode fiksasi intravital pada jaringan testis dapat menghasilkan kualitas pewarnaan histologis yang lebih baik dibandingkan metode konvensional. Sedangkan kualitas pewarnaan pada preparat hepar metode fiksasi intravital lebih baik dibandingkan metode konvensional, meskipun tidak signifikan secara statistik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jusuf AA. Teknik histologi I. Jakarta: Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2012.
2. Ahmed HG, Mohammed AII. A comparison study of histochemical staining of various tissue after Carnoy's versus after Formalin fixation. *J Cancer Sci Ther.* 2011;3(4):084-7.

3. Kap M, Smedts F, Osterhuis W, Winther R, Christensen N, Reischauer B, et al. Histological assessment of paxgene tissue fixation and stabilization reagent. *Plos One*. 2011;6(11):1-10.
4. Sarma JD, Sarma SD, Chatterjee K, Dalui T, Ghosh S. Tissue specific optimization of haematoxylin and eosin stain an experiment accomplished by varying the period of fixation and duration of stain. *Online Journal of Biosciences and Informatics*. 2013;4(1):64-81.
5. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology*. Philadelphia: Elsevier; 2007.
6. Cui D, Naftel JP, Daley WP, Lynch JC, Haines DE, Yang G, et al. *Atlas of histology with functional and clinical correlation*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2011.
7. Gao B, Jeong W-I, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. 2007;47(2):729-36.
8. Kilicoglu S, Erdemli E. Comparing the different fixatives for examination of liver tissue ultrastructure. *Ankara Universitesi Fakultesi Mecmuasi*. 2011;64(2):75-9.
9. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *JVisExp*. 2012;65:1-9.
10. 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. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011;15(2):161-7.
11. Dahlan MS. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika; 2011. 139-50 p.
12. Tripathi M, Bansal R, Gupta M, Bharat V. Comparison of routine fixation of tissue with rapid tissue fixation. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(12):2768-73.
13. Qidwai K, Afkhami M, Day CE. The pathologist's guide to fixative. In: Day CE, editor. *Histopathology : methods and protocols, methods in molecular biology*. New York: Springer Science+Business Media; 2014.
14. *Histopathology in haematoxylin & eosin stained muscle sections*, MDC1A_M.1.2.004 (2014).
15. Leistenschneider W, Nagel R. *Atlas of prostatic cytology : techniques and diagnosis*. Michigan: Springer-Verlag; 1985.
16. National Society for Histotechnology. *Guidelines for hematoxylin & eosin staining*. Maryland. 2001
17. Hayat MA. *Microscopy, Immunohistochemistry and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy*. New York: Kluwer Academic Publisher; 2002.
18. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic histology : text & atlas*. Bahasa Indonesia ed. Dany F, editor. Jakarta: EGC; 2007.