

EFEK EKSTRAK AIR DAN ALKOHOL PADA SIWAK (*Salvadora persica* L.) TERHADAP PENINGKATAN AKTIVITAS DAN KAPASITAS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG

*Sofnie Marusin, **Chairul

* Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, Batan, Jln. Cinere Pasar Jumat, Jak-Sel,
e-mail : sofnie@batan.go.id

** Lab. Bahan Alam, Bidang Botani – Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong Science Center,
Cibinong, Indonesia

EFFECT OF WATER AND ALCOHOL EXTRACTS OF SIWAK (SALVADORA PERSICA L.) ON ACTIVITY AND CAPACITY OF MACROPHAGE CELLS

Abstract

*This research was conducted to observe immunomodulator properties by in vitro assay of water and alcohol extracts of siwak (*Salvadora persica* L.) had been done by observing Specific Phagocytosis Activity (SPA) and Index Phagocytosis (IP) of mice peritonium macrophage cells level induced by *S. epidermidis* bacteria. Each extracts was tested at various concentration in logarithmic order (0.1, 1.0, 10.0 and 1000 µg), and Echinae extract (1000 µg) and distilled water had been used as positive and negative control, respectively. The results showed the remarkable phagocytosis activity (SPA) and Index Phagocytosis (IP) of water and alcohol extracts at various concentration of 0.1, 1.0, 10.0 and 1000 µg/mL on *S. epidermidis* bacteria and gave different significantly from the number of phagocytosis bacteria by macrophage cells compared to positive and negative control. And the extract in higher dose (1000 µg/ml) had higher SPA and IP compared to negative control (>50%). Almost all tested extracts resulted in increasing SPA (62 – 95%) and IP (625 – 955), respectively. Increasing of the doses administration caused in the increasing of SPA and IP level in straight proportion. Alcohol extract also resulted in better SPA and IP level compared to water extract. All tested extracts at 1000 µg/ml concentration enhance the SPA and IP level. Water extract enhanced SPA and IP at the level of 57.7 and 76.1%, while alcohol extract enhanced 82,7% and 90,2% compare to negative control, respectively. The effective of SPA and IP of the tested extracts as imunostimulant was in low dose (0 – 100 µg), but administration of extract in higher doses (100- 1000 µg) indicated imunorestitution tendency, especially on water extract. Doses of extract administration resulted in significant difference ($P < 0.05$) of SPA and IP.*

*Keyword: Salvadoraceae; *Salvadora persica* L.; Siwak, Immunomodulator, phagocytosis, Macrophage cell.*

Abstrak

Siwak (*Salvadora persica* L.) adalah sejenis tumbuhan yang (terdapat dalam Al-Qur'an, Surah 34:16) ranting dan akarnya digunakan sebagai sikat gigi. Pada penelitian ini telah dilakukan uji imunomodulator dari ekstrak air dan alkohol ranting siwak dengan melihat peningkatan aktivitas/*specific phagocytosis activity* (SPA) dan Kapasitas/*index phagocytosis* (IP) sel makrofag peritonium mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi dengan bakteri *Stahylococcus epidermidis*. Masing-masing ekstrak diberikan dengan variasi dosis (0.1 µg - 1000 µg), dan ekstrak Echinae (1000 µg), air suling yang digunakan sebagai kontrol positif dan negatif. Hasil skrining aktivitas fagositosis (SPA) dan

kapasitas fagositosis (IP) ekstrak air dan alkohol terhadap bakteri *S. epidermidis* dengan variasi dosis logaritma perlakuan 0.1 – 1000 µg menunjukkan adanya perbedaan yang cukup signifikan dari jumlah bakteri yang difagositosis oleh sel makrofag dibandingkan kontrol (-)(>50%). Hampir semua ekstrak siwak yang diuji memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan SPA dan IP berturut-turut 62 – 95% dan IP 625 – 955. Peningkatan dosis yang diberikan berbanding lurus dengan peningkatan SPA dan IP. Ekstrak alkohol yang memberikan SPA dan IP yang lebih baik dibandingkan ekstrak air. Semua ekstrak yang diujikan pada konsentrasi 1000 µg memberikan peningkatan SPA dan IP ekstrak air mempunyai kenaikan berturut-turut 57.7 dan 76.1%, sedangkan ekstrak alkohol 82,7 dan 90,2% dibandingkan kontrol (-). SPA dan IP yang diperlihatkan oleh bahan uji pada pemberian dosis 0 – 100 µg memberikan efek imunostimulan, sedangkan pada dosis tinggi 100- 1000 µg cenderung memberikan efek imunorestorasi terutama ekstrak airnya. Analisis statistic memberikan perbedaan SPA dan IP yang signifikan antara dosis perlakuan.

Kata kunci : Salvadoraceae; *Salvadora persica* L.; Siwak, Immunomodulator, Fagositosis, sel makrofag.

Submit: 16 Agustus 2011, Review 1: 25 Agustus 2011, Review 2: 25 Agustus 2011, Eligible article: 21 November 2011

Pendahuluan

Adanya senyawa-senyawa kimia Concanavalin (Con A), Phytohemagglutinin (PHA), Cyclosporin, Cyclophosphamide (Cytoxan), Curcumin, echinacin dan Tactrolimus (FK 506) yang dapat meningkatkan atau menekan efektivitas sistem imun sangat membantu untuk mengatasi masalah sistem imun pada manusia. Dalam ilmu kedokteran, imunitas pada mulanya berarti resisten relative terhadap suatu mikroorganisme. Resistensi terbentuk berdasarkan respon imunologik. Selain membentuk resistensi terhadap suatu infeksi, respon imun juga dapat mengakibatkan terjadinya berbagai penyakit. Oleh karena itu pada masa sekarang arti respon imun sudah lebih luas, yang pada dasarnya mencakup pengobatan maupun pencegahan suatu penyakit pengaruh faktor atau zat asing yang berasal dari luar tubuh. Efektivitas sistem imun dapat menurun karena berbagai faktor, diantaranya karena usia atau penyakit. Proses fagositosis merupakan salah satu mekanisme pertahanan tubuh (immun) non spesifik dalam menghadapi serangan berbagai benda asing, termasuk mikroorganisme. Sel utama yang berperan dalam fagositosis (disebut sel fagosit) adalah sel mononuklear (monosit dan makrofag) dan sel polimorfonuklear atau granulosit (terutama netrofil). Proses fagositosis yang efektif pada invasi mikroorganisme dini dapat mencegah timbulnya penyakit. Secara keseluruhan, penghancuran mikroorganisme dalam proses pertahanan tubuh terjadi dalam beberapa tahap, yaitu kemotaksis (gerakan sel fagosit ke tempat

infeksi mikroorganisme), kemudian sel fagosit mengikat/memakannya melalui reseptor non spesifik. Bila mikro-organisme sudah berada dalam sel, lisosom akan bergabung dengan fagosom membentuk fagolisosom dan selanjutnya mikroorganisme dapat dibunuh dengan mekanisme mikro-bisidal.^{1,2,3, 4,5}

Penggunaan tanaman obat pada awalnya didasarkan pada pengalaman empiris nenek moyang kita, sehingga perlu dilakukan penelitian ilmiah untuk membuktikan khasiatnya. Salah satu khasiat bahan alam yang mulai banyak diteliti adalah aktivitas sebagai imunostimulan, yaitu zat yang dapat merangsang sistem imun atau memperbaiki fungsi sistem imun.¹ Banyak tanaman obat yang telah terbukti berkhasiat sebagai imunostimulan, immunosupreesan dan imunorestorasi. Saat ini terdapat beberapa jenis tumbuhan telah digunakan sebagai immuno-modulator, antara lain; *Allium sativum*, *Andrographis paniculata*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Echina angustifolia*, *Plantago major*, *Phyllanthus niruri*, *Zingiber officinalis* dll.^{4,5}

Siwak (*Salvadora persica* L.) merupakan tumbuhan yang penting berasal dari Arab Saudi dan Negara-negara Afrika Utara. Ranting dan akarnya yang telah dipotong-potong lebih kurang sejengkal, banyak dijual selama musim haji digunakan sebagai sikat gigi dan mempunyai khasiat sebagai antibakteri terutama bakteri yang terdapat di mulut.^{7,8,9,10,11}

Siwak diketahui mengandung minyak atsiri dan berbagai senyawa kimia lainnya antara lain, senyawa organik trietilamin, alkaloid (salvo-

dorine), flavonoid, antraquinon, tannin, saponin, sterol, vitamin C dan senyawa an-organik yaitu, klorida, kalsium, sejumlah besar fluorida, silika dan sulfur. Diketahui bahwa komponen kimia minyak atsiri yang terdapat pada daun miswak terdiri dari benzil nitrile, eugenol, thymol, isothymol, eucalyptol, isoterpinolen, dan beta-caryophyllen.¹³ Menurut Khalil (2006), hasil investigasi fitokimia pada rantingnya telah diidentifikasi terdapat beberapa senyawa amida antara lain, butanediamide, N1,N4-bis (phenylmethyl)-2(S)-hydroxy-butanediamide, N-benzyl-2-phenylacetamide, N-benzylbenzamide and benzylurea.¹²

Dari penelusuran pustaka sampai saat ini dijumpai beberapa penelitian yang berkaitan dengan penggunaan atau khasiat (efikasi) lainnya dari siwak yaitu, sebagai obat cacing, peluruh batu pada kandungan kemih, repelen, sitotoksik, antikanker, antikonvulsan, sedative dan anti ulcer. Oleh karena itu kami tertarik untuk melakukan penelitian dari siwak yang berhubungan dengan imun atau sistem kekebalan tubuh. Pada kesempatan ini dilaporkan hasil skrining efektivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag peritoneum mecit (*Mus musculus*) yang diinduksi dengan *S. epidermidis* terhadap ekstrak air dan alkohol 95% dari siwak (*Salvadora persica*) untuk mengetahui efektivitas imunomodulatornya.

Bahan dan Cara

Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Shajar al-Miswak (Arabic) atau Siwak (Salvadora persica L.) yang dibeli di Mekah, Saudi Arabia, yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 95% (p.a); EDTA 0,2 M (anti koagulan); PBS (Phosphate Buffer Saline); ekstrak Echinae (Im-Boost) diperoleh dari PT. SOHO.

Hewan coba: mencit putih (Mus musculus) galur Swis Webster (jantan), suspensi bakteri uji S. epidermis dan Giemsa untuk pewarnaan.

Alat: Alat yang digunakan antara lain, Autoklaf, incubator, sentrifus, Mikropipet (pipet effendof), seperangkat alat-alat gelas yang telah disterilkan, alat bedah, mikroskop cahaya, spektrofotometer UV/Vis, dan haemositometer

Metode

A. Pembuatan ekstrak

Simplisia yang telah dirajang dan dikeringkan timbang 100 gram duplo, kemudian masing-masing diekstraksi dengan dengan cara maserasi menggunakan air dan etanol 95% selama 24 jam. Filtratnya disaring dan dipisahkan, penyarian dilakukan sampai filtrat tidak berwarna lagi selanjutnya kumpulkan filtrat dikeringkan dengan *evaporator* dan *freeze dryer* sehingga diperoleh ekstrak kering dengan bobot tetap yaitu ekstrak air dan etanol 95 %.

B. Uji Aktivitas Fagositosis

Aktivitas imunostimulan ditentukan dengan menghitung aktivitas fagositosis dan kapasitas fagositosis sel makrofag peritoneum mencit. Nilai aktivitas fagositosis (SPA) adalah persentase sel makrofag yang aktif melakukan proses fagositosis di antara 100 sel makrofag.

$$\text{Aktivitas fagositosis (\%)} = \frac{\text{jumlah sel makrofag aktif} \times 100\%}{\text{jumlah sel makrofag total}}$$

Kapasitas fagositosis (IP) = jumlah bakteri yang difagosit oleh 50 sel makrofag.

Sebelum dilakukan uji fagositosis, terlebih dahulu dilakukan uji viabilitas untuk mengetahui kemampuan hidup sel makrofag dan perhitungan jumlah sel. Viabilitas dinyatakan dengan persentase jumlah sel makrofag yang hidup terhadap jumlah sel makrofag total. Nilai viabilitas yang dipersyaratkan adalah tidak kurang dari 95 %.

1. Aklimatisasi Hewan Percobaan. (Malole, M.B.M., dkk, 1989) Sebelum digunakan, hewan percobaan harus diadaptasikan dengan lingkungan. Aklimatisasi dilakukan minimal selama 14 hari dan selama waktu tersebut hewan percobaan hanya diberi makan dan minum hingga mencapai bobot yang diharapkan ± 30 g.
2. Pembuatan MédiuM Pertumbuhan Bakteri (Michaelson, S., 1998).
 - a. Pembuatan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Natrium klorida 2,0 gram, kalium klorida 50 mg, dinatrium hidrogen fosfat 0,38 gram dan kalium dihidrogen fosfat dilarutkan dalam aquades hingga volume 250 mL.
 - b. Pembuatan Agar Miring *Mueller Hinton*. Sebanyak 3,8 gram *Mueller Hinton* Agar dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dididihkan untuk melarutkan medium dengan sempurna. Kemudian dimasukkan ke dalam

tabung reaksi besar bertutup kapas masing-masing sebanyak 15 mL dan disterilkan, selanjutnya dimiringkan dan didinginkan hingga padat.

- c. Pembuatan Medium Cair *Nutrient Broth*. Sebanyak 1,3 gram *Nutrient Broth* dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dipanaskan jika perlu untuk melarutkan medium dengan sempurna. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil bertutup kapas masing-masing sebanyak 10 mL dan disterilkan.

3. Pembuatan Larutan Uji. Masing-masing ekstrak yang telah dibuat dilarutkan dalam larutan PBS dengan variasi konsentrasi logaritma 0,1, 1,0, 10,0 dan 1000 µg/ml dan untuk meningkatkan kelarutan tambahkan beberapa tetes DMSO.

4. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus epidermidis* (FI IV, 1995)

Bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang tumbuh pada agar miring MHA diambil dengan menggunakan ose steril, lalu ditanam dalam 10 mL medium NB cair secara aseptik, diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian disentrifuge 3000 rpm selama 1 jam. Supernatannya dibuang, lalu pelet yang diperoleh disuspensikan dalam 10 mL PBS. Kekeruhannya diukur dengan spektrofotometer pada 580 nm dan disesuaikan hingga diperoleh suspensi dengan transmitansi 25% (setara dengan 10⁹ sel/mL)..

5. Sterilisasi Peralatan dan Bahan (Dwijoseputro, D., 2003)

Alat-alat yang akan digunakan pada proses uji imunostimulan harus disterilkan dalam oven pada suhu 120°C selama 5 jam. Bahan-bahan seperti *Phosphate buffered saline* (PBS), aquades dan medium pertumbuhan bakteri disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Sebelum digunakan, lampu UV pada *laminair air flow* dinyalakan selama ± 2 jam.

6. Penyiapan Sel Makrofag Peritonium Mencit

Mencit dianestesi dengan kapas yang dibasahi eter. Setelah mati, kulit bagian abdomen dibersihkan dengan etanol 70% dan dikelupas dengan gunting. Membran peritonium dibersihkan dengan etanol 70% kemudian digunting sedikit hingga rongga peritonium berlubang. Ke dalam rongga peritonium

diteteskan larutan PBS sebanyak kurang lebih 3 mL. Abdomen diusap perlahan dengan tangan selama 2-3 menit kemudian cairan peritonium disedot dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam vial.

7. Perhitungan Jumlah Sel Makrofag dan Uji Viabilitas Sel

Suspensi sel makrofag dicampur dengan larutan tripan biru 0,08% dalam PBS (harus dibuat baru) sama banyak, lalu dimasukkan ke *counting chamber* hemositometer. Selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah sel yang hidup (tidak terwarnai oleh tripan biru) dan jumlah total sel untuk mengetahui viabilitas sel.

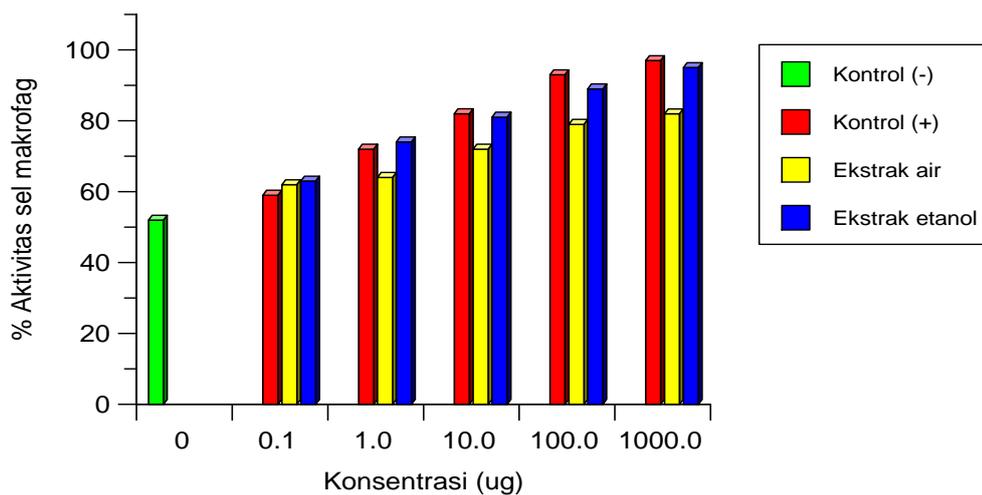
Perhitungan jumlah sel makrofag dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel dalam 80 kotak kecil di bagian tengah. Karena diketahui bahwa volume cairan dalam *chamber* = 0,1 mm³ dan jumlah kotak kecil total adalah 400 maka jumlah sel/mL dapat dihitung.

8. Uji Fagositosis (Sheehan, P.C., et. al., 1980, Wagner and Jurcic, 1991, Wagner, H., 1999)

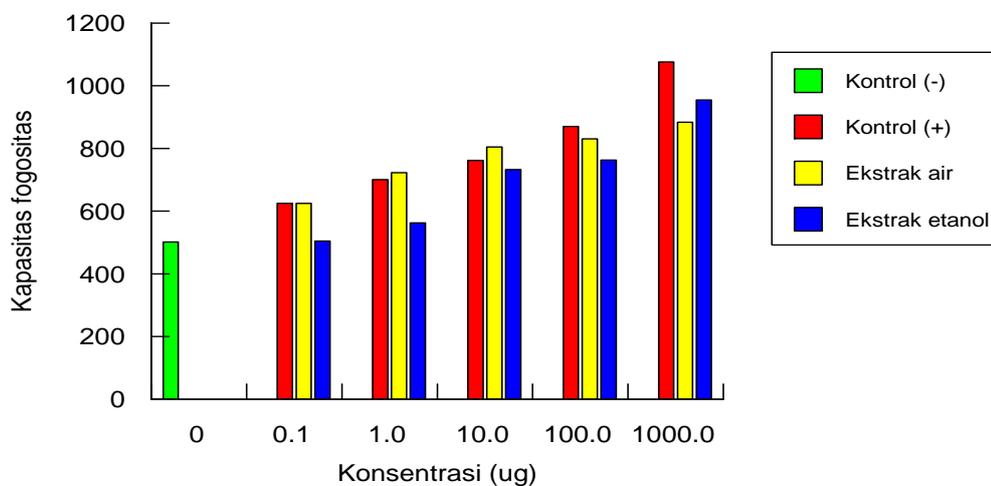
200 µL suspensi bakteri, 200 µL sel makrofag dan 200 µL larutan uji diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C, kemudian ditambahkan 50 µL larutan Na₂EDTA 0,2 M untuk mengakhiri fagositosis. Sebagai kontrol positif digunakan 200 µL suspensi bakteri, 200 µL sel makrofag dan 200 µL larutan levamisol HCl dengan konsentrasi yang sama dengan larutan uji dan sebagai kontrol negatif digunakan 200 µL suspensi bakteri, 200 µL sel makrofag dan 200 µL larutan PBS. Masing-masing dibuat preparat ulas dengan cara meneteskan 100 µL campuran suspensi ke kaca obyek, mengusapnya dengan kaca obyek, lalu dikeringkan dan difiksasi dengan metanol selama 6 menit. Kelebihan metanol dibuang.

Dilakukan pewarnaan dengan mencelupkannya ke dalam larutan Giemsa 2% dan didiamkan selama 45 menit. Setelah itu dicelupkan empat kali ke dalam asam asetat 1%, dibilas dengan aquades mengalir, diletakkan dengan posisi vertikal dan dibiarkan mengering di udara. Preparat apus/ulas yang sudah jadi diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40. Kemudian dilakukan penetapan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag.

- C. Perhitungan statistik



Gambar 1. % Aktivitas fagositosis (SPA) sel makrofag



Gambar 2. Kapasitas fagositosis (IP) sel makrofag

Aktivitas dan kapasitas fagositosis yang diperlihatkan oleh bahan uji, pada pemberian dosis 0 – 100 µg memberikan efek imunostimulan, sedangkan pada dosis tinggi 100- 1000 µg cenderung memberikan efek imunorestorasi terutama pada ekstrak air. Aktivitas atau efektivitas imunomodulator dari siwak tidak lepas dari kandungan kimia yang terdapat dalam bahan uji tersebut.

Menurut Inalci *et.al.* (2005),¹⁷ beberapa komponen bioaktif yang berasal dari alam mempunyai efek pleiotropik (mempunyai beragam efek fisiologis) dan mempunyai kombinasi berbagai komponen bioaktif pada satu simplisia atau ekstrak akan memberikan efek sinergis.

Hasil uji ANOVA dari masing-masing perlakuan memperlihatkan adanya perbedaan yang signifikan baik aktivitas dan kapasitas fagositosis dari variasi konsentrasi yang diberikan maupun terhadap kontrol (-) dan kontrol (+) dengan nilai signifikan 0.375 ($p > 0.05$) terhadap kontrol (-) dan nilai signifikan 0.56 ($p > 0.05$) terhadap kontrol (+). Analisis data dengan SPSS 12.0 yang berdasarkan pada homogenitas dari setiap variabel dan nilai kenormalan dari setiap varian grup diperoleh hasil pengujian dengan nilai homogenitas terdistribusi homogen dan nilai kenormalan terdistribusi normal. Dengan kata lain bahwa hasil pengujian mempunyai nilai signifikan lebih besar dari 0.05, menyatakan H_0 diterima (H_0 adalah pada tiap kelompok

perlakuan mempunyai nilai rata-rata yang berbeda). Dari analisa statistik ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari aktivitas dan kapasitas fagositosis antar ekstrak yang digunakan dan antar variasi konsentrasi perlakuan. Aktivitas dan kapasitas fagositosis akan meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan, artinya aktivitas dan kapasitas fagositosis berbanding lurus dengan konsentrasi yang diberikan, makin besar konsentrasi yang diberikan makin besar aktivitas dan kapasitas fago-sitosisnya.

Kesimpulan dan Saran

- Hampir masing-masing ekstrak siwak yang digunakan dan yang diuji memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan SPA 62 – 95% dan IP 625 – 955 dibandingkan kontrol K (-) dan kontrol (+), SPA 52% dan 97%, sedangkan IP 502 dan 1076.
- Dari hasil juga dapat dilihat bahwa ekstrak alkohol memberikan SPA dan IP yang cukup baik dengan peningkatan SPA dan IP berbanding lurus dengan konsentrasi.
- Kalau dilihat masing-masing peningkatan SPA dan IP pada konsentrasi 1000 µg dibandingkan kontrol (-), terlihat bahwa SPA ekstrak air mempunyai kenaikan 57.7% dan IP 76.1%, ekstrak alkohol SPA (82,7%) dan IP (90,2%) (Perhitungan adalah SPA/IP dikurangi K (-) dibagi K(-) dikali 100%, dari Tabel 1.
- Perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi senyawa aktif sebagai imunomodulator dari siwak (*S. persica*).

Daftar Pustaka

1. Bratawidjaja, K. 2002. *Imunologi Dasar*, Ed. IV, Fakultas kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
2. Naingolan, N.1990. Peranan Imunologi dalam bidang kedokteran, *Majalah Kedokteran Indonesia*, Universitas Sumatera Utara, Medan; 620-624.
3. Kresno, S.B. 1996. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, Ed. III, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
4. Mills, S and Bone, K, 2000. *Principles and Practice of Phytotherapy, Modern Herbal Medicine*, Churchill Livingstone Edition.

5. Ebadi M., 2002. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*, CRC Press, New York, Washington DC,
6. Wagner, H (Editor). 1999. *Immunomodulatory Agents from Plants : Search for potent immunostimulant agents from plants and other natural sources*, Basel, p. 1-32.
7. Farooqi MIH., *Plants of the Qur'an*, Sidrah Publishers, Lucknow India; 1997, 101 –10 2.
8. Al-Mohaya MA, Darwazeh A, Al-Khudair W. 2002. Oral fungal colonization and oral candidiasis in renal transplant patients: the relationship to Miswak use, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 93(4):455-60.
9. al-Otaibi M. 2004. The miswak (chewing stick) and oral health. Studies on oral hygiene practices of urban Saudi Arabians, *Swed Dent J Suppl.* 167: 2-75.
10. Darout IA, Albandar JM, Skaug N 2000. Periodontal status of adult Sudanese habitual users of miswak chewing sticks or toothbrushes, *Acta Odontol Scand.* 58(1):25-30.
11. Sofrata AH, Claesson RL, Lingström PK, Gustafsson AK. 2008. Strong antibacterial effect of miswak against oral microorganisms associated with periodontitis and caries, *J Periodontol.* 79(8):1474-9.
12. Khalil AT.2006. Benzylamides from *Salvadora persica*, *Arch Pharm Res.* 29(11):952-6.
13. Alali F., Al-lafi T. 2003. GC-MS analysis and bioactivity testing of the volatile oil from the leaves of the toothbrush tree *Salvadora persica* L, *Nat Prod Res Jun*;17(3):189-94
14. Malole, M.B.M., Utami Purnomo, C.S. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium*, Institut Pertanian Bogor, Bogor, hal. 94
15. Michaelson Sam, <http://www.dsto.defence.gov.au.ANTISPAM>, Thu Nov 12
16. Dwidjoseputro, DF. 2003. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Penerbit Djambatan, Jakarta, hal. 22-23.
17. Sheehan, P.C., Hrapchak B.R. 1980. *Theory and Practice of Histotechnology*, Second Edition, St Louis, hal. 157.