

UJI METODE PEWARNAAN JARINGAN HEPAR TIKUS WISTAR DEWASA (*Rattus norvegicus L*) DENGAN ESKTRAK ETANOL BUNGA ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa*)

Pangestu Yoga Ajie Pinilih, Aris Rosidah, Arif Yahya*
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Penggunaan pewarna kimia sintetis dalam pembuatan preparat histologi dapat berdampak negatif bagi kesehatan dan lingkungan. Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) sering dimanfaatkan sebagai pewarna alami, namun belum pernah digunakan dalam pewarnaan pada organ hepar tikus wistar sebagai pengganti eosin pada pewarnaan standart. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran deskripsi serta tingkat akurasi dan presisi pada pewarnaan sederhana preparat histologi hepar tikus wistar dengan ekstrak etanol bunga rosella.

Metode: Ekstraksi bunga rosella (EHS) pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Hasil ekstraksi dilakukan untuk uji pewarnaan terhadap organ hepar tikus wistar menggantikan eosin. Hasil pewarnaan diamati menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 400x dan dilakukan pengamatan deskriptif dengan pengukuran indikator berupa quisioner poin. Pengukuran dilakukan oleh 3 orang pengamat dengan mengacak setiap gambar lapang pandang yang akan diamati untuk mengurangi subjektivitas peneliti. serta perhitungan tingkat akurasi presisi pada hasil pewarnaan. Jumlah sel hepatosit yang terlihat dihitung menggunakan aplikasi *ImageJ* dan dinilai tingkat akurasi presisi. Uji statistik menggunakan *Mann-Whitney*, $p < 0,05$.

Hasil: Nilai akurasi dan presisi ekstrak etanol bunga rosella pada organ hepar tikus wistar pada konsentrasi 60%, 70%, dan 80% berturut-turut adalah 60%, 40%, dan 73% serta nilai presisi yaitu 28%, 28%, dan 29% yang tidak memenuhi kriteria dapat diterima. Nilai pengamatan deskriptif ekstrak etanol bunga Rosella memiliki rata-rata kejelasan tertinggi pada konsentrasi 70% dan terendah pada konsentrasi 80% dan seluruh konsentrasi EHS mempunyai nilai rata-rata yang berbeda signifikan dibandingkan dengan Hematoksin Eosin (HE) sebagai pembanding. Sedangkan pada kekontrasan rata-rata tertinggi EHS pada konsentrasi 70% dan terendah pada 60% yang juga berbeda signifikan dibandingkan dengan HE sebagai pembanding.

Kesimpulan: Metode pewarnaan organ hepar tikus wistar dengan ekstrak rosella memiliki nilai akurasi dan presisi serta pengamatan deskriptif dibawah standar yang dapat diterima pada semua konsentrasi.

Kata Kunci: Bunga rosella; pewarnaan, organ hepar tikus wistar

*Penulis Korespondensi:

dr. H. Arif Yahya, M.Kes

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail: arifyahya@unisma.ac.id

STAINING METHOD OF LIVE NETWORK OF ADULT WISTAR RATS (*Rattus norvegicus L*) WITH ETHANOL EXTRACT OF ROSELLA FLOWERS (*Hibiscus sabdariffa*)

Pangestu Yoga Ajie Pinilih, Aris Rosidah, Arif Yahya*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Pendahuluan: The use of synthetic chemical dyes in histology can negatively affect health and the environment. Rosella flowers (*Hibiscus sabdariffa*) are often used as a natural dye. However, it has never been used in staining the liver organs of wistar rats. This study aims to determine the level of accuracy and precision in simple coloring of histological preparations of wistar rat liver with ethanol extract of rosella flowers.

Metode: Rosella flower extraction (EHS) in this study used the maseration method. The extraction results were carried out a staining test on the liver organs of wistar rats using a 400x magnification trinocular microscope and descriptive observations with indicator measurements in the form of a point questionnaire. Measurements were carried out by 3 observers by randomizing each image of the field of view to be observed to reduce the subjectivity of the researcher. were made on the staining results. The number of visible hepatocyte cells was calculated using the *ImageJ* application and assessed for accuracy and precision. Statistical test using *Mann-Whitney*, $p < 0,05$.

Hasil: The accuracy and precision values of rosella flower ethanol extract in the liver organs of wistar rats at concentrations of 60%, 70%, and 80% were 60%, 40%, and 73% respectively and the precision values of 28%, 28%, and 29% that did not meet the acceptable criteria. The descriptive observation value of Rosella flower ethanol extract has the highest average clarity at 70% concentration and the lowest at 80% concentration and all EHS concentrations have significantly different average values compared to Hematoxylin Eosin (HE) as a comparison. While in the highest average contrast EHS at a concentration of 70% and the lowest at 60% which is also significantly different compared to HE as a comparison.

Kesimpulan: The staining method of the liver organ of wistar rats with extract of rosella has a value of accuracy and precision and substandard descriptive observations are acceptable at all concentrations.

Kata Kunci: Rosella flowers; Staining, liver organ of wistar rats

*Correspondence Author:

dr. H. Arif Yahya, M.Kes

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail: arifyahya@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Histologi adalah ilmu yang mempelajari jaringan tubuh yang membentuk organ-organ. Istilah ini pertama kali digunakan oleh A.F.J.K. Mayer pada tahun 1819 dan berasal dari kata Yunani "*histos*" yang berarti jaringan dan "*logos*" yang berarti ilmu pengetahuan¹. Penggunaan preparat histologi penting dalam bidang kedokteran untuk mendiagnosis penyakit berdasarkan perubahan abnormal pada sel dan jaringan, seperti tumor dan kanker. Selain itu, preparat histologi juga banyak digunakan dalam penelitian pada tumbuhan, hewan, dan manusia².

Bahan pewarna yang umum digunakan masih menggunakan bahan kimia. Namun, penggunaan pewarna kimia sintetis seperti safranin, crystal violet, malachit green, dan metilen blue dalam jangka waktu yang lama dapat berdampak negatif bagi kesehatan dan lingkungan³. Efek samping yang ditimbulkan oleh pewarna sintetis ini mendorong pencarian alternatif pewarna dari bahan alami yang lebih murah dan memiliki efek samping minimal. Salah satu herbal yang sering digunakan sebagai pewarna alami adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa*).

Ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa*) mengandung senyawa antosianin dengan kandungan antosianin dalam kelopak bunga rosella sebesar 128,76 mg/100 g, yang dapat digunakan sebagai pewarna alami⁴. Pewarnaan alami menggunakan ekstrak kelopak bunga rosella juga memiliki hasil yang tidak jauh berbeda dengan pewarnaan sintetis seperti safranin³. Namun, hingga saat ini belum ada penelitian yang dilakukan mengenai pemanfaatan ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa*) sebagai bahan pewarna alami pada pewarnaan organ hepar tikus wistar. Pewarnaan alami ini juga penting dikarenakan dapat menjadi pewarnaan alternatif, yang dimana sangat dibutuhkan di waktu - waktu tertentu seperti berhentinya supply chain dari produk pewarna sintesis yang berasal dari luar negeri, dikarenakan adanya pandemi COVID - 19. Yang kita ketahui sendiri saat pandemic berlangsung terjadinya lock down di berbagai Negara, dimana sistem keluar dan masuk penduduk dan juga barang - barang menjadi sulit.

Pandemi COVID - 19 kembali menegaskan bahwa mengandalkan satu negara untuk memproduksi pasokan peralatan medis, obat-obatan, atau barang lain di dunia membuat semua orang berisiko mengalami gangguan atau kekurangan produksi. Seperti yang telah terjadi

saat ini perusahaan-perusahaan di dunia sedang berupaya untuk menyesuaikan seluruh rantai pasokan mereka menuju produksi yang tersebar secara geografis, sehingga tidak lagi bergantung pada satu wilayah⁵.

Maka berdasarkan pemaparan diatas, penelitian ini bertujuan untuk menggunakan bunga rosella sebagai pewarna preparat histologi pada organ hepar tikus wistar. Penelitian sebelumnya³ telah menggunakan ekstrak rosella sebagai pewarna pada tanaman cabe merah dan sedian apusan darah tepi pada sel eritrosit dan trombosit⁶. Namun, penelitian ini menggunakan organ hepar tikus wistar dan melakukan pengamatan kualitatif dan kuantitatif pada histologi hepar. Penggunaan organ hepar dipilih karena ukurannya yang besar dan memudahkan evaluasi histologi. Penelitian ini akan melibatkan pengamatan terhadap tingkat akurasi, presisi, kejelasan, dan kontras warna pada pewarnaan sel hepatosit. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai landasan ilmiah untuk mengurangi penggunaan bahan pewarna sintetis, mengurangi risiko paparan zat kimia, dan lebih ramah lingkungan.

METODE PENELITIAN

Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan hasil perbedaan pewarnaan yang menggunakan bahan ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dan pewarna sintesis HE pada jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus* L). Yang dilakukan pada bulan Maret hingga April tahun 2023 di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Muhammadiyah Malang).

Sampel Penelitian

Tikus wistar yang telah diambil organ heparnya. Selanjutnya hepar diblok parafin. Kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan bahan ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) yang dibagi menjadi 5 kelompok dan 1 kelompok diwarnai dengan Hematoksin Eosin sebagai pembanding dan 3 kelompok lainnya menggunakan bahan pewarna ekstrak bunga rosella dengan konsentrasi 60%, 70%, dan 80% pada jaringan hepar tikus, serta 1 kelompok lainnya menggunakan bahan pelarut etanol pada jaringan hepar tikus. Jumlah sampel diambil dari populasi tersebut dan besarnya ditentukan berdasarkan rumus Federer yang didapat jumlah 5 preparat hepar tikus

perkelompok. Sehingga jumlah keseluruhan preparat dalam penelitian ini adalah 25 preparat. Dimana nantinya akan dilakukan pengamatan 5 lapang pandang dari tiap preparat.

Tahapan Ekstasi Bunga Rosella

Simplisia rosella kemudian ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 100 gram dan dilarutkan menggunakan Etanol 96% sebanyak 750 ml (menggunakan perbandingan 1:7,5) lalu rendam pada beacker glass dan ditutup dengan aluminium foil yang kemudian dimasukkan ke dalam shaker selama 24 jam dengan kecepatan 60 rpm. Setelah itu, disaring sebanyak 1 kali menggunakan kertas Whatman no. 41. Ekstrak dari pelarut dikentalkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ hingga didapatkan ekstrak kental. Lakukan hal serupa hingga mendapatkan hasil ekstrak kental sebanyak 150 ml kemudian hasil ekstrak kemudian dimasukkan kedalam botol dan disimpan di dalam kulkas.

Tahapan Pengenceran Ekstrak Rosella

Setelah mendapat jumlah ekstrak bunga rosella sebanyak sekitar 150 ml nantinya akan di bagi menjadi 3 konsentrasi yaitu 60%, 70%, 80% dengan tiap konsentrasi sebanyak 30 ml (ekstrak kental ditambah pelarut etanol 96 %), dan nantinya akan menyisakan sekitar 87 ml ekstrak kental bunga rosella, yang akan di gunakan untuk cadangan.

Untuk menghitung banyak ekstrak kental dan juga pelarut digunakan rumus :

$$M1.V1 = M2.V2$$

Dan didapatkan hasil pada konsentrasi 60%: ekstrak kental rosella 18 ml dan pelarut etanol 96% 12 ml, pada konsentrasi 70% didapat ekstrak kental rosella 21 ml dan pelarut etanol 96% 21 ml, sedangkan pada konsentrasi 80% didapat ekstrak kental rosella 24 ml dan pelarut etanol 96% sebanyak 6 ml.

Pembuatan Sediaan Organ Hepar Tikus

Anestesi tikus wistar dengan ketamin. Bedah dengan insisi di linea mediana dari atas vesica urinaria sampai diafragma dan dilanjutkan dengan pengambilan organ hepar pada kuadran kanan atas abdomen. Hepar yang telah diambil dicuci dengan larutan PBS dan difiksasi dengan neutral buffer formalin 10% selama 24 jam. Hepar dipotong kecil dan didehidrasi di dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat, dari yang encer sampai pekat (70% sampai 100%) selama 24 jam.

Selanjutnya dijernihkan dengan xylol selama 6 jam. Setelah proses penjernihan dilakukan embedding dengan parafin yang telah dicairkan pada $58-60^{\circ}\text{C}$ selama 6 jam. Blok parafin dipotong serial pada ketebalan 4 μm dengan mikrotom.

Pembuatan Preparat Histologi

Parafin blok hepar dipotong dengan mikrotom ketebalan 4 μm kemudian diletakkan pada slide kaca. Kemudian preparat dimasukkan larutan xylol selama ± 3 menit untuk dilakukan deparafinisasi. Tahap rehidrasi dengan memasukkan preparat kedalam larutan alkohol 80%, alkohol 90% dan alkohol 100% selama masing-masing sekitar 2 menit. Kemudian bilas dengan menggunakan air mengalir selama ± 3 menit. Tahap pewarnaan dengan menggunakan larutan ekstrak bunga rosella yang mengandung antosianin. Selanjutnya Tahap deferensiasi dengan HCL 0,6%).

Tahap Blueing dengan menggunakan lithium karbonat 0,5%. Kemudian proses dehidrasi menggunakan alkohol 80%, alkohol 90% dan alkohol absolut. Selanjutnya mounting untuk mengawetkan jaringan yang telah diwarnai menggunakan entellan/canada balsem., ditutup dengan cover glass dengan hati-hati agar tidak terdapat gelembung).

Validasi Hitung Manual Dengan Otomatis Menggunakan Image J

Pada uji validasi antara manual dan otomatis sebelumnya mencoba berbagai persentase threshold, sampai di temukan threshold yang sesuai dan memenuhi standart selisih kurang dari 10% pada tiga lapang pandang HE, yaitu threshold awal yaitu 81-82% dan threshold selanjutnya yaitu 90-91%, sehingga threshold ini bisa di gunakan untuk di lanjutkan untuk menghitung jumlah sel hepatosit.

Penghitungan Tingkat Akurasi dan Presisi pada Pewarnaan Preparat Jaringan Hepar Tikus

Preparat hepar yang telah dilakukan pewarnaan dengan ekstrak Bunga Rosella dan pewarna kemudian dilakukan pengukuran tingkat akurasi yang diamati dengan menggunakan mikroskop trinokuler Olympus dengan perbesaran lensa okuler 400x pada 5 lapang pandang untuk setiap preparat. ⁷ penghitungan tingkat akurasi menggunakan rumus yaitu:

100 % - error %.

Keterangan:

$$\text{Error \%} = \frac{|approx - exact|}{|exact|} \times 100$$

Approx. = jumlah rata – rata per konsentrasi ekstrak tiap lapang pandang

Exact = jumlah rata – rata HE tiap lapang pandang

Dengan standart dapat di terima jika nilai mencapai 98 % - 102 %.

Untuk penghitungan tingkat presisi menggunakan rumus simpangan baku relatif (RSD)⁸ yaitu :

$$\text{RSD\%} = \frac{SD}{X} 100\%$$

Keterangan:

SD : Standart Deviasi

RSD : Relatif Standart Deviasi

X : Nilai rata-rata

Dengan standart dapat di terima apa bila < 2 %

Penghitungan Tingkat Kejelasan dan Kekontrasan Warna pada Preparat Jaringan Hepar Tikus

Preparat hepar yang telah dilakukan pewarnaan dengan ekstrak Bunga Rosella dan pewarna kemudian dilakukan pengukuran tingkat kejelasan dan kekontrasan warna yang diamati dengan menggunakan mikroskop trinokuler Olympus dengan perbesaran lensa okuler 400x pada 5 lapang pandang untuk setiap preparat. Setelah itu, dilakukan pengambilan gambar kemudian dilakukan pengukuran yang dilakukan oleh 3 orang pengamat dengan mengacak setiap gambar lapang pandang yang akan diamati untuk mengurangi subjektivitas peneliti. Kemudian hasil perhitungan 5 lapang pandang oleh 3 pengamat dirata-rata untuk mendapatkan jumlah hasilnya. Setelah itu, dibandingkan dengan kelompok dengan pewarnaan HE.

Tabel 1 Kriteria Penilaian Pengamatan Deskriptif

Aspek	Indikator	Skor
Kejelasan	Apabila sel hepatosit dapat di bedakan dengan latar belakang preparat	2
	Apabila sel hepatosit memiliki warna yang mirip dengan latar belakang preparat namun dapat di bedakan	1
	Apabila sel hepatosit tidak dapat di bedakan dengan latar belakang preparat	0
Kekontrasan	Apabila sel hepatosit, terwarna sangat berbeda dengan jaringan hepar yang lain	2
	Apabila sel hepatosit terwarna yang menyerupai warna jaringan hepar yang lain, tapi masih bisa dibedakan	1
	Apabila sel hepatosit memiliki warna yang sama dengan jaringan hepar yang lain dan sulit dibedakan	0

Keterangan: Kriteria penilaian deskriptif pengamatan sel hepatosit pada hepar tikus wistar, yaitu kejelasan antara sel hepatosit dengan latar belakang dan juga kekontrasan sel hepatosit.

Analisa Data

Penelitian ini termasuk uji non parametrik di karenakan data tidak terdistribusi dengan normal dan juga tidak homogen, serta jenis data dalam penelitian ini adalah ordinal. Analisa dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan pada masing-masing kelompok. Analisa data dilakukan menggunakan software statistik SPSS

HASIL PENELITIAN

Hasil Validasi Hitung Manual Dengan Otomatis Menggunakan Image J

Hasil validasi antara hitung manual dan otomatis dengan *Image J*, Menggunakan tiga lapang pandang HE dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil dari tiap lapang pandang yang di pilih secara acak menunjukan hasil yang memenuhi standart yaitu di bawah dari 10%.

Tabel 2 Hasil Validasi Hitung Manual Dengan Otomatis Menggunakan Image J

LP	Manual	Otomatis	Selisih	Presentase
HE				
1	120	130	10	8,3%
2	136	138	2	1,4 %
3	147	158	11	7,4%

Keterangan: Nilai presentase batas selisih dari tiap lapang pandang yang di ambil secara acak menunjukan presentase di bawah 10% semua, yang dimana memenuhi dari batas terima.

Hasil Perhitungan Tingkat Akurasi dan Presisi Pewarnaan Ekstrak Etanol Bunga Rosella pada Hepar Tikus Wistar

Hasil perhitungan akurasi dan presisi ekstrak etanol bunga Rosella terhadap hepar tikus wistar diukur menggunakan *ImageJ* dapat dilihat pada Tabel 3. Ekstrak etanol bunga Rosella dibuat dengan konsentrasi 60%, 70%, dan 80%. Etanol 96% digunakan sebagai kontrol negatif dan *Hematoksilin Eosin* (HE) sebagai kontrol positif. Kemudian semua perlakuan diamati dalam lima lapang pandang menggunakan mikroskop trinokuler.

Tabel 3 Hasil Pengukuran Akurasi Pada Jumlah Sel Hepatosit Preparat Histologi Organ Hepar Tikus Wistar

Pewarnaan	Ulangan (n)	Approx	exact	SD	%Error	%Akurasi
Etanol 96%	5	22,72	167,72	12,7	86%	14%
Rosella 60%	5	80,04	167,72	24,9	37%	63%
Rosella 70%	5	140,56	167,72	25,9	9%	91%
Rosella 80%	5	82,88	167,72	16,9	35%	62%
HE	5	-	-	24,1	-	-

Keterangan: nilai akurasi pada ekstrak etanol bunga Rosella seluruh konsentrasi mempunyai nilai yang tidak memenuhi standar rentang nilai akurasi baik yaitu 98-102.

Tabel 4 Hasil Pengukuran Presisi Pada Jumlah Sel Hepatosit Preparat Histologi Organ Hepar Tikus Wistar

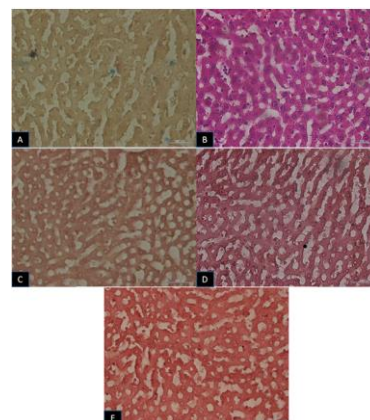
Pewarnaan	Mean	SD	%RSD
Etanol 96%	22,7	12,7	56%
Rosella 60%	80,04	24,9	31%
Rosella 70%	140,56	25,9	18%
Rosella 80%	82,88	16,9	20%
HE	128,88	24,1	19%

Keterangan: Semua data tidak ada yang memenuhi standart terima < 2%, karena memiliki RSD% yang tinggi

Hasil Pengamatan Deskriptif Pewarnaan Ekstrak Etanol Bunga Rosella pada Hepar Tikus Wistar

Pengamatan deksriptif pada pewarnaan hepar tikus wistar dilakukan oleh tiga orang pengamat yang berbeda untuk menghindari bias pada penelitian, kemudian diamati kejelasan dan kontrasan pada preparat uji seperti pada Gambar1.

Hasil nilai akurasi pada ekstrak etanol bunga Rosella seluruh konsentrasi mempunyai nilai yang tidak memenuhi standar rentang nilai akurasi baik yaitu 98-102%. Namun pada ekstrak rosella konsentrasi 70% sudah mendekati pada standart terima, sedangkan untuk ekstrak yang lain terpantau masih jauh dari standart terima. Kemudian perhitungan nilai presisi menggunakan rumus simpangan baku relatif (RSD), hasil nilai RSD pada semua perlakuan pewarnaan didapatkan nilai >2% yang tidak dapat diterima pada standar nilai RSD (<2%).



Gambar 1 Hasil Pewarnaan Ekstrak Bunga Rosella pada Hepar Tikus Wistar

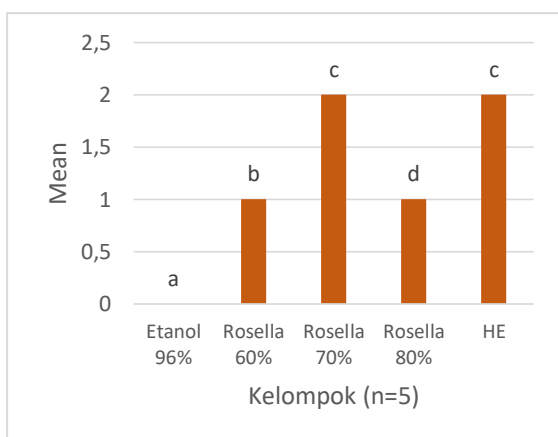
Keterangan: (A) Etanol 96%; (B) HE; (C) Rosella 60%; (D) Rosella 70%; (E) Rosella 80%

Hasil pengamatan deskriptif kejelasan pewarnaan ekstrak etanol bunga Rosella pada hepar tikus wistar dapat dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 2. Ekstrak etanol bunga Rosella memiliki rata-rata kejelasan tertinggi pada konsentrasi 70% dan terendah pada konsentrasi 60% dan 80%. pada seluruh konsentrasi ekstrak etanol bunga Rosella dan HE mempunyai nilai rata-rata kejelasan yang berbeda signifikan dibandingkan dengan etanol 96%, untuk rosella 70% juga berbeda signifikan dengan rosella 80%, pada rosella 80% berbeda signifikan juga dengan HE sebagai pembanding ($p < 0,05$).

Tabel 5 Pengamatan Deskriptif Kejelasan Pada Hepar Tikus Wistar

Pewarnaan	Kejelasan			Mean±SD
	P1	P2	P3	
Etanol 96%	0	0	0	0±0
Rosella 60%	1	2	1	1±1
Rosella 70%	2	2	2	2±1
Rosella 80%	1	1	1	1±1
HE	2	2	2	2±0

Keterangan: Menunjukkan hasil pengamatan kejelasan pada preparat hepar tikus wistar yang dilakukan oleh tiga pengamat (P1, P2, P3) berdasarkan skoring **Tabel 1** dan dilakukan lima lapang pandang tiap preparat. Mean total merupakan penjumlahan dari rata-rata tiap aspek



Gambar 2 Hasil Pengamatan Deskriptif Kejelasan Pada Hepar Tikus Wistar

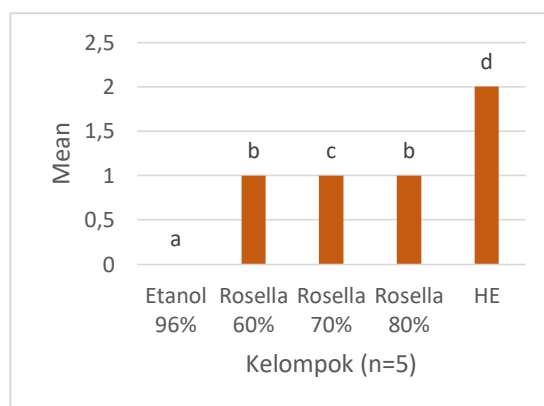
Keterangan: huruf berbeda a,b,c,d menunjukkan perbedaan efek ($p < 0.05$, Uji Mann-Whitney)

Hasil pengamatan deskriptif kekontrasan pewarnaan ekstrak etanol bunga Rosella pada hepar tikus wistar dapat dilihat pada Tabel 6 dan Gambar 3. pada seluruh konsentrasi ekstrak etanol bunga Rosella dan HE mempunyai nilai rata-rata kejelasan yang berbeda signifikan dibandingkan dengan etanol 96%, untuk konsentrasi 60% dan 80% berbeda signifikan juga dengan HE sebagai pembanding ($p < 0,05$).

Tabel 6 Pengamatan Deskriptif Kekontrasan Pada Hepar Tikus Wistar

Pewarnaan	Kontrasan			Mean±SD
	P1	P2	P3	
Etanol 96%	0	0	0	0±0
Rosella 60%	1	1	1	1±1
Rosella 70%	2	1	1	1±1
Rosella 80%	1	1	1	1±1
HE	2	2	2	2±0

Keterangan: Menunjukkan hasil pengamatan kekontrasan pada preparat hepar tikus wistar yang dilakukan oleh tiga pengamat (P1, P2, P3) berdasarkan skoring **Tabel 1** dan dilakukan lima lapang pandang tiap preparat. Mean total merupakan penjumlahan dari rata-rata tiap aspek



Gambar 3 Hasil Pengamatan Deskriptif Kekontrasan Pada Hepar Tikus Wistar

Keterangan: : huruf berbeda a,b,c,d menunjukkan perbedaan efek ($p < 0.05$, Uji Mann-Whitney)

PEMBAHASAN

Tingkat Akurasi dan Presisi Pewarnaan Ekstrak Etanol Bunga Rosella pada Hepar Tikus Wistar

Pada penelitian ini, hasil perhitungan yang didapatkan pada hepar tikus wistar mempunyai nilai akurasi dan presisi yang tidak dapat diterima pada seluruh konsentrasi. Hasil perhitungan pada HE juga memiliki hasil yang tidak dapat diterima. Pada penelitian ini ditemukan beberapa bias penelitian sehingga menyebabkan nilai akurasi dan presisi tidak dapat diterima. Penetapan angka *threshold* yang berbeda-beda tiap pengambilan gambar sehingga mempengaruhi perhitungan dari *ImageJ*.⁷ Selain itu, perbedaan jumlah sel hepatosit yang sangat berbeda tiap lapang pandang pada perlakuan juga menjadi salah satu penyebab berbedanya nilai akurasi dan presisi. Hal ini selaras dengan penelitian Saputra (2022) yang menyatakan perbedaan nilai akurasi dan presisi pada ekstrak metanol bunga rosella.

Hematoksilin Eosin (HE) pada penelitian ini digunakan sebagai pembanding dikarenakan HE adalah pewarna yang umum digunakan dalam pewarnaan histologi. Hematoksilin pada pewarnaan bekerja sebagai pewarna basa yang mana zat ini dapat mewarnai unsur asam, sedangkan eosin bersifat asam yang dapat mewarnai komponen yang bersifat basa sehingga dapat mewarnai sel pada organ hepar wistar.⁹ Etanol merupakan senyawa polar pada penelitian ini digunakan sebagai pelarut untuk ekstraksi bunga rosella dan sebagai kontrol negatif. Etanol tidak mempunyai pigmen berwarna sehingga pada penelitian ini tidak dapat mewarnai sel pada organ hepar tikus wistar.

ImageJ pada penelitian ini digunakan untuk menghitung nilai akurasi dan presisi terhadap jumlah sel hepatosit organ hepar tikus wistar yang dilakukan dengan 5 lapang padang dengan tiga kali pengulangan. Hasil perhitungan menunjukkan perbedaan selisih yang cukup jauh antar tiap perlakuan. Hal ini kemungkinan karena sel hepatosit dan sel eritrosit yang sama-sama terwarnai sehingga sel eritrosit kemungkinan juga terhitung pada *ImageJ*. Selain itu, bisa juga karena fokus pengamatan yang kurang baik pada tiap lapang padang sehingga menyebabkan hasil perhitungan yang tidak dapat diterima.

Pengamatan Deskriptif Pewarnaan Ekstrak Etanol Bunga Rosella pada Hepar Tikus Wistar

Hasil pengamatan deskriptif percobaan pewarnaan sel hepatosit menunjukkan ekstrak etanol bunga rosella mampu mewarnai organ hepar tikus wistar. pada kejelasan, etanol berbeda signifikan pada semua konsentrasasi baik 60%,70%,80%,dan HE. Pada HE berbeda signifikan dengan etanol dan konsentrasasi 80 %, namun tidak berbeda signifikan pada konsentrasasi 60% dan 70 %. Pada konsentrasasi 60 % berbeda signifikan dengan etanol, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasasi 70% ,80%, dan HE. Pada konsentrasasi 70 % berbeda signifikan dengan etanol dan konsentrasasi 80%, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasasi 60% dan HE. Pada konsentrasasi 80% berbeda signifikan dengan etanol, konsentrasasi 70%, dan HE, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasasi 60 %.

Pada kekontrasan, etanol berbeda etanol berbeda signifikan pada semua konsentrasasi baik 60%,70%,80%,dan HE. Pada HE berbeda signifikan dengan etanol, konsentrasasi 60% ,dan 80%, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasasi 70%. Pada konsentrasasi 60% berbeda signifikan dengan etanol dan HE, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasasi 70% dan 80%. Pada konsentrasasi 70% berbeda signifikan dengan etanol saja, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasasi 60%, 80%, dan HE. Sedangkan pada konsentrasasi 80% berbeda signifikan dengan etanol dan HE, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasasi 60% dan 70%.

Pada penelitian ini terdapat beberapa perbedaan antara kejelasan dan kekontrasan pada tiap konsentrasasi ekstrak etanol bunga

rosella. Pada konsentrasasi 70% memiliki nilai kekontrasan yang paling optimum kemungkinan karena adanya reaksi elektrostatis antara muatan ion zat warna dan bagian sel yang berbeda muatan, sehingga mampu mewarna dengan sempurna sitoplasma pada sel.¹⁰ Antosianin yang terdapat pada bunga rosella bermuatan negatif dapat mengikat kuat inti sel namun karena perbedaan komponen penyusun dapat menyebabkan reaksi antar muatan sehingga sitoplasma yang bermuatan positif ikut terwarnai.¹⁰ Pada konsentrasasi 80% dan 60% bisa dibawah dari konsentrasasi 70% kemungkinan karena pada konsentrasasi ini semakin tinggi konsentrasasi maka makin tinggi juga ikatan negatifnya , sehingga mewarnai menjadi merah. Lalu pada HE sebagai pembandingan mempunyai nilai kekontrasan dan kejelasan yang paling tinggi karena memiliki sifat basa dan asam seperti penjelasan sebelumnya. Sehingga pada penelitian ini metode pewarnaan menggunakan ekstrak etanol bunga rosella masih belum dapat menggantikan HE sebagai pewarna histologi.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Rina Asmara⁶ menyatakan bahwa ekstrak bunga rosella mengandung senyawa antosianin yang dapat memberikan warna merah pada jaringan. Antosianin adalah senyawa kimia organik yang dapat larut dalam pelarut polar sehingga mudah untuk memberikan pewarnaan pada jaringan. Namun pada penelitian ini kandungan senyawa pada ekstrak etanol bunga rosella belum diketahui sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol bunga rosella.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan diatas dapat disimpulkan bahwa:

1. Pewarnaan ekstrak etanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) memiliki tingkat akurasi dan presisi dibawah standar pada semua konsentrasasi untuk dapat diterima pada metode pewarnaan terhadap preparat histologi hepar tikus wistar.
2. Pewarnaan ekstrak etanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) memiliki tingkat kejelasan dan kekontrasan paling baik pada konsentrasasi 70% yang dimana tidak memiliki perbedaan signifikan dengan Hematoksilin Eosin pada preparat histologi hepar tikus wistar.
3. Pewarnaan ekstrak etanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*), bisa di gunakan untuk pewarnaan alternatif, namun belum bisa

menggantikan Hemaktosilin Eosin sebagai pewarnaan standart, karena memiliki nilai akurasi dan presisi di bawah standart.

SARAN

1. Melakukan penelitian lebih lanjut untuk identifikasi senyawa fitokimia pada ekstrak etanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*)
2. Di perlukanya pengembangan lebih lanjut dalam metode menghitung jumlah sel dengan *image j*
3. Di perlukanya validasi menghitung secara manual sebagai pembanding
4. Pengambilan zat antosianin secara spesifik pada bunga rosella

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih saya sampaikan kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA yang telah mengintensif penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ariyadi, T. and Suryono, H. (2017) 'Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode Microwave dan Conventional Histoprocessing Pewarnaan Hematoxylin Eosin', *Jurnal Labora Medika*, 1(1), pp. 7–11.
2. Bisri, C., Pantiwati, Y. and Wahyuni, S. (2013) 'EKSTRAK KELOPAK BUNGA ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa* L.) SEBAGAI PEWARNAAN ALTERNATIF ALAMI PREPARAT SECTION TANAMAN CABE MERAH BESAR (*Capsicum annuum* L.)', *Jurnal UMM*, pp. 214–221.
3. Lusiana, U. (2012) 'Application of Calibration Curve, Accuracy and Precision Chart as Internal Quality Control at COD Testing in Wastewater', *Biopropal Industri*, 3(1), pp. 1–8.
4. Mescher, A.L. (2013) *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. 13th edn. Indiana: McGraw-Hill Education.
5. Rahayuwati, L. et al. (2020) 'Pendidikan Kesehatan tentang Pencegahan Penyakit Kanker dan Menjaga Kualitas Kesehatan', *Media Karya Kesehatan*, 3(1), pp. 59–69.
6. Riyanto Ph.D (2012) 'Validasi & Verifikasi Metode Uji', *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*, 3(April), pp. 49–58.
7. Saputra, B. E., Bintari, Y. R., & Risandiansyah, R. (2022). Uji VALIDASI AKURASI DAN PRESISI METODE PEWARNAAN SEDERHANA *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* MENGGUNAKAN EKSTRAK METANOLIK *Hibiscus sabdariffa* Linn. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*, 9(1), 1–13.
<http://riset.unisma.ac.id/index.php/jbm/article/view/15621>
8. Setiawan, B. 2016. *Optimalisasi Metode Automatic slide stainer untuk Pewarnaan Jaringan Menggunakan Hematoksilin-Eosin*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
9. Harborne, J. B., 1996, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Padmawinata, K. dan I. Soediro, Cetakan kedua, ITB, Bandung.
10. Rosyada, A. G., Prihastuti, C. C., Sari, D. N. I., Setiawati, S., Ichsyani, M., Laksitasari, A., Andini, R. F., & Kurniawan, A. A. (2023). *Aktivitas antibiofilm ekstrak etanol kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923*. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*, 35(1), 34.
<https://doi.org/10.24198/jkg.v35i1.42451>
11. Rina Asmara. Ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Sebagai Pewarna Pada Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) [Karya tulis ilmiah]. Bandung. Poltekkes Bandung. 2015.
- 12.