

**PENGEMBANGAN METODE PEWARNAAN ORGAN HEPAR TIKUS WISTAR DEWASA
(*Rattus norvegicus* L) BERBASIS BAHAN ALAM DARI DAUN JATI (*Tectona grandis*)**

Adam Billy Maulana, Arif Yahya, Aris Rosidah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) merupakan teknik rutin dalam pemeriksaan histologi. Namun penggunaan eosin berpotensi menimbulkan dampak negatif bagi kesehatan dan lingkungan. Antosianin sebagai pigmen alami yang bersifat asam memiliki kemiripan sifat dengan eosin, berpotensi menjadi alternatif pewarna histologi. Ekstrak daun jati kaya akan antosianin dan mampu memberikan pola pewarnaan sitoplasma yang baik. Penelitian ini bertujuan menilai tingkat akurasi, presisi, kejelasan, dan kekontrasan warna pewarnaan preparat histologi hepar tikus wistar menggunakan ekstrak daun jati sebagai pengganti eosin.

Metode: Daun jati muda diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol (1:3) selama ± 26 jam, kemudian filtrat dipisahkan hingga diperoleh ekstrak pekat yang diencerkan menjadi konsentrasi 60%, 70%, dan 80%. Preparat hepar tikus wistar dibuat dan dibagi menjadi lima kelompok dengan HE (kontrol positif), ekstrak daun jati 60%, 70%, 80%, dan etanol (kontrol negatif). Pengamatan dilakukan pada pembesaran 400x. Akurasi dan presisi dianalisis dengan ImageJ dibandingkan HE, sedangkan kejelasan dan kekontrasan dinilai oleh tiga pengamat pada lima lapang pandang.

Hasil: Pewarnaan ekstrak daun jati pada seluruh konsentrasi (60%, 70%, 80%) menunjukkan akurasi dan presisi yang tidak memenuhi standar bila dibandingkan dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE), ditunjukkan oleh nilai akurasi di luar rentang 98–102% dan nilai %RSD $> 2\%$. Konsentrasi 80% memberikan kejelasan dan kekontrasan terbaik mendekati HE. Uji statistik menunjukkan adanya perbedaan signifikan kualitas pewarnaan antara ekstrak daun jati dan HE ($p < 0,05$).

Simpulan: Ekstrak daun jati belum dapat menggantikan HE dari sisi akurasi dan presisi, namun pada konsentrasi 80% mampu memberikan kejelasan dan kekontrasan warna yang baik dan mendekati hasil pewarnaan HE pada preparat hepar tikus wistar.

Kata Kunci: Pewarna alami, *Tectona grandis*, Hematoxylin eosin, *Rattus norvegicus* L, Akurasi, Presisi

*Korespondensi :

dr.H.Arif yahya M.kes

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

e-mail : arifyahya@unisma.ac.id

**DEVELOPMENT OF A STAINING METHOD FOR ADULT WISTAR RAT (*Rattus norvegicus* L.) LIVER
TISSUE USING NATURAL TEAK LEAF (*Tectona grandis*) EXTRACT**

Adam Billy Maulana, Arif Yahya, Aris Rosidah*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: Hematoxylin–Eosin (H&E) staining is a routine technique in histological examinations. However, the use of eosin may pose potential risks to health and the environment. Anthocyanin, a naturally occurring acidic pigment, has properties similar to eosin and therefore has potential as an alternative histological stain. Teak leaf extract is rich in anthocyanins and is capable of producing good cytoplasmic staining patterns. This study aimed to evaluate the accuracy, precision, clarity, and color contrast of histological staining of Wistar rat liver preparations using teak leaf extract as a substitute for eosin.

Methods: Young teak leaves were extracted using a maceration method with ethanol (1:3) for approximately 26 hours. The filtrate was then concentrated to obtain a crude extract, which was diluted to concentrations of 60%, 70%, and 80%. Wistar rat liver preparations were prepared and divided into five groups: H&E (positive control), 60%, 70%, and 80% teak leaf extract, and ethanol (negative control). Observations were performed at 400 $\times$ magnification. Accuracy and precision were analyzed using ImageJ in comparison with H&E, while clarity and color contrast were assessed by three observers across five fields of view.

Results: Teak leaf extract staining at all concentrations (60%, 70%, and 80%) showed accuracy and precision values that did not reach the acceptable standards when compared with Hematoxylin–Eosin (H&E) staining, as indicated by accuracy values outside the 98–102% range and %RSD values greater than 2%. The 80% concentration provided the best clarity and color contrast, approaching that of H&E. Statistical analysis revealed a significant difference in staining quality between teak leaf extract and H&E ($p < 0.05$).

Conclusion: Teak leaf extract cannot replace H&E in terms of accuracy and precision. However, at 80% concentration, it provides good clarity and color contrast that closely resemble the staining results of H&E in Wistar rat liver preparations.

Keywords : Natural dye, *Tectona grandis*, Hematoxylin eosin, *Rattus norvegicus* L, Accuracy, Precision

*Correspondence:

dr.H.Arif yahya M.kes

Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144

e-mail : arifyahya@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Pewarnaan digunakan untuk memberikan tanda pada sel, asam nukleat, protein, serta elektroforesis gel yang bertujuan untuk membantu pemeriksaan mikroskopis¹. Metode pewarnaan konvensional menggunakan dua pewarnaan yaitu hematoxylin, yang merupakan pewarna dasar dan pewarnaan kromatin nukleus, dan eosin, pewarna merah yang digunakan sebagai pewarna pengimbang untuk menandai struktur yang tidak bisa menyerap pewarna basa².

Penggunaan pewarna konvensional harus di batasi karena dapat menimbulkan reaksi alergi dan penyakit alergi yaitu menimbulkan iritasi pada kulit, mata, dan membran mukosa saluran pernapasan, terutama bila terhirup dalam bentuk uap, aerosol, atau serbuk halus yang dihasilkan selama proses penimbangan dan pencampuran selain itu pewarna sintetis juga biasanya bersifat karsinogenik dan juga berdampak negatif terhadap lingkungan. Hematoxylin sebagai bahan yang digabungkan dengan eosin juga mempunyai kekurangan harganya mahal³⁻⁹. Selain itu eosin dapat menimbulkan permasalahan serius bagi lingkungan. Eosin dikategorikan sebagai pewarna sintetis non-biodegradable atau sulit terurai secara alami karena struktur kimianya yang stabil dan resisten terhadap degradasi biologis¹⁰.

Dampak penggunaan eosin dan hematoxylin bagi kesehatan pengguna sehingga diperlukan alternative pewarna alami salah satunya antosianin yang merupakan turunan dari satu struktur aromatik yaitu sianidin, terbentuk dari pigmen sianidin melalui penambahan atau penghilangan gugus hidroksil, metilasi, dan glikosilasi dan secara glikosidik berikatan dengan monosakarida glukosa, galaktosa, rhamnosa, dan pentose^{11,12}. Antosianin merupakan kumpulan terbesar dari flavonoid yang banyak terdapat pada bunga, buah-buahan, biji dan daun tanaman¹³. Pigmen ini ada dalam berbagai bentuk, struktur bentuk dan fenomena fisikokimia yang terkait mempunyai pengaruh besar terhadap warna yang memberikan pewarnaan oranye, merah muda, kemerahan, merah marun, merah, ungu, biru, dan biru warna bunga gelap^{14,15}.

Beberapa penelitian telah dilakukan hingga saat ini sebagai alternatif pengganti eosin dengan menggunakan pewarna alami yang mendapatkan hasil bahwa pewarna ekstrak daun jati (*T. grandis*) bisa dijadikan pengganti pewarna sintetis, sehingga

mengurangi dampak kesehatannya¹⁶. Penelitian selanjutnya adalah penelitian dari Fasya Fatarani Nadhira dkk (2023) tentang Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) Sebagai alternatif pengganti eosin dalam pemeriksaan telur cacing golongan *Soil Transmitted Helminths* mendapatkan hasil pewarnaan dengan ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) dalam pelarut etanol 96% ditambah HCl pekat, aquades ditambah HCl pekat dan eosin 2%, hasil tidak berbeda nyata¹⁷. Selanjutnya menurut Muhamad Jumardi dkk (2023) meneliti tentang perbandingan kualitas hasil pewarnaan menggunakan Hematoxylin Eosin dan Ekstrak Daun Jati Sebagai pengganti eosin mendapatkan hasil ekstrak daun jati dapat digunakan sebagai pewarna dalam pewarnaan Hematoxylin-Eosin⁸. Menurut penelitian Cecilia Smith-Togobo dkk (2023) bahwa ekstrak pewarna daun *Tectona grandis* memberikan pola pewarnaan sitoplasma yang sangat baik dan dapat digunakan sebagai counterstain alternatif dalam teknik pewarnaan H&E rutin¹⁸.

Antosianin secara umum merupakan zat pewarna pada tanaman memiliki sifat yang asam dan pigmen warna oranye merah eosin juga memiliki sifat asam dan pigmen warna oranye merah¹⁹⁻²¹. Berdasarkan hal tersebut maka bahan eosin dan antoniosin memiliki kesamaan dari sisi pigmen dan dari sisi sifatnya, maka antoniasin dapat dijadikan alternatif bahan pewarna histologi pengganti eosin. Pemilihan antosianin sebagai preparat pengganti eosin menggunakan daun jati hal ini karena ekstrak pewarna daun jati (*Tectona grandis*) dapat memberikan pola pewarnaan sitoplasma yang sangat baik dan dapat digunakan sebagai counterstain alternatif dalam teknik pewarnaan H&E, lebih murah daripada pewarna sintesis dan dapat dibuat sendiri untuk pembuatan preparat. Selain itu senyawa antosianin pada daun jati menghasilkan pewarna alami yang aman bagi kesehatan dan lingkungan^{18,22-25}. Sebagai sampel uji coba menggunakan organ hepat tikus wistar dan dilakukan pengamatan secara kualitatif dan kuantitatif pada histologi hepar. Penggunaan hati tikus sebagai sampel uji coba pewarnaan histologi karena hati tikus memiliki struktur dasar yang sama dengan hati manusia dan mudah diambil sebagai sampel pewarnaan histologi²⁶⁻³⁰.

Penelitian ini dilakukan untuk melihat tingkat akurasi dan presisi dan secara kualitatif

tentang kejelasan dan kekontrasan warna pada pewarnaan preparat histologi sel hepatosit³¹. Hasil penelitian ini juga diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif pewarnaan histologi dari ekstrak daun jati untuk mengurangi penggunaan bahan sintesis eosin dalam pewarnaan histologi, sehingga mengurangi resiko paparan zat kimia eosin agar lebih ramah lingkungan dan membutuhkan biaya lebih sedikit.

METODOLOGI PENELITIAN

Riset berikut merupakan riset eksperimental laboratorium yang menganalisa kandungan perbedaan pewarnaan yang menggunakan bahan ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) dan pewarna sintesis HE pada jaringan hepar tikus wistar (*Rattus novvergicus L*).

Ekstrak Daun Jati

Cuci pucuk daun jati muda dengan air mengalir, keringkan diangin-anginkan dan potong kecil-kecil. Kemudian, 50 gr dari masing-masing bahan ditimbang. Sampel daun jati muda digiling hingga halus menggunakan mortar dan dimaserasi dengan masing-masing pelarut dengan perbandingan 1: 3 (1 bagian sampel : 3 bagian pelarut). Lalu masing masing ditambahkan 150 ml pelarut PBS, etanol 96%, dan asam sitrat 14%. Kemudian direndam selama 26 jam pada suhu kamar (37 °C). Larutan hasil ekstraksi disaring melalui kertas saring, dan filtrat yang dihasilkan dipekatkan dalam evaporator vakum pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ dan tekanan ± 220 mbar. 1 ml aliquot filtrat pekat ditempatkan dalam tabung Eppendorf dengan lubang di tutupnya, dan larutan dibekukan pada suhu -60°C . Filtrat dikeringkan dengan pengering semprot.³²

Uji Kandungan Antosianin

Pembuktian keberadaan antosianin dapat dilakukan dengan cara yang pertama adalah sampel dipanaskan dengan HCl 2M selama 2 menit pada suhu 100°C , kemudian diamati warna sampel. Apabila warna merah pada sampel tidak berubah (mantap), maka menunjukkan adanya antosianin. Cara kedua dengan menambahkan sampel dengan NaOH 2M tetes demi tetes. Apabila warna merah berubah menjadi hijau biru dan memudar perlahan maka menunjukkan adanya antosianin³³

Pembuatan Sediaan Organ Hepar Tikus

Hewan coba dikorbankan dalam kondisi anestesi menggunakan ketamin. Pembedahan

melalui 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 5 μm dengan mikrotom³⁴

Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Hepar Tikus

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 dilakukan untuk mengisi air pada rongga-rongga jaringan yang kosong yaitu 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 untuk memberi warna pada inti sel dan sitoplasma pada jaringan hepar dengan menggunakan larutan ekstrak daun jati yang mengandung antosianin. Tahap deferensiasi bertujuan untuk menghilangkan warna biru pada sitoplasma dan mengurangi warna biru pada inti sel dengan menggunakan HCL 0,6% .

Tahap *Blueing* untuk memperjelas warna biru pada inti sel dengan menggunakan *lithium carbonat* 0,5%. Kemudian proses dehidrasi untuk menghilangkan untuk menghilangkan air dari jaringan menggunakan alkohol 80%, alkohol 90% dan alkohol absolut. *Mounting* untuk mengawetkan jaringan yang telah diwarnai menggunakan entellan/canada balsem. Selanjutnya sesudah diberi entellan, ditutup dengan cover glass dengan hati-hati agar tidak terdapat gelembung

ANALISA DATA

Data dinyatakan dalam bentuk rerata $\pm$ SD. Selanjutnya data dilakukan uji *Saphiro Wilk* untuk mengetahui homogenitas dan normalitas data. Setelah itu, dilakukan uji statistik *Oneway ANOVA* untuk perbedaan antar kelompok dengan derajat signifikansi $p < 0.05$. Apabila

terdapat signifikansi, analisa dilanjutkan dengan uji *Least Significance Different* (LSD) untuk mengetahui perbandingan masing-masing kelompok perlakuan. Jika didapatkan data tidak terdistribusi normal atau heterogeni maka dilakukan analisa non-parametrik menggunakan *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui apakah hasil yang diperoleh signifikan. Analisa dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan pada masing-masing kelompok. Analisa data dilakukan menggunakan software statistik SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 22

HASIL PENELITIAN

Hasil Perhitungan Tingkat Akurasi dan Presisi Pewarnaan Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) pada Hepar Tikus Wistar

Hasil Perhitungan Tingkat Akurasi dan Presisi Pewarnaan Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) pada Hepar Tikus Wistar ditunjukkan dalam Tabel 1 dan 2.

Hasil Pengamatan kejelasan dan kekontrasan warna pada pewarnaan preparat histologi hepar tikus wistar dengan Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*)

Hasil pengamatan deskriptif kejelasan pewarnaan ekstrak Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) pada hepar tikus wistar dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 1.

Tabel 1 Hasil Pengukuran Akurasi Pada Jumlah Sel Hepatosit Preparat Histologi Organ Hepar Tikus Wistar

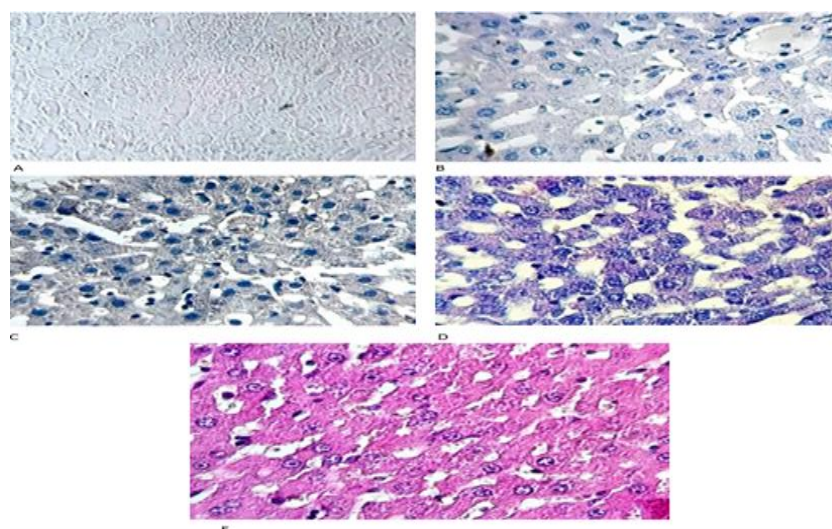
Pewarnaan	Ulangan (n)	Approx	Exact	SD	%Error	%Akurasi
Etanol 96%	5	22,72	165,52	12,7	86%	14%
Daun Jati 60%	5	230,16	165,52	64,9	39%	61%
Daun Jati 70%	5	253,20	165,52	71,2	52%	48%
Daun Jati 80%	5	211,44	165,52	61,2	27%	73%
HE	5	-	-	-	-	-

Keterangan: Nilai akurasi pada ekstrak etanol bunga Daun Jati seluruh konsentrasi mempunyai nilai yang tidak memenuhi standar rentang nilai akurasi baik yaitu 98-102%

Tabel 2 Hasil Pengukuran Presisi Pada Jumlah Sel Hepatosit Preparat Histologi Organ Hepar Tikus Wistar

Pewarnaan	Mean	SD	%RSD
Etanol 96%	22,72	12,7	56%
Daun Jati 60%	230,16	64,9	28%
Daun Jati 70%	253,20	71,2	28%
Daun Jati 80%	211,44	61,2	29%
HE	165,52	44,8	27%

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



Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Ekstrak Daun Jati pada Hepar Tikus Wistar

Keterangan : (A) Etanol 96%; (B) Daun Jati 60%; (C) Daun Jati 70%; (D) Daun Jati 80%; (E) Hematoksilin Eosin

Tabel 3 Pengamatan Deskriptif Kejelasan Pada Hepar Tikus Wistar

Pewarnaan	Kejelasan			Mean±SD
	P1	P2	P3	
Etanol 96%	0	0	0	0,00±0,00
Daun Jati 60%	1	1	1	1,00±0,00 (a)
Daun Jati 70%	1	1	1	1,00±0,00 (b)
Daun Jati 80%	1	2	1	1,34±0,58 (c)
HE	2	2	2	2,00±0,00

Keterangan: Menunjukkan hasil pengamatan kejelasan pada preparat hepar tikus wistar yang dilakukan oleh tiga pengamat (P1, P2, P3) berdasarkan skoring Tabel 5.3 dan dilakukan lima lapang pandang tiap preparat. Mean total merupakan penjumlahan dari rata-rata tiap aspek

Tabel 4 Pengamatan Deskriptif Kekontrasan Pada Hepar Tikus Wistar

Pewarnaan	Kejelasan			Mean±SD
	P1	P2	P3	
Etanol 96%	0	0	0	0,00±0,00
Daun Jati 60%	1	1	1	1,00±0,00 (a)
Daun Jati 70%	2	1	1	1,34±0,58 (b)
Daun Jati 80%	2	2	1	1,67±0,58 (c)
HE	2	2	2	2,00±0,00

Keterangan: Menunjukkan hasil pengamatan kekontrasan pada preparat hepar tikus wistar yang dilakukan oleh tiga pengamat (P1, P2, P3) berdasarkan skoring Tabel 5.4 dan dilakukan lima lapang pandang tiap preparat. Mean total merupakan penjumlahan dari rata-rata tiap aspek

Tabel 4: Hasil Uji Statistik

Uji Statistik	Nilai Sig
Shapiro-Wilk Test	0.000
Kruskal-Wallis Test	0.024

Data yang diperoleh dari pembacaan secara mikroskopis dilakukan uji normalitas menggunakan Shapiro-wilk test. Berdasarkan hasil pengujian data diperoleh nilai signifikansi 0,000 yang berarti nilai p value <0,05 menunjukkan hasil berdistribusi tidak normal sehingga dilakukan uji non parametrik Kruskal-Wallis Test. Hasil uji tersebut didapatkan hasil signifikansi 0,024 maka p value <0,05, sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan signifikan kualitas sediaan pada proses pewarnaan alami daun jati dengan pewarnaan hematoxylin-eosin

PEMBAHASAN

Tingkat Akurasi dan Presisi Pewarnaan Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) pada Hepar Tikus Wistar

Hasil perhitungan dalam penelitian ini yang dilakukan pada hepar tikus wistar menunjukkan nilai akurasi dan presisi yang tidak memenuhi standar di semua konsentrasi jika dibandingkan dengan hasil perhitungan pada HE. Penelitian ini menemukan beberapa

bias yang terjadi, sehingga menyebabkan nilai akurasi dan presisi tidak bisa diterima. Akurasi adalah cara mengukur seberapa dekat hasil yang didapat dengan nilai sebenarnya dari zat dalam sampel. Presisi mengukur seberapa seragam hasil pengukuran satu sama lain^{35,36}. Selain itu, perbedaan jumlah sel hepatosit yang sangat berbeda di setiap area pengamatan pada setiap perlakuan juga menjadi salah satu penyebab perbedaan nilai akurasi dan presisi. Sejalan dengan yang diteliti oleh peneliti sebelumnya yang menyatakan adanya perbedaan nilai akurasi dan presisi pada evaluasi dalam klasifikasi citra histopatologi payudara.^{37,38}

Hematoksilin Eosin (HE) pada penelitian ini digunakan sebagai pembanding dikarenakan Hematoksilin dan Eosin (H&E) adalah pewarna standar histologis yang paling banyak digunakan. Pewarna ini mudah digunakan, mudah diotomatisasi, dan menunjukkan struktur jaringan yang berbeda dengan jelas. Hematoksilin mewarnai inti sel menjadi biru kehitaman, menunjukkan detail intranuklear yang jelas, sedangkan eosin mewarnai sitoplasma sel dan sebagian besar serat jaringan ikat dengan berbagai nuansa dan intensitas warna merah muda, oranye, dan merah³⁹. Etanol yang merupakan senyawa polar pada penelitian ini digunakan sebagai pelarut untuk ekstraksi daun jati dan sebagai kontrol negatif. Etanol tidak mempunyai pigmen perwarna sehingga

pada penelitian ini tidak dapat mewarnai sel pada organ hepar tikus wistar.

Pengamatan Deskriptif Pewarnaan Ekstrak Etanol Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) pada Hepar Tikus Wistar

Hasil observasi deskriptif dari percobaan pewarnaan sel hati menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jati mampu memberi warna pada organ hati tikus wistar. Dalam penelitian ini, hasil terbaik diperoleh dari ekstrak daun jati dengan konsentrasi 80%, dimana tidak terdapat perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan HE, baik dalam hal kejelasan maupun kekontrasan. Observasi deskriptif dilakukan dengan mengevaluasi tingkat kejelasan dan kekontrasan hasil pengamatan. Kekontrasan mengacu pada perbedaan warna antara inti sel hati dengan sitoplasma, sedangkan kejelasan merujuk pada apakah sel hepatosit bisa terlihat dengan jelas dan dapat dibedakan antara satu sel dengan sel yang lain.

Dalam penelitian ini terdapat perbedaan antara kejelasan dan kekontrasan pada setiap konsentrasi ekstrak etanol daun jati. Konsentrasi 80% memiliki nilai kekontrasan yang terbaik, kemungkinan karena terjadi reaksi elektrostatis antara muatan ion zat warna dan bagian sel yang memiliki muatan berbeda, sehingga mampu memberi warna yang sempurna pada sitoplasma sel.^{40,41} Antosianin pada daun jati memiliki muatan negatif yang mampu melekat kuat pada inti sel, tetapi karena adanya perbedaan dalam komponen penyusunnya, bisa terjadi reaksi antar muatan, sehingga sitoplasma yang bermuatan positif juga ikut terwarnai^{17,33}.

Pada konsentrasi 60% dan 70% bisa lebih rendah dibandingkan konsentrasi 80%, kemungkinan karena semakin tinggi konsentrasi maka ikatan negatifnya juga semakin kuat, sehingga menghasilkan warna merah. Selanjutnya pada HE sebagai pembanding memiliki tingkat kontras dan kejelasan tertinggi karena memiliki sifat basa dan asam seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Oleh karena itu, dalam penelitian ini metode pewarnaan menggunakan ekstrak etanol daun jati masih belum mampu menggantikan HE sebagai pewarna histologi.

Ekstrak daun jati memiliki senyawa antosianin yang bisa memberi warna merah pada jaringan. Antosianin adalah zat kimia organik yang larut dalam pelarut polar, sehingga mudah digunakan sebagai pewarna untuk jaringan. Namun, dalam penelitian ini

belum diketahui berapa banyak senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol dari daun jati^{8,17,23,42}. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis dan jumlah senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak etanol daun jati tersebut.

KESIMPULAN

Bersumber hasil analisa dalam riset berikut bisa dibuat simpulan bahwasanya :

1. Pewarnaan ekstrak Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) memiliki tingkat akurasi dan presisi dibawah standar pada semua konsentrasi untuk dapat diterima pada metode pewarnaan terhadap preparat histologi hepar tikus wistar.
2. Pewarnaan ekstrak Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) memiliki tingkat kejelasan dan kekontrasan paling baik pada konsentrasi 80% yang dimana tidak memiliki perbedaan signifikan dengan Hematoksin Eosin pada preparat histologi hepar tikus wistar.

SARAN

Bersumber hasil riset, pembahasan, serta simpulan maka bisa dikemukakan sejumlah masukan yakni:

1. Melakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan konsentrasi Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) yang lebih tinggi dari sebelumnya.
2. Mempertimbangkan karakteristik daun jati secara lebih spesifik, seperti usia daun, tingkat kematangan, serta kondisi lingkungan tempat tumbuhnya..

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan pada Pembimbing dan Fakultas Kedokteran UNISMA yang telah membantu fasilitasi penelitian ini

REFERENSI

1. Yadav, S. *et al.* Histopathological Stains - a Review. *Int. J. Curr. Res.* **11**, 8163–8167 (2019).
2. Holmes, R. L. *LIVING TISSUES An introduction to functional occlusion*. (Pergamon Press Ltd, 1965). doi:10.1016/0300-5712(82)90065-3.

3. Lillie, P. P. & D. P. T. Hematoxylin Substitutes: A Survey of Mordant Dyes Tested and Consideration of the Relation of Their Structure to Performance as Nuclear Stains. *Stain Tehnol.* **51**, 25–41 (1976).
4. Bochner, B. S. The eosinophil: For better or worse, in sickness and in health. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **121**, 150–155 (2018).
5. Culling Charles Frederick Albert. *Handbook of histopathological and histochemical techniques: (including museum techniques)*. (Butterworth & Co, 1974).
6. Motahiro Ebisawa, B. S. B. & R. P. S. Eosinophil-Endothelial Interactions and Transendothelial Migration. in *Adhesion Molecules in Allergic Disease* (ed. Bochner, B. S.) (Marcel Dekker, Inc., 1997).
7. Sa'diyah, R. A. PENGUNAAN FILTRAT KUNYIT (Curcuma domestica Val.) SEBAGAI PEWARNA ALTERNATIF JARINGAN TUMBUHAN PADA TANAMAN MELINJO (Gnetum gnemon). *Berk. Ilm. Pendidik. Biol.* **4**, 765–769 (2015).
8. Jumardi, M., Iswara, A., Setya, G., Putri, A. & Ariyadi, T. Perbandingan Kualitas Hasil Pewarnaan Menggunakan Hematoxylin-Eosin dan Ekstrak Daun Jati Sebagai Pengganti Eosin Comparison of Quality of Staining Results Using Hematoxylin-Eosin and Teak Leaf Extract As Eosin Substitute. *Pros. Semin. Nas. Unimus* **2**, 878–887 (2023).
9. Sigma-Aldrich. Eosin Y solution. 1–12 (2020).
10. Kant, R. Textile dyeing industry an environmental hazard. *Nat. Sci.* **04**, 22–26 (2012).
11. Lee, Y. M. *et al.* Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. *Nutrients* **9**, 1–15 (2017).
12. Burdock, G. A. B. B. *Encyclopedia of Food & Color Additives*. (Chapman and Hall/CRC, 2014).
13. Enrico, G. M. & Miniati. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. (CRC Press Taylor & Francis Group, 1993).
14. Tanaka, Y., Brugliera, F. & Chandler, S. Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 5350–5369 (2009).
15. Delgado-Vargas, F. & Paredes-López, O. *Natural Colorants Nutraceutical for Food and Uses. Sustainability (Switzerland)* (CRC Press, 2003).
16. Abubakar, S., Usman, A. B., Nnadi, O., Alaku, C. & Etim, V. A. Perfection of organic dye from *Tectona grandis* (Linn) young leaves methanolic extract for mycological staining. *Int. J. Biol. Sci. Technol.* **6**, 31–36 (2014).
17. Fatarani Nadhira, F., Rahmat, M., Sundara Mulia, Y. & Rismiarti, Z. Ekstrak Daun Jati (*Tectona Grandis*) Sebagai Alternatif Pengganti Eosin Dalam Pemeriksaan Telur Cacing Golongan Soil Transmitted Helminths. *J. Kesehat. Siliwangi* **4**, 165–171 (2023).
18. Smith-Togobo, C. *et al.* *Tectona grandis* (Teak Tree) Young Leaf Extract as a Histological Stain. *J. Biomed. Sci. Eng.* **16**, 17–41 (2023).
19. Strack, D. W. The Antochyanins. in *The Flavonoids Advances In Research Since 1986* (ed. Harborne, J. B.) 1–22 (CRC Press, 1994).
20. Brouillard, R. Chemical Structure of Anthocyanins. in *Antocianinas como colorantes alimenticios* (ed. Markakis, P.) 1–39 (Academic Press Inc, 1982).
21. Nuovo, G. J. *In Situ Molecular Pathology and Co-expression Analyses. Mao's Road to Power* (Academic Press Inc, 2013).
22. Kembaren, R. *br et al.* Ekstraksi Dan Karakterisasi Serbuk Nano Pigmen Dari Daun Daun Tanaman Jati (*Tectona grandis* Linn . F). *Kim. Kemasan* **36**, 191–196 (2013).
23. Nurwanti, M., Budiono, J. D. & P, R. P. Pemanfaatan Filtrat Daun Muda Jati Sebagai Bahan Pewarna Alternatif Dalam Pembuatan Preparat Jaringan Tumbuhan. *BioEdu* **2**, 73–76 (2013).
24. Paul, J. J. P. Histochemistry and Fluorescence Analysis of *Turbinaria Ornata* (Turner) J . Ag . – an Important Brown Seaweed (Phaeophyceae). *Indian J. Plant Sci.* **3**, 40–44 (2014).
25. Gersbach, P. V., Wyllie, S. G. & Sarafis, V. A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Ann. Bot.* **88**, 521–525 (2001).
26. Kriska, P. L. K. M. G. *Atlas of Animal Anatomy and Histology*. (Springer, 2016).

27. Scudamore, C. L. *et al.* The effect of post-mortem delay on immunohistochemical labelling-a short review. *Comp. Clin. Path.* **20**, 95–101 (2011).
28. Kogure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H. & Makuuchi, M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* **6**, 171–175 (1999).
29. Gude, W. D., Cosgrove, G. E. & Hirsch, G. P. *Histological atlas of the laboratory mouse.* (Springer Science+Business Media, 1982).
30. Thurberg, J. J. D. S. B. P. U. S. R. L. *The Laboratory Mouse A Guide to the Location and Orientation of Tissues for Optimal Histological Evaluation.* (CRC Press Taylor & Francis Group, 2019).
31. Michalopoulos, G. K., Bowen, W. C., Mulè, K. & Stolz, D. B. Histological organization in hepatocyte organoid cultures. *Am. J. Pathol.* **159**, 1877–1887 (2001).
32. Sri Andayani, I. G. A., Sulastri, S., Hananto, D. A. & Sriasih, M. Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) Alternatif Pewarna pada Penghitungan Jumlah dan Viabilitas Sel Kultur Dibandingkan dengan Pewarna Tryphan Blue. *Biosci. J. Ilm. Biol.* **8**, 205 (2020).
33. Surianti, S., Husain, H. & Sulfikar, S. Uji Stabilitas Pigmen Merah Antosianin Dari Daun Jati Muda (*Tectona grandis* Linn f) terhadap pH sebagai Pewarna Alami. *Chem. J. Ilm. Kim. dan Pendidik. Kim.* **20**, 94 (2019).
34. Soesanti, A. M. R. N. KARAKTERISTIK HISTOPATOLOGI HEPAR TIKUS GOT HISTOPATHOLOGY CHARACTERIZATION OF NORWAY RAT ' S LIVER *Rattus norvegicus* INFECTED BY *Leptospira* sp . BAHAN DAN METODE 1 . Lokasi / Pengambilan Sampel Tikus Sampling tikus dilakukan di Kelurahan Miroto , Kecam. *J. Vektora J. Vektor dan Reserv. Penyakit* **1**, 84–92 (2009).
35. Indrayanto, G. Application of Accuracy and Precision Evaluations Based on the Current United States and Indonesian Pharmacopoeias: A Critical Review. *Makara J. Sci.* **26**, 227–237 (2022).
36. Joseph M Betz, Paula N Brown, M. C. R. Accuracy, Precision, and Reliability of Chemical Measurements in Natural Products Research. *Bone* **82**, 44–52 (2011).
37. DeVoe, K., Takahashi, G., Tarshizi, E. & Sacker, A. Evaluation of the precision and accuracy in the classification of breast histopathology images using the MobileNetV3 model. *J. Pathol. Inform.* **15**, 100377 (2024).
38. Pinilih, P. Y. A. PENGEMBANGAN METODE PEWARNAAN ORGAN HEPAR TIKUS WISTAR DEWASA (*Rattus norvegicus* L) BERBASIS BAHAN ALAM DARI BUNGA ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa*). (UNIVERSITAS ISLAM MALANG, 2023).
39. Layton, J. D. B. & C. The hematoxylin and eosin. in *Bancroft's of HISTOLOGICAL PRACTICE THEORY and TECHNIQUES* (ed. S. Kim Suvarna, C. L. and J. D. B. to) 126–138 (Elsevier, 2019).
40. Evangelina, I. A., Syafitri, F. U., Mardiaty, E. & Laviana, A. Daya antibakteri fraksi etil asetat daun kemangi (*Ocimum basilicum*) terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pada clear retainer secara in vitro Antibacterial potential of the ethyl acetate fraction of basil (*Ocimum basilicum*) leaves on *Streptoco.* *Padjadjaran J. Dent. Res. Students* **5**, 97 (2021).
41. Rosyada, A. G. *et al.* Aktivitas antibiofilm ekstrak etanol kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *J. Kedokt. Gigi Univ. Padjadjaran* **35**, 34 (2023).
42. Priska, M., Peni, N., Carvallo, L. & Ngapa, Y. D. Review: Antosianin dan Pemanfaatannya. *Cakra Kim. (Indonesian E-Journal Appl. Chem.* **6**, 79–97 (2018).