

Pewarnaan Jaringan Hepar Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus L*) Berbasis Pewarnaan Bahan Alam Ekstrak Kulit Manggis (*Garciana Mangostana L.*)

Yudistira Firman Alamsyah, Denis Merry Mirza, Arif Yahya*

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Banyaknya minat konsumsi dari buah manggis (*Graciana mangostana*) di masyarakat, maka akan menyebabkan banyaknya limbah dari kulit buah manggis. Kulit buah manggis sebagai alternatif dari pewarnaan HE (*Haematoxylin dan eosin*).

Metode: Ekstraksi kulit buah manggis 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. 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 Kruskal wallis, $p < 0,05$.

Hasil: Pewarnaan ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 25% memiliki nilai total pengamatan deskriptif (kejelasan dan kontras) (1,1), konsentrasi 50% (1,1, 1,36), dan konsentrasi 75% (1,34, 1). Hasil nilai akurasi pada konsentrasi 25%, 50% dan 75% didapatkan sebesar (60%, 46% dan 73%), Hasil nilai presisi pada konsentrasi 25%, 50% dan 75% didapatkan sebesar (25%, 20% dan 27%).

Simpulan: Ekstrak kulit buah manggis dapat mewarnai preparat organ hepar *Rattus norvegicus L*, tetapi dengan kualitas yang lebih rendah dibandingkan pewarna hematoxylin eosin. Sehingga tidak efektif untuk menjadi alternatif pewarna eosin

Kata Kunci: *Graciana Mangostana*, *Hematoxylin Eosin*, Pewarna Alami, *Rattus Norvegicus*

*Penulis korespondensi:

dr.H.Arif yahya M.Kes

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

e-mail : arifyahya@unisma.ac.id

Staining of Wistar Rat Liver Tissue (*Rattus Norvegicus L*) Based on Natural Staining of Mangosteen Peel Extract (*Garciana Mangostana L.*)

Yudistira Firman Alamsyah, Denis Merry Mirza, Arif Yahya*

Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: The high interest in consuming mangosteen (*Graciana mangostana*) in society results in a significant amount of waste from mangosteen peels. Researchers came up with the idea to utilize mangosteen peel waste as an alternative for HE (Hematoxylin and Eosin) staining.

Methods: Mangosteen peel extraction in this study used the maceration method. The extraction results were used for staining tests on the liver organs of Wistar rats replacing eosin. The staining results were observed using a trinocular microscope with a magnification of 400x and descriptive observations were made. 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. as well as calculating the level of precision accuracy in the staining results. The number of visible hepatocyte cells was calculated using the ImageJ application and the level of precision accuracy was assessed. Statistical tests used Kruskal wallis, $p < 0.05$.

Results: Mangosteen peel extract staining with a concentration of 25% has a total value of descriptive observations (clarity and contrast) (1.1), a concentration of 50% (1.1, 1.36), and a concentration of 75% (1.34, 1). The results of the accuracy values at concentrations of 25%, 50% and 75% were obtained at (60%, 46% and 73%), the results of the precision values at concentrations of 25%, 50% and 75% were obtained at (25%, 20% and 27%).

Conclusion Mangosteen rind extract can color *Rattus norvegicus L* liver organ preparations, but with lower quality compared to hematoxylin eosin stain. So it is not effective as an alternative to eosin stain.

Keywords: *Graciana mangostana*, *Hematoxylin Eosin*, Natural stain, *Rattus norvegicus*

Correspondence: dr.H.Arif yahya M.Kes

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

e-mail : arifyahya@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Tingginya minat dari masyarakat untuk konsumsi buah manggis (*Graciana mangostana*) menandakan banyaknya limbah dari buah manggis, terutama dari kulit dari buah manggis tersebut¹. Berdasarkan data di atas peneliti merasa pemanfaatan limbah dari kulit manggis secara maksimal dapat mengurangi limbah yang ada.

Langkah preventif yang dapat ditempuh untuk mereduksi limbah kulit manggis dengan memanfaatkan sebagai bahan pewarna alami menggantikan pewarna sintetis yaitu HE sekaligus menga³⁴. Dengan memanfaatkan kandungan antosianin yang berada Kulit buah manggis tersebut⁵.

Antosianin termasuk senyawa flavonoid yaitu zat yang dapat berperan dalam pemberian warna pada tanaman, mulai dari warna ungu, biru, merah, dan kuning⁶. Kulit manggis mengandung Antosianin sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengganti pewarna HE karena sifat antosianin yang bersifat asam, sehingga diketahui dapat mewarnai sel⁷.

METODE PENELITIAN

Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis post control group design. Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi sediaan histologi organ hepar tikus dari kelompok perlakuan ekstrak *Garcinia mangostana* pada variasi konsentrasi 25%, 50%, dan 75%, dengan kelompok pembanding menggunakan pewarnaan *hematoksilin-eosin*. Bahan baku serbuk kulit manggis dipasok oleh UPT Laboratorium Herbal Materia Medica. Ekstrak kulit buah manggis didapatkan dari Fakultas Laboratorium Biomedik Kedokteran Muhammadiyah Malang.

Prosedur Pembuatan Preparat Histologi Hepar dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

O Blok jaringan hepar dalam media parafin disayat menggunakan mikrotom rotari dengan tebal irisan konstan sebesar 4 μ m, selanjutnya blok parafin dideparafinisasi dengan menggunakan *xylol* selama $\pm$ 3 (tiga) menit. Setelah itu dilakukan proses dehidrasi dengan memasukkan preparat dalam larutan alkohol 70%, alkohol 80%, dan alkohol 100% secara bertingkat selama 2 (dua) menit tujuannya untuk mengisi air pada jaringan yang kosong. Lalu di alirkan dengan air mengalir selama tiga menit. Tahap pewarnaan I

menggunakan menggunakan *hematoxylin* untuk memberi warna sitoplasma selama 7 (tujuh) menit. Tahap deparafinisasi menggunakan HCL 0,6% bertujuan untuk menghilangkan warna biru pada sitoplasma dan inti sel¹². Tahap *blueing* menggunakan litium karbonat 0,5% agar warna biru terlihat jelas. Tahap pewarnaan II bertujuan untuk memberi warna pada sitoplasma dengan menggunakan eosin. Kemudian dilakukan proses dehidrasi menggunakan alkohol 80%, alkohol 90%, dan alkohol absolut untuk menghilangkan air dari jaringan. Setelah itu tahap *mounting* yang bertujuan untuk mengawetkan jaringan yang telah diwarnai menggunakan Entellan. Selanjutnya sesudah diberi Entellan, ditutup dengan *cover glass* agar tidak terdapat gelembung pada preparat.

Pembuatan Preparat Histologi Hepar dengan Pewarnaan

Organ hepar difiksasi menggunakan larutan BNF 10% setelah sebelumnya direndam dalam formalin 10%, kemudian dicuci dengan air mengalir. Jaringan hepar dipotong dengan ukuran sekitar $\pm$ 3mm dan dimasukkan ke dalam embedding cassette. Tahap dehidrasi jaringan dilakukan menggunakan larutan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 96%, hingga alkohol absolut masing-masing selama $\pm$ 1 jam. Sisa alkohol dibersihkan menggunakan larutan *clearing xilol*, dilanjutkan infiltrasi parafin cair ke dalam jaringan pada suhu oven 56°C, lalu diletakkan ke dalam kotak kertas dan disimpan dalam lemari es bersuhu 4°C hingga membeku. Blok parafin dipotong menggunakan mikrotom putar dengan ketebalan 3-6 μ m, dan hasil irisan ditempelkan pada kaca objek. Preparat tersebut kemudian dipanaskan hingga jaringan mengembang sempurna dan dimasukkan ke dalam water bath selama beberapa detik sampai mengembang secara optimal.

Validasi Hitung Dengan Menggunakan Image J

Pengukuran kuantitatif preparat histopatologi hepar *Rattus norvegicus* L. dilaksanakan via software ImageJ version 1.53. Pengamatan mikroskopis di dokumentasikan pada lima lapangan pandang preparat demi memperoleh parameter akurasi dan presisi. Perumusan perhitungan akurasi dijabarkan melalui persamaan berikut

$$\% \text{error rate} = \frac{\text{approx} - \text{exact}}{\text{exact}} \times 100$$

Keterangan: Approx = Pewarna alami

Exact = Hematoxylin eosin

Pengukuran parameter presisi menggunakan tiga level konsentrasi yang merujuk pada perlakuan dalam uji validitas akurasi

RSD (Relative Standard Deviation) :

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

Keterangan: SD = Standar deviasi
 $\bar{X}$ = Kadar rerata

Penghitungan Tingkat Akurasi dan Presisi pada Pewarnaan Preparat Jaringan Hepar Tikus

Preparat hepar yang telah dilakukan pewarnaan dengan ekstrak Kulit buah manggis 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 masih dapat di bedakan.	1
	Apabila sel hepatosit tidak dapat dengan jelas dan tidak bisa dibedakan dengan sel hepar yang lain.	0
Kekontrasan	Apabila inti sel dapat jelas dibedakan dengan sitoplasma.	2
	Apabila inti sel menyerupai sitoplasma tapi masih dapat dibedakan	1
	Apabila inti sel hepatosit tidak dapat dibedakan dengan sitoplasma	0

ANALISA DATA

Data kuantitatif intensitas pewarnaan preparat diuji menggunakan SPSS version 27.0. Mengingat asumsi kenormalan data tidak terpenuhi, prosedur statistik dialihkan pada uji non-parametrik Kruskal-Wallis. Taraf signifikansi penarikan kesimpulan ditetapkan pada batas nilai $p < 0,05$

HASIL PENELITIAN

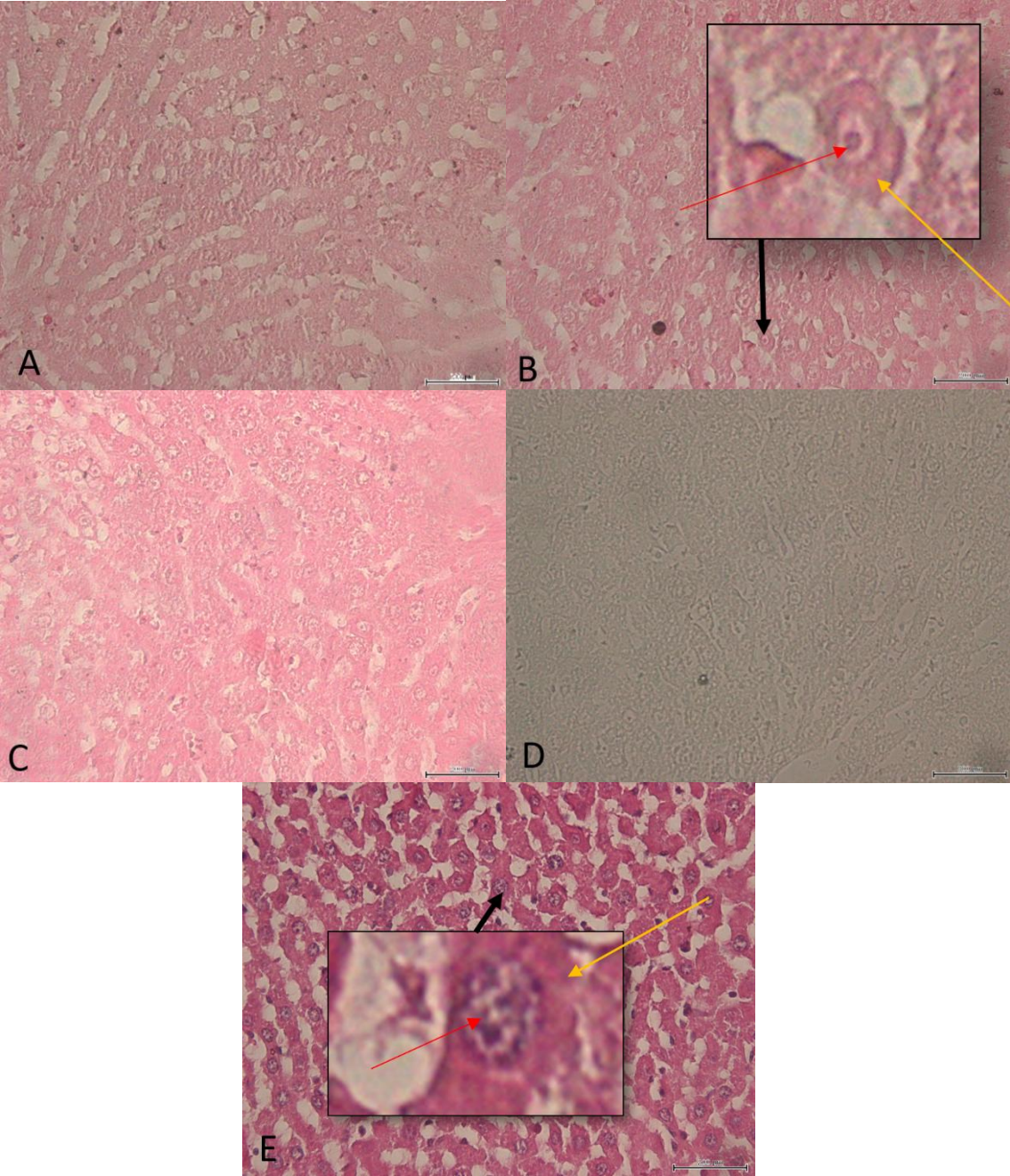
Perhitungan Tingkat Akurasi dan Presisi Pewarnaan ekstrak kulit buah manggis pada Hepar Tikus Wistar

Perolehan dokumentasi yang dihasilkan melalui mikroskop trinokuler kemudian dinilai intensitas warnanya dengan perangkat lunak ImageJ. Hasil pengukuran tersebut selanjutnya dikalkulasikan menggunakan persamaan akurasi dan presisi.

Kriteria akurasi dianggap ideal apabila pada kisaran 98-102%, sementara parameter presisi direpresentasikan melalui nilai RSD dengan ambang batas $< 2\%$. Berdasarkan hasil pengujian, parameter intensitas tidak menunjukkan tingkat akurasi yang memadai di setiap konsentrasi, tetapi memperlihatkan nilai presisi yang baik pada tingkat konsentrasi sebagaimana tercantum dalam tabel (2).

Tabel 2 Hasil Perhitungan Nilai Akurasi dan Presisi Intensitas Pewarnaan Preparat Histologi Organ Hepar Rattus Norvegicus L

Pewarnaan	Mean	SD	RSD	Akurasi
HE	336,8	73,6	22%	-
GM (25%)	315	77	25%	60%
GM (50%)	262	52	20%	46%
GM (75%)	303	82	27%	73%
A.sitrat	300	88	56%	14%



Gambar 1. Hasil Pewarnaan Preparat Histologi Hepar R.norvegicusL

Keterangan: Hasil pewarnaan preparat histologi hepar R.norvegicusL menggunakan ekstrak asam sitrat 70% *G.Mangostana* A 25%, B 50%, C 75%, D Asam Sitrat dan E HE. Panah kuning (gambaran sel hepatosit yang terdiri dari intisel dan sitoplasma), lingkaran merah (gambaran intisel).

Tabel 3 Pengamatan Deskriptif Kejelasan Pada Hepar Tikus Wistar

Pewarnaan	Kejelasan			Mean
	P1	P2	P3	
HE	1,92	1,96	1,92	1,93
<i>G.Mangostana</i> (25%)	1	1	0,96	1
<i>G.Mangostana</i> (50%)	1,16	1,08	1,08	1,1
<i>G.Mangostana</i> (75%)	1,04	1,04	1	1
Asam sitrat	0	0	0	0

Keterangan : Nilai 0-1 menandakan kualitas buruk. Sedangkan nilai 2 menandakan baik.

Tabel 4 Pengamatan Deskriptif Kekontrasan ada Hepar Tikus Wistar

Pewarnaan	Kekontrasan			Mean
	P1	P2	P3	
HE	1,88	1,92	2	1,93
<i>G.Mangostana</i> (25%)	0,92	0,92	1	1
<i>G.Mangostana</i> (50%)	1,36	1,28	1,44	1,36
<i>G.Mangostana</i> (75%)	1,5	1,16	1,36	1,34
Asam sitrat	0	0	0	0

PEMBAHASAN

Hasil Pengamatan Sediaan Histologis Hati *Rattus norvegicus* L. Pasca Pemberian Ekstrak Kulit Buah Manggis

Pada kekontrasan, asam sitrat memiliki perberbeda signifikan pada semua konsentrasinya baik 25%, 50%, 75%, dan HE. Pada HE berbeda signifikan dengan asam sitrat, konsentrasi 25% dan 75%, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 50%. Pada konsentrasi 25% berbeda signifikan dengan asam sitrat dan HE, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 50% dan 75%. Pada konsentrasi 25% berbeda signifikan dengan asam sitrat, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 50%, 75%. Pada penelitian ini terdapat beberapa perbedaan antara kejelasan dan kekontrasan pada tiap konsentrasi ekstrak asam sitrat kulit manggis. Pada konsentrasi 50% memiliki nilai kekontrasan yang paling optimum kemungkinan akibat terjadinya afinitas ikatan ionik bermuatan pada zat warna dengan struktur seluler yang bermuatan berbeda, sehingga mampu mewarna dengan sempurna sitoplasma pada sel.

Antosianin yang terdapat pada kulit manggis bermuatan negatif dapat mengikat kuat inti sel namun karena perbedaan komponen penyusun dapat menyebabkan reaksi antar muatan sehingga sitoplasma yang bermuatan positif ikut terwarnai.

Pada konsentrasi 25% dan 75% bisa dibawah dari konsentrasi 50% kemungkinan karena pada konsentrasi ini semakin tinggi konsentrasi maka makin tinggi juga ikatan negatifnya, sehingga mewarnai menjadi merah. Lalu pada HE sebagai pembanding 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 asam sitrat kulit manggis masih belum dapat menggantikan HE sebagai pewarna histologi.

HE sebagai pembanding 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 kulit buah manggis masih belum dapat menggantikan HE sebagai pewarna histologi.

Tingkat Akurasi dan Presisi Pewarnaan Ekstrak Kulit Buah Manggis pada Hepar Tikus Wistar

Pada riset ini, hasil perhitungan yang didapatkan pada hepar tikus wistar menunjukkan parameter akurasi dan presisi yang tidak memenuhi kriteria validitas pada seluruh tingkat konsentrasi. Hasil perhitungan pada HE juga memiliki hasil yang tidak dapat diterima. Pada penelitian ini ditemukan bias penelitian sehingga menyebabkan nilai akurasi dan presisi tidak dapat diterima. perbedaan jumlah sel hepatosit yang sangat berbeda tiap lapang pandang pada perlakuan juga menjadi salah satu penyebab berbedanya nilai akurasi dan presisi.

Hematoksilin Eosin (HE) pada penelitian ini digunakan sebagai pembanding dikarenakan HE adalah pewarna yang umum digunakan dalam pewarnaan histologi. Hematoksin pada pewarnaan bekerja sebagai pewarna basa yang mana zat ini dapat mewarnai unsur asam, Sebaliknya, pewarna eosin yang bersifat asam akan berikatan dan mewarnai komponen seluler yang bersifat basa. Sehingga dapat mewarnai sel pada organ hepar wistar. Asam sitrat merupakan senyawa polar pada penelitian ini digunakan sebagai pelarut untuk ekstrak kulit buah manggis dan sebagai kontrol negatif. Asam sitrat tidak mempunyai pigmen berwarna sehingga pada penelitian ini tidak dapat mewarnai sel pada organ hepar tikus wistar.

KESIMPULAN

Berdasarkan temuan riset dan pengujian yang telah dibahas sebelumnya, dapat disimpulkan bahwa:

1. Pewarnaan ekstrak kulit buah manggis, bisa di gunakan untuk pewarnaan alternatif, namun belum bisa menggantikan Hematoksin Eosin sebagai pewarnaan standart, karena memiliki nilai akurasi dan presisi di bawah standar.

SARAN

Merujuk pada interpretasi hasil dan pembahasan, disampaikan beberapa catatan rekomendasi untuk studi lanjutan sebagai berikut :

Melakukan penelitian lebih lanjut untuk identifikasi senyawa fitokimia pada ekstrak kulit buah manggis

1. Melakukan eksplorasi lebih lanjut untuk identifikasi senyawa fitokimia pada ekstrak kulit buah manggis

2. Pemilihan metode ekstraksi yang terbaik.
3. Mengevaluasi kadar zat aktif antosianin pada simplisia yang dipersiapkan untuk pengujian.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ungkapan terima kasih ditujukan kepada tim peneliti atas kontribusinya, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang selaku penyandang dana riset, serta Laboratorium Universitas Muhammadiyah Malang atas penyediaan fasilitas pembuatan preparat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Humaira L, Srikandi. Pemanfaatan Potensi Limbah Kulit Manggis Dalam Pembuatan Pembersih Lantai Berbasis Zero Waste.
2. Wahyudi E At Al. Potensi Hambat Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) Terhadap Pertumbuhan *Enterococcus Faecalis*. *Med Kartika J Kedokt Dan Kesehat* 2019.
3. Andriani A. Efek Ekstrak Tanaman Kelor (*Moringa Oleifera*) Terhadap Gambaran Perbaikan Histopatologi Dan Fungsi Hepar Tikus Diabetes Melitus
4. Biran Ar, Chairani S, Dewi Srp. Efek Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) Terhadap Pembentukan Pembuluh Darah Baru Pada Luka Gingiva Tikus Wistar. *J 'Aisyiyah Med*. 2020;3(1).
5. Melkianus. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) Terhadap Bakteri *Klebsiella Pneumonlae*. *Pharmacon*. 2019;8(1):88.
6. Yani. Pemanfaatan Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) Sebagai Pewarna Alami Jaringan Daun Dan Batang Krokot (*Portulaca Oleracea* L.). *Bioeksakta J Ilm Biol Unsoed*. 2020;2(2):288.
7. Putri Rd, Sofyanita En. Perbedaan Hasil Pewarnaan Hematoxylin Eosin (He) Pada Histologi Kolon Mencit (*Mus Musculus*) Berdasarkan Ketebalan Pemotongan Mikrotom 3, 6, Dan 9 Mm. *J Labora Med*. 2023;7:31–8.
8. Saputra, B. E., Bintari, Y. R., & Risandiansyah, R. (N.D.). *Uji Validasi Akurasi Dan Presisi Metode Pewarnaan Sederhana Staphylococcus Aureus Dan Escherichia Coli Menggunakan Ekstrak Metanolik Hibiscus Sabdariffa Linn*. 1–13.
9. Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D., Supratman, U., Teknologi, J., Pertanian, H., Pertanian, T., Jember, U., Tegalboto, K., Kalimantan, J., Ilmu, D., Pangan, T., & Pertanian Bogor, I. (2013). Identifikasi Antosianin Buah Duwet (*Syzygium Cumini*) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Hasil Penelitian J. Teknol. Dan Industri Pangan*, 4(2), 3–10.
10. Setiawan, B. (2016). Optimalisasi Metode Automatic Slide Stainer Untuk Pewarnaan Jaringan Menggunakan *Haematoksilin-Eosin*. *Praktikum Kimia Analitik Penetapan Kadar*, 1.
11. Soesilawati, P. (2019). Histologi Kedokteran Dasar. In *Airlangga University Press* (Issue Oktober).
12. Srihari, E., & Lingganingrum, F. S. (2015). Ekstrak Kulit Manggis Bubuk. *Jurnal Teknik Kimia*, 10(1), 1–7.
13. Tirtasari, N. L., & Prasetya, T. (2020). Pengaruh Rasio Berat Bunga Telang (*Clitoria Ternatea*. L) Dan Volume Pelarut Asam Sitrat Terhadap Pewarnaan Preparat Jaringan Tumbuhan. *Indonesian Journal Of Chemical Science*, 9(3), 201–204.
14. Uray, L. (2021). Penerapan Kurva Kalibrasi, Bagan Kendali Akurasi Dan Presisi Sebagai Pengendalian Mutu Internal Pada Pengujian Cod Dalam Air Limbah. *Application Of Calibration Curve, Accuracy And Precision Chart As Internal Quality Control At Cod Testing In Wastewater*, 1(1), 52–56. <https://doi.org/10.53862/Jupeten.V1i1.011>