

PEMANFAATAN EKSTRAK BUNGA ASOKA SEBAGAI ALTERNATIF PENGANTI EOSIN PADA PEWARNAAN HEMATOXYLIN EOSIN

Utilization of Ashoka Flower Extract as an Alternative to Eosin in Hematoxylin Eosin Staining

Nur Haliza¹, Indah Sari^{1*}, Dewi Hartati¹, Nyiayu Fauziah Kurniawati²

¹Program Studi D IV Teknologi Laboratorium Medis, Institut Ilmu Kesehatan dan Teknologi Muhammadiyah Palembang, Palembang, Indonesia

²Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia

*Email: iindahsari1917@gmail.com

ABSTRACT

*Preparation of tissue preparations using hematoxylin eosin staining. The price of reagents used is relatively expensive so it has the potential to use local raw materials to replace eosin staining. Red Ashoka flowers (*Ixora coccinea*) contain red anthocyanin glycosides that can be used as an alternative to eosin. The research aimed to utilize environmentally friendly Ashoka flower extract as a substitute for eosin in hematoxylin eosin staining. The research design used is true experiment design. Sampling techniques in research using nonprobability in the form of purposive sampling. Samples of human breast tissue (mammary) be jumlah 32 tissue preparations to see the results of the examination using Ashoka flower alternatives as many as 16 preparations and eosin as a control as many as 16 preparations. The examination data will be processed by descriptive analysis based on the results of the assessment score of tissue preparation. In hematoxylin eosin staining control 100% showed very good preparation quality with a score of (4), producing blue in the cell nucleus is very clear, pink is very clear, and can be diagnosed, while for the ash flower extract staining 93.8% showed less good preparation quality with scores of (2) and (1), producing blue in the cell nucleus, less pink but still can be diagnosed. Chi-Square test results obtained p-value $0.000 < 0.05$ shows that there are significant differences from the two staining processes using Ashoka flower extract with eosin.*

Keywords: ashoka flower extract, eosin extract, hematoxylin eosin extract, benign tumor breast

ABSTRAK

Pembuatan preparat jaringan menggunakan pewarnaan hematoksin eosin. Harga reagensia yang digunakan relatif mahal sehingga berpotensi untuk pemanfaatan bahan baku lokal dalam menggantikan pewarnaan eosin. Bunga Asoka merah (*Ixora coccinea*) mengandung glikosida antosianin berwarna merah yang dapat digunakan sebagai alternatif pengganti eosin. Tujuan penelitian untuk memanfaatkan ekstrak bunga asoka yang ramah lingkungan sebagai pengganti eosin dalam pewarnaan hematoksin eosin. Desain penelitian yang digunakan adalah *true eksperimen design*. Teknik sampling pada penelitian menggunakan Nonprobability dalam bentuk *Purposive sampling*. Sampel berupa jaringan payudara (*mammary*) manusia berjumlah 32 preparat jaringan untuk melihat hasil pemeriksaan menggunakan alternatif bunga asoka sebanyak 16 preparat dan eosin sebagai kontrol sebanyak 16 preparat. Data hasil pemeriksaan akan diolah secara analisis deskriptif berdasarkan hasil skor penilaian preparat sediaan jaringan. Pada kontrol pewarnaan hematoksin eosin 100% menunjukkan kualitas sediaan yang sangat baik dengan skor adalah (4), menghasilkan warna biru pada inti sel sangat jelas, warna merah muda sangat jelas, dan dapat didiagnosis, sedangkan untuk pewarnaan ekstrak bunga asoka 93,8%

menunjukkan kualitas sediaan kurang baik dengan skor adalah (2) dan (1), menghasilkan biru pada inti sel, kurang warna merah muda tetapi masih dapat didiagnosis. Hasil uji Chi-Square diperoleh $p\text{-value } 0.000 < 0.05$ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan dari kedua proses pewarnaan menggunakan ekstrak bunga asoka dengan eosin.

Kata kunci: ekstrak bunga asoka, eosin, pewarnaan hematoxylin eosin, tumor jinak payudara

PENDAHULUAN

Patologi anatomi adalah spesialis medis terkait diagnosis penyakit berdasarkan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis terhadap sel, jaringan, dan organ.¹ Laboratorium patologi anatomi adalah laboratorium yang memeriksa spesimen jaringan dan cairan tubuh pasien untuk diagnosis klinis.²

Histoteknik adalah suatu metode untuk membuat preparat histologi melalui suatu proses sehingga menjadi sajian yang siap untuk dianalisis.³ Sampel dapat berupa jaringan manusia atau jaringan hewan seperti mencit, tikus ataupun marmut menggunakan organnya. Untuk jaringan manusia juga bisa digunakan seperti payudara, ginjal.⁴

Pewarna Histologi adalah sebuah cara pemberian warna pada bagian organel sel agar mudah diamati dengan mikroskop.⁵ Salah satu tahap dalam proses pembuatan preparat histologi adalah *staining* atau proses pewarnaan pada preparat jaringan, dalam diagnosa medis dan penelitian menggunakan pewarnaan hematoksilin eosin.⁶

Eosin digunakan pada pH 5 untuk mendapatkan hasil yang optimal, cara menurunkan pH yaitu eosin ditambahkan asam asetat sebanyak lima tetes, pH akan turun menjadi pH 4.⁷ Harga reagensia eosin yang mahal membuka jalan untuk menggunakan bahan baku lokal sebagai alternatif untuk menggantikan pewarnaan eosin.⁸

Bunga Asoka merah (*Ixora coccinea*) ini mengandung glikosida antosianin yang berwarna merah, yang dimana diduga jenis pelargonidin⁹. Zat warna antosianin merupakan turunan struktur aromatik tunggal, yaitu sianidin, dan semuanya terbentuk dari zat warna

sianidin dengan penambahan atau pengurangan gugus hidroksil, metilasi dan glikolisasi.⁸

Penelitian sebelumnya tentang potensi bunga asoka sebagai pewarna alami makanan dan minuman yang ditinjau dari stabilitas pH selama masa penyimpanan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan ekstrak bunga asoka terhadap pengaruh pH selama masa penyimpanan. Pada penelitian ini menggunakan waktu 10 hari, pada penelitian ini juga menggunakan variasi pH yaitu pH 2,3,4,5,6. Hasil penelitian ini menunjukkan zat warna ekstrak bunga asoka stabil pada pH 2 setelah masa penyimpanan 10 hari dengan presentasi degradasi 36,21%.¹⁰

Penelitian sebelumnya juga melakukan penggunaan air perasan bunga asoka merah (*Ixora coccinea*) pengganti eosin pada pewarnaan STH lebih jelas kelihatan dibanding dengan zat warna Eosin. Hasil ekstraksi zat warna alami yang paling optimal diperoleh dengan menggunakan etanol sebagai pelarut organik polar untuk mengekstraksi antosianin dari bunga ixora, yang menunjukkan bahwa zat warna tersebut stabil pada suhu yang relatif tinggi dan dalam kondisi asam, terutama pada pH 4.¹¹

Berdasarkan latar belakang diatas maka penulis tertarik untuk memanfaatkan ekstrak bunga asoka yang ramah lingkungan sebagai pengganti eosin dalam pewarnaan hematoksylin eosin.

METODE

Penelitian ini dilakukan setelah mendapatkan surat layak etik dengan nomor: 000086/ KEP IKesT Muhammadiyah Palembang/ 2024.

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah metode *Experimental*.¹² Variabel bebas terdiri atas Pewarnaan HE menggunakan ekstrak bunga asoka dan eosin, sedangkan variabel terikat yaitu kualitas spesimen. Teknik sampling pada penelitian menggunakan Nonprobability dalam bentuk *Purposive sampling* yaitu teknik penentuan sampel dengan pertimbangan tertentu.

Populasi penelitian menggunakan Blok Paraffin yang didiagnosis Tumor Jinak Payudara dari Laboratorium Patologi Anatomi Barokah Palembang berjumlah 32 preparat jaringan untuk melihat hasil pemeriksaan menggunakan alternatif bunga asoka sebanyak 16 preparat dan eosin sebagai kontrol sebanyak 16 preparat. Penelitian dilakukan pada Bulan Februari 2024 di Laboratorium Patologi Anatomi Barokah Palembang.

Alat dan bahan yang digunakan adalah bunga asoka, timbangan analitik, mortar, etanol 96%, kertas saring, waterbath, pewarnaan hematoksin eosin. Ekstrak bunga asoka yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga asoka yang berasal dari Lr Sinar Ladang 2, Kecamatan Seberang Ulu 2, Kelurahan 16 ulu Kota Palembang.

Prosedur kerja pembuatan ekstrak bunga asoka yaitu bunga segar dicuci dengan air mengalir, bunga ditimbang sebanyak 500 gram, Bunga dihaluskan menggunakan mortar, kemudian bunga dimasukkan kedalam wadah kedap cahaya, dan kemudian etanol 96% ditambahkan sebanyak 500ml pada wadah kedap cahaya tersebut.⁹

Prosedur kerja maserasi bunga asoka yaitu ekstrak bunga asoka ditutup rapat, ekstrak bunga disimpan selama 1 hari dalam waktu 6 jam sekali di kocok pada suhu ruang, ekstrak bunga disaring menggunakan kertas saring, selanjutnya menghilangkan sisa etanol dengan cara dipanaskan menggunakan waterbath sampai kental, menambahkan 10 ml etanol

96%, pH akhir ekstrak adalah 4, selanjutnya masukkan kedalam botol dan reagensia siap untuk digunakan.⁹

Prosedur kerja pewarnaan hematoksin eosin yaitu jaringan dicelupkan ke dalam xylol selama 5 menit sebanyak 3x pengulangan, kemudian jaringan ditiriskan dan dicelupkan ke etanol selama 3 menit lakukan sebanyak 2x pengulangan, dicelupkan ke alkohol 96% selama 3 menit sebanyak 2x pengulangan, dicuci menggunakan air mengalir 3 menit, dicelupkan ke hematoksin selama 5 - 7 menit, dicuci menggunakan air mengalir selama 3 menit, celupkan ke hematoksin selama 5 – 7 menit, dicuci menggunakan air mengalir selama 5 menit, dimasukkan ke alkohol 70% sebanyak 7 celup, dimasukkan ke alkohol 80% sebanyak 7 celup, dimasukkan ke ekstrak bunga asoka sebanyak 1 – 2 celup, dimasukkan alkohol 96% sebanyak 7 celup dengan 2x pengulangan, dimasukkan etanol sebanyak 7 celup, dan dimasukkan xylol sebanyak 7 celup.⁹

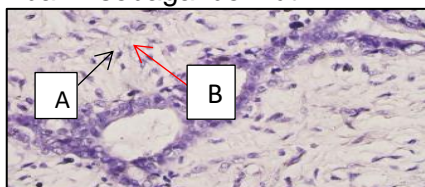
Data di analisis dengan uji *Chi-Square*. Instrumen pemeriksaan menggunakan mikroskop berdasarkan kriteria skor 1 – 5 dengan deskripsi sebagai berikut: Skor 1: Tidak Baik; Skor 2: Kurang Baik; Skor 3: Cukup Baik; Skor 4: Baik; Skor 5: Sangat Baik

Data yang telah diperoleh dilakukan dokumentasi dan disajikan dalam bentuk foto dengan melihat perbandingan antara pewarnaan hematoxylin eosin menggunakan ekstrak bunga asoka dan eosin secara mikroskopis oleh tiga orang yang terdiri atas satu orang dokter spesialis patologi anatomi, satu orang laboran, dan satu orang peneliti sendiri sebagai verifikator mendapatkan hasil skor 4 menggunakan eosin, sedangkan skor 2 dan 1 menggunakan alternatif ekstrak bunga asoka.

HASIL

Hasil kualitas jaringan pada pewarnaan menggunakan ekstrak bunga asoka mendapatkan interpretasi

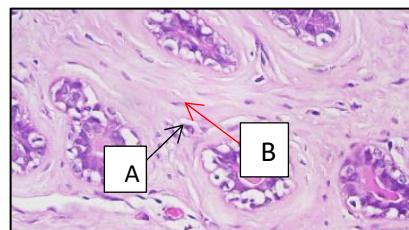
hasil yang dilakukan pengamatan oleh dokter ahli patologi anatomi pada gambar 1 sebagai berikut:



Gambar 1. Hasil Pengamatan Pewarnaan Menggunakan Ekstrak Bunga Asoka Perbesaran 400x

Berdasarkan gambar 1 didapatkan hasil pada kode (A) tampak gambaran arsitektur payudara tidak normal dengan sel-sel tumor tidak tersusun, warna biru keunguan pada inti sel terlihat sangat jelas, kode (B) warna merah eosin pada sitoplasma terlihat kurang jelas dan dapat membedakan jaringan ikat, serta warna pada preparat kurang seragam tetapi masih dapat didiagnosis.

Hasil kualitas jaringan pada pewarnaan hematoxilin eosin mendapatkan interpretasi hasil yang dilakukan pengamatan oleh dokter ahli patologi anatomi pada gambar 2 sebagai berikut:



Gambar 2. Hasil Pengamatan Pewarnaan Menggunakan Eosin Perbesaran 400x

Berdasarkan gambar 2 didapatkan hasil pada kode (A) tampak gambaran arsitektur payudara tidak normal dengan sel-sel tumor tidak tersusun, warna biru keunguan pada inti sel terlihat sangat jelas, kode (B) warna merah eosin pada sitoplasma terlihat sangat jelas dan dapat membedakan jaringan ikat, serta warna pada preparat seragam masih dapat didiagnosis.

Hasil yang sudah diteliti jumlah rata-rata hasil mikroskopis sediaan jaringan tumor jinak payudara yang diwarnai menggunakan ekstrak bunga asoka dan eosin pada pewarnaan hematoxilin eosin sebagai berikut.

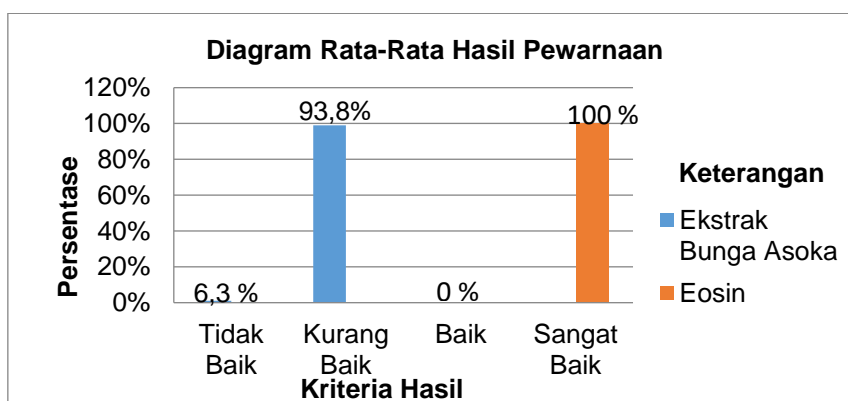
Tabel 1. Hasil Tabulasi Proses Pewarnaan

	Proses Pewarnaan		
	Tidak Baik	Kurang Baik	Sangat Baik
Ekstrak Bunga Asoka	1	15	0
Eosin	0	0	16
Total	1	15	16

Nilai $P = 0,000 < 0.05$

Berdasarkan Tabel 1 tabulasi proses pewarnaan mendapatkan hasil ekstrak bunga asoka yang kurang baik

sebanyak 15 sampel dan tidak baik sebanyak 1 sampel, sedangkan eosin sangat baik sebanyak 16 sampel.



Gambar 3. Diagram Rata-Rata Hasil Pemanfaatan Ekstrak Bunga Asoka Sebagai Pengganti Eosin pada Pewarnaan Hematoxylin Eosin

PEMBAHASAN

Penelitian menggunakan sampel mammae sebanyak 16 preparat diwarnai HE dengan menggunakan ekstrak bunga asoka dan 16 preparat diwarnai HE dengan menggunakan eosin. Sediaan yang telah diwarnai diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan dilakukan penilaian terhadap kualitas pewarnaan secara mikroskopis. Hasil dari penelitian pada pemeriksaan mikroskopis sediaan jaringan payudara pada proses pewarnaan menggunakan eosin yaitu 16 sampel preparat jaringan mammae mendapatkan hasil yaitu 100% dengan kriteria hasil mikroskopis sangat baik (skor 4). Hasil penelitian menggunakan ekstrak bunga asoka yaitu 16 sampel preparat jaringan mammae mendapatkan hasil yaitu 93,8 % dengan kriteria hasil mikroskopis kurang baik (skor 2) dan 1 sampel didapatkan hasil yaitu 6,3% sediaan jaringan dengan kriteria hasil mikroskopis kualitas tidak baik (skor 1).

Hasil penelitian terdapat perbedaan pada pemeriksaan jaringan tumor jinak payudara yang di warnai menggunakan eosin dan ekstrak bunga asoka pada pewarnaan hematoxylin eosin. Hal tersebut terjadi karena memiliki hasil perwarnaan yang sama, yaitu dengan memberikan gambaran tentang bentuk, susunan sel, inti sel, dan sitoplasma, serta susunan serat jaringan ikat yang sesuai dengan gambaran jaringan.

Ekstrak bunga asoka terdapat senyawa fenol dan flavonoid. Menurut hasil penelitian Ramadhan, dkk. (2023) bahwa ekstrak etanol bunga asoka (*Ixora Coccinea*) mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, triterpenoid dan saponin serta memiliki potensi sebagai antioksidan pada konsentrasi 1 mg/mL dengan nilai persen penghambatan sebesar 88,10%.^{13,14}

Pada ekstrak bunga asoka terdapat senyawa fenol dan flavonoid. Senyawa ini berperan sebagai

antioksidan dikarenakan memiliki gugus hidroksil (-OH) pada struktur senyawa fenolik dan flavonoid dapat menyumbangkan atom hidrogennya sehingga senyawa radikal bebas menjadi stabil, senyawa ini dapat berpotensi sebagai antioksidan alami.¹⁵

Menurut hasil penelitian Lestario, dkk. dan Jenianti, dkk. (2019) bahwa bunga asoka pengganti pewarnaan alternatif karena mempunyai kandungan antosianin. Antosianin merupakan pigmen yang disebut flavonoid yang pada biasanya larut dalam air. Konsentrasi pigmen sangat berfungsi dalam memastikan warna, pada konsentrasi kecil antosianin berwarna biru, pada konsentrasi normal antosianin berwarna ungu serta pada konsentrasi tinggi antosianin berwarna merah.^{16 10}

Pemilihan pelarut etanol 96% didasarkan pada tingkat keamanan dan kemudahan saat diuapkan serta sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semipolar, dan nonpolar serta dapat menarik senyawa flavonoid secara optimum.¹⁷

Pada pengamatan mikroskopis sediaan jaringan tumor jinak payudara yang pewarnaan menggunakan ekstrak bunga asoka didapatkan hasil 98,3% baik, pada inti sel terlihat jelas, warna merah pada sitoplasma kurang jelas tetapi dapat membedakan jaringan ikat dan dapat didiagnosis sehingga dapat digunakan sebagai alternatif.

Faktor yang memengaruhi kestabilan antosianin pada penelitian adalah metode pengambilan antosianin, suhu pada saat penelitian, jenis pelarut yang digunakan serta pH antosianin pada saat pewarnaan membuat kurang terserapnya zat warna antosianin, sehingga memengaruhi kualitas sediaan yang diujikan.¹¹

SIMPULAN

Hasil pewarnaan hematoxylin eosin menggunakan alternatif ekstrak bunga asoka mendapatkan hasil 93,8% yang kurang baik (skor 2) tetapi masih dapat

didiagnosis dan terdapat hasil 6,3% yang tidak baik (skor 1). Hasil pewarnaan hematoxylin eosin menggunakan eosin mendapatkan hasil 100% sangat baik (skor 4) sebagai pewarna gold standard. Adanya perbedaan signifikan hasil kualitas preparat pewarnaan hematoxylin eosin menggunakan alternatif ekstrak bunga asoka dengan eosin.

Bagi peneliti selanjutnya hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan perbandingan dan referensi untuk penelitian dalam melakukan pengujian terhadap faktor-faktor yang memengaruhi kualitas pigmen antosianin agar bisa mewarnai sediaan histologi menggunakan alat vakum rotary evaporatory, dan melakukan maserasi dengan waktu yang lebih lama.

DAFTAR RUJUKAN

1. Yubarda E, Yanti MR. Sistem Informasi Hasil Pemeriksaan Laboratorium Patologi Anatomi Pada Rs. Permata Hati. *JSR Jar Sist Inf Robot.* 2019;3(1):177-183. doi:10.58486/jsr.v3i1.44
2. Annisa Rahmawati, Suhartini DSP. Jurnal sains dan teknologi laboratorium medik. *Identifikasi Candida sp Dalam Urin Ibu Hamil Di Klin Ramlah Parjib 1 Samarinda.* 2022;8(2):1-5.
3. Faraditha YE. *Literature Review: Perbandingan Kualitas Preparat.* Universitas Aisyiyah Yogyakarta; 2022. https://digilib.unisayogya.ac.id/6765/1/Naskah_Publikasi_1811304119_D4_TLM_Yourike_Eka_Faraditha_-_Yourike_Eka_F.pdf
4. Mayangsari MA, Nuroini F, Ariyadi T. Perbedaan Kualitas Preparat Ginjal Marmut pada Proses Deparafinasi Menggunakan Xylol dan Minyak Zaitun pada Pewarnaan HE. *Pros Mhs Semin Nas Unimus.* 2019;2:190-194.
5. Mamay M, Mutmaina GN, Nurahma IA. Utilization Dishwashing Soap as a Substitute of Xylol in the Deparaffinization process of Hematoxylin-Eosin Dye: Review Article. *Medicra (Journal Med Lab Sci.* 2022;5(1):47-55. doi:10.21070/medicra.v5i1.1629
6. Wulandari YP, Nuroini F, Ariyadi T. Gambaran Jaringan Hati Pada Tahap Clearing Menggunakan Ekstrak Jeruk Nipis Pada Pewarnaan Hematoksin Eosin. *Biol Nat Resour J.* 2022;1(1):44-47.
7. Apriani, Ereskadi. Ekstrak kulit manggis (*Garcinia Mangostana* L) sebagai alternatif pengganti eosin untuk pemeriksaan telur cacing. *J Indones Med Lab Sci.* 2022;116(1):32-47.
8. Rizki Z, Ardhyia Y, Fajarna F. Optimasi Penggunaan Air Perasan bunga asoka merah (*Ixora Coccinea*) sebagai pengganti eosin pada pemeriksaan telur cacing Soil Transmitted Helminth. *J SAGO Gizi dan Kesehat.* 2023;4(2):271-277. doi:10.30867/gikes.v4i2.1235
9. Yuliana C, Ceriana R, Shafriyani R. Standarisasi Mutu Ekstrak Etanol Bunga Soka (*Ixora coccinea* L.). *J Pharm Heal Res.* 2022;3(1):1-5. doi:10.47065/jharma.v3i1.1322
10. Jenianti E, Nurhaeni, Satrimafitrah P, Pusptasari DJ. Stabilitas Ekstrak Warna Bunga Asoka (*Ixora Javanica*) Berdasarkan Variasi Ph Selama Masa Penyimpanan. *KOVALEN J Ris Kim.* 2019;5(2):207-213. doi:10.22487/kovalen.2019.v5.i2.12820
11. A. M. Al-Alwani M, Al-Mashaan ABSA, Abdullah MF. Performance of the dye-sensitized solar cells fabricated using natural dyes from *Ixora coccinea* flowers and *Cymbopogon schoenanthus* leaves as sensitizers. *Int J Energy Res.* 2019;43(13):7229-7239. doi:10.1002/er.4747
12. Daniel BK, Harland T. *Higher Education Research Methodology.* 1st ed. Taylor & Francis Group;

2020. doi:10.4324/9781315149783
13. Shafriyani R, Lestari W. Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Etanol Bunga Soka (*Ixora coccinea* L) Sebagai Terapi Infeksi Pada Kulit Yang Disebabkan Oleh Bakteri *Staphylococcus aureus* Formulation. *J Heal Technol Med.* 2020;6(2):1332-1344.
 14. Ramadhan A, Saleh C, Hairani R, Ruga R. Potensi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Asoka (*Ixora Coccinea* L .) Potential Antioxidant Activity Of Methanol Extract Of Asoka (*Ixora Coccinea* L .) Flower. *J At.* 2024;9(1):9-14.
 15. Suzana N, Prabawati SY. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Bunga dan Daun Soka (*Ixora coccinea*) pada Minyak Kelapa. *Kaunia Integr Interconnect Islam Sci J.* 2023;19(1):1-7.
 16. Lestario LN. *Antosianin: Sifat Kimia, Perannya Dalam Kesehatan, Dan Prospeknya Sebagai Pewarna Makanan.* (Farm's, ed.). Gadjara Mada University Press Anggota IKAPI; 2019.
 17. Sa'adah H, Nurhasnawati H, Permatasari V. Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*(L.)Merr) dengan Metode Spektrofotometri. *J Borneo J Pharmascientech.* 2019;01(01):1-9.