

Pewarnaan Preparat Apus Tipis Malaria
(*Plasmodium vivax* Dan *Plasmodium falcifarum*) Menggunakan Ekstrak Murbei
Sebagai Pengganti Eosin Pada Komposisi Giemsa

**Sandra Amalia Riyadi^{*1}, Fathlia Sinta Azhara², Ronald Yeyasa Koromath³,
Fitri Fadhilah⁴**

^{*1,2,3} Program Studi Analisis Kesehatan, Sekolah Tinggi Analisis Bakti Asih Bandung; Jalan
Padasuka Atas No. 233 Bandung 40192 Indonesia, telp (022) 7203733

e-mail: *1s.amaliariyadi89@gmail.com

ABSTRACT

*Malaria is caused by the plasmodium parasite and still a threat to Indonesia. The main examination is staining of thick and thin smear preparations using Giemsa. Because Giemsa is expensive, its waste is difficult to decompose, toxic and rare. Therefore, there is a need for new inventions to utilize the potential of natural components like mulberry fruit, which contains anthocyanins for coloring agents, to lessen the impact and risk of Giemsa. The purpose of this study was to determine the effect of macerated ethanol extract of mulberry with a ratio of 1:3 (w/v) as an alternative to eosin in Giemsa on staining of thin blood smears of malaria, as well as knowing the best concentration in staining. This type of experimental research by observing the clarity of shape, color of parasites *P.vivax*, *P.falcifarum*, erythrocyte cells also compared with 3% Giemsa as a control. This study consisted of 32 samples, 8 repetitions and 4 treatments namely P1 (3% Giemsa control), Giemsa modified mulberry eosin P2 (20%), P3 (30%), P4 (40%). The quality of the preparations was assessed based on the clarity and contrast of the colors. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney data analysis techniques were used. The results showed that mulberry extract could be an alternative dye to replace eosin in the composition of Giemsa on malaria thin smear preparations. The most effective concentration was 30% which could give the Plasmodium nuclei the same quality of staining as the control, while for the erythrocytes the staining quality was not the same as the control.*

Keywords: mulberry ethanol extract, thin smear preparation, Giemsa alternative dye

ABSTRAK

*Malaria disebabkan oleh parasit plasmodium dan masih menjadi ancaman di Indonesia. Pemeriksaan utamanya menggunakan pewarnaan preparat apus tebal dan tipis dengan pewarna Giemsa. Karena Giemsa harganya mahal, limbahnya sulit terurai, beracun dan langka. Maka perlu adanya pengembangan baru untuk mengurangi resiko Giemsa, dengan memanfaatkan potensi bahan alam seperti buah murbei yang mengandung antosianin sebagai bahan pewarnaan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol murbei hasil maserasi rasio 1:3 (b/v) sebagai alternatif pengganti eosin pada Giemsa terhadap pewarnaan apus darah tipis malaria, juga mengetahui konsentrasi terbaik dalam pewarnaan. Jenis penelitian eksperimental dengan cara mengamati kejelasan bentuk, warna parasit *P.vivax*, *P.falcifarum*, sel eritrosit juga membandingkannya dengan Giemsa 3% sebagai kontrol. Penelitian ini terdiri dari 32 sampel, 8 pengulangan dan 4 perlakuan yaitu P1 (kontrol Giemsa 3%), Giemsa modifikasi eosin murbei P2 (20%), P3 (30%), P4 (40%). Kualitas preparat dinilai berdasarkan kejelasan dan kontras warna. Digunakan teknik analisis data Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney. Hasil menunjukkan ekstrak murbei dapat menjadi pewarna alternatif pengganti eosin dalam komposisi Giemsa pada sediaan apus tipis malaria. Konsentrasi paling efektif adalah 30% yang dapat memberi kualitas pewarnaan pada inti Plasmodium yang sama baiknya dengan kontrol, sedangkan untuk bagian eritrosit kualitas pewarnaannya belum sama dengan kontrol.*

Kata kunci: Ekstrak etanol murbei, Preparat apus tipis, Pewarna alternatif Giemsa

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit yang masih banyak dijumpai di berbagai provinsi Indonesia terutama wilayah timur seperti daerah Papua. Adapun malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit genus *Plasmodium*, salah-satu jenis spesies yang banyak di Indonesia adalah *Plasmodium falcifarum*, dan *Plasmodium vivax*, penyakit ini ditularkan melalui nyamuk anopeles betina yang berperan sebagai vektor (Sitohang, 2016). Bervariasinya manifestasi gejala klinis yang ditandai gejala awal demam tinggi, hemoglobin dan trombosit rendah, yang sering di sangka bukan malaria, menyebabkan tingginya tingkat kesakitan dan kematian sehingga melonjaknya permintaan pemeriksaan (Arsin, 2012).

Salah-satu pemeriksaan laboratorium yang dijadikan *gold standart* dan sering digunakan adalah pemeriksaan apus darah tipis dan tebal. Adapun kedua pemeriksaan ini sangat penting, terutama apus tipis untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasi pemeriksaan pada apus tebal dalam mendiagnosis penyakit malaria, utamanya untuk mengidentifikasi morfologi sel darah, sel parasit dan fase pertumbuhan jenis *Plasmodium* (Arsin, 2012). Kedua metode pemeriksaan ini menggunakan pewarnaan Giemsa. Oleh karenanya Giemsa menjadi bahan penting dalam pemeriksaan malaria. Namun permasalahannya kebutuhan Giemsa semakin meningkat untuk pemeriksaan, pembelajaran dan riset penelitian sehingga harga Giemsa relatif menjadi mahal dan menyebabkan Giemsa sulit ditemukan, terkhusus di daerah-daerah seperti provinsi papua. Selain itu, Giemsa termasuk salah satu pewarna sintetik yang terdiri dari eosin dan metilen biru yang limbahnya sulit terurai juga membahayakan kesehatan (Noor, 2020).

Dalam upaya meminimalkan resiko dan memudahkan ketersediaan reagen Giemsa, peneliti tertarik untuk melakukan pemanfaatan bahan alam yang mengandung pewarna alami berasal dari tumbuhan (Antosianin), untuk dijadikan alternatif pengganti pewarna dalam komposisi pewarna Giemsa yaitu eosin dan di aplikasikan sebagai pewarnaan malaria, tepatnya pada sel-sel yang bersifat basa yaitu kromatin inti *P.falcifarum* dan *P.vivax*. Pada penelitian oleh Subakir dan Dzikra tahun 2020, dilakukan penelitian menggunakan ekstrak antosianin dari ubi ungu sebagai pengganti pewarna Giemsa dan didapatkan hasil eritrosit yang memiliki kualitas pewarnaan cukup baik sedangkan kualitas pewarnaan trombosit dan leukosit kurang baik, penelitian oleh Isnawati, et al tahun 2021 juga meneliti ekstrak betasianin dari umbi bit sebagai pewarna alami dengan hasil penelitian ekstrak betasianin menunjukkan bahwa kualitas pewarnaan pada leukosit dan trombosit kurang baik dan eritrosit memiliki kualitas pewarnaan yang cukup baik dengan memperlihatkan warna oranye yang cukup jelas. Penelitian oleh Ardila et.al pada 2021 juga mencari pewarna alami pengganti Giemsa yaitu dengan ekstrak kulit buah jambang, dengan hasil yang tidak berbeda dengan penelitian-penelitian sebelumnya.

Zat warna antosianin merupakan senyawa turunan flavonoid yang bersifat amfoter dan stabil pada pH asam menghasilkan warna bervariasi mulai dari merah, hijau, ungu biru sampai hitam yang sering di temukan dalam tumbuhan seperti bunga, buah, biji bijian, dan umbi-umbian (Azmi, 2015; Priska,2018).

Dalam penelitian ini tumbuhan yang digunakan zat warna antosianinnya adalah murbei yang mana memiliki antosianin cukup tinggi dan baik untuk penggunaan zat warna (Hasanah,2019). Selain itu buah murbei memiliki ragam manfaat yang belum diketahui banyak orang (Azmi,2015).

Sehingga berdasarkan uraian tersebut, pada penelitian ini dikembangkan pengaplikasian zat warna antosianin pada murbei untuk dijadikan pengganti pewarna eosin dalam Giemsa sebagai zat warna apus tipis malaria. Pengembangan ini diharapkan mampu mewarnai inti parasit pada preparat, sehingga membantu memperjelas diagnosis, terutama pada penentuan jenis *Plasmodium*. Oleh karenanya peneliti melakukan penelitian dengan judul “Pewarnaan Preparat Apus Tipis Malaria (*Plasmodium vivax* dan *Plasmodium falcifarum*) Menggunakan Ekstrak Murbei Sebagai Pengganti Eosin Pada Komposisi Giemsa”.

METODOLOGI PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental, yang dilakukan dengan mengetahui pengaruh pemberian hasil ekstraksi antosianin dari buah murbei sebagai zat warna pengganti eosin dalam komposisi Giemsa pada pewarnaan preparat apus tipis malaria, dengan cara mengamati kejelasan bentuk, warna parasit *P.vivax*, *P.falcifarum*, sel eritrosit juga membandingkannya dengan Giemsa 3% sebagai kontrol. Penelitian ini terdiri dari 32 sampel dengan 8 pengulangan dan 4 perlakuan yaitu P1 (kontrol Giemsa 3%), Giemsa modifikasi eosin murbei P2 (20%), P3 (30%), P4 (40%).

Bahan penelitian yang digunakan antara lain buah murbei segar dari petani Lembang Bandung, etanol, akuades, HCl, NaOH, eosin 2%, plat KLT, buffer pH 3, metanol, etil asetat, n-butanol, asam asetat glasial, kertas saring (Whatman), kain kassa, aluminium foil, NH₃, FeCl₃, reagen mayer, H₂SO_{4 p}, asam asetat anhidrat, larutan Giemsa, gliserin, azur II methylene blue, gliserin, dan sampel darah positif malaria yang di dapatkan dari RSUD Mimika Papua.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya Spektrofotometer Uv-Vis (Shimadzu), seperangkat alat destilasi, *freeze dry*, mikroskop binokuler, objek glass, cover glass, pH meter, dan rak pewarnaan.

Proses pembuatan zat warna modifikasi Giemsa untuk menggantikan eosin ini, perlu beberapa tahap yang dilakukan, mulai dari proses ekstraksi murbei dengan maserasi oleh metanol selama 3 x 24 jam kemudian maserat dipisahkan fase airnya dengan destilasi dan *freeze dry* kemudian sampel ekstrak dapat digunakan. Dalam

penelitian ini dilakukan maserasi menggunakan etanol, dengan perbandingan sampel dan pelarut yaitu 1:3 b/v, murbei yang di gunakan sebanyak 250 gram dan etanol 750 ml, dilakukan selama 3 x 24 jam dalam botol coklat, di tempat tertutup dan gelap. Setelah didapatkan ekstrak etanol murbei yang pekat dari hasil ekstraksi, selanjutnya dilakukan pembuatan modifikasi pewarna, berdasarkan pembuatan stok Giemsa 100% secara manual (Ronald,2021). Kemudian dilakukan pengenceran dari stock 100% menjadi 20%, 30% dari 40%. Selanjutnya preparat malaria dikondisikan kering dan telah difiksasi, kemudian dilakukan pewarnaan dengan Giemsa termodifikasi ekstrak buah murbei 20%, 30%, 40% selama 45 menit diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran lensa objektif 100x dan lensa okuler 10x.

Pada penelitian ini indentifikasi antosianin dilakukan dengan spektrofotometer Uv-Vis, kromatografi lapis tipis (KLT) dan Uji fitokimia. Pada uji spektrofotometer dibuat kontrol Eosin 1% sebanyak 10 ml, dan sampel ekstrak yang di larutkan akuades 10 ml, lalu dimasukan pada alat dengan panjang gelombang maksimum 510-700 nm. Pada uji kromatografi lapis tipis, eluen yang digunakan adalah butanol : asam asetat : air (4:1:2) v/v, lalu hasil noda diidentifikasi secara visual dengan penyemprotan NH_3 , dan FeCl_3 2% (Wirasuta dkk, 2015), hasil penyemprotan NH_3 yang menandakan terdapat antosianin noda jingga hingga lembayung berubah menjadi biru, dan hasil penyemprotan FeCl_3 2% noda menjadi warna ungu menandakan adanya senyawa fenol. Sedangkan untuk uji Fitokimia dilakukan berbagai uji seperti antosianin, flavonoid, alkaloid, polifenol, terpenoid, steroid, tanin dan saponin. Untuk uji antosianin hasil ekstrak dicampur dengan HCl 2 M dan dipanaskan selama 5 menit pada 100°C , hasil positif jika sampel berwarna merah. Analisis dilakukan juga menggunakan NaOH 2 M yang dicampur ekstrak, jika positif warna merah berubah menjadi hijau biru dan memudar. Untuk uji flavonoid hasil ekstraksi dimasukan ke dalam 2 tabung, tabung satu ditambahkan NaOH 10%, tabung dua ditambahkan H_2SO_4 . Hasil dinyatakan positif apabila tabung satu berubah mejadi hijau kekuningan sampai hijau kuning kecoklatan, sedangkan tabung dua berubah menjadi merah kekuningan sampai merah kehitaman. Untuk uji alkaloid hasil ekstraksi ditambahkan reagen Mayer dan Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada reagen Mayer dan endapan jingga pada reagen Dragendorff. Untuk uji polifenol hasil ekstrak ditambahkan larutan FeCl_3 1%. Hasil positif terdapat endapan warna hijau, merah, ungu, biru tua, biru, biru kehitaman, atau hijau kehitaman. Untuk uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan pengujian Liebermann-Burchard. Hasil ekstrak ditambahkan 5 tetes H_2SO_4 p dan 3 tetes asam asetat anhidrat. Positif triterpenoid jika terbentuk warna merah atau ungu dan positif steroid jika terbentuk warna hijau. Untuk Uji tanin hasil ekstrak diencerkan aquades dan ditambah besi (III) klorida. Hasil positif jika sampel berubah menjadi biru atau hijau kehitaman. Untuk uji saponin hasil ekstrak di campur air panas, dinginkan lalu dikocok sampai

muncul buih dan ditambahkan 1 tetes HCl 2 N, hasil positif sampel terdapat buih yang banyak dan tahan lama.

PEMBAHASAN

Berdasarkan prinsip pewarnaan, dilakukan proses penambahan pewarna berfungsi untuk membantu dalam mempertajam suatu elemen sehingga unsur jaringan menjadi kontras dan nampak lebih jelas (Hasanah,2019). Dari hal tersebut dapat diketahui bahwa penggunaan pewarna Giemsa dalam penelitian ini merupakan faktor yang sangat penting, terutama untuk indentifikasi morfologi sel parasit maupun sel darah yang menentukan keadaan pasien sebagai tindakan penanganan dan pengobatan.

Pada komposisi Giemsa terdapat dua zat warna utama yaitu Eosin Y yang bersifat asam dan Azur metilen biru bersifat basa (Salnus dkk,2020). Pada murbei terdapat zat warna alami yaitu antosianin yang bersifat amfoter. Pada penelitian ini bermaksud untuk menggantikan Eosin Y pada Giemsa yang bersifat asam, sehingga antosianin diekstrak dalam keadaan pH asam yang selanjutnya diaplikasikan terhadap preparat apus darah tipis malaria. Pada proses ekstraksi antosianin dilakukan dengan cara maserasi dalam botol coklat dan gelap hal ini berkaitan dengan sifat senyawa antosianin yang ingin di dapatkan dari proses maserasi ini, memiliki sifat mudah di pengaruhi pH, oksigen, cahaya, yang mana jika sampel terpengaruh oleh hal tersebut akan menyebabkan zat warna menjadi tidak stabil, bahkan menyebabkan rusaknya antosianin (Priska,2018). Maserasi merupakan salah-satu proses ekstraksi yang sangat tepat untuk senyawa-senyawa bahan alam, karena selain mudah dan terjangkau, maserasi dapat menghindari pengaruh suhu, terutama suhu tinggi yang memungkinkan menyebabkan terdegradasinya senyawa-senyawa metabolit sekunder, juga akan lebih mengefektifkan senyawa larut dengan baik karena memiliki kontak waktu yang cukup lama dengan sampel (Hidayah,2013). Proses selanjutnya adalah destilasi hal ini bertujuan untuk memisahkan pelarut dari sampel berdasarkan perbedaan titik didihnya kemudian proses pengeringan dengan cara freeze drying karena memiliki keunggulan terutama dalam mempertahankan mutu hasil pengeringan, mempertahankan stabilitas stuktur bahan, menghambat aktifitas mikroba dan terutama mengurangi pengaruh suhu yang tinggi (Huda,2019). Adapun pada penelitian ini sampel didapatkan, dalam bentuk semi solid, salah satu alasannya adalah murbei memiliki kandungan gula dan air yang cukup tinggi sehingga akan perlu waktu cukup lama untuk mendapatkan hasil yang serbuk. Setelah proses freeze drying, di dapat ekstrak etanol murbei yang siap digunakan sebagai bahan pewarna pengganti eosin dalam pembuatan pewarna modifikasi Giemsa. Selain untuk pewarnaan, ekstrak etanol murbei dalam penelitian ini juga sebelumnya di lakukan indentifikasi antosianin dan senyawa kimia lainnya dengan cara analisis fitokimia, kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri UV-Vis.

Rendemen hasil ekstraksi didapatkan sebesar 2% dengan berat sampel hasil freeze dry sebanyak 5 gram, dari berat awal buah murbei 250 gram dan hasil destilasi sebanyak

1 liter. Dari hasil pengamatan uji fitokimia didapatkan ekstrak etanol ini dapat melarutkan senyawa-senyawa kimia dalam murbei seperti flavonoid, alkaloid, saponin, polifenol dan terpenoid, dapat dilihat dalam Tabel 1.

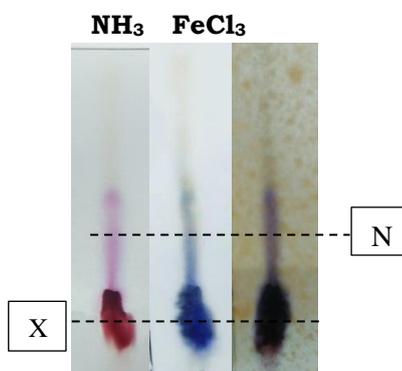
Tabel 1. Hasil uji fitokimia buah murbei

Uji	Reagen	Hasil Uji	Keterangan
Antosianin	HCl 2M	Positif (+)	Tidak pudarnya warna merah
	NaOH 2 M		warna hijau biru yang memudar perlahan
Flavonoid	NaOH 10%,	Positif (+)	Merah menjadi hijau kuning kecoklatan.
Alkaloid	Reagen mayer	Positif (+)	Terbentuknya endapan putih
Tanin	FeCl ₃	Negatif (-)	Tetap bewarna merah, Tidak berubahnya warna menjadi biru atau hijau kehitaman
Saponin	Akuades + 1 tetes HCl 2 N	Positif (+)	Adanya buih yang stabil
Polifenol	FeCl ₃ 1%	Positif (+)	Warna semakin merah, (merah kehitaman)
Steroid	Liebermann-Burchard (5 tetes H ₂ SO ₄ (P) dan 3 tetes asam asetat anhidrat)	Negatif (-)	Tidak terbentuk warna hijau, melainkan tetap merah
Terpenoid		Positif (+)	Terbentuk warna merah atau ungu

Pada uji fitokimia hasil positif adanya antosianin dari buah murbei pada penelitian ini sesuai dengan yang telah di dapatkan pada penelitian sebelumnya oleh Handaratri dan yuniati (2019). Pada kromatografi lapis tipis dilakukan indentifikasi melalui pemisahan noda warna, dengan melakukan elusi menggunakan fase diam dan fase gerak, yang selanjutnya di lakukan pengukuran nilai Rf (*retardation factor*) dan dibandingkan dengan Rf standar, juga di lakukan indentifikasi warna dengan suatu pereaksi. Fase diam yang di gunakan adalah silika gel yang bersifat polar dan fase geraknya n- Butanol : asam asetat glasial : akuades (4:1:2). Fase gerak tersebut dipilih karena berkaitan dengan kepolaran sampel yang digunakan itu relatif polar, sehingga kesamaan sifat antara fase gerak dan

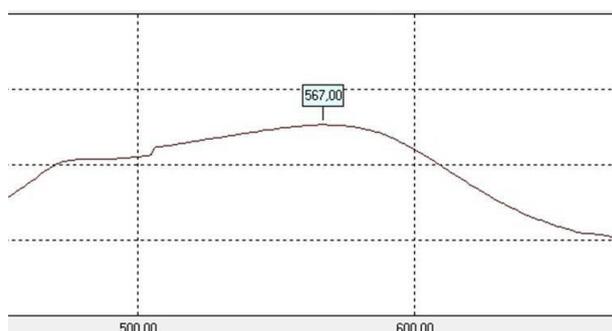
sampel dapat memberikan pemisahan yang baik. Selain itu dipilihnya fase gerak ini karena merupakan fase terbaik dan optimal untuk memisahkan senyawa antosianin (Wirasuta,2015). Fase gerak ini merupakan fase optimal yang mampu mengidentifikasi senyawa antosianin pada ubi jalar. Fase gerak berfungsi sebagai eluen dalam proses elusi, adapun pada proses elusi terjadinya pemisahan, yang didasarkan perbedaan distribusi antara dua fase yaitu fase gerak dan fase diam, yang di dasarkan hukum like dissolve like yaitu senyawa polar akan cenderung berinteraksi dengan pelarut polar dan sebaliknya senyawa nonpolar akan cenderung berinteraksi dengan pelarut nonpolar, juga berdasarkan proses migrasi differensial komponen-komponen yang dipisahkan melalui kromatografi.

Dari hasil proses pemisahan yang diamati dengan reagen penampak warna didapatkan dua pola noda, dengan Rf 0,36 pada noda N, dan 0,18 pada noda X. Adapun Rf pada noda N diduga sebagai senyawa antosianin, karena didasarkan pada standar Rf 0,3 itu merupakan senyawa antosianin (Wirasuta dkk; Laksmiani, 2015) dipastikan juga berdasarkan hasil indentifikasi pengamatan noda warna pada penguapan dengan ammonia dan penambahan FeCl₃ 2% sebagai reagen penampak noda, noda berubah sesuai karakteristik senyawa antosianin. Pada Gambar 1 hasil visualisasi dengan reagen penampak noda, dari mulanya hasil elusi berwarna merah lembayung, didapat hasil berubah menjadi biru setelah di semprot dengan NH₃, yang menandakan adanya antosianin dan berwarna ungu setelah di semprot dengan FeCl₃ 2%, yang menandakan adanya gugus fenolik pada noda tersebut. Reaksi perubahan warna sampel dari lembayung menjadi biru setelah diuapkan amoniak terjadi menunjukkan positif antosianin yang termasuk golongan flavonoid. Perubahan warna ini karena adanya interaksi uap amoniak dengan gugus hidroksil pada flavonoid. Adapun dengan penguapan amonia, akan deprotonisasi H, akibatnya ausokrom pada 3 pasang elektron bebas yang menghasilkan warna. Sama halnya dengan penambahan reagen penampak noda yang khas untuk kerangka flavonoid yaitu FeCl₃, yang kemudian diamati adanya perubahan menjadi warna ungu, hal ini karena polifenol dapat melepaskan ion H⁺ dan membentuk ion fenoksi yang akan bereaksi dengan FeCl₃ membentuk senyawa kompleks besi (III) heksafenolat.



Sebelum Sesudah
Gambar 1. Hasil indentifikasi KLT

Pemastian adanya antosianin dilanjutkan pada analisis spektrofotometri yang bermaksud untuk mengetahui panjang gelombang maksimum zat warna pada ekstrak etanol buah murbei yang kemudian dibandingkan dengan penyerapan panjang gelombang eosin, pada penelitian ini didapatkan perbandingan panjang gelombang yang tidak signifikan, dimana eosin didapatkan panjang gelombang sebesar 569 nm, sedangkan murbei 567 nm. Pada Gambar 2 dapat dilihat, panjang gelombang buah murbei dalam penelitian ini yaitu 567 nm. Diketahui bahwa dalam murbei diduga mengandung antosianin, karena menurut Harbone (1987) senyawa antosianin turunan flavonoid mempunyai serapan khas pada panjang gelombang antara 475-650 nm, sehingga Panjang gelombang ekstrak etanol murbei ini masih dalam rentang antosianin senyawa turunan flavonoid.



Gambar 2. Panjang gelombang ekstrak etanol murbei

Antosianin secara spesifik dapat menyerap cahaya pada daerah serapan ultraviolet (UV) sampai violet, tetapi lebih kuat pada daerah tampak dari spektrum antosianin terserap pada panjang gelombang 250 – 700 nm, dengan 2 puncak sebagai gugus gula (glikon) di panjang gelombang sekitar 278 nm, dan puncak utama sebagai antosianin (aglikon) di sekitar panjang gelombang 465-560 nm. Gugus gula ini merupakan gugus aromatik yang biasa muncul di 270-300 nm, sedangkan pada puncak utama aglikon menunjukkan berasal dari gugus karbonil terkonjugasi C=C (Wahyuningsih,2017). Pada penelitian ini didapatkan panjang gelombang yang di dapat lebih besar dari yang diperoleh pada wahyuningsih, (2017) yaitu 526 nm, dan dari target puncak utama antosianin yaitu 465-560 nm, namun pada penelitian ini di dapat 567 nm. Sehingga panjang gelombang yang didapat lebih besar, penggeseran panjang gelombang menjadi lebih besar disebut dengan penggeseran merah (Batokromik). Hal ini terjadi karena adanya substituen tertentu pada kromofor, salahsatunya terjadi ketika ada perubahan pelarut saat bertambah banyaknya cincin benzen yang terpadu dalam 1 molekul akibat adanya antosianin atau senyawa organik lainnya seperti, protein, tannin, flavonoid dan polisakarida. Hal ini akan meningkatkan penyerapan warna pada panjang gelombang maksimum sehingga menjadi semakin besar karena konjugasi bertambah dan stabilitas resonansi membesar. Pada penelitian ini, diduga yang menjadi penyebab terjadinya pergeseran panjang gelombang menjadi besar, salahsatunya adalah adanya perubahan larutan pada sampel. Adapun

sampel murbei ini awalnya diekstraksi dengan etanol, namun saat pengukuran ditambahkan pH 3 yang berisikan Aquades, KH_2PO_4 , NH_4Cl dan HCl , hal ini yang memungkinkan terjadinya pergeseran ke arah panjang gelombang yang semakin tinggi karena penyerapan warna semakin banyak, warna merah semakin pekat. Berdasarkan penelitian CN Sutanto, (2012) diketahui bahwa yang membuat penggeseran batokromik adalah salah satunya yang cenderung menstabilkan antosianin. Selain itu penyebab pergeseran panjang gelombang adalah ekstrak etanol murbei berasal dari tumbuhan murbei yang mengandung banyak gula, sehingga akibat gula inilah salah-satunya menyebabkan kelarutan dan stabilitasnya meningkat sehingga panjang gelombang akan bergeser ke yang lebih tinggi (Lestario dkk, 2011).

Setelah memastikan senyawa-senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak etanol murbei, selanjutnya pada modifikasi giemsa dengan mengganti eosin menggunakan ekstrak etanol murbei kemudian dilakukan pewarnaan pada preparat malaria yang telah kering dan difiksasi. Proses fiksasi ini bertujuan untuk lebih merekatkannya pewarna terhadap sel darah, mencegah lisisnya sel darah, dan menghentikan segala metabolisme tanpa merubah struktur dan sifat sel (Dian, 2016). Pada apus darah tipis fiksasi dilakukan untuk mencegah lisisnya sel darah, dengan tujuan utama adalah mengkonfirmasi hasil indentifikasi dari pengamatan dalam apus tebal mengenai fase dan jenis parasit malaria.

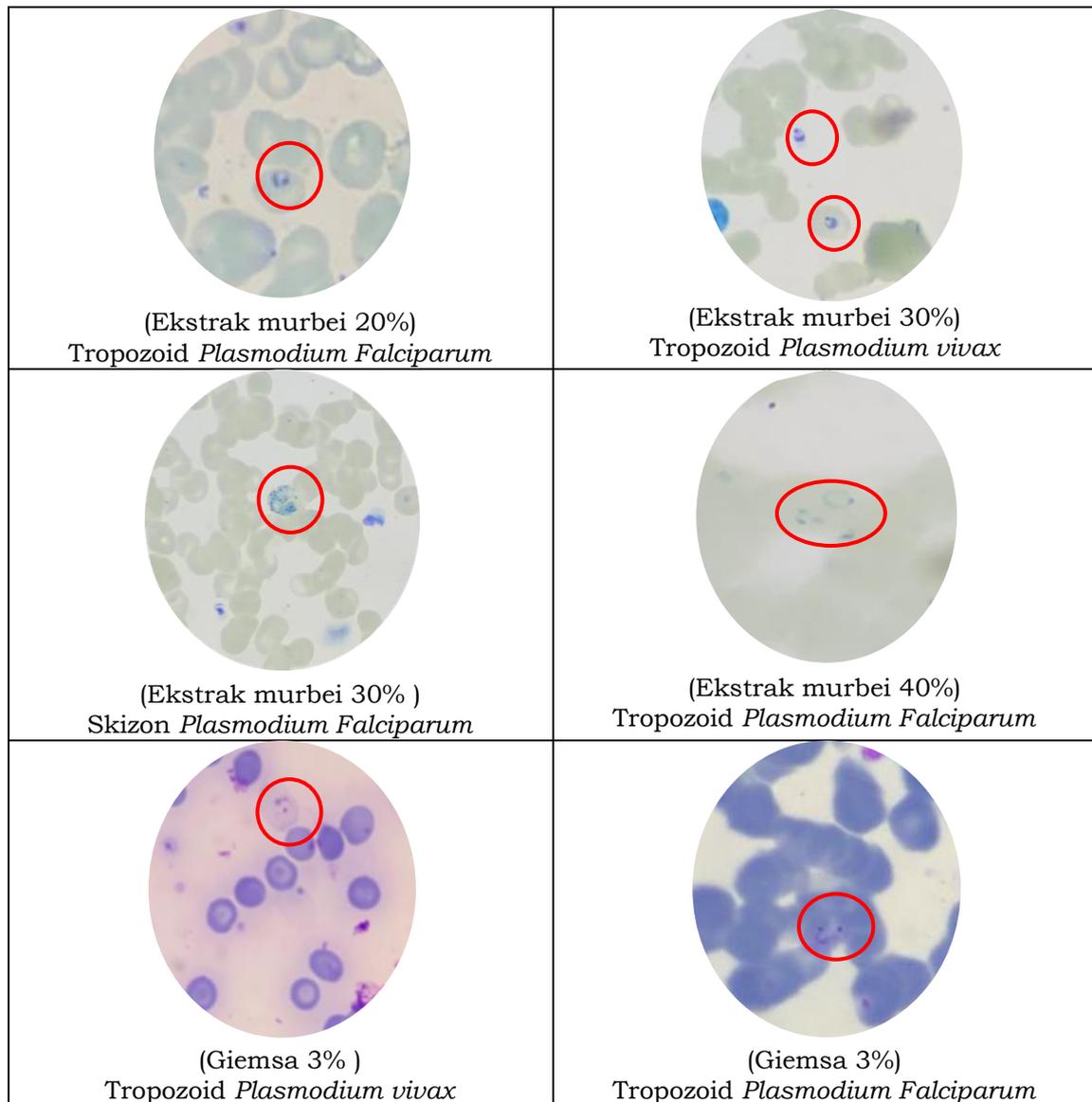
Pewarnaan dilakukan selama 45 menit seperti halnya pewarnaan pada kontrol Giemsa 3%, dimana zat warna dapat menyerap dengan baik (Puasa, 2018). Pada pewarnaan modifikasi, sampel mengandung antosianin yang bersifat amfoter atau mampu bersifat asam dan basa. Antosianin dapat berubah warna seiring dengan perubahan nilai pH. Pada pH tinggi antosianin cenderung berwarna biru, sedangkan pada pH rendah cenderung berwarna merah (Putri, 2019). Setelah proses pewarnaan selesai dilakukan kemudian diamati pada mikroskop pembesaran 100X lensa objektif dan 10X lensa okuler.

Pada Gambar 3 terdapat hasil pengamatan preparat. Pada penelitian ini dengan konsentrasi pewarna modifikasi ekstrak murbei 20%, 30% dan 40% dapat mewarnai sel, namun warna yang di hasilkan di preparat tidak lebih baik dari warna kontrol Giemsa dimana sel-sel parasit dapat terwarnai dengan jelas begitupun sel darah. Pada sampel preparate sel darah merah teramati berwarna hijau sedangkan inti dan sitoplasma parasitnya teramati berwarna hijau kebiruan. Hal ini terjadi kemungkinan akibat adanya pengaruh dari pH terhadap antosianin.

Pada hasil pengamatan didapatkan jenis parasit plasmodium spesies *P.falcifarum* dan *P.vivax*, dengan stadiumnya yaitu skizon, trofoploid juga terdapat gamet yang tidak utuh, sehingga dapat dinyatakan siklus parasit sudah berputar lebih dari tiga kali di dalam fase eritrositer. Telah diketahui, bahwa fase stadium parasit terbagi atas 3 yaitu Trofoploid, Skizon dan Gametosit, adapun dari ketiga jenis stadium tersebut, yang paling banyak dijumpai pada pengamatan preparat penelitian ini adalah fase trofoploid. Trofoploid

memiliki berbagai bentuk diantaranya adalah bentuk cincin, huruf I, burung dan amoboid. Pada penelitian ini didapatkan hasil trophozoid dengan bentuk bentuk cincin, penggunaan bentuk cincin bertujuan untuk lebih memudahkan dalam memastikan pengamatan terhadap indikasi adanya malaria, karena malaria memiliki bentuk yang khas terutama untuk *P.falciparum* dan *P.vivax*, yang memiliki trophozoid berbeda. Hal ini dapat diamati dengan adanya perbedaan bentuk struktur eritrosit dan sitoplasma yang terinfeksi, *P.vivax* memiliki sitoplasma lebih tebal dan eritrosit yang terinfeksi membesar sedangkan pada *P. falciparum* tidak terjadi perbesaran eritrosit serta sitoplasma yang lebih tipis. Pada pengamatan 30% teramati bentuk skizon dengan ciri-ciri ditemukannya titik-titik kasar berwarna merah pada sitoplasma (titik maurer), serta terdapat pigmen gelap yang menggumpal atau menyebar yang menandakan skizon *P.falciparum*.

Adapun dalam pengamatan preparat parasit malaria ini, hal yang lebih mudah untuk diamati adalah dengan mendapatkan bentuk trophozoid dari malaria, ciri khas dari malaria itu memiliki inti dan sitoplasma. Inti parasit, mampu diwarnai oleh pewarna yang bersifat asam sedangkan sitoplasma terwarnai oleh zat warna yang bersifat basa (Anggryani,2019). Sehingga dalam penelitian ini pewarna eosin dalam Giemsa yang bersifat asam mewarnai inti yang bersifat basa, dan metilen biru mewarnai sitoplasma yang bersifat asam. Sama halnya yang terjadi dengan eosin, zat warna alami (antosianin) dalam ekstrak etanol murbei yang dibuat untuk mengganti eosin, memiliki pH asam yang dapat mewarnai dinding sel berselulosa yang memiliki pH basa. Ion negatif pada zat warna (H^+) akan terlepas dan berikatan kovalen dengan ion positif yang ada pada dinding sel jaringan sehingga ekstrak dari buah murbei dapat mewarnai sel inti parasit yang bersifat basa (Hasanah,2019). Selain karena adanya reaksi ikatan elektrostatik antara muatan ion, sebagaimana reaksi yang terjadi antara sel darah dengan pewarna sintetik, reaksi dengan pewarna alami pun sama, dimana terbentuknya warna dihubungkan dengan adanya ikatan oksigen sebagaimana Fe (besi) pada heme sel darah merah akan mengikat 4 unsur oksigen untuk dapat membuat sel darah tersebut terwarnai (Ronald,2021). Sebagaimana tujuan dalam penelitian ini yaitu mengobservasi konsentrasi ekstrak buah murbei untuk dijadikan pewarna alternatif pengganti eosin dalam komposisi Giemsa, pada pemeriksaan malaria metode sediaan apus tipis. Hasil pengamatan dengan variasi konsentrasi ekstrak murbei 20%, 30%, 40% dan Giemsa 3% sebagai kontrolnya, kemudian dinilai oleh peneliti dan satu orang verifikator yang ahli dibidangnya. Adapun penilaian pengamatan hasil pewarnaan dengan ekstrak murbei dan Giemsa menggunakan teknik likert scale, non parameterik dengan output data ordinal. Untuk hasil pengamatan terdapat dalam gambar 3.



Gambar 3. Hasil pewarnaan ekstrak murbei 20%, 30%, 40% sebagai pengganti eosin pada Giemsa serta perbandingannya pada kontrol (Giemsa 3%) untuk pemeriksaan malaria metode sediaan apus tipis.

Berdasarkan hasil penilaian diketahui bahwa Giemsa 3% memberikan kualitas warna yang baik. Namun untuk menguji perbedaan kualitas pewarnaan yang ada berbeda signifikan atau tidak dengan metode alternatif, maka dilakukan uji beda signifikan Kruskal Wallis, karena sifat data pada penelitian ini adalah data non parametrik dan variasi perlakuan lebih dari dua perlakuan. Perbandingan yang dilakukan adalah perbandingan kualitas pewarnaan dari setiap perlakuan eksperimen dan preparat kontrol Giemsa 3%.

Hipotesis uji Kruskal wallis pada penelitian ini adalah jika nilai $Asymp.sig > 0,05$ maka variasi konsentrasi ekstrak murbei memberikan kualitas pewarnaan yang tidak berbeda signifikan. Jika $Asymp.Sig < 0,05$ maka variasi konsentrasi ekstrak murbei memberikan perbedaan kualitas pewarnaan yang signifikan. Hasil uji Kruskal wallis berdasarkan perhitungan SPSS IBM versi 25 memberikan nilai $Asymp.Sig 0,000 < 0,05$

baik pada bagian Inti (I), Sitoplasma (S) dan Eritrosit (E). Tabel uji Kruskal Wallis tersedia pada Tabel 2

Dikarenakan hasil uji Kruskal Wallis memberikan perbedaan yang signifikan maka analisis data dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Berdasarkan hasil uji Mann Whitney U pada Tabel 3 maka diketahui bahwa pada modifikasi Giemsa ekstrak murbei 20% dan 30% diketahui pada bagian inti dan sitoplasma parasit memberikan kualitas yang tidak berbeda signifikan dengan Asymp.sig > 0,05. Namun jika dianalisis nilai Asymp. Sig pada ekstrak murbei 30% memberikan nilai Asymp.sig 1,000 lebih besar dibandingkan Asymp.Sig pada ekstrak murbei 20%. Sedangkan pada ekstrak murbei 40%, diketahui baik bagian inti, sitoplasma parasit dan eritrosit kualitas pewarnaan yang diberikan kurang kualitasnya secara signifikan dibandingkan dengan Giemsa 3%.

Tabel 2. Hasil Uji Kruskal Wallis

	I	S	E
Kruskal Wallis	54,478	58,269	63,000
Asymp. Sig.	0,000 < 0,05	0,000 < 0,05	0,000 < 0,05

Tabel 3. Hasil uji lanjut Mann Whitney U

Kelompok Perlakuan ekstrak murbei 20% terhadap Giemsa 3%	Asymp. Sig	Uji
		Keterangan
Inti sel (I)	0,151 > 0,05	Tidak berbeda signifikan
Sitoplasma (S)	0,317 > 0,05	Tidak berbeda signifikan
Eritrosit (E)	0,000 < 0,05	Berbeda signifikan
30% terhadap Giemsa 3%		
Inti sel (I)	1,000 > 0,05	Tidak berbeda signifikan
Sitoplasma (S)	1,000 > 0,05	Tidak berbeda signifikan
Eritrosit (E)	0,000 < 0,05	Berbeda signifikan
40% terhadap Giemsa 3%		
Inti sel (I)	0,000 < 0,05	Berbeda signifikan
Sitoplasma (S)	0,000 < 0,05	Berbeda signifikan
Eritrosit (E)	0,000 < 0,05	Berbeda signifikan

Dari hasil uji olah data di atas didapatkan bahwa kondisi konsentrasi terbaik berada pada konsentrasi modifikasi Giemsa murbei 30% sebagai pengganti eosin pada Giemsa. Ekstrak murbei mampu memberikan kualitas pewarnaan yang sama baiknya dengan kontrol, penyerapan dan kontras zat warna dapat terlihat lebih baik di banding kedua konsentrasi lainnya. Hal ini juga berpengaruh terhadap penyerapan pada sitoplasma dan inti parasit yang cukup terlihat jelas. Dari penelitian ini juga dapat diamati bahwa pengenceran yang terlalu tinggi dan konsentrasi yang terlalu pekat tidak baik untuk pewarnaan preparat malaria, pewarna dalam konsentrasi yang pekat dan terlalu encer dapat menyebabkan zat warna sulit untuk diserap sehingga proses pengamatan menjadi kurang jelas.

Dari hasil penelitian yang telah disebutkan ekstrak buah murbei mampu menggantikan eosin sebagai zat warna pada pewarna Giemsa. Inti sel parasit malaria *P.*

vivax, *P. falcifarum* dan eritrosit dapat terwarnai dengan baik. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa ekstrak murbei mampu dengan baik mewarnai sel-sel dan jaringan, pada preparat jaringan tumbuhan akar bawang merah (Noor dkk, 2020), dan pewarna preparat gosok tulang femur kelinci (Hasanah,2019).

KESIMPULAN

Ekstrak Murbei mampu dijadikan sebagai alternatif pengganti pewarna eosin pada Giemsa terhadap pewarnaan inti parasit *P.vivax* dan *P.falcifarum* dalam pembuatan apus darah tipis malaria yang kualitas pewarnaannya tidak berbeda signifikan dengan kontrol Giemsa. Konsentrasi optimum dari ekstrak etanol murbei untuk mewarnai inti *P.vivax* dan *P.falcifarum* pada sediaan apus darah tipis malaria adalah sebesar 30% yang mampu memberikan kualitas pewarnaan sama baiknya dengan kontrol, namun hanya pada bagian inti dan sitoplasma sel, sedangkan tidak untuk bagian eritrosit.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhinata, Faisal Dharma, Esti Suryani, And Paramasari Dirgahayu. 2016. "Identification Of Parasite Pasmodium Sp . On Thin Blood Smears With Rule-Based Method." *Journal Itsmart* 5(1): 16–24.
- Andi Arsunan Arsin. 2012. Masagena Press *Malaria Di Indonesia Tinjauan Aspek Epidemiologi*.
- Anggryani, Chintya. 2019. *Pengaruh Perbedaan Pengenceran Giemsa Terhadap Sediaan Darah Tipis Pada Penyakit Malaria Di Rsud M. Zein Painan*.
- Azmi, Aliefa Nur, And Yunianta. 2015. "Extraction Of Anthocyanin Mulberry (Morus Alba L .) With Ultrasonic Bath (Study Of Extraction Time And Solid : Liquid Ratio)." *Jurnal Pangan Dan Agroindustri* 3(2): 773–83.
- Dais Iswanto, Purwanto, Nuraliah Rusman. 2020. "Penggunaan Ekstrak Buah Merah (Pandanus Conoedius,Sp.Lam) Asal Papua Sebagai Pewarna Morfologi Eritrosit Dengan Metode Sediaan Apusan Darah Tepi (Sadt)." 1.
- Dewi, Aprilia Larasati (2018). "Pengaruh Waktu Terhadap Kadar Fenol Dan Tanin Ekstrak Daun Pandan".Universitas Diponegoro
- Dian, Rachmawati. 2016. "Pengaruh Lama Penguapan Larutan Fiksasi Terhadap Hasil Makroskopis Dan Mikroskopis Sediaan Apus Darah Tepi." Endarini. 2016. *Farmakognisi-Dan-Fitokimia*. Jakarta Selatan.
- Gafur, Maryati Abd, Ishak Isa, Nurhayati Bialangi, And Jurusan Kimia Fakultas. 2013. *Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Daun Jamblang (Syzygium Cumini)*.
- Hada,Didimus Daton,2018."Perbandingan Pengenceran Larutan Giemsa 3% Dan 5% Terhadap Pemeriksaan Morfologi Falciparum". Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Handaratri, Anitarakhmi, And Yuyun Yuniati. 2019. "Kajian Ekstraksi Antosianin Dari Buah Murbei Dengan Metode Sonikasi Dan Microwave." *Reka Buana: Jurnal Ilmiah Teknik Sipil Dan Teknik Kimia* 4(1): 63.
- Hasanah, Lia Rohmatul. 2019. "Pengaruh Pemberian Filtrat Buah Murbei (Morus Alba L) Sebagai Pewarna Alternatif Terhadap Kualitas Preparat Gosok Tulang Femur Kelinci (Oryctolagalus Cuniculus L)." *Skripsi* 8(5): 55.
- Hidayah, Tri. 2013. "Uji Stabilitas Pigmen Dan Antioksidan Hasil Ekstraksi Zat Warna Alami Dari Kulit Buah Naga (Hylocereus Undatus)." *Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang* 29(18): 2616–27.
- Hilwiyah, Dkk. 2015. *Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Serta Kadar Total Fenol-Flavonoid Ekstrak Etanol Murbei (Morus Alba L.)*.
- Huda. 2019. "Ekstraksi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Aktif Dengan Variasi Pengeringan Alga Merah (Euclidean Cottonii) Pantai Wongsorejo Banyuwangi."

- Islawati, Asriyani, Ridwan, Rahmat Aryandi. 2021. "Ekstrak Betasianin Dari Umbi Bit (*Beta Vulgaris*) Sebagai Pewarna Alami Pada Sediaan Apusan Darah Tepi". *Jurnal Kesehatan Panrita Husada* 6(2): 152-160.
- Isnain, Wahyudi, And Nurhaedah Muin. 2015. "Tanaman Murbei : Sumber Hutan Multimanfaat." *Info Teknis Eboni* Vol. 12(2): 111-19.
- Kandun, I Nyoman. 2008. "Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria Di Indonesia By Tim Penyusun (Z-Lib.Org)."
- Kurniati,dkk.2018, Penuntun Praktikum Mikrobiologi. Jakarta: Program Studi Dan Pendidikan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta
- Kusuma, Wijaya Et Al. 2014. "Pemeriksaan Mikroskop Dan Tes Diagnostik Cepat Dalam Menegakkan Diagnosis Malaria." *E-Jurnal Medika Udayana* 3(2): 170-86.
- Laksmiani. 2015. "Identifikasi Dan Karakterisasi Antosianin Ekstrak Etanol 70 % Dalam Suasana Asam Dari Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas L .*) Dengan Identification And Characterization Anthocyanins From 70 % Ethanol Extract In Acid Condition Of Purple Sweet Potato (*Ipomoea*." 1.
- Lestario, Lydia Ninan, Elisabeth Rahayuni, And Kris Herawan Timotius. 2011. "Kandungan Antosianin Dan Identifikasi Antosianidin Dari Kulit Buah Jenitri (*Elaeocarpus Angustifolius Blume*)." *Agritech: Jurnal Fakultas Teknologi Pertanian Ugm* 31(2): 93-101.
- Made Agus Gelgel Wirasuta, I Et Al. 2015. Seminar Nasional Sains Dan Teknologi (Senastek) *Identifikasi Antosianin Ubi Ungu (Ipomoea Batatas Klt-Spektrofotodensitometri*.
- Nastiti, D S, N Nurhamidah, And I N Chandra. 2019. "Pemanfaatan Ekstrak Buah Morus Alba L.(Murbei) Sebagai Pengawet Alami Ikan Selaroides Leptolepis (Selar)." *Alotrop* 3(1): 1-7.
<https://Ejournal.Unib.Ac.Id/Index.Php/Alotropjournal/Article/Viewfile/9019/4423>.
- Priska, Melania, Natalia Peni, Ludovicus Carvallo, And Yulius Dala Ngapa. 2018. "Review : Antosianin Dan Pemanfaatannya." *Indonesian E-Journal Of Applied Chemistry* 6(2): 79-97.
- Puasa, Rony. 2018. "Studi Perbandingan Jumlah Parasit Malaria Menggunakan Variasi Waktu Pewarnaan Pada Konsentrasi Giemsa 3 % Di Laboratorium Rsud Dr. H. Chasan Boesoirie Ternate." *Jurnal Riset Kesehatan* 6(2): 23.
- Putri. 2019. *Gambaran Hasil Pemeriksaan Plasmodium Dengan Sediaan Tetes Tebal Dan Hapusan Darah Di Puskesmas Leung Keubeu Jagat Kabupaten Nagan Raya*.
- Rasuane Noor, Nisa Yulis Tika, Putri Agustina. 2020. "Preparat Jaringan Tumbuhan Dengan Menggunakan Pewarna Alami Sebagai Media Belajar Jaringan Tumbuhan." 5(2): 136-48.
- Rizky Ardila, Zahara Afnita, Ayu Nirmala Sari, Diky Setya Diningrat. 2021. "Ekstrak Kulit Buah Jamblang (*Syzygium Cumini*) Sebagai Pewarnaan Alternatif Preparat Sediaan Apusan Darah Tepi (SADT)." *Webinar Nasional VII Biologi*: 313-318.
- Ronald Y. Koromath (2021). "Penggunaan Ekstrak Metanol Dari Buah Murbei Buah Merah Dan Kulit Buah Manggis Sebagai Zat Warna Alternatif Pada Pemerisaan Malaria Sediaan Apus Darah Tebal Metode Pewarnaan Giemsa". Prodi Kimia Konsentrasi Analisis Medis Sekolah Tinggi Analisis Kesehatan Bandung .
- Sitepu, Rehmadata, Tatas H P Brotosudarmo, And Leenawaty Limantara. 2016. "Karakterisasi Antosianin Buah Murbei Spesies Morus Alba Dan Morus Cathayana Di Indonesia (Anthocyanin Characterization Of Morus Alba And Morus Cathayana In Indonesia)." *Online Journal Of Natural Science* 5(2): 158-71.
- Sitohang, Vensya. 2016. "Buku Saku Tatalaksana Kasus Malaria." *Jurnal Ekologi Kesehatan* 13(3 Sep): 201-209-209.
- Sitti Wahyuni, Md, Phd. 2015. "Csl5 _ Manual Apusan Darah Tepi _ Swahyuni 2015 Page 1 Csl5 _ Manual Apusan Darah Tepi _ Swahyuni 2015 Page 2." *Manual Apusan Darah Tepi*: 1-7.

- Subakir Salnus; Dzikra Arwie. 2020. "Ekstrak Antosianin Dari Ubi Ungu (*Ipomoea Batatas* L.) Sebagai Pewarna Alami Pada Sediaan Apusan Darah Tepi." *Jurnal Media Analisis Kesehatan* 11(2): 96–103.
- Sulistiyarini, Indah Et Al. 2020. "Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus Polyrhizus*)."
- Supriyatin, Yati., (2014). "Diktat Kuliah & Petunjuk Praktikum Parasitologi II". Staba: Bandung
- Tamara, Sri Wantini, dan Sri Ujjiani. 2019. "Perbandingan Hitung Jenis Leukosit Pada Penderita Malaria *Falciparum* Dengan Malaria *Vivax* Di Puskesmas Sukamaju Bandar Lampung."
- Vanadis, Putu Aurora, Ni Made Suartini, And Ni Putu Ariantari. 2013. "Analisis Antimalaria Ekstrak Metanol Daun Murbei (*Morus Alba*) Pada Mencit Terinfeksi." *Jurnal Farmasi Udayana* 2(1): 45–51.
- Wahyuningsih, S. Et Al. 2017. "The Effect Of Ph And Color Stability Of Anthocyanin On Food Colorant." *Iop Conference Series: Materials Science And Engineering* 193(1).
- Wijayanti. (2015). "Teknik Survei Darah *Filaria* Dan Malaria". Balai Litbang P2b2: Banjarnegara
- Wulandari, Lestyo. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember.
- Yani, Gita Fitri, Muachiroh Abbas, And Siti Samiyarsih. 2020. "Pemanfaatan Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) Sebagai Pewarna Alami Jaringan Daun Dan Batang Krokot (*Portulaca Oleracea* L.)." *Bioeksakta : Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed* 2(2): 288.
- Yuni, Fajriyah, Sri Wulandari, Shintya Devi Widiyani, And Arya Iswara. 2019. "Caesar (*Caesalpinia* Extract) : Pewarna Alami Tanaman Indonesia Pengganti Giemsa." 3: 45–49.