

**UJI VALIDASI AKURASI DAN PRESISI METODE PEWARNAAN
SEDERHANA *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* MENGGUNAKAN
ESKTRAK METANOLIK *Hibiscus sabdariffa* Linn**

Bima Esa Saputra, Yoni Rina Bintari, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Penggunaan pewarna alami dapat mengurangi limbah pewarna sintetis pada pewarnaan bakteri sederhana. Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) banyak dimanfaatkan sebagai pewarna alami. Namun, belum pernah digunakan dalam pewarnaan bakteri sederhana. Penelitian ini bertujuan mengetahui nilai akurasi dan presisi ekstrak metanol bunga rosella sebagai pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dibandingkan *methylene blue*.

Metode: Penelitian ini bersifat eksperimental *in vitro*. Dilakukan pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan *Methylene blue* (kontrol positif +), pewarna ekstrak metanolik bunga rosella konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan metanol (kontrol negatif -). Bakteri diamati dengan mikroskop trinokuler perbesaran 1000x dan dilakukan pengamatan deskriptif pada hasil pewarnaan. Bakteri yang terlihat dihitung menggunakan aplikasi ImageJ dan dinilai akurasi serta presisinya. Uji statistik pada pengamatan deskriptif dilakukan dengan uji *Mann-Whitney* ($p < 0,05$).

Hasil: Nilai akurasi dan presisi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan tidak memenuhi kriteria penilaian yang baik (85-115% dan 1,5%). Nilai akurasi pada *Escherichia coli* memenuhi kriteria baik pada konsentrasi 50% dan 75% serta nilai presisi yang tidak memenuhi kriteria baik semua konsentrasi (85-115% dan 1,5%). Nilai pengamatan deskriptif tertinggi bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 75% dan pada bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 50%. Dengan hasil analisis menggunakan *Mann-Whitney* didapatkan bahwa ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 25% berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan semua konsentrasi, *methylene blue* berbeda signifikan dengan konsentrasi 50%, 75% dan metanol, konsentrasi 50% berbeda signifikan dengan metanol dan konsentrasi 75% berbeda signifikan dengan metanol.

Kesimpulan: Metode pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki nilai akurasi dan presisi dibawah standar pada semua konsentrasi. Metode pewarnaan sederhana bakteri *Escherichia coli* memiliki nilai akurasi yang memenuhi standar pada konsentrasi 50% dan 75% serta nilai presisi yang tidak memenuhi standar pada semua konsentrasi. Sehingga metode pewarnaan dengan ekstrak metanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) memiliki validitas dibawah standar sehingga tidak dapat menggantikan *methylene blue*.

Kata Kunci: *Hibiscus sabdariffa* Linn, Pewarnaan sederhana, bakteri

*Korespondensi:

Rio Risandiansyah, S.Ked, M.P, Ph.D
Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia,
65145 Telp +62(341)578920
e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id.

ABSTRACT

Introduction: The use of natural dyes can reduce synthetic dye waste in simple bacterial staining. Rosella flowers (*Hibiscus sabdariffa* L) are widely used as natural dyes. However, it has never been used in simple bacterial staining. This study aims to determine the value of accuracy and precision of roselle flower methanol extract as a simple staining of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria compared to *methylene blue*.

Method: This research is experimental *in vitro*. Simple staining of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria was performed using *Methylene blue* (positive control +), rosella flower methanolic extract dye with concentrations of 25%, 50%, 75%, and methanol (negative control -). Bacteria were observed with a trinocular microscope with 1000x magnification and descriptive observations were made on the staining results. The visible bacteria were counted using the ImageJ application and assessed for accuracy and precision. Statistical tests on descriptive observations were carried out using the *Mann-Whitney* test ($p < 0,05$).

Result: The value of accuracy and precision on *Staphylococcus aureus* bacteria and does not meet the good assessment criteria (85-115% and 1.5%)²⁴⁻²⁶. The accuracy value of *Escherichia coli* meets the criteria for both concentrations of 50% and 75% and the precision value does not meet the criteria for both concentrations (85-115% and 1.5%). The highest descriptive observation value was *Staphylococcus aureus* at a concentration of 75% and *Escherichia coli* at a concentration of 50%. With the results of the analysis using *Mann-Whitney*, it was found that the methanol extract of rosella flower with a concentration of 25% was significantly different ($p < 0.05$) with all concentrations, *methylene blue* was significantly different with a concentration of 50%, 75% and methanol, a concentration of 50% was significantly different with methanol. and the concentration of 75% was significantly different from methanol.

Conclusion: The simple staining method of *Staphylococcus aureus* bacteria has accuracy and precision values below the standard at all concentrations. The simple staining method of *Escherichia coli* bacteria has accuracy

values that meet the standards at concentrations of 50% and 75% and precision values that do not meet standards at all concentrations. So the validity of staining method with methanol extract of Rosella flower (*Hibiscus sabdariffa* L) is under standart and cannot replace methylene blue.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* Linn, Simple staining, bacteria

*Correspondence to:

Rio Risandiansyah, S.Ked, M.P, Ph.D

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur,Indonesia, 65145

Telp +62(341)578920

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Salah satu bahan pewarna kimia yang sering digunakan untuk pewarnaan bakteri sederhana adalah *methylene blue*. *Methylene blue* mampu memberikan warna pada bakteri dengan cara berikatan dengan sitoplasma bakteri sehingga bakteri dapat terwarnai. Namun, penggunaan *methylene blue* dapat menimbulkan beberapa efek negatif seperti iritasi pada kulit, iritasi saluran pencernaan jika tertelan, dan sianosis jika terhirup dalam konsentrasi yang tinggi¹. Selain itu, *methylene blue* juga bersifat karsinogenik dan dapat mencemari lingkungan. *Methylene blue* mengakibatkan pencemaran air dikarenakan dalam penggunaannya, sebanyak 75% terbuang ke perairan sebagai limbah². Limbah buangan dari *Methylene blue* mampu memberikan efek pada organisme akuatik karena mengurangi intensitas cahaya matahari dan bersifat toksik karena mengandung senyawa aromatik, logam, khlorida, dan lain-lain³.

Tingginya efek negatif yang timbul akibat penggunaan bahan pewarna sintesis mendorong inovasi untuk mencari bahan pewarna alternatif yang berasal dari bahan alam. Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) dapat digunakan sebagai sumber bahan pewarna alami pada produk pangan⁴. Bunga rosella sudah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat, mulai dari daun, biji hingga kelopak bunga. Penggunaan rosella sebagai pewarna sel telah dilakukan, yang mana telah digunakan dalam pewarnaan preparat section cabai merah besar⁵. Namun penggunaannya dalam pewarnaan bakteri belum dilakukan. Kelopak bunga rosella mengandung senyawa antosianin⁶. Beberapa jenis antosianin mampu memberikan warna merah pada makanan maupun minuman⁷. Selain itu, senyawa antosianin tertentu juga diketahui mampu berikatan dengan peptidoglikan dinding sel bakteri¹⁰. Penelitian yang dilakukan oleh Tutty dan Siti (2016), melaporkan bahwa antosianin dari sari ubi jalar ungu mampu mewarnai bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Sehingga dapat dihipotesakan bahwa ekstrak Rosella yang mengandung antosianin dapat tertahan pada dinding sel bakteri yang mengandung peptidoglikan dan menyebabkan bakteri dapat terwarnai.

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri Gram positif yang memiliki dinding peptidoglikan yang tebal. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu flora normal pada kulit, mulut dan saluran pernafasan. Infeksi dari *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang ditandai dengan terbentuknya abses bernanah, jerawat dan bisul. *Staphylococcus aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik¹³. Sebaliknya, *Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif yang memiliki lapisan

peptidoglikan yang tipis. *Escherichia coli* merupakan salah satu spesies bakteri normal pada usus besar manusia. Namun, *Escherichia coli* juga merupakan bakteri patogen utama penyebab infeksi saluran pencernaan¹⁴.

Pewarnaan bakteri menggunakan bahan pewarna alami sudah pernah dilakukan seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Yunan (2016) yang menggunakan buah naga sebagai pewarna alami untuk pewarnaan bakteri, namun belum pernah dilakukan validasi terhadap hasil pewarnaan yang didapat. Sehingga validasi dari pewarnaan bakteri menggunakan bahan alam sangat dibutuhkan untuk mengetahui kelayakan penggunaan pewarna bahan alam pada pewarnaan bakteri. Validasi merupakan suatu penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan kelayakan parameter tersebut untuk digunakan. Metode validasi yang digunakan dalam penelitian ini berupa parameter akurasi dan presisi. Akurasi dinyatakan sebagai ukuran kedekatan nilai hasil parameter ukur rata-rata yang diperoleh dari sejumlah pengukuran berulang terhadap nilai sesungguhnya. Presisi dapat ditentukan dari populasi data hasil pengukuran berulang. Indikator untuk presisi biasanya digunakan simpangan baku, yang menunjukkan variasi populasi data yang diperoleh. Makin rendah nilai simpangan baku, maka data yang diperoleh akan saling berdekatan, menunjukkan presisi hasil pengukuran bernilai lebih baik. Metode validasi pada penelitian pewarnaan bakteri berbasis bahan alam berguna untuk mengetahui apakah suatu bahan alam layak digunakan dalam pewarnaan bakteri sehingga dapat distandarkan dan digunakan sebagai bahan pewarna pengganti dari pewarna sintesis.

Penelitian ini akan melakukan uji validitas metode pewarnaan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* menggunakan ekstrak metanolik *Hibiscus sabdariffa* L, dengan perbandingan dengan metode standar menggunakan *methylene blue*. Penelitian ini akan memperoleh hasil akurasi dan presisi dari metode pewarnaan dengan ekstrak tersebut, sehingga penggunaan bahan alam tersebut dapat terstandar dan valid.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental *in vitro* dan telah dilakukan di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan Juli-Agustus 2021.

Metode Ekstraksi Herbal

Metode ekstraksi herbal dilakukan dengan metode maserasi kinetik. Tahapan yang dilakukan diantaranya simplisia ditimbang menggunakan neraca digital dan dilarutkan dengan metanol 96% menggunakan perbandingan 1:10 (g/ml) yaitu simplisia dengan berat 20 g dilarutkan dengan methanol 96% sebanyak 200 ml kemudian direndam didalam Erlenmeyer. Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil dan

dimasukkan kedalam *Shaker* selama 48 jam dengan kecepatan 60 rpm. Kemudian hasil ekstrak disaring untuk memperoleh filtrate yang kemudian filtrate tersebut di evaporasi. Hasil dari evaporasi dimasukkan kedalam oven dengan suhu 40°C hingga menjadi ekstrak kental. Kemudian ekstrak kental yang sudah didapat disuspensikan 100 mg/ml dengan metanol 96%. Kemudian ekstrak kental tersuspensi dijadikan dalam beberapa konsentrasi yaitu 75%, 50%, 25%, 10% dan 1%. Dengan cara mengambil 100µl ekstrak kental dan ditambahkan 33µl metanol untuk membuat ekstrak bunga rosella dengan konsentrasi 75%. Untuk ekstrak bunga rosella konsentrasi 50%, dibuat dengan menambahkan 100µl metanol pada 100µl ekstrak kental bunga rosella. Untuk pembuatan ekstrak rosella konsentrasi 25% dilakukan dengan menambahkan 300µl metanol pada 100µl ekstrak kental bunga rosella. Dalam pembuatan ekstrak bunga rosella konsentrasi 10%, dilakukan dengan menambahkan 900µl metanol pada 100µl ekstrak bunga rosella kental. Ekstrak bunga rosella konsentrasi 1% dibuat dengan menambahkan 1000µl metanol pada 100µl ekstrak bunga rosella konsentrasi 10%. Hasil ekstrak dan pengencerannya kemudian dimasukkan kedalam botol dan disimpan didalam kulkas.

Inokulasi Bakteri

Bakteri *S. aureus* dan *E. coli* masing-masing diambil menggunakan ose dengan jumlah 3 ose dari stok media padat yang didapat dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) FK UNISMA. Kemudian bakteri diinokulasikan ke cawan petri berisi media padat *Nutrient Agar* (NA) (Merck, 20g/L), dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam.

Persiapan dan Fiksasi Kaca preparat

Persiapan dilakukan dengan menyiapkan kaca preparat berjumlah 45 buah, kemudian dibersihkan menggunakan kapas alkohol dengan cara diusap pada permukaan yang akan digunakan untuk penempatan bakteri. Kaca preparat yang telah dibersihkan diberi lingkaran pada sisi yang tidak digunakan untuk meletakkan bakteri dengan diameter 2,5 cm menggunakan spidol permanen sebanyak 2 lingkaran. Pada tiap lingkaran diberikan kode yang menunjukkan jenis bakteri dan juga diberikan label yang berisi mengenai jumlah koloni bakteri, konsentrasi dan jenis pewarna serta nomor pengulangan. Larutan NS ditetesi pada masing-masing lingkaran pada sisi yang digunakan untuk penempatan bakteri sebanyak 1 tetes (20 ul). Lalu bakteri diletakkan pada larutan NS yang telah diberikan menggunakan oshe steril sebanyak 1 koloni dan diratakan hingga menempati seluruh lingkaran (ukuran diameter koloni sebesar 1-1,5 mm). Preparat yang telah berisi bakteri kemudian

dikeringkan selama 30 menit hingga 1 jam dan kemudian difiksasi dengan cara dilewatkan diatas api sebanyak 3 kali dan didinginkan.

Pewarnaan Sederhana Bakteri Sintetik (*Methylene blue*)

Setiap lingkaran pada kaca preparat yang telah difiksasi, ditetesi dengan 100 µL larutan *Methylene blue* dan ditunggu 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan sediaan dikeringkan dengan diletakkan diantara kertas saring. Preparat diamati dengan mikroskop menggunakan perbesaran 1000 kali dengan menggunakan minyak emersi. Setelah diamati di bawah mikroskop, kemudian preparat bakteri dieksplorasi berapa jumlah sel bakteri yang terlihat.

Pewarnaan Sederhana Bakteri dengan Ekstrak Rosella

Setiap kaca preparat yang telah difiksasi diletakkan diatas bak pengecatan, kemudian ditetesi dengan 100 ul ekstrak rosella dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir sampai bersih, dan dikeringkan. Kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali, bakteri yang terlihat dihitung dalam 5 lapang pandang.

Pengamatan Deskriptif

Pengamatan deskriptif dilakukan oleh tiga orang dengan cara preparat yang sudah diwarnai kemudian diletakkan dibawah mikroskop dan diamati perubahan yang terjadi. Pada pengamatan deskriptif yang diperhatikan adalah :

- Kontras terhadap latar belakang pada preparat terlihat jelas atau tidak (2 = kontras jelas terlihat, 1 = kontras kurang terlihat, 0 = tidak ada kontras).
- Memiliki warna yang jelas (2 = warna jelas, 1 = warna buram, 0 = tidak ada warna).
- Bentuk bakteri yang berhasil terwarnai (2 = kualitas yang baik, 1 = kurang baik, 0 = tidak terlihat bentuk).
- Debris (2 = tidak ada debris/bersih, 1 = debris terlihat tetapi tidak menutupi seluruh badan bakteri, 0 = debris menutupi keseluruhan bakteri).

Perhitungan Sel Menggunakan ImageJ

Perhitungan sel dilakukan dengan cara membuka foto hasil pengamatan yang telah didapatkan menggunakan aplikasi ImageJ. Foto dikonversi menjadi 8-bit, dan kontras gambar diatur dengan menggeser bar pada 'threshold'. Dan dilakukan 'watershed' pada menu 'binary' untuk membagi partikel besar menjadi beberapa bagian. Gambar yang terlihat dianalisa menggunakan 'analyze particles' tanpa merubah satuan pada kolom 'size' yaitu '0-infinity'. Pada semua gambar, dilakukan perhitungan dengan memilih opsi 'exclude on edges' dan 'display results'. Jumlah perhitungan sel bakteri muncul pada kolom 'count'.

Penentuan Nilai Akurasi dan Presisi

Pengujian parameter akurasi menggunakan metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan dihitung menggunakan *direct cell counting*. Pembuatan sampel akurasi dengan pembuatan larutan analit sebanyak minimal 3 macam konsentrasi yang berbeda. Kemudian dilakukan pengukuran sel menggunakan Image J dengan 5 lapang pandang / 5 foto. Kemudian dihitung persen recovery nya dengan rumus

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{x}{\mu} \times 100\%$$

Dengan : μ : Nilai bakteri sebenarnya (%)

x : Hasil pewarnaan bunga rosella (%)

Nilai persen perolehan kembali yang dipersyaratkan sesuai dengan tabel penerimaan untuk akurasi. Pengujian Presisi yang dilakukan meliputi kategori repeatabilitas. Dengan membuat 3 seri konsentrasi seperti saat melakukan uji validitas akurasi. Kemudian hitung RSD (*Relative Standard Deviation*) menggunakan rumus :

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Dengan : SD : Standar Deviasi/simpangan baku jumlah bakteri tiap pengulangan.

$\bar{x}$: Kadar rerata jumlah bakteri tiap pengulangan.

Analisis Data

Pada penelitian ini, data yang telah didapatkan akan diuji menggunakan pengujian Mann- Whitney. Pengujian Mann- Whitney menyatakan jika tidak terdapat perbedaan signifikan pada kedua kelompok data serta kedua kelompok data tersebut tidak saling terkait²⁵. Data yang dibandingkan adalah jumlah sel yang didapatkan antara ekstrak herbal, kontrol (+) (*Methylene blue*) & kontrol (-) (metanol). hasil dianggap signifikan apabila $p < 0,05$ ²⁵.

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Hasil Eksplorasi Pewarnaan Ekstrak Metanol Bunga Rosella pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Tahapan eksplorasi pewarna dari ekstrak metanolik bunga rosella bertujuan untuk mencari konsentrasi terbaik dari ekstrak metanolik bunga rosella yang dapat digunakan sebagai perlakuan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

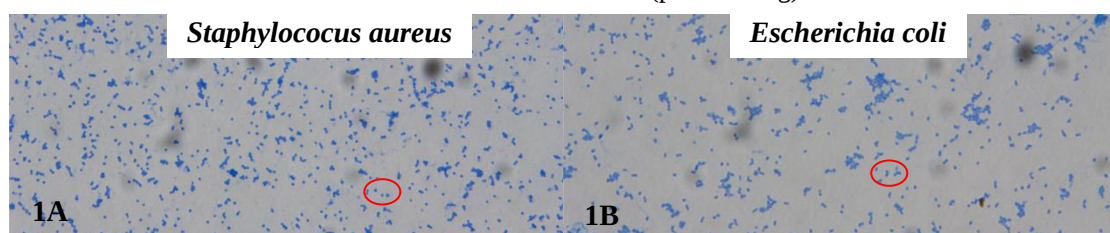
Eksplorasi dilakukan dengan mengambil konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, dan

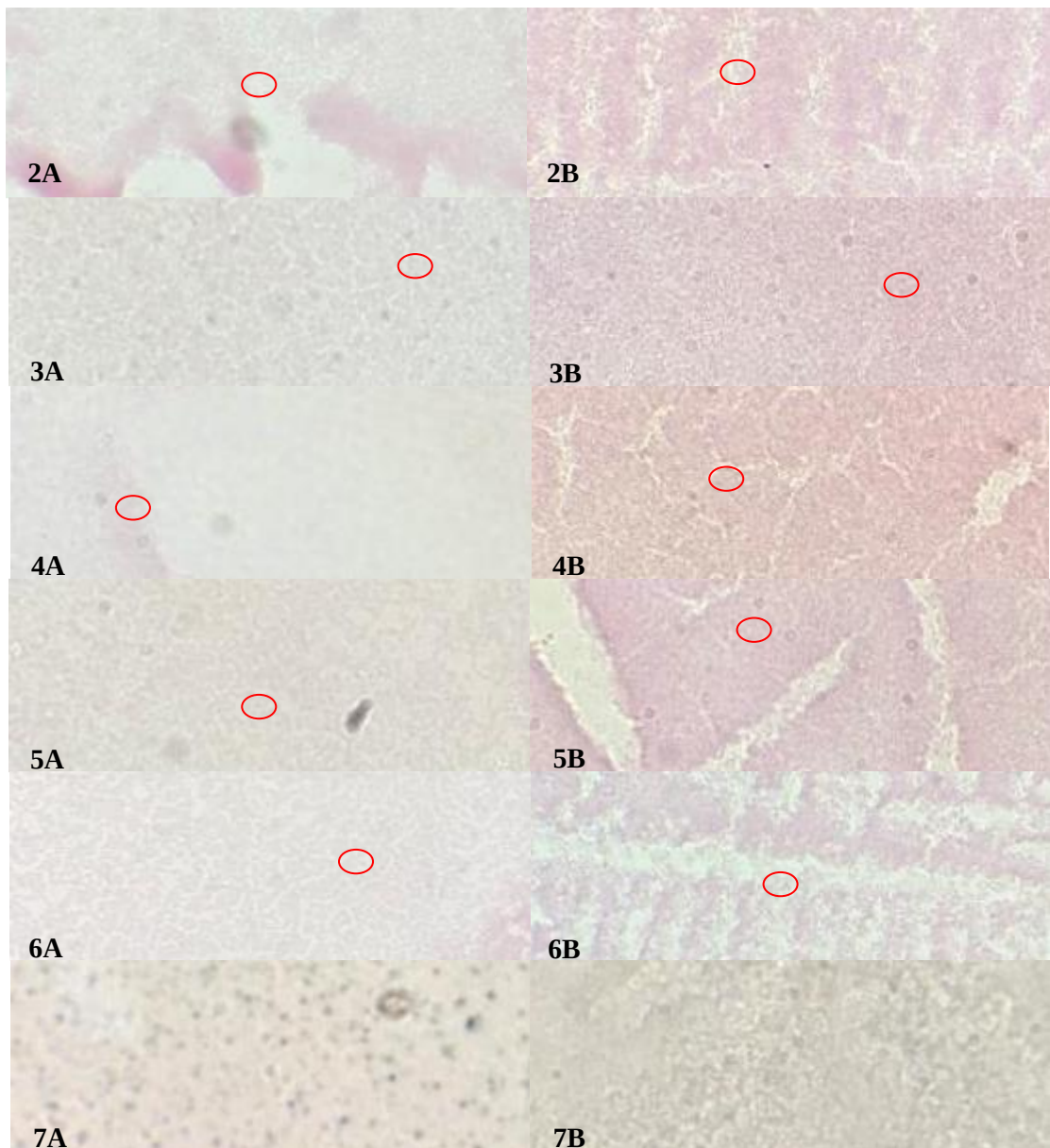
1% dari ekstrak kental (**Gambar 1**). Pada hasil pewarnaan menggunakan pewarna ekstrak metanolik bunga rosella konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, 10% pada preparat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menunjukkan kontras yang baik antara bakteri dengan latar belakangnya, namun bentuk bakteri sulit diamati karena jumlah bakteri yang terlalu padat. Pada hasil eksplorasi pewarnaan dengan konsentrasi 100% menunjukkan warna yang terlalu pekat. Serta pada hasil pewarnaan dengan konsentrasi 100% dan 50% didapatkan adanya debris pada hasil pewarnaan bakteri *Staphylococcus aureus* berupa endapan pewarna pada hasil pewarnaan. Pada eksplorasi pewarnaan dengan konsentrasi 75%, 25%, dan 10% tidak didapatkan adanya debris pewarnaan. Pada konsentrasi 1% kontras bakteri yang terwarnai dengan latar belakangnya buruk dikarenakan konsentrasi zat warna dari ekstrak bunga rosella terlalu rendah sehingga tidak mampu mewarnai bakteri dengan jelas. Bentuk bakteri tidak dapat diamati karena tidak terwarnai. Sehingga didapatkan konsentrasi terbaik ekstrak metanol bunga rosella yang dapat digunakan sebagai perlakuan yaitu 75%, 50% dan 25%.

Hasil Perhitungan Akurasi dan Presisi

Pewarnaan Ekstrak Metanol Bunga Rosella pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Akurasi dapat dinyatakan sebagai nilai %*Recovery*, serta dapat dinyatakan baik apabila nilai %*Recovery* berada pada rentang 85-115²⁶. Presisi dapat dinyatakan sebagai RSD dan dapat dikatakan baik apabila berada pada rentang $< 1,5\%$ ²⁴. Agar mendapatkan nilai akurasi dan presisi yang baik, pada setiap kelompok perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan. Hasil perhitungan yang didapatkan bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki nilai akurasi dan presisi yang tidak baik pada semua konsentrasi (**Tabel 1**). Pada bakteri *Escherichia coli* didapatkan hasil nilai akurasi yang baik pada konsentrasi 50% dan 75% serta nilai presisi yang tidak baik pada semua konsentrasi (**Tabel 2**). Hasil perhitungan akurasi dan presisi dari ekstrak metanol bunga rosella didapatkan dari perhitungan hasil foto dalam lima lapang pandang menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 1000x. Jumlah bakteri diukur menggunakan aplikasi Image-J. Ekstrak metanolik bunga rosella diencerkan menjadi tiga konsentrasi yaitu 25%, 50% dan 100%. Metanol berfungsi sebagai kontrol negatif sedangkan *methylene blue* berfungsi sebagai kontrol + (pembandingan).





Gambar 1. Hasil Eksplorasi Pewarnaan Ekstrak Metanol Bunga Rosella

Keterangan: Gambar 1 menunjukkan hasil eksplorasi pewarnaan ekstrak metanol bunga rosella pada bakteri *Staphylococcus aureus* (A) dan *Escherichia coli* (B), dengan 1 merupakan pewarnaan dengan konsentrasi 100%, 2 merupakan pewarnaan dengan konsentrasi 75%, 3 merupakan pewarnaan dengan konsentrasi 50%, 4 merupakan pewarnaan dengan konsentrasi 25%, 5 merupakan pewarnaan dengan konsentrasi 10% dan 6 merupakan pewarnaan dengan konsentrasi 1%. ○ menunjukkan bakteri pada hasil pengamatan.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Akurasi dan Presisi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Konsentrasi Herbal	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Rata-rata $\pm$ SD	RSD	% Recovery
Metanol (0%)	1287,00 $\pm$ 163,67	12,72	182,13
25%	11070,33 $\pm$ 1870,33	16,89	153,68
50%	13421,67 $\pm$ 3616,14	26,94	186,33
75%	20343,33 $\pm$ 6427,49	31,60	282,42
Methylene Blue	7203,33 $\pm$ 3680,03	51,09	

Keterangan: Tabel 1 menunjukkan hasil pengukuran akurasi dan presisi ekstrak metanol bunga rosella dengan konsentrasi 75%, 50%, 25% pada pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus*, dengan *methylene blue* sebagai kontrol positif dan metanol sebagai kontrol negatif. n=3 dengan 5 lapang pandang.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Akurasi dan Presisi Bakteri *Escherichia coli*.

Konsentrasi Herbal	<i>Escherichia coli</i>		
	Rata-rata $\pm$ SD	RSD	% Recovery
Metanol (0%)	1004,33 $\pm$ 56,23	5,60	187,96
25 %	16151,67 $\pm$ 6694,83	41,45	193,63
50 %	8815,67 $\pm$ 2631,28	29,85	105,68
75 %	9273,33 $\pm$ 5239,97	56,51	111,17
<i>Methylene Blue</i>	8341,67 $\pm$ 1263,97	15,15	

Keterangan: Tabel 2 menunjukkan hasil pengukuran akurasi dan presisi ekstrak metanol bunga rosella dengan konsentrasi 75%, 50%, 25% pada pewarnaan sederhana bakteri *Escherichia coli*, dengan *methylene blue* sebagai kontrol positif dan metanol sebagai kontrol negatif. n=3 dengan 5 lapang pandang.

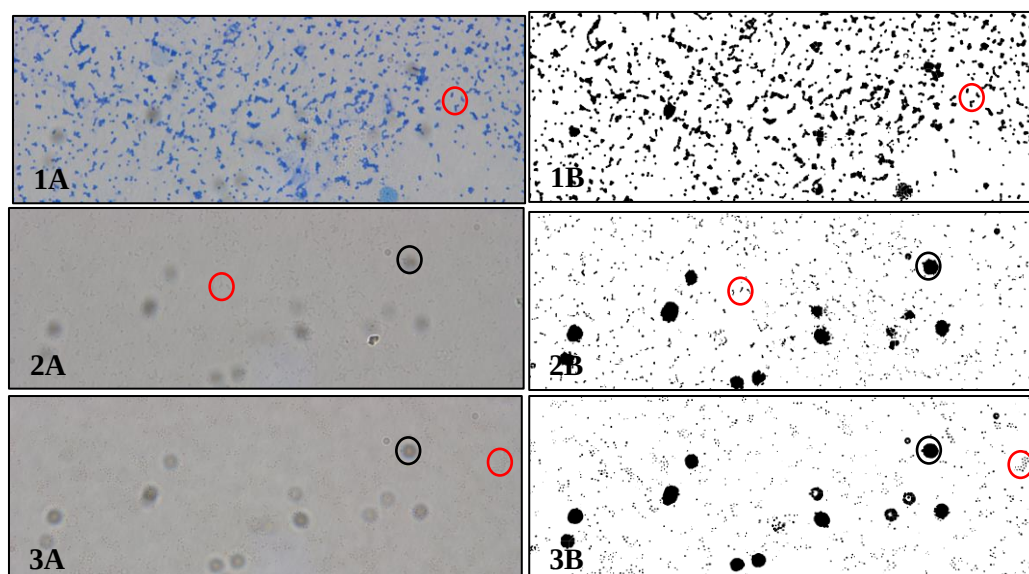
Hasil Pengamatan Deskriptif Pewarnaan Ekstrak Metanol Bunga Rosella pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

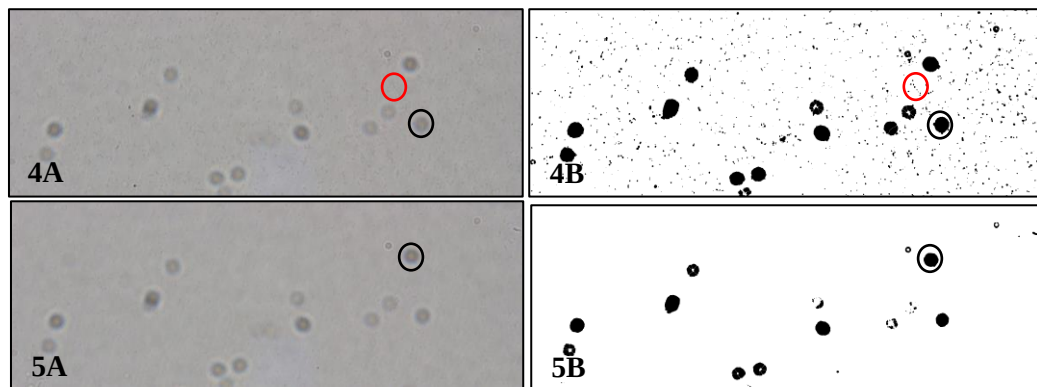
Hasil pengamatan deskriptif pewarnaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan ekstrak metanol bunga rosella, diamati menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 1000x menggunakan minyak emersi, kemudian dinilai kontras antara bakteri dengan latar belakangnya, hasil warna yang melekat pada bakteri, bentuk bakteri serta jumlah debris yang terdapat pada hasil pewarnaan (**Tabel 3 – 4**). Pengamatan deskriptif dilakukan oleh tiga orang pengamat yang berbeda yang berfungsi untuk menghindari bias yang ditimbulkan oleh peneliti.

Setelah dilakukan pengamatan deskriptif, hasil pengamatan yang didapat diolah menjadi grafik yang berfungsi untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki rata-rata terbaik (**Gambar 2**). Pengamatan deskriptif

terbaik pada bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat pada ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 75% (**Gambar 2**). Sedangkan hasil terendah terdapat pada ekstrak metanol bunga rosella dengan konsentrasi 25% (**Gambar 2**). *Methylene blue* sebagai kontrol positif memiliki rata-rata nilai tertinggi (**Gambar 2**), sedangkan metanol sebagai kontrol negatif memiliki nilai rata-rata terendah (**Gambar 2**).

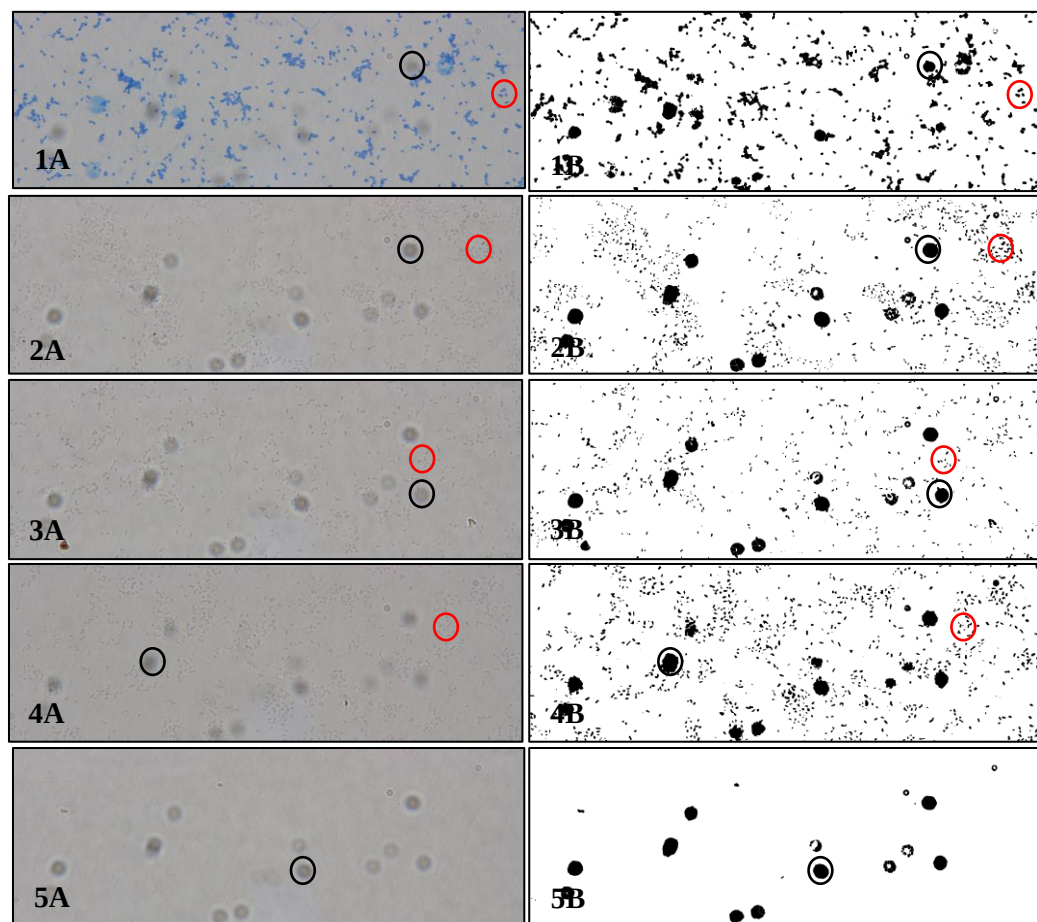
Hasil pengamatan deskriptif tertinggi pada bakteri *Escherichia coli* terdapat pada pewarnaan ekstrak metanol bunga rosella menggunakan konsentrasi 50% (**Gambar 2**). Dan nilai rata-rata terendah pada pewarnaan ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 75% (**Gambar 2**). *Methylene blue* sebagai kontrol positif memiliki nilai rata-rata tertinggi (**Gambar 2**), dan metanol sebagai kontrol negatif memiliki nilai rata-rata terendah (**Gambar 2**).





Gambar 3. Pengamatan Deskriptif *Staphylococcus aureus*

Keterangan: Gambar 3 menunjukkan hasil pewarnaan pada bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan *methylene blue* (1A), ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 75% (2A), 50% (3A), 25% (4A) dan metanol (5A) serta gambaran dalam ImageJ. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 1000x dengan minyak emersi. O debris ○ bakteri.



Gambar 4. Pengamatan Deskriptif *Escherichia coli*

Keterangan: Gambar 4 menunjukkan hasil pewarnaan pada bakteri *Escherichia coli* menggunakan *methylene blue* (1A), ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 75% (2A), 50% (3A), 25% (4A) dan metanol (5A) serta gambaran dalam ImageJ. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 1000x dengan minyak emersi. O debris ○ bakteri.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Deskriptif Bakteri *Staphylococcus aureus*

Konsentrasi	Koloni	Rata kontras ± SD	Rata warna ± SD	Rata bentuk ± SD	Rata debris ± SD	Rata total ± SD
MB	1	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	8,00±0,00
25%	1	1,07±0,06	1,15±0,13	2,00±0,00	2,00±0,00	6,22±0,52
50%	1	1,15±0,13	1,55±0,39	2,00±0,00	2,00±0,00	6,70±0,41

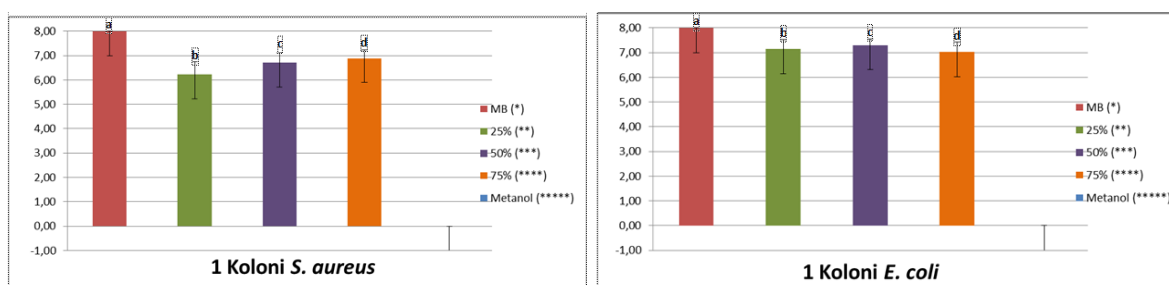
75%	1	1,26±0,06	1,63±0,32	2,00±0,00	2,00±0,00	6,89±0,35
Metanol	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Keterangan: Tabel 3. menampilkan data rata-rata nilai pengamatan deskriptif bakteri *Staphylococcus aureus* dari lima lapang pandang. Pengamatan dilakukan oleh tiga orang berbeda. Konsentrasi ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 75% memiliki nilai rata-rata tertinggi.

Tabel 4. Hasil Pengamatan Deskriptif *Escherichia coli*

Konsentrasi	Koloni	Rata kontras ± SD	Rata warna ± SD	Rata bentuk ± SD	Rata debris ± SD	Rata ± SD
MB	1	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	8,00±0,00
25%	1	1,22±0,19	1,93±0,06	2,00±0,00	2,00±0,00	7,15±0,38
50%	1	1,48±0,13	1,82±0,06	2,00±0,00	2,00±0,00	7,3±0,25
75%	1	1,18±0,13	1,85±1,3	2,00±0,00	2,00±0,00	7,03±0,39
Metanol	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Keterangan: Tabel 4. menampilkan data rata-rata nilai pengamatan deskriptif bakteri *Escherichia coli* dari lima lapang pandang. Pengamatan dilakukan oleh tiga orang berbeda. Konsentrasi ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 50% memiliki nilai rata-rata tertinggi.



Gambar 2. Grafik Rata-Rata Hasil Pengamatan Deskriptif

Keterangan: Gambar 2 menunjukkan hasil rata-rata pengamatan deskriptif *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, yang menunjukkan hasil pengamatan terbaik untuk *Staphylococcus aureus* adalah perlakuan ekstrak bunga rosella 75%, dan nilai terbaik untuk *Escherichia coli* adalah perlakuan ekstrak bunga rosella 50%. *Methylene blue* (a) menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) dengan ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 25% (**), 50% (***) dan metanol (****). Ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 25% (b) berbeda signifikan dengan semua konsentrasi. Ekstrak metanol bunga rosella konsentrasi 50% (c) berbeda signifikan dengan *Methylene blue* (*), konsentrasi 25% (**) dan metanol (****). Ekstrak rosella konsentrasi 75% (d) berbeda signifikan dengan konsentrasi 25% (**) dan metanol (****). Analisa statistik dilakukan dengan metode Mann-Whitney.

PEMBAHASAN

Perhitungan Akurasi dan Presisi Metode Pewarnaan Sederhana Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Menggunakan Ekstrak Metanol Bunga Rosella

Pada penelitian ini, hasil perhitungan yang didapatkan pada bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki nilai akurasi dan presisi yang tidak baik pada semua konsentrasi. Pada bakteri *Escherichia coli* didapatkan nilai akurasi yang baik pada konsentrasi 50% dan 75% serta nilai presisi yang tidak baik pada semua konsentrasi (85-115% dan 1,5%). Salah satu indikator buruknya nilai akurasi dan presisi adalah diameter koloni yang terbentuk pada tiap cawan petri berbeda-beda, sehingga koloni yang diambil pada saat perlakuan juga berbeda. Ahmad, 2015 menyatakan bahwa perhitungan kumpulan koloni yang besar dan menjadi satu deretan atau terlihat seperti satu garis tidak bisa di hitung sebagai satu koloni²⁰. Hasil perhitungan presisi pada *Methylene blue* juga mendapatkan hasil yang buruk (1,5%). Hal ini juga dapat diakibatkan oleh persebaran jumlah

bakteri antar lapang pandang yang jauh sehingga mempengaruhi nilai rata-rata RSD.

Methylene blue digunakan sebagai kontrol + (pembanding) dikarenakan *methylene blue* merupakan pewarna yang umum digunakan dalam pewarnaan bakteri sederhana. *Methylene blue* merupakan pewarna kationik yang memiliki muatan positif dan dapat mewarnai bakteri karena bakteri memiliki muatan negatif dalam bentuk gugus fosfat. Sehingga muatan negatif dari bakteri akan berikatan dengan muatan positif dari pewarna, menyebabkan pewarna akan terserap dan bakteri akan terwarnai²². Metanol merupakan senyawa polar yang digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi zat warna bunga rosella dan pada penelitian ini digunakan sebagai kontrol – dikarenakan tidak memiliki komponen pewarna sehingga tidak mampu mewarnai bakteri²³.

ImageJ digunakan untuk menghitung jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang terdapat pada 5 lapang pandang dan pada 3 kali pengulangan²⁴. Hasil perhitungan menunjukkan jumlah yang beragam dengan selisih antar lapang pandang yang cukup jauh. Hal ini dapat diakibatkan oleh debris

pengamatan yang ikut terhitung oleh ImageJ dan juga dapat diakibatkan oleh persebaran jumlah bakteri yang tidak merata pada tiap kaca preparat. Fokus pengamatan juga mempengaruhi hasil perhitungan bakteri pada tiap lapang pandang, karena fokus pengamatan yang buruk akan memperburuk hasil perhitungan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Pengamatan Deskriptif Pewarnaan Bakteri Menggunakan Ekstrak Metanol Bunga Rosella

Pada penelitian ini, hasil pengamatan deskriptif terbaik pada bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan pada pewarnaan ekstrak bunga rosella konsentrasi 75%. nilai rata-rata pada kontras, kualitas warna, bentuk bakteri dan debris yang didapatkan berturut-turut adalah 1,26, 1,63, 2, 2. Sedangkan untuk bakteri *Escherichia coli* hasil pengamatan deskriptif terbaik didapatkan pada ekstrak bunga rosella konsentrasi 50%. Nilai rata-rata pada kontras, kualitas warna, bentuk bakteri dan debris berturut-turut adalah 1,48, 1,82, 2, 2. Pengamatan deskriptif dilakukan dengan menilai empat komponen yang terdapat pada hasil pengamatan yaitu kontras, bentuk, warna, dan debris. Kontras dapat diartikan sebagai perbedaan warna yang jelas antara bakteri dengan latar belakang. Warna dapat diartikan sebagai kemampuan bakteri menyerap pewarna dengan baik. Bentuk diartikan sebagai gambaran bentuk bakteri yang sesuai dan dapat diidentifikasi. Debris diartikan sebagai material yang terlihat dalam pengamatan namun bukan bakteri atau pewarna.

Penelitian yang dilakukan oleh Handarini, 2014 menyebutkan bahwa ekstrak kelopak bunga rosella mengandung senyawa antosianin yang mampu memberi warna merah, biru hingga ungu. Antosianin merupakan senyawa golongan flavonoid dengan tiga atom karbon yang diikat oleh sebuah atom oksigen untuk menghubungkan dua cincin aromatik benzene (C₆H₆) di dalam struktur utamanya¹⁵. Ekstrak Bunga Rosella juga mengandung senyawa fenolik utama antosianin seperti delphinidin-3- glucoside, sambubioside, dan cyanidin-3- sambubioside; flavonoid lain seperti gossypetin, protocatechuic acid, eugenol, dan ergosterol⁴. Penelitian yang dilakukan oleh Marbun, 2020 menyebutkan bahwa antosianin yang terdapat pada sari ubi jalar ungu dapat mewarnai bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Komponen antosianin ubi jalar ungu adalah turunan mono atau diasetil 3-(2-glukosil) glukosil-5-glukosil peonidin dan sianidin¹⁰. Cara kerja antosianin dalam mewarnai bakteri adalah dengan berikatan dengan lapisan peptidoglikan pada dinding sel bakteri Gram positif yang bersifat asam hanya dapat mengikat larutan yang memiliki kadar pH

yang basa¹⁰.

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa antosianin pada ubi jalar ungu dapat dimanfaatkan menjadi pewarna alami untuk mewarnai preparat jamur *Trichophyton rubrum* dengan memperhatikan aspek stabilitas antosianin¹⁷. Penelitian yang dilakukan oleh Fatimatuszahro, 2019 menyebutkan bahwa antosianin dari ekstrak ubi jalar ungu juga mampu mewarnai *paramecium sp.* Rein, 2005 menyebutkan bahwa stabilitas antosianin dipengaruhi oleh temperatur, pH, cahaya, keberadaan ion logam, oksigen dan enzim. Sehingga dapat disimpulkan bahwa antosianin dari ekstrak bunga rosella memiliki jenis senyawa yang sama dengan ubi jalar ungu dikarenakan memiliki kemampuan berikatan dengan dinding sel yang tidak memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal. Hasil pengamatan deskriptif dari pewarnaan ekstrak bunga rosella dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya masih banyaknya komponen senyawa aktif lain yang masih terdapat pada ekstrak metanolik bunga rosella sehingga mempengaruhi kemampuan komponen pewarna pada ekstrak bunga rosella dalam mewarnai bakteri. Aspek stabilitas antosianin pada ekstrak bunga rosella juga mempengaruhi hasil pewarnaan. Pengaruh temperatur, pH, cahaya, keberadaan ion logam, oksigen dan enzim pada antosianin bunga rosella dapat mempengaruhi hasil pewarnaan dikarenakan antosianin yang berasal dari bahan alam memiliki sifat kurang stabil.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa statistik dan studi literatur yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Metode pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus* dengan ekstrak metanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L*) memiliki nilai akurasi dan presisi dibawah nilai standar (85-115% dan <1,5%).
2. Metode pewarnaan sederhana bakteri *Escherichia coli* dengan ekstrak metanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L*) memiliki nilai akurasi yang baik pada konsentrasi 50% dan 75% serta nilai presisi dibawah nilai standar (85-115% dan <1,5%).
3. Metode pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan ekstrak metanol bunga Rosella memiliki validitas dibawah standar berdasarkan parameter akurasi dan presisi.

SARAN

1. Melakukan pengenceran bakteri bertingkat agar didapatkan jumlah bakteri yang homogen.

2. Melakukan optimalisasi fokus pengamatan bakteri saat menggunakan mikroskop.
3. Melakukan isolasi komponen pewarna pada ekstrak metanolik bunga rosella

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) selaku pemberi dana pada penelitian ini, serta tim kelompok penelitian yang telah membantu proses penelitian ini. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada Dr.dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes. sebagai *peerreviewer*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Yulandi T, Saputra E, Daud S. Adsorpsi Zat Warna *Methylene blue* Menggunakan Spent Bleaching Earth Sebagai Adsorben. *Jom F Teknik* Volume 3 No. 2 Oktober 2016.
- [2]. Agnestisia R. Sintesis dan Karakterisasi Magnetit (Fe₃O₄) Serta Aplikasinya Sebagai Adsorben *Methylene blue*. *Sains dan Terapan Kimia*, Vol. 11, No. 2 (Juli 2017), 61 – 70.
- [3]. Mahbubah H G. Identifikasi Morfologi dan Molekuler Fungi (Isolat M) Yang Dapat Mendegradasi Pewarna Sintetik. Universitas Pendidikan Indonesia. 2013.
- [4]. Fauziati, Sampepana E. Pemanfaatan Ekstrak Bunga Rosella sebagai Bahan Pewarna pada Produk Kacang Goyang. *JRTI* Vol.10 No.1 Juni 2016.
- [5]. Bisri C, Pantiwati Y, Wahyuni S. Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Sebagai Pewarnaan Alternatif Alami Preparat Section Tanaman Cabe Merah Besar (*Capsicum annum* L.). Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi FKIP UNS. 4- 034.
- [6]. Mastuti E, Sari N P, Simangunsong R A. Ekstraksi Zat Warna Alami Kelopak Bunga Rosella Dengan Pelarut Aquadest. *E K U I L I B R I U M* Vol. 12. No. 2. Juli 2013 : 43 – 47.
- [7]. Anggisia M D, Widiyandari H, Anam K. Identifikasi dan Kuantifikasi Antosianin dari Fraksi Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L) dan Pemanfaatannya sebagai Zat Warna Dye-Sensitized Solar Cell (DSSC). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi* 19 (2) (2016) : 50 – 57.
- [8]. Septiadi A, Ramadhani W K. Penerapan Metode Anova untuk Analisis Rata-rata Produksi Donat, Burger, dan Croissant pada Toko Roti Animo Bakery. *Bulletin of Applied Industrial Engineering Theory* Vol. 1 No. 2 September 2020.
- [9]. Sawyer SF. Analysis of Variance: The Fundamental Concepts. *J Man Manip Ther*. 2009;17(2):27E-38E.
- [10]. Marbun R W S, Mardani F N, Aini U F. Pemanfaatan Sari Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* poiret) Sebagai Zat Pewarna Pada Pewarnaan Gram Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
- [11]. Artaya I P. Uji Anova (Anova Test). Universitas Narotama. Januari 2019.
- [12]. Harris L G, Foster S J, Richards R G. An Introduction To *Staphylococcus Aureus*, And Techniques For Identifying And Quantifying *S. Aureus* Adhesins In Relation To Adhesion To Biomaterials: Review. *European Cells and Materials* Vol. 4. 2002 (pages 39-60).
- [13]. Kusuma S A F. *Staphylococcus aureus*. Universitas Padjadjaran Fakultas Farmasi. Juni 2009.
- [14]. Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M. S. Donnenberg, M. Beaudry, and J. M. Fairbrother. 1994. Virulence properties and attaching/effacing activity of *E. coli* O45 associated from swine post weaning diarrhea. *Infection and Immunity* 62: 4153-4159.
- [15]. Pujiyono, Fauzan R D, Yulianto A. Pemanfaatan Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai Upaya dalam Meningkatkan Kesejahteraan dan Ekonomi Masyarakat Desa Sumberdem, Wonosari, Malang. *Jurnal SEMAR* Vol. 10 No. 1, hal. 22 – 28.
- [16]. Yanotama H D. Analisis Komponen Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan Bioautografinya. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2009.
- [17]. Haliza T N, Iza, Mulia Y S. Stabilitas Antosianin Ubi Jalar Ungu Sebagai Pewarna Alami Jamur *Trichophyton rubrum*. 2020.
- [18]. Kurniawan C, Waluyo T B, P, Sebayang P. Analisis Ukuran Partikel Menggunakan Free-Software Image-J. Seminar Nasional Fisika 2011 Pusat Penelitian Fisika-LIPI Serpong, 12-13 Juli 2011.
- [19]. Thomas A, Firman R N, Azhari A. Analisis radiograf periapikal menggunakan software ImageJ pada granuloma periapikal pada perawatan endodontik. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia* Vol 3 No 2 – Agustus 2017.
- [20]. Kadri A N, Gelgel K T P, Suarjana I G K. Perbedaan Cara Penyebaran Suspensi terhadap Jumlah Bakteri pada Media Eosin *Methylene blue* Agar. *Indonesia Medicus Veterinus* Juni 2015 4(3) :

- 205-212.
- [21]. Mardiah, Amalia L, Sulaeman A. Ekstraksi Kulit Batang Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Sebagai Pewarna Merah Alami. *Jurnal Pertanian* ISSN 2087-4936 Volume 1 Nomor 1, Oktober 2010.
 - [22]. Jawetz, Melnick & A. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology Twenty-Seventh Edition. virology herpes virus. [Internet]. **Medical Microbiology**. 2007. 464–470 p. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/abstract/10.1055/b-0034-71555>
 - [23]. Ramdani D, Marjuki, Chuzaemi S. Pengaruh perbedaan jenis pelarut dalam proses ekstraksi buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada pakan terhadap viabilitas protozoa dan produksi gas in-vitro. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 27 (2): 54 – 62
 - [24]. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. **Dep Farm Fmipa-Ui**. 2004;1(1).
 - [25]. Sriwidadi T. Penggunaan Uji Mann-Whitney Pada Analisis Pengaruh Pelatihan Wiraniaga Dalam Penjualan Produk Baru. *BINUS BUSINESS REVIEW* Vol. 2 No. 2 November 2011: 751-762
 - [26]. Lusiana, U. Penerapan Kurva Kalibrasi, Bagan Kendali Akurasi dan Presisi sebagai Pengendalian Mutu Internal pada Pengujian COD dalam Air Limbah. *BIOPROPAL INDUSTRI* Vol. 3 No. 1 Juni 2012.

