

POTENSI EKSTRAK METANOL DAUN JATI (*Tectona grandis*) SEBAGAI PEWARNA SEDERHANA PADA *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*

Qorina Aluf Supardi, Yoni Rina Bintari, Rio Risandiansyah*

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Penggunaan pewarna alamiah pada pewarnaan bakteri dapat mengurangi limbah yang disebabkan oleh pewarna sintetis yang bersifat toksik terhadap lingkungan biota sehingga berpengaruh terhadap kehidupan manusia. Daun jati (*Tectona grandis*) mengandung zat warna alami antosianin yang memberikan warna merah pada bahan organik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas pewarnaan sederhana dengan ekstrak daun *T. grandis* pada *S. aureus* dan *E. coli* yang kemudian menilai validasi hasil pewarnaan.

Metode: Penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* ini membandingkan pewarnaan sederhana dengan *Methylene blue* (kontrol positif), pewarna dengan ekstrak metanol *T. grandis* (konsentrasi 10%, 25%, 50%), dan metanol (kontrol negatif). Pengamatan preparat dengan mikroskop lalu bakteri yang terlihat dihitung untuk menilai kuantitas yaitu akurasi (98-102%) dan presisi (kurang dari 1,3%). Pengamatan kualitas pewarnaan dilakukan dengan pengamatan deskriptif. Analisa statistik menggunakan Mann-Whitney dengan *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 25.

Hasil: Akurasi memiliki nilai yang baik (98-102%) pada bakteri *E.coli* dengan konsentrasi herbal 25%, sedangkan presisi pada semua konsentrasi ekstrak *T.grandis* bakteri *S.aureus* dan *E.coli* tidak ada yang memiliki nilai presisi (kurang dari 1,3%). Pengamatan deskriptif pada bakteri *S.aureus* didapatkan hasil yang baik pada konsentrasi 50% dengan 2 koloni. Sedangkan pada *E.coli* didapatkan hasil baik pada konsentrasi 50% dengan 0,5 koloni. Kelemahan dari penelitian ini salah satunya disebabkan oleh metode perhitungan bakteri, debris pada preparat terhitung sebagai sel bakteri dan membuat hasil yang didapat tidak baik.

Kesimpulan: Ekstrak metanol daun *T.grandis* memiliki validitas sebagai pewarna sederhana bakteri.

Kata Kunci: Daun *Tectona grandis*, pewarnaan bakteri, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

*Penulis 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 in simple staining of bacteria can reduce waste caused by synthetic dyes that are toxic to the biota environment and it affects human life. *Tectona grandis* leaves contain natural anthocyanin dyes, which give organic matter a red color. This study aims to determine the quality of simple staining with teak leaf extract (*Tectona grandis*) on *S.aureus* and *E.coli* bacteria and then validation method is assessed.

Methods : This study is an *in vitro* laboratory experimental study. Simple staining was performed using methylene blue (positive control), teak leaf methanol extract with concentrations of 10%, 25%, 50% and methanol (negative control). Then the slide were observed under a microscope, then the visible bacteria were counted to assess the quantity, namely accuracy (98-102%) and precision (less than 1,3%). Observation of the quality of coloring is done by descriptive observation. Statistical analysis using Mann-Whitney on *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) vers 25.

Results : The accuracy has a good value (98-102%) on *E.coli* bacteria with a herbal concentration of 25%, while precision on all concentrations of *T.grandis* extracts of *S.aureus* and *E.coli* bacteria has no precision value (less than 1,3%). Descriptive observations on *S.aureus* bacteria obtained good results at a concentration of 50% with 2 colonies. Meanwhile, *E.coli* showed good results at a concentration of 50% with 0,5 colonies. One of the weakness of this study was caused by the bacterial counting method, debris on the slide was counted as bacterial cells and the results obtained were not good.

Conclusion : *T.grandis* leaf methanol extract has validity as a simple bacterial dye

Keywords: *Tectona grandis*, Simple staining, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

*Correspondence author:

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

Penyakit infeksi adalah penyebab utama morbiditas serta mortalitas dunia, WHO mengungkapkan pada tahun 1990 penyakit infeksi menyebabkan enam belas juta kematian serta pada tahun 2010 menurun menjadi lima belas juta.¹ Bakteri *S.aureus* menyebabkan lebih dari sepuluh juta kunjungan rawat jalan pertahun dan bakteri *E.coli* menyebabkan infeksi saluran pencernaan pada manusia mencapai lebih dari delapan juta penduduk dengan 0,1 juta kasus pertahun menyebabkan sepsis.^{2,3} Metode diagnostik pada infeksi bakteri salah satunya adalah dengan teknik pewarnaan sederhana. Pewarnaan sederhana merupakan teknik pewarnaan yang seringkali dipergunakan karena dapat diterapkan untuk seluruh jenis sel bakteri dan hanya memerlukan satu jenis zat warna.⁴

Penggunaan zat warna yang terlalu banyak menghasilkan limbah yang akan mencemari lingkungan, hal ini dikarenakan kurang lebih sekitar 280.000 ton limbah pewarna didapatkan setiap tahunnya⁵. Limbah pewarna sintesis yang besar juga akan menyebabkan kanker kandung kemih pada manusia, serta mengakibatkan alergi⁶. Salah satu pewarna tunggal atau sederhana yang sering digunakan pada pewarnaan bakteri adalah *methylene blue*. Penggunaan *methylene blue* secara luas akan mengakibatkan pencemaran limbah air yang akan menghalangi masuknya cahaya ke dalam air, mengurangi proses fotosintesis, serta menghabiskan oksigen terlarut dalam air⁷. Penggunaan zat warna yang terlalu banyak dan terus menerus bila tidak diperhatikan akan berbahaya bagi makhluk hidup.

Beberapa upaya untuk mengurangi pencemaran lingkungan adalah dengan mengganti pewarna sederhana *methylene blue* menggunakan pewarna bahan alam. Daun *T.grandis* sejak lama telah digunakan secara tradisional sebagai obat dan sebagai zat warna. Penggunaan daun *T.grandis* muda sebagai pewarna alami dapat memberikan warna merah sebab daun *T.grandis* memiliki pigmen alami yaitu antosianin⁸. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa pewarna daun *T.grandis* memberikan kualitas warna yang baik pada sel limfosit dan diperoleh waktu viabilitas yang sama dengan pewarna *trypan blue*⁸. Pada penelitian lainnya juga menyebutkan bahwa ekstrak kombinasi angkak dan daun *T.grandis* dapat digunakan menjadi alternatif pewarna penutup pada pewarnaan gram bakteri *E.coli*.⁹ Pada penelitian ini daun *T.grandis* diekstrak menggunakan larutan *metanol* karena pelarut *metanol* memiliki struktur molekul yang kecil serta mampu menembus semua jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktifnya keluar.¹⁰

Metode pewarnaan bakteri menggunakan daun *T.grandis* masih termasuk metode baru, karena hal itu maka perlu dilakukannya uji validitas.¹¹ Dalam penelitian ini, nilai validasi yang akan ditetapkan adalah akurasi dan presisi karena merupakan

parameter awal dari penilaian validasi suatu metode. Nilai akurasi dan presisi akan dihitung dari nilai bakteri yang terlihat pada pewarna dengan daun *T.grandis* dibandingkan pewarnaan bakteri dengan *methylene blue*. Pewarnaan bakteri dengan bahan alam sudah pernah dilakukan tetapi belum divalidasi, sehingga validitas metode baru tersebut masih belum bisa memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

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

Metode Ekstraksi Herbal

Metode ekstraksi dengan metode maserasi berdasarkan Anita dan Lean (2017) dengan beberapa modifikasi, dilakukan mengikuti Unit Pelaksana Teknis (UPT) Batu Materia Medika. Siplisia ditimbang menggunakan neraca digital dan dilarutkan menggunakan *metanol* 96% dengan perbandingan 1:10 (g/ml) yaitu siplisia dengan berat 20 g dilarutkan dengan *metanol* 96% sebanyak 200 ml kemudian direndam didalam Erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan dimasukkan *Shaker* selama 48 jam dengan kecepatan 60 rpm. Hasil ekstrak disaring untuk memperoleh filtrate kemudian dievaporasi. Hasil dari evaporasi dimasukkan kedalam oven dengan suhu 40°C dan didiamkan hingga menjadi ekstrak kental. Kemudian ekstrak kental tersebut dilarutkan 100 mg/ml dengan *metanol* 96%. Ekstrak kental tersuspensi dijadikan dalam beberapa konsentrasi yaitu 50%, 25%, 10% dan 0%. Hasil ekstrak kemudian dimasukkan kedalam botol dan disimpan di dalam kulkas.

Eksplorasi Ekstrak Herbal

Dilakukan eksplorasi untuk mencari konsentrasi terbaik yang akan dilakukan pada pewarnaan bakteri. Konsentrasi herbal yang menjadi acuan adalah 100%, 10%, dan 1% untuk kemudian dieksplorasi berdasarkan tingkatannya. Preparat diberi biakan bakteri menggunakan ose sebanyak 1 koloni setelah itu difiksasi diatas api dan diletakkan diatas bak pengecatan, kemudian ditetesi 100 µl ekstrak daun jati dan didiamkan selama 3 menit. Bakteri yang sudah diberi warna dicuci dengan aquades sampai bersih. Preparat kemudian diamati dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1.000 kali.

Inokulasi Bakteri

Inokulasi bakteri menggunakan NA berdasarkan Siti dan Wulan (2018). Bakteri *S.aureus* dan *E.coli* masing-masing diambil menggunakan ose dengan jumlah 3 ose dari stok media padat dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) FK UNISMA. Bakteri

kemudian diinokulasikan ke cawan petri yang berisi media padat Nutrient Agar (NA), dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam.

Pewarnaan Sederhana Bakteri Menggunakan Methylene blue

Pewarnaan menggunakan *methylene blue* dilakukan sebagai pembanding pada penelitian ini, hasil yang didapat saat pengamatan dibawah mikroskop terlihat bakteri berwarna biru, bentuk coccus pada *S.aureus* dan bentuk batang pada *E.coli*. Pada slide digambar lingkaran dengan diameter 2,5 cm, sebanyak 2 lingkaran per slide dan diberikan 1 tetes NS. Dari stok bakteri diambil 0,5 koloni, 1 koloni, 2 koloni menggunakan ose dan diletakkan di tengah-tengah lingkaran slide, lalu diratakan. Kemudian fiksasi diatas api bunsen dengan jarak sekitar 30 cm dari nyala api dan preparat ditunggu hingga kering. Slide ditetesi 100 µL *methylene blue* ditunggu selama 3 menit, cuci dengan aquades. Preparat diamati dengan mikroskop trinokuler menggunakan perbesaran 1.000 kali, dan minyak emersi. dan diamati dalam 5 (lima) lapang pandang.

Pewarnaan Sederhana Bakteri Menggunakan Ekstrak Metanol Daun *T.grandis*

Pada slide digambar lingkaran dengan diameter 2,5 cm, sebanyak 2 lingkaran per slide dan diberikan 1 tetes NS. Preparat diberi biakan bakteri menggunakan ose sebanyak 0,5 koloni, 1 koloni dan 2 koloni dan difiksasi diatas api. Sediaan yang sudah kering, diletakkan diatas bak pengecatan, dan ditetesi 100 µl pewarnaan bahan alam setelah itu didiamkan selama 3 menit. Bakteri yang sudah diberi warna dicuci dengan aquades dan diamati dibawah mikroskop trinokuler dengan perbesaran 1.000 kali, bakteri yang terlihat dihitung dalam 5 lapang pandang.

Pengamatan Deskriptif

Pengamatan deskriptif dilakukan berdasarkan Ivan dan Mustika (2020) dengan beberapa modifikasi. Preparat yang sudah diwarnai kemudian diamati dibawah mikroskop trinokuler pada perbesaran 1.000 kali dan diamati perubahan yang terjadi. Pengamatan deskriptif yang diperhatikan adalah :

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

Penentuan Nilai Akurasi dan Presisi

Pembuatan sampel akurasi dengan pembuatan larutan analit sebanyak minimal 3 (tiga) macam konsentrasi yang berbeda (10%, 25% dan 50%). Kemudian dilakukan perhitungan sel bakteri menggunakan *Image J* dengan 3 (tiga) lapang pandang. Kemudian hitung persen *Recovery* nya dengan **Rumus 1** berikut.:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{|Us - Ua|}{Us} \times 100\% \quad (1)$$

Dengan : || : Tanda hasil perhitungan mutlak

Us : Nilai bakteri sebenarnya (%)

Ua : Hasil pewarnaan Daun jati (%)

Perhitungan Presisi dilakukan dengan membuat tiga konsentrasi seperti saat melakukan uji validitas akurasi. Kemudian dihitung RSD (Relative Standard Deviation) menggunakan **Rumus 2** berikut :

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (2)$$

Dengan : SD : Standar Deviasi/simpangan baku

$\bar{x}$: Kadar rerata

Analisa Data Statistik

Pada penelitian ini, data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan SPSS 25.00 for windows. Uji hipotesa menggunakan uji *one way ANOVA*. Hasil dianggap signifikan apabila $p < 0,05$ dilanjutkan dengan Mann-Whitney hasil dianggap signifikan apabila $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Hasil Eksplorasi Pewarnaan Ekstrak Metanol Daun *T.grandis* pada *S.aureus* dan *E.coli*

Eksplorasi pertama dilakukan pada konsentrasi 1%, 10%, dan 100%. Eksplorasi kedua dilakukan pada konsentrasi 5% dan 7,5%, kemudian dilanjutkan dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75%. Pada tahapan eksplorasi yang digunakan untuk mencari konsentrasi terbaik untuk digunakan sebagai perlakuan, maka didapatkan kesimpulan bahwa ekstrak metanol daun jati yang bisa digunakan adalah konsentrasi 10%, 25% dan 50%.

Hasil Perhitungan Akurasi dan Presisi pada Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil foto dari preparat bakteri *S.aureus* dan *E.coli* yang didapat pada mikroskop trinokuler kemudian diamati sel bakteri yang terlihat menggunakan aplikasi ImageJ, kemudian dihitung menggunakan rumus akurasi dan presisi.

Akurasi dinyatakan sebagai %*Recovery*, nilai akurasi baik jika berada pada rentang 98-102. Presisi dinyatakan sebagai RSD, nilai presisi yang baik jika berada pada rentang <1,3%. Hasil perhitungan yang didapatkan bakteri *S.aureus* memiliki nilai akurasi dan presisi yang tidak baik pada semua konsentrasi (**Tabel 1**). Begitupula pada

bakteri *E.coli* memiliki nilai akurasi dan presisi yang tidak baik pada semua konsentrasi (**Tabel 2**).

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

Pelarut	Jumlah Koloni	Rata-rata Sel Bakteri	SD	%RSD	%Recovery
Methylene Blue	0,5 Koloni	932.67	144.86	15.53	-
	1 Koloni	1519	495.66	32.63	-
	2 Koloni	1625	518.82	31.93	-
T.grandis 10%	0,5 Koloni	7084.56	1171.44	16.54	759.6
	1 Koloni	9331.89	2766.46	29.65	614.34
	2 Koloni	12630.4	1894.7	15	777.26
T.grandis 25%	0,5 Koloni	6473.56	2981.14	46.05	91.38
	1 Koloni	6900.56	4818.18	69.82	73.95
	2 Koloni	8221	2527.53	30.74	65.09
T.grandis 50%	0,5 Koloni	8768.44	2282.32	26.03	135.45
	1 Koloni	8784.56	1087.38	12.38	127.3
	2 Koloni	10025.78	5028.49	50.16	121.95
Metanol	0,5 Koloni	156.22	24.36	15.59	1.78
	1 Koloni	164.56	22.5	13.67	1.87
	2 Koloni	150.22	23.93	15.93	1.50

Keterangan: Tabel 1 menunjukkan hasil pengukuran akurasi dan presisi ekstrak *metanol* daun jati konsentrasi 10%, 25%, dan 50% pada pewarnaan sederhana bakteri *S.aureus* yang dijadikan dalam beberapa koloni yaitu 0,5 Koloni, 1 koloni dan 2 koloni, dengan *methylene blue* sebagai pembanding dan *metanol* sebagai kontrol negatif. Pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan dan pengambilan gambar berjumlah tiga lapang pandang.

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

Pelarut	Jumlah Koloni	Rata-rata Sel Bakteri	SD	%RSD	%Recovery
Methylene Blue	0,5 Koloni	2903.78	1721.84	59.30	-
	1 Koloni	3213.11	397.6	12.37	-
	2 Koloni	3826.11	1955.31	51.1	-
T.grandis 10%	0,5 Koloni	5170.56	3037.29	58.74	178.06
	1 Koloni	8093.78	2336.8	28.87	251.9
	2 Koloni	7308.22	3349.63	45.83	191.01
T.grandis 25%	0,5 Koloni	7092.56	2088.89	29.45	137.17
	1 Koloni	8213.56	3909.31	47.6	101.48
	2 Koloni	8847.11	5051.73	57.1	121.06
T.grandis 50%	0,5 Koloni	3728.11	1063.61	28.53	52.56
	1 Koloni	7700.67	3319.6	43.11	93.76
	2 Koloni	4890.22	2998.84	61.32	55.27
Metanol	0,5 Koloni	154.56	31.22	20.20	4.15
	1 Koloni	137.44	31.09	22.62	1.78
	2 Koloni	143.22	36.17	25.25	2.93

Keterangan: tabel 2 menunjukkan hasil pengukuran akurasi dan presisi ekstrak *metanol* daun jati konsentrasi 10%, 25%, dan 50% pada pewarnaan sederhana bakteri *E.coli* yang dijadikan dalam beberapa koloni yaitu 0,5 koloni, 1 koloni dan 2 koloni, dengan *methylene blue* sebagai pembanding dan *metanol* sebagai kontrol negatif. Pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan dan pengambilan gambar berjumlah tiga lapang pandang.

Hasil Pengamatan Deskriptif pada Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Hasil pengamatan deskriptif menggunakan ekstrak *metanol* daun *T.grandis* dilihat menggunakan mikroskop trinokuler dengan

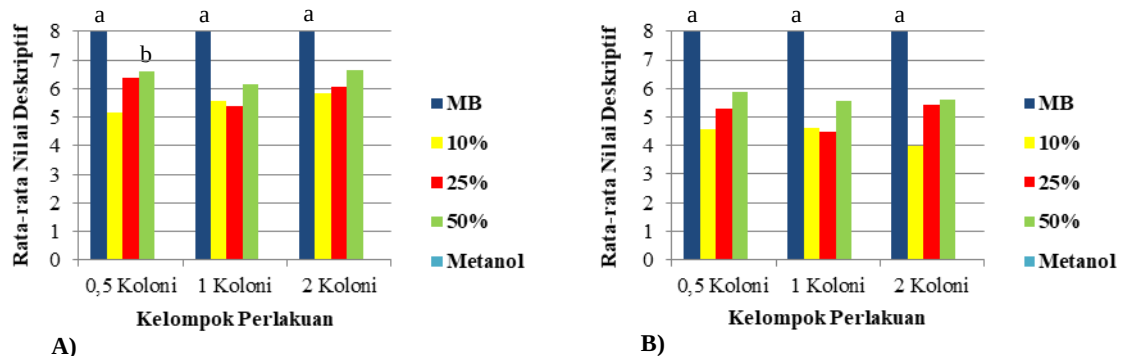
perbesaran 1000x. Kemudian preparat diambil dalam tiga lapang pandang dan dinilai kontras, warna, bentuk dan debris. Setelah dilakukan penilaian deskriptif kemudian hasil pengamatan dijadikan grafik untuk melihat rata-rata perlakuan

terbaik pada bakteri *S.aureus* (**Gambar 1a**), maupun pada bakteri *E.coli* (**Gambar 1b**).

Pengamatan deskriptif tertinggi *Staphylococcus aureus* terdapat pada konsentrasi 50% 2 koloni dengan nilai rata-rata 6,67 (**Gambar 2**). Sedangkan hasil terendah terdapat pada konsentrasi 10% 0,5 koloni dengan nilai rata-rata 5,17. *Methylene blue* sebagai kontrol (+) memiliki rata-rata nilai tertinggi yaitu 8 (**Gambar 2**), sedangkan *metanol* sebagai

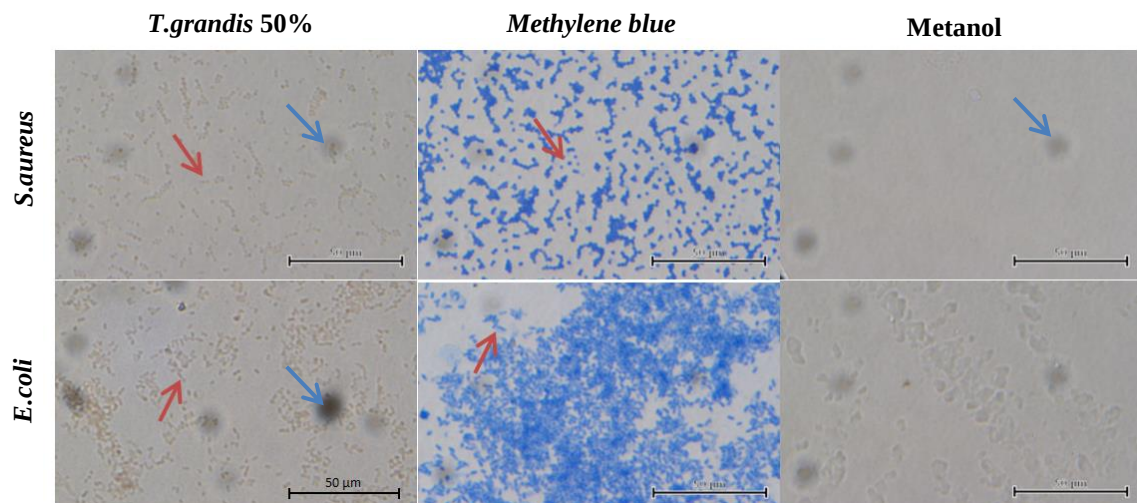
kontrol negatif (0%) memiliki nilai rata-rata terendah yaitu 0 (**Gambar 2**).

Pengamatan deskriptif tertinggi *Escherichia coli* terdapat pada konsentrasi 50% 0,5 koloni dengan nilai rata-rata 5,89 (**Gambar 2**). Sedangkan hasil terendah terdapat pada konsentrasi 10% 2 koloni dengan nilai rata-rata 4. *Methylene blue* sebagai kontrol (+) memiliki rata-rata 8 (**Gambar 2**), sedangkan *metanol* sebagai kontrol (-) memiliki nilai rata-rata terendah yaitu 0 (**Gambar 2**).



Gambar 1. Grafik Pengamatan Deskriptif

Keterangan: Gambar 1A menunjukkan hasil pengamatan deskriptif *Staphylococcus aureus*, nilai terbaik pada daun jati 50% 2 koloni dengan rata-rata 6,67. Gambar 1B menunjukkan hasil pengamatan deskriptif *Escherichia coli*, nilai terbaik adalah daun jati 50% 1/2 koloni dengan rata-rata 5,89. Tanda (a = *Methylene blue*) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada semua konsentrasi. Tanda (b) menunjukkan nilai signifikan konsentrasi 50% 0,5 koloni yang diuji menggunakan analisa statistik Mann-Whitney.



Gambar 2. Hasil Gambar Pengamatan Deskriptif

Keterangan: Gambar 2 menunjukkan hasil pengamatan deskriptif pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Pewarna yang digunakan adalah ekstrak metanol *T. grandis* 50%, *methylene blue* sebagai kontrol positif, dan metanol sebagai kontrol negatif. Panah merah menunjukkan sel bakteri yang terlihat dimana pada *S.aureus* berbentuk coccus dan pada *E.coli* berbentuk batang. Panah biru menunjukkan debris yang disebabkan oleh mikroskop. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop trinokuler dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak emersi.

PEMBAHASAN

Hasil Pewarnaan Bakteri Menggunakan Ekstrak Metanol *Tectona grandis*

Pada penelitian ini menggunakan ekstrak *metanol* daun *T. grandis* konsentrasi 10%, 25%, dan 50%, penelitian sebelumnya menggunakan

konsentrasi 100% tanpa membuat beberapa konsentrasi. Peneliti membuat beberapa konsentrasi dikarenakan setelah melakukan eksplorasi terhadap ekstrak *metanol* daun *T. grandis* 100%, ekstrak tidak bisa mewarnai bakteri dikarenakan debris yang terlalu banyak, kemudian konsentrasi diturunkan

menjadi 75% tetapi debris yang terlihat masih banyak dan masih menutupi bentuk bakteri. Pada konsentrasi 50%, dan 25% bentuk bakteri terlihat dengan baik pada *S.aureus* dan *E.coli*. Penggunaan tiga konsentrasi pada penelitian ini dikarenakan pengukuran validasi akurasi dan presisi paling tidak dilakukan dalam tiga kali replikasi dan tiga kali pengulangan.¹⁷

Penelitian yang dilakukan oleh Baharuddin, 2015 menyatakan bahwa daun *T.grandis* memiliki pigmen alami yaitu antosianin dan keratinoid.¹² Daun *T.grandis* juga memiliki pigmen bernama pelargonidin yang merupakan golongan antosianidin, yaitu aglikon dari antosianin yang terbentuk jika antosianin dihidrolisis dengan asam, kandungan ini membuat ekstrak daun jati berwarna merah.¹³ Antosianin adalah senyawa flavonoid, senyawa antosianin merupakan senyawa yang bernama kation flavylium dan tergolong ke dalam turunan benzopiran.¹⁴ Pada lingkungan pH yang semakin asam, antosianin akan berbentuk kation flavylium dan menghasilkan warna merah.¹⁵

Berdasarkan penelitian sebelumnya penggunaan ekstrak kombinasi angkak dan daun jati sebagai pewarna penutup (*counterstain*) pada pewarnaan gram dapat digunakan untuk menjadi pengganti safranin (*counterstain*).⁹ Selain itu, Penelitian lainnya juga menyebutkan bahwa kandungan antosianin yang terkandung di dalam buah naga untuk pewarnaan sederhana pada bakteri *S.aureus* dan *E.coli* menghasilkan warna yang tidak baik dikarenakan banyaknya kandungan air dalam buah naga.¹⁶

Methylene blue sebagai kontrol pembanding memiliki hasil yang baik dimana pada bakteri *S.aureus* dan *E.coli* warna yang dihasilkan biru dan bentuk coccus dari *S.aureus* dan bentuk batang pada *E.coli* sangat jelas terlihat. Tetapi pada beberapa hasil perlakuan terdapat bakteri yang saling bertumpukan dan menyebabkan bentuk bakteri tidak terlihat. Hal ini akan mempengaruhi hasil perhitungan pada aplikasi *ImageJ*.

Hasil pengamatan deskriptif ditemukan bahwa ekstrak *metanol* daun *T.grandis* menghasilkan nilai terbaik pada bakteri *S.aureus* 2 koloni dengan konsentrasi herbal daun *T.grandis* 50%, sedangkan untuk bakteri *E.coli* hasil pengamatan deskriptif terbaik adalah ekstrak *metanol* daun *T.grandis* 50% 0,5 koloni. Perbedaan nilai antara *S.aureus* dan *E.coli* dikarenakan dinding sel pada bakteri gram positif mempunyai struktur dinding sel yang lebih tebal dibandingkan gram negatif, lapisan peptidoglikan yang lebih tebal membuat *S.aureus* mampu mempertahankan zat warna dan bakteri lebih terlihat kontras ketika diamati di bawah mikroskop.¹⁶ Pada bakteri *E.coli* didapatkan kualitas warna yang kurang baik karena warna yang diserap oleh lapisan pada peptidoglikan dinding sel yang tipis tidak sempurna dan menyebabkan bakteri kurang terwarnai sehingga menyebabkan bentuk dan kontras dari bakteri kurang terlihat ketika diamati dibawah mikroskop.¹⁶ Penelitian sebelumnya

menyatakan ekstrak daun *T.grandis* baik digunakan untuk melihat bentuk bakteri, karena itu perlu dilakukan kombinasi herbal untuk mendapatkan nilai yang baik.⁹

Akurasi dan Presisi Perhitungan Jumlah Bakteri

Perhitungan sel bakteri merupakan metode untuk mengetahui berapa banyak koloni yang terbentuk dari suatu media secara langsung maupun tidak langsung. Metode yang dilakukan dalam menghitung bakteri memiliki beberapa kelemahan seperti keterbatasan alat, ketelitian peneliti dan lain-lain.²² Maka dari itu perhitungan bakteri pada penelitian ini menggunakan *software ImageJ* karena dapat diunduh secara gratis dan efektif.

Image-J merupakan *software* gratis yang berfungsi untuk pengolahan gambar digital berbasis Java, dibuat oleh Wayne Rasband dari Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.¹⁸ Penggunaan *ImageJ* dalam analisis gambar digital telah digunakan secara luas dalam bidang kesehatan dan biologi. Meskipun hasil gambar pada penelitian dapat memberikan informasi terhadap hasil penelitian, tetapi ada saatnya suatu gambar yang dihasilkan mempunyai kualitas yang kurang bagus, sehingga penggunaan aplikasi *ImageJ* perlu untuk dilakukan.¹⁹

Pada penelitian ini, hasil gambar yang dianalisis menggunakan *ImageJ* memiliki debris yang masih terlalu banyak, sehingga saat dianalisis debris tetap terhitung oleh *ImageJ* dan menyebabkan hasil hitung bakteri terlalu besar. Kelompok perlakuan dengan menggunakan ekstrak *metanol* daun *T.grandis*, kontras antara bentuk bakteri dengan latar belakang masih terlalu samar, sehingga saat dianalisis menggunakan *ImageJ* peneliti harus menyesuaikan kontras agar bakteri dapat tetap terhitung. Sedangkan pada kontrol pewarnaan menggunakan *methylene blue*, gambar yang dihasilkan bersih dan tidak ada debris yang terlihat, sehingga peneliti tidak perlu menaikkan kontras agar gambar lebih jelas terlihat.

Hasil perhitungan akurasi dan presisi pada ekstrak *metanol* daun *T.grandis* terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli* tidak didapatkan nilai yang baik kecuali pada bakteri *E.coli* dengan konsentrasi *T.grandis* 25%. Selain itu perbedaan nilai pada tiap perlakuan sering berbeda sangat jauh, salah satu indikator berbedanya nilai akurasi dan presisi di tiap pengulangan adalah diameter koloni yang terbentuk pada tiap cawan petri berbeda-beda, sehingga koloni yang diambil oleh peneliti juga berbeda di tiap perlakuan. Ari 2019 dalam penelitiannya melakukan perhitungan diameter koloni bakteri menggunakan jangka sorong digital dan didapatkan hasil diameter yang berbeda-beda pada setiap koloni.²⁰ Ahmad 2015 menyebutkan bahwa perhitungan kumpulan koloni yang besar dan menjadi satu deretan atau ketika terlihat seperti satu garis tidak bisa dihitung sebagai satu koloni.²¹

Hasil dari perhitungan juga menyatakan bahwa jumlah bakteri terlalu variatif dan tidak seimbang sehingga menyebabkan nilai RSD yang tidak baik. Karena itu, perlu untuk mencari metode selain menggunakan koloni bakteri agar jumlah sel tidak terlalu bervariasi. Hal yang sama juga diamati pada variable pewarnaan lain. Pada perlakuan menggunakan daun *T.grandis* pada semua konsentrasi baik pada bakteri *S.aureus* dan *E.coli* memiliki nilai yang tidak baik (lebih dari 1,3%). Hal ini juga kemungkinan disebabkan oleh berbedanya ukuran pada tiap koloni dan banyaknya debris yang terlihat saat pengamatan yang dan menyebabkan hasil pada daun *T.grandis* sangat tinggi.

Pada konsentrasi 0% (*metanol*) hasil didapat karena debris pada preparat terhitung sebagai bakteri saat perhitungan menggunakan *imageJ*. Debris pada pewarnaan *metanol* muncul salah satunya dari mikroskop yang kotor sehingga menyebabkan pada semua preparat terdapat bentuk debris yang sama. Selain itu preparat yang didiamkan pada suhu ruang menyebabkan slide menjadi kotor dan berdebu. Karena hal itu, maka saat diamati dihitung menggunakan *ImageJ*, debris dari *metanol* terhitung sebagai bakteri.

Berdasarkan penjelasan sebelumnya maka pada nilai %*Recovery* daun *T.grandis* tidak bisa dilakukan, karena *methylene blue* sebagai pembanding tidak memiliki nilai yang akurat yang disebabkan oleh ukuran koloni yang berbeda-beda sehingga menyebabkan jumlah bakteri yang terhitung terlalu bervariasi dan tidak seimbang. Debris yang tetap terhitung disebabkan oleh *ImageJ* yang tidak bisa membedakan antara debris dan bakteri serta kontras yang terlalu samar, sehingga walaupun perhitungan *ImageJ* sudah menggunakan protokol yang benar hasil akan tetap tidak sesuai. Maka dari itu pada penelitian diperlukan pengamatan kualitas dengan menggunakan scoring yang dilakukan oleh dua orang pengamat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa statistik dan studi literatur dapat disimpulkan bahwa :

1. Pewarnaan sederhana dengan ekstrak *metanol* daun jati (*Tectona grandis*) memiliki tingkat akurasi dan presisi yang lebih rendah daripada *methylene blue*, baik pada bakteri *S.aureus* maupun *E.coli*.
2. Pewarnaan sederhana dengan ekstrak *metanol* daun jati (*Tectona grandis*) memiliki kualitas pewarnaan yang lebih rendah daripada *methylene blue* baik pada bakteri *S.aureus* maupun *E.coli*.
3. Penggunaan ekstrak *metanol* daun jati (*Tectona grandis*) dengan konsentrasi 50% memiliki kualitas pewarnaan paling baik diantara ekstrak *metanol* konsentrasi 10% dan 25%, baik pada bakteri *Staphylococcus aureus* maupun pada bakteri *Escherichia coli*

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka peneliti menyarankan untuk:

1. Melakukan pengambilan sampel yang akan menghasilkan jumlah sel yang lebih akurat
2. Melakukan kombinasi antara ekstrak daun jati dengan herbal lain (contoh : *Monascus anka*) yang memiliki warna lebih kuat untuk dilakukan pada pewarnaan diferensial.

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.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Bachir G, Abouni B. ***Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Most Common Source Of Infection**. Battle Against Microb Pathog Basic Sci. 2015;2(January 2015):637–48.
- [2]. Myles Ia, Datta Sk. ***Staphylococcus aureus: An Introduction***. Semin Immunopathol. 2012;34(2):181–4.
- [3]. Prasetya Ya, Winarsih Iy, Pratiwi Ka, Hartono Mc, Rochimah Dn. **Deteksi Fenotipik *Escherichia coli* Penghasil Extended Spectrum Beta-Lactamases (Esbls) Pada Sampel Makanan di Krian Sidoarjo**. Life Sci. 2019;8(1):95–105.
- [4]. Moyes Rb, Reynolds J, Breakwell Dp. **Preliminary Staining Of Bacteria: Simple Stains**. Curr Protoc Microbiol. 2009;(Suppl. 15):1–5.
- [5]. Saratale Rg, Saratale Gd, Chang Js, Govindwar Sp. **Bacterial Decolorization and Degradation Of Azo Dyes : A Review Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers Bacterial Decolorization And Degradation Of Azo Dyes : A Review**. J Taiwan Inst Chem Eng. 2011;42(1):138–57.
- [6]. Adeyemo.Dkk Sm. **The Use Of Plant Dyes For Microbial Staining And Identification : An Eco-Friendly The Use Of Plant Dyes For Microbial Staining And Identification : An Eco-Friendly And Non-Toxic Alternative Method**. 2018;(January).
- [7]. Yu Xz, Feng Yx, Yue Dm. **Phytotoxicity Of *Methylene blue* To Rice Seedlings**. Glob J Environ Sci Manag. 2015;1(3):199–204.
- [8]. Tumangkeng Ga. **Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis*) Alternatif Pewarna pada Penghitungan Jumlah dan Viabilitas Sel Kultur Dibandingkan**

- dengan Pewarna Tryphan Blue. J Emba. 2013;1(4):78–85.
- [9]. Virgianti Dp. **Penggunaan Ekstrak Kombinasi Angkak dan Daun Jati sebagai Pewarna Penutup pada Pewarnaan Gram.** J Kesehat Bakti Tunas Husada. 2017;17(1):66.
- [10]. Ahayu Sitir, Urniasih Nuk, Malia Danvinaa. **Limbah Kulit Bawang Merah sebagai Antioksidan Alami.** 2015;2(1).
- [11]. Harmita. **Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya.** Dep Farm Fmipa-Ui. 2004;1(1).
- [12]. Baharuddin A, Aisyah A, Saokani J, Risnah Ia. **Karakterisasi Zat Warna Daun Jati (*Tectona grandis*) Fraksi Metanol:N-Heksana sebagai Photosensitizer pada Dye Sensitized Solar Cell.** Chim Nat Acta. 2015;3(1).
- [13]. Pratama Y. **Pemanfaatan Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis* Linn. F.) sebagai Indikator Titration Asam-Basa.** Skripsi Univ Negeri Semarang. 2013;6.
- [14]. Ariesandy Easra. **Pigmen Antosianin : Identifikasi dan Manfaatnya bagi Industri Makanan dan Farmasi.** 1st Ed. Malang; 2016.
- [15]. Feri Am, Andarwulan Kn. **Karakteristik Warna dan Aktivitas Antioksidan Antosianin Ubi Jalar Ungu [Color Characteristics And Antioxidant Activity Of Anthocyanin Extract From Purple Sweet Potato].** J Teknol Dan Ind Pangan. 2014;25(2):176–84.
- [16]. Jiwintarum Y, Rohmi, Prayuda Idpm. **Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*) Sebagai Pewarna Alami Untuk Pewarnaan Bakteri.** J Kesehat Prima. 2016;10(2):1726–34.
- [17]. Rohman Igga. **Kimia Farmasi Analisis.** Yogyakarta; 2007.
- [18]. Candra Kurniawan, Thomas Budi Waluyo Ps. **Particle Size Analysis Using Free-Software Imagej.** 2011;(May).
- [19]. Neng Nenden Mulyaningsih, Fita Widiyatun Sew. **Rekomendasi Teknik Analisis Citra Sem dengan Menggunakan Free Software Imagej.** Wahana Fis. 2020;5(2):104–12.
- [20]. Cahyono Ad. **Pengaruh Penambahan Media Kultur Terhadap Pertumbuhan Bakteri Simbion Larva *Oryctes rhinoceros* L.** 1st Ed. Skripsi. Sumatera Utara; 2019. 29 P.
- [21]. Kadri An, Gelgel Ktp, Suarjana Igk. **Perbedaan Cara Penyebaran Suspensi terhadap Jumlah Bakteri pada Media Eosin *Methylene blue* Agar.** Indones Med Veterinus. 2015;4(3):205–12.
- [22]. Yanti Fitri, Rosmania. **Perhitungan Jumlah Bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Menggunakan Pengembangan Metode Spektrofotometri.** Jurnal Penelitian Sains. 2020; 22 (2): 76-86.