

VALIDASI METODE PEWARNAAN SEDERHANA BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* DENGAN EKSTRAK METANOL DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*)

Ibrahim Ashri, Yoni Rina Bintari, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Pewarna alami dapat menjadi solusi terhadap efek negatif yang ditimbulkan pewarna sintetik. Daun teh hijau (*Camellia sinensis*) sebagai pewarna alami telah sering digunakan pada pewarnaan industri tekstil. Penelitian ini bertujuan untuk menilai kualitas pewarnaan alami daun teh hijau dibandingkan dengan pewarna sintetik *Methylene Blue* pada pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, kemudian dilakukan validasi metode akurasi dan presisi.

Metode: Penelitian ini bersifat eksperimental *in vitro*. Pewarnaan sederhana dilakukan dengan menggunakan *Methylene Blue* sebagai kontrol positif (+) dan daun teh hijau (*Camellia sinensis*) konsentrasi 2,5%, 5%, dan 7,5%. Jumlah bakteri dihitung dalam 5 lapang pandang menggunakan software ImageJ dan dilakukan perhitungan akurasi dan presisi. Dilakukan pula pengamatan deskriptif oleh tiga pengamat yang berbeda, dan dilakukan uji statistik metode Mann-Whitney.

Hasil: Pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, di semua konsentrasi nilai yang diperoleh tidak memenuhi standar %Recovery (80-110%). Sama halnya dengan nilai presisi kedua bakteri tidak ada yang memenuhi standar *Relative Standard Deviation* (11%). Pada pengamatan deskriptif nilai tertinggi kedua bakteri diperoleh pada konsentrasi 7,5%.

Kesimpulan: Pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) memiliki tingkat akurasi dan presisi yang lebih rendah daripada *Methylene Blue* namun memiliki nilai pengamatan deskriptif yang baik pada konsentrasi 7,5%.

Kata Kunci: *Camellia Sinensis*; Pewarnaan Sederhana; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; Akurasi; Presisi

*Korespondensi

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

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

Telp +62(341)578920

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

ABSTRACT

Introduction: Natural dyes can be a solution for the negative effects of synthetic dyes. Green tea leaves (*Camellia sinensis*) as a natural dye have been frequently used in the textile industry. This study aims to assess the quality of natural staining of green tea leaves compared with synthetic dye *Methylene Blue* on simple staining of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria, then validate the accuracy and precision of the method.

Methods: This research is experimental *in vitro*. Simple staining was performed using *Methylene Blue* as a positive control (+), and methanol extract of green tea leaves (*Camellia sinensis*) with a concentration of 2.5%, 5%, and 7.5%. The number of bacteria was counted in 5 fields of view using ImageJ software and accuracy and precision were calculated. Descriptive observations were also carried out by two different observers, and statistical tests were carried out using the Mann-Whitney method.

Results: In *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria, in all concentrations the values obtained did not meet the %Recovery standard (80-110%). Similarly, the precision value of the two bacteria did not meet the *Relative Standard Deviation* (11%). In descriptive observations the second highest value bacteria was obtained at a concentration of 7.5%.

Conclusion: Simple staining of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria with methanol extract of green tea leaves (*Camellia sinensis*) has a lower accuracy and precision than *Methylene Blue* but has a good descriptive observation value at a concentration of 7.5%.

Keywords: *Camellia Sinensis*; Simple Staining; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; Accuracy; Precision

*Correspondence to

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

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

Telp +62(341)578920

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Methylene Blue adalah pewarna kationik thiazine yang tidak berwarna dalam keadaan tereduksi namun berwarna biru tua dalam keadaan teroksidasi¹. Dalam pewarnaan bakteri, pewarna *Methylene Blue* sering digunakan dalam metode pewarnaan sederhana dan sebagai *counterstain* pada pewarnaan tahan asam (*Acid-fast staining*) atau metode Ziehl-Neelsen². *Methylene Blue* sebagai pewarna sintetis, memiliki efek negatif terhadap kesehatan manusia dan juga lingkungan. Dampak yang dapat ditimbulkan oleh *Methylene Blue* terhadap kesehatan manusia di antaranya yaitu iritasi pada kulit dan mata, takikardi, sianosis, dispnea, dan jika *Methylene Blue* tertelan, maka dapat menyebabkan iritasi pada saluran pencernaan, mual, dan diare³. Limbah *Methylene Blue* juga termasuk limbah *non-degradable* atau limbah yang tidak dapat diuraikan secara alami. Maka penelitian ini bertujuan untuk mencari alternatif bahan pewarna untuk pewarnaan bakteri dengan bahan dasar bahan alam, yang tidak membahayakan kesehatan manusia dan limbahnya mudah terurai secara alami sehingga tidak mengancam kesehatan lingkungan.

Penggunaan bahan alam untuk pewarnaan bakteri dapat menjadi solusi untuk menghindari efek negatif yang ditimbulkan oleh pewarna sintetis, karena bahan alam memiliki sifat non toksik dan limbahnya mudah terurai oleh alam. Salah satu contoh studi bahan alam sebagai pewarna alami bakteri menyebutkan bahwa ubi jalar ungu terbukti dapat mewarnai bakteri gram positif karena memiliki pH basa yaitu 10 sehingga dapat diserap oleh dinding sel bakteri⁴. Pada penelitian ini bahan alam yang digunakan adalah daun teh hijau. Penggunaan daun teh hijau pada penelitian ini didasari oleh kemudahan untuk memperoleh daun teh hijau dimanapun dan daun teh hijau juga sering digunakan sebagai pewarna pada bidang industri juga contohnya pada produk kain seperti kain wol, katun, hingga karpet⁵. Sifat daun teh yang mudah didapatkan dimanapun, dapat membantu memfasilitasi peneliti yang di daerahnya distribusi pewarna sintetis *Methylene Blue* belum dijangkau.

Daun teh hijau (*Camellia sinensis*) diketahui mengandung berbagai senyawa, di antaranya polifenol (tanin dan flavonoid). Beberapa jenis senyawa tanin yang dapat dimanfaatkan sebagai pewarna alami adalah Gallocatechin, epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (EGC), dan epigallocatechin gallate (EGCG)⁵. Tanin diketahui dapat digunakan sebagai pewarna alami yang dapat memberi warna kuning pucat sampai coklat tua. Tanin dapat berikatan dengan protein kolagen yang ada di kulit dan membuat ikatan silang sehingga dihasilkan produk kulit⁶. Maka diduga dengan kemampuan tanin membentuk ikatan dengan protein, dapat bekerja untuk mewarnai bakteri dengan cara berikatan dengan protein yang ada di membran sel bakteri.

Penelitian ini akan melakukan pewarnaan ekstrak daun teh hijau pada bakteri yang digunakan yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Perbedaan dari jenis gram bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menjadi dasar pemilihan kedua bakteri tersebut. Hal ini bertujuan untuk melihat apakah ada perbedaan efek dari pewarna alami daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap perbedaan jenis gram yaitu gram positif dan gram negatif.

Uji validasi merupakan suatu metode dalam penelitian untuk menilai parameter tertentu sehingga penelitian tersebut dapat dibuktikan persyaratannya dan penggunaannya⁷. Pewarnaan bakteri dengan bahan alam merupakan metode yang masih jarang dilakukan, sehingga perlu dilakukan uji validasi. Dalam penelitian ini parameter uji validasi yang digunakan adalah akurasi dan presisi. Akurasi adalah kesesuaian hasil analisis dengan nilai benar analitis atau *true value*⁸. Sedangkan presisi adalah ukuran yang membuktikan derajat kedekatan antara hasil individual⁹. Pemilihan parameter akurasi didasari oleh kesamaan fungsi parameter tersebut dengan tujuan penelitian ini yaitu ingin melihat apakah daun teh hijau dapat mewarnai bakteri dengan baik sama seperti pewarnaan standar dalam pewarnaan sederhana *Methylene Blue*. Sedangkan parameter presisi dapat membuktikan apakah metode yang digunakan nantinya dapat dilakukan oleh siapapun dan dalam kondisi yang berbeda namun tetap memberikan hasil yang sama.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

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

Ekstraksi Daun Teh Hijau

Prosedur ekstraksi herbal dilakukan dengan mengikuti Unit Pelaksana Teknis (UPT) Materia Medika Batu. Simplisia yang diperoleh ditimbang dengan menggunakan neraca digital dan dilarutkan dengan metanol 97% dengan perbandingan 1:10 (g/ml) yaitu, simplisia dengan berat 20 g dilarutkan dengan metanol 97% sebanyak 200 ml dan direndam di dalam Erlenmeyer. Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil dan diletakkan pada shaker selama 48 jam dengan kecepatan 60 rpm. Setelah itu hasil ekstrak yang diperoleh disaring dengan tujuan memperoleh filtrate. Filtrate yang diperoleh kemudian dievaporasi. Hasil dari evaporasi dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C dan didiamkan sampai menjadi ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut kemudian disuspensikan 100 mg/ml dengan larutan metanol 97%. Ekstrak kental yang telah disuspensi dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 2,5%, 5%, dan 7,5%.

Inokulasi Bakteri

Bakteri yang digunakan (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*), disiapkan dari stok media padat dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) FK UNISMA. Masing-masing dari bakteri

tersebut kemudian diambil dengan menggunakan ose yang telah difiksasi dan diinokulasikan ke cawan petri yang berisi media cair *Nutrient Agar (NA)*. Kemudian *NA* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam.

Pewarnaan Sederhana Bakteri Menggunakan *Methylene Blue*

Kaca slide dibersihkan terlebih dahulu dengan *alcohol swab*, kemudian digambar satu lingkaran yang memiliki diameter 2,5 cm dan ditetesi NS menggunakan pipet tetes sebanyak 1 tetes. Kemudian setiap slide diberi label sesuai jenis bakteri dan jumlah koloninya. Kemudian bakteri dari *NA* diambil menggunakan ose yang telah difiksasi sebelumnya dan diterapkan pada slide sesuai label.

Bakteri diambil sebanyak 1 koloni dan diterapkan pada kaca *slide*. Setelah diterapkan, larutan NS dan bakteri diratakan sesuai ukuran lingkaran yang telah dibuat dan kemudian difiksasi dengan dilewatkan diatas api bunsen. Kemudian dilakukan pewarnaan bakteri dengan *Methylene Blue* pada bak pewarnaan. Dengan menggunakan mikropipet tiap preparat ditetesi dengan pewarna *Methylene Blue* sebanyak 100 µl dan didiamkan selama 3 menit untuk tiap preparat. Setelah didiamkan selama 3 menit, preparat dibilas dengan akuades dan didiamkan hingga kering. Preparat yang telah kering, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop Trinokuler dengan perbesaran 1000x, dan ditambahkan minyak emersi. Kemudian bakteri yang terlihat diamati dalam 5 lapang pandang dan dihitung jumlahnya¹⁰.

Pewarnaan Sederhana dengan Ekstrak Metanol Daun Teh Hijau

Kaca slide dibersihkan terlebih dahulu dengan *alcohol swab*, kemudian dibuat lingkaran pada slide dengan diameter 2,5 cm. Setelah dilingkari masing-masing kaca slide diberi label sesuai jenis bakteri, dan konsentrasi pewarna ekstrak. Kaca slide kemudian ditetesi NS dengan menggunakan pipet tetes sebanyak 1 tetes. Kemudian biakan bakteri diambil dari *NA* dengan menggunakan ose yang telah difiksasi dan diterapkan pada kaca slide sesuai label yang ada pada kaca slide. Larutan NS dan bakteri diratakan sesuai dengan diameter lingkaran pada kaca slide. Preparat kemudian difiksasi dengan dilewatkan diatas api bunsen. Tiap preparat yang telah kering kemudian ditetesi dengan pewarna ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) konsentrasi 2,5%, 5%, dan 7,5%.

Pewarna ekstrak metanol daun teh hijau dan metanol kemudian diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 100 µl dan didiamkan selama 3 menit. Kemudian preparat dibilas dengan menggunakan akuades dan didiamkan hingga kering. Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop Trinokuler dengan pembesaran 1000 kali dan ditambahkan minyak emersi. Kemudian bakteri yang terlihat diamati dalam 5 lapang pandang dan dihitung jumlahnya¹⁰.

Pengamatan Deskriptif

Untuk melakukan pengamatan deskriptif, preparat yang telah diwarnai diletakkan di bawah mikroskop dan diamati perubahan yang terjadi. Pengamatan deskriptif dilakukan untuk melihat:

1. Kontras preparat dengan latar belakang terlihat dengan jelas atau tidak (2 = kontras terlihat jelas, 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 terwarnai (2 = kualitas baik, 1 = kualitas kurang baik, 0 = bentuk bakteri tidak terlihat).
4. Debris (2 = tidak ada debris/bersih, 1 = debris terlihat namun tidak sampai menutupi seluruh badan bakteri, 0 = debris menutupi keseluruhan bakteri).

Penghitungan Jumlah Bakteri dengan ImageJ

ImageJ adalah sebuah platform atau program yang sering digunakan untuk memproses dan menganalisis gambar yang sering digunakan dalam studi biologi atau studi bidang yang lain. Platform ini dikembangkan oleh Wayne Rasband di *National Institutes of Health (NIH)*¹¹. ImageJ gratis untuk diunduh, hal ini membuat ImageJ menjadi salah satu alat analisis gambar yang paling populer dan paling banyak digunakan¹².

Sebelum dilakukan perhitungan, gambar diubah menjadi 8-bit agar format gambar menjadi RGB dengan memilih *Image>Type>8-bit*. Bakteri dihitung otomatis dengan menggunakan algoritma *Threshold* sehingga dapat membedakan partikel yang diinginkan dengan latar belakang. Untuk mengatur threshold, gambar dipilih kemudian digunakan opsi *Image>Adjust>Threshold>* atur algoritma sesuai yang diinginkan *>Apply*. Agar partikel pada gambar tidak bergabung, perlu dilakukan proses *Watershed* dengan memilih *Process>Binary>Watershed*. Kemudian partikel pada gambar dihitung dengan memilih *Analyze>Analyze Particle*^{13,14}.

Penentuan Nilai Akurasi dan Presisi

Pengujian metode validasi akurasi dilakukan dengan metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan dihitung dengan ImageJ. Larutan analit dibuat minimal sebanyak tiga macam konsentrasi yang berbeda. Perhitungan sel dilakukan menggunakan ImageJ dengan 5 lapang pandang. Kemudian persen *recovery* dihitung dengan rumus¹⁵:

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

Keterangan:

x: Hasil pewarnaan menggunakan Daun Teh Hijau

µ: Nilai yang sebenarnya

Metode presisi yang dilakukan merupakan presisi kategori *repeatability*. Metode ini dilakukan dengan membuat 3 seri konsentrasi sama seperti saat melakukan uji validitas akurasi. *RSD (Relative Standard Deviation)* dihitung dengan rumus⁷:

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

Keterangan: SD: Standar Deviasi atau simpangan baku
 $\bar{X}$: Kadar rerata

Analisa Data Statistik

Pada penelitian ini dilakukan pengujian data Mann-Whitney. Uji Mann-Whitney menyatakan jika tidak terdapat perbedaan antara dua kelompok data dan kedua kelompok data tersebut tidak diperoleh dari sampel yang terkait¹⁶. Jumlah sel bakteri yang diperoleh dari pewarnaan ekstrak herbal daun teh hijau dan pewarnaan *Methylene Blue* sebagai kontrol (+) merupakan data yang dibandingkan. Setelah dilakukan uji data statistik, dilakukan penilaian deskriptif antara pewarnaan dengan ekstrak daun teh hijau dan pewarnaan dengan *Methylene Blue* sebagai kontrol (+) yang dilakukan secara manual oleh tiga orang pengamat.

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Hasil Perhitungan Akurasi Presisi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

ImageJ digunakan untuk menghitung hasil perhitungan akurasi dan presisi ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Nilai akurasi dinyatakan dalam %Recovery. Nilai akurasi dapat dikatakan baik jika rentan nilainya berada pada 80-110%. Sedangkan untuk presisi dinyatakan sebagai *Relative Standard Deviation*, dan nilai presisi dapat dikatakan baik jika rentan nilainya 11%.

Setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali sehingga nantinya dapat memperoleh nilai akurasi dan presisi yang paling baik. Nilai perhitungan akurasi yang

memenuhi standar (80-110%) tidak diperoleh pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Escherichia coli*. Sama halnya untuk nilai presisi baik pada bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli* tidak ada yang memenuhi standar *Relative Standard Deviation* yaitu 11% (Tabel 1 dan Tabel 2).

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

Pengamatan deskriptif pada pewarnaan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dilakukan dengan menggunakan mikroskop trinokuler dengan perbesaran 1000x dan ditambahkan dengan minyak emersi. Hasil pengamatan kemudian dinilai kontras, warna, bentuk dan debrisnya. Pengamatan deskriptif dilakukan oleh tiga orang pengamat yang berbeda agar tidak terdapat bias dari hasil pengamatan.

Hasil pengamatan deskriptif tertinggi pewarnaan dengan ekstrak daun teh hijau, pada bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan pada ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 7,5% dengan nilai rata-rata 3,8 (Tabel 3). Sedangkan untuk hasil terendah didapatkan pada konsentrasi 5% dengan nilai rata-rata 3,2. Hasil pengamatan deskriptif pewarnaan dengan *Methylene Blue* sebagai kontrol positif memiliki nilai tertinggi yaitu 8 (Gambar 1a dan Gambar 2).

Hasil pengamatan deskriptif *Escherichia coli* yang tertinggi didapatkan pada ekstrak metanol daun teh hijau konsentrasi 7,5%, dengan nilai rata-rata 4,7 (Tabel 4). Sedangkan untuk hasil terendah didapatkan pada konsentrasi 2,5% dengan nilai rata-rata 2,0. *Methylene Blue* sebagai kontrol positif memiliki nilai rata-rata tertinggi yaitu 8. (Gambar 1b dan Gambar 3).

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

Konsentrasi Herbal	Mean±SD	%RSD	%Recovery
Teh Hijau 2,5%	7474.13±5102.72	68.27	466.63
Teh Hijau 5%	5543.53±1658.49	29.92	346.10
Teh Hijau 7,5%	1817.00±615.76	33.89	113.44
MB	1601.73±442.31	27.61	

Keterangan: Tabel 1. Menunjukkan hasil perhitungan akurasi dan presisi ekstrak metanol daun teh hijau dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 7,5%, *Methylene Blue* sebagai pembanding pada pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus* 1 koloni. Tiap kelompok perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan (n=3) dan dilakukan pengambilan gambar sebanyak 5 lapang pandang.

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

Konsentrasi Herbal	Mean±SD	%RSD	%Recovery
Teh Hijau 2,5%	6351.78±3661.66	57.65	155.98
Teh Hijau 5%	4985.11±3540.87	71.03	122.42
Teh Hijau 7,5%	4722.22±1817.70	38.49	155.96
MB	4072.11±577.15	14.17	

Keterangan: Tabel 2. Menunjukkan hasil perhitungan akurasi dan presisi ekstrak metanol daun teh hijau dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 7,5%, *Methylene Blue* sebagai pembanding pada pewarnaan sederhana bakteri *Escherichia coli* 1 koloni. Tiap kelompok perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan (n=3) dan dilakukan pengambilan gambar sebanyak 5 lapang pandang.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Deskriptif *Staphylococcus aureus*

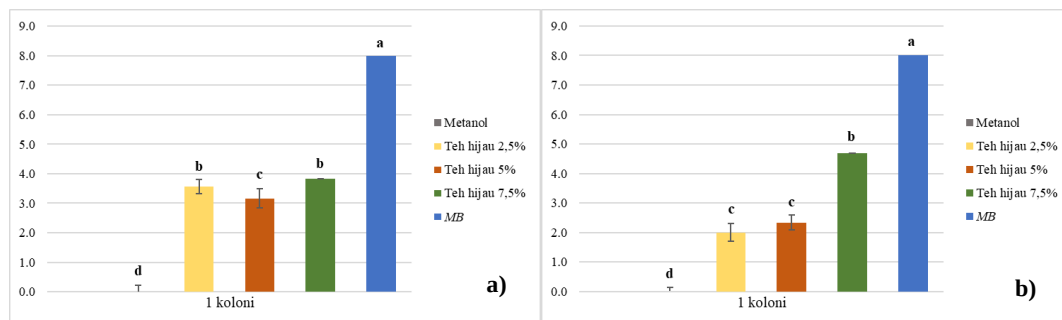
Konsentrasi Herbal	Kontras			Warna			Bentuk			Debris			Hasil
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Teh Hijau 2,5%	1.3	0.7	1.0	1.0	1.0	0.6	1.0	1.0	0.4	0.4	1.0	0.7	3.6
Teh Hijau 5%	0.7	1.3	0.8	0.7	1.0	0.8	1.3	1.0	0.6	0.0	0.7	0.6	3.2
Teh Hijau 7,5%	1.1	1.3	1.0	0.8	0.7	1.7	1.2	1.3	1.0	0.2	0.3	0.9	3.8
MB	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	8.0

Keterangan: Tabel 3. menampilkan data rata-rata nilai pengamatan deskriptif bakteri *Staphylococcus aureus* dari lima lapang pandang. Pengamatan dilakukan oleh tiga orang berbeda.

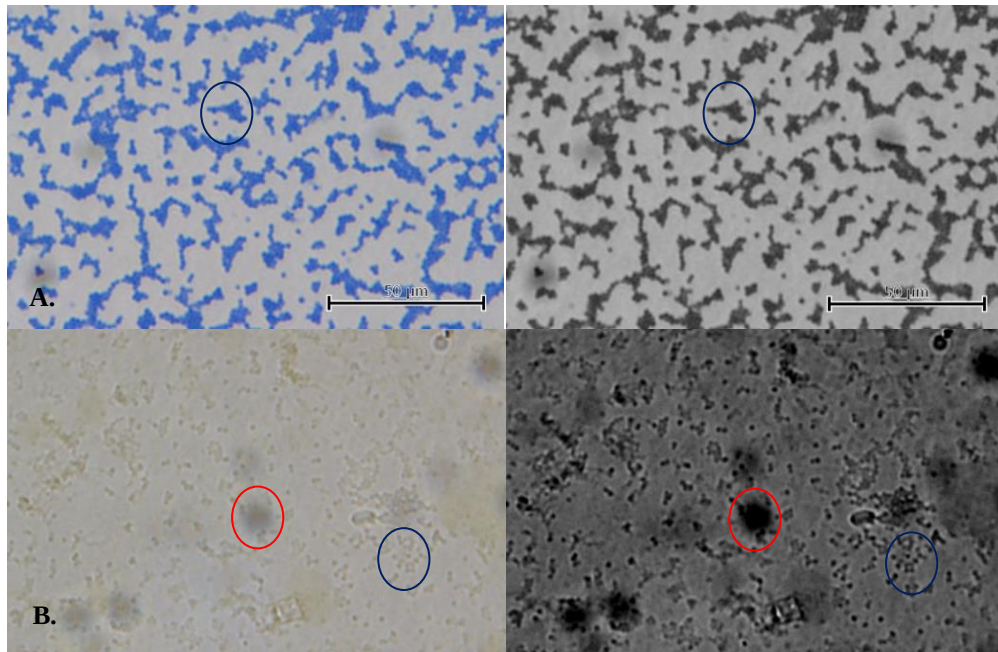
Tabel 4. Hasil Pengamatan Deskriptif *Escherichia coli*

Konsentrasi Herbal	Kontras			Warna			Bentuk			Debris			Hasil
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Teh Hijau 2,5%	0.3	0.7	0.6	0.3	0.7	1.0	0.7	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	2.0
Teh Hijau 5%	0.6	0.6	1.0	0.6	0.9	0.9	0.2	0.8	1.0	0.0	0.3	0.1	2.3
Teh Hijau 7,5%	1.0	1.3	1.6	1.0	1.7	1.7	0.7	1.0	1.1	0.8	1.3	0.9	4.7
MB	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	8.0

Keterangan: Tabel 4. menampilkan data rata-rata nilai pengamatan deskriptif bakteri *Escherichia coli* dari lima lapang pandang. Pengamatan dilakukan oleh tiga orang berbeda.

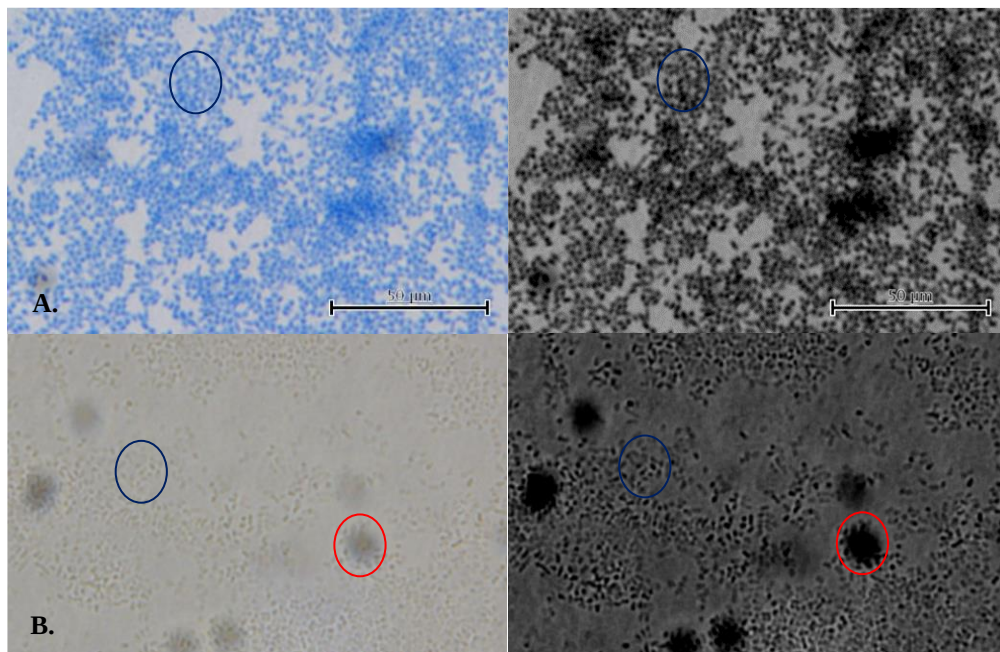
**Gambar 1. Hasil Pengamatan Deskriptif a) Bakteri *Staphylococcus aureus* dan b) *Escherichia coli***

Keterangan: Gambar 1. Menampilkan grafik hasil pengamatan deskriptif bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Pada kedua bakteri nilai terbaik didapatkan pada ekstrak metanol daun teh hijau konsentrasi 7,5% 1 koloni dengan rata-rata 3,8 untuk bakteri *S. aureus* dan 4,7 untuk bakteri *E. coli*. a, b, c, d...= huruf berbeda menandakan perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0,05$). Analisa statistik dilakukan dengan metode Mann-Whitney.



Gambar 2. Hasil Pewarnaan Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan A. *Methylene Blue*, dan B. Ekstrak Metanol Daun Teh Hijau Konsentrasi 7,5%

Keterangan: Gambar 2. Menunjukkan hasil pewarnaan A. *Methylene Blue* (kontrol positif), dan B. ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) konsentrasi 7,5% pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan gambaran dalam software ImageJ. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop Trinokuler dengan minyak emersi perbesaran 1000x. O Gerombolan bakteri, O Debris.



Gambar 3. Hasil Pewarnaan Bakteri *Escherichia coli* dengan A. *Methylene Blue*, dan B. Ekstrak Metanol Daun Teh Hijau Konsentrasi 7,5%

Keterangan: Gambar 3. menunjukkan hasil pewarnaan A. *Methylene Blue* (kontrol positif), dan B. ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) konsentrasi 7,5% pada bakteri *Escherichia coli* dan gambaran dalam software ImageJ. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop Trinokuler dengan minyak emersi perbesaran 1000x. O Gerombolan bakteri, O Debris.

PEMBAHASAN

Perhitungan Akurasi dan Presisi

Pada penelitian ini, pewarna *Methylene Blue* dijadikan sebagai kontrol positif atau pembanding, dikarenakan *Methylene Blue* merupakan pewarna yang umum digunakan dalam pewarnaan sederhana, sehingga peneliti ingin membandingkan kualitas pewarnaan *Methylene Blue* dengan bahan alam yang digunakan dan apakah pewarna bahan alam yang digunakan dapat dijadikan sebagai pewarna alternatif yang bersifat ramah lingkungan dan non toksik^{2,17}. *Methylene Blue* sebagai pewarna kationik, memiliki muatan positif dan dapat dengan mudah mewarnai bakteri karena bakteri memiliki muatan negatif dalam bentuk gugus fosfat. Muatan negatif dari bakteri nantinya akan bergabung dengan muatan positif dari pewarna sehingga pewarna akan diserap dan bakteri akan terwarnai¹⁸.

Pada penelitian ini, ImageJ digunakan untuk menghitung jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dari foto yang diambil dalam 5 lapang pandang di tiap konsentrasi dan tiap bakteri dilakukan 3 kali pengulangan^{7,10}. Hasil rata-rata yang diperoleh tidak maksimal dan beragam. Hal ini dapat dikarenakan debris pada gambar slide hasil pewarnaan ataupun dari mikroskop ikut terhitung oleh ImageJ¹⁹. Debris dapat berasal dari ekstrak yang tidak encer atau tidak homogen, sehingga ada bahan-bahan yang tidak larut dari ekstrak yang menjadi debris dan mengganggu hasil perhitungan bakteri dengan ImageJ. Pada gambar pengamatan hasil pewarnaan bakteri dengan ekstrak metanol daun teh hijau, kontras bakteri dengan latar belakang tidak terlalu jelas, sehingga perlu dilakukan pengaturan pada panel *color balance* ImageJ. Panel *color balance* berfungsi untuk mengatur kecerahan dan kontras dalam satu warna pada gambar. Berbeda dengan hasil pewarnaan dengan pewarna *Methylene Blue*, panel *color balance* tidak digunakan karena hasil pewarnaan sudah baik sehingga kontras bakteri dengan latar belakang terlihat dengan jelas²⁰.

Perhitungan akurasi pewarnaan ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) pada bakteri *Staphylococcus aureus* tidak diperoleh nilai yang memenuhi standar %*Recovery* (80-110%). Nilai yang paling mendekati standar diperoleh pada konsentrasi 7,5% dengan nilai 113,44. Pada bakteri *Escherichia coli* nilai yang diperoleh juga tidak memenuhi standar %*Recovery* (80-110%). Nilai yang mendekati standar diperoleh pada konsentrasi 5% dengan nilai 122,42²¹. Perhitungan nilai rata-rata *Standard Deviation* pada kedua bakteri tidak ada yang memenuhi kriteria *Relative Standard Deviation* (11%). Nilai rata-rata yang diperoleh di tiap konsentrasi dan pengulangan berbeda-beda dan dengan jarak yang jauh. Hal ini dapat dipengaruhi oleh distribusi sel bakteri pada kaca slide yang tidak merata dan tidak seragam. Distribusi sel yang tidak seragam pada kaca slide dapat mempengaruhi perolehan data jumlah total bakteri²². Bias dari peneliti juga dapat menjadi penyebab dari hasil

perhitungan yang berbeda-beda. Bias adalah penyimpangan dari kebenaran dalam mengumpulkan, menganalisis, menginterpretasi, dan mempublikasikan data. Bias dapat bersifat disengaja ataupun tidak disengaja²³. Bias pada penelitian ini dapat terjadi saat penerapan bakteri pada kaca slide. Bias dapat terjadi saat pengambilan koloni dalam jumlah yang telah ditentukan, misalnya yang seharusnya 1 koloni, namun yang diterapkan dapat lebih atau kurang dari 1 koloni.

Hasil perhitungan presisi *Methylene Blue* pada kedua bakteri diperoleh nilai rata-rata *RSD* yang tidak sesuai dengan standarnya (11%) dan nilainya beragam. Sama halnya dengan pewarnaan daun teh hijau, hal ini juga dapat dipengaruhi oleh faktor distribusi bakteri pada kaca slide yang tidak merata dan seragam²², sehingga di tiap pengulangan rata-rata *RSD* yang diperoleh berbeda beda dengan jarak yang jauh.

Pengamatan Deskriptif Pewarnaan Ekstrak Metanol Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) pada Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Teh hijau (*Camellia sinensis*) memiliki kandungan senyawa yang kaya akan flavonoid, tanin, dan katekin. Sekitar 80-90% flavonoid teh hijau adalah katekin (tanin terkondensasi). Teh hijau mengandung lebih banyak katekin dibandingkan dengan jenis teh lain. Jenis katekin pada teh hijau antara lain (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), dan (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)²⁴.

Ekstrak tanin daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dapat digunakan sebagai pewarna alami pada berbagai jenis kain. Ekstrak daun teh hijau dapat digunakan untuk mewarnai kain wol, dan membuat kain wol tersebut menjadi warna coklat²⁵. Tannin memiliki kemampuan untuk membentuk ikatan silang yang efektif antara protein dan makromolekul lainnya karena terdapat gugus hidroksil fenolik²⁶. Gugus hidroksil fenolik akan membentuk ikatan dengan gugus polar protein melalui ikatan hidrogen²⁷. Daun teh hijau lebih aman untuk digunakan dibandingkan pewarna sintetik karena tidak bersifat toksik, karsinogenik, dan limbahnya dapat terurai dengan alami¹⁶.

Pengamatan deskriptif dilakukan dengan menilai empat parameter yaitu kontras, bentuk, warna, dan debris. Kontras merupakan perbedaan yang dapat terlihat antara bakteri dengan latar belakang. Warna merujuk kepada bakteri terwarnai atau menyerap pewarna dengan baik. Bentuk merujuk pada gambaran bentuk bakteri yang sesuai dan dapat diidentifikasi. Debris merujuk kepada material yang bukan merupakan bagian dari bakteri atau pewarna yang biasanya terlihat dalam pengamatan²⁸.

Pada pengamatan deskriptif, hasil dengan nilai rata-rata tertinggi pada pewarnaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* sama-

sama didapatkan dari konsentrasi ekstrak metanol daun teh hijau 7,5% dengan nilai rata-rata 3,8 pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan 4,7 pada bakteri *Escherichia coli*. Gambar yang diperoleh dari hasil pewarnaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan ekstrak metanol daun teh hijau konsentrasi 7,5%, pada tiap pengulangan rata-rata gambarnya memiliki kualitas yang memenuhi parameter pengamatan deskriptif (kontras, warna, bentuk, dan debris) dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih rendah yaitu 5% dan 2,5%. Hal ini dapat disebabkan oleh konsentrasi ekstrak daun teh hijau pada 7,5% lebih banyak dibandingkan pada konsentrasi 5% dan 2,5%.

Kemampuan bakteri menyerap kandungan tanin dari ekstrak metanol daun teh hijau didasari oleh kemampuan tanin untuk membentuk ikatan kompleks dengan protein atau molekul lain pada dinding bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* melalui ikatan hidrogen. Pada bakteri *Staphylococcus aureus*, terdapat asam teikoat yang merupakan suatu kelompok polimer yang mengandung fosfat, ada sekitar 40% komponen asam teikoat yang terdapat pada dinding sel *Staphylococcus aureus*²⁹. Pada bakteri *Escherichia coli*, terdapat disosiasi gugus karboksil dan fosfat dalam peptidoglikan dan lipopolisakarida dinding sel³⁰.

KESIMPULAN

1. Pewarnaan sederhana bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli* dengan ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia Sinensis*) memiliki tingkat akurasi dan presisi yang lebih rendah dari *Methylene blue*.
2. Pewarnaan sederhana dengan ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) memiliki kualitas pewarnaan yang lebih rendah daripada *Methylene blue* baik pada bakteri *Staphylococcus aureus* maupun bakteri *Escherichia coli*.
3. Ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 7,5% memiliki kualitas pewarnaan pada bakteri *Staphylococcus aureus* maupun pada bakteri *Escherichia coli* yang paling baik dibandingkan ekstrak metanol daun teh hijau (*Camellia sinensis*) konsentrasi 5% dan 2,5%.

SARAN

1. Penerapan bakteri pada preparat menggunakan metode yang memisahkan bakteri agar tidak bergerombol.
2. Melakukan ekstraksi daun teh hijau dengan metode yang menghasilkan ekstrak homogen sehingga menurunkan bahan-bahan yang tidak larut.
3. Menggunakan bahan alam lain selain daun teh hijau yang menghasilkan warna yang lebih kuat dan terang

4. Metode perhitungan bakteri dilakukan secara manual, tidak menggunakan ImageJ.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan rendah hati peneliti ucapkan terimakasih kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) yang telah membiayai berjalannya proses penelitian ini, dan kepada Dr. dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes sebagai *peer reviewer*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Miclescu A, Wiklund L. *Methylene blue, an old drug with new indications?* *Jurnalul Rom Anestezie Ter Intensiva/Romanian J Anaesth Intensive Care*. 2010;17(1):35–41.
- [2]. Putri HM, Sukini, Yodong. Mikrobiologi, Buku Ajar Keperawatan Gigi. Jakarta: **Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan**; 2017. 401 p.
- [3]. Fil BA, Özmetin C, Korkmaz M. *Cationic dye (methylene blue) removal from aqueous solution by montmorillonite*. *Bull Korean Chem Soc*. 2012;33(10):3184–90.
- [4]. Misbach SR, Yuniarty T. **Pemanfaatan Sari Ubi Jalar Ungu (Ipomoea Batatas Poiret) Sebagai Zat Pewarna Pada Pewarnaan Staphylococcus Aureus**. *Teknolab*. 2016;5(2):1–5.
- [5]. Vankar PS. *Low Temperature Optimized Dyeing of Cotton, Wool and Silk with Extract of Camellia Sinensis (Tea Leaves)*. *J Text Eng Fash Technol*. 2017;2(1):274–80.
- [6]. Falcão L, Araújo MEM. *Vegetable tannins used in the manufacture of historic leathers*. *Molecules*. 2018;23(5):8–10.
- [7]. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. **Dep Farm Fmipa-Ui**. 2004;1(1).
- [8]. Rahmiati TN. **Validasi Metode Untuk Analisis Kandungan Uranium Menggunakan Potensiometer T-90**. *Pus Sains dan Teknol Akselerator*. 2016;
- [9]. M. K. S, Budari, IG. N. A. Dewantara, N. P. A. D W. **Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar A-Mangostin Pada Gel Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) Dengan Klt-Spektrofotodensitometri**. 2013;
- [10]. Budiawan IGO, Suwiti NK, Suastika IP, Besung INK. **Pengaruh Pemberian Pegagan (Centella asiatica) terhadap Gambaran Mikroskopis Usus Halus Mencit yang Diinfeksi Salmonella typhi**. *Bul Vet Udayana*. 2012;4(2):15–21.
- [11]. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. **ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data**. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):1–26.
- [12]. Eliceiri KW, Berthold MR, Goldberg IG, Ibáñez L, Manjunath BS, Martone ME, et al. **Biological imaging software tools**. *Nat Methods*. 2012;9(7):697–710.

- [13]. Al-osta IM, Diab MS, Al-shreef SAS. ***Journla of Molecular Pharmaceutics & Organic Process Research ImageJ for Counting of Labeled Bacteria from Smartphone-Microscope Images***. 2021;9(2).
- [14]. Kurniawan C, Waluyo TB, **Perdamean Sebayang**. Analisis Ukuran Partikel Menggunakan Free Software Image-J. *Semin Nas Fis*. 2011;(Juli 2011):1–9.
- [15]. Lusiana U. ***Application of Calibration Curve, Accuracy and Precision Chart as Internal Quality Control at COD Testing in Wastewater***. *Biopropal Ind*. 2012;3(1):1–8.
- [16]. Sriwidadi T. Dalam Penjualan Produk Baru Pendahuluan Ruang Lingkup Penelitian Landasan Teori. *Binus Bus Rev*. 2011;2 No, 2:751–62.
- [17]. Bydoon EA. ***Extraction of Natural Dye from Tea Leaves and its Application on Giza 86 Egyptian Cotton Fabric***. *Int J Adv Sci Eng*. 2017;3(4):455–62.
- [18]. Jawetz, Melnick & A. Jawetz, Melnick, & Adelberg's *Medical Microbiology Twenty-Seventh Edition*. virology herpes virus. ***Medical Microbiology***. 2007. 464–470 p.
- [19]. Pride L, Agehara S. ***Useful Image-Based Techniques for Manual and Automatic Counting Using ImageJ for Horticultural Research***. Edis. 2021;2021(1):1–10.
- [20]. Ross J. *Microscopy New Zealand Inc. Conference Workshop 2015 Stitching images using Fiji*. 2015;(February):1–14.
- [21]. Huber L. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories Second Edition*. 2nd Ed. New York: **Informa Healthcare USA**; 2007. 303 p.
- [22]. Muthukrishnan T, Govender A, Dobretsov S, Abed RMM. ***Evaluating the reliability of counting bacteria using epifluorescence microscopy***. *J Mar Sci Eng*. 2017;5(1).
- [23]. Simundic A. *Lessons in biostatistics. Past, Present Futur Stat Sci*. 2014;23(1):359–72.
- [24]. Reygaert WC. ***Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases***. 2018;2018:9.
- [25]. Moiz A, Aleem Ahmed M, Kausar N, Ahmed K, Sohail M. ***Study the effect of metal ion on wool fabric dyeing with tea as natural dye***. *J Saudi Chem Soc*. 2010;14(1):69–76.
- [26]. Patel BH. Natural dyes. Vol. 1, *Handbook of Textile and Industrial Dyeing: Principles, Processes and Types of Dyes*. **Woodhead Publishing Limited**; 2011. 395–424 p.
- [27]. Kosińska A, Karamać M, Penkacik K, Urbalewicz A, Amarowicz R. ***Interactions between tannins and proteins isolated from broad bean seeds (Vicia faba Major) yield soluble and non-soluble complexes***. *Eur Food Res Technol*. 2011;233(2):213–22.
- [28]. Dafrita IE, Sari M. ***Senduduk dan ubi jalar ungu sebagai pewarna preparat squash akar bawang merah***. *JPBIO (Jurnal Pendidik Biol*. 2020;5(1):46–55.
- [29]. Harris LG, Foster SJ, Richards RG, Lambert P, Stickler D, Eley A. ***An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review***. *Eur Cells Mater*. 2002;4:39–60.
- [30]. Liang X, Liao C, Thompson ML, Soupier ML, Jarboe LR, Dixon PM. ***E. coli surface properties differ between stream water and sediment environments***. *Front Microbiol*. 2016;7(NOV):1–1