

Piper betle* L. SEBAGAI PEWARNA BAKTERI : UJI AKURASI DAN PRESISI WARNA PADA *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli

Annur Affin Niswah, Yoni Rina Bintari, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Tanaman *Piper betle* L.(PB) memiliki kandungan pigmen antosianin dan tannin warna hijau kecoklatan yang dapat digunakan sebagai zat warna pada pewarnaan bakteri sederhana untuk mengurangi dampak negatif penggunaan pewarna sintesis. Namun, tingkat efektivitas PB sebagai pewarnaan sederhana bakteri belum diketahui sehingga perlu dilakukan uji akurasi dan presisi PB sebagai pewarnaan sederhana bakteri.

Metode: Penelitian eksperimental *in vitro* menggunakan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* yang dilakukan pewarnaan sederhana dengan ekstrak metanol PB (2,5%, 5%, 10%)v/v, *methylene blue* (kontrol positif) dan metanol (kontrol negatif). Hasil pewarnaan diamati secara deskriptif kualitatif oleh tiga pengamat pada lima lapang pandang dari gambar mikroskop cahaya. Perhitungan kuantitatif dilakukan dengan *imageJ* yang dihitung nilai akurasi dan presisinya secara matematis. Hasil dianalisa dengan *Mann-Whitney* dan signifikansi ditetapkan pada $p < 0.05$.

Hasil: Pewarna *methylene blue* (MB) memberikan hasil pewarnaan kualitatif 100% sedangkan metanol 0%. Pewarnaan ekstrak metanol PB konsentrasi 2,5%, 5%, 10% menunjukkan hasil pengamatan deskriptif kualitatif yaitu 2,40, 5,38, 3,22 pada *S. aureus* dan 2,77, 4,94, 2,68 pada *E. coli*. Hasil kuantitatif didapatkan nilai akurasi *S. aureus* yakni 240,51%, 158,49%, 160,91% dan 81,22%, 107,02%, 63,01% pada *E. coli* dengan nilai presisinya yaitu 35,21%, 26,28%, 31,51% pada *S. aureus* dan 42,14%, 23,78%, 26,23% pada *E. coli*. Hasil analisa kualitatif dan kuantitatif menunjukkan bahwa ekstrak metanol PB 5% memiliki kualitas lebih baik daripada 2,5% dan 10%. Adanya bias berupa genangan minyak (*micelles*) diperkirakan mengganggu perhitungan bakteri dengan *imageJ* dan kelemahan dalam pemilihan metode penelitian.

Kesimpulan: Ekstrak metanol PB mengandung pigmen zat warna. Namun, uji akurasi dan presisi menunjukkan lebih rendah daripada kontrol positif.

Kata Kunci: Daun sirih, pewarnaan sederhana, *S. aureus*, *E. coli*, akurasi, presisi

*Korespondensi:

Rio Risandiansyah, S.Ked., M.P., PhD

Alamat : JL. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

ABSTRACT

Introduction: *Piper betle* L.(PB) contains anthocyanin and brownish green pigments which can be used as dyes in simple bacterial staining to reduce the negative impact of using synthesized dyes. However, the effectiveness of PB as a simple stain of bacteria is not yet known, so it is necessary to test the accuracy and precision of PB as a simple stain of bacteria.

Methods: experimental research *In vitro* using *S. aureus* and *E. coli* bacteria was carried out by simple staining with methanol extract PB (2.5%, 5%, 10%) v/v, *methylene blue* (positive control) and methanol (negative control). The staining results were qualitatively observed by three observers in five fields of view from light microscope images. Quantitative calculations were carried out with *imageJ* where the accuracy and precision values were calculated mathematically. Results were analyzed by *Mann-Whitney* and significance was set at $p < 0.05$.

Results: *Methylene blue* dye gave 100% qualitative staining results while methanol gave 0% staining results. Staining of PB methanol extract at concentrations of 2.5%, 5%, 10% showed the results of qualitative descriptive observations, namely 2.40, 5.38, 3.22 in *S. aureus* and 2.77, 4.94, 2.68 in *E. coli*. Quantitative results obtained from *S. aureus* are 240.51%, 158.49%, 160.91% and 81.22%, 107.02%, 63.01% in *E. coli* with a precision value of 35.21% , 26.28%, 31.51% in *S. aureus* and 42.14%, 23.78%, 26.23% in *E. coli*. The results of qualitative and quantitative analysis showed that 5% PB methanol extract had better quality than 2.5% and 10%, respectively. The presence of bias in the form of oil puddles (*micelles*) is thought to interfere with bacterial calculations with *imageJ* and weakness in choosing the research methods.

Conclusion: PB methanol extract contains pigments. However, the accuracy and precision test showed lower than the positive control.

Keywords: Betel leaf, simple staining, *S. aureus*, *E. coli*, accuracy, precision

*Correspondence Writer:

Rio Risandiansyah, S.Ked, M.P., PhD

JL. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Pemeriksaan *gold standar* penyakit infeksi yaitu dengan ditemukannya bakteri atau kuman pada pemeriksaan langsung menggunakan teknik pewarnaan sederhana atau khusus^{1,2}. Pada pewarnaan sederhana, zat warna yang sering digunakan adalah pewarna sintetis *methylene blue*³. Sifat kationik pada *methylene blue* akan menembus dinding sel atau membran sel, berinteraksi dengan komponen bakteri yang bermuatan negatif, membentuk ikatan ionik sehingga bakteri terwarnai⁴.

Penggunaan pewarna sintetis yang tidak terkontrol dapat menyebabkan limbah cair zat warna *non biodegradable* yang membahayakan makhluk hidup⁵. Selain itu, kandungan toksik *methylene blue* dapat menyebabkan ketidakseimbangan ekosistem lingkungan dan menjadi bahan iritan⁶. Oleh sebab itu, diperlukan alternatif lain untuk mengurangi dampak negatif dari pewarna sintetis *methylene blue*.

Penggunaan bahan alam menjadi alternatif zat warna lain karena ramah lingkungan, harga terjangkau, mudah didapatkan dan perawatan yang mudah sehingga dapat dibudidayakan di daerah pelosok⁷. Tanaman *Piper betle* L. mengandung zat pigmen antosianin dan tannin^{8,9}. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa antosianin dapat mempertahankan warnanya pada benang tenunan dan tannin memberikan warna hitam kecoklatan pada jaringan hati burung dara^{8,9}. Namun, belum pernah dilakukan pewarnaan terhadap bakteri. Oleh karena itu, suatu penelitian baru diperlukan untuk menilai kemampuan ekstrak metanol *Piper betle* L. sebagai pewarna bakteri.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian *in vitro* eksperimental laboratorium menggunakan ekstrak metanol *Piper betle* L., *S. aureus* dan *E. coli*. Bakteri didapatkan dari LPRK FK UNISMA yang telah terstandar dengan kode *S. aureus* VT000122-10EA dan *E. coli* VT0003222-10EA. Ekstrak metanol *Piper betle* L. didapatkan dari UPT Materia Medika, Batu, Malang yang telah diverifikasi (determinasi nomor 074/002/1027-D/2022). Penelitian ini dilakukan pada tanggal 18 Agustus-18 September 2021 di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) FK UNISMA.

Ekstraksi *Piper betle* L.

Ekstraksi PB dilakukan dengan proses maserasi menggunakan simplisia *Piper betle* L. sebanyak 20 gram dan 200 ml pelarut metanol 97%. Rendaman simplisia *Piper betle* L. ditutup *aluminium foil* dan diletakkan pada *shaker* kecepatan 60 rpm selama 48 jam. Setelah itu, rendaman simplisia disaring, didapatkan filtrat dan dilanjutkan proses evaporasi. Rendaman simplisia *Piper betle* L. dimasukkan ke dalam oven yang bersuhu 40°C hingga terbentuk ekstrak kental. Hasil

dari ekstrak metanol *Piper betle* L. disimpan ke dalam kulkas.

Eksplorasi Konsentrasi Sebagai Pewarna Bakteri

Hasil maserasi dari ekstrak metanol *Piper betle* L. berupa ekstrak kental pekat sehingga memerlukan beberapa pengenceran. Percobaan eksplorasi dilakukan dari konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 25%, 30%, 50% dan 70%. Kemudian diamati menggunakan mikroskop binokuler dan diambil tiga konsentrasi terbaik untuk pewarnaan bakteri.

Pewarnaan Sederhana Bakteri dengan *Methylene blue*

Pada penelitian ini pewarna *methylene blue* sebagai kontrol positif dalam mewarnai satu koloni bakteri yang dilanjutkan dengan pengamatan menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 1000 kali dengan mengambil gambar sebanyak lima lapang pandang.

Pewarnaan Sederhana Bakteri dengan Ekstrak Metanol *Piper betle* L. Pada *S. aureus* dan *E. coli*

Proses pewarnaan menggunakan 100 µl ekstrak metanol *Piper betle* L. (2,5%, 5%, 10%), dibilas dengan aquades dan penambahan 100 µl larutan *mordant* (lugol) pada *S. aureus* dan *E. coli*. Preparat dikeringkan dan dilakukan pengamatan dengan mikroskop trinokuler perbesaran 1000 kali dan diambil gambar sebanyak lima lapang pandang.

Analisa Kualitatif Hasil Pewarnaan Bakteri

Gambar dari mikroskop trinokuler dievaluasi berdasarkan skoring sesuai Tabel 1. Skoring pada setiap aspek dilakukan oleh tiga pengamat berbeda yang kemudian dihitung rata-ratanya.

Tabel 1. Kriteria Penilaian Pengamatan Deskriptif

Aspek	Indikator	Skor
Kontras	Latar belakang dengan bakteri terlihat jelas	2
	Latar belakang dengan bakteri kurang terlihat	1
	Tidak ada kontras antara bakteri dengan latar belakang	0
Debris	Tidak ada debris (bersih)	2
	Debris ada tetapi tidak menutupi sebagian besar lapang pandang	1
	Debris menutupi sebagian besar keseluruhan bakteri	0
Bentuk	Jika tampak bakteri terlihat jelas	2
	Jika tampak bakteri terlihat samar-samar	1
	Jika tampak bakteri tidak terlihat	0
Warna	Jika bakteri terwarnai dengan jelas	2
	Jika bakteri terwarnai buram	1
	Jika bakteri tidak terwarnai	0

Keterangan : Kriteria penilaian deskriptif pada preparat bakteri dengan beberapa kriteria diantaranya yaitu kejelasan tampilan bentuk bakteri, tingkatan kontras latar belakang bakteri, kualitas terwarnainya bakteri dan banyaknya tampilan debris.

Analisa Kuantitatif Hasil Pewarnaan Bakteri

Pengamatan secara kuantitatif menggunakan aplikasi *imageJ* 1,53 versi JAVA 1.8_172 (64-bit) yang diambil gambarnya dalam lima lapang pandang untuk menentukan nilai akurasi dan presisi.

Perhitungan nilai akurasi menggunakan rumus persen *recovery* sebagai berikut.

$$\% Recovery = \frac{x}{\mu} \times 100\% \quad \dots (1)$$

Keterangan :

X : Nilai konsentrasi yang terbaca
 μ : Nilai yang sebenarnya

Penentuan presisi dengan cara membuat tiga seri konsentrasi berbeda ekstrak metanol *Piper betle* L. yaitu 2,5%, 5% dan 10%. Data tiga pengulangan percobaan dihitung menggunakan perhitungan *RSD* (*Relative Standard Deviation*) sebagai berikut.

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

Keterangan :

SD : Standar Deviasi atau Simpangan Baku
 $\bar{x}$: Kadar rerata

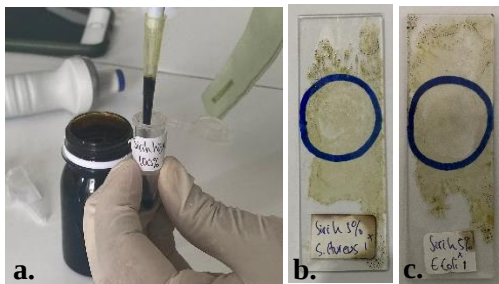
Analisa Data

Data didapatkan dari hasil pengamatan deskriptif kualitatif pewarnaan sederhana bakteri kemudian dikarenakan data tidak homogen maka dilanjutkan uji non-parametrik *Mann-Whitney* dan *Kruskal-Wallis* menggunakan aplikasi SPSS versi 22 tahun 2013.

HASIL

Hasil Warna Ekstrak Metanol *Piper betle* L.

Hasil maserasi ekstrak metanol *Piper betle* L. didapatkan berupa ekstrak kental pekat berwarna hijau kecoklatan dengan disertai genangan minyak.



Gambar 1. Ekstrak metanol *Piper betle* L. berwarna hijau kecoklatan

Hasil Uji Senyawa Fitokimia Ekstrak Metanol *Piper betle* L.

Berdasarkan skrining fitokimia pada **Tabel 2** senyawa metabolit sekunder ekstrak metanol *Piper betle* L. didapatkan senyawa flavonoid positif sehingga menunjukkan adanya senyawa antosianin sedangkan hasil fenol positif menunjukkan adanya senyawa tannin. Dinyatakan ekstrak metanol *Piper betle* L. berpotensi sebagai zat warna.

Tabel 2. Senyawa Ekstrak Metanol *Piper betle* L.

Identifikasi Senyawa	Hasil
Flavonoid	Positif
Alkaloid	Positif
Tanin atau Fenol	Positif
Terpenoid	Negatif
Saponin	Negatif

Keterangan: Berdasarkan hasil uji skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder ekstrak metanol *Piper betle* L. yang dilakukan oleh UPT Materia Medika Batu, Malang menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid, alkaloid dan tannin.

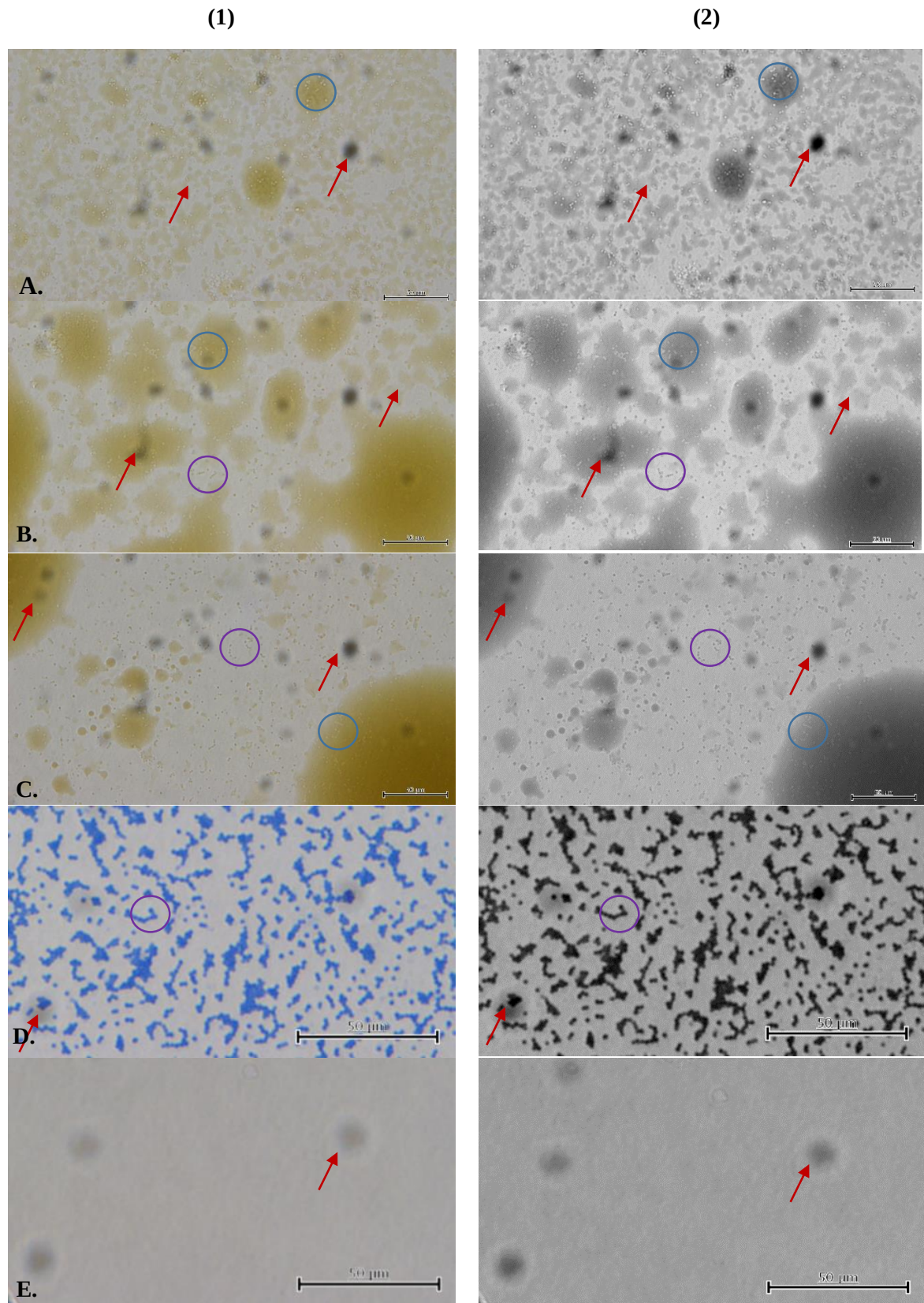
Hasil Eksplorasi Konsentrasi Ekstrak Metanol *Piper betle* L. Pada Pewarnaan Bakteri

Pengenceran ekstrak metanol *Piper betle* L. dimulai dari konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 30%, 50%, 70% dan 75%. Hasil eksplorasi ekstrak metanol *Piper betle* L. dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70% dan 75% didapatkan tampakan *S. aureus* dan *E. coli* yang tidak teridentifikasi. Konsistensi dari *Piper betle* L. yang cukup kental dan cukup banyak genangan minyak menyebabkan bakteri tidak teridentifikasi. Sehingga dilanjutkan eksplorasi kedua menggunakan tambahan larutan *mordant* (lugol) dengan ekstrak metanol *Piper betle* L. konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 30% dan 50%. Hasil eksplorasi menunjukkan bahwa tiga konsentrasi ekstrak metanol *Piper betle* L. yaitu 2,5%, 5% dan 10% memiliki pewarnaan yang lebih baik meskipun genangan minyak (misel) masih terlihat.

Hasil Pengamatan Deskriptif Kualitatif Pewarnaan Sederhana Ekstrak Metanol *Piper betle* L. Pada *S. aureus* dan *E. coli*

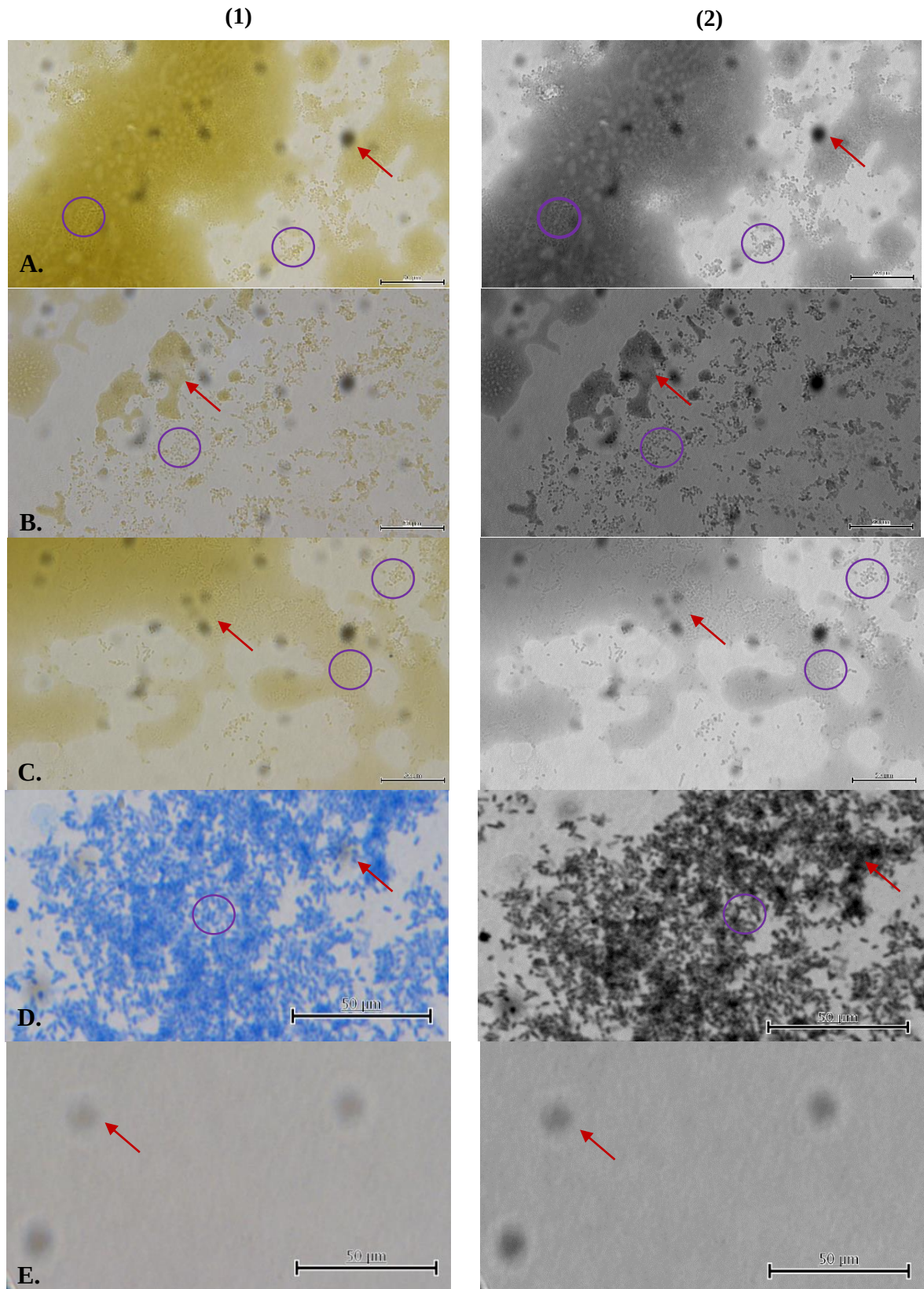
Perhitungan skor pada pengamatan deskriptif berdasarkan skoring pada **Tabel 1**. Preparat yang telah terwarnai diamati menggunakan mikroskop trinokuler dan dilakukan pengamatan deskriptif oleh tiga pengamat. Hasil pewarnaan menggunakan ekstrak metanol *Piper betle* L. konsentrasi 2,5%, 5% dan 10% dapat memberikan warna pada *S. aureus* dan *E. coli*. Namun, pada sisi lain didapatkan perbedaan yakni *S. aureus* yang berada didalam misel tidak terwarnai dikarenakan zat warna hanya mengelilingi bagian luar dari *S. aureus*. Sebaliknya, pada tampakan *E. coli* zat pigmen warna ekstrak metanol *Piper betle* L. mampu memberikan warna kecoklatan (**Gambar 2**, **Gambar 3**).

Warna kecoklatan dari *Piper betle* L. memungkinkan terbentuknya bias dengan terwarnainya partikel kecil seperti debu yang menyerupai bentuk bakteri. Selain itu, mikroskop yang digunakan dalam keadaan kotor sehingga menutupi beberapa tampakan bakteri. Beberapa genangan minyak juga masih ditemukan pada ekstrak metanol *Piper betle* L. konsentrasi 2,5%, 5% dan 10%.



Gambar 2. Hasil Pewarnaan Sederhana Pada *S. aureus* Menggunakan Ekstrak Metanol *Piper Betle* L. Konsentrasi 2,5%, 5%, 10% , Kontrol Positif (*Methylene blue*) dan Kontrol Negatif (Metanol).

Keterangan : menunjukkan hasil pewarnaan sederhana pada *S. aureus* menggunakan ekstrak metanol *Piper betle* L. konsentrasi **A.** 2,5%, **B.** 5%, **C.** 10%, **D.** pewarna sintesis *methylene blue* (kontrol positif) dan **E.** metanol (kontrol negatif) yang dilanjutkan perhitungan dengan *imageJ*. Gambar kolom **(1)** merupakan hasil gambar mikroskop dan gambar kolom **(2)** merupakan hasil dari *imageJ*. (→) panah warna merah menunjukkan tampilan debris. (O) lingkaran warna biru menunjukkan tampilan *S.aureus* tidak terwarnai dalam micelle. (O) lingkaran warna ungu menunjukkan *S. aureus* terwarnai.



Gambar 3. Hasil Pewarnaan Sederhana Pada *E. coli* Menggunakan Ekstrak Metanol *Piper betle* L.

Konsentrasi 2,5%, 5%, 10% , Kontrol Positif (*Methylene blue*) dan Kontrol Negatif (Metanol).

Keterangan : menunjukkan hasil pewarnaan sederhana pada *E. coli* menggunakan ekstrak metanol *Piper betle* L. konsentrasi A. 2,5%, B.5%, C. 10%, D. pewarna sintetis *methylene blue* (kontrol positif) dan E. metanol (kontrol negatif) yang dilanjutkan perhitungan dengan *imageJ*. Gambar kolom (1) merupakan hasil gambar mikroskop dan gambar kolom (2) merupakan hasil *imageJ*. (→) panah warna merah menunjukkan tampakan debris. (O) lingkaran warna ungu menunjukkan *E. coli* terwarnai.

Tabel 3. Perhitungan Skoring Pada *S. aureus*

	Kontras				Warna				Bentuk				Debris				Mean Total
	P1	P2	P3	Mean	P1	P2	P3	Mean	P1	P2	P3	Mean	P1	P2	P3	Mean	
MT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MB	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	8
2,5%	1,80	0,73	0,33	0,95	0,60	0,93	0,33	0,62	1,13	0,67	0,67	0,82	0,67	0,13	0,33	0,38	2,77
5%	2,00	1,40	1,07	1,49	1,53	1,53	1,07	1,38	2,00	1,07	1,00	1,36	0,87	0,87	0,40	0,71	4,94
10%	1,00	0,60	0,80	0,80	2,00	1,07	1,00	1,36	1,30	0,47	0,87	0,85	0,07	0,47	0,13	0,22	2,68

Keterangan: menunjukkan hasil rata-rata data pengamatan deskriptif kualitatif pada *S.aureus* yang dilakukan oleh tiga pengamat (P1, P2, P3) berdasarkan skoring **Tabel 1** dan dilakukan sebanyak lima lapang pandang pada setiap preparat. Mean total merupakan penjumlahan dari rata-rata setiap aspek. MB adalah *methylene blue*. MT adalah metanol.

Hasil perhitungan skoring menunjukkan pewarnaan sederhana ekstrak metanol *Piper betle* L. pada *S. aureus* didapatkan konsentrasi tertinggi adalah 5% dengan nilai rata-rata 5,38 dan nilai terendah didapatkan pada konsentrasi 2,5% dengan nilai rata-rata adalah 2,40 (**Tabel 3, Gambar 4a**). Pengamatan deskriptif pewarnaan sederhana pada *E.coli* didapatkan bahwa ekstrak metanol *Piper betle* L. dengan konsentrasi 5% mendapatkan nilai rata-rata tertinggi yaitu 4,94. Sedangkan nilai rata-rata terendah didapatkan pada ekstrak metanol *Piper betle* L. dengan konsentrasi 10% yaitu 2,68 (**Tabel 4, Gambar 4b**).

Hasil Perhitungan Nilai Akurasi dan Presisi Pewarnaan Sederhana Pada *S. aureus* dan *E. coli*

Penentuan nilai akurasi menggunakan **Rumus 1**, yaitu menghitung selisih nilai sertifikat (rujukan) dengan hasil analisis terhadap nilai dari sertifikat¹⁰. Kriteria nilai akurasi baik apabila nilai akurasi berkisar antara 98%-102% dari persen *recovery*¹¹. Hasil perhitungan nilai akurasi tercantum pada **Tabel 5**. Pewarnaan sederhana ekstrak metanol *Piper betle* L. pada *S. aureus* dan *E.coli* dengan konsentrasi 2,5%, 5% dan 10% didapatkan hasil perhitungan yang tidak memenuhi kriteria penerimaan nilai akurasi.

Perhitungan nilai presisi didapat dari *Piper betle* L. dengan konsentrasi 2,5%, 5% dan 10% dan dilakukan tiga kali pengulangan. Apabila nilai simpangan baku relatif (RSD)<2%, maka menunjukkan nilai presisi yang dapat memberikan keterulangan sehingga dapat diterima dengan baik^{12,13}. Hasil perhitungan nilai presisi yang dicantumkan pada **Tabel 5** menunjukkan bahwa

pewarnaan sederhana ekstrak metanol *Piper betle* L. pada *S.aureus* dan *E.coli* tidak memenuhi standar simpangan baku relatif (< 2%).

PEMBAHASAN

Piper betle L. Sebagai Sumber Zat Pewarna Bakteri

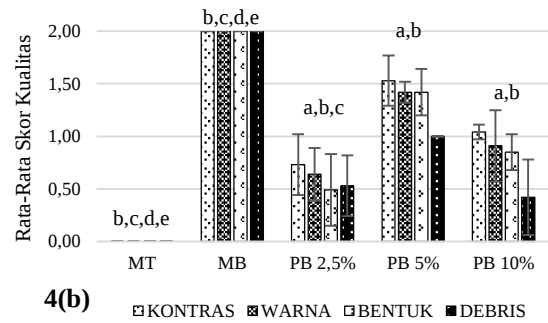
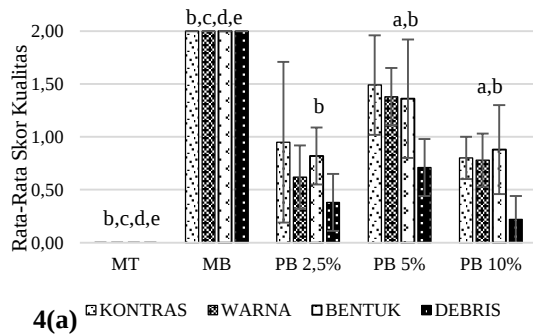
Pengujian fitokimia memberikan hasil bahwa terdapat senyawa antosianin, tannin dan alkaloid pada ekstrak metanol *Piper betle* L. sehingga berpotensi menjadi zat warna. Tampakkan warna yang dihasilkan dari ekstrak metanol *Piper betle* L. berupa perpaduan warna hijau dan coklat serta terdapat genangan minyak menutupi hampir seluruh lapang pandang sehingga memerlukan eksplorasi untuk mendapatkan tiga konsentrasi terbaik dalam pewarnaan bakteri.

Penelitian sebelumnya menyatakan zat tannin yang terkandung didalam *Piper betle* L. mampu memberikan warna hitam kecoklatan pada jaringan hati burung dara⁷. Tannin merupakan senyawa polifenol larut air yang mengandung gugus hidroksil fenolik sehingga memungkinkan terbentuknya ikatan silang antara protein dan makromolekul lainnya¹⁴. Penelitian sebelumnya juga menyatakan, senyawa tannin pada kulit biji asam jawa mengandung gugus hidroksil fenolik yang akan membentuk ikatan kompleks dengan molekul zat warna dan menyebabkan fiksasi zat warna pada kain lebih tinggi sehingga mampu mempertahankan warnanya secara permanen¹⁵.

Tabel 4. Perhitungan Skoring Pada *E. coli*

	Kontras				Warna				Bentuk				Debris				Mean Total
	P1	P2	P3	Mean	P1	P2	P3	Mean	P1	P2	P3	Mean	P1	P2	P3	Mean	
MT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MB	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	8
2,5%	0,60	1,07	0,53	0,73	0,47	0,93	0,53	0,64	0,87	0,20	0,40	0,49	0,20	0,73	0,67	0,53	2,40
5%	1,80	1,47	1,30	1,53	1,40	1,53	1,33	1,42	1,67	1,27	1,33	1,42	1,00	1,00	1,00	1,00	5,38
10%	1,13	1,00	1,00	1,04	0,53	1,20	1,00	0,91	0,87	1,00	0,67	0,85	0	0,60	0,66	0,42	3,22

Keterangan: menunjukkan hasil rata-rata data pengamatan deskriptif kualitatif pada *E. coli* yang dilakukan oleh tiga pengamat (P1, P2, P3) berdasarkan skoring **Tabel 1** dan dilakukan sebanyak lima lapang pandang pada setiap preparat. Mean total merupakan penjumlahan dari rata-rata setiap aspek. MB adalah *methylene blue*. MT adalah metanol.



Gambar 4. Hasil Pengamatan Deskriptif *S. aureus* (a) dan *E. coli* (b)

Keterangan: Grafik nilai rata-rata berdasarkan kriteria penilaian deskriptif menunjukkan bahwa konsentrasi 5% ekstrak metanol *Piper betle* L. memiliki kualitas lebih baik dalam pewarnaan pada *S. aureus* dan *E. coli* daripada konsentrasi 2,5% dan 10%. Notasi huruf yang berbeda memiliki perbedaan signifikan ($p < 0,05$) dengan pengelompokan berdasarkan a=berbeda signifikan terhadap MT, b=berbeda signifikan terhadap MB, c=berbeda signifikan terhadap PB 2,5%, d=berbeda signifikan terhadap PB 5% dan e=berbeda signifikan terhadap PB 10%. MB adalah *Methylene blue*. MT adalah metanol.

Antosianin termasuk dalam golongan flavonoid berstruktur cincin aromatik yang larut dalam air¹⁶. Adanya sifat hidrofilik memungkinkan antosianin dapat larut pada pelarut bersifat polar seperti larutan metanol. Ion positif pada zat warna (H^+) akan melepas dan berikatan kovalen dengan ion negatif yang ada pada dinding sel jaringan¹⁶. Antosianin cukup rentan terhadap proses degradasi, tidak hanya melalui aktivitas enzim tetapi melalui faktor lain seperti suhu, cahaya, pH, gula, presentase oksigen, sulfat, asam askorbat, ion logam dan *co-pigment*¹⁷. Degradasi antosianin juga dipengaruhi oleh komposisi larutan dan kondisi lingkungan¹⁸. Pigmen antosianin cepat terdegradasi pada suhu tinggi dikarenakan reaktivitasnya yang tinggi menyebabkan monomer antosianin berpolimerisasi membentuk senyawa berwarna coklat¹⁷.

Pada pengujian fitokimia didapatkan juga senyawa alkaloid dengan hasil positif. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa dengan *polyamine alkaloid squalamine* dapat merusak integritas membran luar dan membran sitoplasma. Squalamin akan penetrasi pada lapisan tunggal lipopolisakarida sehingga menyebabkan depolarisasi membran sitoplasma, kerusakan dari sitoplasma dan bakteri terwarnai¹⁹.

Analisa Kualitatif Ekstrak Metanol *Piper betle* L. Pada Pewarnaan Bakteri *S. aureus* dan *E. coli*

Hasil pengamatan dari percobaan pewarnaan bakteri menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Piper betle* L. mampu mewarnai bakteri dengan warna hijau kecoklatan tetapi masih ditemukannya genangan minyak dan tampakan debris. Penggunaan ekstrak metanol *Piper betle* L. memiliki kualitas pewarnaan bakteri lebih rendah daripada *methylene blue* yang sudah terstandar dalam pewarnaan bakteri.

Perbedaan tampakan bentuk dan warna pada *S. aureus* dan *E. coli* dapat disebabkan karena adanya lapisan membran pada bakteri yang bersifat *selective permeable* sehingga mempengaruhi ukuran molekul yang dapat menembus dinding sel bakteri. Ukuran molekul zat pigmen warna yang beragam menyebabkan pewarnaan bakteri tidak maksimal hingga bakteri tidak terwarnai²⁰. Selain itu adanya kontras yang berbeda pada *S. aureus* dan *E. coli* dapat dipengaruhi oleh faktor dari proses ekstraksi diantaranya yaitu jenis pelarut, rasio antara berat bahan dengan volume pelarut, suhu, proses pengadukan, waktu ekstraksi dan ukuran sampel²¹.

Tabel 5. Hasil Perhitungan Nilai Akurasi dan Presisi Pada *S. aureus* dan *E. coli*

Zat warna	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	Jumlah bakteri			Jumlah bakteri		
	Mean $\pm$ SD	RSD	%Recovery	Mean $\pm$ SD	RSD	%Recovery
MB	8049,67 $\pm$ 3018,59	37,50		16052 $\pm$ 2322,68	14,47	
MT	822 $\pm$ 66,55	8,10	10,21	726,67 $\pm$ 68,89	9,48	4,53
2,5%	19360 $\pm$ 6817,27	35,21	240,51	13037,33 $\pm$ 5493,62	42,14	81,22
5%	12758 $\pm$ 3353,26	26,28	158,49	17179,67 $\pm$ 4084,83	23,78	107,02
10%	12952,33 $\pm$ 4081,89	31,51	160,91	10115 $\pm$ 2652,71	26,23	63,01

Keterangan: Hasil perhitungan nilai akurasi dan presisi pewarnaan sederhana pada *S. aureus* dan *E. coli* menggunakan *methylene blue* (nilai rujukan), tiga konsentrasi ekstrak metanol *Piper betle* L. (2,5%, 5%, 10%) v/v dan metanol (kontrol negatif). Pewarnaan sederhana dilakukan tiga kali pengulangan dan pengambilan gambar diambil sebanyak lima lapang pandang pada setiap preparat. Mean adalah nilai rata-rata jumlah bakteri dari tiga pengulangan. RSD menunjukkan nilai presisi yang dihitung dengan Rumus 2. % Recovery menunjukkan nilai akurasi yang dihitung dengan Rumus 1.

Tampakan debris dan genangan minyak dapat terjadi karena pengolahan ekstrak metanol *Piper betle* L. masih tergolong ekstrak kasar sehingga akan mempengaruhi pengamatan dengan mikroskop. Genangan minyak berwarna kuning kecoklatan merupakan kandungan kimia dari sirih yaitu minyak atsiri. *Piper betle* L. merupakan tanaman yang memiliki aroma kuat dan kadar minyak atsiri lebih tinggi daripada spesies tanaman sirih lainnya²². Minyak atsiri adalah senyawa non-polar yang menyebabkan ketidaklarutan senyawa tersebut pada pelarut polar²³.

Perbedaan antara bakteri gram positif dan gram negatif terletak pada ketebalan lapisan peptidoglikan. Pada dinding bakteri gram positif setidaknya ketebalan peptidoglikan sekitar 10-20 lapisan sedangkan pada bakteri gram negatif hanya satu hingga tiga lapisan. Sehingga dapat dinyatakan bahwa pada lapisan peptidoglikan bakteri gram negatif cukup tipis untuk menjaga stabilitas mekanik sel²⁴.

Protein penyusun struktur dinding bakteri memungkinkan penyebab terjadinya suatu perbedaan pewarnaan pada *S. aureus* dan *E. coli*. Membran luar bakteri gram negatif terdiri atas glikolipid dan protein. Penyusun protein gram negatif terbagi menjadi dua yaitu lipoprotein dan beta-barrel protein. Lipoprotein melekat pada bagian dalam dari membran luar. Terdapat 100 jenis lipoprotein pada *E. coli* yang dimana fungsinya belum diketahui. Pada bakteri gram positif tidak memiliki membran luar tetapi memiliki lapisan peptidoglikan cukup tebal yang dimana tersusun atas polimer anionik atau asam teikoat. Selain itu, komposisi protein yang diekspresikan pada bakteri gram positif dapat berubah tergantung kondisi lingkungan dan kondisi pertumbuhan. Hal tersebut dapat terjadi sebagai bentuk peran adaptasi dan pertahanan dari dinding sel bakteri gram positif²⁵.

Analisa Kuantitatif Pewarnaan Sederhana Ekstrak Metanol *Piper betle* L. Pada *S. aureus* dan *E. coli*

Perhitungan nilai akurasi dan presisi didapatkan dari hasil pengamatan pewarnaan sederhana terhadap *S. aureus* dan *E. coli* menggunakan mikroskop trinokuler dengan perbesaran 1000 kali dan dilanjutkan perhitungan bakteri menggunakan aplikasi software *imageJ*.

Warna kecoklatan yang dihasilkan oleh *Piper betle* L. memungkinkan terbentuknya bias yaitu terwarnainya partikel kecil seperti debu yang menyerupai bentuk bakteri. Keterbatasan jumlah dari mikroskop menyebabkan pengamatan membutuhkan waktu lebih lama dan memungkinkan preparat terpapar debu. Keadaan kotor dari mikroskop juga menyebabkan tampilan bulatan hitam pada saat pengambilan gambar sehingga menutupi beberapa tampilan bakteri.

ImageJ digunakan pada penelitian ini karena pemakaiannya mudah, akurat dan perhitungan yang relatif cepat sehingga meminimalisir waktu. Selain itu, perhitungan otomatis yang dilakukan dapat

mengeliminasi proses perhitungan manual yang rumit dan juga dapat menunjukkan data penting lainnya dari setiap objek yang dihitung. Namun, hal tersebut mengakibatkan seluruh objek yang terlihat akan dihitung secara otomatis oleh *imageJ*²⁶.

Pada penelitian ini didapatkan beberapa bias yang menyebabkan nilai akurasi dan presisi tidak memenuhi standar. Penggunaan mikroskop trinokuler dalam keadaan kotor menyebabkan tampilan debris pada setiap gambar preparat. Penetapan angka *threshold* yang berbeda-beda pada setiap pengambilan gambar juga akan mempengaruhi perhitungan dari *imageJ*. *Threshold* memberikan warna hitam putih pada gambar yang sebelumnya skala abu-abu dengan cara mengatur *pixel* untuk mengatur *hue*, saturasi dan tingkat kecerahan²⁷.

Pewarna *methylene blue* sebagai kontrol positif (nilai rujukan) dan larutan metanol sebagai kontrol negatif. Perhitungan nilai akurasi dan presisi pewarnaan sederhana ekstrak metanol *Piper betle* L. dengan konsentrasi 2,5%, 5% dan 10% pada *S. aureus* dan *E. coli* didapatkan data bahwa tidak ada yang memenuhi standar. Nilai akurasi menganalisis tiga sampel berbeda konsentrasi (rendah, sedang, tinggi) yang masih dalam ambang batas². Kriteria penerimaan nilai akurasi berkisar dari 98% - 102% dari persen *recovery*¹⁰. Sedangkan nilai presisi dinyatakan dalam bentuk standar deviasi atau Relatif Standar Deviasi¹¹. Apabila nilai simpangan baku relatif (RSD) < 2%, maka menunjukkan nilai presisi yang dapat memberikan keterulangan sehingga diterima dengan baik¹².

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui ekstrak metanol *Piper betle* L. mampu memberikan warna pada pewarnaan sederhana bakteri *S. aureus* dan *E. coli* tetapi tidak dapat menggantikan *methylene blue* sebagai kontrol positif.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka penelitian selanjutnya disarankan untuk:

1. Melakukan isolasi senyawa aktif antosianin dan tannin pada *Piper betle* L. sebagai zat pewarna.
2. Mengganti proses ekstrak dengan metode lain yang berpotensi menarik senyawa tannin dan antosianin lebih kuat.
3. Melakukan proses penyaringan atau filtrasi yang bertujuan mengurangi tampilan debris.
4. Mengganti pelarut yang bersifat semipolar untuk mengurangi genangan yang tidak larut.
5. Melakukan uji pewarnaan diferensial sebagai penelitian lanjutan.
6. Studi *in silico* untuk mengetahui proses pembentukan warna melalui ikatan protein atau struktur tertentu.

7. Mengganti perhitungan bakteri selain menggunakan aplikasi *software imageJ*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan oleh Penulis kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan dr. Rahma Triliana, M. Kes., Ph.D sebagai *peer reviewer*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Howland RH. *Psychopharmacology Exploring Psychotherapeutic Issues and Agents in Clinical Practice The Long and Winding Road from Stain to Brain: Part 1*. **Journal of Psychosocial Nursing**. 2016;54(9):21–4.
2. Hu Xiaotang, Verronika P, Daniel N, Alice M, Lynn. *A Simple and Efficient Method for Preparing Cell Slides and Staining Without Using Cytoentrifuge and Cytoclips*. **International Journal of Cell Biology**. 2015;2015:1–2.
3. Roslizawaty, Ramadani NY, Fakhurrazi, Herrialfian. *Aktivitas Antibakterial Ekstrak Etanol dan Rebusan Sarang Semut (Myrmecodia sp.) Terhadap Bakteri Escherichia coli*. **Jurnal Medika Veterinaria**. 2013;7(2):91–4.
4. Thairu Y, Usman Y, Nasir I. *Laboratory Perspective Of Gram Staining And Its Significance In Investigations Of Infectious Diseases*. **Sub-Saharan African J Med**. 2014;1(4):168.
5. Ferronato N, Torretta V. *Waste Mismanagement in Developing Countries: A Review of Global Issues*. **International Journal Environmental Research and Public Health**. 2019;16(6):2–4.
6. Rizqi HD, Purnomo AS. *Biodegradasi Pewarna Metilen Biru oleh Daedalea dickinsii*. **Jurnal Seni dan Sains**. 2014;2(1):1–6.
7. Oktaviani DN, Santoso H, Noor R. *Perbandingan Larutan Buah Pinang (Arecha catechu L) dan Daun Sirih Hijau (Piper betle L) Terhadap Kejelasan Jaringan Hati Sebagai Alternatif Pewarna Alami Preparat Jaringan Sebagai Sumber Belajar Biologi*. **Biodulock**. 2019;1(1):50–8
8. Afan M, Wiraningtyas A, Agustina S, R R. *Pemanfaatan Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper betle L.) Sebagai Zat Pewarna Alami (ZPA) Tekstil dan Aplikasinya pada Benang Tenun*. **Jurnal Redoks : Jurnal Pendidikan Kimia dan Ilmu Kimia**. 2020;3(2):20–7.
9. Dafrita IE, Sari M. *Senduduk dan Ubi Jalar Ungu Sebagai Pewarna Preparat Squash Akar Bawang Merah*. **JPBIO (Jurnal Pendidikan Biologi)**. 2020;5(1):46–55.
10. Mulyati AH, Apriyani D, Sutanto. *Validasi Metode Analisa Kadar Ambroksol Hidroklorida Dalam Sediaan Tablet Cystelis Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. **Ekologia**. 2011;11(2):36–45.
11. Torowati, Rahmiwati. *Validasi Metode Untuk Analisis Kandungan Uranium Menggunakan Potensiometer T-90*. **Pusat Sains dan Teknologi Akselerator**. 2016. p. 104–10.
12. Budari, Dewantara, Wijayanti. *Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar A-Mangostin Pada Gel Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) dengan KIT-Spektrofotodensitometri*. Universitas UDAYANA. 2013;20–4.
13. Arikalang TG, Sudewi S, Rorong JA. *Penentuan Kandungan Total Fenolik Pada Ekstrak Daun Gedi Hijau (Abelmoschus manihot L.) yang Diukur dengan Spektrofotometer UV-VIS*. **PHARMACON**. 2018;7(3).
14. Patra AK. *Dietary Phytochemicals and Microbes*. SpringerLink. 2012;1–400.
15. Prabhu KH, Teli MD. *Eco-dyeing Using Tamarindus indica L. seed Coat Tannin As A Natural Mordant For Textiles With Antibacterial Activity*. **Journal of Saudi Chemical Society**. 2014;18(6):864–72.
16. Priska M, Peni N, Carvallo L, Ngapa YD. *Antosianin dan Pemanfaatannya*. **Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)**. 2018;6(2):79–97.
17. Marszałek K, Woźniak Ł, Kruszewski B, Skapska S. *The Effect of High Pressure Techniques on The Stability of Anthocyanins in Fruit and Vegetables*. **International Journal of Molecular Sciences**. 2017;18(2).
18. Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W, McClements DJ. *Stability Improvement of Natural Food Colors: Impact of Amino Acid and Peptide Addition on Anthocyanin Stability in Model Beverages*. **Food Chemistry**. 2017;218:277–84.
19. Cushnie TP, Cushnie B, Lamb AJ. *Alkaloids: An Overview Of Their Antibacterial, Antibiotic-Enhancing And Antivirulence Activities*. **International Journal of Antimicrob Agents**. 2014 Nov;44(5):377–86.
20. Rahayuningtyas AD, Dewi W, Indrati. *Pemanfaatan Ekstrak Etil Asetat Buah Merah Sebagai Zat Pengganti Pewarna Primer Pada Teknik Pengecatan Tunggal Bakteri Gram Negatif Batang*. **Jurnal Kedokteran Gigi Univ Padjadjaran**. 2017;29(2):139–43.
21. Savitri I, Suhendra L, Wartini NM. *Pengaruh Jenis Pelarut Pada Metode Maserasi Terhadap Karakteristik Ekstrak Srgassum polycystum*. **Jurnal Rekayasa dan**

- Manajemen Agroindustri.** 2017;5(3):93–101.
22. Widiyastuti Y, Haryanti S, Subositi D. *Karakterisasi Morfologi Dan Kandungan Minyak Atsiri Beberapa Jenis Sirih (Piper sp.)*. Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. 2013;6(2):86–93.
 23. Ariyani F, Setiawan LE, Soetaredjo FE. *Ekstraksi Minyak Atsiri Dari Tanaman Sereh dengan Menggunakan Pelarut Metanol, Aseton dan N-Heksana.* **WIDYA TEKNIK.** 2008;7(2):124–33.
 24. Scheffers D-J, Pinho MG. *Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies.* **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 2005;69(4):585–607.
 25. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S, Kumar K, Mella-herrera RA, Golden JW, et al. *The Bacterial Cell Envelope.* **Cold Spring Harbor Perspective in Biology.** 2014;2(5).
 26. Pride L, Agehara S. *Useful Image-Based Techniques for Manual and Automatic Counting Using ImageJ for Horticultural.* **IFAS Extension.** 2021;1–10.
 27. O'brien J, Hayder H, Peng C. *Automated Quantification And Analysis of Cell Counting Procedures Using ImageJ Plugins.* **Journal Vis Exp.** 2016;2016(117):1–10.

