
Optimasi Asam Sulfat dan Asam Klorida Sebagai Peluntur *Malachite Green* pada Pewarnaan Spora Metode *Schaeffer–Fulton* Secara Spektrofotometri

Optimization of Sulfuric and Hydrochloric Acids as Decolorizing Agents for Malachite Green in Spore Staining Using The Schaeffer–Fulton Method and Spectrophotometry

Fitria Hariati Ramdhani^{1*}

Windya Nazmatur Rahmah²

Al Hidayani³

^{1,3}Sarjana Terapan Teknologi
Laboratorium Medis, Universitas
Muhammadiyah Palangka Raya.

²Diploma III Teknologi Laboratorium
Medis, Universitas Muhammadiyah
Palangka Raya.

*email: tia.fitria210393@gmail.com

Abstrak

Bakteri pembentuk endospora seperti *Bacillus subtilis* memerlukan teknik pewarnaan khusus untuk identifikasinya. Metode *Schaeffer-Fulton* menggunakan *malachite green* sebagai pewarna utama dan safranin sebagai pewarna kontras. Tahap pelunturan berperan penting dalam menghasilkan kontras warna yang jelas antara spora dan sel vegetatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi penggunaan asam sulfat (H_2SO_4) dan asam klorida (HCl) sebagai peluntur *malachite green* pada pewarnaan spora metode *Schaeffer-Fulton* yang dianalisis secara spektrofotometri. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan variasi peluntur H_2SO_4 0,5% dan 1%, serta HCl 0,5% dan 1%. Data dianalisis menggunakan Uji One Way Anova dan uji lanjut Duncan. Hasil penelitian menunjukkan nilai F-hitung 196621,2 lebih besar dari F-tabel 2,603 dengan p-value 0,000 (<0,05), yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar perlakuan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa HCl 1% menghasilkan nilai absorbansi sisa zat warna paling rendah (1,587) sehingga merupakan peluntur paling efektif.

Kata Kunci:

Bacillus subtilis, *malachite green*,
peluntur, pewarnaan spora,
spektrofotometri.

Keywords:

Bacillus subtilis, *malachite green*,
decolorizing agent, spore staining,
spectrophotometry.

Abstract

Endospore-forming bacteria such as *Bacillus subtilis* require specific staining techniques for identification. The *Schaeffer-Fulton* method uses *malachite green* as the primary stain and safranin as the counterstain. The decolorization step is important to produce clear contrast between spores and vegetative cells. This study aimed to optimize sulfuric acid (H_2SO_4) and hydrochloric acid (HCl) as decolorizing agents for *malachite green* in the *Schaeffer-Fulton* staining method analyzed by spectrophotometry. This experimental study used decolorizing agents of H_2SO_4 0,5% and 1%, and HCl 0,5% and 1%. Data were analyzed using One Way Anova followed by Duncan's tests. The result showed that the F-value (196621,2) was higher than the F-table value (2,603) with a p-value 0,000 (<0,05), indicating significant differences among treatments. Duncan's test showed that HCl 1% produced the lowest residual dye absorbance (1,587), indicating the most effective decolorizing agent.

PENDAHULUAN

Bakteri merupakan mikroorganisme yang memiliki berbagai mekanisme adaptasi untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Salah satu mekanisme tersebut adalah pembentukan endospora yang dapat ditemukan pada bakteri gram positif tertentu seperti genus *Bacillus* dan *Clostridium*. Endospora memiliki struktur yang sangat resisten terhadap panas, radiasi, kekeringan, serta bahan kimia sehingga memungkinkan bakteri

bertahan dalam kondisi lingkungan ekstrem dalam waktu yang lama (Yuniarti et al., 2019).

Salah satu bakteri yang mampu membentuk endospora adalah *Bacillus subtilis*. Bakteri ini berbentuk batang, bersifat gram positif, serta memiliki kemampuan sporulasi yang baik sehingga sering digunakan sebagai organisme model dalam penelitian mikrobiologi, khususnya dalam studi sporulasi dan fisiologi bakteri (Liswanto, 2018). Selain itu, *Bacillus subtilis* juga banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti

bioteknologi, pertanian, dan kesehatan karena kemampuannya menghasilkan berbagai metabolit yang bermanfaat (Istiqomah & Kusumawati, 2018).

Identifikasi bakteri pembentuk spora di laboratorium mikrobiologi umumnya dilakukan melalui teknik pewarnaan spora. Salah satu metode yang paling banyak digunakan adalah metode *Schaeffer-Fulton* yang menggunakan *malachite green* sebagai pewarna utama dan safranin sebagai pewarna kontras. Pada metode ini, pemanasan dilakukan untuk membantu penetrasi *malachite green* ke dalam struktur spora yang memiliki lapisan pelindung tebal. Setelah proses pencucian, sel vegetatif akan kehilangan pewarna utama dan kemudian menyerap pewarna kontras sehingga menghasilkan perbedaan warna yang jelas antara spora dan sel vegetatif (Widodo et al., 2022).

Malachite green merupakan zat warna sintesis yang sering digunakan dalam teknik mikrobiologi karena kemampuannya menembus lapisan spora melalui proses pemanasan. Namun, zat warna ini memiliki afinitas yang relatif rendah terhadap sel vegetatif sehingga mudah dilunturkan selama proses pencucian. Proses pelunturan merupakan tahap penting dalam teknik pewarnaan karena berfungsi untuk menghilangkan pewarna yang tidak terikat pada sel sehingga menghasilkan kontras warna yang optimal antara spora dan sel vegetatif (Oktari et al., 2017).

Pelunturan malachite green pada pewarnaan spora umumnya menggunakan air atau larutan kimia tertentu. Penggunaan peluntur yang optimal dapat menyebabkan pewarna masih melekat pada sel vegetatif sehingga mengurangi kontras warna dan berpotensi mengganggu interpretasi hasil mikroskopis. Oleh karena itu, diperlukan optimasi agen peluntur untuk meningkatkan kualitas hasil pewarnaan spora (Widodo et al., 2022).

Asam sulfat dan asam klorida merupakan asam kuat yang memiliki kemampuan melarutkan berbagai senyawa organik sehingga berpotensi digunakan sebagai agen peluntur dalam proses pewarnaan bakteri. Penggunaan kedua jenis asam tersebut diharapkan

mampu meningkatkan efektivitas peluntur *malachite green* sehingga menghasilkan kontras warna yang lebih jelas antara spora dan sel vegetatif.

Selain pengamatan mikroskopis, proses pelunturan zat warna dapat dianalisis secara kuantitatif menggunakan spektrofotometri, yaitu metode yang mengukur konsentrasi senyawa berdasarkan penyerapan cahaya pada panjang gelombang tertentu sehingga memungkinkan analisis perubahan konsentrasi zat warna secara objektif dan akurat (Hasibuan et al., 2025). Berdasarkan penjelasan di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi penggunaan asam sulfat dan asam klorida sebagai peluntur *malachite green* pada pewarnaan spora metode *Schaeffer-Fulton* pada *Bacillus subtilis* yang dianalisis menggunakan metode spektrofotometri.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, yaitu melakukan percobaan, mengamati, mengumpulkan dan mengolah serta menganalisis data.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi inkubator, lampu spiritus, kaca objek, mikroskop, pipet tetes, ose bulat, rak pewarnaan, botol semprot, batang pengaduk, gelas kimia 250 mL, gelas ukur 100 mL, labu ukur 100 mL, label, botol reagen, kertas lensa, autoclave, tabung reaksi, kertas pembungkus media, spektrofotometer, kuvet, dan tisu.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bakteri uji *Bacillus subtilis*, aquadest steril, larutan BaCl₂ 1%, H₂SO₄ 0,5%, H₂SO₄ 1%, HCl 0,5%, HCl 1%, larutan NaCl fisiologis, *malachite green* 5%, safranin 1%, minyak imersi, dan xylol.

Tahap Pra Analitik

Sterilisasi alat dilakukan terhadap seluruh alat gelas yang digunakan dalam penelitian. Alat terlebih dahulu dicuci hingga bersih, kemudian dibilas menggunakan aquadest dan dikeringkan. Setelah kering, alat dibungkus

menggunakan kertas pembungkus dan selanjutnya disterilisasi menggunakan oven pada suhu 160°C selama 2 jam atau pada suhu 180°C selama 1 jam. Proses sterilisasi ini bertujuan untuk memastikan seluruh alat bebas dari kontaminasi mikroorganisme sebelum digunakan dalam penelitian (Oktari *et al.*, 2017).

Pembuatan standar McFarland I dilakukan dengan mencampurkan 0,1 mL larutan BaCl₂ 1% dalam 9,9 mL larutan H₂SO₄ 1% hingga terbentuk larutan dengan tingkat kekeruhan tertentu. Larutan ini digunakan sebagai standar untuk menyamakan tingkat kekeruhan suspensi bakteri sehingga jumlah bakteri yang digunakan dalam pengujian menjadi seragam (Widodo *et al.*, 2022). Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan mengambil beberapa koloni *Bacillus subtilis* dari biakan murni menggunakan ose steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL NaCl fisiologis (0,85%). Suspensi kemudian dihomogenkan hingga tingkat kekeruhannya setara dengan standar McFarland I, sehingga diperoleh jumlah bakteri yang relatif seragam untuk digunakan dalam proses pengujian (Nabila & Asri, 2021).

Pembuatan larutan pewarna dilakukan dengan melarutkan 5 gram *malachite green* 5%, serta melarutkan 1 gram safranin 1 gram ke dalam 100 mL aquadest untuk memperoleh larutan safranin 1%. Kedua larutan tersebut digunakan sebagai pewarna utama dan pewarna kontras dalam metode pewarnaan spora (Widodo *et al.*, 2022).

Larutan peluntur dibuat menggunakan asam sulfat (H₂SO₄) dan asam klorida (HCl) dengan konsentrasi 0,5% dan 1%. Larutan disiapkan dengan cara menambahkan asam pekat ke dalam aquadest steril hingga mencapai volume 100 mL sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan (Rahmawati & Pratiwi, 2020).

Media Nutrien Agar dibuat dengan melarutkan serbuk media ke dalam aquadest kemudian dipanaskan hingga homogen. Media selanjutnya disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, didinginkan hingga suhu ± 45°C, lalu dituangkan ke dalam cawan

petri steril. Setelah media memadat, media siap digunakan untuk penumbuh bakteri (Mugiastuti *et al.*, 2019).

Tahap Analitik

Suspensi biakan murni *Bacillus subtilis* diinokulasikan pada media nutrien agar secara aseptik, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, pertumbuhan koloni diamati secara makroskopis untuk memastikan karakteristik koloni bakteri yang terbentuk pada media (Mugiastuti *et al.*, 2019).

Pewarnaan spora dilakukan menggunakan metode *Scheffer-Fulton* dengan terlebih dahulu membuat preparat bakteri secara aseptik pada kaca objek, kemudian dibiarkan mengering di udara dan difiksasi menggunakan lampu spiritus. Preparat selanjutnya ditetesi larutan *malachite green* 5%, kemudian dipanaskan secara perlahan di atas lampu spiritus hingga menguap dan dibiarkan selama ± 3 menit dengan menjaga agar preparat tidak mengering (Waluyo, 2016). Setelah didinginkan, preparat dilunturkan menggunakan larutan H₂SO₄ 0,5% dan 1% serta HCl 0,5% dan 1% selama 1-2 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir. Preparat selanjutnya diberi pewarna kontras safranin 1% selama 30 detik, dicuci kembali dengan air mengalir, lalu dikeringkan dengan menyerap sisa air menggunakan tisu. Preparat yang telah kering kemudian diamati di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif 100x dengan bantuan imersi oil untuk mengidentifikasi keberadaan spora bakteri (Pratiwi, 2017).

Pengukuran pH larutan dilakukan dengan menggunakan pH meter. Sebelum pengukuran, alat terlebih dahulu dikalibrasi menggunakan larutan standar pH asam, pH netral, dan pH basa dengan menekal tombol kalibrasi (Cal). Elektroda pH meter kemudian dibilas menggunakan air khusus dan dikeringkan dengan tisu untuk menghindari kontaminasi. Selanjutnya, elektroda dicelupkan ke dalam larutan yang akan diukur sebanyak ± 50 mL dan digerakkan perlahan hingga larutan

homogen. Setelah itu tombol pembacaan (read/baca) ditekan, kemudian dibiarkan beberapa saat hingga muncul angka pada layar yang menunjukkan nilai pH larutan tersebut (Oktari *et al.*, 2017).

Penentuan panjang gelombang maksimum merupakan tahap awal dalam analisis menggunakan spektrofotometri. Pengukuran pada panjang gelombang maksimum penting dilakukan karena dapat meningkatkan sensitivitas, ketelitian, dan keakuratan hasil analisis, serta meminimalkan kesalahan pengukuran pada proses penentuan konsentrasi suatu zat (Sahara *et al.*, 2021; Wardani *et al.*, 2024).

Pengukuran absorbansi sisa zat warna dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui jumlah zat warna yang masih tersisa setelah proses pewarnaan ditampung terlebih dahulu menggunakan cawan petri, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dimasukkan ke dalam tabung kuvet spektrofotometer. Selanjutnya larutan diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Sari *et al.*, 2019; Pratiwi & Rahman, 2022).

Tahap Pasca Analitik

Nilai absorbansi sisa zat warna dibandingkan pada setiap perlakuan peluntur untuk menentukan efektivitas H₂SO₄ dan HCl dalam proses pelunturan *malachite green*.

Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian dimasukkan ke dalam tabel data. Data diolah dan dianalisis menggunakan Uji Anova.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji One Way Anova dan Uji Duncan terhadap perbandingan absorbansi sisa zat warna H₂SO₄ 0,5%; dan 1%, HCl 0,5%; dan 1% dan *malachite green* 5% dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 1. Perbandingan Absorbansi Sisa Zat Warna H₂SO₄ 0,5%; dan 1%, HCl 0,5%; dan 1% dan *malachite green* 5%

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-hitung	F-tabel	p-value
Between Group	0,131	4	0,033	196621,200	2,603	0,000
Within Groups	0,000	25	0,000			
Total	0,131	29				

Tabel 2. Uji Lanjut H₂SO₄ 0,5%; dan 1%, HCl 0,5%; dan 1% dan *malachite green* 5%

Absorbansi Zat Warna	n	Pengelompokan				
		1	2	3	4	5
Kontrol	6	2,560				
H ₂ SO ₄ 0,5% + air	6	1,686				
H ₂ SO ₄ 1% + air	6	1,742				
HCl 0,5% + air	6	1,629				
HCl 1% + air	6	1,587				

Berdasarkan hasil analisis menggunakan uji Anova pada tabel 1, diperoleh nilai F-hitung sebesar 196621,2 yang jauh lebih besar dibandingkan dengan F-tabel sebesar 2,603, serta nilai p-value sebesar 0,000 (<0,05). Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan berupa penggunaan H₂SO₄ 0,5% dan 1%, HCl 0,5% dan 1%, serta *malachite green* 5% memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai absorbansi sisa zat warna. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan nyata pada kemampuan masing-masing larutan peluntur dalam melunturkan zat warna pada proses pewarnaan spora metode *Scheffer-Fulton*. Metode ini menggunakan *malachite green* sebagai pewarna utama untuk mewarnai endospora bakteri, sedangkan sel vegetatif akan lebih mudah mengalami pelunturan oleh larutan peluntur sehingga menghasilkan kontras warna yang jelas saat diamati secara mikroskopis (Pratiwi, 2017; Waluyo, 2016).

Hasil uji lanjut Duncan pada tabel 2 menunjukkan adanya perbedaan nilai absorbansi pada setiap perlakuan. Nilai absorbansi tertinggi diperoleh pada kelompok kontrol (2,560) yang menunjukkan bahwa tanpa perlakuan peluntur, zat warna *malachite green* masih berada dalam jumlah besar.

Sementara itu, perlakuan menggunakan H_2SO_4 0,5% (1,686) dan H_2SO_4 1% (1,742) menunjukkan penurunan nilai absorbansi dibandingkan kontrol, yang menandakan bahwa H_2SO_4 mampu melunturkan sebagian zat warna yang tidak terikat pada preparat. Hal ini disebabkan oleh sifat H_2SO_4 sebagai asam kuat yang dapat menyebabkan perubahan pada struktur molekul zat warna sehingga ikatan antara zat warna dan komponen sel menjadi lebih mudah terlepas (Rohman, 2018).

Pada perlakuan HCl 0,5% (1,629) dan HCl 1% (1,587) diperoleh nilai absorbansi yang lebih rendah dibandingkan perlakuan menggunakan H_2SO_4 , yang menunjukkan bahwa HCl memiliki kemampuan pelunturan yang lebih efektif terhadap zat warna *malachite green* pada konsentrasi yang digunakan.

Kemampuan tersebut berkaitan dengan ionisasi HCl yang tinggi sehingga dapat memutus interaksi antara zat warna dan komponen sel bakteri yang lebih efektif. Selain itu, penggunaan spektrofotometri UV-Vis dalam penelitian ini memungkinkan pengukuran sisa zat warna secara lebih objektif karena metode ini mengukur kemampuan larutan dalam menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu yang berbanding lurus dengan konsentrasi zat warna dalam larutan (Hidayati & Kusumawati, 2020; Sari *et al.*, 2020).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penggunaan larutan peluntur H_2SO_4 dan HCl pada berbagai konsentrasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai absorbansi sisa zat warna *malachite green* pada pewarnaan spora metode *Schaeffer-Fulton*, yang ditunjukkan dengan nilai F-hitung yang lebih besar dari F-tabel serta p-value <0,05.

Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa perlakuan HCl 1% menghasilkan nilai absorbansi sisa zat warna paling rendah sehingga dinilai sebagai peluntur yang paling efektif dalam melunturkan zat warna *malachite green* dibandingkan perlakuan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Hasibuan, E. S., Sulistiani, R., & Haron, F. F. (2025). Seleksi *Bacillus* sp. sebagai penambat NPK dan penghambat aktivitas jamur patogen tanaman. *Agrium: Jurnal Ilmu Pertanian*, 30(1), 45-52.
- Hidayati, N., & Kusumawati, E. (2020). Pemanfaatan spektrofotometer UV-Vis dalam analisis konsentrasi senyawa kimia di laboratorium. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 9(2), 97-103.
- Istiqomah, I., & Kusumawati, D. E. (2018). Pemanfaatan *Bacillus subtilis* sebagai agen hayati dalam pengendalian penyakit tanaman. *Jurnal Agro*, 5(2), 95-102.
- Liswanto, B. O. (2018). Pengaruh pH terhadap produksi spora *Bacillus subtilis*. Universitas Brawijaya Repository.
- Mugiastuti, E., Manan A., & Rahayuniati, R. F. (2019). Aplikasi *Bacillus* sp. sebagai agen pengendali hayati penyakit tanaman. *Jurnal Agro*, 6(1), 158-165.
- Nabila, F., & Asri, M. T. (2021). Keefektifan *Bacillus subtilis* terhadap penghambat bakteri secara in vitro. *LenteraBio*, 10(2), 158-165.
- Oktari, A., Fathurrahman, & Handayani, S. (2017). Sterilisasi alat dan bahan pada pemeriksaan mikrobiologi laboratorium. *Jurnal Analis Kesehatan Indonesia*, 6(2), 45-50.
- Oktari, D., Wulandari, R., & Sari, P. (2017). Teknik pewarnaan bakteri dalam identifikasi mikroorganisme di laboratorium mikrobiologi. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 6(2), 85-92.
- Pratiwi, R., & Rahman, A. (2022). Analisis konsentrasi zat warna menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 25(2), 65-72.
- Pratiwi, S. T. (2017). *Mikrobiologi farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Rahmawati, S., & Pratiwi, D. (2020). Analisis penggunaan spektrofotometri dalam penentuan konsentrasi zat warna pada penelitian laboratorium. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 23(3), 89-95.
- Rohman, A. (2018). *Analisis farmasi dengan spektrofotometri UV-Vis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Sahara, E., Vania, B., & Pratama, R. (2021). Penentuan panjang gelombang maksimum pada analisis spektrofotometri UV-Vis. *Sainsbertek: Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi*, 3(1), 20-27.
- Sari, D. P., Handayani, S., & Wibowo, A. (2019). Analisis zat warna menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada berbagai panjang gelombang. *Jurnal Analis Kesehatan*, 8(1), 45-51.
- Waluyo, L. (2016). *Mikrobiologi umum*. Malang: UMM Press.
- Wardani, T. K., Yusuf, M., & Rahman, A. (2024). Penetapan kadar kuersetin ekstrak daun jambu biji menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal farmasi Sains dan Teknologi*, 2(1), 15-22.

- Widodo, W., Purlinda, D. E., & Riadi, A. (2022). Perbandingan metode pewarnaan spora pada bakteri genus *Bacillus*. *Jaringan Laboratorium Medis*, 4(1), 21-28.
- Yuniarti, A., Arifin, N. B., Fakhri, M., & Hariati, A. (2019). Produksi Spora dan efisiensi sporulasi *Bacillus subtilis*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 11(2), 120-127.