

---

## Potensi Dan Uji Stabilitas Ekstrak *Lawsonia Inermis* Sebagai Cat Penutup Pada Gram Staining Dengan Variasi Suhu

### Potency and Stability Test of *Lawsonia inermis* Extract as Counterstain on Gram Staining with Temperature Variation

---

Nida Azki Asfiya<sup>1\*</sup>

Dhiah Novalina<sup>2</sup>

Tri Dyah Astuti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia

<sup>3</sup>Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia

\*email: nidaazkiasfiya22@gmail.com

#### Abstrak

Pewarnaan gram merupakan salah satu metode untuk mengidentifikasi bakteri. Safranin merupakan salah satu zat pewarna pada pewarnaan gram. Toksisitas dan bahaya kesehatan yang ditimbulkan dari penggunaan pewarna safranin telah banyak dilaporkan, terutama bahaya pencemaran zat warna yang berasal dari limbah zat warna sintesis. Penggunaan pewarna sintesis sangat berbahaya karena dapat memicu kanker, kerusakan ginjal dan hati. Tanaman yang berpotensi dijadikan sebagai cat penutup pada pewarnaan gram adalah daun pacar kuku (*Lawsonia inermis*) yang mengandung zat warna lawsone. Namun, zat warna alami rentan terhadap suhu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan daun pacar kuku dalam mewarnai bakteri sebagai pewarna penutup pada pewarnaan gram, serta mengetahui stabilitas suhu ekstrak daun pacar kuku pada berbagai variasi suhu. Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif kualitatif dengan desain penelitian eksperimen yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta. Hasil pewarnaan bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*) pada suhu 40°C dan 80°C terlihat tidak kontras dengan latar belakang, sementara pewarnaan Gram positif (*Staphylococcus aureus*) terlihat kontras dengan latar belakang. Dapat disimpulkan bahwa pewarnaan gram bakteri *Escherichia coli* dengan ekstrak *Lawsonia inermis* pada suhu 40°C dan 80°C, diperoleh hasil pewarnaan yang tidak kontras antara sel bakteri dengan latar belakang, sedangkan pada bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh hasil pewarnaan yang kontras antara sel bakteri dengan latar belakang. Uji stabilitas ekstrak *Lawsonia inermis* pada suhu 40°C lebih stabil dibandingkan 80°C.

#### Kata Kunci:

*Lawsonia inermis*, Uji Stabilitas, Pewarnaan Gram, Safranin

#### Keywords:

*Lawsonia inermis*, Stability Test, Gram Staining, Safranin

#### Abstract

Gram staining is one of the methods used for bacterial identification. Safranin is one of the dye substances employed in Gram staining. The toxicity and health hazards associated with the use of safranin have been extensively reported, especially the risk of contamination from synthetic dye waste. The use of synthetic dyes is highly hazardous as it can lead to cancer, kidney, and liver damage. A potential alternative for Gram staining is the use of henna leaves (*Lawsonia inermis*), which contain the dye substance lawsone. However, natural dyes are susceptible to temperature changes. This research aims to determine the ability of henna leaves to stain bacteria as a counterstain in Gram staining and to assess the temperature stability of the henna leaf extract under various temperature variations. This study is a qualitative descriptive research with an experimental design conducted in the Microbiology Laboratory of the Faculty of Health Sciences at 'Aisyiyah University Yogyakarta. The results of Gram staining for Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*) at temperatures of 40°C and 80°C show no contrast with the background, while Gram-positive staining for *Staphylococcus aureus* appears contrasting against the background. It can be concluded that the Gram staining of *Escherichia coli* bacteria with *Lawsonia inermis* extract at temperatures of 40°C and 80°C yields staining results that lack contrast between bacterial cells and the background. In contrast, *Staphylococcus aureus* bacteria exhibit contrasting staining results between bacterial cells and the background. The stability test of *Lawsonia inermis* extract indicates greater stability at 40°C compared to 80°C.

## PENDAHULUAN

Bakteri secara umum tidak berwarna dan hampir tidak nampak. Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan pewarnaan bakteri. Pewarnaan Gram merupakan teknik pewarnaan differential yang paling penting dan paling luas digunakan dan membagi bakteri menjadi dua kelompok, yaitu Gram positif dan Gram negatif (Rini & Rohmah, 2020). Bakteri Gram positif (+) mempertahankan zat warna Kristal violet sehingga sel bakteri tampak berwarna biru atau ungu tua. Bakteri Gram negatif (-) kehilangan Kristal violet ketika di cuci dengan alkohol dan sewaktu diberi *counterstain* safranin sel bakteri tampak berwarna merah (Gracia dalam Miftahul, 2021).

Safranin merupakan salah satu zat warna yang secara luas digunakan pada bidang industri, tekstil, histologi, sitologi dan bakteri. Limbah safranin berdampak bagi kesehatan, diantaranya dapat mengakibatkan iritasi pada mulut, tenggorokan, pernafasan dan perut (Edyani, 2020). Selain itu zat pewarna tersebut mahal, juga mengandung senyawa kimia yang berbahaya bagi kesehatan pengguna. Penggunaan pewarna sintesis sangat berbahaya karena dapat memicu terjadinya kanker serta kerusakan ginjal dan hati (Reysa dalam Pujilestari, 2015). Toksisitas dan bahaya kesehatan yang ditimbulkan dari penggunaan pewarna safranin dan pewarnaan sintetik lain telah banyak dilaporkan, terutama bahaya pencemaran zat warna yang berasal dari limbah cair buangan industri (Nurmasari *et al.*, 2018).

Adanya keterbatasan penggunaan pewarna sintetik, maka dibutuhkan pewarna alternatif yaitu pewarna alami. Pewarna alami dapat dijadikan sebagai alternatif karena selain murah, penggunaan bahan alami lebih aman dan mudah diperoleh. Beberapa penelitian terdahulu telah dilakukan untuk memanfaatkan bahan alami sebagai pengganti pewarnaan gram diantaranya yang dilakukan oleh Niken & Yulia (2023) tentang pemanfaatan daun pacar kuku (*Lawsonia inermis*) sebagai pewarna alternatif untuk mewarnai bakteri

*Escherichia coli*. Daun pacar kuku (*Lawsonia inermis*) mengandung zat warna lawsone. Lawsone (2-hidroksi, 1,4 naftokuinon) merupakan kandungan pewarna utama daun pacar kuku dengan konsentrasi 1,0-1,4%. Daun pacar kuku memiliki substansi zat warna yang bervariasi mulai dari merah, burgundy, kuning tua, coklat kemerahan sampai coklat (Setiana, 2015).

Pada penelitian Niken & Yulia (2023) belum dilakukan uji stabilitas dari ekstrak daun pacar kuku yang digunakan sebagai pewarna alternatif pada pewarnaan bakteri. Kestabilan zat warna lawsone dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain pH, oksigen, cahaya dan suhu yang juga dapat merusak warna zat warna lawsone pada saat proses maserasi (Herwin dalam Niken & Yulia, 2023). Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti tertarik untuk meneliti potensi ekstrak daun pacar kuku sebagai alternatif pewarna safranin serta stabilitas suhu dari ekstrak tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah daun pacar kuku dapat dijadikan sebagai pewarna alternatif safranin sebagai *counterstain* pada pewarnaan gram, serta mengetahui stabilitas suhu dari ekstrak daun pacar kuku.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif kualitatif dengan desain penelitian eksperimen yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.

### PREPARASI SAMPEL

Daun pacar kuku disortir untuk memisahkan daun dari tangkai dan daun yang rusak. Setelah itu daun pacar kuku dicuci dan ditiriskan. Daun yang telah tiris dikeringkan dengan oven selama 4 hari pada suhu 50 °C sampai kadar air daun <10 % dari berat basah. Daun pacar kuku yang telah kering diblender hingga menjadi bubuk.

### EKSTRAKSI

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut ethanol absolut 96%. Bubuk daun

pacar kuku direndam dalam pelarut selama tiga hari dan sesekali diaduk. Setelah tiga hari, hasil maserasi disaring menggunakan kertas *Whatman* no.1 untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Hasil maserat di uapkan dengan hotplate sampai ekstrak menjadi kental.

### UJI STABILITAS SUHU

Pengujian stabilitas suhu dilakukan dengan cara ekstrak daun pacar kuku dibuat menjadi dua larutan yaitu larutan pertama 2 ml ekstrak daun pacar kuku ditambahkan dengan 50 ml aquadest, kemudian dihomogenkan dan dipanaskan pada hotplate dengan suhu 40°C selama satu jam. Larutan kedua dibuat dengan cara 2 ml ekstrak daun pacar kuku ditambahkan dengan 50 ml aquadest, kemudian dihomogenkan dan dipanaskan pada hotplate dengan suhu 80°C selama satu jam. Kemudian dilakukan uji stabilitas dengan cara larutan tersebut di ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 600-640 nm, kemudian dibuat grafik hubungan suhu dengan absorbansi zat warna.

### PEMBUATAN PREPARAT BAKTERI

Pembuatan preparat bakteri dilakukan dengan cara ose cincin di pijarkan di atas spritus kemudian biakan murni dari *E. coli* dan *Staphylococcus aureus* diambil dan diletakkan di kaca objek . Kemudian diteteskan larutan NaCl dan diratakan sehingga membentuk oval. Preparat dibiarkan kering setelah itu di fiksasi diatas spritus.

### PEWARNAAN GRAM

Preparat bakteri yang telah difiksasi digenangi dengan larutan kristal violet selama satu menit, kemudian dibilas dengan aquades. Setelah itu preparat digenangi dengan larutan lugol selama satu menit dan dibilas dengan aquades. Kemudian preparat digenangi dengan larutan alkohol sampai warna luntur dan dibilas dengan aquades. Kemudian preparat digenangi dengan larutan safranin selama 30 detik sebagai kontrol , sedangkan sebagai percobaan maka safranin diganti dengan larutan pewarna dari ekstrak daun pacar kuku dengan suhu 40°C dan 80°C. Preparat dikeringkan. Setelah kering maka dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop perbesaran 100x.

### ANALISIS DATA

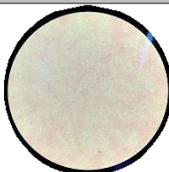
Pengolahan dan analisis data pada penelitian ini berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis pewarnaan gram dengan ekstrak daun pacar kuku pada bakteri *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*. Analisis data hasil pengujian stabilitas disajikan dalam bentuk grafik suhu dan absorbansi zat pewarna dari ekstrak daun pacar kuku pada panjang gelombang 600-640 nm.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### HASIL

Hasil pewarnaan gram dengan ekstrak *Lawsonia inermis* pada bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada Tabel I.

**Tabel I.** Hasil Pewarnaan Gram dengan Zat Warna dari Ekstrak Daun Pacar Kuku pada *Escherichia coli*

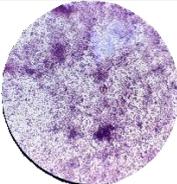
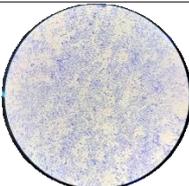
Perlakuan	Warna	Hasil Pewarnaan Gram		Keterangan
		Bentuk	Gambar	
Safranin (kontrol)	Merah	Basil		Penyerapan zat warna terlihat kontras dengan latar belakang

<b>Daun pacar kuku (Suhu 40°C)</b>	Bening	Basil		Penyerapan zat warna terlihat tidak kontras dengan latar belakang
<b>Suhu 80°C</b>	Bening	Basil		Penyerapan zat warna terlihat tidak kontras dengan latar belakang

Sebelum bakteri *Escherichia coli* dan *staphylococcus aureus* diwarnai dengan ekstrak *Lawsonia inermis* dilakukan perlakuan kontrol terlebih dahulu, yaitu *Escherichia coli* dan *staphylococcus aureus* diwarnai dengan safranin untuk melihat perbedaan hasil antara menggunakan zat warna alami dan zat warna sintetis.

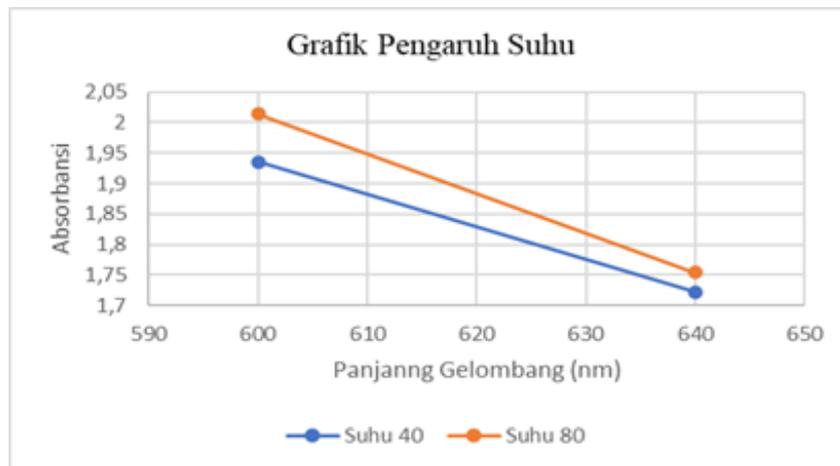
Pewarnaan dengan ekstrak *Lawsonia inermis* juga dilakukan dengan variasi suhu 40°C dan 80°C untuk melihat kestabilan zat warna tersebut. Hasil pewarnaan gram dengan ekstrak *Lawsonia inermis* pada *staphylococcus aureus* disajikan pada Tabel II.

**Tabel II.** Hasil Pewarnaan Gram dengan Zat Warna dari Ekstrak Daun Pacar Kuku pada *Staphylococcus aureus*

Perlakuan	Warna	Hasil Pewarnaan Gram		Keterangan
		Bentuk	Gambar	
<b>Safranin (kontrol)</b>	Ungu	Coccus		Penyerapan zat warna terlihat kontras dengan latar belakang
<b>Daun pacar kuku (Suhu 40°C)</b>	Ungu	Coccus		Penyerapan zat warna terlihat kontras dengan latar belakang
<b>Suhu 80°C</b>	Ungu	Coccus		Penyerapan zat warna terlihat kontras dengan latar belakang

Hasil pewarnaan gram dengan ekstrak *Lawsonia inermis* pada bakteri *staphylococcus aureus* terlihat lebih jelas dan kontras dibandingkan dengan hasil pewarnaan pada bakteri *Escherichia coli*, dikarenakan *staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang tidak menyerap cat warna penutup baik safranin maupun zat

warna ekstrak *Lawsonia inermis*. Variasi suhu pada pewarnaan gram dilakukan untuk melihat stabilitas suhu dari zat warna *Lawsonia inermis*. Hasil uji stabilitas ekstrak *Lawsonia inermis* pada suhu 40°C dan 80°C dapat dilihat pada grafik Gambar 1.



Gambar 1. Grafik uji stabilitas ekstrak *Lawsonia inermis* pada suhu 40°C dan 80°C pada panjang gelombang 600-640 nm.

## PEMBAHASAN

Pada penelitian ini safranin digantikan dengan zat warna dari ekstrak *Lawsonia inermis*. Fungsi dari zat warna ekstrak daun pacar kuku adalah mewarnai dinding sel bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli*. Berdasarkan hasil pada Tabel I dengan perlakuan kontrol yaitu pewarnaan *Escherichia coli* menggunakan safranin mempunyai kualitas hasil pewarnaan yang baik dan kontras yaitu terlihat bakteri berbentuk basil berwarna merah. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang lebih tipis. Setelah pencucian dengan alkohol lapisan lipopolisakarida pada bakteri gram negatif memberikan permeabilitas yang lebih besar, sehingga pewarna sebelumnya dapat lebih mudah dikeluarkan dari sel. Akibatnya, saat proses pewarnaan dengan safranin, bakteri gram negatif akan menerima pewarna safranin dan tampak berwarna merah. Sedangkan hasil pewarnaan gram *Escherichia coli* dengan ekstrak *Lawsonia inermis* pada suhu 40°C dan 80°C kualitas hasil pewarnaan kurang baik, karena hanya terlihat bakteri berbentuk basil jernih tidak berwarna. Hal ini tidak sejalan dengan penelitian Niken & Yulia (2023) yang

menyatakan

bahwa ekstrak daun pacar kuku (*Lawsonia inermis*) efektif dan dapat digunakan sebagai pengganti pewarna penutup pada pewarnaan gram, pada pewarnaan tersebut tampak bakteri basil berwarna merah. Berdasarkan studi literatur yang dilakukan oleh Edyani (2020) menyatakan bahwa zat pewarna alami yang efektif digunakan sebagai pewarna alternatif safranin dalam *gram staining* adalah daun pacar kuku. Pada penelitian ini *Escherichia coli* tidak terwarnai dengan sempurna menggunakan ekstrak daun pacar kuku karena dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya perbandingan konsentrasi antara ekstrak daun pacar kuku dan pelarut masih belum sempurna, pencucian dengan alkohol yang terlalu lama dapat menyebabkan semua pewarna keluar dari sel bakteri, baik dari bakteri gram positif maupun gram negatif. Hal ini dapat menyebabkan kesulitan dalam membedakan antara kedua jenis bakteri. Selain itu suhu yang tidak stabil atau waktu yang tidak sesuai, dapat memengaruhi hasil akhir. Suhu yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat mempengaruhi interaksi antara bakteri, pewarna, dan reagen. Kontaminasi zat warna dapat menyebabkan gangguan dalam proses pewarnaan dan menghasilkan hasil yang kurang akurat. Kesalahan

dalam prosedur pewarnaan juga dapat mempengaruhi hasilnya.

Hasil pewarnaan bakteri *Staphylococcus aureus* pada Tabel 2 dengan perlakuan kontrol safranin, perlakuan suhu 40°C dan 80°C memperlihatkan hasil pewarnaan gram yang baik dan kontras yaitu terlihat bakteri berbentuk coccus berwarna ungu. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang memiliki dinding sel yang lebih tebal daripada bakteri gram negatif. Struktur ini memungkinkan bakteri gram positif mempertahankan kristal violet selama pencucian dengan alkohol.

Uji stabilitas suhu pada penelitian ini dilakukan dengan larutan zat warna ekstrak daun pacar kuku dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pada uji stabilitas ini terjadi penurunan absorbansi dari suhu 40°C ke 80°C pada  $\lambda$  600-640 nm dapat dilihat pada grafik Gambar 1. Hal ini sejalan dengan Sharifi & Hassani, (2012 dalam Nasrullah et al., 2020) yang menyatakan bahwa salah satu faktor penyebab penurunan nilai absorbansi adalah enzim. Enzim menyebabkan terjadinya dekolerasi zat warna, sehingga warna yang diekstrak akan memudar. Hal ini diduga dengan semakin tinggi suhu pemanasan maka akan mengakibatkan pigmen warna mengalami dekomposisi dan nilai absorbansinya menurun. (Wijaya dalam Yusuf et al., 2023) menyatakan bahwa suhu dan lama penyinaran menyebabkan terjadinya dekomposisi dan perubahan struktur pigmen sehingga terjadi pemucatan. Penurunan absorbansi juga dapat disebabkan oleh denaturasi protein, banyak zat warna alami yang memiliki struktur kompleks, seperti protein. Pemanasan yang tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein, yang mengakibatkan perubahan bentuk dan struktur molekuler. Perubahan ini bisa menyebabkan perubahan dalam absorbansi spektrum zat warna. Pemanasan ekstrak zat warna dapat menyebabkan perubahan kimia, seperti reaksi oksidasi atau degradasi. Perubahan ini bisa merusak struktur molekuler zat warna dan mengakibatkan penurunan absorbansi.

Selain itu pemanasan dapat mengakibatkan penguapan pelarut. Konsentrasi zat warna dalam larutan dapat meningkat, dan hal ini dapat mempengaruhi absorbansi. Menurut Oktaviani (2016) warna yang dihasilkan daun pacar kuku lebih pekat, jika tanaman tumbuh pada temperatur antara 35°C sampai 45°C. Pada temperatur di bawah 11°C tanaman tidak berkembang dengan baik, dan pada temperatur di bawah 5°C tanaman akan mati. Lawsonia sebagai molekul warna, terutama banyak terkandung di dalam daunnya, dan kandungan warna terpekat terdapat pada tangkai daunnya. Maka stabilitas suhu ekstrak daun pacar kuku yang digunakan sebagai zat warna stabil pada temperatur antara 35°C sampai 45°C dan pada temperatur tersebut pigmen warna lebih pekat dan maksimal jika digunakan sebagai pewarna.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pewarnaan gram bakteri *Escherichia coli* dengan ekstrak *Lawsonia inermis* pada suhu 40°C dan 80°C, diperoleh hasil pewarnaan yang tidak kontras antara sel bakteri dengan latar belakang. Sedangkan hasil pewarnaan gram bakteri *Staphylococcus aureus* dengan ekstrak *Lawsonia inermis* diperoleh hasil pewarnaan yang kontras antara sel bakteri dengan latar belakang. Hasil uji stabilitas ekstrak *Lawsonia inermis* pada suhu 40°C lebih stabil dibandingkan 80°C, ditandai terjadinya penurunan absorbansi pada suhu 80°C.

## SARAN

Penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan lebih lanjut. Bagi peneliti selanjutnya dapat dicari konsentrasi yang paling sesuai antara ekstrak daun pacar kuku dengan pelarut untuk dijadikan pewarna alternatif pengganti safranin pada pewarnaan gram, serta diteliti lebih lanjut mengenai stabilitas zat pewarna daun pacar kuku, baik dari sisi suhu, lama penyimpanan, pH dan lain sebagainya.

## DAFTAR PUSTAKA

Edyani, J. S., Widyantara, A. B., & Novalina, D. 2020. Systematic Review: Pemanfaatan Bahan Alami Sebagai Pewarna Alternatif Pengganti Safranin pada Pewarnaan Gram. *Disertasi*. Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Yogyakarta.

Miftahul, K. 2021. Identifikasi Ekstrak Ubi Jalar (*Ipomea Batatas Poiret*) sebagai Zat Pewarna Alternatif pada Pewarnaan Gram. *Skripsi*. Universitas Perintis Indonesia, Padang.

Niken, N., & Yulia, I. 2023. Innovation of extract (*Lawsonia inermis L*) as alternative dye for *Escherichia Coli* bacterial staining. *International Journal of Multidisciplinary Approach Research and Science*, 1(03):512-517.

Nasrullah, N., Husain, H., & Syahrir, M. 2020. Pengaruh suhu dan waktu pemanasan terhadap stabilitas pigmen antosianin ekstrak asam sitrat kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrizus*) dan aplikasi pada bahan pangan. *Chemica*, 21(2):150-162 .

Nurmasari, R., Umaningrum, D., & Yuliyanti, E. 2018. Kajian Sorpsi Zat Warna Safranin O Pada Sorben Beads Kitosan-Tripolifosfat. *Sains dan Terapan Kimia*, 12(1):34 – 40.

Oktaviani, I. M. 2016. Pengaruh Rebusan Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis Linn.*) terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Mencit Jantan (*Mus musculus L.*). *Skripsi*. Univeritas Jember, Jember.

Pujilestari, T. 2015. Sumber dan pemanfaatan zat warna alam untuk keperluan industry. *Dinamika Kerajinan dan Batik*, 32(2):93-106.

Rini, C. S., & Rohmah, J. 2020. Buku Ajar Mata Kuliah Bakteriologi Dasar. *Umsida Press*, 1-108.

Setiana, Shella. 2015. Pengaruh Konsentrasi Mordan Kapur Dengan Zat Warna Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis*) Kering Terhadap Pewarnaan Kain Knit Cotton Dengan Teknik Tie Dye. *Jurnal SI Tata Busana*, 4(3):38-43.

Susanto, H. 2016. Pemeriksaan Protozoa, Helminthes. Depok, PPPPTK Bisnis dan Pariwisata.

Yusuf, T. M., Nurjanah, A., & Wapa, A. 2023. Karakteristik Uji Stabilitas Pigmen dan Antioksidasi Hasil Ekstraksi Pewarna Alami dari Kulit Buah Naga Merah. *SOKO GURU: Jurnal Ilmu Pendidikan*, 3(1):163-176.