

**PEMANFAATAN LARUTAN
KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan* L.) SEBAGAI COUNTERSTAIN
PADA PENGECATAN GRAM *Escherichia coli* ATCC 25922**

*The Application Of Sappan Wood Solution
(Caesalpinia Sappan L.) As Counterstain In Gram Staining Of Escherichia
Coli ATCC 25922*

**Francisko Angelo Eko Sujono¹, Anggraeni Sih Prabandari^{2*},
Fredericus Pramonodjati³**

^{1,2,3} Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Santo Paulus
Surakarta

¹anggraenisihp@gmail.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Pengecatan Gram merupakan metode identifikasi bakteri berdasarkan komponen dinding sel. Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) mengandung senyawa brazilin yang teroksidasi menjadi brazilein, suatu kromofor berwarna merah. Brazilein mengandung atom O gugus fungsional yang dapat berikatan dengan peptidoglikan sehingga berpotensi sebagai pewarna sel bakteri.
Tujuan Penelitian : Menguji efektivitas larutan secang sebagai *counterstain* pada pengecatan Gram *Escherichia coli* ATCC 25922.

Metode : Jenis penelitian merupakan eksperimental. Brazilein diperoleh melalui maserasi serbuk kayu secang dalam pelarut akuades dan etanol 96% selama 1 minggu. Larutan secang digunakan sebagai *counterstain* dengan metode pewarnaan langsung, pra-mordan, dan mordan berkelanjutan. Hasil pewarnaan dinilai oleh peneliti berdasarkan standar penilaian parameter uji, yaitu: intensitas, artifak, dan keseragaman warna. Data dianalisis dengan uji *One Way ANOVA* dan *Duncan*.
Hasil : Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara tiap perlakuan. Larutan etanol 96%-secang metode pra-mordan memberikan intensitas warna tertinggi sedangkan larutan akuades-secang metode pewarnaan langsung menghasilkan jumlah artifak terendah.

Kesimpulan: Larutan kayu secang dapat digunakan sebagai *counterstain* pada pengecatan Gram *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kata kunci: pengecatan Gram, larutan secang, brazilein, mordan, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Background: Gram staining differentiates bacteria by their chemical and physical properties of their cell walls. Brazilein, a chromophore is oxidizing form of brazilin, the main chemical component of sappan wood (*Caesalpinia sappan* L.). Its O functional group can bind to peptidoglycan, a component of bacteria cell wall and stain them.
Research purpose : We conduct this research to evaluate the efficacy of sappan wood solution as counterstain in Gram staining of *Escherichia coli* ATCC 25922.

Methods : This study was an experimental laboratory design. We obtained brazilein extract by macerated the sappan wood powder in aquadest and ethanol 96% solvent for a week. They were applied as counterstain by direct dyeing, pre-mordanting, and simultaneous mordanting methods. The staining result is evaluated based on density, artifact, and color consistency. The data were analyzed with One Way ANOVA and Duncan test.

Results: The result shows there were significantly difference among the treatments. Ethanol 96%-sappan wood solution by pre-mordanting method has the highest color intensity, whereas aquadest-sappan wood solution by direct dyeing has the lowest number of artifact.

Conclusion: Sappan wood solution can be used as counterstain in Gram staining of *Escherichia coli* ATCC 25922

Keywords: Gram staining, sappan wood solution, brazilein, mordant, *Escherichia coli*

PENDAHULUAN

Pengecatan Gram merupakan metode identifikasi bakteri yang penting dalam proses diagnosis penyakit infeksi. Pengecatan Gram menggunakan reagen kristal violet (pewarna primer), iodine, etanol 95%, dan safranin (*counterstain*). Safranin mewarnai bakteri Gram negatif menjadi merah. Mekanisme pewarnaan terjadi melalui ikatan ionik antara pewarna basa dengan komponen dinding peptidoglikan karboksil dan amino yang bermuatan negatif (Natarajan, 2018). Limbah reagen pengecatan Gram apabila tidak diolah dengan benar dapat mencemari lingkungan. Hal ini karena bahan kimia sintetis sulit didegradasi dan pada konsentrasi tertentu dapat mengintervensi aktivitas biologis makhluk hidup. Selain itu, reagen Gram khususnya safranin dapat menyebabkan kerusakan mata serius yang berbahaya bagi petugas laboratorium (Global Safety Management, 2014). Berdasarkan hal tersebut, maka peneliti ingin mengembangkan *counterstain* alternatif dengan kualitas pewarnaan yang sama, tetapi lebih aman dan *ecofriendly*.

Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) mengandung senyawa brazilin yang teroksidasi oleh udara dan cahaya matahari menjadi brazilein, suatu kromofor berwarna merah (Rondao *et al.*, 2013). Brazilein umumnya diolah menjadi brazalum, suatu larutan pewarna histologi. Brazalum serupa dengan hemalum yang secara selektif mewarnai nukleus (Dapson dan Bain, 2015). Selain itu, larutan brazilein pada pH 5 diketahui memberikan kualitas pewarnaan yang baik pada pewarnaan sel spermatozoa (Husein dan Abdurrahman, 2018). Pemanfaatan brazilein sebagai pewarna sediaan hanya terbatas pada sel/jaringan manusia dan binatang. Dalam bidang bakteriologi, brazilein kemungkinan dapat mewarnai sel bakteri pada pewarnaan Gram melalui pembentukan kompleks mordan. Brazilein memiliki gugus hidroksil yang berpotensi membentuk ikatan hidrogen dengan peptidoglikan yang merupakan lapisan terluar bakteri meskipun sangat minimal. Selain itu, berdasarkan karakteristik warnanya maka kemungkinan dapat pula diaplikasikan sebagai *counterstain* pengecatan Gram (Dapson dan Bain, 2015).

Mordan secara tradisional digunakan dalam pewarnaan tekstil untuk mengikat zat warna alami pada serat kain. Setiap jenis mordan memberikan reaksi pewarnaan yang berbeda. Alumunium asetat merupakan mordan yang baik digunakan pada serat selulosa. Peptidoglikan yang merupakan lapisan dinding sel bakteri memiliki struktur yang serupa dengan selulosa karena tersusun atas monomer gula dan memiliki gugus hidroksil sehingga dalam pewarnaan Gram digunakan mordan alumunium. Selain itu, ion alumunium dapat membentuk kompleks koordinasi dengan brazilein (StainsFile, 2019).

Brazilein diperoleh dari kayu secang melalui ekstraksi maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan merendam simplisia dalam pelarut tertentu. Brazilein merupakan homoisoflavonoid yang larut dalam pelarut polar seperti akuades dan etanol (Dapson dan Bain, 2015). Lamanya proses ekstraksi yaitu 3 – 7 hari tergantung dari ukuran sampel, jenis dan volume pelarut. Hasil dari ekstraksi maserasi adalah larutan yang mengandung senyawa fitokimia.

METODE

Jenis penelitian yang digunakan ialah eksperimen murni kuantitatif dengan desain penelitian *Posttest-Only Group Design*. Subjek penelitian adalah larutan pewarna kayu secang, sedangkan objek penelitian adalah *Escherichia coli* ATCC 25922. Larutan pewarna kayu secang meliputi: larutan akuades-secang metode pewarnaan langsung (K1), larutan akuades-secang metode pra-mordan (K2), larutan akuades-secang metode mordan berkelanjutan (K3), larutan etanol 96%-secang metode pewarnaan langsung (K4), larutan etanol 96%-secang metode pra-mordan (K5), dan larutan etanol 96%-secang metode mordan berkelanjutan (K6). Setiap jenis larutan secang diujicobakan sebanyak 4 kali.

Ekstraksi dilakukan dengan merendam 10 gram serbuk kayu secang masing-masing dalam 100 ml akuades mendidih dan etanol 96%. Rendaman didiamkan selama 1 minggu dengan penggojokan berkala setiap 12 jam. Setelah 1 minggu, larutan dipisahkan dari residu dan disimpan dalam botol kaca hingga siap digunakan. Larutan kayu secang tersebut digunakan sebagai *counterstain* pada pengecatan Gram dengan metode pewarnaan langsung, pra-mordan, dan mordan berkelanjutan.

Mordan alumunium asetat dibuat dengan mencampur 0,7 gram $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dan 0,8 gram $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dalam 100 ml akuades. Larutan mordan tersebut ditambahkan pada larutan secang dengan perbandingan volume 1:2 untuk membuat larutan secang-mordan. Larutan mordan tersebut juga digunakan pada metode pra-mordan.

Prosedur pewarnaan mengikuti standar prosedur operasional pengecatan Gram dengan rincian waktu setiap reagen sebagai berikut: kristal violet 2% 60 detik, iodine 60 detik, etanol 95% 10 – 30 detik, dan safranin 0,25% 30 detik (Remel, 2008). Pada metode pewarnaan langsung, pra-mordan, dan mordan berkelanjutan, safranin digantikan oleh: larutan secang 5 menit, larutan mordan 3 menit kemudian larutan secang 2 menit, dan larutan secang-mordan 4 menit. Setelah penambahan larutan mordan dan larutan secang, preparat tidak dicuci, tetapi ditiriskan hingga kering sempurna.

Preparat diamati secara mikroskopis dengan perbesaran kuat 1000x dan diperiksa 20 lapang pandang. Hasil pewarnaan dinilai berdasarkan parameter: intensitas warna (Tabel 1), keberadaan artifak, dan keseragaman warna. Intensitas warna dinilai berdasarkan warna standar bakteri Gram negatif yaitu merah muda sampai merah (sebagai *gold standard*) yang ditentukan mengacu pada Hardy Diagnostics (2014). Intensitas warna ini diukur dengan tabel warna sederhana yang dibuat oleh peneliti dan disesuaikan berdasarkan warna kontrol dan latar belakang lapang pandang. Semakin pudar warna semakin rendah nilai intensitas yang diberikan.

Tabel 1. Diagram Gradasi Warna Pengecatan Gram

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Artifak adalah sisa atau gumpalan cat yang dapat mengganggu pengamatan. Penilaian (N) dilakukan secara kuantitatif dengan konversi jumlah lapang pandang yang tidak terdapat artifak (LP) sebagai berikut:

$$20 \times N = 10 \times LP$$

$$N = \frac{10 \times LP}{20}$$

Keterangan:

N : nilai (1-10)

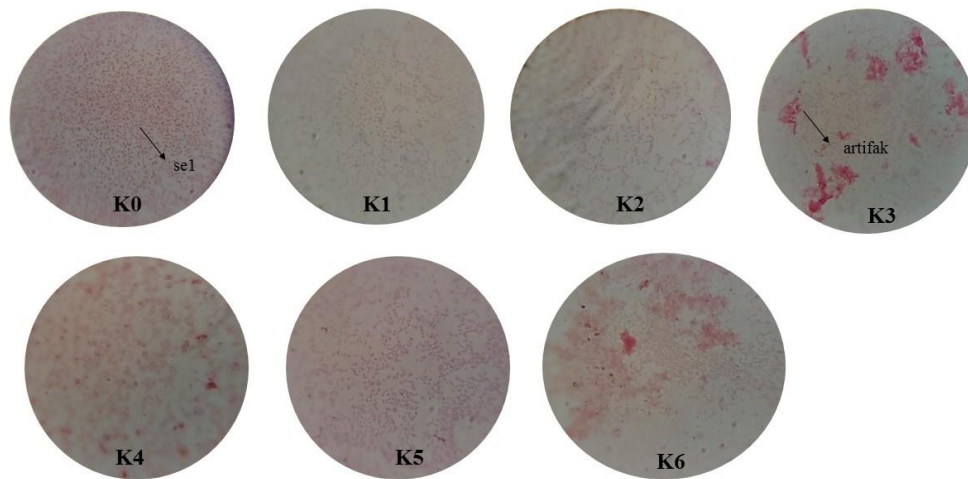
LP : jumlah lapang pandang

Uji statistik yang digunakan ialah uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% dilanjutkan uji *Duncan*. Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk menganalisis perbedaan perlakuan terhadap hasil, sedangkan uji *Duncan* digunakan untuk menganalisis pengaruh antar perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

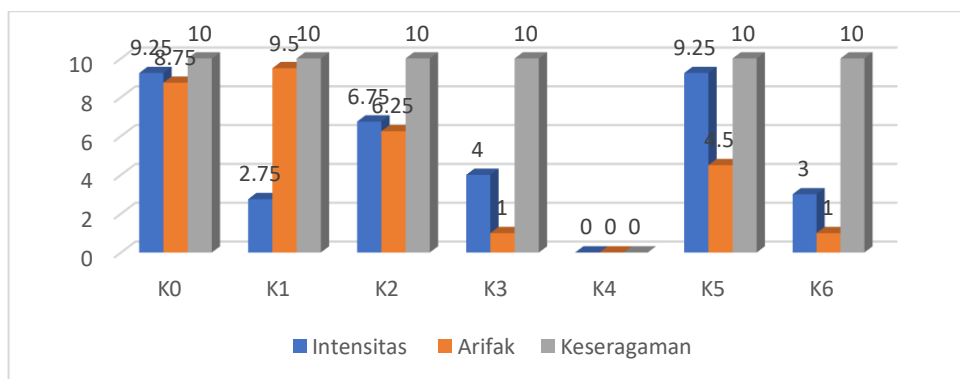
Hasil

Hasil pewarnaan sel bakteri K0 (kontrol positif/safranin), K1 (larutan akuades-secang metode pewarnaan langsung), K2 (larutan akuades-secang metode pra-mordan), K3 (larutan akuades-secang metode mordan berkelanjutan), K4 (larutan etanol 96%-secang metode pewarnaan langsung), K5 (larutan etanol 96%-secang metode pra-mordan), dan K6 (larutan etanol 96%-secang metode mordan berkelanjutan) terlihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 1. Hasil Pewarnaan Bakteri pada Masing-masing Kelompok Perlakuan

Rerata penilaian terhadap intensitas warna yang terbentuk, keseragaman warna dan keberadaan artifak diberikan pada diagram pada Gambar 2 di bawah ini.

Gambar 2. Grafik Rerata Nilai Kualitas Pewarnaan Gram *Escherichia coli*

Tabel 2. Output One Way ANOVA

Parameter	Nilai Signifikansi
Intensitas Warna	0,00*
Artifak	

* $p < 0,05$ ada beda signifikan

Hasil penilaian dianalisis secara statistik dengan uji *One Way ANOVA*. Tabel 2 menunjukkan nilai signifikansi sebesar $0,00 < 0,05$ sehingga terdapat perbedaan intensitas warna antar perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji *Duncan* untuk melihat

besarnya pengaruh dari setiap perlakuan terhadap intensitas warna. Semakin besar pengaruh maka semakin baik intensitas warnanya sehingga dapat diurutkan perlakuan dari kualitas terbaik ke terburuk, sebagai berikut: K0 dan K5, K2, K3, K6 dan K1, dan K4. Demikian pula pada parameter artifak warna dengan urutannya sebagai berikut: K0 dan K1, K2, K5, dan K6, K3, dan K4. Uji *One Way ANOVA* parameter keseragaman warna tidak dilakukan karena nilai yang diperoleh tiap perlakuan adalah sama dan merupakan nilai maksimum kecuali K4.

Pembahasan

Larutan kayu secang mengandung brazilein, suatu senyawa kromofor berwarna merah yang berpotensi sebagai *counterstain* pada pengecatan Gram. Brazilein memiliki 2 struktur dominan yang berbeda tergantung pH. Pada pH netral, brazilein mengalami perubahan gugus 10-hidroksil menjadi atom O⁻, demikian pula pada pH basa dengan penambahan perubahan yang sama pada gugus 3-hidroksil (Ngamonglumlert, 2020).

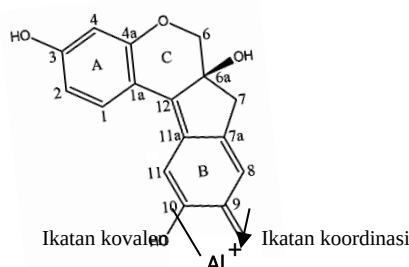
Berdasarkan hasil pewarnaan bakteri pada Gambar 1 terlihat bahwa hasil pewarnaan sel bakteri K0 (kontrol positif/safranin) dan K5 yaitu merah muda cerah dan merah muda violet dengan intensitas warna tinggi sehingga morfologi sel jelas. Hasil pewarnaan K2, K3, dan K6 masing-masing: merah muda violet, merah tua, dan merah dengan intensitas sedang sehingga morfologi sel kurang jelas. Selanjutnya, K1 dengan hasil pewarnaan merah muda violet, tetapi intensitas warnanya rendah sehingga morfologi sel tidak jelas. Sebaliknya dengan K4, sel bakteri sama sekali tidak terwarnai sehingga morfologi tidak dapat diamati.

Preparat dengan jumlah artifak terbanyak yaitu K3 dan K6. K2 dan K5 memiliki cukup banyak artifak, tetapi dengan ukuran yang lebih kecil daripada K3 dan K6 sehingga sel bakteri tidak tertutupi dan masih dapat diamati dengan jelas. Pada K1 dan K2 ditemukan sangat sedikit artifak. Secara keseluruhan setiap perlakuan menghasilkan sebaran warna yang merata kecuali K4. Hal ini karena pada sel yang tidak terwarnai tingkat absorpsi sel terhadap bahan pewarna tidak dapat dinilai.

Berdasarkan Gambar 2, diketahui bahwa metode dengan intensitas warna tertinggi ke terendah ialah metode pra-mordan, kemudian mordan berkelanjutan, dan terakhir pewarnaan langsung. Pada metode pra-mordan, K5 memberikan intensitas warna yang lebih baik daripada K2. Hal ini karena etanol 96% memiliki tingkat kepolaran yang sama dengan brazilein. Adapun reaksi pewarnaan yang terjadi yaitu ikatan koordinasi antara alumunium dan gugus hidroksil peptidoglikan (tahap *mordanting*) dan kompleks koordinasi antara alumunium dan brazilein (tahap pewarnaan) (Zaman *et al.*, 2018; StansFile, 2019).

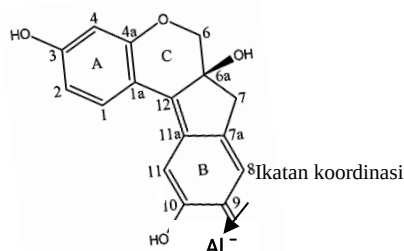
Pada metode mordan berkelanjutan, K3 memberikan intensitas pewarnaan yang lebih baik daripada K6. Hal ini karena tingkat kelarutan dan disosiasi mordan terjadi optimum dalam pelarut air bukan etanol 96%. Tingkat disosiasi mempengaruhi interaksi elektron kompleks alumunium-brazilein yang

menyebabkan pergeseran batokromik. Adapun jenis reaksi pewarnaan yang terjadi yaitu kompleks koordinasi antara brazilein dan alumunium (tahap pembuatan larutan secang-mordan) dan ikatan koordinasi antara gugus hidroksil peptidoglikan dengan kompleks alumunium-brazilein (tahap pewarnaan) (Zaman *et al.*, 2018).



Gambar 3. Kompleks Al-Brazilein yang terjadi pada perlakuan K3 dan K5 (Rattanaphani & Bremmer, 2008; Ngamonglumlert, 2020)

Pada metode pewarnaan langsung, K1 memberikan intensitas pewarnaan yang lebih baik daripada K4. Hal ini karena pada pH basa (pH larutan-secang K4 = 8,8), brazilein bermuatan negatif, demikian pula dinding sel sehingga terjadi penolakan zat warna oleh peptidoglikan yang menyebabkan zat warna tidak dapat berdifusi ke dalam sel. pH larutan secang K1 yaitu 6,8, di mana brazilein bersifat nonionik dan lipofilik sehingga brazilein dapat masuk ke dalam dinding sel, tetapi tidak dapat berikatan dengan komponen dinding sel. Hal ini mengakibatkan hanya sedikit zat warna yang tertahan di dalam sel akibat gaya van der Waals (Dapson dan Bain, 2015).



Gambar 4. Kompleks Al-Brazilein yang terjadi pada perlakuan K2 dan K4 (Rattanaphani & Bremmer, 2008; Ngamonglumlert, 2020)

Metode pra-mordan lebih baik daripada metode mordan berkelanjutan karena pada metode mordan berkelanjutan dihasilkan kompleks alumunium-brazilein (pigmen) yang ukuran molekulnya lebih besar (> 1nm) daripada pori dinding sel *Escherichia coli* (± 2 nm) sehingga zat warna lebih sulit berdifusi ke dalam dinding sel. Hal ini berbeda pada metode pra-mordan, di mana proses pewarnaan terjadi secara bertahap, yaitu *mordanting* kemudian pewarnaan sehingga tidak terbentuk pigmen lebih dahulu.

Metode mordan berkelanjutan menghasilkan jumlah artifak terbanyak daripada metode pra-mordan. Hal ini karena pada mordan berkelanjutan, larutan yang digunakan adalah asam lemah ($\text{pH} = 4,2$) sehingga memperantarai terbentuknya flok oleh Al^{3+} (Mbaeze *et al.*, 2017). Selain itu, artifak juga disebabkan oleh akumulasi brazilein dan presipitat $\text{Al}(\text{OH})_3$. Pada metode pra-mordan, artifak berasal dari pembentukan pigmen brazilein dengan sisa mordan yang menempel pada preparat. Metode pewarnaan langsung menghasilkan jumlah artifak paling sedikit karena akumulasi brazilein beradhesi lemah dengan permukaan kaca benda (tidak ada tahap *mordanting*) sehingga zat warna terbuang saat preparat ditiriskan.

Seluruh kelompok memberikan hasil keseragaman warna yang baik kecuali kelompok K4. Hal ini menandakan bahwa metode yang digunakan mampu memberikan sebaran zat warna yang merata pada *smear*. Brazilein merupakan senyawa yang larut dalam air dan ethanol melalui ikatan hidrosil sehingga setiap molekul pelarut mengandung molekul brazilein.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Larutan kayu secang dapat digunakan sebagai *counterstain* pada pengecatan Gram *Escherichia coli* ATCC 25922. Perlakuan K5 (larutan ethanol 96%-secang metode pra-mordan) menghasilkan intensitas warna dan keseragaman warna terbaik, sedangkan perlakuan K1 (larutan akuades-secang metode pewarnaan langsung) menghasilkan jumlah artifak terkecil dan keseragaman warna terbaik.

Saran

Untuk penelitian selanjutnya, dapat dilakukan pengujian penggunaan ekstrak murni brazilein dan fiksatif untuk meningkatkan kualitas pewarnaan. Selain itu, dapat pula dilakukan pemanfaatan ekstrak brazilein kayu secang sebagai pewarna pada jenis pengecatan bakteri lainnya dan jaringan.

DAFTAR PUSTAKA

- Dapson, R. dan C. Bain. 2015. Brazilwood, Sappanwood, Brazilin and The Red Dye Brazilein: From Textile and Folk Medicine to Biological Staining and Musical Instruments. *Biotechnic & Histochemistry* 90(6): 401-423
- Global Safety Management. 2014. Safety Data Sheet: Safranin Staining Solution 1%. <http://www.beta-static.fischerchi.com>. Tanggal akses 21 Februari 2022
- Hardy Diagnostics. 2014. Q-Slide™ Gram. https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/Q-SlideGram.htm. 17 November 2021.
- Husein, L. O. I dan S. Aburrahman. 2018. Pengaruh Variasi pH Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* Linn) terhadap Pewarnaan Sel Spermatozoa pada Sampel Suspek Infertilitas. *Jurnal MediLab Mandala Waluya Kendari* 2(2): 29-33.

- Mbaeze, M. C., V. E. Agbazue, dan N. M. Orjioke. 2017. Comparative Assessment of Performance of Alumunium Sulphate (Alum) and Ferrous Sulphate as Coagulant in Water Treatment. *Mod Chem Appl* 5(4): 1-14
- Natarajan, K. A. 2018. *Biotechnology of Metals: Principles, Recovery Methods, and Environmental Concern*. Elsevier. London.
- Ngamwonglumlert, L., S. Devahastin, N. Chiewchan, dan G. S. V. Raghavan. Color and Molecular Structure Alterations of Brazilein Extracted from *Caesalpinia sappan* L. Under Different pH and Heating Conditions. *SCIENTIFIC Reports* 10(12386): 1-10.
- Rattanaphani, V. dan J. Bremmer. 2008. Study of an Al (III) Complex with the Plant Dye Brazilein from *Caesalpinia sappan* Linn. *Suranaree J. Sci. Technol* 15(2): 159-165.
- Remel. 2008. Gram Decolorizer (95% Ethyl Alcohol). <https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/MBD/Instructions/IFU40168.pdf>. 18 Juli 2022.
- Rondao R., J. S. S. de Melo, J. Pina, M. J. Melo, T. Vitorino, dan A. J. Parola. 2013. Brazilwood Reds: The (Photo)Chemistry of Brazilin and Brazilein. *The Journal of Physical Chemistry* 117: 10650-10660.
- StainsFile. 2019. Formulating Alum Hematoxylin. https://stainsfile.info/stain/hematoxylin/mordant_hemalum.htm. 12 Januari 2022.
- Zaman, N. U., M. L. R. Liman, A. Kader, M. A. Al Mamun, B. Sarker, R. Islam, dan I. Parveen. 2018. An Eco-friendly Approach of Cotton Fabric Dyeing with Natural Dye Extracted from *Bixa orellana* Seeds Employing Different Metallic Mordants. *Chemical and Materials Engineering* 6(1): 1-8.