

**EKSTRAK DAUN JATI (*Tectona grandis*) ALTERNATIF PEWARNA  
PADA PENGHITUNGAN JUMLAH DAN VIABILITAS SEL  
KULTUR DIBANDINGKAN DENGAN PEWARNA  
TRYPHAN BLUE**

**I Gusti Ayu Sri Andayani<sup>1\*</sup>, Sri Sulastri<sup>2</sup>, Dwi Ampera Hananto<sup>3</sup>,  
& Made Sriasih<sup>4</sup>**

<sup>1&3</sup>Fakultas MIPA, Universitas Mataram, Indonesia

<sup>2&4</sup>Fakultas Peternakan, Universitas Mataram, Indonesia

*E-mail* : [igasriandayani@gmail.com](mailto:igasriandayani@gmail.com)

**ABSTRAK:** Tryphan blue berasal dari toluidine yaitu salah satu basa isomer toluene yang memiliki kandungan pigmen alami antosiasin. Tryphan blue umumnya digunakan untuk penghitungan sel dan untuk penghitungan viabilitas jaringan pada tikus laboratorium. Pada dasarnya penggunaan tryphan blue berbahaya bagi pekerja laboratorium, karena memiliki efek karsinogenik, mutagenesis, sehingga diperlukan bahan lain terutama bahan alam yang lebih aman dan tidak berbahaya. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kualitas ekstrak pewarna daun jati sebagai pewarna alami pada penghitungan jumlah dan viabilitas sel kultur dibandingkan dengan pewarna tryphan blue. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga faktor perlakuan (etanol 96%, asam sitrat 14%, dan Phospat Buffer Saline (PBS)) dengan pengamatan 5 kali ulangan penghitungan jumlah dan viabilitas sel limposit pada menit ke-1, 10, 20, dan 30 dengan tryphan blue sebagai kontrol positif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kualitas pewarna daun jati dengan pelarut etanol 96% viabilitas tidak berbeda nyata, memberikan kualitas warna yang baik dan diperoleh waktu viabilitas yang sama dengan tryphan blue.

**Kata Kunci:** Daun Jati, Tryphan Blue, Viabilitas Sel Kultur Sel.

**ABSTRACT:** Tryphan blue comes from toluidine which is one of the bases of toluene isomer which has a natural pigment content of anthiasin. Tryphan blue is commonly used for cell counting and for the calculation of tissue viability in laboratory mice. Basically the use of tryphan blue is dangerous for laboratory workers because it has a carcinogenic effect, mutagenesis, so other materials are needed especially safer and harmless natural materials. This study aims to compare the quality of teak leaf dye extract as a natural dye on the calculation of the number and viability of culture cells compared to tryphan blue dye. The study used the Complete Randomized Design (RAL) method with three treatment factors (96% ethanol, 14% citric acid, and Phospat Buffer Saline (PBS)) and observations of 5 replays be used for the calculation of the number and viability of spleen cells in the 1<sup>st</sup>, 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup>, and 30<sup>th</sup> minutes with tryphan blue as a positive control. The results showed that the quality of teak leaf dye with ethanol solvent 96% viability does not differ materially, provides good color quality and obtained the same viability time as tryphan blue.

**Keywords:** Teak Leaves, Tryphan Blue, Cell Culture Viability.

## PENDAHULUAN

Di Indonesia, bahan pewarna alami banyak digunakan seperti dari bahan alam berupa tanaman yang mengandung antosianin baik bagian bunga, daun, batang, maupun akar. Aplikasi penggunaan pewarna alami diantaranya yaitu sebagai pewarna alami pada makanan dan tekstil. Pewarna alami yang dapat diaplikasikan pada makanan diantaranya yaitu: buah naga (Ekawati, Rostiati, & Syahraeni, 2015), kulit manggis (Farida & Nisa, 2015), dan kunyit (Syarfi, 2013).



Sedangkan pewarna alami yang dapat diaplikasikan sebagai pewarna tekstil yaitu daun jati (Rosyida & Achadi, 2014). Selain digunakan sebagai pewarna makanan dan tekstil, pewarna alami dari bahan alam dapat pula digunakan sebagai pewarna pada proses pewarnaan bakteri. Filtrat daun jati muda yang mengandung antosianin dapat dijadikan pewarna alami pada preparat jaringan epidermis, parenkim, floem, xilem, dan sklerenkim (Nurwanti, Budiono, & Pratiwi, 2013).

Senyawa antosianin daun jati memberikan warna merah, ungu, hingga merah gelap. Penggunaan pucuk daun jati muda tersebut menghasilkan warna yang lebih merah jika dibandingkan dengan daun jati tua, dikarenakan kandungan pigmen antosianin yang lebih tinggi. Selain itu, jaringan pucuk daun jati muda yang belum mengeras dan memiliki kandungan air yang lebih tinggi menyebabkan bagian daun tersebut lebih mudah digerus.

Zat warna alam sebelum digunakan harus diekstraksi terlebih dahulu. Ekstraksi biasanya dilakukan dengan perebusan, soxhlet, ataupun dengan menggunakan alat ekstraktor. Kekontrasan warna preparat juga dipengaruhi oleh proses ekstraksi dan pelarut yang cocok dengan sifat zat yang akan diekstrak, dimana zat yang akan diekstrak dapat larut di dalamnya. Berdasarkan studi yang telah dilakukan, antosianin memiliki sifat kimia yang tidak larut dalam larutan basa dan dapat larut dalam asam. Semakin asam pH pelarut yang digunakan akan semakin banyak pigmen yang dapat terlarut dalam bentuk kation flavium (Ali, Ferawati, & Arqomah, 2013). Hasil ekstrak zat warna alam tersebut masih dalam bentuk cair, sehingga sulit untuk digunakan dan kurang praktis. Oleh karena itu, ekstrak zat warna yang masih berbentuk cair ini dikeringkan sehingga menjadi serbuk. Pembuatan serbuk zat warna memerlukan alat pengering. Alat pengering yang dapat dipakai adalah spray dryer dan oven.

Pada tahapan kultur sel, ada proses penghitungan jumlah dan viabilitas sel kultur secara mikroskopis dengan hemasitometer yang menggunakan pewarna tryphan blue. Tryphan blue ( $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ ) pertama kali disintesis oleh ilmuwan Jerman yaitu Paul Ehrlich tahun 1904. Karena sel hidup memiliki membran sel utuh, tryphan blue tidak dapat menembus membran sel sel hidup dan sitoplasma. Dalam sel mati, tryphan blue melewati membran sel berpori dan memasuki sitoplasma, sehingga sel mati akan menyerap warna biru. Tryphan blue dinyatakan memiliki efek karsinogen, mutagenesis, dan gangguan fertilitas pada hewan coba. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kualitas ekstrak daun jati sebagai pewarna alami yang aman dan tidak berbahaya serta murah untuk proses pewarnaan, penghitungan jumlah, dan viabilitas sel dengan pembanding pewarna tryphan blue.

## **METODE**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Peternakan, Universitas Mataram. Menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 ulangan. Terdiri dari tryphan blue 0,4% sebagai kontrol positif, pewarna daun jati PBS sebagai kontrol negatif, perlakuan pewarna daun jati muda etanol 96%, dan pewarna daun jati asam sitrat 14%. Jumlah sel (jumlah



sel x 10<sup>4</sup>) dan % viabilitas sel limposit dihitung dengan hemositometer pada menit ke-1, 10, 20, dan 30 dengan rumus seperti di bawah ini.

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{Jumlah Sel Hidup}}{\text{Jumlah Sel Seluruhnya}} \times 100\%$$

### **Ekstraksi Pucuk Daun Jati Muda**

Pucuk daun jati muda dicuci dengan air mengalir, kemudian dikering anginkan dan dipotong kecil-kecil. Setelah itu, ditimbang masing-masing perlakuan 50 gr. Sampel daun jati muda digerus hingga halus menggunakan mortar, kemudian dilakukan maserasi dengan masing-masing pelarut dengan perbandingan 1:3 (1 bagian sampel : 3 bagian pelarut). Masing-masing ditambahkan dengan 150 ml pelarut PBS, etanol 96% dan asam sitrat 14%. Kemudian rendam selama 26 jam pada suhu ruang 37°C. Larutan ekstrak disaring menggunakan kertas saring, dan filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan evaporator vacum suhu ± 40°C dengan tekanan ± 220 mbar. Filtrat kental masing-masing 1 ml dimasukkan ke dalam eppendorf tube yang telah dilubangi bagian penutupnya dan larutan dibekukan pada suhu -60°C. Kemudian filtrat dikeringkan menggunakan pengering spray dryer.

### **Penyiapan Sel Limposit**

Pengujian pewarna menggunakan sel kultur limposit yang diperoleh dari limpa mencit jantan Balb/c berumur 2 hingga 3 bulan dengan berat badan sekitar 20-30 gr secara aseptik. Mencit dimatikan secara fisik yaitu dislokasi leher dilakukan setelah dibius dengan dietil eter. Mencit kemudian dianastesi menggunakan alkohol 70%, robek bagian abdomen menggunakan gunting secchio. Diambil limpa mencit secara hati-hati dan dipindahkan ke cawan petri steril berisi 5 ml RPMI. Keluarkan limposit dengan menyemprotkan media RPMI menggunakan spuit ke dalam limpa. Suspensi sel yang didapat dimasukkan ke dalam tabung dan disentrifugasi 3000 rpm selama 5 menit. Pelet yang terbentuk disuspensikan dengan larutan NH<sub>4</sub>Cl 0,17 M sebanyak 5 ml, untuk melisis sel darah merah selama 5 menit pada suhu kamar. Selanjutnya disentrifugasi 3000 rpm, 5 menit pada suhu kamar. Pelet yang didapat dicuci dengan RPMI sebanyak dua kali. Jumlah sel dihitung dan dikultur menggunakan media RPMI 10% PBS, penisilin 100 IU/ml – streptomisin 100 µl/ml, suhu 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, selama 24 jam.

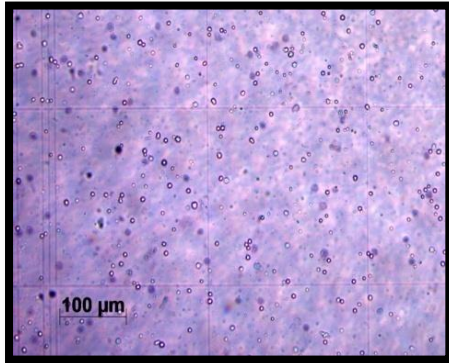
Untuk perlakuan sel yang telah diinkubasi selama 24 jam dipanen dari petri dish kemudian dimasukkan ke dalam plate 96 masing-masing sebanyak 10 µl. Ditambahkan pewarna masing-masing 90 µl sesuai perlakuan ke dalam well. Dihitung jumlah sel dan viabilitas sel dengan hemositometer. Dihitung viabilitas kembali di menit ke-10, 20, dan 30 menit perendaman pewarna.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

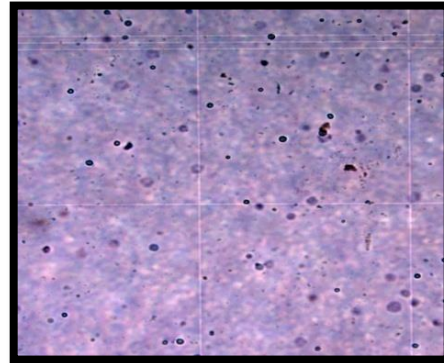
Secara umum, penggunaan pewarna memberikan kontras yang baik pada pengamatan mikroskop. Garis pembatas pada bilik hitung hemositometer terlihat jelas. Pada Gambar 1, sel limposit yang berwarna putih bening dan tidak menyerap pewarnaan trypan blue dihitung sebagai sel yang hidup, sedangkan



pada Gambar 2, sel yang mati akan berwarna biru dan gelap karena menyerap pewarnaan tryphan blue (Djajanegara & Wahyudi, 2010).

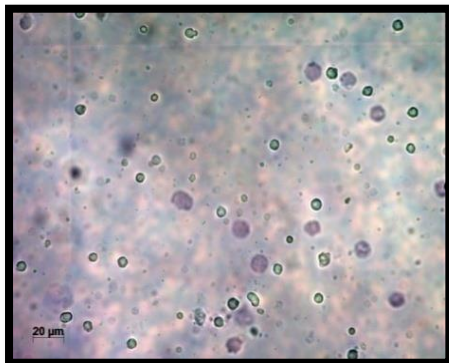


**Gambar 1. Limposit Hidup.**

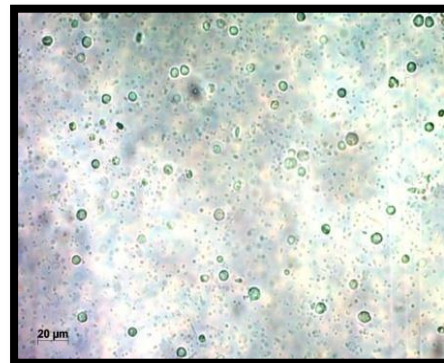


**Gambar 2. Limposit Mati.**

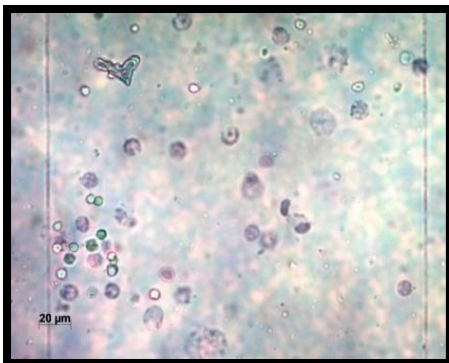
Berikut beberapa gambar hasil pengamatan dari tiap perlakuan:



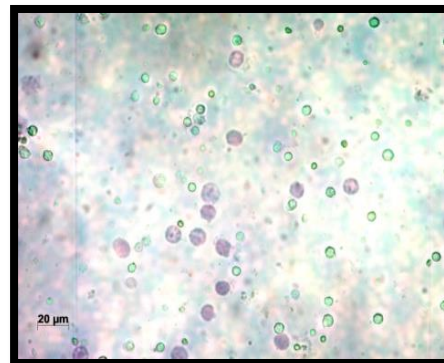
**Gambar 3. Pewarnaan Tryphan Blue.**



**Gambar 4. Pewarnaan Daun Jati PBS.**



**Gambar 5. Pewarnaan Daun Jati Etanol 96%.**



**Gambar 6. Pewarnaan Daun Jati Asam Sitrat 14%.**

Pada Gambar 3, sel yang diwarnai dengan tryphan blue memiliki kontras warna yang baik. Karena sel hidup memiliki membran sel utuh, tryphan blue tidak dapat menembus membran sel sel hidup dan sitoplasma, sel terlihat jernih dan berwarna kebiruan. Pada sel mati, pewarna melewati membran sel berpori dan



memasuki sitoplasma sehingga sel mati akan menyerap warna biru gelap. Pada Gambar 4, menggunakan pewarna daun jati muda dengan pelarut Phospat Buffer Saline (PBS) didapatkan gambaran sel yang jelas, namun memiliki kontras warna yang lemah. Ini dapat dikarenakan pH netral dari PBS yang kurang mampu melarutkan pigmen warna dari daun jati. Gambar 5 dengan pelarut etanol 96% menunjukkan sel terwarnai dengan baik, terlihat dengan jelas antara sel yang hidup maupun mati. Sesuai dengan hasil penelitian yang menyebutkan bahwa, antosianin dapat larut dalam pelarut yang bersifat polar seperti etanol maupun pelarut netral (Julita, Isda, & Lestari, 2014). Asam sitrat ( $C_6H_8O_7$ ) merupakan pelarut organik yang bersifat polar. Golongan asam ini jika dikombinasikan dengan air dapat melarutkan zat-zat yang dapat larut pada pelarut polar, contohnya antosianin (Lazuardi, 2010). Gambar 6 dengan menggunakan pelarut asam sitrat 14%, warna filtrat merah cerah karena pigmen warna dapat larut dengan baik pada asam sitrat. Asam menyebabkan dinding vakuola yang pecah semakin banyak sehingga pigmen antosianin semakin banyak yang terekstrak (Setiawan, Nugroho, & Lestario, 2015). Akan tetapi, kontras warna sel tidak sebaik tryphan blue, hal ini dikarenakan pewarna alami dengan pelarut asam mudah mengalami degradasi oleh cahaya.

**Tabel 1. Rerata Viabilitas antar Berbagai Perlakuan pada Menit ke-1, ke-10, ke-20, & ke-30.**

Perlakuan	Menit ke-			
	1	10	20	30
Tryphan Blue (K+)	98.5 <sup>a</sup>	97.5 <sup>ab</sup>	83.5 <sup>a</sup>	71.75 <sup>a</sup>
PBS (K-)	98.6 <sup>a</sup>	98.6 <sup>b</sup>	98.2 <sup>b</sup>	97.8 <sup>c</sup>
Etanol	99 <sup>a</sup>	94.6 <sup>a</sup>	82.2 <sup>a</sup>	80 <sup>b</sup>
Asam Sitrat	98.8 <sup>a</sup>	98.8 <sup>b</sup>	98 <sup>b</sup>	96.6 <sup>c</sup>

Dari hasil uji SPSS pada menit ke-1, rata-rata viabilitas antar empat kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata. Ini menunjukkan bahwa, sel terwarnai bagian sitoplasma saja. Pada menit ke-10, rata-rata viabilitas tertinggi terjadi pada perlakuan menggunakan asam sitrat, hal ini terlihat belum adanya sel yang mati. Akan tetapi tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan perlakuan tryphan blue maupun PBS. Pada menit ke-20, viabilitas tertinggi terjadi pada perlakuan PBS, atau berbeda nyata jika dibandingkan dengan perlakuan tryphan blue dan etanol, dan tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan perlakuan PBS. Demikian pula pada menit ke-30, viabilitas tertinggi terjadi pada perlakuan PBS dan asam sitrat, atau berbeda nyata jika dibandingkan tryphan blue dan etanol. Hal ini dikarenakan PBS merupakan larutan penyangga yang tidak dapat merusak membran sel, sehingga penyerapan pewarna pada sel yang matipun akan diperlambat.

Pada penelitian ini diperoleh pewarna yang memiliki kualifikasi mendekati tryphan blue adalah pewarna jati menggunakan pelarut etanol 96%. Kemampuan pewarna tryphan blue mampu masuk menembus membran sel yang telah mati pada menit ke-20, begitu juga halnya dengan pewarna daun jati muda menggunakan pelarut etanol 96%. Pewarna dibuat dalam bentuk serbuk memiliki



kelebihan dengan larutan yaitu memiliki masa simpan panjang, ringan, dan volumenya lebih kecil, sehingga mempermudah dalam pengemasan dan distribusi. Selain itu, pembuatan serbuk akan menghilangkan sifat toksik pelarut terhadap sel kultur.

### **SIMPULAN**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, kualitas pewarna daun jati dengan pelarut etanol 96% viabilitas tidak berbeda nyata. Pewarna daun jati dengan pelarut etanol 96% memberikan kualitas warna yang baik dan diperoleh waktu viabilitas yang sama dengan tryphan blue.

### **SARAN**

Perlunya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kualitas masa simpan pewarna terhadap hasil pengamatan.

### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah meluncurkan program hibah pengembangan profesi bagi PLP di perguruan tinggi, karena telah memfasilitasi PLP dalam menghasilkan produk penelitian. Sehingga mampu meningkatkan kompetensi PLP sebagai tenaga fungsional. Kami ucapkan terima kasih juga kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini, sehingga penelitian ini dapat terlaksana sesuai dengan harapan.

### **DAFTAR RUJUKAN**

- Ali, F., Ferawati, & Arqomah, R. (2013). Ekstraksi Zat Warna dari Kelopak Bunga Rosella (Study Pengaruh Konsentrasi Asam Asetat dan Asam Sitrat). *Jurnal Teknik Kimia*, 19(1), 26-34.
- Djajanegara, I., & Wahyudi, P. (2010). Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Herba Ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) terhadap Sel T47D secara In Vitro. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 8(1), 41-47.
- Ekawati, P., Rostiati, & Syahraeni. (2015). Aplikasi Ekstrak Kulit Buah Naga sebagai Pewarna Alami pada Susu Kedelai. *Jurnal Agrotekbis*, 3(2), 198-205.
- Farida, R., & Nisa, F. C. (2015). Ekstraksi Antosianin Limbah Kulit Manggis Metode Microwave Aasisted Extration (Lama Ekstraksi dan Rasio Bahan Pelarut). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(2), 362-373.
- Julita, I., Isda, & Lestari. (2014). Pengujian Kualitas Pigmen Antosianin pada Bunga Senduduk (*Melastoma malabathricum* L.) dengan Penambahan Pelarut Organik dan Asam yang Berbeda. *JOM FMIPA*, 1(2), 1-7.
- Lazuardi, R. N. M. (2010). Mempelajari Ekstraksi Pigmen Antosianin dari Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan Berbagai Jenis Pelarut. *ST Skripsi*. Universitas Pasundan Bandung.



- Nurwanti, M., Budiono, J. D., & Pratiwi, R. (2013). Pemanfaatan Filtrat Daun Muda Jati sebagai Bahan Pewarnaan Alternatif dalam Pembuatan Preparat Jaringan Tumbuhan. *Jurnal Biologi Education*, 2(1), 73-76.
- Rosyida, A., & Achadi, D. (2014). Pemanfaatan Daun Jati Muda untuk Pewarnaan Kain Kapas pada Suhu Kamar. *Jurnal Ilmiah Arena Tekstil*, 29(2), 115-124.
- Setiawan, M. A. W., Nugroho, E., & Lestario. (2015). Ekstraksi Betasianin dari Kulit Umbi Bit (*Beta vulgaris*) sebagai Pewarna Alami. *Jurnal Ilmu Pertanian (AGRIC)*, 27(1), 38-43.
- Syarfi. (2013). Pembuatan Zat Warna Alami dari Kunyit dengan Membran Ultrafiltrasi. *Jurnal Teknobiologi*, IV(1), 29-33.

