



Penggunaan Safranin sebagai Pewarna Alternatif dalam Pengamatan Mikroskopik Daun Bayam

Amelia Putri Az Zahra^{1*}, Azlinatul Lulu Kharolaini², Feni Atika Tsureya³, Khotimah Nur Ramadhani⁴, Pramai Sheila eka khoireina⁵, Septi Puspita Kurniawati⁶, Liss Dyah Dewi Arini⁷

Universitas Duta Bangsa Surakarta

Korespondensi Penulis: ameliaputri.01092021@gmail.com

Abstract: *Microscopic staining is an important technique in observing plant tissue to increase contrast and clarify cellular structures. One of the dyes commonly used in plant tissue studies is Safranin, a cationic base compound from the azo group that has a high affinity for cell components that produce negative impacts such as lignin and nucleic acids. This study aims to determine the effectiveness of Safranin as an alternative dye in microscopic observation of spinach leaf tissue (Amaranthus spp.). The practicum was carried out using the wet preparation method, using cross-sections of spinach leaves stained with Safranin solution, then observed under a light microscope. The results showed that Safranin was able to provide good red color contrast to cell walls, cell nuclei, and blood vessel tissue, so that structures such as epidermis, palisade tissue, sponges, and xylem and phloem could be clearly identified. However, obstacles arise in the regulation of concentration and duration of staining, where excess of both can cause excess and excessive structural accuracy. Therefore, adjustment of technical parameters is needed to obtain optimal results. These findings indicate that Safranin is effective as a microscopic dye and has the potential to be used in educational practicum activities, because it is economical, safe, and easy to apply. This study also applies the interdisciplinary application of chemistry and biology in science learning.*

Keywords: *Safranin, Microscopic dye, Spinach Leaves, Plant Anatomy, Ionic Interactions*

Abstrak: Pewarnaan mikroskopik merupakan teknik penting dalam pengamatan jaringan tumbuhan untuk meningkatkan kontras dan memperjelas struktur seluler. Salah satu zat pewarna yang umum digunakan dalam studi jaringan tumbuhan adalah Safranin, senyawa basa kationik dari golongan azo yang memiliki afinitas tinggi terhadap komponen sel bermuatan negatif seperti lignin dan asam nukleat. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas Safranin sebagai pewarna alternatif dalam pengamatan mikroskopik jaringan daun bayam (*Amaranthus spp.*). Praktikum dilakukan dengan metode preparat basah, menggunakan potongan melintang daun bayam yang diwarnai dengan larutan Safranin, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya. Hasil menunjukkan bahwa Safranin mampu memberikan kontras warna merah yang baik pada dinding sel, inti sel, dan jaringan pembuluh, sehingga struktur seperti epidermis, jaringan palisade, spons, serta xilem dan floem dapat diidentifikasi dengan jelas. Namun, hambatan muncul dalam pengaturan konsentrasi dan durasi pewarnaan, di mana kelebihan keduanya dapat menyebabkan pewarnaan berlebihan dan mengaburkan detail struktur. Oleh karena itu, penyesuaian parameter teknis diperlukan untuk memperoleh hasil optimal. Temuan ini menunjukkan bahwa Safranin efektif sebagai pewarna mikroskopik dan berpotensi digunakan dalam kegiatan praktikum pendidikan, karena bersifat ekonomis, aman, dan mudah diaplikasikan. Studi ini juga memperlihatkan penerapan interdisipliner antara kimia dan biologi dalam pembelajaran sains.

Kata kunci: Safranin, pewarna mikroskopik, daun bayam, anatomi tumbuhan, interaksi ionik.

1. PENDAHULUAN

Teknik pewarnaan atau staining merupakan salah satu metode esensial yang digunakan untuk meningkatkan kontras struktur seluler sehingga mempermudah observasi di bawah mikroskop (Dean, 1940). Tanpa pewarnaan, banyak struktur mikroskopis dalam jaringan tumbuhan maupun hewan tampak transparan atau terlalu samar untuk diidentifikasi. Pewarna merupakan salah satu objek penting dalam pengamatan laboratorium, khususnya dalam bidang botani, mikrobiologi, dan histologi (Noor, Tika and Agustina, 2020). Salah satu zat pewarna

yang umum digunakan dalam pengamatan jaringan tumbuhan adalah Safranin. Safranin merupakan senyawa kimia yang tergolong dalam kelompok senyawa azo – senyawa aromatik yang mengandung gugus azo ($-N=N-$) yang memberikan warna khas pada zat tersebut. Senyawa ini umumnya berbentuk serbuk kristal merah yang larut dalam air atau alkohol dan menghasilkan larutan berwarna merah muda atau merah tua tergantung pada konsentrasinya. Secara kimia, Safranin memiliki rumus molekul $C_{20}H_{19}ClN_4$, dan merupakan senyawa basa kationik yang memiliki afinitas tinggi terhadap komponen jaringan sel yang bermuatan negatif, seperti asam nukleat dan lignin pada dinding sel tumbuhan.

Di berbagai tumbuhan, terutama pada spesimen daun seperti daun bayam (*Amaranthus* spp.), Safranin berfungsi sebagai pewarna utama untuk mewarnai dinding sel sekunder yang mengandung lignin, serta inti sel dan struktur lainnya yang memiliki daya ikat terhadap senyawa basa. Ketika digunakan dalam pewarnaan mikroskopik, Safranin akan memberikan warna merah pada struktur yang menyerapnya dengan baik, sehingga memperjelas batas dan bentuk sel yang diamati. Pemilihan Safranin sebagai pewarna dalam pengamatan daun bayam bukan tanpa alasan. Selain karena sifat kimianya yang stabil dan mudah larut, Safranin juga relatif murah, mudah didapat, serta aman digunakan dalam skala laboratorium pendidikan. Namun demikian, efektivitasnya sangat tergantung pada konsentrasi larutan, durasi pewarnaan, dan teknik fiksasi atau persiapan spesimen sebelum proses pewarnaan. Pewarnaan yang terlalu tebal atau penggunaan konsentrasi larutan yang terlalu tinggi dapat mengaburkan struktur mikroskopik, sehingga justru menyulitkan pengamatan, seperti yang terjadi dalam praktik pengamatan ini.

Bayam dipilih sebagai objek karena memiliki struktur jaringan daun yang cukup kompleks dan khas, seperti epidermis, jaringan palisade, jaringan spons, dan pembuluh angkut, yang semuanya dapat diamati dengan jelas jika proses pewarnaan dilakukan secara optimal. Kandungan kloroplas dalam sel bayam juga membuat daun ini menarik untuk diamati karena akan tampak kontras dengan pewarna merah dari Safranin. Dari sudut pandang kimia, Safranin bekerja melalui interaksi ionik antara gugus bermuatan positif pada molekul pewarna dan gugus bermuatan negatif yang terdapat dalam jaringan sel tumbuhan. Mekanisme ini dikenal sebagai pewarnaan basa, di mana Safranin, sebagai zat pewarna kationik, akan tertarik oleh komponen jaringan yang bersifat anionik seperti nukleus, dinding sel berlignin, dan bagian dari sitoplasma. Hal ini memungkinkan diferensiasi struktur jaringan berdasarkan afinitas kimia terhadap zat pewarna tersebut.

Pemanfaatan Safranin sebagai pewarna dalam pendidikan sains, khususnya kimia dan biologi, juga mencerminkan penerapan prinsip interdisipliner. Di satu sisi, Safranin adalah

subjek dalam kajian kimia organik karena struktur molekul dan sifat pewarnanya. Di sisi lain, senyawa ini menjadi alat bantu penting dalam kajian struktur anatomi tumbuhan yang merupakan materi biologi. Dengan demikian, praktik penggunaan Safranin dalam pengamatan mikroskopik tidak hanya melatih keterampilan teknis, tetapi juga memperkaya pemahaman lintas bidang.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian atau praktik ini bertujuan untuk mengeksplorasi penggunaan Safranin sebagai pewarna alternatif yang efektif dalam pengamatan mikroskopik daun bayam. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengevaluasi kekuatan warna yang dihasilkan, kejelasan struktur yang dapat diamati, serta tantangan teknis seperti ketebalan pewarnaan yang dapat memengaruhi hasil akhir. Temuan dari praktik ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap peningkatan metode pewarnaan sederhana yang dapat diterapkan dalam pembelajaran laboratorium di tingkat pendidikan menengah hingga perguruan tinggi.

2. KAJIAN PUSTAKA

Struktur Senyawa Safranin

Safranin adalah salah satu jenis zat pewarna sintetik yang termasuk dalam kelompok zat warna azo dan dikenal sebagai pewarna basa (Zadegan *et al.*, 2024). Safranin paling sering digunakan dalam bentuk Safranin O, yang secara kimia memiliki rumus molekul $C_{20}H_{19}ClN_4$ dan massa molar sekitar 350,85 g/mol. Struktur molekulnya terdiri dari dua cincin aromatik (fenil) yang dihubungkan oleh gugus azo ($-N=N-$) serta gugus amino ($-NH_2$) dan gugus metil ($-CH_3$) sebagai substituen (Preethi *et al.*, 2006).

Struktur khas dari Safranin mengandung inti fenazin, yaitu sistem cincin aromatik dengan nitrogen, yang membuat molekul ini bersifat aromatik dan stabil. Bagian penting lainnya dari Safranin adalah keberadaan ion klorida (Cl^-) sebagai penyeimbang muatan, karena Safranin dalam bentuk garam mengandung kation pewarna bermuatan positif (Baumgartner, Richtol and Aikens, 1981). Kation ini ($Safranin^+$) sangat berperan dalam pewarnaan jaringan karena dapat berikatan secara elektrostatis dengan bagian-bagian sel yang bermuatan negatif, seperti dinding sel tumbuhan yang mengandung lignin, nukleus yang mengandung DNA, dan beberapa komponen sitoplasmik lainnya.

Sifat Azo dan Basa dari Senyawa Pewarna

Safranin termasuk dalam golongan pewarna azo, yaitu kelompok zat warna yang mengandung gugus azo ($-N=N-$) sebagai bagian utama dari struktur molekulnya. Gugus azo inilah yang bertanggung jawab atas warna merah atau merah muda khas dari Safranin karena

menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu (Baldacci *et al.*, 2020). Pewarna azo dikenal luas dalam industri tekstil dan biologi karena variasi warnanya yang luas dan kestabilan warnanya yang baik

Dari sisi sifat basa, Safranin tergolong sebagai zat pewarna basa (cationic dye). Ini berarti Safranin memiliki muatan positif pada kondisi larutan biasa, dan akan tertarik oleh struktur sel atau jaringan yang bersifat asam atau bermuatan negatif. Dalam pengamatan mikroskopik, interaksi ini memungkinkan Safranin untuk menempel dengan kuat pada bagian jaringan tumbuhan yang memiliki kandungan lignin atau asam nukleat tinggi. Hasilnya, bagian-bagian tersebut tampak berwarna merah, memperjelas kontras saat dilihat di bawah mikroskop (Alkherraz, 2023). Kombinasi antara struktur azo yang memberi warna dan sifat basa yang memungkinkan penempelan selektif ini menjadikan Safranin sangat efektif dalam aplikasi pewarnaan biologis, termasuk dalam pengamatan anatomi daun bayam.

Mekanisme Pewarnaan Mikroskopik

Pewarnaan mikroskopik merupakan teknik penting dalam pengamatan jaringan biologis yang bertujuan untuk meningkatkan kontras sel atau jaringan agar strukturnya dapat terlihat lebih jelas di bawah mikroskop. Proses pewarnaan ini bekerja melalui mekanisme kimiawi, di mana molekul pewarna akan berinteraksi dengan komponen-komponen sel berdasarkan sifat muatan atau afinitas kimia tertentu. Dalam praktik mikroskopi tumbuhan, pewarna digunakan untuk memperjelas batas antar jaringan seperti dinding sel, inti sel, dan pembuluh angkut, sehingga struktur yang diamati dapat dikenali dengan lebih akurat. Pewarna tertentu akan menempel secara selektif pada bagian tertentu dari jaringan sel, tergantung pada sifat kimianya.

Interaksi ionik merupakan dasar utama dari proses pewarnaan biologis, terutama saat menggunakan pewarna basa seperti Safranin. Molekul Safranin memiliki muatan positif (kation), yang membuatnya tertarik secara elektrostatis kepada struktur jaringan yang bermuatan negatif. Dalam sel tumbuhan, bagian-bagian yang bermuatan negatif seperti asam nukleat di inti sel dan lignin dalam dinding sel sekunder memiliki afinitas tinggi terhadap Safranin. Akibatnya, Safranin akan menempel pada struktur-struktur tersebut dan memberikan warna merah yang khas. Interaksi ionik ini memungkinkan diferensiasi jaringan, sehingga bagian-bagian tertentu menjadi lebih menonjol dibanding yang lain saat diamati dengan mikroskop.

Pewarna mikroskopik dapat diklasifikasikan menjadi dua berdasarkan sifat muatannya, yaitu pewarna asam dan pewarna basa. Pewarna asam, yang memiliki muatan negatif (anionik), cenderung berikatan dengan bagian sel yang bermuatan positif seperti protein dasar dalam

sitoplasma. Salah satu contoh pewarna asam yang umum digunakan adalah eosin. Sebaliknya, pewarna basa seperti Safranin bersifat kationik dan akan berinteraksi dengan struktur bermuatan negatif, seperti nukleus dan dinding sel yang mengandung lignin.

Anatomi Daun Bayam

Daun bayam (*Amaranthus* spp.) merupakan organ tumbuhan yang berperan utama dalam proses fotosintesis dan respirasi (Prabowo and Rachmawati, 2020). Secara anatomi, daun bayam tersusun atas beberapa jaringan utama yang masing-masing memiliki struktur dan fungsi yang khas. Struktur paling luar dari daun adalah epidermis, yang terdiri dari sel-sel pipih dan transparan yang tersusun rapat tanpa ruang antar sel (Fauziah, 2021). Epidermis berfungsi melindungi jaringan dalam dari kerusakan fisik dan kehilangan air. Di bagian permukaan epidermis ini juga terdapat kutikula, yaitu lapisan lilin yang memperkecil penguapan air. Pada epidermis terdapat stomata, yaitu pori-pori kecil yang dikelilingi oleh dua sel penjaga. Stomata berperan dalam pertukaran gas antara jaringan dalam daun dan lingkungan, termasuk pengambilan karbon dioksida serta pelepasan oksigen dan uap air.

Di bawah epidermis terdapat jaringan utama daun, yaitu mesofil, yang terbagi menjadi dua bagian: jaringan palisade dan jaringan spons. Jaringan palisade tersusun atas sel-sel silindris yang memanjang dan rapat, mengandung banyak kloroplas, serta menjadi lokasi utama berlangsungnya fotosintesis. Bagian ini biasanya terletak tepat di bawah epidermis atas. Sementara itu, jaringan spons (spongy parenchyma) berada di bawah jaringan palisade dan terdiri dari sel-sel yang tidak teratur bentuknya dengan banyak ruang antarsel. Ruang-ruang ini berfungsi memfasilitasi pertukaran gas dalam daun, sehingga mendukung proses fotosintesis dan respirasi secara efisien. Dalam daun bayam juga terdapat pembuluh angkut yang membentuk berkas vaskular dan berfungsi dalam transportasi zat. Berkas ini terdiri dari dua jaringan utama, yaitu xilem dan floem. Xilem berfungsi mengangkut air dan mineral dari akar menuju daun, sedangkan floem berperan dalam mengangkut hasil fotosintesis (seperti gula) dari daun ke bagian lain tumbuhan. Berkas pembuluh ini biasanya dikelilingi oleh jaringan pendukung yang memperkuat struktur daun.

3. METODELOGI

Pada praktikum ini, dilakukan pengamatan mikroskopik jaringan daun bayam yang telah diberi pewarna Safranin untuk memperjelas struktur seluler. Adapun alat dan bahan yang digunakan meliputi mikroskop cahaya, kaca objek (slide), kaca penutup (cover glass), pinset, pipet tetes, dan kertas tisu. Bahan utama yang digunakan adalah daun bayam segar sebagai

objek pengamatan dan larutan Safranin sebagai zat pewarna. Air bersih juga digunakan sebagai media pembuatan preparat basah.

Prosedur praktikum diawali dengan pengambilan potongan melintang tipis dari daun bayam segar menggunakan pisau silet atau cutter. Potongan ini kemudian diletakkan di atas kaca objek dan diberi satu tetes air b. Setelah dibiarkan selama $\pm 2-3$ menit agar pewarna terserap, kelebihan larutan dibuang perlahan dengan tisu, lalu kaca penutup diletakkan perlahan untuk menghindari terbentuknya gelembung udara. Preparat yang telah siap kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran bertahap, dimulai dari 100x hingga 400x.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa jaringan daun bayam berhasil menyerap Safranin dan memperlihatkan warna merah pada bagian-bagian tertentu. Struktur jaringan yang berhasil teridentifikasi antara lain epidermis yang tampak sebagai lapisan tipis di bagian tepi, jaringan palisade dan spons yang terlihat berlapis-lapis, serta pembuluh angkut yang tampak memanjang di tengah-tengah jaringan. Inti sel pada beberapa sel parenkim juga tampak lebih gelap karena menyerap lebih banyak Safranin.



Gambar 1. Hasil Praktikum

Safranin yang merupakan pewarna basa akan berikatan dengan komponen sel yang bermuatan negatif. Struktur seperti nukleus yang mengandung DNA, serta dinding sel sekunder yang mengandung lignin, memiliki afinitas kuat terhadap molekul Safranin. Intensitas warna merah yang muncul berkaitan langsung dengan konsentrasi larutan Safranin dan lamanya

waktu pewarnaan. Konsentrasi tinggi dan waktu pewarnaan yang lama akan menghasilkan warna yang lebih pekat, namun berisiko mengaburkan detail struktur.

Dalam praktik ini, ditemukan kendala teknis yaitu pewarnaan yang terlalu tebal sehingga menyebabkan seluruh jaringan tampak sangat merah dan kontras antar bagian sulit dibedakan. Kemungkinan hal ini disebabkan oleh penggunaan larutan Safranin yang terlalu pekat atau waktu pewarnaan yang terlalu lama. Teknik pengeringan kelebihan pewarna yang kurang hati-hati dapat menyebabkan pewarna menyebar tidak merata. Hal ini menunjukkan bahwa proses pewarnaan memerlukan ketelitian dan pengaturan parameter yang tepat untuk memperoleh hasil pengamatan yang maksimal.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil praktikum dan analisis yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa Safranin merupakan pewarna basa yang efektif digunakan dalam pengamatan mikroskopik jaringan daun bayam, khususnya untuk menyoroti struktur-struktur seperti dinding sel, inti sel, dan jaringan pembuluh angkut. Safranin bekerja melalui mekanisme interaksi ionik antara molekul bermuatan positif dengan komponen sel bermuatan negatif seperti lignin dan asam nukleat, sehingga menghasilkan warna merah yang kontras dan memudahkan identifikasi jaringan.

Pengamatan menunjukkan bahwa struktur utama daun bayam seperti epidermis, jaringan palisade, jaringan spons, stomata, serta pembuluh xilem dan floem dapat terlihat dengan baik setelah pewarnaan. Namun demikian, pewarnaan yang terlalu tebal atau konsentrasi Safranin yang berlebihan dapat mengaburkan struktur dan mengurangi kejelasan pengamatan. Maka dari itu, penggunaan Safranin memerlukan pengaturan yang tepat terhadap waktu pewarnaan dan konsentrasi larutan agar hasil yang diperoleh optimal dan struktur jaringan dapat dibedakan secara jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Alkherraz, A. M., Elsherif, K. M., & Blayblo, N. A. (2023). Safranin adsorption onto Acacia plant derived activated carbon: Isotherms, thermodynamics and kinetic studies. *Chemistry International*, 9(4), 134–145. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8127687>
- Aoudjit, L., Selatnia, A., & Hadj, B. (2024). Photocatalytic degradation of Safranin O dye under visible light using NiO–MgO catalysts. *Cellulose Chemistry and Technology*, 58(1–2), 133–139.

- Baldacci-Cresp, F., Morel, O., Spriet, C., Lion, C., & Neutelings, G. (2020). A rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell wall lignification. *The Plant Journal*, 102(5), 1074–1089. <https://doi.org/10.1111/tpj.14675>
- Baumgartner, C. E., Richtol, H. H., & Aikens, D. A. (1981). Transient photochemistry of safranin-O. *Photochemistry and Photobiology*, 34(1), 17–22.
- Dean, H. L. (1940). Delafield's hematoxylin and safranin for staining plant materials. *Stain Technology*, 15(2), 61–65.
- Fauziah, A. (2021). *Fisiologi tumbuhan* [Preprint]. Tulungagung: Biru Atmajaya.
- Morel, O., Spriet, C., Lion, C., Neutelings, G., & Baldacci-Cresp, F. (2023). Ratiometric fluorescent Safranin-O staining allows the quantification of lignin contents in muro. In S. Hawkins, G. Neutelings, & D. Hawkins (Eds.), *Plant cell wall histochemistry and cytochemistry* (pp. 255–268). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2675-7_21
- Noor, R., Tika, N. Y., & Agustina, P. (2020). Preparat jaringan tumbuhan dengan menggunakan pewarna alami sebagai media belajar jaringan tumbuhan praktikum biologi sel. *Jurnal Lentera Pendidikan Pusat Penelitian LPPM UM METRO*, 5(2), 136–147.
- Prabowo, I., & Rachmawati, D. (2020). Respons fisiologis dan anatomi akar tanaman bayam (*Amaranthus tricolor* L.) terhadap cekaman NaCl. *Jurnal Penelitian Saintek*, 25(1), 36–43.
- Preethi, S., Viruthagiri, T., & Sivakumar, R. (2006). Removal of safranin basic dye from aqueous solutions by adsorption onto corncob activated carbon. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(22), 7627–7632.
- Previtali, C. M., & Bertolotti, A. (2012). Quenching of the triplet state of safranin-O by aliphatic amines in reverse micelles. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(1), 104–111. <https://doi.org/10.1039/C1PP05252G>
- Sapre, A. B. (1969). Delafield's hematoxylin—Fast green mixture for bulk staining of plant materials. *Experientia*, 25, 336. <https://doi.org/10.1007/BF02034432>
- Zadegan, M. S. J., Karami, H., Jafari, A. J., Faghihi, M., & Aliabadi, M. (2024). Remediation of Safranin-O and acid fuchsin by using Ti₃C₂ MXene/rGo–Cu₂O nanocomposite: Preparation, characterization, isotherm, kinetic and thermodynamic studies. *Environmental Research*, 258, 119469. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119469>