

Efektivitas Pewarnaan Jaringan Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L) Dengan Pewarna Alami dari Buah Duwet (*Syzygium cumini*) Sebagai Alternatif Pewarna Eosin

Eka Cahya Yulia Kiranawati, Denis Mery Mirza, Arif Yahya*

Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan : Bahan pewarna sintetik untuk mewarnai jaringan atau sel seperti eosin yang dapat memberikan warna merah memiliki harga yang relatif mahal dan bersifat karsinogenik. Sehingga diperlukan alternatif metode pewarnaan menggunakan bahan alami, seperti dengan pemanfaatan zat pewarna alami antosianin yang berasal dari Buah duwet (*Syzygium cumini*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas pewarnaan dengan ekstrak etanol 70% *S. cumini* pada preparat histologi jaringan hepar *Rattus norvegicus* L kemudian dilakukan validasi metode berupa akurasi dan presisi.

Metode : Simplisia *S. cumini* di ekstraksi dengan pelarut etanol 70% kemudian dibuat tiga konsentrasi (25%, 50%, 75%), *hematoxylin eosin* (Kontrol positif), dan etanol 70% (kontrol negatif). Dilakukan pewarnaan pada preparat kemudian preparat diamati dibawah mikroskop trinokuler dengan perbesaran 400 kali dan dilakukan pengamatan deskriptif. Intensitas pewarnaan preparat diukur menggunakan *ImageJ*, Uji statistik dilakukan untuk intensitas pewarnaan preparat menggunakan *Kruskal Wallis* ($P < 0,05$).

Hasil : Pewarna *hematoxylin eosin* memberikan nilai total pengamatan deskriptif (kejelasan dan kekontrasan) yaitu (5,92, 6) sedangkan etanol 70% (0,0). Pewarnaan ekstrak etanol 70% *S. cumini* dengan konsentrasi 25% memiliki nilai total pengamatan deskriptif (kejelasan dan kekontrasan) (2,84, 3,48), konsentrasi 50% (2,68, 3,08), dan konsentrasi 75% (2,76, 2,92). Hasil nilai akurasi pada konsentrasi 25%, 50% dan 75% didapatkan sebesar (24%, 23% dan 29%), Hasil nilai presisi pada konsentrasi 25%, 50% dan 75% didapatkan sebesar (2,57%, 5,24% dan 1,39%).

Kesimpulan : Ekstrak etanol 70% *S. cumini* dapat mewarnai preparat organ hepar *Rattus norvegicus* L, tetapi dengan kualitas yang lebih rendah dibandingkan pewarna *hematoxylin eosin*. Sehingga tidak efektif untuk menjadi alternatif pewarna eosin.

Kata kunci : Akurasi, *Hematoxylin eosin*, Pewarna alami, Presisi, *Rattus norvegicus* L, *Syzygium cumini*

*Korespondensi :

dr.H.Arif yahya M.Kes

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail : arifyahya@unisma.ac.id

Effectiveness of Staining Liver Tissue from White Rats (*Rattus norvegicus* L) with Natural Dye from Duwet Fruit (*Syzygium cumini*) as Alternative to Eosin Dye

Eka Cahya Yulia Kiranawati, Denis Mery Mirza, Arif Yahya*

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Synthetic dyes for coloring tissue or cells such as eosin which can give a red color are relatively expensive and are carcinogenic. So alternative coloring methods are needed using natural ingredients, such as using the natural dye anthocyanin which comes from duwet fruit (*Syzygium cumini*). This study aims to determine the quality of staining with 70% ethanol extract of *S. cumini* on histological preparations of *Rattus norvegicus* L liver tissue and then validate the method in terms of accuracy and precision.

Methods: Simplisia *S. cumini* was extracted with 70% ethanol solution then made into three concentrations (25%, 50%, 75%), *hematoxylin eosin* (positive control), and 70% ethanol (negative control). The preparations were stained, then the preparations were observed under a trinocular microscope with a magnification of 400 times and descriptive observations were made. The staining intensity of the preparations was measured using *ImageJ*. Statistical tests were carried out for the staining intensity of the preparations using *Kruskal Wallis* ($P < 0.05$).

Results: *Hematoxylin eosin* dye provides a total descriptive observation value (clarity and contrast) namely (5,92, 6) while 70% ethanol (0, 0). Staining of 70% ethanol extract of *S. cumini* with a concentration of 25% had a total value of descriptive observations (clarity and contrast) (2,84, 3,48), a concentration of 50% (2,68, 3,08), and a concentration of 75% (2,76, 2,92). The results of the accuracy values at concentrations of 25%, 50% and 75% were obtained at (24%, 23% and 29%), the results of the precision values at concentrations of 25%, 50% and 75% were obtained at (2,57%, 5,24% and 1,39%).

Conclusion: 70% ethanol extract of *S. cumini* can color *Rattus norvegicus* L liver preparations, but with lower quality than *hematoxylin eosin* dye. So it is not effective as an alternative to eosin dye.

Keywords: Accuracy, *Hematoxylin eosin*, Natural dye, Precision, *Rattus norvegicus* L, *Syzygium cumini*

*Correspondence:

dr.H.Arif yahya M.Kes

Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144

e-mail : arifyahya@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Histologi adalah ilmu yang mempelajari struktur mikroskopis sel dan jaringan tubuh yang normal. Ilmu ini merupakan dasar pemahaman patologi penyakit, diagnosis dan praktik medis serta penelitian di bidang kedokteran dan kesehatan.¹ Untuk mempelajari histologi diperlukan preparasi dengan alat yang disebut mikroskop, selain itu diperlukan pewarnaan preparat histologi untuk memudahkan dalam proses identifikasi jaringan dibawah mikroskop.² Pewarnaan bertujuan agar dapat mempertajam atau memperjelas berbagai elemen jaringan, terutama bagian sel-selnya.³

Bahan pewarna sintetik untuk mewarnai jaringan atau sel seperti eosin yang dapat memberikan warna merah memiliki harga yang relatif mahal dan bersifat karsinogenik.⁴ Sehingga diperlukan alternatif metode pewarnaan menggunakan bahan alami, seperti dengan pemanfaatan zat pewarna alami antosianin yang berasal dari Buah duwet (*Syzygium cumini*).⁵

S. cumini mengandung banyak kandungan antosianin ditandai dengan warna ungu kehitaman pada kulit buah yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber pewarna alami.⁶ Antosianin merupakan senyawa yang termasuk dalam golongan flavonoid umumnya terdapat pada tumbuhan yang dapat menghasilkan warna biru, ungu, violet, magenta.⁷

Penelitian sebelumnya disebutkan bahwa ekstrak kulit *S. cumini* dapat digunakan sebagai pewarna alternatif preparat Sediaan Apusan Darah Tepi (SADT) dengan hasil yang cukup jelas.⁸ Adapun penelitian lain menyebutkan bahwa ekstrak *S. cumini* dapat menggantikan tinta *tryphan blue* untuk mengamati kolonisasi mikoriza pada akar tanaman.⁹

Berdasarkan penjelasan tersebut, maka dilakukan penelitian ini dengan ekstraksi *S. cumini* menggunakan pelarut etanol 70% dikarenakan etanol bersifat polar sehingga mampu melarutkan senyawa antosianin yang bersifat polar juga.¹⁰

Pewarna dari ekstrak buah duwet sudah pernah digunakan sebagai pewarna preparat sediaan apusan darah tepi, namun belum pernah dilakukan pada preparat histologi hewan, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian baru yang sudah tervalidasi untuk menilai kemampuan ekstrak *S. cumini* sebagai pewarna alternatif pengganti eosin pada preparat histologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus* L).

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini termasuk dalam jenis eksperimental laboratorium secara *ex vivo*. Dalam penelitian ini variabel yang diamati adalah sediaan preparat histologi organ hepar tikus putih dengan tiga konsentrasi ekstrak *S. cumini* yaitu 25%, 50%, 75%, dan *hematoxylin eosin* sebagai pembanding. Serbuk *S. cumini* didapatkan dari UPT Laboratorium Herbal Materia Medica. Ekstrak etanol 70% *S. cumini* didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

Ekstraksi *S. cumini*

Serbuk *S. cumini* ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 50 gram dan dilarutkan menggunakan etanol 70% yang didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang sebanyak 200 ml. Campuran serbuk *S. cumini* dan pelarut etanol 70% didiamkan selama 8 jam pada suhu ruang dalam wadah tertutup dan terhindar dari cahaya matahari langsung. Ekstrak etanol 70% *S. cumini* disaring menggunakan kertas saring dan dilakukan penguapan di suhu 50-60°C, hingga didapatkan ekstrak kental.

Ekstrak etanol 70% *S. cumini* yang sudah di ekstraksi masih terlalu kental sehingga perlu dilakukan pengenceran dengan konsentrasi yang menjadi acuan yaitu 25%, 50% dan 75%.

Pembuatan Preparat Jaringan Hepar *Rattus norvegicus* L

Preparat organ hepar *Rattus norvegicus* L didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, melalui beberapa tahapan yakni fiksasi sampel dengan *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10% (1 jam). Dehidrasi, dan *clearing* dilakukan dengan pengenceran alkohol menggunakan empat konsentrasi (70%, 80%, 96%, 100%) (masing-masing 1-1,5 jam). Impregnasi (55-60°C/30-60 menit). *Embedding* dengan paraffin menggunakan mold/cetakan. Lalu, dilakukan pemotongan, kemudian dilakukan *staining* menggunakan pewarna HE dan pewarna alami dari ekstrak 70% etanol *S. cumini* dan *mounting* dengan menempelkan *coverglass* pada kaca preparat menggunakan cairan perekat.

Pengamatan Preparat Jaringan Hepar *R. norvegicus* L

Preparat yang telah dilakukan pewarnaan diamati dibawah mikroskop trinokuler dengan perbesaran 400x dan dalam lima lapang pandang.

Pengukuran Intensitas Preparat Jaringan Hepar *R. norvegicus* L Menggunakan *ImageJ*

Disiapkan gambar berupa foto preparat kemudian klik *image*, klik *color*, dan klik *split channels*. Kemudian klik edit, klik *invert*, selanjutnya klik *image*, klik adjust dan klik *threshold* lalu *apply*. Dilakukan penyesuaian *threshold*, kemudian klik *process*, *binary*, *make binary* dan klik ok. Pilih ikon persegi pada sudut kiri atas dan buat persegi pada gambar, selanjutnya klik *analyze* dan *measure* untuk menampilkan hasil intensitas.

Analisa Kualitatif Hasil Pewarnaan Preparat Jaringan Hepar *R. norvegicus* L

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop trinokuler dan dievaluasi berdasarkan skoring sesuai (Tabel 1). Skoring pada setiap aspek dilakukan oleh tiga pengamat.

Analisa Kuantitatif Hasil Pewarnaan Preparat Jaringan Hepar *R. norvegicus* L

Pengamatan secara kuantitatif dilakukan menggunakan aplikasi *imageJ* versi 1,53 dan diambil gambar dalam lima lapang pandang untuk menentukan nilai akurasi dan presisi. Penghitungan nilai akurasi menggunakan rumus:

Akurasi = 100 - error rate (%)

$$\% \text{error rate} = \left| \frac{\text{approx} - \text{exact}}{\text{exact}} \right| \times 100$$

Keterangan: Approx = Pewarna alami
Exact = *Hematoxylin eosin*

Pengujian presisi dilakukan dengan membuat 3 konsentrasi seperti saat melakukan uji validitas akurasi. Kemudian hitung RSD (*Relative Standard Deviation*) menggunakan rumus:

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}}$$

Keterangan: SD = Standar deviasi
 \bar{X} = Kadar rerata

Analisis Data

Pada penelitian ini data yang diperoleh dari hasil pengamatan intensitas preparat, dilakukan uji beda dengan menggunakan SPSS 27.00 for windows. Dikarenakan data tidak terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Hasil dianggap signifikan apabila $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Hasil Pengamatan Deskriptif Kualitatif Pewarnaan Ekstrak etanol 70% *S. cumini* Pada Preparat Histologi *R. norvegicus* L

Perhitungan skor pada pengamatan deskriptif berdasarkan (Tabel 1). Preparat yang telah terwarnai diamati menggunakan mikroskop trinokuler dengan perbesaran 400 kali dan dilakukan pengamatan deskriptif oleh tiga pengamat.

Hasil pewarnaan menggunakan ekstrak etanol 70% *S. cumini* dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dapat memberikan warna pada preparat histologi hepar *R. norvegicus* L. Pengamatan deskriptif tertinggi preparat histologi hepar *R. norvegicus* L terdapat pada konsentrasi 25% dengan nilai total kategori kejelasan 2,84 dan kekontrasan 3,48. *Hematoxylin eosin* sebagai kontrol (+) memiliki nilai total kategori kejelasan 5,92 dan kekontrasan 6, Sedangkan etanol sebagai Kontrol (-) memiliki nilai jumlah kejelasan dan kekontrasan yaitu 0.

Hasil Perhitungan Akurasi Dan Presisi Pada Pengukuran Intensitas Preparat Jaringan Hepar *R. norvegicus* L

Hasil foto yang didapatkan dari mikroskop trinokuler kemudian dilakukan pengukuran intensitas warna menggunakan aplikasi *ImageJ*. Hasil yang sudah didapatkan dari *ImageJ* dihitung menggunakan rumus akurasi dan presisi.

Nilai akurasi dinyatakan baik jika berada pada rentang 98-102%. Presisi dinyatakan sebagai RSD, nilai presisi yang baik jika berada pada rentang $< 2\%$. Hasil pengukuran intensitas yang didapatkan tidak memiliki nilai akurasi yang baik pada semua konsentrasi dan memiliki nilai presisi yang baik pada konsentrasi 75% (Tabel 3).

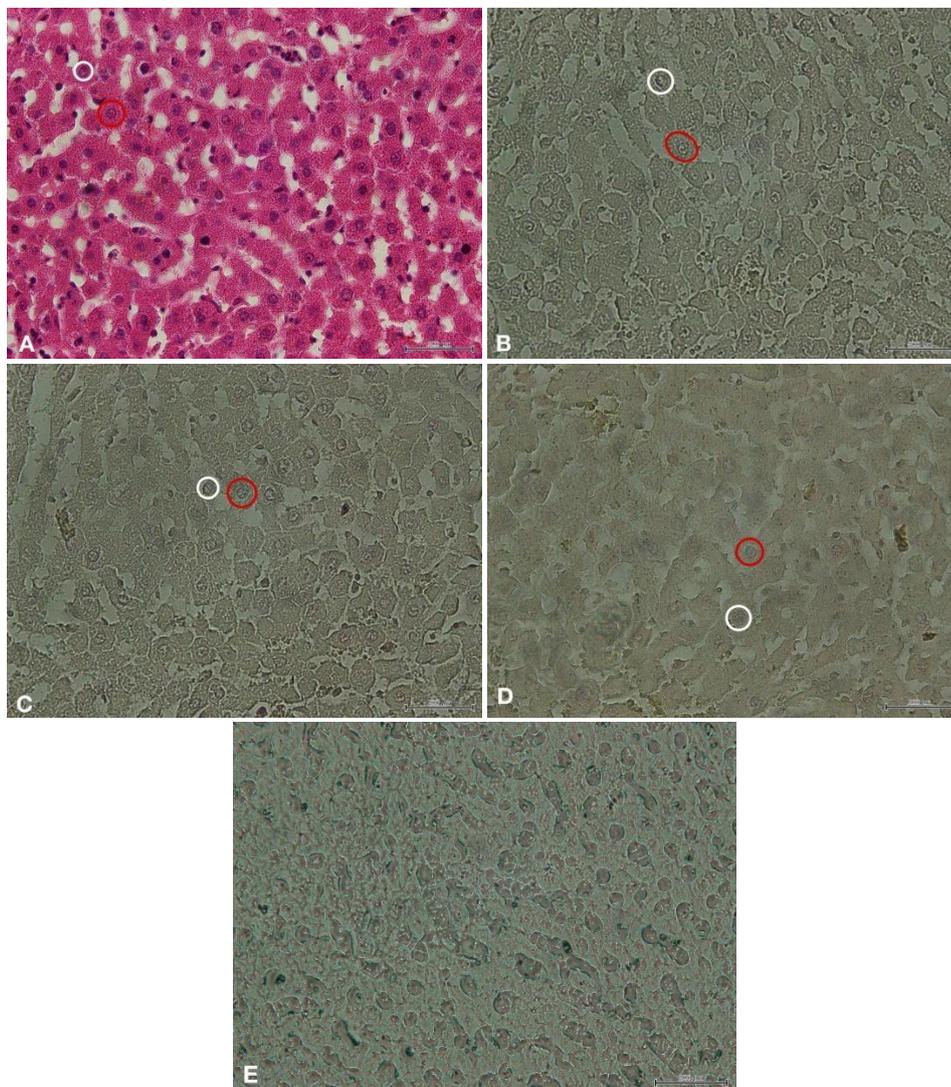
Tabel 1. Kriteria Penilaian Pengamatan Deskriptif

Aspek	Indikator	skor
Kejelasan	Apabila antara sel dan latar belakang tidak dapat dibedakan dengan jelas	0
	Apabila antara sel dan latar belakang dapat dibedakan dengan jelas	1
	Apabila antara sel dan latar belakang dapat dibedakan dengan sangat jelas	2
Kekontrasan	Apabila sitoplasma dan inti sel tidak dapat dibedakan dengan jelas	0
	Apabila sitoplasma dan inti sel dapat dibedakan dengan jelas	1
	Apabila sitoplasma dan inti sel dapat dibedakan dengan sangat jelas	2

Tabel 2. Perhitungan Skoring Preparat Histologi Hepar *Rattus norvegicus* L

Pewarna	Kejelasan			Total	Kekontrasan			Total
	P1	P2	P3		P1	P2	P3	
ET	0	0	0	0	0	0	0	0
HE	2	2	1,92	5,92	2	2	2	6
SC 25%	0,96	0,88	1	2,84	0,72	1,4	1,36	3,48
SC 50%	1	0,68	1	2,68	1	0,92	1,16	3,08
SC 75%	1	0,76	1	2,76	0,92	1,08	0,92	2,92

Keterangan: Data pengamatan deskriptif kualitatif pada preparat histologi *R. norvegicus* L yang dilakukan oleh tiga pengamat (P1,P2,P3) berdasarkan skoring **Tabel 1**. ET adalah etanol. HE adalah *Hematoxylin eosin*. SC adalah *S. cumini*

**Gambar 1. Hasil Pewarnaan Preparat Histologi Hepar *R. norvegicus* L**

Keterangan: Hasil pewarnaan preparat histologi hepar *R. norvegicus* L menggunakan ekstrak etanol 70% *S. cumini*. A. *hematoxylin eosin*, B. 25%, C.50%, D. 75% dan E. etanol. Lingkaran merah (gambaran sel hepatosit yang terdiri dari inti sel dan sitoplasma), lingkaran putih (gambaran inti sel).

Tabel 3. Hasil Perhitungan Nilai Akurasi dan Presisi Intensitas Pewarnaan Preparat Histologi Organ Hepar *Rattus norvegicus* L.

Zat Warna	Intensitas Pewarnaan Preparat Histologi Organ Hepar <i>R. norvegicus</i> L		
	Mean \pm SD	%RSD	%Akurasi
HE	99,79 \pm 2,37	2,37%	-
ET	0 \pm 3,01	-	1%
SC 25%	23,68 \pm 0,61	2,57 %	24%
SC 50%	22,1 \pm 1,16	5,24 %	23%
SC 75%	28,6 \pm 0,40	1,39 %	29%

PEMBAHASAN

Hasil Pewarnaan Preparat Histologi Hepar *R. norvegicus* L Menggunakan Ekstrak 70% Etanol *S. cumini*

S. cumini mengandung banyak kandungan antosianin ditandai dengan warna ungu kehitaman pada kulit buah.¹¹ Antosianin telah digunakan secara luas sebagai pewarna alami, selain itu antosianin termasuk dalam kelompok flavonoid dari senyawa polifenol dan merupakan glikosida dari turunan polihidroksi dan polimetoksi dari kation 2-fenilbenzopirilium atau kation flavilium.¹²

Pewarnaan histologi pada jaringan dapat terjadi karena terdapat ikatan molekul zat warna dan jaringan yang diwarnai. Sehingga, Ion positif (OH^-) pada zat warna akan terlepas dan berikatan kovalen dengan ion negatif (H^+) yang ada pada dinding sel jaringan.¹³

Hematoxylin bersifat basa yang khusus mewarnai unsur asam pada sel sehingga tampak kebiruan, karena unsur yang paling asam ialah *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan *ribonucleic acid* (RNA), maka inti dan lingkungan sitoplasma yang banyak terdapat ribosom akan tampak berwarna biru tua, sehingga disebut basofilik. *Eosin* bersifat asam yang mewarnai unsur basa dari sel sehingga tampak merah muda, karena banyak bagian sitoplasma yang bersifat basa maka pada daerah tertentu sitoplasma terwarna merah muda, unsur-unsur ini disebut asidofilik (eosinofilik).¹⁴

Hematoxylin eosin memiliki hasil yang baik dari segi kejelasan dimana dapat dibedakan antara sel dan latar belakang, selain itu kekontrasan antara sel dan sitoplasma terlihat jelas. Hasil pengamatan deskriptif ditemukan bahwa ekstrak etanol 70% *S. cumini* menghasilkan nilai terbaik pada konsentrasi 25%, namun pada preparat menghasilkan warna coklat. Hal ini dipengaruhi oleh faktor suhu dan cahaya pada saat proses maserasi. Sehingga, antosianin menjadi tidak stabil dan terdegradasi menjadi senyawa teroksidasi berwarna coklat.¹⁵

Antosianin sangat mudah terdegradasi oleh panas, diketahui bahwa proses pemanasan dengan suhu 60°C selama 30 menit dapat menurunkan retensi warna antosianin kurang lebih sebesar 20%. Cahaya dapat mempengaruhi kestabilan antosianin, ketidakstabilan dalam struktur antosianin menyebabkan senyawa ini mudah mengalami hidrolisis pada ikatan glikosidik dan cincin aglikon menjadi terbuka, sehingga membentuk berbagai aglikon yang labil, serta gugus karbonil dan kalkon yang tidak berwarna.¹⁶

Perhitungan Nilai Akurasi dan Presisi Pada Preparat Histologi Hepar *R. norvegicus* L

Perhitungan nilai akurasi dan presisi didapatkan dari hasil pengukuran intensitas warna menggunakan aplikasi *software imageJ* pada preparat jaringan hepar *R. norvegicus* L dengan perbesaran 400 kali.

Pewarna *Hematoxylin eosin* sebagai kontrol positif dan etanol 70% sebagai kontrol negatif. Perhitungan nilai akurasi pewarnaan ekstrak etanol 70% *S. cumini* pada preparat jaringan hepar *R. norvegicus* L dengan konsentrasi 25% menunjukkan hasil 24%, konsentrasi 50% menunjukkan hasil 23% dan konsentrasi 75% menunjukkan hasil 29%. Ketiga konsentrasi ekstrak etanol 70% *S. cumini* tidak memenuhi nilai standar penerimaan akurasi, dimana kriteria penerimaan dari pengujian akurasi adalah didapatkannya nilai sebesar 98-102%.¹⁷ Perhitungan nilai presisi pewarnaan ekstrak etanol 70% *S. cumini* pada preparat jaringan hepar *R. norvegicus* L dengan konsentrasi 25% menunjukkan hasil 2,57%, konsentrasi 50% menunjukkan hasil 5,24% dan konsentrasi 75% menunjukkan hasil 1,39%. Yang termasuk dalam penerimaan presisi hanya konsentrasi 75%, dimana presisi dinyatakan dalam nilai simpangan baku relatif (RSD) dengan syarat penerimaannya adalah $\text{RSD} < 2\%$.¹⁸

Pada penelitian ini terdapat beberapa kekurangan yang menyebabkan nilai akurasi tidak memenuhi standar pada semua konsentrasi dan nilai presisi memenuhi standar pada konsentrasi 75%. Hal ini disebabkan karena metode ekstraksi yang kurang tepat sehingga menyebabkan warna dari ekstrak etanol 70% *S. cumini* terdegradasi menjadi warna coklat. Selain itu, penetapan angka *threshold* yang berbeda-beda pada masing-masing konsentrasi pada saat pengukuran intensitas warna menyebabkan adanya kemungkinan mempengaruhi pengukuran dari *ImageJ*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Pewarnaan dengan ekstrak etanol 70% *S. cumini* tidak memiliki tingkat akurasi yang baik pada semua konsentrasi, tetapi memiliki nilai presisi yang baik pada konsentrasi 75%.
2. Ekstrak etanol 70% *S. cumini* sebagai pewarna alami dapat mewarnai preparat jaringan hepar *R. norvegicus* L, tetapi tidak efektif sebagai alternatif pewarna eosin.

SARAN

1. Melakukan uji kadar antosianin pada simplisia yang akan digunakan.
2. Eksplorasi konsentrasi terbaik yang akan digunakan sebagai acuan.
3. Pemilihan metode ekstraksi yang terbaik.
4. Meningkatkan kualitas pembuatan ekstrak.
5. Meningkatkan kualitas pembuatan preparat, dan pewarnaan preparat.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan penulis kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, serta tim kelompok penelitian ini yang telah membantu proses jalannya penelitian ini. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada Rio Risadiansyah, S.Ked., MP., PhD sebagai *peer reviewer*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Susilowati, R., Fachiroh, J., & Sumiwi, Y. A. A. (2016). Ujian Praktikum Histologi Dengan Tayangan Foto.

- Jurnal Pendidikan Kedokteran Indonesia.
2. Soesilawati, P. (2019). Histologi Kedokteran Dasar. *In Airlangga University Press*.
 3. Noor, R. (2020). Pengembangan buku panduan praktikum mikroteknik melalui pewarnaan jaringan tumbuhan dan hewan dengan menggunakan pewarna alami.
 4. Oktaviani, D. N., Santoso, H., & Noor, R. (2019). Perbandingan Larutan Buah Pinang (*Arecha Catechu L*) Dan Daun Sirih Hijau (*Piper Betle L*) Terhadap Kejelasan Jaringan Hati Sebagai Alternatif Pewarna Alami Preparat Jaringan Sebagai Sumber Belajar Biologi.
 5. Setya, D. (2021). Ekstrak Kulit Buah Jamblang (*Syzygium cumini*) Sebagai Pewarnaan Alternatif Preparat Sediaan Apusan Darah Tepi (SADT).
 6. Wati, A. F. (2018). Duwet (*Syzygium cumini*) Dan Air Dalam Pembuatan Jelly Drink Application Comparative of Java Plum (*Syzygium cumini*) Juice and Water On Jelly Drink. *Media Ilmiah Teknologi Pangan (Scientific Journal of Food Technology)*.
 7. Hastari, C. (2017). Karakteristik Minuman Sari Buah Duwet (*Syzygium Cumini*) Dengan Penambahan Ekstrak Polifenol Rosemary. Efektifitas Penyuluhan Gizi Pada Kelompok 1000 HPK Dalam Meningkatkan Pengetahuan Dan Sikap Kesadaran Gizi.
 8. Setya, D. (2021). Ekstrak Kulit Buah Jamblang (*Syzygium cumini*) Sebagai Pewarnaan Alternatif Preparat Sediaan Apusan Darah Tepi (SADT).
 9. Hadianur, H., No, K., Darussalam, K., & Aceh, B. (2021). Tryphan Blue Pada Pengamatan Kolonisasi Mikoriza.
 10. Agustin, D., & Ismiyati, I. (2015). Pengaruh Konsentrasi Pelarut Pada Proses Ekstraksi Antosianin Dari Bunga Kembang Sepatu.
 11. Wati, A. F. (2018). Duwet (*Syzygium cumini*) Dan Air Dalam Pembuatan Jelly Drink Application Comparative of Java Plum (*Syzygium cumini*) Juice and Water On Jelly Drink. *Media Ilmiah Teknologi Pangan*.
 12. Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D., Supratman, U., & I. (2009). Identification of Anthocyanins in

- Jambolan Fruit (*Syzygium cumini*) by High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detection. *J. Teknolol. Dan Industri Pangan*.
13. Bisri, C., Pantiwati, Y., & Wahyuni, S. (2013). Ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa*) sebagai pewarna alternatif alami preparat section tanaman cabe merah (*Capsicum annuum L.*).
 14. Putri, S. W. (2020). Perbedaan Identifikasi Sel Goblet Pada Mukosa Lambung Tikus Gastritis Dengan Menggunakan Pewarnaan *Periodic Acid Schiff*.
 15. Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., & Silva, P. (2020). Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases.
 16. Ifadah, Raida Amelia, Wiratara, Pinasthika Rizkia Warapsari, & Afgani, Chairul Anam. (2021). Ulasan Ilmiah : Antosianin Dan Manfaatnya Untuk Kesehatan. *Jurnal Teknologi Pengolahan Pertanian*.
 17. International Conference on Harmonization (ICH). (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Geneva: International Conference on Harmonization
 18. Anamisa, D. R. (2015) Rancang Bangun Metode OTSU Untuk Deteksi Hemoglobin.