

**Ekstrak Biji Kesumba Keling (*Bixa orellana* L.) sebagai Pewarna Alami
Sediaan Jaringan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**

*(Kesumba Keling Seed Extract (*Bixa orellana* L.) as a Natural Stain for Tilapia Fish
(*Oreochromis niloticus*) Tissue Preparations*

*Filda Rahmawati, Kesha Purwaning Sari, Nurul Huda, Diah Wulandari Rousdy**
Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Tanjungpura, Pontianak 78124

*Email korespondensi: diah.wulandari.rousdy@fmipa.untan.ac.id

ABSTRAK

Penggunaan pewarna sintesis dalam histologi dapat memberikan dampak buruk bagi kesehatan dan lingkungan. Keberadaan pewarna alami menjadi alternatif permasalahan tersebut, salah satunya ekstrak biji kesumba keeling (*Bixa orellana* L.). Riset ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak biji kesumba keeling yang memberikan pewarnaan jaringan terbaik pada gambaran histologi organ hepar, insang, dan ginjal ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Riset dilakukan selama empat bulan dan terbagi menjadi 4 tahapan, yaitu tahap aklimatisasi ikan, ekstraksi biji kesumba dengan pelarut etanol 70%, pembuatan preparat dengan metode parafin, dan pengamatan struktur histologis jaringan ikan. Konsentrasi ekstrak biji kesumba yang digunakan adalah 35%, 50% dan 70%. Masing-masing konsentrasi pewarna diulang sebanyak 5 preparat. Hasil pengamatan gambaran histologis dilakukan secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak biji kesumba mampu memberikan warna merah muda pada sitoplasma sel dan dapat menggantikan pewarna eosin sehingga berperan sebagai counterstaining terhadap pewarna hematoksilin. Akan tetapi ekstrak biji kesumba tidak memberikan warna pada inti sel sehingga tidak dapat menggantikan pewarna hematoksilin. Konsentrasi ekstrak biji kesumba yang memberikan warna sediaan jaringan paling baik adalah konsentrasi 50%.

Kata kunci: pewarna jaringan; kesumba; *Bixa orellana* L., pigmen

ABSTRACT

The use of synthetic dyes in histology can have a negative impact on health and the environment. The existence of natural dyes is an alternative to these problems, one of which is kesumba keeling seed extract (*Bixa orellana* L.). This research was conducted to determine the concentration of kesumba keeling seed extract that provides the best tissue staining in the histology of hepatic organs, gills, and kidneys of tilapia (*Oreochromis niloticus*). The research was conducted for four months and divided into 4 stages, namely the fish acclimatization stage, extraction of kesumba seeds with 70% ethanol solvent, making preparations with the paraffin method, and observing the histological structure of fish tissue. The concentrations of kesumba seed extract used were 35%, 50% and 70%. Each dye concentration was repeated as many as 5 preparations. The observation of the histological picture was done descriptively. The results showed that the extract was able to give a pink color to the cell cytoplasm and could replace eosin dye so that it acted as counterstaining against hematoxylin dye. However, kesumba seed extract does not give color to the cell nucleus so it cannot replace hematoxylin dye. The concentration of kesumba seed extract that gives the best tissue preparation color is 50% concentration.

Keywords: tissue stain; kesumba; *Bixa orellana* L., pigment

PENDAHULUAN

Histologi merupakan salah satu disiplin ilmu dalam biologi yang mempelajari struktur mikroskopis sel dan jaringan, baik pada hewan maupun tumbuhan. Histologi menjadi bagian penting dari biologi karena mampu memahami dan mengenal jenis jaringan, mendiagnosis penyakit serta analisis pengobatannya. Selain itu, dapat mengetahui hubungan antara struktur dan fungsi organisme

sehingga memudahkan organisme beradaptasi dengan lingkungannya serta respon perilaku terhadap perubahan lingkungan (García *et al.*, 2019). Dalam histologi, dilakukan pewarnaan yang bertujuan untuk meningkatkan kontras visual pada jaringan dan sel sehingga komponennya terlihat lebih jelas dan memungkinkan diperiksa melalui mikroskop (Saraswati & Rahmawati, 2023). Pewarna histologi yang paling umum digunakan adalah HE (Hematoxylin-Eosin) karena cukup efektif dalam memberikan pewarnaan. Hematoxylin berperan sebagai pewarna dasar yang mewarnai inti sel sehingga menjadi biru sedangkan sitoplasma dan matriks ekstraseluler oleh eosin. Eosin berperan sebagai pewarna counter yang menghasilkan warna merah muda (Rubina *et al.*, 2020).

Eosin termasuk salah satu pewarna sintetis yang dapat memberikan dampak negatif bagi kesehatan dan lingkungan karena diproduksi dari batu bara. Paparan akut terhadap pewarna sintetis dapat menyebabkan iritasi pada kulit, mata, dan selaput lendir lainnya, dermatitis, serta stomatitis. Pewarna sintetis mengandung bahan kimia seperti klorat hidrat, asam pikrat, potasium dikromat, dan lainnya yang bersifat karsinogenik bagi tubuh (Saraswati & Rahmawati, 2023). Oleh karena itu, diperlukan pewarna alami sebagai alternatif dalam pewarnaan histologi, salah satunya dapat diperoleh dari ekstrak biji kesumba keling (*Bixa orellana* L.).

Kesumba keling mempunyai biji yang berwarna merah jingga pada lapisan resin tipis. Pewarna biji kesumba keling telah banyak digunakan dalam industri makanan (keju, mentega, dan roti), obat-obatan, kosmetik untuk pewarna bibir (Mira *et al.*, 2013), dan pewarna kain batik dalam industri tekstil (Pujilestari, 2014). Warna tersebut dihasilkan oleh keberadaan pigmen bixin dan norbixin pada bijinya. (Nnaemeka *et al.*, 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Nnaemeka *et al.* (2019) yang menggunakan ekstrak biji kesumba keling pH netral sebagai pewarna dalam pemeriksaan jaringan tikus Wistar melaporkan bahwa ekstrak pewarna biji kesumba pH 5 dan pH7,5 memberikan warna latar kekuningan pada tampilan sitoplasma sel. Oliveira *et al.* (2018) juga melaporkan hasil penelitian bahwa penggunaan ekstrak murbei hitam dan biji kesumba keling bersamaan dapat dijadikan sebagai alternatif pewarna dalam histoteknologi, dalam hal ini pengganti hematoxylin dan eosin.

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan jenis ikan yang resisten terhadap penyakit dan perubahan lingkungan sehingga potensial dalam riset histologi karena tidak mengancam populasinya (Sallata, 2015). Beberapa penelitian histologi pada ikan nila dilakukan untuk mengetahui dampak pencemaran lingkungan terhadap organ ikan nila, seperti insang (Sipahutar *et al.*, 2013), hepar (Sugiantari *et al.*, 2022), dan ginjal. Insang berfungsi sebagai organ osmoregulasi, respirasi, dan keseimbangan asam basa. Selain insang, ginjal juga termasuk organ yang berpengaruh dalam osmoregulasi karena berperan dalam proses filtrasi. Sebagai organ detoksifikasi, akumulasi logam berat dapat terdeteksi pada organ hepar karena menjadi organ target bagi toksikan (Sari *et al.*, 2016).

Sehubungan dengan bahaya penggunaan pewarna sintetis pada pewarnaan histologi maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui gambaran histologi organ hepar, insang dan ginjal pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dan mengetahui konsentrasi ekstrak biji kesumba keling (*Bixa orellana*) yang efektif pada gambaran histologinya. Pemanfaatan tumbuhan sebagai pewarna alami tersebut dapat menguraikan permasalahan yang selama ini menjadi problematika lingkungan akibat limbah pembuangan pewarna sintetis.

METODE

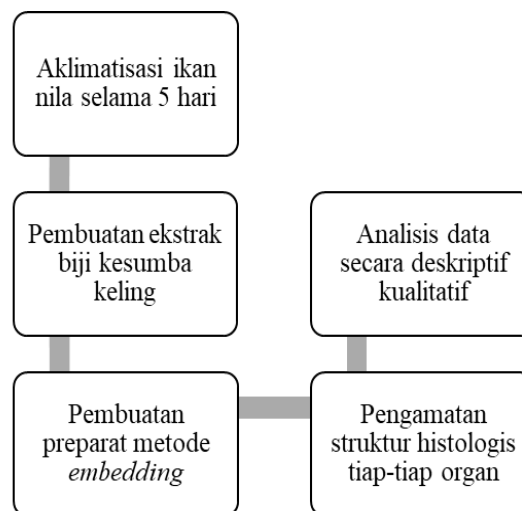
Waktu dan Tempat

Metode yang digunakan dalam riset ini adalah metode eksperimen. Riset dilakukan selama 4 bulan mulai Juli-Oktober 2023 di Laboratorium Mikroteknik Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tanjungpura Pontianak.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada riset ini adalah botol vial, *object glass*, *deck glass*, *hot plate*, *label name*, mikroskop, mikrotom, pisau bedah, *staining jar vertical*, oven, silet, gelas beaker, labu Erlenmeyer, kertas saring Whatman, aluminium foil, pipet tetes, baskom besar. Adapun bahan yang digunakan, yaitu akuades, alkohol bertingkat, biji kesumba keling, canada balsam, buffer neutral formaline 10%, garam fisiologis 0,9%, parafin, xilol, dan minyak cengkeh.

Prosedur Riset



Gambar 1. Tahapan Riset

Aklimasi Ikan

Sampel ikan dengan berat 80-100 gr diaklimasi dalam wadah akuarium selama 5 hari. Selama aklimasi, ikan diberi pakan pellet sebanyak dua kali sehari secara adlibitum. Aerasi oksigen diberikan selama 24 jam. Penggantian air akuarium dilakukan 2 hari sekali untuk menjaga supaya kualitas air tetap optimal.

Pembuatan Ekstrak Biji Kesumba

Ekstraksi biji dimulai dengan tahapan dengan biji kesumba keling yang dikoleksi berasal dari Kota Pontianak. Biji yang dipilih berwarna merah tua dan segar, lalu dikeringanginkan. Selanjutnya, biji ditimbang seberat 70 gr, 100 gr, dan 130 gr masing-masing direndam dalam alkohol 70% sebanyak 200 mL. Perendaman dilakukan selama 3x24 jam pada suhu ruang. Setelah 3x24 jam disaring menggunakan kertas saring Whatman sehingga diperoleh ekstrak konsentrasi 35%, 50%, dan 65%.

Pembuatan Preparat Metode Parafin

Ikan nila dibius dengan minyak cengkeh (2 tetes), kemudian dilakukan narkose dan diambil organ hepar, insang, dan ginjal. Organ tersebut dicuci dengan larutan garam fisiologis dengan konsentrasi 0,9% dan dipotong setebal ± 5 cm menggunakan silet. Potongan organ difiksasi dalam formalin 10% selama 24 jam lalu dicuci 6 dengan akuades. Selanjutnya, dehidrasi dengan alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% selama 30 menit dan 100% selama 2x30 menit. *Clearing* dilakukan dengan merendam organ pada xylol selama 4,5 jam. Kemudian, infiltrasi pada oven dengan suhu 58-60°C dalam larutan parafin: xylol (1:1) dan parafin murni selama 3,5 jam. Cetak organ pada blok parafin dan diletakkan sesuai dengan arah potongan, lalu biarkan dalam kulkas selama 24 jam. Kemudian, dilanjutkan dengan *section* menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6 μ m, lalu *affixing* pita sayatan pada gelas beker yang berisi akuades di atas *hot plate* dengan suhu 50°C.

Pewarnaan Preparat

Pewarnaan preparat organ hepar, insang, dan ginjal ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dilakukan pada masing-masing 5 slide dengan perlakuan sebagai berikut:

- P0 : 1. Hematoxylin-Eosin;
- PI : 1. Hematoxylin-Bixa (30%)
2. Bixa (30%)-Eosin
- P2 : 1. Hematoxylin-Bixa (50%)
2. Bixa (50%)-Eosin
- P3 : 1. Hematoxylin-Bixa (65%)
2. Bixa (65%)-Eosin

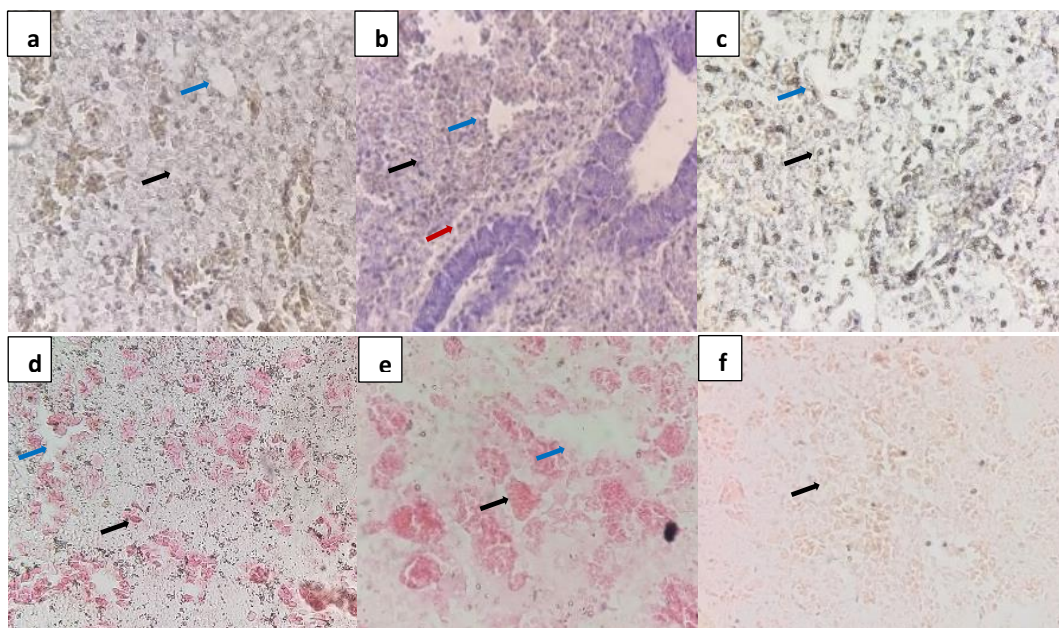
Analisis Data

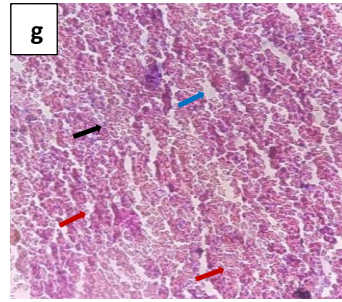
Gambaran histologi organ hepar, insang, dan ginjal ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dianalisis secara deskriptif kualitatif melalui analisis kualitas struktur histologis preparat embedding dan kualitas warna dengan membandingkan gambaran histologi antara kelompok kontrol dan perlakuan. Indikator kejelasan preparat meliputi kejelasan bentuk sel, pewarnaan sitoplasma dan nukleus, serta intensitas pewarnaan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pewarnaan preparat organ hepar, insang, dan ginjal ikan nila (*Oreochromis niloticus*) menggunakan pewarna alami yaitu ekstrak biji kesumba keling (*Bixa orellana*) yang dikombinasikan dengan pewarna standar hematoksilin dan eosin. Hasil pengamatan visual preparat menunjukkan intensitas penyerapan warna yang berbeda-beda dikarenakan perbedaan konsentrasi pewarna *Bixa* yang digunakan.

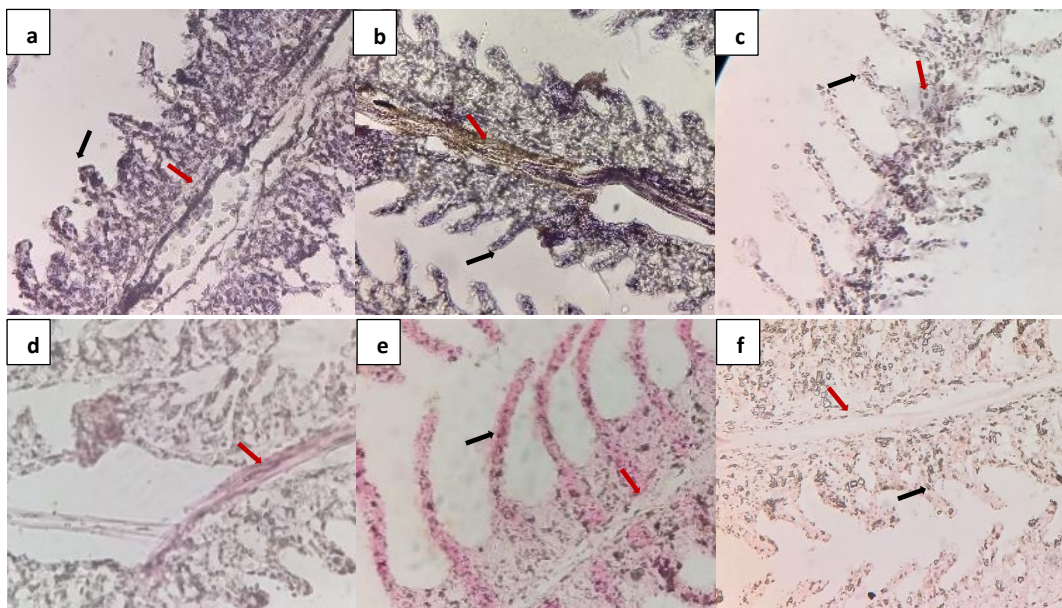
Tampak pada pengamatan irisan jaringan hepar (hati) dari ikan nila, kombinasi pewarna hematoksilin-*Bixa* memberikan gambaran sel hepatosit lebih jelas. Pewarna *Bixa* mampu mewarnai sitoplasma sel hepatosit menjadi warna ungu-merah muda, sedangkan hematoksilin tetap mewarna inti sel hepatosit (Gambar 2a-c). Kombinasi pewarna *Bixa* dan eosin memberikan hasil pewarnaan kurang baik. Pewarna *Bixa* tidak dapat mewarnai inti sel hepatosit dengan baik, sehingga susunan sel hepatosit, vena sentralis dan sinusoid tidak dapat dibedakan secara jelas (Gambar 2d-f). Intensitas serapan pewarna *Bixa* paling kuat diberikan oleh konsentrasi 50%.

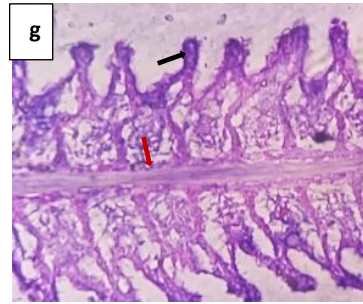




Gambar 2. Sediaan irisan jaringan hepar ikan nila (a) Hematoxylin-Bixa 35%; (b) Hematoxylin-Bixa 50%; (c) Hematoxylin-Bixa 65%; (d) Bixa 35%-Eosin; (e) Bixa 50% - Eosin; (f) Bixa 65% - Eosin; (a) Hematoxylin-Eosin (x400). Keterangan: vena sentralis (panah biru), hepatosit (panah hitam), sinusoid (panah merah).

Pada pengamatan irisan jaringan insang ikan nila, kombinasi pewarna hematoksilin-*Bixa* memberikan gambaran sel epitel lebih jelas. Pewarna *Bixa* memberikan warna ungu pada sitoplasma sel epitel sedangkan hematoksilin tetap mewarna inti sel epitel. Lamella sekunder yang disusun oleh sel epitel tampak jelas dan dapat dibedakan dengan jaringan sekitarnya (Gambar 3a-c). Kombinasi pewarna *Bixa* dan eosin memberikan hasil pewarnaan kurang baik. Pewarna *Bixa* tidak dapat mewarnai inti sel epitel dengan baik, sehingga tidak dapat dibedakan batas antara sel epitel penyusun lamella sekunder (Gambar 3d-f). Konsentrasi pewarna *Bixa* paling baik yaitu pada konsentrasi 50% yang dikombinasikan dengan hematoksilin, akan tetapi belum dapat menyamai intensitas serapan pewarna standar hematoksilin-eosin (Gambar 3g).

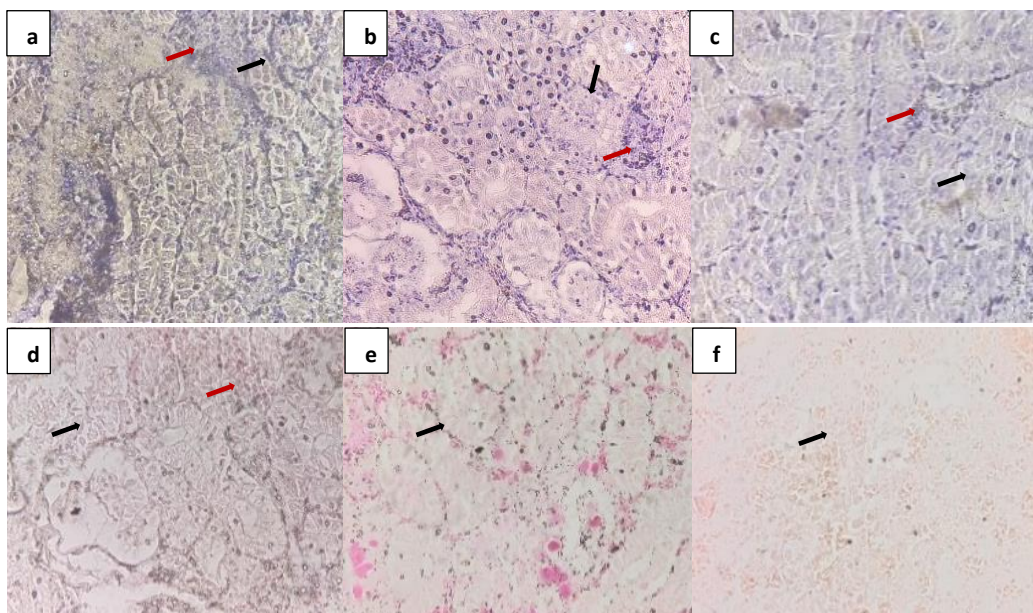


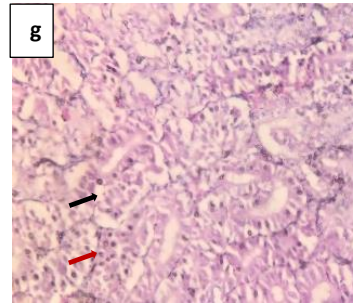


Gambar 3. Sediaan irisan jaringan insang ikan nila (a) Hematoxylin-Bixa 35%; (b) Hematoxylin-Bixa 50%; (c) Hematoxylin-Bixa 65%; (d) Bixa 35%-Eosin; (e) Bixa 50% - Eosin; (f) Bixa 65% - Eosin; (a) Hematoxylin-Eosin (x400). Keterangan: lamela sekunder (panah hitam), pembuluh vena (panah merah).

Pada pengamatan jaringan ginjal ikan nila memberikan hasil yang serupa dengan pengamatan jaringan hepar dan insang. Kombinasi pewarna hematoxilin-*Bixa* memberikan gambaran tubulus ginjal lebih jelas (Gambar 4a-c). Tubulus ginjal ikan nila disusun oleh epitel kubus selapis. Disekitar tubulus ginjal, ditemukan jaringan hematopoietic dengan sel yang tersusun rapat. Jaringan hematopoietic berfungsi dalam pembentukan sel darah. Tubulus penyusun nefron ginjal ikan dapat dibedakan menjadi tubulus proksimal, tubulus distal, tubulus kolektivus dan lengkung Henle (Genten *et al.*, 2009).

Pewarna *Bixa* memberikan warna ungu pada sitoplasma dan hematoxilin mewarnai inti sel epitel. Sedangkan pada kombinasi pewarna *Bixa*-eosin, bagian penyusun nefron ginjal tidak dapat dibedakan dengan jelas (Gambar 4d-f). dengan demikian pewarna *Bixa* dapat digunakan sebagai *counterstaining* hematoxilin namun tidak dapat digunakan sebagai *counterstaining* pewarna eosin.





Gambar 4. Sediaan irisan jaringan insang ikan nila (a) Hematoxylin-Bixa 35%; (b) Hematoxylin-Bixa 50%; (c) Hematoxylin-Bixa 65%; (d) Bixa 35%-Eosin; (e) Bixa 50% - Eosin; (f) Bixa 65% - Eosin; (g) Hematoxylin-Eosin (x400). Keterangan: tubulus proksimal (panah hitam), jaringan hematopoietik (panah merah).

Secara keseluruhan, kombinasi pewarna hematoxylin dan ekstrak biji *Bixa* menunjukkan hasil warna preparat yang lebih baik dibandingkan dengan kombinasi ekstrak *Bixa* dan eosin. Berdasarkan hasil pengamatan terlihat warna kuning pada sitoplasma sel dan tidak mewarnai inti sel. Hal tersebut berarti pewarna ekstrak biji *Bixa* tidak memberikan spesifitas dan kontras yang sama dengan hematoxylin. Pewarna alami dari biji *Bixa* memberikan hasil diferensiasi jaringan sehingga bisa digunakan sebagai counterstaining bersama hematoxylin. Hasil ini sesuai dengan Sadiq *et al.* (2021) yang menggunakan ekstrak etanol wortel (*Daucus carota* L.) mampu mewarnai jaringan pulmo dan memberikan hasil tidak signifikan dengan pewarna eosin. Pewarna alami wortel paling baik dalam mewarnai sel epitel penyusun alveolus dan bronkiolus pulmo.

Eosin merupakan pewarna sintesis dari golongan xanthan yang berpotensi mencemari lingkungan. Penggunaan pewarna alami dapat menggantikan pemakaian pewarna eosin (Sarode *et al.*, 2022). Hartika *et al.* (2021) menyatakan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tannin dan antosianin berpotensi sebagai pewarna alternatif dalam pembuatan sediaan jaringan. Biji kesumba (*Bixa orellana*) diketahui mengandung senyawa bixin (warna merah gelap) dan norbixin (warna kuning) yang termasuk dalam senyawa karotenoid (Raddatz-Mota, 2017).

Akan tetapi dari hasil pengamatan, tampak diferensiasi jaringan paling jelas ditunjukkan oleh pewarna standar hematoxylin-eosin. Pewarna dari ekstrak biji kesumba keling tidak lebih unggul dari pewarna eosin. Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Nnaemeka *et al.* (2019), bahwa pewarnaan histologi organ tikus Wistar dengan ekstrak biji kesumba keling dipengaruhi oleh berbagai tingkat pH, paling signifikan teramati pada pH 5 dan 7,5.

Selain itu, kualitas pewarnaan dipengaruhi oleh berbagai faktor salah satunya jenis pelarut dan lama waktu pewarnaan (Hartika *et al.*, 2021). Ekstrak biji kesumba keling dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Pemilihan

pelarut tersebut didasarkan pada hasil penelitian Nnaemeka *et al.* (2019) bahwa ekstrak biji kesumba keling teramati paling signifikan menggunakan larutan etanol.

KESIMPULAN

Pewarna dari ekstrak kesumba (*Bixa orellana*) mampu memberikan warna pada sitoplasma sel sehingga berpotensi menggantikan pewarna eosin. Akan tetapi, pewarna kesumba (*Bixa orellana*) tidak dapat mewarnai inti sel sehingga tidak dapat menggantikan pewarna hematoksilin. Konsentrasi ekstrak kesumba (*Bixa orellana*) yg paling baik digunakan sebagai pewarna yaitu konsentrasi 50%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi yang telah memberikan pendanaan dalam penelitian melalui skema Pekan Kreativitas Mahasiswa bidang Riset Eksakta (PKM-RE) tahun 2023 serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian artikel ini

DAFTAR PUSTAKA

- García, M. Victory, N., Navarro-Sempere, A., Segovia, Y. (2019). Students' Views on Difficulties in Learning Histology. *Anatomical Sciences Education*, 12(5), 541–549. Available at: <https://doi.org/10.1002/ase.1838>.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A. (2009). Atlas of Fish Histology. Science Publishers. India.
- Hartika, G., Zulharmita, Asra, R. (2021). Utilization of Natural Dyes Substances for Histological Staining: A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 9(1): 149-158
- Mira, E., Anggraini, D., Sukmayani, P. (2013). Formulasi Sediaan Pewarna Bibir dari Ekstrak Etanol Biji Buah Kesumba Keling (*Bixa orellana* L.). *Jurnal Scientia*. 3(1), 29-34.
- Nnaemeka, O., Avwioro, OG., Samuel, A (2019). Staining Interactions of *Bixa orellana* (Annatto) Seed Extracts with Tissues of Wistar Rats. *Annals of Advanced Biomedical Sciences*, 2(6), 1 – 14
- Oliveira, M.A.B., Pereira, S.T., Mendonça, A.R. dos A., Lopes, E.J. de S., Mundim, F.G.L. and Pereira, R.M. (2018). Extratos de morus nigra l. (amora-preta) e *Bixa orellana* l. (urucum) para substituição dos corantes hematoxilina e eosina (HE) na técnica histológica de rotina'. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 11(2), 132-141.

- Pujilestari, T. (201). Pengaruh Ekstraksi Zat Warna Alam dan Fiksasi terhadap Ketahanan Luntur Warna pada Kain Batik Katun. *Jurnal Dinamika Kerajinan dan Batik*, 31(1), 31-40
- Raddatz-Mota, D., Perez-Flores, L.J., Carrari, F., Mendoza-Espinoz, J.A., Leon-Sanchez, F.D., Pinzon-Lopez, L.J., Godoy-Hernandez, G., Rivera-Cabrera, F. (2017). Achiote (Bixa Orellana L.): A Natural Source of Pigment and Vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1729-1741
- Rubina, M. P. Khrisnan, A. M., Basheer, R., Safeer, M., Soumya, V. (2020). Assessment of Staining Quality of Curcumin as a Substitute for Eosin in Hematoxyline and Eosin Staining in Histopathology. *Journal of Research in Medical and Dental Science*, 8(5), 146–150.
- Sadiq, D. H., Ghalib, A. M., Husein, D. M., Qasim, H. H. (2021). Histology Staining with An Alternative Natural Dye (*Daucus carrota* L.). *Annals of The Romanian Society for Cell Biology*, 25(1), 6080-6084
- Sallata, M.K. (2015). Konservasi Dan Pengelolaan Sumber Daya Air Berdasarkan Keberadaannya Sebagai Sumber Daya Alam. *Info Teknis Eboni*, 12(1), 75 - 86.
- Samuel Ayobami, F. (2019). Staining Interactions of Bixa Orellana (Annatto) Seed Extracts with Tissues of Wistar Rats. *Annals of Advanced Biomedical Sciences*, 2(2). Available at: <https://doi.org/10.23880/aabsc-16000144>.
- Saraswati, Rahmawati, Y. (2023). Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) sebagai Alternatif Bahan Pewarna Histologi. *Jurnal Sains dan Teknologi Laboratorium Medik*. 9(1), 22 – 26
- Sari, W, Okavia, I.W., Cerianna, R., & Sumarti. (2016). Struktur Mikroskopis Hati Ikan Serukan (*Osteochilus vittatus*) dari Sungai Krueng Sabee Kabupaten Aceh Jaya yang Tercemar Limbah Penggilingan Bijih Emas. *Jurnal Biotik*, 4(1), 33 – 40
- Sarode, S. A., Pradeep, G. L., Prakash, N., Mahajan, A., Mangle, N. (2022). Exploring a Safer Alternative to eosin in Soft Tissue Staining. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 26(4), 134-141
- Sipahutar, L.W. Aliza, D. Nazaruddin dan Winaruddin. (2013). Gambaran Histopatologi Insang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dipelihara Dalam Temperatur Air di Atas Normal. *Jurnal Medika Veterinaria*, 1(1), 76-89
- Sugiantari, I. A. P., Sukmaningsih, A. A. S. A., and Wijana, I. M. S. (2022). Kajian Struktur Histologi Hati, Insang dan Lambung Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Danau Batur, Bangli. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, [Online] Volume 7(1), pp. 51-59. <https://doi.org/10.14710/baf.7.1.2022.51-59>