



**VALIDASI METODE PEWARNAAN SEDERHANA
BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*
DENGAN EKSTRAK METANOL DAUN JATI
(*Tectona grandis*)**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh

**QORINA ALUF SUPARDI
21701101076**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM MALANG**

2022



**VALIDASI METODE PEWARNAAN SEDERHANA
BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*
DENGAN EKSTRAK METANOL DAUN JATI
(*Tectona grandis*)**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh

QORINA ALUF SUPARDI

21701101076

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM MALANG**

2022

**VALIDASI METODE PEWARNAAN SEDERHANA
BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*
DENGAN EKSTRAK METANOL DAUN JATI
(*Tectona grandis*)**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh
UNISMA

QORINA ALUF SUPARDI

21701101076

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM MALANG
2022**

RINGKASAN

Supardi, Qorina Aluf. Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang, Januari 2022. Uji Validasi Akurasi Dan Presisi Ekstrak Metanol Daun Jati (*Tectona grandis*) Pada Pewarnaan Sederhana Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli*. **Pembimbing 1:** Yoni Rina Bintari. **Pembimbing 2:** Rio Risandiansyah

Pendahuluan: Penggunaan pewarna alamiah pada pewarnaan bakteri dapat menurangi limbah yang disebabkan oleh pewarna sintetis yang bersifat toksik terhadap lingkungan biota sehingga berpengaruh terhadap kehidupan manusia. Daun jati (*Tectona grandis*) mengandung zat warna alami antosianin yang memberikan warna merah pada bahan organik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas pewarnaan sederhana dengan ekstrak daun *T. grandis* pada *S. aureus* dan *E. coli* yang kemudian menilai validasi hasil pewarnaan.

Metode: Penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* ini membandingkan pewarnaan sederhana dengan *methylene blue* (kontrol positif), pewarna dengan ekstrak metanol *T. grandis* (konsentrasi 10%, 25%, 50%) dan metanol (kontrol negatif). Pengamatan preparat dengan mikroskop lalu bakteri yang terlihat dihitung untuk menilai kuantitas yaitu akurasi (98-102%) dan presisi (kurang dari 1,3%). Pengamatan kualitas pewarnaan dilakukan dengan pengamatan deskriptif. Analisa statistik menggunakan Mann-Whitney dengan SPSS versi 25.

Hasil: Nilai akurasi (98-102%) dan presisi (<1,3%) pada pewarnaan sederhana bakteri *S. aureus* dan *E. coli* menggunakan ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) tidak memiliki nilai yang baik. Pengamatan deskriptif pada bakteri *S. aureus* dan *E.coli* didapatkan hasil yang baik pada ekstrak daun jati konsentrasi 50%. Kelemahan dari penelitian ini salah satunya disebabkan oleh metode perhitungan bakteri yaitu debris pada preparat terhitung sebagai sel bakteri dan membuat hasil yang didapat tidak baik.

Kesimpulan: Ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) tidak memiliki nilai akurasi dan presisi, tetapi memiliki potensi sebagai pewarna sederhana pada bakteri *S. aureus* dan *E.coli*.

Kata Kunci: Daun *Tectona grandis*, pewarnaan bakteri, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

SUMMARY

Supardi, Qorina Aluf. Faculty of Medicine, University of Islam Malang, January 2022. Validation Test of Accuracy dan Precision for Teak Leaf (*Tectona grandis*) Methanol Extract on Simple Staining of *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. **Supervisor 1:** Yoni Rina Bintari. **Supervisor 2:** Rio Risandiansyah

Introduction: The use of natural dyes in simple staining of bacteria can reduce waste caused by synthetic dyes that are toxic to the biota environment dan it affects human life. *Tectona grandis* leaves contain natural anthocyanin dyes, which give organic matter a red color. This study aims to determine the quality of simple staining with teak leaf extract (*Tectona grandis*) on *S. aureus* dan *E.coli* bacteria dan then validation method is assessed.

Method: This study is an in vitro laboratory experimental study. Simple staining was performed using *methylene blue* (positive control), teak leaf methanol extract with concentrations of 10%, 25%, 50% dan methanol (negative control). Then the slide were observed under a microscope, then the visible bacteria were counted to assess the quantity, namely accuracy (98-102%) dan precision (less than 1,3%). Observation of the quality of coloring is done by descriptive observation. Statistical analysis using Mann-Whitney on SPSS vers 25.

Result: Accuracy (98-102%) dan precision (<1.3%) in simple staining of *S. aureus* dan *E. coli* bacteria using methanol extract of teak (*Tectona grandis*) leaves did not have a good value. Descriptive observations on *S. aureus* dan *E. coli* bacteria showed good results at 50% concentration of teak leaf extract. One of the weaknesses of this study was caused by the bacterial calculation method, namely the debris on the preparations counted as bacterial cells dan made the results obtained were not good.

Conclusion: The methanol extract of teak (*Tectona grandis*) leaves does not have accuracy and precision values, but has potential as a simple dye for *S. aureus* dan *E. coli* bacteria.

Keywords: *Tectona grandis*, Simple staining, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Teknik pewarnaan bakteri memiliki beberapa cara, diantaranya pewarnaan sederhana, pewarnaan diferensial, dan pewarnaan struktural. Pewarnaan sederhana merupakan teknik pewarnaan yang paling sering digunakan karena dapat diterapkan pada semua jenis sel bakteri dan hanya menggunakan satu jenis pewarna (Moyes *et al.*, 2009). Penggunaan zat pewarna yang terlalu banyak akan menghasilkan limbah yang mencemari lingkungan, hal ini karena sekitar 280.000 ton limbah pewarna telah dihasilkan setiap tahunnya dan telah mencemari lingkungan (Saratale *et al.*, 2011). Menurut Stella Adeyomo dalam penelitiannya menyebutkan, beberapa pewarnaan memiliki efek karsinogenik dan alergi (Adeyemo *et al.*, 2018).

Pada tikus yang diberi dosis 25 mg/kg bb/hari didapatkan hasil peningkatan signifikan terhadap adenoma dan karsinoma, sedangkan tikus yang diberi dosis *methylene blue* 25 dan 50 mg/kg bb/hari dan mencit yang menerima 25 mg/kg bb/hari mengalami anemia ringan (Auerbach *et al.*, 2010). Limbah pewarna sintetik yang besar juga akan menimbulkan kanker kandung kemih pada manusia sedangkan untuk hepatokarsinoma dan kelainan kromosom dalam sel mamalia penelitiannya masih dikonfirmasi memiliki resiko terhadap hewan coba (Padhi, 2012). Beberapa resiko dari penggunaan zat warna harus diperhatikan, karena jika penggunaannya dilakukan secara terus menerus dan dalam jumlah yang banyak akan berbahaya bagi makhluk hidup.

Salah satu pewarna tunggal atau sederhana yang sering digunakan pada bakteri adalah *methylene blue*. Namun, pewarna *methylene blue* bersifat toksik, dapat menyebabkan mutasi genetik, iritasi saluran pencernaan, sianosis jika terhirup, iritasi pada kulit dan berpengaruh pada reproduksi (Fathoni dan Rusmini, 2016). Penggunaan *methylene blue* secara luas akan menyebabkan pencemaran limbah air yang menghalangi masuknya cahaya ke dalam air, mengurangi aktivitas fotosintesis, dan menghabiskan oksigen terlarut dalam air (Yu *et al.*, 2015). Salah satu upaya untuk mengurangi pencemaran dan efek negatif dari *methylene blue* adalah dengan mengganti pewarnaan sederhana bakteri menggunakan pewarna bahan alam, maka peneliti berinovasi untuk mengganti *methylene blue* pada pewarnaan sederhana bakteri menggunakan pewarna alami.

Daun jati (*Tectona grandis*) sejak lama telah digunakan secara tradisional oleh masyarakat Indonesia sebagai obat dan sebagai zat pewarna. Penggunaan daun jati muda sebagai pewarna alami yang memberikan warna merah karena daun jati memiliki kandungan pigmen alami yaitu antosianin (Tumangkeng, 2013). Penelitian lain menyebutkan bahwa ekstrak daun jati memiliki kandungan antosianin jenis pelargonidin sebagai pigmen alaminya (Ati *et al.*, 2010). Selain digunakan sebagai pewarna alami dalam makanan dan kain, daun jati dapat pula digunakan sebagai pewarna pada proses pewarnaan bakteri. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa pewarna daun jati memberikan kualitas warna yang baik pada sel limfosit dan diperoleh waktu viabilitas yang sama dengan *tryphan blue* (Tumangkeng, 2013). Pada penelitian lainnya juga menyebutkan bahwa ekstrak kombinasi angkak dan daun jati dapat digunakan sebagai alternatif pewarna penutup pada pewarnaan gram bakteri *Escherichia coli*, tetapi masih

memerlukan penelitian lanjutan (Virgianti, 2017). Pada penelitian ini daun jati diekstrak menggunakan larutan metanol karena pelarut metanol merupakan pelarut polar yang memiliki struktur molekul kecil dan mampu menembus semua jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktifnya keluar (Romadanu *et al.*, 2014). Metanol juga dapat melarutkan hampir semua senyawa organik baik pada polar ataupun nonpolar, dan juga sifatnya yang mudah menguap sehingga akan mudah dipisahkan dari ekstrak herbal (Ahayu *et al.*, 2015).

Teknik pewarnaan sederhana pada bakteri digunakan dalam diagnosis penyakit salah satunya adalah penyakit infeksi. Penyakit infeksi merupakan penyebab utama angka morbiditas dan mortalitas di dunia. *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* adalah penyebab utama berbagai penyakit infeksi pada manusia dan hewan. Bakteri *Staphylococcus aureus* menyebabkan berbagai macam penyakit seperti infeksi kulit, bakterimia, endokarditis, radang paru-paru dan keracunan makanan (Gnanamani *et al.*, 2017). Bakteri *Escherichia coli* menyebabkan sejumlah kasus penyakit enterik bagi anak-anak di beberapa negara berkembang (Rahayu *et al.*, 2018). Penyakit infeksi merupakan penyumbang angka kematian pada kelompok anak - anak dengan usia 29 hari – 11 bulan (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Data tahun 2019, menyebutkan diare dan pneumonia masih menjadi penyebab utama yang menyebabkan 746 kematian (diare) dan 979 kematian (pneumonia) (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Karena banyaknya kasus infeksi yang disebabkan oleh bakteri, maka perlu menggunakan metode yang tepat untuk menegakkan diagnosis. Metode pewarnaan bakteri dengan daun jati masih termasuk metode baru, karena hal itu maka perlu dilakukannya uji validitas.

Dalam pengembangan suatu metode baru, tahapan penting yang harus dilakukan adalah metode validasi. Validasi metode analisis adalah tindakan penilaian kepada parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, yang bertujuan untuk membuktikan bahwa parameter tersebut sudah memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Dalam penelitian ini, parameter validasi yang akan ditetapkan adalah akurasi dan presisi. Akurasi adalah nilai yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya (Budari *et al.*, 2013). Presisi atau kecermatan merupakan nilai yang menunjukkan kedekatan hasil yang diperoleh dari pengamatan dengan hasil sebenarnya (Perdana, 2020). Pada penelitian ini nilai akurasi dan presisi akan dihitung dari nilai bakteri yang terlihat pada pewarna dengan daun jati dibandingkan pewarnaan bakteri dengan *methylene blue*. Pewarnaan bakteri dengan bahan alam sudah pernah dilakukan tetapi belum divalidasi, sehingga validitas metode baru tersebut masih belum bisa memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapakah nilai akurasi dan presisi ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) sebagai pewarna sederhana pada bakteri *Staphylococcus aureus* ?
2. Berapakah nilai akurasi dan presisi ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) sebagai pewarna sederhana pada bakteri *Escherichia coli*?
3. Berapakah nilai pengamatan deskriptif ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) sebagai pewarna sederhana pada bakteri *Staphylococcus aureus* ?
4. Berapakah nilai pengamatan deskriptif ekstrak metanol daun jati (*Tectona*

grandis) sebagai pewarna sederhana pada bakteri *Escherichia coli*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui nilai akurasi dan presisi ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) sebagai pewarnaan sederhana pada bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Mengetahui nilai akurasi dan presisi ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) sebagai pewarnaan sederhana pada bakteri *Escherichia coli*.
3. Mengetahui nilai pengamatan deskriptif ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) sebagai pewarnaan sederhana pada bakteri *Staphylococcus aureus*.
4. Mengetahui nilai pengamatan deskriptif ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) sebagai pewarnaan sederhana pada bakteri *Escherichia coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Menambah pengetahuan bagi peneliti mengenai efek ketahanan warna dari senyawa aktif ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) yang diujikan terhadap metode pewarnaan bakteri dan metode validasi yaitu akurasi dan presisi pewarnaan tersebut dibandingkan metode pewarnaan standar.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dalam penggunaan pewarnaan sederhana bakteri menggunakan ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*).



BAB VII PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Pewarnaan sederhana dengan ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) memiliki tingkat akurasi dan presisi yang lebih rendah daripada *methylene blue*, baik pada bakteri *S. aureus* maupun *E. coli*.
2. Pewarnaan sederhana dengan ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) memiliki kualitas pewarnaan yang lebih rendah daripada *methylene blue* baik pada bakteri *S. aureus* maupun bakteri *E. coli*.
3. Penggunaan ekstrak metanol daun jati (*Tectona grandis*) dengan konsentrasi 50% memiliki kualitas pewarnaan paling baik diantara ekstrak konsentrasi 10% dan 25%, baik pada bakteri *S. aureus* maupun pada bakteri *E. coli*

7.2 Saran

1. Melakukan pengambilan sampel yang akan menghasilkan jumlah sel yang lebih akurat
2. Melakukan kombinasi antara ekstrak daun jati dengan herbal lain (seperti angkak) yang memiliki warna lebih kuat untuk dilakukan pada pewarnaan diferensial
3. Perhitungan sel bakteri menggunakan metode yang lebih akurat

DAFTAR PUSTAKA

- Adeyemo.dkk, S. M. 2018. *The Use of Plant Dyes for Microbial Staining and Identification: An Eco-friendly The Use of Plant Dyes for Microbial Staining and Identification: An Eco-friendly and Non-Toxic Alternative Method.*
- Ahayu, S. I. T. I. R., Urniasih, N. U. K. and Malia, D. A. N. V. I. N. A. A. 2015. *Limbah Kulit Bawang Merah Sebagai Antioksidan Alami.* 2(1).
- Ahmad, A. *et al.* 2009. *Scavenging behaviour of meranti sawdust in the removal of methylene blue from aqueous solution.* **Journal of Hazardous Materials.** 170(1), pp. 357–365.
- Al-mohanna, M. T. 2017. *Bacterial introduction.* *Research Gate.* April. pp. 679–692.
- Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M. and Mohammedsaleh, Z. M. 2015. *Histological Stains: A Literature Review and Case Study.* **Global Journal of Health Science.** 8(3), pp. 72–79.
- Ariesandy, E. A. S. R. A. 2016. *Pigmen Antosianin : Identifikasi dan Manfaatnya Bagi Industri Makanan dan Farmasi.* 1st edn. Malang.
- Arikalang, T. G., Sudewi, S. and Rorong, J. A. 2018. *Penentuan Kandungan Total Fenolik pada Ekstrak Daun Gedi Hijau (Abelmoschus manihot L .) yang Diukur Dengan Spektrofotometer Uv-Vis.* 7(3).
- Asriana, A. N. 2016. *Penggunaan Minyak Biji Johar (Senna seamea Lam) sebagai Minyak Immersi dan Zat Pewarna untuk Identifikasi Bakteri.* p. 39.
- Astiti, N. P. A. 2017. *Analisis Kandungan Fenolik Ekstrak Daun Jati (Tectona grandis L.) dengan Waktu Dekomposisi yang Berbeda.* **Metamorfosa: Journal of Biological Sciences,** 4(1), p. 122.
- Ati, N. H. *et al.* 2010. *The Composition and The Content of Pigments From Some Dyeing Plant for Ikat Weaving in Timorrese Regency, East Nusa Tenggara.* **Indonesian Journal of Chemistry.** 6(3), pp. 325–331.
- Auerbach, S. S. *et al.* 2010. *Toxicity and Carcinogenicity Studies of Methylene blue Trihydrate in F344N Rats and B6C3F1 Mice.* **Food and Chemical Toxicology.** 48(1), pp. 169–177.
- Bachir, G. and Abouni, B. 2015. *Escherichia coli and Staphylococcus aureus Most Common Source of Infection. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science.* pp. 637–48.

- Baharuddin, A. *et al.* 2015. *Karakterisasi Zat Warna Daun Jati (Tectona grandis) Fraksi Metanol:N-Heksana sebagai Photosensitizer pada Dye Sensitized Solar Cell.* **Chimica et Natura Acta.** 3(1).
- Bapa Lasang, M. 2017. *Ekstraksi Zat Warna Daun Jati (Tectona grandis) dan Aplikasinya Pada Dye Sensitized Solar Cell (DSSC).*
- Bisen, P. S. 2014. *Microbial Staining.* **Microbes in Practice.** 1(1), pp. 139–155.
- Blount, Z. D. 2015. *The Unexhausted Potential of E. coli.* **eLife.** 4, pp. 1–12.
- Bordoloi, B. *et al.* 2017. *A history of Evolution of Special Stains.* **International Journal of Medical Laboratory Research.** 2(3), pp. 55–62.
- Budari, M.K.S. Dewantara, IG. N. A. Wijayanti, N. P. A. 2013. *Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar A -Mangostin pada Gel Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.).* pp. 20–24.
- Bulut, Y. and Aydin, H. 2006. *A Kinetics And Thermodynamics Study of Methylene Blue Adsorption on Wheat Shells.* **Desalination.** 194(1–3), pp. 259–267.
- Chung, K.-T. 2016. *Accepted Manuscript Accepted Manuscript Azo Dyes And Human Health.* **Environ. Sci. Health Care.** 34(4), pp. 1–60.
- Conn, H. J. 2016. *The History of Staining The Development of Bacteriological Staining Methods.* **Biotechnic and Histochemistry.** 5(2), pp. 39–48.
- Dafrita, I. E. and Sari, M. 2020. *Senduduk dan Ubi Jalar Ungu Sebagai Pewarna Preparat Squash Akar Bawang Merah.* **JPBIO (Jurnal Pendidikan Biologi).** 5(1). pp. 46–55.
- Dyrda, G. *et al.* 2019. *The Effect of Organic Solvents on Selected Microorganisms and Model Liposome Membrane.* **Molecular Biology Reports.** 46(3). pp. 3225–3232.
- Erikawati, D., Santosaningsih, D. and Santoso, S. 2016. *Tingginya Prevalensi MRSA pada Isolat Klinik Periode 2010- 2014 di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang, Indonesia.* **Jurnal Kedokteran Brawijaya.** 29(2), pp. 149–156.
- Faner, R. *et al.* 2017. *The Microbiome in Respiratory Medicine: Current Challenges and Future Perspectives.* **European Respiratory Journal,** 49(4).
- Feri, A. M. and Andarwulan, K. N. 2014. *Color Characteristics and Antioxidant Activity of Anthocyanin Extract from Purple Sweet Potato.* **Jurnal Teknologi dan Industri Pangan.** 25(2), pp. 176–184.

- Gnanamani, A., Hariharan, P. and Paul-Satyaseela, M. 2017. *Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach*. **Frontiers in Staphylococcus aureus**.
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. **Departemen Farmasi FMIPA-UI**. 1(1).
- Hassaan, M. A. and Nemr, A. El. 2017. *Health and Environmental Impacts of Dyes: Mini Review*. **American Journal of Environmental Science and Engineering**. 1(3), pp. 64–67.
- Hufnagel, D. A., Depas, W. H. and Chapman, M. R. 2015. *The Biology of the Escherichia coli Extracellular Matrix*. **Microbiology Spectrum**. 3(3), pp. 1–14.
- Imam Fathoni dan Rusmini. 2016. *Pemanfaatan Bentonit Teknis Sebagai Adsorben Zat Warna*. **UNESA journal of chemistry**. 5(3), pp. 18–22.
- Jawetz, Melnick and Aldeberg. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran*.
- Jiwintarum, et al. 2016. *Buah Naga (Hylocereus Polyrhizus) Sebagai Pewarna Alami Untuk Pewarna Bakteri*. **Jurnal Kesehatan Prima**
- Kane, S. N., Mishra, A. and Dutta, A. K. 2016. *Preface: International Conference on Recent Trends in Physics (ICRTP 2016)*. **Journal of Physics: Conference Series**. 755(1).
- Kemenkes. 2020. *Health Statistics (Health Information System), Short Textbook of Preventive and Social Medicine*.
- Khasanah, L. U., Fathinatullabibah and Kawiji. 2014. *Stabilitas Antosianin Ekstrak Daun Jati (Tectona grandis) terhadap Perlakuan pH dan Suhu*. **Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan**. 3(2). pp. 60–63.
- Koch, R. 2016. *Some Drugs and Herbal Products*. **IARC Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, 108, pp. 7–419.
- Kurniawan, Candra. Et al. 2011. *Analisis Ukuran Partikel Menggunakan Free Software Image-J*. **Pusat Penelitian Fisika, LIPI**.
- Lamanda, S. A. 2018. *Analisis Morfologi Jati (Tectona grandis Linn. f.)*. **Jurnal Pertanian**. 2(1), pp. 78–86.
- Lellis, B. et al. 2019. *Effects of Textile Dyes on Health and The Environment and Bioremediation Potential of Living Organisms*. **Biotechnology Research and Innovation**. 3(2), pp. 275–290.

- Lim, J. Y., Yoon, J. W. and Hovde, C. J. 2010. *A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 20(1), pp. 1–10.
- Lister, N. parker. M. S. A.-H. T. T. B. M. F. P. 2016. *Open Stax Microbiology*. **Journal of Chemical Information and Modeling**.
- Lusiana, U. 2012. *Application of Calibration Curve, Accuracy and Precision Chart as Internal Quality Control at COD Testing in Wastewater*. **Biopropal Industri**. 3(1), pp. 1–8.
- Meganada, Sukini, Y. 2017. *Mikrobiologi Bahan Ajar Keperawatan Gigi*. **Kemenkes**. 1, p. 307.
- Merck. 2006. *Lembaran Data Keselamatan Bahan*. 1907. pp. 1–16.
- Miclescu, A. and Wiklund, L. 2010. *Methylene Blue, an Old Drug With New Indications*. **Journal of Anaesthesia and Intensive Care**. 17(1), pp. 35–41.
- Moyes, R. B., Reynolds, J. and Breakwell, D. P. 2009. *Preliminary Staining of Bacteria: Simple Stains*. **Current Protocols in Microbiology**. pp. 1–5.
- Murthy, N. *et al.* 2018. *Training Manual on "Microbiological Examination of Seafood Pathogens with Special Reference V. mimicus & V. valnificus"*. pp. 37–44.
- Muthukrishnan, T., Govender, A., Dobretsov, S., dan Abed, R. 2017. *Evaluating the Reliability of Counting Bacteria Using Epifluorescence Microscopy*. **Journal of Marine Science and Engineering**. 5(1)., 4.
- Nenden. N.M. *et al.* 2020. *Rekomendasi Teknik analisis citra SEM Dengan Menggunakan Free Software ImageJ*. **Wahana Fisika**. 5(2). 104-112
- Nuzuludin.A.K, *et al.* 2015. *Perbedaan Cara Penyebaran Suspensi Terhadap Jumlah Bakteri Pada Media Eosin Methylene Blue Agar*. **Indonesia Medicus Veterinus**. 4(3) : 205-212.
- Padhi, B. S. 2012. *Pollution Due To Synthetic Dyes Toxicity & Carcinogenicity Studies and Remediation*. 3(3), pp. 940–955.
- Perdana, A. I. 2020. *Optimasi Dan Validasi Metode Analisis Kadar Alkohol pada Produk Pangan dengan Spektrofotometer UV-Vis*. **Jurnal Inovasi dan Pengelolaan Laboratorium**, pp. 28–37.
- Prajapati, V. *et al.* 2018. *Chemistry and Histochemistry of Gram Staining of Dyes on Bacterial Peptidoglycan*. **World Journal of Pharmaceutical Research**. 7(16), pp. 490–535.

- Pratama, Y. 2013. *Pemanfaatan Ekstrak Daun Jati (Tectona grandis linn. f.) Sebagai Indikator Titrasi Asam-Basa*. **Skripsi Universitas Negeri Semarang**, p. 6.
- Priska, M. *et al.*, 2018. *Antosianin dan Pemanfaatannya*. **Cakra Kimia Indonesia**. 6(2), pp. 79–97.
- Pujilestari, T. 2016. *Review: Sumber dan Pemanfaatan Zat Warna Alam untuk Keperluan Industri*. **Dinamika Kerajinan dan Batik: Majalah Ilmiah**. 32(2), p. 93.
- Purnama, P. and Kusumaningtyas, D. I. 2013. *Penentuan Batas Deteksi (Lod) Dan Batas Kuantitasi (Loq) Pada Pengukuran Fosfat (Po4-P) Dalam Air Tawar Dengan Metode Asam Askorbat*. **Btl**. 11(1), pp. 71–75.
- Rahayu, W. P., Nurjanah, S. and Komalasari, E. 2018. *Escherichia coli: Patogenitas, Analisis, dan Kajian Risiko*. **Journal of Chemical Information and Modeling**. p. 5.
- Rahmi, Y. *et al.* 2015. *Identification of Staphylococcus aureus in Preputium and Vagina of Horses (Equus caballus)*. **Jurnal Medika Veterinaria**. 9(2).
- Rahmiati, T. N. 2016. *Validasi Metode Untuk Analisis Kandungan Uranium Menggunakan Potensiometer T-90*. **Pusat Sains dan Teknologi Akselerator**.
- Ravishankar, S. 2004. *Food Microbiology: A Laboratory Manual*. **Food Microbiology**.
- Rivas, L. *et al.* 2015. *Introduction to Pathogenic Escherichia coli*.
- Riyanto. 2014. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji*. 1st edn. Yogyakarta.
- Rohman, I. G. G. A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta.
- Romadanu, *et al.* 2014. *Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (Nelumbo nucifera)*. **Jurnal Fishtech**. 3(1), pp. 1–7.
- Santoso, B. and Sri Mulyono, E. W. 2017. *Penapisan Zat Warna Alam Golongan Anthocyanin dari Tanaman Sekitar Sebagai Indikator Asam Basa*. **Fluida**. 11(2), pp. 1–8.
- Saratale, R. G. *et al.* 2011. *Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes: A Review Journal of The Taiwan Institute of Chemical Engineers Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 42(1), pp. 138–157.
- Simundic, A.-M. 2013. *Bias in Research*. **Biochemia Medica**. 12-15.

- Sriwidadi, T. 2011. *Dalam Penjualan Produk Baru Pendahuluan Ruang Lingkup Penelitian Landasan Teori*. **Binus Business Review**. 2 No. 2. pp. 751–762.
- Titford, M. 2010. *Paul Ehrlich: Histological Staining, Immunology, Chemotherapy*. **Laboratory Medicine**. 41(8), pp. 497–498.
- Tumangkeng, G. A. 2013. *Ekstrak Daun Jati (Tectona grandis) Alternatif Pewarna pada Penghitungan Jumlah dan Viabilitas Sel Kultur Dibandingkan dengan Pewarna Tryphan Blue*. **Jurnal EMBA**. 1(4), pp. 78–85.
- UI, S. P. F. K. U. 2005. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran Edisi Revisi*.
- Virgianti, D. P. 2017. *Penggunaan Ekstrak Kombinasi Angkak dan Daun Jati sebagai Pewarna Penutup pada Pewarnaan Gram*. **Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan dan Farmasi**. 17(1), p. 66.
- Wainwright, M. and Crossley, K. B. 2002. *Methylene Blue - A therapeutic Dye for All Seasons*. **Journal of Chemotherapy**. 14(5), pp. 431–443.
- Widjaja. idiatmaka, A. Mediranto. dan Hermanu. 2015. *Karakteristik, Klasifikasi Tanah, dan Pertumbuhan Tanaman Jati (Tectona Grandis Linn F.) Var. Unggul Nusantara Di Ciampea, Kabupaten Bogor*. **Journal of Natural Resources and Environmental Management**. 5(1), pp. 87–87.
- Wijaya, R. C., Utari, E. L. and Yudianingsih, Y. 2015. *Perancangan Alat Penghitung Bakteri*. **Respat.**, 10(29).
- Yu, X. Z., Feng, Y. X. and Yue, D. M. 2015. *Phytotoxicity Of Methylene Blue To Rice Seedlings*. **Global Journal of Environmental Science and Management**. 1(3), pp. 199–204.
- Yulianingtyas, A. dan Kusmartono, B. 2016. *Optimasi Volume Pelarut Dan Waktu Maserasi Pengambilan Flavonoid Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa Bilimbi L.)*. **Jurnal Teknik Kimia**. 10(2). pp. 58–64.
- Yuwono, M. and Indrayanto, G. 2005. *Validation of Chromatographic Methods of Analysis*. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. 32(05), pp. 241–260.
- Ziarani, G. M. et al. 2018. *Introduction and Importance of Synthetic Organic Dyes*. **Metal-Free Synthetic Organic Dyes**. pp. 1–7.