

Pengaruh pH Terhadap Stabilitas Daun Pacar Kuku Sebagai *Counterstain* Alternatif pada Pewarnaan Gram

Sunita Damayanti¹, Dhiah Novalina¹, Wahid Syamsul Hadi¹

¹ Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

Abstrak

Identifikasi bakteri pewarnaan gram dilakukan dengan metode konvensional atau molekuler secara mikroskopis. Pewarnaan gram memiliki kemampuan menyeleksi bakteri gram positif dengan bakteri gram negatif berdasarkan peptidoglikannya. Pewarnaan gram menggunakan safranin sebagai cat penutup. Safranin merupakan pewarna kation yang bersifat karsinogenik dan menimbulkan permasalahan bagi lingkungan dan kesehatan manusia. Oleh sebab itu, perlu dikembangkan pewarna alternatif dari bahan alami yang sama dengan safranin. Daun pacar kuku merupakan senyawa fenolik dan termasuk dalam protein yang memberikan kemampuan pewarnaan yang baik. Penelitian ini memiliki tujuan menentukan pengaruh antara variasi pH dengan stabilitas daun pacar kuku sebagai counterstain alternatif pewarnaan gram dan membuat inovasi baru bahan dasar alami untuk pewarnaan gram yang stabil dan lebih ramah lingkungan. Metode penelitian ini dilakukan secara eksperimen dengan uji stabilitas untuk mengukur absorbansi. Selanjutnya, setelah pewarnaan diamati dibawah mikroskop perbesaran 100x. Hasil penelitian menunjukkan bahwa zat warna pada pH 3 lebih stabil dibanding dengan zat warna pada pH 7 dan pada pewarnaan dengan ekstrak daun pacar kuku bakteri *Staphylococcus aureus* lebih terwarnai dan terlihat jelas dibanding dengan bakteri *Esherichia coli* yang tidak terwarnai oleh ekstrak daun pacar kuku.

Kata Kunci : Daun pacar kuku, Pewarna penutup, Pewarnaan gram, pH

The effect of pH on the stability of henna nail leaves as an alternative counterstain to gram staining

Abstract

Identification of gram staining bacteria is done by conventional or molecular methods microscopically. Gram staining has the ability to select gram positive bacteria with gram negative bacteria based on their peptidoglycan. Gram staining uses safranin as a covering paint. Safranin is a cation dye that is carcinogenic and causes problems for the environment and human health. Therefore, it is necessary to develop alternative dyes from natural materials that are the same as safranin. Henna nail leaves are phenolic compounds and are included in proteins that provide good coloring ability. This study aims to determine the effect between pH variations and the stability of henna nail leaves as an alternative counterstain for gram staining and to make new innovations based on natural ingredients for gram staining that are stable and more environmentally friendly. This research method was conducted experimentally with a stability test to measure absorbance. Furthermore, after staining was observed under a 100x magnification microscope. The results showed that the dye at pH 3 was more stable than the dye at pH 7 and in staining with henna nail leaf extract, *Staphylococcus aureus* bacteria were more stained and clearly visible than *Esherichia coli* bacteria which were not stained by henna nail leaf extract.

Keywords : Henna nail, Counterstain, Gram staining, pH

Korespondensi: Sunita Damayanti, Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Jl. Ringroad Barat No. 63, Area Sawah, Nogotirto, Kec. Gamping, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewah Yogyakarta, mobile 081263854468, email sunitadmn67@gmail.com

Pendahuluan

Identifikasi bakteri dilakukan dengan metode konvensional atau molekuler. Identifikasi konvensional dapat dilakukan secara mikroskopis melalui pewarnaan gram. Peptidoglikan merupakan dasar dalam pewarnaan bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif (Wulandari & Purwaningsih 2019). Pewarnaan gram ialah tahap pertama untuk tindakan karakterisasi dan klasifikasi bakteri. Meskipun teknologi medis saat ini rumit dan mahal, metode pewarnaan Gram tetap merupakan alat yang penting dan sederhana dalam diagnosis bakteriologis medis. Pewarnaan tersebut merupakan prosedur penting dalam mengidentifikasi bakteri berdasarkan karakteristik pewarnaan. Pewarnaan gram tetap eksis dan efektif untuk tes diagnostik meskipun telah ditemukan satu abad lebih (Harindana dkk, 2021).

Pewarnaan Gram merupakan suatu metode dimana organisme dikelompokkan menjadi gram positif maupun gram negatif. Pengelompokannya didasarkan pada komposisi kimia dan integritas struktural dinding sel bakteri. Pewarnaan gram dapat difaktori oleh reaksi dinding sel bakteri terhadap safranin serta kristal violet. Pewarna yang digunakan dalam proses pewarnaan gram dapat bersifat basa atau asam. Kromofor yang merupakan pewarna basa dan bermuatan positif, bertanggung jawab untuk menciptakan warna. Sebaliknya, warna negatif yang bermuatan negatif memberi warna karena adanya muatan yang berlawanan (Papalangi, 2023).

Pewarnaan gram terdiri dari 4 jenis pewarnaan sintetik. Menurut Abdulrahman dkk (2020), "pewarnaan gram A berwarna ungu karena mengandung kristal violet, pewarnaan gram B berwarna coklat mengandung iodine, pewarnaan gram C tidak berwarna/bening, pewarnaan gram D berwarna merah mengandung safranin."

Safranin merupakan pigmen yang dapat digunakan dalam pewarnaan gram negatif untuk mewarnai dinding sel bakteri, salah satunya *Escherichia coli*. Kandungan safranin adalah antosianin yang memberi warna merah pada pewarna safranin. Antosianin merupakan senyawa yang berasal dari polifenol dan banyak ditemukan pada tumbuhan. Senyawa ini bertanggung jawab pada warna merah dalam buah, bunga, dan makanan. Sedangkan menurut Prisma dkk (2018), "Antosianin ialah pigmen larut dalam air dan dapat berwarna merah, biru dan ungu tergantung pada kondisi pH."

Safranin merupakan pewarna basa yang kuat dan dapat terwarnai dengan baik jika jaringan difiksasi dengan larutan Fleming, namun safranin mudah rusak, sulit disimpan, dan proses pewarnaannya lambat. pH yang umum digunakan untuk larutan safranin pada pewarnaan Gram adalah antara 7,2 dan 7,4 (Izzati, 2017).

Safranin merupakan pewarna sintetik yang sering digunakan dalam pewarnaan gram untuk memberi warna merah pada sediaan. Namun jumlah safranin yang ada terbatas karena harga safranin saat ini cukup tinggi, selain itu safranin sulit disimpan dan mudah rusak jika terkena sinar matahari. Kelemahan safranin lainnya adalah bersifat karsinogenik, artinya zat yang dapat memicu kanker. Zat karsinogenik pada pewarna sintetik bisa menimbulkan permasalahan terhadap lingkungan dan kesehatan bagi manusia. Karena kelemahan tersebut, maka perlu dicari alternatif pewarna alami dari beberapa tumbuhan di Indonesia yang dapat digunakan sebagai pewarna, seperti safranin (Sa'adah, 2023). Selain itu safranin mempunyai beberapa kelemahan lain yaitu harganya yang mahal, sulit diserap pada sediaan tertentu, sulit disimpan dan mudah rusak (Karlina dan Rosanty, 2020).

Pewarna sintesis seperti safranin umumnya digunakan dalam pengamatan melalui mikroskop. Safranin merupakan pewarna kationik berbahaya yang sering ditemukan dalam limbah pembuatan kain serta farmasi. Safranin berbahaya karena termasuk faktor pusing, sakit kepala, alergi, demam, gangguan pencernaan, gangguan pernapasan, gangguan kardiovaskular, anemia, hingga masalah kulit karena susah diuraikan dan memiliki sifat karsinogenik (Dafrita & Sari, 2020).

Oleh sebab itu, untuk mendapatkan pH seperti Safranin, dikembangkan pewarna alami. Menurut Zainab dkk (2016) "*Lawsonia inermis* (daun pacar kuku) yang memiliki senyawa flavonoid (apigenin, luteolin, glikosida), kumarin (fraxitin, esculetin, scopoletin), saponin dan tanin di dalamnya" sehingga cocok untuk dijadikan pewarna alami. Selain itu menurut Lestari (2022), "Daun pacar kuku (*Lawsonia inermis*) juga mengandung glukosa, steroid, asam galat, menitol, lemak, resin, protein, karbohidrat dan senyawa fenolik." Daun pacar kuku memiliki kandungan pada pewarna dasar Lawson yaitu 2-hidroksi serta 1,4-naphthoquinone dengan konsentrasi sebesar 1,0-1,4%, flavonoid, kumarin dan steroid. Raja

dkk (2013) menemukan kandungan senyawa tannin, glikosida, flavonoid, fitosterol, dan steroid dalam skrining fitokimianya.

Daun pacar kuku termasuk senyawa fenolik dan kandungan antosianin yang tinggi yaitu 500g/L dengan kelompok protein yang memiliki potensi pewarnaan kategori baik. Septiana (2015) mengungkapkan, "daun pacar kuku mempunyai pigmen warna yang berbeda-beda yaitu kuning tua, merah, merah anggur, coklat kemerahan hingga coklat". Selain itu, daun pacar kuku belum banyak dimanfaatkan di laboratorium karena masih dianggap sebagai tanaman hias (Niken dan Yulia, 2023).

Terdapat keterbatasan dalam pengaplikasian pewarna sintesis dengan sifat karsinogenik serta membahayakan lingkungan, maka diperlukan pewarna alternatif pada pewarnaan gram yang lebih efektif, ramah lingkungan dan harganya relatif lebih murah. Beberapa peneliti terdahulu telah meneliti konteks serupa seperti Azizah dan Syafaatullah (2018) mengatakan, "daun pacar kuku mengandung lawson yang dapat digunakan dalam pewarnaan bakteri dan Ekstraksi daun pacar kuku dan daun tarum dengan metode UAE dari segi waktu lebih efektif dan efisien dari pada menggunakan sokletasi." Kemudian pada penelitian Niken & Yulia (2023) mengatakan pada pewarnaan gram, safranin dapat digantikan oleh ekstrak dari daun pacar kuku. Faktor yang mempengaruhi kestabilan serta merusak kandungan zat warna daun pacar kuku antara lain pH, oksigen, serta cahaya. Pada penelitian sebelumnya belum dilakukan penelitian lebih mendalam tentang pH yang berpengaruh pada stabilitas pewarna ekstrak daun pacar kuku. Berdasarkan permasalahan tersebut peneliti tertarik untuk meneliti pengaruh variasi pH terhadap stabilitas pewarna ekstrak daun pacar kuku.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh variasi pH terhadap stabilitas daun pacar kuku sebagai *counterstain* alternatif pewarnaan gram dan membuat inovasi baru berbahan dasar alami untuk pewarnaan gram yang stabil dan lebih ramah lingkungan.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen menggunakan perlakuan dengan variasi pH 3 dan pH 7 dan pengulangan sebanyak 3 kali. Subjek penelitian adalah daun pacar kuku sebagai alternatif pewarnaan gram. Lokasi penelitian di Laboratorium

Mikrobiologi Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta selama bulan Februari-November 2023. Populasi pada penelitian ini adalah daun pacar kuku yang dapat digunakan sebagai *counterstain* alternatif pewarnaan gram. Populasi ini mencakup daun pacar kuku dalam kondisi segar dan berwarna hijau, sehingga kualitas ekstrak yang didapatkan baik. Sedangkan sampel penelitian berupa daun pacar kuku dari pekarangan rumah warga yang tumbuh daun pacar kuku.

Penelitian ini membutuhkan alat-alat, yaitu neraca analitik, erlenmeyer, cincin, gelas ukur, mikroskop, ose pipet ukur, cawan petri, objek glass, pinset, rak pewarnaan, lampu spiritus, kuvet, oven, spektrofotometer UV-VIS, termometer, pH indikator, bubuk daun pacar kuku, kristal violet, lugol, alkohol, safranin, kertas saring watt man No.1, etanol, aquades, buffer sitrat pH 3 dan pH 7, biakan murni bakteri *Esherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Prosedur kerja penelitiannya yaitu tahap pertama pembuatan bubuk ekstrak daun pacar kuku dengan memisahkan daun pacar kuku sebanyak 2,7 kg dari tangkainya dan dioven selama 4 hari di suhu 50°C hingga kadar air daun yang tersisa <10% dari berat basah. Selanjutnya diblender hingga menjadi bubuk.

Tahap kedua pembuatan ekstrak daun pacar kuku yaitu maserasi dengan 96% pelarut ethanol absolut, direndam dalam pelarut selama 4 hari setelah itu dilakukan penyaringan dengan kertas *Whatman* no.1 untuk memisahkan maserat dari ampasnya. Hasil maserat diupkan dengan *hotplate* sampai tersisa residu kental daun pacar kuku.

Tahap ketiga yaitu Pengujian stabilitas pH dilakukan perlakuan dengan variasi pH 3 dan pH 7 dengan pengulangan sebanyak 3 kali, dengan membuat larutan pewarna sebanyak 1 ml dari ekstrak daun pacar kuku yang dilarutkan 30 ml aquadest, kemudian ditambahkan buffer sitrat hingga mencapai pH 3 dan pH 7 yang diukur dengan kertas indikator pH. Seluruh sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis, kemudian gambar grafik hubungan antara pH terhadap absorbansi zat warna.

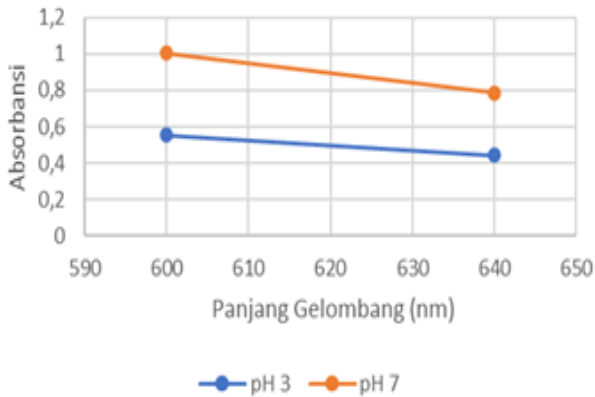
Tahap keempat yaitu pengecatan bakteri *Esherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode pewarnaan gram. Sediaan bakteri yang sudah difiksasi kemudian ditetaskan larutan kristal violet hingga menutupi seluruh kaca bagian bakteri diamkan selama satu menit, dan bilas dengan aquades

hingga kristal violet pada kaca hilang. Setelah itu teteskan larutan lugol hingga menutupi seluruh bakteri selama satu menit dan bilas dengan aquades hingga lugol pada kaca hilang. Teteskan larutan alkohol sampai warna luntur dan bilas dengan aquades. Teteskan larutan safranin selama 30 detik sebagai kontrol, sedangkan sebagai percobaan maka safranin diganti dengan larutan pewarna dari ekstrak daun pacar kuku dengan pH 3 dan pH 7. Kemudian keringkan sediaan, setelah kering lakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x.

Pengolahan dan analisis data pada penelitian ini berdasarkan pada analisis data hasil pengujian stabilitas yang disajikan dalam bentuk grafik pengaruh pH terhadap absorbansi ekstrak daun pacar kuku pada panjang gelombang 600-640 nm. Kemudian hasil pengamatan dilihat dibawah mikroskop perbesaran 100x pada bakteri *Esherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menggunakan pewarnaan gram dengan ekstrak daun pacar kuku dan kontrol safranin.

Hasil

Pengujian kestabilan pH pewarnaan gram dari zat warna ekstrak daun pacar kuku pada pH 3 serta pH 7 dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 1. Grafik Pengaruh pH Terhadap Absorbansi Ekstrak Daun Pacar Kuku.

Berdasarkan gambar 1 terjadi penurunan absorbansi pada pH 3 dan pH 7 sehingga didapatkan hasil zat warna pada pH 3 lebih stabil dibanding dengan zat warna pada pH 7, semakin rendah nilai pH maka warna bakteri akan semakin terlihat jelas (Edyani dkk, 2020).

Tabel 1. Hasil Pewarnaan Gram dengan Zat Pewarna Ekstrak Daun Pacar Kuku pada *Esherichia coli* secara Mikroskopis

Perlakuan	Gambar	Keterangan
Kontrol dengan Safranin		Terlihat bakteri berbentuk basil berwarna merah
pH 3		Terlihat bakteri berbentuk basil transparan
pH 7		Terlihat bakteri berbentuk basil transparan

Tabel 2. Hasil Pewarnaan Gram dengan Zat Pewarna dari Ekstrak Daun Pacar Kuku pada *Staphylococcus aureus* Secara Mikroskopis

Perlakuan	Gambar	Keterangan
Kontrol dengan Safranin		Terlihat bakteri coccus berwarna ungu
pH 3		Terlihat bakteri coccus berwarna biru keunguan
pH 7		Terlihat bakteri coccus berwarna biru keunguan

Berdasarkan table 1 dan 2 didapatkan hasil, pewarnaan dengan daun pacar kuku bakteri *Staphylococcus aureus* lebih terwarnai dan terlihat jelas dibanding dengan bakteri *Esherichia coli* yang terlihat transparan dan tidak terwarnai oleh ekstrak daun pacar kuku.

Pembahasan

Sampel ekstrak daun pacar kuku menghasilkan bakteri berwarna merah atau jingga dikarenakan adanya zat lawson (2-hidroksi, 1,4-naphthoquinone) dengan konsentrasi 1,0-1,4%, (Supriningrum dkk, 2018). Safranin pada pewarnaan gram dalam pewarnaan bakteri positif dan negatif digunakan sebagai kontrol dan ekstrak daun pacar kuku sebagai counterstain alternatif dibagi menjadi 2 perlakuan pH yaitu pH 3 dan 7.

Untuk uji kestabilan pH pada penelitian ini digunakan larutan pewarna ekstrak daun pacar kuku dan diukur stabilitasnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian stabilitas menunjukkan adanya penurunan stabilitas dari pH 3 ke pH 7 dengan Panjang gelombang antara 600-640 nm. Daun pacar kuku merupakan pewarna alami yang berwarna kuning kemerahan sebagai hasil diekstraksi. Berlandaskan skala spektral cahaya tampak, biru ialah warna yang diserap dan rentang panjang gelombangnya kurang lebih 600-640 nm. Ketika cahaya polikromatis mengenai suatu zat, maka Cahaya dengan Panjang gelombang tertentu saja lah yang akan diserap. Menurut Lashmin dkk (2018), jika dalam zat menyerap cahaya tampak (visibel) maka akan terjadi perpindahan elektron dari keadaan dasar menjadi keadaan tereksitasi.

Pada penelitian ini dapat dilihat pada grafik gambar 1. Bahwa terjadi penurunan nilai absorbansi pH 3 ke pH 7. pH 3 lebih stabil dibandingkan dengan pH 7 pada pewarnaan ekstrak daun pacar kuku sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh edyani dkk (2020), "total antosianin dari ekstrak daun pacar kuku di perlakuan pH 3 tidak berbeda dengan kontrol, sedangkan di perlakuan pH 7 berbeda dengan kontrol. Hal ini menunjukkan antosianin lebih stabil dalam kondisi asam dibanding netral maupun basa. Dalam pH asam, antosianin pada kerangka garam flavilium berwarna kemerahan, akan lebih stabil. Besarnya pH akan menentukan tampak tidaknya serta membirunya warna ekstrasi pada antosianin. Miftahul (2021) berpendapat, stabilitas antosianin juga dapat mempengaruhi warna. Stabilitas antosianin dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain pH, suhu, cahaya dan oksigen yang juga dapat merusak warna antosianin pada proses maserasi.

Pada table 1, selama proses pewarnaan gram, warna kristal violet tidak dapat dipertahankan bakteri gram negatif *Escherichia coli* selama proses pewarnaan gram sehingga

mikroba berubah merah. Bakteri gram negatif mempunyai batang berbentuk bulat, oval, lurus, dengan dinding sel tipis. Menurut Aruan & Andreas (2024), "saat proses pewarnaan dengan safranin bakteri gram negatif akan menerima pewarna safranin yang hasilnya tampak berwarna merah."

Pendapat Aruan & Andreas berbanding terbalik dengan hasil penelitian pada tabel 1 yang menunjukkan, "bakteri gram negatif *Escherichia coli* bakteri tidak terwarnai dengan sempurna oleh zat pewarna daun pacar kuku." Peneliti dan faktor variabel seperti proporsi konsentrasi antara daun pacar kuku dan pelarut yang masih belum ideal hingga pencucian dengan cairan yang terlalu lama, sehingga menyebabkan semua warna keluar dari sel bakteri baik pada mikroba gram positif maupun mikroba gram negatif. Hal ini akan menyebabkan kesulitan dalam mengenali kedua jenis mikroba tersebut. pH yang tidak stabil atau waktu yang tidak tepat, strategi pewarnaan dapat mempengaruhi hasil akhir. Namun berdasarkan literatur dari Edyani dkk (2020), bahan pewarna alami yang paling efektif digunakan sebagai pengganti safranin dalam pewarnaan gram negatif adalah daun pacar kuku.

Sedangkan pada table 2 bakteri *Staphylococcus aureus* dapat terlihat lebih jelas morfologinya yaitu berbentuk bulat atau coccus gram positif, susunan sudah tersebar tidak bergerombol, ukuran 07-1.2 μm , lapang pandang dan latar belakang jelas, masih bisa diidentifikasi dengan baik. Pada bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* memiliki tebal 20-80 nm dan didominasi peptidoglikan dengan ketebalan 2-7 nm. Bentuknya bisa berupa bola, batang atau filamen. Menurut Koentjoro & Biotech (2020), "bakteri gram positif yang memiliki dinding sel yang lebih tebal daripada bakteri gram negatif sehingga struktur ini memungkinkan bakteri gram positif mempertahankan kristal violet selama pencucian dengan alkohol."

Menurut Tyasningrum (2021), "daun pacar kuku dapat digunakan sebagai pewarna alternatif dalam pewarnaan gram." Daun pacar kuku mengandung warna antosianin, yang merupakan tempat berkumpulnya flavonoid, senyawa fenol. Senyawa ini memiliki kemiripan dengan zat dalam permata violet. Dalam perenungan, organisme mikroskopis *Staphylococcus aureus* dapat terikat pada warna daun pacar kuku karena pembatas selnya, peptidoglikan dari mikroba gram positif, dapat mengasimilasi pengaturan dengan pH basa.

Zat warna lawsone pada daun pacar kuku ialah senyawa fenolik dan termasuk kelompok protein dengan potensi baik dalam pewarnaan yang baik, selain dulu terdapatnya kadar 500g/l antosianin. Menurut Septiana (2015), “daun pacar kuku memiliki zat warna yang beragam, yaitu kuning tua, merah, merah anggur, coklat kemerahan hingga coklat.” Selain itu, daun pacar kuku belum banyak digunakan di laboratorium karena masih dianggap sebagai tanaman hias (Ratnawati dkk, 2018).

Kesimpulan penelitian ini ialah ekstrak daun pacar kuku dapat digunakan sebagai pewarna penutup safranin dalam pewarnaan gram. Pada bakteri *Escherichia coli* dengan ekstrak daun pacar kuku mendapatkan hasil pewarnaan yang tidak kontras terhadap sel bakteri. Sedangkan pada pewarnaan gram bakteri *Staphylococcus aureus* dengan ekstrak daun pacar kuku didapatkan hasil pewarnaan kontras yang membedakan dengan sel bakteri di dalam media. Dan pada uji kestabilan ekstrak daun pacar kuku pada pH 3 lebih stabil dibandingkan pH 7, yang ditandai dengan penurunan absorbansi pada pH 7.

Saran penelitian ini ialah menambah beberapa variabel penelitian, yaitu: variasi konsentrasi, lama penyimpanan dan suhu. Dan dapat dilakukan pembuatan daun pacar kuku dengan metode selain maserasi agar hasil yang didapat lebih sempurna.

Daftar Pustaka

- Abdulrahman, S., Shaleh, A., & Adriana, F. (2020). Pengaruh Variasi Konsentrasi Ekstrak Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus Rosa-Sinensis* L.) Dan Daun Miana (*Coleus Atropurpureus* Benth) Sebagai Zat Pewarna Alternatif Pengganti Safranin Pada Pewarnaan Gram. *Jurnal MediLab Mandala Waluya*, 4(I), 1-7.
- Aruan, M., & Andareas, P. (2024). *Teknik Dasar Dalam Bakteriologi*. Media Pustaka Indo.
- Azizah, N., & Syafaatullah, A. Q. (2018). Ekstraksi Zat Warna Alami dari Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis*) dan Daun Tarum (*Indigofera tinctoria*) dengan Metode Ultrasound Assisted Extraction (Doctoral dissertation, Institut Teknologi Sepuluh Nopember).
- Dafrita, I. E., & Sari, M. (2020). Senduduk dan ubi jalar ungu sebagai pewarna preparat squash akar bawang merah. *JPBIO (Jurnal Pendidikan Biologi)*, 5(1), 46-55.
- Edyani, J. S., Widyantara, A. B., & Novalina, D. (2020). *Systematic Review: Pemanfaatan Bahan Alami Sebagai Pewarna Alternatif Pengganti Safranin Pada Pewarnaan Gram* (Doctoral dissertation, Universitas ‘Aisyiyah Yogyakarta).
- Harindana, P. Y. A., Iswari, I. S., Setyoatmiko, I., & Fatmawati, N. N. D. (2021). Kesesuaian pewarnaan gram dengan kultur darah sebagai prediktor nilai kritis kasus bakteremia di Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah, Denpasar. *Intisari Sains Medis*, 12(2), 494-499.
- Izzati, M. (2017). Kualitas Preparat Mitosis *Allium cepa* Menggunakan Pewarna Ekstrak Kulit Buah Naga Merah dengan Pelarut Akuades dan Asam Sitrat 10%. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Karlina, P., & Rosanty, A. (2020). *Pemanfaatan Sari Buah Pinang (Areca catechu L) Sebagai Alternative Pewarnaan Gram Pengganti Safranin* (Doctoral dissertation, Poltekkes Kemenkes Kendari).
- Koentjoro, M. P., & Biotech, M. (2020). *Dinamika Struktur Dinding Sel Bakteri*. Jakad Media Publishing.
- Lahsmin, Y. K., Iswadi, I., Aisyah, A., & Rahmania, R. (2018). Pengaruh Konsentrasi Pigmen Warna dari Daun Pacar Kuku (*Lawsonia Inermis* L.) Terhadap Efisiensi Dye Sensitized Solar Cell (DSSC). *Teknosains: Media Informasi Sains dan Teknologi*, 12(2).
- Lestari, W. (2022). *Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Daun Pacar Kuku (Lawsonia inermis Linn) Terhadap Pertumbuhan Jamur Malassezia furfur Sebagai Bahan Ajar Mikologi Dalam Bentuk Booklet* (Doctoral dissertation, Universitas Jambi).

- Miftahul, K. (2021). *Identifikasi Ekstrak Ubi Jalar Ungu (Ipomea Batatas Poiret) Sebagai Zat Pewarna Alternatif Pada Pewarnaan Gram* (Doctoral dissertation, Universitas Perintis Indonesia).
- Niken, N., & Yulia, I. (2023). Innovation of extract (*Lawsonia Inermis L*) as an alternative dye for *Escherichia coli* bacterial staining. *International Journal of Multidisciplinary Approach Research and Science*, 1 (03), 512-517.
- Papalanggi, K. M. (2023). Pengaruh Perbedaan Variasi Waktu Rendaman Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*) Sebagai Alternatif Pewarna Pengganti Safranin Pada Pemeriksaan Bakteri *Escherichia coli* (Doctoral dissertation, Politeknik 'Aisyiyah Pontianak).
- Ratnawati, D., Maryanti, E., & Sentani, A. M. 2018. *Application of henna leaf extract (Lawsonia Inermis L) as a preservative and dye natural Tofu*. *Gradient Journal*, 8(1), 739-745.
- Sa'adah, A. (2023). *Pengaruh Variasi Waku Rendaman Bunga Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) Sebagai Pewarna Alternatif Pengganti Safranin* (Doctoral dissertation, Politeknik 'Aisyiyah Pontianak).
- Setiana, Shella. 2015. The Effect of Concentration of Mordant Lime with Dyes of Dried Girlfriend Leaves (*Lawsonia Inermis L*) on Staining of Knit Cotton Fabrics Using the Tie Dye Technique. *Journal of SI Dressmaking*, Vol. 4, No. 3.
- Supriningrum, R., Fatimah, N., & Wahyuni, N. R., 2018. *Determination of Flavonoid Levels of Ethanol Extract of Girlfriend Leaves (Lawsonia inermis L.) based on Differences in Drying Methods*. *Manuntung Scientific Journal*, 4(2), 156-161.
- Tyasningrum, N. P. (2021). Ekstraksi dan Uji Stabilitas Zat Warna Alami Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis L.*).
- Wulandari, D., & Purwaningsih, D. (2019). Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculenta L.* secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(2), 247- 258.
- Zainab, Sulistyani, & Nanik. (2016). Penetapan Parameter Standarisasi Non Spesifik Dan Spesifik Ekstrak Determination Of Non Specific And Specific Standardization Parameter Of Henna (*Lawsonia inermis L.*) Leaves Extract. *Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan*, 13, 212–226