

Pemeriksaan golongan darah sistem absorpsi-elusi pada sampel darah kering

Tirta Mayangsari¹, Nurfaizah¹, Isna Rasdianah Aziz^{1*}, Irmawati Masse²

¹Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

²Laboratorium Forensik Polda Sulawesi Selatan

*Corresponding author: Jl. HM. Yasin Limpo 36 Gowa, Sulawesi Selatan, Indonesia. 92113

E-mail addresses: isna-rasdianah@uin-alauddin.ac.id

Kata kunci

Antisera darah
Metode *slide*
Penggolongan darah
Serum darah
Sistem ABO

Diajukan: 19 November 2021

Ditinjau: 20 Desember 2021

Diterima: 15 Januari 2022

Diterbitkan: 30 Januari 2022

Cara Sitasi:

T. Mayangsari., N. Nurfaizah., I. R. Aziz., I. Masse, "Pemeriksaan golongan darah sistem absorpsi-elusi dengan optimalisasi waktu dan suhu inkubasi", *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, vol. 2, no. 1, pp. 1-7, 2022.

Abstrak

Penggolongan darah sistem ABO lazim digunakan untuk melacak berbagai kasus bencana, kecelakaan, kejahatan atau paternitas dengan barang bukti darah. Penelitian ini bertujuan untuk memeriksa sampel darah kering bukti kasus dan penggolongan darah metode absorpsi-elusi dengan optimalisasi waktu suhu inkubasi. Darah kering ditetesi dengan antisera A, B dan larutan lektin O, diinkubasi pada suhu 0°C selama 15 menit kemudian dicuci dengan NaCl Fis-0,9 %, dan sentrifugasi 200 rpm selama 10 menit. Larutan eritrosit ABO 2% ditetaskan pada tabung reaksi, kemudian pengamatan aglutinasi divisualisasikan dengan mikroskop *compound*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses aglutinasi positif ditemukan pada golongan darah O, yaitu berupa gumpalan yang banyak, halus dan cairan agak keruh. Pengamatan mikroskop menunjukkan terjadinya penumpukan sel darah merah pada sampel A. Hal ini menunjukkan bahwa adanya keterkaitan antara sampel A dengan sampel B.

Copyright © 2022. The authors. This is an open access article under the CC BY-SA license

1. Pendahuluan

Manusia memiliki materi genetik yang terdapat pada darah dan dapat digolongkan berdasarkan adanya senyawa antigenik (karbohidrat, protein, glikoprotein, dan glikolipid) [1][2]. Klasifikasi pengelompokan darah berdasarkan sistem ABO adalah yang paling umum digunakan bersumber pada aglutinogen (antigen) dan aglutinin (antibodi) pada membran permukaan eritrosit. Golongan darah menjadi penting untuk diketahui dalam berbagai kasus bencana, kecelakaan, kejahatan atau paternitas yang melibatkan bukti darah di tempat kejadian perkara [3][4]. Premis pemeriksaan golongan darah didasarkan pada respon antigen pada permukaan sel darah merah dengan antibodi yang sama, sehingga terjadi aglutinasi [5][6]. Akan tetapi, pemeriksaan golongan darah berdasarkan bukti forensik membutuhkan metode standar yang akurasi dapat divalidasi.

Pada umumnya, berbagai kasus akan meninggalkan barang bukti di tempat kejadian perkara. Sampel biologis yang mengandung DNA seperti rambut, kuku, hasil *buccal swab*, sperma, daging, tulang, kulit, gigi, air liur dan darah yang ditemukan pada tempat kejadian perkara dapat digunakan sebagai barang bukti forensik [7][8][9]. Noda darah dapat ditemukan di berbagai benda, termasuk lantai, meja, kursi, karpet, senjata, dan pakaian. Barang bukti tersebut akan dibawa ke laboratorium forensik untuk dilakukan pemeriksaan lanjut. Penyidik biasanya menemukan bukti darah di properti korban serta pada barang basah atau kering tersangka [10][11]. Identifikasi forensik akan dilakukan dengan membandingkan DNA korban dengan DNA terduga yang dicurigai. Proses identifikasi menyeluruh diperlukan untuk mendapatkan data lengkap dan pendukung, memastikan darah tersebut berasal dari

korban dan tersangka, dan untuk menentukan tes tambahan seperti penggolongan darah dan tes DNA.

Metode absorpsi-elusi digunakan untuk menentukan golongan darah dengan mendeteksi keberadaan antigen dalam darah. Fitri dkk. [12] menyatakan bahwa penggolongan darah pada rambut, saliva dan darah kering menggunakan uji absorpsi-elusi dapat dilakukan dengan menentukan terjadinya aglutinasi pada sampel. Sejalan dengan Utami dkk. [13], yang menyebutkan bahwa persentase keberhasilan identifikasi golongan darah mencapai 100% pada barang bukti darah kering yang diletakkan pada suhu ruangan menggunakan metode absorpsi-elusi. Metode ini juga berhasil digunakan oleh Eldiana dkk. [14] untuk mengidentifikasi golongan darah pada empat variasi substrat kayu sengon (*Paraserianthes falcataria*) pada lingkungan tertutup.

Berdasarkan hal tersebut, maka pemeriksaan golongan darah pada sampel darah kering perlu dilakukan untuk melihat keberadaan darah tersangka pada alat bukti. Penelitian ini bertujuan untuk memeriksa sampel darah kering yang berasal dari substrat kain dan penggolongan darah sistem absorpsi-elusi dengan optimalisasi waktu suhu inkubasi. Informasi mengenai keberhasilan identifikasi darah kering pada berbagai substrat seperti kain dengan mengoptimalkan suhu inkubasi tertentu menjadi penting ketika berhadapan dengan situasi forensik. Temuan penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk mengoptimalkan proses penggolongan darah pada kasus yang serupa, sehingga meningkatkan efektivitas dan efisiensi pemeriksaan.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Agustus 2021 di Laboratorium Forensik Polda Sulawesi Selatan, subbid kimia, toksikologi dan biologi forensik (Kimbiofor).

Instrumentasi. Alat yang digunakan yaitu inkubator, sentrifus, mikroskop, lemari pendingin, gelas 50 ml, gelas ukur 100 ml, pipet tetes, gunting, tusuk sate, tabung reaksi berkode A, B, dan O, kaca preparat, spidol, dan kamera, sedangkan bahan yang digunakan yaitu serbuk *leuco-malachite green* (LMG), biji kacang merah sebagai anti H, larutan hidrogen peroksida 30%, larutan NaCl Fis-0,9%, reagen antisera A dan B, larutan lektin O, tisu, kapas, barang bukti berupa darah kering dari substrat kain dan larutan eritrosit ABO [15].

Konfirmasi golongan darah. Sampel darah yang diambil dari vena probandus dan pada barang bukti diletakkan pada *slide* kemudian ditetesi dengan serum antigen A, B dan O. Golongan darah ditentukan berdasarkan terjadinya penggumpalan darah dengan metode *slide* [16].

Uji presuntif keberadaan darah. Sampel darah kering dari substrat kain diurai dan ditetesi dengan LMG dan H₂O₂ sebanyak 2 tetes. Perubahan warna darah menjadi biru kehijauan mengindikasikan hasil positif keberadaan darah pada substrat yang diuji [17].

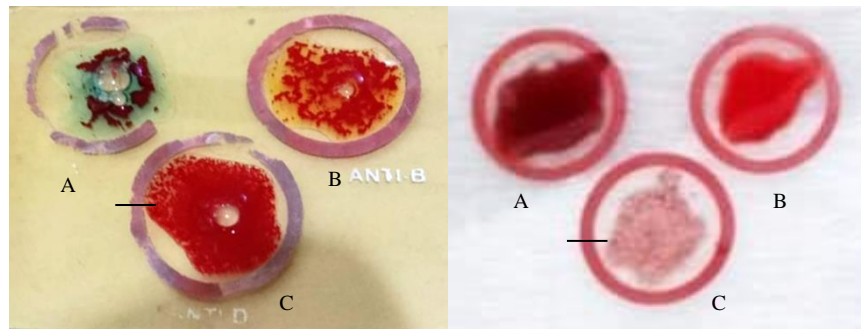
Penentuan golongan darah. Metode yang digunakan untuk menentukan golongan darah adalah absorpsi-elusi [18][19]. Barang bukti kain dipotong kecil-kecil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diberi kode A, B dan O, dan ditetesi dengan larutan antisera A dan B serta larutan lektin O, masing-masing sebanyak 3 tetes. Tabung reaksi ditutup dengan kapas lalu diinkubasi dalam lemari pendingin (*freezer*) suhu 0°C selama 15 menit dengan cara tabung reaksi dimasukkan ke dalam gelas kimia yang telah diisi air sampai tabung reaksi terendam sekitar ¼ bagian sebelum dimasukkan ke dalam *freezer*. Setelah itu, diinkubasi kembali dalam lemari pendingin suhu 4°C selama 5 jam. Kemudian dicuci dengan larutan NaCl Fis-0,9 % lalu disentrifugasi dengan kecepatan 2000

rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang hingga bersih. Perlakuan tersebut diulangi sebanyak 3 kali. Tabung reaksi kemudian dikeringkan dengan cara ditiriskan. Larutan NaCl Fis-0,9% ditambahkan sebanyak 3 tetes dan ditutup dengan kapas. Tabung dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 56°C selama 20 menit. Larutan eritrosit ABO 2 % ditetes sebanyak 5 tetes pada tabung reaksi yang berkode A, B dan O. Setelah 20 menit, tabung reaksi dikeluarkan dari oven lalu supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung yang berisi larutan eritrosit ABO sesuai kode. Tabung reaksi ditutup kembali dengan kapas, lalu diinkubasi dalam *freezer*. Suhu diatur 0°C selama 15 menit dengan cara tabung reaksi dimasukkan ke dalam gelas kimia yang telah diisi air sampai tabung reaksi terendam sekitar ¼ bagian sebelum dimasukkan ke dalam *freezer*. Kemudian diinkubasi kembali dalam lemari pendingin suhu 4°C selama 30 menit. Kemudian sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 2000 rpm selama 3 menit. Setelah itu, supernatan diambil dengan pipet tetes, diletakkan ke kaca preparat dan proses aglutinasi diamati dengan menggunakan mikroskop.

3. Hasil dan Pembahasan

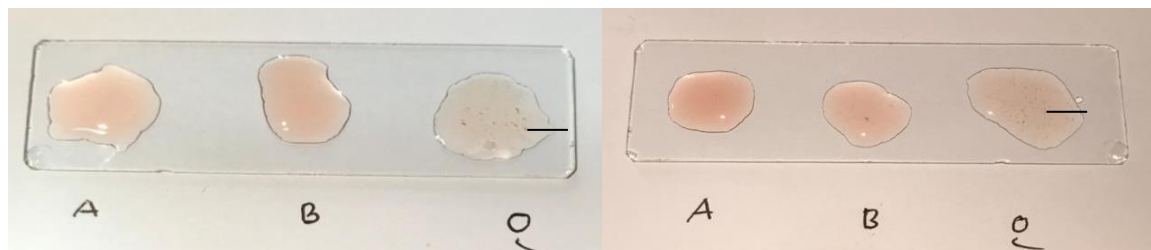
3.1 Hasil Penelitian

Pada pengamatan uji konfirmasi golongan darah menggunakan anti A, anti B dan anti H menunjukkan aglutinasi pada golongan darah O (Gambar 1).



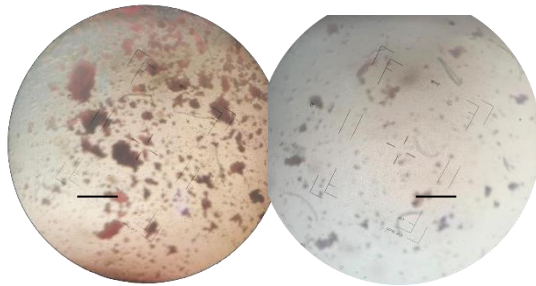
Gambar 1. Uji konfirmasi golongan darah di atas *slide* pada barang bukti sampel A (kiri) dan sampel B (kanan): A. Anti A; B. Anti B; C. Anti O.

Hasil konfirmasi uji golongan darah kedua sampel pada gambar 1 menunjukkan terjadinya aglutinasi pada golongan darah O yaitu pada anti O. Setelah dilakukan uji presuntif keberadaan darah, penentuan golongan darah sampel A dan B dilanjutkan dengan metode absorpsi-elusi (Gambar 2).



Gambar 2. Aglutinasi (tanda garis) berisi eritrosit golongan darah O sampel A (kiri), dan sampel B (kanan).

Gambar 2 menunjukkan hasil positif metode absorpsi-elusi pada kaca preparat dengan adanya aglutinasi pada sampel A dan B setelah ditetesi lektin O. Gumpalan yang terbentuk halus dan cairan menjadi keruh. Hal ini dilanjutkan dengan pengamatan mikroskop yang memvisualisasikan aglutinasi pada eritrosit O pada kedua sampel (Gambar 3).



Gambar 3. Pengamatan mikroskop golongan darah O sampel A (kiri), dan sampel B (kanan).

3.2 Pembahasan

Golongan darah mengacu pada keberadaan antigen tertentu pada sel darah merah manusia. Terdapat empat golongan darah pada sistem penggolongan darah ABO, yaitu golongan darah A, B, AB dan O. Antibodi untuk antigen A dan B pada plasma disebut anti-A dan anti-B. Antigen dan antibodi tidak akan ditemukan bersama pada satu individu, karena dapat menggumpalkan darah dengan pembentukan kompleks antigen-antibodi [20][21]. Uji konfirmasi darah sampel A dan B pada gambar 1 menunjukkan terjadinya aglutinasi pada anti-O yang ditetesi dengan anti-H, sehingga ditetapkan bahwa darah yang digunakan pada penelitian ini merupakan darah positif golongan O. Menurut Raman dkk [22], lektin yang diisolasi dari biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dapat digunakan sebagai anti-H karena menunjukkan titer aglutinasi O yang tinggi dibandingkan golongan darah lainnya, sehingga golongan darah O dapat terkonfirmasi karena adanya reaksi aglutinasi eritrosit tersebut. Lektin biji kacang merah bekerja dengan cara mengikat glikoprotein pada residu gula dari membran eritrosit secara spesifik yang menyebabkan terjadinya penggumpalan sel darah merah [23][24]. Individu dengan golongan darah O memiliki antigen H pada permukaan eritrosit, sedangkan lektin yang diisolasi dari biji kacang merah memiliki anti-H yang memberikan reaksi positif dengan terjadinya aglutinasi dengan variasi derajat reaksi aglutinasi yang berbeda. Pemanfaatan lektin dari tanaman lokal menjadi pilihan teknik yang lebih murah untuk mendeteksi antigen langka dibandingkan menggunakan antiserum komersial yang tergolong lebih mahal [23]. Akan tetapi, efektifitas daya kerjanya masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

Perubahan warna menjadi hijau pada substrat kain barang bukti dalam uji presumtif keberadaan darah menunjukkan terjadinya reaksi oksidasi Fe^{2+} pada darah (*unpublished data*). Penambahan H_2O_2 pada hemoglobin darah yang mengandung ion Fe^{2+} menyebabkan terjadinya oksidasi menjadi Fe^{3+} , mengkatalisis pemecahan hidrogen peroksida, dan produksi radikal hidroksi [25], sehingga mengakibatkan perubahan warna. LMG ($C_{23}H_{26}N_2$) terdiri dari kandungan malasit yang merupakan zat warna golongan trifenil metan yang berwarna ungu perunggu [26][27]. Termasuk ke dalam kelompok pewarna organik sintetik, pewarna ini memiliki struktur molekul yang memiliki ketahanan yang buruk terhadap cahaya. Pada saat sampel ditetesi LMG dan H_2O_2 , maka kepekatan warna hijau yang ditimbulkan akan berbeda bergantung pada jumlah darah sampel. Sensivitas LMG juga dipengaruhi oleh warna substrat kain yang digunakan. LMG menjadi *enhancer* yang optimal apabila ditetesi pada kain berwarna terang dibandingkan kain yang berwarna gelap [28]. Sensitivitas dan spesifitas bahan laboratorium yang digunakan menjadi penting sebagai indikasi performa uji presumtif yang optimal.

Metode absorpsi-elusi menjadi lazim digunakan dalam identifikasi golongan darah sistem ABO. Pendekatan metode ini didasarkan pada absorpsi antibodi terhadap antigen yang terdapat dalam sampel dan kemudian elusi antibodi-antigen dari sampel. Gambar 2 menunjukkan hasil kondisi darah yang berasal dari substrat kain setelah ditambahkan

antisera A, antisera B, dan anti-H lektin O ke dalam masing-masing tabung reaksi kode A, B dan O. Pada kaca preparat, kode A dan B pada kedua sampel menunjukkan tidak adanya proses aglutinasi yang ditandai dengan cairan homogen berwarna cerah dan tidak ada gumpalan, sedangkan kode O menunjukkan adanya gumpalan yang banyak dan halus serta cairan yang agak keruh dibandingkan kode A dan B. Hal ini menunjukkan bahwa optimasi waktu dan suhu inkubasi yang diperlakukan yaitu 0°C 15 menit dilanjutkan 4°C 5 jam berhasil mengikat antigen dan antibodi pada sampel kode O. Suhu menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi reaksi antigen-antibodi pada konstanta keseimbangan [29][30]. Proses absorpsi berlangsung pada suhu rendah yang memfasilitasi pengikatan determinan epitop dan paratop. Ikatan hidrogen pada daya ikatan epitop paratop bekerja lebih stabil apabila berada pada suhu rendah karena bersifat eksotermik dengan tingkat labilitas termal yang tinggi, sedangkan antibodi yang terbentuk dari reaksi tersebut akan terikat pada suhu yang lebih tinggi [21][31]. Proses elusi dimulai pada saat sampel pada tabung reaksi mendapatkan paparan suhu 56°C selama 20 menit. Pemanasan suhu 56°C dapat memindahkan ikatan antigen-antibodi ke dalam larutan salin (NaCl Fis). Larutan garam fisiologis berperan menghilangkan glutaraldehid yang terikat, antisera yang berlebih, serta zat pengotor lainnya [32][33]. Hasil uji metode absorpsi-elusi sesuai dengan uji presumtif yang dilakukan sebelumnya. Substrat kain yang menunjukkan hasil positif keberadaan darah juga menunjukkan hasil yang positif pada identifikasi golongan darah. Visualisasi aglutinasi menggunakan mikroskop perbesaran 40×10 menunjukkan kesamaan golongan darah sampel A melalui metode absorpsi-elusi. Penggumpalan atau penumpukan sel darah merah yang terjadi pada kode O, mengindikasikan bahwa sampel A dan B memiliki keterkaitan. Meskipun metode absorpsi-elusi hanya dapat menentukan fenotip golongan darah, akan tetapi metode ini merupakan metode yang relatif cepat dan sederhana untuk penentuan golongan darah dengan tingkat sensitivitas dan spesifitas yang optimal.

4. Kesimpulan

Identifikasi golongan darah pada sampel A menunjukkan kecocokan dan keterkaitan dengan sampel B berdasarkan penentuan golongan darah sistem ABO metode absorpsi-elusi dengan optimalisasi waktu suhu inkubasi. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melihat genotip sampel.

Daftar Pustaka

- [1] R. Danne et al., "doGlycans—Tools for Preparing Carbohydrate Structures for Atomistic Simulations of Glycoproteins, Glycolipids, and Carbohydrate Polymers for GROMACS", *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 57, no. 10, pp. 2401-2406, 2017. Available: 10.1021/acs.jcim.7b00237
- [2] K. Russo, "The Digital Life of Henrietta Lacks: Reforming the Regulation of Genetic Material", *Journal of Legal Medicine*, vol. 38, no. 3-4, pp. 449-470, 2018. Available: 10.1080/01947648.2017.1419152
- [3] G. Edelman, T. van Leeuwen and M. Aalders, "Hyperspectral imaging for the age estimation of blood stains at the crime scene", *Forensic Science International*, vol. 223, no. 1-3, pp. 72-77, 2012. Available: 10.1016/j.forsciint.2012.08.003
- [4] W. Petherick and A. Rowan, "Physical Evidence and the Crime Scene", *Applied Crime Analysis*, pp. 39-61, 2015. Available: 10.1016/b978-0-323-29460-7.00003-x
- [5] R. Mitra., N. Mishra and G. P. Rath, "Blood Group systems", *Indian Journal of Anaesthesia*, pp. 524-528, 2014. Available: 10.4103/2F0019-5049.144645
- [6] P. Jarujamrus, J. Tian, X. Li, A. Siripinyanond, J. Shiowatana and W. Shen, "Mechanisms of red blood cells agglutination in antibody-treated paper", *The Analyst*, vol. 137, no. 9, p. 2205, 2012. Available: 10.1039/c2an15798e
- [7] P. Minakshi et al., "Animal Forensics and Applications", *Biotechnology: Prospects and Applications*, pp. 265-286, 2013. Available: 10.1007/978-81-322-1683-4_20

- [8] V. Cortellini, L. Franceschetti, H. Correa and A. Verzeletti, "DNA Extraction in Human Bodies: From Fresh to Advanced Stages of Decomposition", *Handbook of DNA Profiling*, pp. 1-23, 2021. Available: [10.1007/978-981-15-9364-2_37-1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-9364-2_37-1)
- [9] M. E. A. Bur., M. T. Hidayat., I. R. Aziz and S. B. Aritonang, "Extraction of DNA on human bone powder", *Tropical Genetics*, vol. 1, no. 1, pp. 24-28, 2021
- [10] D. Johnson., J. Peterson., I. Sommers and D. Baskin, "Use of Forensic Science in Investigating Crimes of Sexual Violence: Contrasting Its Theoretical Potential With Empirical Realities", *Violence Against Women*, pp. 193-222, 2012. Available: <https://doi.org/10.1177%2F1077801212440157>
- [11] P. R. Velani., P. Shah and L. Lakade, "Determination of ABO Blood Groups and Rh Typing from Dry Salivary Samples", *Int J Clin Pediatr Dent.*, pp. 100-104, 2018. Available: <https://dx.doi.org/10.5005%2Fjcp-journals-10005-1493>
- [12] A. Fitri., B. Oktaviana., K. Warsa., R. N. Sunarti., R. A. H. T. Amalia and E. Rezakola, "Penentuan Substansi Golongan Darah Pada Rambut, Darah Kering Dan Saliva Dengan Metode Absorpsi- Elusi Dan Absorpsi-Inhibisi", *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan*, pp. 1-11, 2019.
- [13] Y. Utami, S. Hastuti and B. Nurcahyo, "Identifikasi Golongan Darah O dengan Metode Absorpsi Elusi pada Sampel Darah Kering yang Terdapat pada substrat Kain Jeans dalam Waktu dan Lingkungan Berbeda", *Jurnal Biologi Indonesia*, vol. 17, no. 2, pp. 165-173, 2021. Available: [10.47349/jbi/17022021/165](https://doi.org/10.47349/jbi/17022021/165).
- [14] F. D. E. Eldiana., D. C. Cahyaningrum and B. Nurcahyo, "Keberhasilan Identifikasi Sampel Darah Kering yang Dipaparkan pada Beragam Jenis Substrat Kayu dengan Kondisi Lingkungan Berbeda Selama Kurun Waktu Tertentu", *Jurnal Biologi Indonesia*, vol. 18, no. 1, pp. 31-40, 2022. Available: [10.47349/jbi/18012022/31](https://doi.org/10.47349/jbi/18012022/31)
- [15] Puslabfor, "Instruksi Kerja Laboratorium Forensik Polri", Sub Bagian Manajemen Mutu Pusat Laboratorium Forensik (Puslabfor) Bareskrim Polri, 2012, pp. 12
- [16] A. Oktari and N. D. Silvia, "Pemeriksaan Golongan Darah Sistem ABO Metode Slide dengan Reagen Serum Golongan Darah A, B, O", *Jurnal Teknologi Laboratorium*, vol 5, no. 2, pp. 49-54, 2016
- [17] K. Martin, "The Effects of Bluestar on Presumptive Test for Blood", *North West Association of Forensic Student*, vol. 44, no. 1, pp. 1-13, 2013
- [18] Siracusa V, "La sostanza isoagglutinabile del sangue e la sua dimostrazione per la diagnosi individuale delle macchie". *Arch Antropol Criminol Psichiat Med Leg.* vol 43, pp. 362-365, 1923
- [19] S. S. Kind, "Absorption-Elution Grouping of Dried Blood Smears", *Nature*, vol 185, pp. 397-398, 1960
- [20] S. E. Little, M. R. Raymond, J. E. Thomas, J. Gruntmeir, J. A. Hostetler, J. H. Meinkoth, and B. L. Blagburn, "Heat treatment prior to testing allows detection of antigen of *dirofilaria immitis* in feline serum," *Parasites & Vectors*, vol. 7, no. 1, p. 1, 2014. Available: [10.1186/1756-3305-7-1](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-1)
- [21] T. Osajima, M. Suzuki, S. Neya, and T. Hoshino, "Computational and statistical study on the molecular interaction between antigen and antibody," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 53, pp. 128-139, 2014.
- [22] B. V. Raman., B. Sravani., P. P. Rekha and K. V. N. Lalitha, "Effect of plant lectins on human blood group antigens with special focus on plant foods and juices", *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, vol 3, no. 2, pp. 255-263, 2012
- [23] A. C. Gorakshakar and K. Ghosh, "Use of lectins in immunohematology". *Asian journal of transfusion science*. vol 10, no. 1, pp. 12-21, 2016. Available: <https://dx.doi.org/10.4103%2F0973-6247.172180>
- [24] A. Movafagh., et al., "The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins", *Archives of Advances in Biosciences*, vol 4, 2013, pp. 126-141. Available: <https://doi.org/10.22037/jps.v4i0.4037>
- [25] T. Soderquist, O. Chesniak, M. Witt, A. Paramo, V. Keeling and J. Keleher, "Evaluation of the catalytic decomposition of H₂O₂ through use of organo-metallic complexes – A potential link to the luminol presumptive blood test", *Forensic Science International*, vol. 219, no. 1-3, pp. 101-105, 2012. Available: [10.1016/j.forsciint.2011.12.005](https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.12.005)
- [26] J. Alexander et al., "Malachite green in food", *EFSA Journal*, vol. 14, no. 7, 2016. Available: [10.2903/j.efsa.2016.4530](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4530)
- [27] N. López-Gutiérrez, R. Romero-González, J. Martínez Vidal and A. Frenich, "Analysis of triphenylmethane dyes in seafood products: a review of extraction methods and determination by liquid chromatography coupled to mass spectrometry", *Analytical Methods*, vol. 5, no. 14, p. 3434, 2013. Available: [10.1039/c3ay40485d](https://doi.org/10.1039/c3ay40485d)
- [28] J. Butler, J. Chaseling and K. Wright, "A Comparison of Four Presumptive Tests for the Detection of Blood on Dark Materials", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 64, no. 6, pp. 1838-1843, 2019. Available: [10.1111/1556-4029.14091](https://doi.org/10.1111/1556-4029.14091)

- [29] J. Choi, J. Hu, S. Feng, W. Wan Abas, B. Pinguan-Murphy and F. Xu, "Sensitive biomolecule detection in lateral flow assay with a portable temperature–humidity control device", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 79, pp. 98-107, 2016. Available: 10.1016/j.bios.2015.12.005
- [30] W. Lai, D. Tang, X. Que, J. Zhuang, L. Fu and G. Chen, "Enzyme-catalyzed silver deposition on irregular-shaped gold nanoparticles for electrochemical immunoassay of alpha-fetoprotein", *Analytica Chimica Acta*, vol. 755, pp. 62-68, 2012. Available: 10.1016/j.aca.2012.10.028
- [31] J. A. Ramos-Vara and M. A. Miller, "When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique", *Veterinary Pathology*, vol. 5, no. 1, 2013. pp. 42-87. Available: 10.1177/0300985813505879
- [32] R. Vieira et al., "Chromium removal on chitosan-based sorbents – An EXAFS/XANES investigation of mechanism", *Materials Chemistry and Physics*, vol. 146, no. 3, pp. 412-417, 2014. Available: 10.1016/j.matchemphys.2014.03.046
- [33] M. H. H. B. Asad, "Antihemorrhagic Potential of *Citrullus colocynthis* Schrad (Cucurbitaceae) against *Naja naja karachiensis* (Black Pakistan Cobra) Venom", *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 6, no. 18, 2012. Available: 10.5897/jmpr12.048