

Menghitung Jumlah Sel Goblet Usus Ayam Secara Otomatis Dengan Metode *Multilevel Thresholding*

Dedi Sepriana^{1*}, Kusworo Adi², Catur Adi Widodo²

¹ Program Studi Teknik Elektro, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Pembangunan Panca Budi
Jl. Jend. Gatot Subroto Km. 4,5 Medan

² Program Studi Fisika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang Semarang
E-mail: dedisepriana@gmail.com

Naskah Masuk: 15 Februari 2023; Diterima: 14 Maret 2023; Terbit: 17 Maret 2023

ABSTRAK

Abstrak – Sel goblet merupakan salah satu indikator kesehatan usus ayam yang sangat berpengaruh terhadap produktivitas ayam. Selama ini penentuan sel goblet dilakukan secara visual menggunakan mikroskop. Cara tersebut membutuhkan waktu yang lama dan juga hasilnya bernilai subjektif. Tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi aplikasi yang dikembangkan dengan metode *multilevel thresholding* untuk menghitung jumlah sel goblet pada usus ayam. Penelitian ini menggunakan citra villi yang berasal dari 30 preparat usus halus ayam broiler. Metode *multilevel thresholding* dan pelabelan digunakan untuk menghitung jumlah sel goblet usus halus ayam broiler. Preparat usus halus ayam broiler dengan pewarnaan AB-PAS selanjutnya diakuisisi dengan mikroskop yang telah dilengkapi kamera dan terhubung dengan laptop. Citra yang dihasilkan dari hasil akuisisi yang masih berskala RGB kemudian dikonversi menjadi berskala HSV. Proses selanjutnya adalah proses ekstraksi komponen *hue* yang mengubah skala citra menjadi keabuan dan digunakan untuk mengidentifikasi sel goblet dengan metode *multilevel thresholding*. Operasi morfologi digunakan untuk memperbaiki citra dari sel goblet yang telah terpisah dengan jaringan lainnya. Hasil operasi morfologi ini selanjutnya digunakan untuk menghitung jumlah sel goblet menggunakan metode pelabelan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aplikasi yang digunakan berhasil menghitung jumlah sel goblet secara otomatis. Hasil perhitungan dengan menggunakan metode *multilevel thresholding* dan pelabelan memiliki tingkat akurasi 90% dibandingkan dengan hasil perhitungan secara visual langsung oleh analis.

Kata kunci: Otomatis, Pelabelan, Sel Goblet, *Thresholding*, Usus Ayam

ABSTRACT

Abstract - Goblet cell was an indicator the health of chicken intestine that was strongly influence of chicken productivity. So far, the determination of goblet cell was conducted by visual used of microscope. These methods required a long time and also the result was subjective value. The aim of this study was to evaluate the application of the multilevel thresholding method for calculating the number of goblet cells in the intestine of chickens. The study used villi images derived from 30 small intestine preparations of broiler chickens. Multilevel thresholding and labelling methods were used to calculate the number of goblet cells in the small intestine of broiler chickens. The small intestine preparations of broiler chickens with AB-PAS staining were then acquired with a microscope equipped with a camera and connected to a laptop. The resulting image from the acquisition was still on RGB scale and then converted to HSV scale. The next process was the hue component extraction process which changes the image scale to gray and was used to identify goblet cells with the multilevel thresholding method. Morphological operations were used to improve the image of goblet cells that have been separated from other tissues. The results of this morphological operation were then used to calculate the number of goblet cells using the labelling method. The results showed that the application used was successful in automatically calculating the number of goblet cells. The results of calculations using the multilevel thresholding and labelling method had accuracy rate of 90% compared with the results of calculated of visually directly by analyst.

Keywords: Automatic, Labelling, Goblet Cell, *Thresholding*, Chicken Intestine

Copyright © 2023 Jurnal Teknik Elektro dan Komputasi (ELKOM)

1. PENDAHULUAN

Kesehatan usus memiliki peranan yang penting dalam menentukan produktivitas ayam. Kesehatan usus dapat ditentukan dari jumlah sel goblet yang terdapat di epitel usus halus. Jumlah sel goblet yang tinggi dalam epitel usus mengindikasikan bahwa kondisi usus tidak sehat [1]. Peran penting sel goblet antara lain pencernaan dan penyerapan nutrisi serta produsen utama musin [2]. Penghitungan jumlah sel goblet secara umum telah banyak dilakukan oleh laboratorium di dunia [3]. Prosedur cara perhitungan sel goblet yang

umum dilakukan hingga saat ini adalah secara visual langsung, hal ini dikarenakan metode penghitungan sel goblet tersebut mudah digunakan dan murah [4]. Namun kelemahan dari prosedur tersebut antara lain memakan waktu dan tenaga kerja yang banyak, subjektivitas akan berpengaruh terhadap proses, serta memiliki hasil yang kurang akurat dan tepat [5,6]. Oleh sebab itu perlu alternatif metode penghitungan sel goblet secara otomatis yang nantinya secara signifikan akan menghasilkan hasil perhitungan yang sebanding dengan metode penghitungan yang dilakukan secara visual langsung [5]. Metode perhitungan secara otomatis juga dapat digunakan sebagai solusi yang efisien untuk melakukan analisis sampel yang jumlahnya banyak [7].

Penelitian-penelitian yang berkaitan dengan perhitungan jumlah sel secara otomatis selama ini sudah banyak dilakukan, diantaranya yaitu pengolahan citra untuk mendeteksi dan menghitung jumlah sel darah merah melalui proses tahapan awal berupa penghitungan preprocessing citra menjadi skala keabuan [8]. [9] melakukan penelitian penghitungan otomatis jumlah sel darah merah dengan *Thresholding* dan pelabelan memiliki tingkat akurasi sebesar 80% dan penelitian yang dilakukan [10] berhasil memisahkan objek sel goblet dengan bagian lainnya dengan *multilevel thresholding* sebanyak 2 *threshold* yaitu dengan nilai T_1 , 159 dan T_2 , 221. Berdasarkan hal tersebut perlu dibuat aplikasi yang mampu digunakan untuk melakukan perhitungan jumlah sel goblet secara otomatis menggunakan metode *Multilevel Thresholding* dan Pelabelan. Metode ini dimulai dengan preparasi usus halus menggunakan pewarnaan *Alcian Blue-Periodic Acid Schiff* (AB-PAS), citra selanjutnya diambil menggunakan mikroskop yang dilengkapi kamera serta terhubung dengan laptop, kemudian dilakukan proses normalisasi, segmentasi, morfologi dan pelabelan untuk penghitungan jumlah sel goblet. Tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi aplikasi yang dikembangkan dengan metode *multilevel thresholding* untuk menghitung jumlah sel goblet usus ayam.

2. KAJIAN PUSTAKA

2.1. Sel Goblet

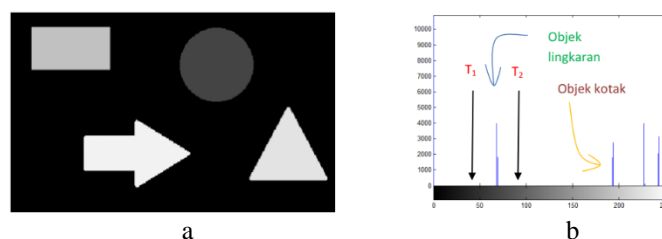
Sel goblet memiliki peran utama untuk mengeluarkan mucin yang melindungi saluran usus dari kerusakan mekanis maupun patogen [11,12]. Jumlah sel goblet akan mengalami peningkatan akibat adanya kontaminasi aflatoksin dari makanan [1]. Identifikasi sel goblet usus secara umum dilakukan melalui pewarnaan *Alcian Blue-Periodic Acid Schiff* (AB-PAS) [12]. Teknik pewarnaan ini akan menyebabkan musin berwarna biru, sehingga akan timbul perbedaan warna antara sel goblet dengan jaringan yang lain [13].

2.2. Multilevel thresholding

Multilevel thresholding adalah metode segmentasi atau memecah citra digital menjadi beberapa bagian dengan menggunakan nilai ambang lebih dari satu. Citra digital yang memiliki histogram dengan nilai puncak yang lebih dari satu dapat dipecah menjadi beberapa bagian dengan menggunakan beberapa nilai ambang sehingga dapat membedakan antara objek yang satu dengan objek yang lain. Objek yang ingin dipisah ditentukan dengan nilai T_1 sebagai nilai minimal dan T_2 sebagai nilai maksimal, sedangkan citra yang dapat digunakan untuk proses segmentasi berupa citra dengan kelas *uint8* [14]. Contoh citra disajikan pada Gambar 1, adapun formula segmentasi menggunakan dua nilai ambang T_1 dan T_2 sebagai berikut:

$$f_B(i, j) = \begin{cases} 1, & T_1 \leq f_g(i, j) \leq T_2 \\ 0, & \text{lainnya} \end{cases} \quad (1)$$

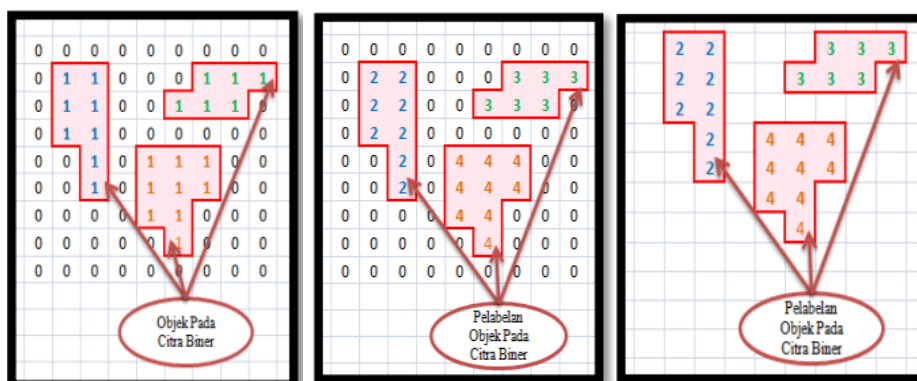
Dimana citra biner $f_B(i, j)$, citra grayscale $f_g(i, j)$, dan nilai ambang minimal T_1 dan maksimal T_2 .



Gambar 1. a) Contoh citra *grayscale* beberapa benda. b) Histogram citra

2.3. Pelabelan

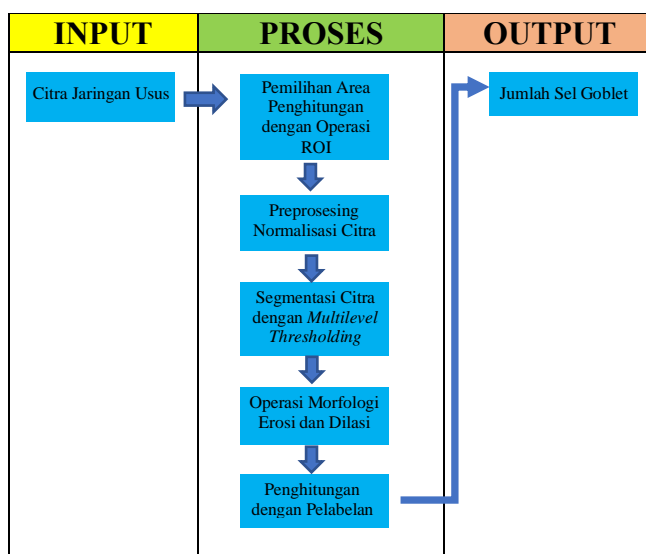
Pelabelan adalah teknik yang digunakan untuk memberikan label pada citra digital pada setiap objek yang berbeda dalam bentuk nomor, dimana citra yang dapat diberi label pada objek umumnya berupa citra biner. Sekumpulan pixel pada citra biner dengan intensitas warna bernilai 1 dan saling terhubung dianggap sebagai objek, sedangkan sebaliknya jika sekumpulan pixel memiliki intensitas warna bernilai 0 dianggap sebagai latar belakang. Sehingga dapat dibedakan nilai 0 sebagai latar belakang dan nilai 1 sebagai latar depan atau objek dengan nilai 2,3, ...,n., dimana n adalah nomer objek. Gambar 2 berikut ini memberikan ilustrasi matrix citra biner pada 3 objek [15].



Gambar 2. Operasi pelabelan objek pada citra biner

3. METODE PENELITIAN

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian usus halus ayam broiler yang telah dipreparasi sebanyak 30 citra vili usus ayam untuk dilakukan penghitungan secara visual langsung oleh analis dan penghitungan dengan *multilevel thresholding* dan pelabelan. Metode yang dilakukan meliputi pengambilan citra, pemilihan objek untuk penghitungan jumlah sel goblet, preprocessing untuk normalisasi citra, *multilevel thresholding* dengan dua nilai ambang, operasi morfologi, dan metode pelabelan untuk penghitungan jumlah sel goblet. Gambaran penelitian penghitungan jumlah sel goblet diperlihatkan pada Gambar 3 berikut ini.



Gambar 3. Diagram blok proses penghitungan jumlah sel goblet

Pengambilan citra sel goblet dilakukan untuk mengambil citra digital pada beberapa citra bagian usus yang telah di preparasi. Mikroskop yang digunakan yaitu mikroskop pembesaran 40x dan kamera digital resolusi 1 Megapiksel serta laptop yang terhubung dengan *Universal Serial Bus (USB)*. Jumlah citra yang

akan dilakukan pada penelitian ini adalah 30 citra dari 5 sampel usus halus ayam broiler bagian jejunum yang telah dipreparasi dengan pewarnaan AB-PAS.

Citra vili usus ayam yang diperoleh dari bagian pencitraan kemudian dipilih menggunakan *tool ROI (Region of Interest)* dan selanjutnya dinormalisasi dengan tujuan untuk menyamakan bentuk citra dalam skala keabuan melalui proses konversi citra RGB ke HSV dan ekstraksi komponen *hue*. Citra hasil ekstraksi komponen *hue* [16] memiliki tipe data *double*, sedangkan untuk proses segmentasi dengan *thresholding* memerlukan citra dengan tipe *uint8*. Citra hasil normalisasi tersebut menghasilkan citra berskala keabuan.

Segmentasi citra dengan metode *Thresholding* digunakan untuk memisahkan objek yang dikehendaki dengan latar belakang pada citra vili usus yang telah dinormalisasi. Keluaran hasil segmentasi citra berupa citra biner yang terdiri dari objek yang dikehendaki akan berwarna putih (memiliki nilai 1) dan latar belakang yang ingin dihilangkan akan berwarna hitam (memiliki nilai 0) [17], sehingga diperoleh objek sel goblet berwarna putih.

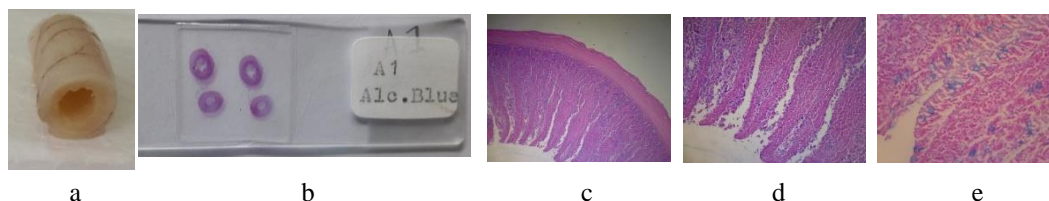
Operasi morfologi erosi dan dilasi digunakan untuk memisahkan sel goblet yang tertumpuk, memperjelas jarak antar sel dan merapikan bentuk sel goblet. Operasi morfologi erosi digunakan untuk mengurangi piksel pada batas antar sel goblet dan mengurangi tepi yang menonjol. Sedangkan dilasi menambahkan piksel pada objek sel goblet yang terdapat lubang atau cekungan. Citra hasil operasi morfologi masih terdapat beberapa objek kecil yang bukan merupakan sel goblet, sehingga perlu dibersihkan dengan menggunakan fungsi *bwareaopen*. Sedangkan untuk menghilangkan lubang di dalam objek sel goblet, citra perlu diperbaiki menggunakan fungsi *Image Filling* [18].

Proses penghitungan jumlah sel goblet dilakukan metode pelabelan. Sel goblet yang telah diidentifikasi dilakukan pelabelan dengan *boundary box*. Sedangkan satuan sel goblet diukur dalam satuan sel. Tahap akhir adalah validasi untuk melihat sejauh mana ketepatan metode yang sudah diterapkan yaitu dengan membandingkan data hasil penghitungan menggunakan metode yang diterapkan dengan data *real* dari penghitungan secara visual langsung. Validasi ditunjukkan untuk melihat seberapa besar tingkat akurasi dari metode yang diterapkan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengambilan Citra

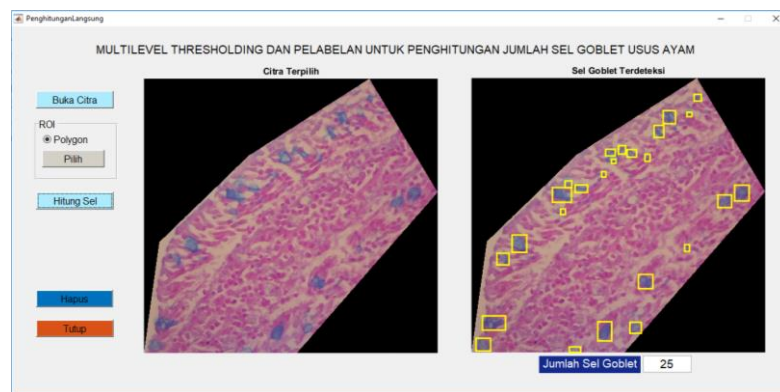
Citra diambil dari sampel usus ayam yang telah dipreparasi kemudian dilakukan analisa penghitungan sel goblet oleh Dokter Hewan yang berwenang. Analisa dilakukan melalui pengambilan citra dari mikroskop dengan perbesaran 40x. Hasil Analisa diperoleh 30 citra dengan resolusi 2560 x 2048 piksel yang kemudian dihitung jumlah sel gobletnya secara visual langsung. Pengambilan citra untuk identifikasi dan penghitungan jumlah sel goblet diperlihatkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Akuisisi citra untuk identifikasi dan penghitungan sel goblet. a) Usus halus ayam broiler yang telah dipotong ± 2 cm pada bagian jejunum. b) *Slide glass* hasil preparasi usus halus ayam broiler dengan teknik pewarnaan AB-PAS, c) Citra mikroskopis jaringan usus halus ayam broiler dengan perbesaran 4x, d) Citra mikroskopis jaringan usus halus ayam broiler dengan perbesaran 10x. e) Citra mikroskopis jaringan usus halus ayam broiler dengan perbesaran 40x.

4.2. Penghitungan Jumlah Sel Goblet dengan *Multilevel Thresholding* dan Pelabelan

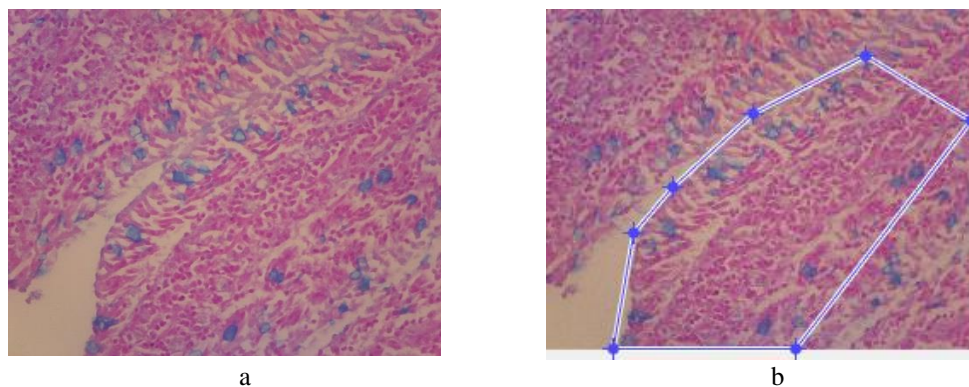
Penghitungan jumlah sel goblet dilakukan untuk mengetahui jumlah sel goblet dengan *Multilevel Thresholding* dan Pelabelan menggunakan *Graphical User Interface (GUI)* yang telah dibangun seperti yang tersaji pada Gambar 5. Tahapan penghitungan meliputi pemilihan objek untuk penghitungan jumlah sel goblet, preprocessing untuk normalisasi citra, *multilevel thresholding* dengan dua nilai ambang, operasi morfologi, dan metode pelabelan untuk melakukan perhitungan jumlah sel goblet.



Gambar 5. Perhitungan jumlah sel goblet dengan GUI

4.3. Pemilihan Objek

Pemilihan objek untuk penghitungan jumlah sel goblet digunakan untuk memilih area penghitungan sesuai dengan keinginan. Objek area yang akan dihitung dapat dipisahkan dengan bagian lainnya yang tidak dihitung menggunakan operasi *Region of Interest* (ROI). Operasi ROI yang digunakan dalam penelitian ini adalah *polygon*. Operasi ROI *polygon* digunakan untuk memilih area bagian objek dengan bentuk sesuai keinginan, dimana titik awal area pemilihan harus dipertemukan dengan titik akhir area pemilihan, dengan ditandai kursor berbentuk bulat. Operasi ROI *polygon* digunakan karena area objek yang dihitung tidak memiliki keteraturan bentuk [19]. Area objek dipilih berdasarkan area pandang pada beberapa bagian area objek. Dengan menggunakan pemilihan area bentuk *polygon* analisis dapat memilih area objek sesuai dengan keinginannya. Dalam hal ini analisis telah melakukan penghitungan jumlah sel goblet secara visual sesuai dengan keahliannya. Gambar 6 berikut ini merupakan contoh pemilihan area objek untuk penghitungan jumlah sel goblet yang telah disesuaikan dengan area pandang analisis.



Gambar 6. a) Citra jaringan vili usus ayam. b) Memilih area penghitungan dengan operasi ROI *polygon*.

4.4. Preprocessing untuk Normalisasi Citra

Area objek yang terpilih untuk dilakukan penghitungan, kemudian dilakukan preprocessing untuk normalisasi citra, sehingga semua citra yang dihasilkan berupa citra berskala keabuan dengan kelas *uint8*. Tahapan preprocessing meliputi konversi citra dari skala RGB menjadi skala HSV, kemudian dilakukan ekstraksi komponen *hue*. Citra yang dihasilkan dari ekstraksi komponen *hue* merupakan citra berskala keabuan dengan kelas *double*. Citra selanjutnya diubah menjadi citra dengan kelas *uint8* supaya dapat dilakukan proses segmentasi dengan metode pengembangan dua skala keabuan yaitu T1 dan T2.

4.5. Multilevel Thresholding dengan Dua Nilai Ambang

Area objek yang telah menjadi skala keabuan selanjutnya dilakukan segmentasi menggunakan metode *multilevel thresholding* dengan dua nilai ambang. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya diperoleh nilai ambang T1 dan T2 yaitu 159 dan 221 [10]. Nilai ambang inilah yang dimasukkan dalam bahasa

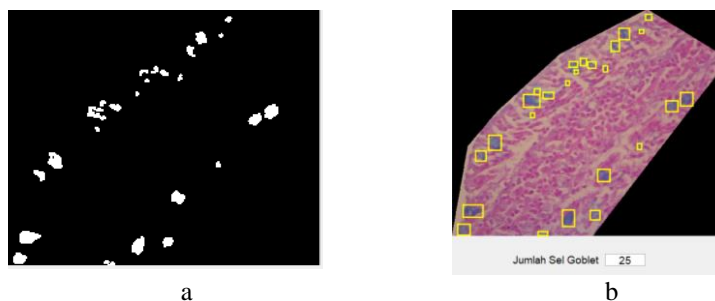
pemrograman matlab untuk dilakukan proses segmentasi pemisahan objek berupa sel goblet dengan latar belakang berupa jaringan lainnya. Hasil segmentasi menggunakan metode *Multilevel Thresholding* dengan dua nilai ambang berupa citra biner. Bagian citra dengan nilai skala keabuan kurang dari 159 atau lebih dari 221 semula berskala keabuan berubah menjadi citra biner berwarna hitam atau bernilai 0. Sedangkan bagian citra dengan nilai skala keabuan berada diantara 159 dan 221 semula berskala keabuan berubah menjadi citra biner dengan warna putih. Objek berwarna putih inilah yang merupakan objek sel goblet.

4.6. Operasi Morfologi

Objek berupa sel goblet yang telah dipisahkan dari latar belakangnya berupa jaringan lainnya masih terdapat beberapa objek dengan bentuk yang terpotong, terdapat dua objek yang tidak terpisah dan terdapat lubang pada objek. Sehingga perlu dilakukan perbaikan citra melalui proses morfologi berupa erosi, dilasi, *image filling*, dan *area open*. Jenis dan parameter operasi morfologi yang digunakan antara lain operasi erosi dengan tipe disk sebesar 10 piksel digunakan untuk mengikis bagian tepi objek, sehingga beberapa objek yang menempel jadi satu dapat dipisahkan. Operasi dilasi dengan tipe disk sebesar 10 piksel dilakukan untuk menutup objek yang terkikis menjadi tertutup. Operasi *image filling* digunakan untuk menghapus lubang yang terdapat di dalam bagian objek. Sedangkan operasi *area open* dengan jangkauan sebesar 10 piksel digunakan untuk menghapus noise di sekitar objek dan menandai tepian objek sehingga dapat dilakukan pelabelan pada objek.

4.7. Pelabelan untuk Penghitungan Jumlah Sel Goblet

Objek berupa sel goblet yang telah dipisahkan dari jaringan lainnya dalam bentuk citra biner dan kemudian dilakukan operasi morfologi telah dapat digunakan untuk proses pelabelan. Proses pelabelan diawali dengan pembuatan *bounding box*, dimana ukuran *bounding box* dapat berubah sesuai dengan besarnya objek. Jumlah label inilah yang digunakan untuk menghitung jumlah sel goblet usus ayam. Gambar 7 menunjukkan contoh citra objek sel goblet yang telah dilakukan *bounding box* dan pelabelan serta hasil penghitungan jumlah sel goblet dari objek berupa sel goblet yang telah dilabeli.



Gambar 7. Contoh citra hasil pelabelan dan penghitungan jumlah sel goblet. a) citra hasil segmentasi menggunakan *multilevel thresholding* dua nilai ambang, b) Citra hasil pelabelan dan jumlah penghitungan sel goblet.

4.8. Validasi

Validasi dilakukan untuk mengetahui keakuratan penghitungan yang dilakukan melalui metode yang diterapkan dibandingkan dengan penghitungan secara visual langsung oleh analis seorang Dokter Hewan yang bekerja di laboratorium. Metode penghitungan secara visual dilakukan dengan menggunakan mikroskop. Preparat sampel usus diletakkan dalam penjepit kaca kemudian diamati dengan perbesaran mikroskop 40x selanjutnya akan dilihat sel goblet yang ditandai dengan warna biru dan dihitung satu per satu jumlahnya. Hasil penghitungan sel goblet yang dilakukan menggunakan metode yang diterapkan dibandingkan dengan penghitungan secara visual langsung oleh analis disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1 tersebut, tingkat akurasi penghitungan jumlah sel goblet yang dilakukan secara visual langsung oleh analis dibandingkan dengan penghitungan jumlah sel goblet menggunakan GUI dari metode yang diterapkan diperoleh:

$$\text{Akurasi} = \frac{\sum \text{Citra terhitung sama}}{\sum \text{Citra}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Akurasi} = \frac{27}{30} \times 100\%$$

$$\text{Akurasi} = 90\%$$

Sedangkan untuk mengetahui klasifikasi akurasi penghitungan dari metode yang diterapkan, klasifikasi akurasi disesuaikan dengan klasifikasi sebagai berikut (Gorunescu, 2011):

- a. Akurasi bernilai 90 % – 100 % = Baik Sekali
- b. Akurasi bernilai 80 % – 90 % = Baik
- c. Akurasi bernilai 70 % – 80 % = Cukup Baik
- d. Akurasi bernilai 60 % – 70 % = Kurang Baik
- e. Akurasi bernilai 50 % – 60 % = Gagal

Berdasarkan hasil validasi pada penghitungan jumlah sel goblet yang dilakukan secara visual langsung oleh analis dibandingkan dengan menggunakan GUI dari metode yang diterapkan diperoleh tingkat akurasi penghitungan sebesar 90%, hal tersebut menunjukkan tingkat akurasi penghitungan yang baik

Tabel 1. Data hasil penghitungan jumlah sel goblet dengan metode visual langsung oleh analis dan GUI

No.	Kode Citra	Hasil Perhitungan		
		Visual	GUI	Keterangan
1	A1.1	25	25	Sama
2	A1.2	27	27	Sama
3	A1.3	31	31	Sama
4	A1.4	25	25	Sama
5	A1.5	23	23	Sama
6	A1.6	20	20	Sama
7	A2.1	16	16	Sama
8	A2.2	26	26	Sama
9	A2.3	36	36	Sama
10	A2.4	17	17	Sama
11	A2.5	14	14	Sama
12	A2.6	18	18	Sama
13	A3.1	17	17	Sama
14	A3.2	9	10	Beda
15	A3.3	12	12	Sama
16	A3.4	13	13	Sama
17	A3.5	14	14	Sama
18	A3.6	12	12	Sama
19	A4.1	11	11	Sama
20	A4.2	16	16	Sama
21	A4.3	19	19	Sama
22	A4.4	20	20	Sama
23	A4.5	21	21	Sama
24	A4.6	16	16	Sama
25	A5.1	21	21	Sama
26	A5.2	35	35	Sama
27	A5.3	25	18	Beda
28	A5.4	26	26	Sama
29	A5.5	23	23	Sama
30	A5.6	20	18	Beda

5. KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian adalah metode *multilevel thresholding* dan pelabelan dapat mengidentifikasi dan menghitung jumlah sel goblet pada usus ayam dengan tingkat akurasi sebesar 90% apabila dibandingkan dengan penghitungan yang dilakukan secara visual langsung oleh analis.

REFERENSI

- [1] Jahanian, E., A. H. Mahdavi, S. Asgary, and Jahanian, R., "Effect of dietary supplementation of mannanoligosaccharides on growth performance, ileal microbial counts, and jejunal morphology in broiler chicks exposed to aflatoxins", *Livest. Sci.*, vol. 190, pp. 123-130, 2016.
- [2] Contreras-Ruiz, L., A. Ghosh-Mitra, M. A. Shatos, D. A. Dartt, and S. Masli, "Modulation of conjunctival goblet cell function by inflammatory cytokines", *Mediators Inflamm.*, pp. 1–11, 2013.
- [3] Piccinini, F., A. Tesei, G. Paganelli, W. Zoli, and A. Bevilacqua, "Improving reliability of live/dead cell counting through automated image mosaicking", *Comput Methods Programs Biomed*, vol. 117, no. 3, pp. 448-463, 2014.
- [4] Grishagin, I. V., "Automatic cell counting with Image", *Anal biochem*, vol. 473, pp. 63-65, 2015.
- [5] Kim, S. I., H. J. Kim, H. J. Lee, K. Lee, D. Hong, H. Lim, K. Cho, N. Jung, and Y. W. Yi, "Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters", *Anal biochem*, vol. 492, pp. 8-12, 2016.
- [6] Ji, X., C. Zhao, P. Gong, Q. Li, and Y. Yu, "Research on high-accuracy biological microscopic imaging and cell counting system", *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, vol. 127, no. 23, pp. 11483-11491, 2016.
- [7] Cadena-Herrera, D., J. E. Esparza-De Lara, N. D. Ramírez-Ibañez, C. A. López-Morales, N. O. Pérez, L. F. Flores-Ortiz, and E. Medina-Rivero, "Validation of three viable-cell counting methods: manual, semi-automated, and automated" *Biotechnology Reports*, vol. 7, pp. 9-16, 2015.
- [8] Maitra, M., R. K. Gupta, and M. Mukherjee, 2012, "Detection and counting of red blood cells in blood cell images using hough transform", *Int j comput appl*, vol. 53, no. 16, pp. 13-17, 2012.
- [9] Setyowati, S., K. Adi, K., and C. Anam, "Rancang Bangun Perangkat Lunak untuk Perhitungan Sel Darah Merah Normal Dan Terinfeksi Malaria", *Berkala Fisika*, vol. 22, no. 3, 110-116, 2019.
- [10] Sepriana, D., K. Adi, and C. E. Widodo, "Determining the Threshold Value for Identification of the Goblet Cells in Chicken Small Intestine", In 2019 International Conference of Artificial Intelligence and Information Technology (ICAIIIT), IEEE, pp. 255-259, 2019.
- [11] Johansson, M., and G. C. Hansson, "Immunological aspects of intestinal mucus and mucins", *Nat Rev Immunol*, vol. 16, pp. 639–649, 2016.
- [12] Reynolds, K. L., S. E. Cloft, and E. A. Wong, "Changes with age in density of goblet cells in the small intestine of broiler chicks", *Poult sci*, vol. 99, no. 5, pp. 2342-2348, 2020.
- [13] Osho, S. O., T. Wang, N. L. Horn, and O. Adeola, "Comparison of goblet cell staining methods in jejunal mucosa of turkey poult", *Poult Sci*, vol. 96, no. 3, pp. 556-559, 2017.
- [14] Putra, I.K.G.D., *Pengolahan citra digital*, Andi, Yogyakarta, 2010.
- [15] Sujito, S., and M. Yunus, "Perbandingan strategi pelabelan objek pada citra digital dengan metode flood filling", *Jurnal teknologi informasi: Teori, Konsep, dan Implementasi*, vol. 7, no. 2, pp. 139-148, 2016.
- [16] Hamuda, E., B. Mc Ginley, M. Glavin, and E. Jones, "Automatic crop detection under field conditions using the HSV colour space and morphological operations", *Comput electron agric*, vol. 133, pp. 97-107, 2017.
- [17] Murthy, T. D., and G. Sadashivappa, "Brain tumor segmentation using thresholding, morphological operations and extraction of features of tumor", In 2014 international conference on advances in electronics computers and communications, IEEE, pp. 1-6, 2014.
- [18] Sepriana, D., K. Adi, and C. E. Widodo, C. E., "Application of morphological operations for improvement the segmentation image of chicken intestinal goblet cells". *Int J Comput Appl*, 975, 8887, 2019.
- [19] Oruganti, N., and T. Singh, "Best fit polygonal approximation for multiple roi estimation. in 2020 11th international conference on computing", Communication and Networking Technologies (ICCCNT), IEEE, pp. 1-6, 2020.