

Artikel Penelitian

## Pengaruh Konsentrasi dan Lama Perendaman Carbol Fuchsin pada Hasil Pewarnaan Modifikasi Ziehl-Neelsen untuk Deteksi *Cyclospora cayetanensis*

Yuni Wulandari,<sup>1</sup> Dewi Inderiati,<sup>2</sup> Ika P. Sari<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Teknologi Laboratorium Medis Program Sarjana Terapan, Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jakarta III, Bekasi, Indonesia

<sup>2</sup>Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jakarta III, Bekasi, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

\*Penulis korespondensi: ika.puspa@ui.ac.id

Diterima 22 Mei 2026; Disetujui 15 September 2026

<https://doi.org/10.23886/ejki.14.1502.1>

### Abstrak

*Cyclospora cayetanensis* merupakan protozoa penyebab siklosporiasis yang memerlukan diagnosis laboratorium secara cepat dan akurat. Metode pewarnaan modifikasi Ziehl-Neelsen umum digunakan untuk mendeteksi ookista *C. cayetanensis* dalam spesimen feses, namun variasi penyerapan zat warna sering kali berpotensi menyebabkan kesalahan identifikasi. Penelitian eksperimental dengan rancangan posttest-only ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh variasi konsentrasi (0,3%; 1%; 4%) dan lama perendaman (10 menit, 15 menit, 20 menit) Carbol Fuchsin dengan tiga kali pengulangan terhadap hasil pewarnaan. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada Maret–April 2025. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa konsentrasi Carbol Fuchsin berpengaruh signifikan terhadap persentase ookista terwarna (ANOVA dua arah,  $p < 0,000$ ) dan kualitas latar belakang pewarnaan (uji Kruskal-Wallis,  $p = 0,004$ ). Sebaliknya, lama perendaman Carbol Fuchsin tidak berpengaruh signifikan terhadap persentase ookista terwarna ( $p = 0,234$ ) maupun kualitas latar belakang ( $p = 0,128$ ). Tidak ditemukan interaksi signifikan antara konsentrasi dan lama perendaman ( $p = 0,183$ ). Kesimpulannya, konsentrasi Carbol Fuchsin memengaruhi keberhasilan pewarnaan ookista *C. cayetanensis*, dengan kombinasi konsentrasi 1% dan lama perendaman 10 menit sebagai variasi optimal untuk meningkatkan kejelasan visual dan meminimalkan risiko misidentifikasi.

**Kata kunci:** Carbol Fuchsin, *Cyclospora cayetanensis*, diare, modifikasi Ziehl-Neelsen.

## Effect of Carbol Fuchsin Concentration and Staining Duration on Modified Ziehl-Neelsen Staining for the Detection of *Cyclospora cayetanensis*

### Abstract

*Cyclospora cayetanensis* is a protozoan parasite that causes cyclosporiasis, for which rapid and accurate laboratory diagnosis is essential. The modified Ziehl-Neelsen staining method is routinely used to detect *C. cayetanensis* oocysts in stool specimens; however, variable stain uptake may contribute to misidentification. This experimental study, employing a posttest-only design, aimed to evaluate the effects of Carbol Fuchsin concentration (0.3%, 1%, and 4%) and staining duration (10, 15, and 20 minutes) on staining results. Each treatment combination was performed in triplicate. The study was conducted at the Department of Parasitology Laboratory, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, from March to April 2025. Statistical analysis demonstrated that Carbol Fuchsin concentration significantly affected both the percentage of stained oocysts (two-way ANOVA,  $p < 0.001$ ) and background staining quality (Kruskal-Wallis test,  $p = 0.004$ ). In contrast, staining duration had no significant effect on either the percentage of stained oocysts ( $p = 0.234$ ) or background staining quality ( $p = 0.128$ ). No significant interaction was observed between Carbol Fuchsin concentration and staining duration ( $p = 0.183$ ). In conclusion, Carbol Fuchsin concentration plays a significant role in the successful staining of *C. cayetanensis* oocysts. A 1% Carbol Fuchsin concentration with a 10-minute staining duration was identified as the optimal combination for improving visual clarity and minimizing the risk of misidentification.

**Keywords:** Carbol Fuchsin, *Cyclospora cayetanensis*, diarrhea, modified Ziehl-Neelsen.

## Pendahuluan

*Cyclospora cayetanensis* adalah protozoa koksidia yang menyebabkan penyakit diare pada manusia yang dikenal sebagai siklosporiasis. Parasit ini ditularkan melalui konsumsi makanan atau air yang terkontaminasi ookista infeksius.<sup>1</sup> Gejala klinis yang umum meliputi diare berair, kram perut, mual, dan kelelahan.<sup>2,3</sup> Siklosporiasis telah dilaporkan di berbagai belahan dunia, dengan peningkatan kasus selama musim hujan, termasuk di Indonesia.<sup>2,4</sup> Deteksi dini sangat penting untuk mencegah komplikasi lebih lanjut pada kelompok dengan sistem imun lemah seperti anak-anak, orang tua, penderita HIV/AIDS, dan warga negara asing.<sup>2</sup>

Diagnosis laboratorium yang akurat sangat penting untuk penanganan siklosporiasis. Metode pewarnaan tahan asam, seperti modifikasi Ziehl-Neelsen (mZN) digunakan untuk mendeteksi ookista *C. cayetanensis* dalam sampel feses.<sup>1,5</sup> Namun, ookista *C. cayetanensis* menunjukkan variasi dalam penyerapan pewarna pada metode ini, dengan beberapa ookista tampak tidak terwarnai sehingga dapat menyebabkan misidentifikasi.<sup>1,5,6</sup> Beberapa penelitian telah mengeksplorasi modifikasi teknik pewarnaan untuk meningkatkan deteksi ookista *C. cayetanensis*. Salah satu pendekatan yang dilaporkan efektif adalah teknik pewarnaan safranin panas dengan pemanasan menggunakan microwave. Metode ini memberikan pewarnaan yang lebih seragam dan intens terhadap ookista.<sup>1,6,7</sup> Namun, metode ini memerlukan peralatan tambahan serta prosedur yang lebih kompleks, sehingga tidak selalu tersedia di semua laboratorium. Oleh karena itu, pewarnaan mZN masih lebih banyak digunakan di laboratorium klinis karena lebih sederhana. Faktor-faktor yang memengaruhi pewarnaan mZN di ookista meliputi konsentrasi Carbol Fuchsin, proses dekolorisasi, karakteristik ookista, dan modifikasi teknik lainnya.<sup>6,8</sup>

Modifikasi Ziehl-Neelsen yang digunakan di Laboratorium Departemen Parasitologi FKUI menggunakan Carbol Fuchsin 1% tanpa

pemanasan selama 15 menit.<sup>4</sup> Rekomendasi serupa juga dijelaskan oleh United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS) yaitu selama 15–20 menit.<sup>9</sup> MZN ditinjau oleh Garcia et al<sup>6</sup> dengan kisaran konsentrasi Carbol Fuchsin yang digunakan berkisar 0,3%, 1%, dan reagen Kinyoun-Gabet (4%) dengan waktu perendaman selama 20 menit.

Penelitian yang secara spesifik mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi dan lama perendaman Carbol Fuchsin untuk deteksi *C. cayetanensis* masih sangat terbatas. Bahkan, beberapa studi yang menggunakan pewarnaan tahan asam tidak secara eksplisit melaporkan konsentrasi Carbol Fuchsin yang digunakan. Dalam tinjauan sistematis oleh Cakir et al<sup>10</sup> mengenai *C. cayetanensis* di Turki periode 2004–2023, metode pewarnaan tahan asam digunakan pada 43 dari 47 penelitian yang dianalisis, sementara metode ZN dan Kinyoun hanya dilaporkan digunakan secara bersamaan dalam satu penelitian. Selain itu, beberapa penelitian pada spesies koksidia lain dan bakteri tahan asam (BTA) menunjukkan bahwa variasi prosedur pewarnaan dapat memengaruhi kualitas hasil pewarnaan. Al-Ezzy et al<sup>11</sup> pada *Cryptosporidium* dan Wahid et al<sup>12</sup> pada BTA melaporkan bahwa perbedaan konsentrasi dan lama perendaman Carbol Fuchsin berpengaruh signifikan terhadap kualitas pewarnaan. Penelitian yang dilakukan oleh Setyowatiningsih<sup>13</sup> juga menunjukkan bahwa lama perendaman Carbol Fuchsin memengaruhi kualitas pewarnaan sediaan BTA menggunakan metode ZN. Temuan-temuan tersebut menunjukkan bahwa parameter pewarnaan berperan penting dalam keberhasilan visualisasi mikroorganisme. Namun, hasil penelitian pada *Cryptosporidium* dan BTA belum dapat secara langsung diterapkan pada *C. cayetanensis* karena perbedaan karakteristik biologis dan sifat pewarnaannya. Meskipun metode ZN dan berbagai modifikasinya telah banyak digunakan untuk mendeteksi *C. cayetanensis*, termasuk dalam penelitian Wahdini et al<sup>14</sup> yang mengevaluasi modifikasi pewarnaan ZN untuk identifikasi ulang

ookista *C. cayetanensis* dengan Malachite Green 0,4%, bukti mengenai pengaruh kombinasi konsentrasi Carbol Fuchsin dan lama perendaman terhadap keberhasilan pewarnaan masih terbatas. Hingga saat ini, belum ditemukan penelitian yang secara sistematis membandingkan variasi kedua parameter tersebut dengan menggunakan persentase ookista terwarnai sebagai indikator kuantitatif keberhasilan pewarnaan.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi dan lama perendaman Carbol Fuchsin terhadap hasil pewarnaan mZN dalam mendeteksi ookista *C. cayetanensis* di Laboratorium Departemen Parasitologi FKUI. Penelitian ini bertujuan menentukan kombinasi konsentrasi dan lama perendaman Carbol Fuchsin yang optimal berdasarkan persentase ookista terwarnai dan kualitas latar belakang sediaan, sehingga dapat meningkatkan kualitas identifikasi mikroskopis serta mengurangi potensi kesalahan diagnosis laboratorium

## Metode

### Desain Penelitian dan Sampel

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik menggunakan *posttest-only control group design*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Departemen Parasitologi FKUI, Jakarta, pada periode Januari hingga Juni 2025. Populasi penelitian mencakup seluruh sampel feses positif protozoa yang tersimpan di laboratorium tersebut selama kurang dari satu tahun. Sampel penelitian terdiri atas satu suspensi feses positif *C. cayetanensis* yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi, yaitu tidak mengalami kerusakan atau kontaminasi protozoa lain, mengandung jumlah ookista yang memadai untuk pemeriksaan berulang, serta menunjukkan variasi ookista terwarnai dan tidak terwarnai pada pewarnaan mZN standar menggunakan Carbol Fuchsin 1% dengan lama perendaman 15 menit. Kriteria eksklusi meliputi volume sampel kurang dari 2 mL, penyimpanan yang tidak sesuai prosedur,

preparat yang tidak berbentuk suspensi, atau terdapat debris berlebihan yang dapat mengganggu interpretasi hasil pewarnaan.

Berdasarkan kriteria tersebut dipilih satu sampel yang kemudian diberikan sembilan kombinasi perlakuan yang terdiri atas tiga konsentrasi Carbol Fuchsin (0,3%; 1%; dan 4%) serta tiga lama perendaman (10, 15, dan 20 menit). Setiap kombinasi perlakuan dilakukan dalam tiga kali pengulangan, sehingga diperoleh total 27 sediaan uji. Jumlah pengulangan ditentukan menggunakan rumus Federer.

### Pembuatan Sediaan dan Kontrol

Sebanyak 27 sediaan uji disiapkan dan diberi kode alfanumerik sesuai kelompok perlakuan. Setiap sediaan dibuat dengan meneteskan 10  $\mu$ L suspensi feses yang mengandung ookista *C. cayetanensis* pada kaca objek, kemudian diratakan membentuk apusan berdiameter sekitar 1 cm dan dikeringkan pada suhu ruang.

Sebagai kontrol mutu pewarnaan digunakan sembilan sediaan *Cryptosporidium sp.* sebagai kontrol positif dan sembilan sediaan tanpa parasit sebagai kontrol negatif, yang didistribusikan pada setiap kelompok perlakuan.<sup>6,15</sup> Penggunaan kontrol positif dan negatif bertujuan untuk memastikan konsistensi prosedur pewarnaan dan validitas hasil pembacaan mikroskopis.

### Prosedur Pewarnaan

Pewarnaan mZN diawali dengan fiksasi ganda melalui pemanasan sediaan di atas nyala api sebanyak 2 hingga 3 kali, diikuti perendaman dalam metanol selama 3 menit. Setelah fiksasi, sediaan ditetesi 1 mL larutan Carbol Fuchsin sesuai konsentrasi perlakuan (0,3%; 1%; atau 4%) dan diinkubasi selama 10, 15, atau 20 menit. Sediaan kemudian dibilas menggunakan air mengalir dan didekolorisasi dengan HCl-metanol 1% selama 10 detik.

Tahap berikutnya adalah pemberian pewarna latar menggunakan 1 mL Malachite Green 0,4% selama 30 detik, kemudian sediaan kembali dibilas

dengan air mengalir dan dikeringkan pada suhu ruang sebelum dilakukan pembacaan mikroskopis.

### **Pembacaan Mikroskopis**

Metode pembacaan hasil dimodifikasi dari standar pembacaan sediaan BTA Direktorat Jenderal P2P tahun 2022.<sup>16</sup> Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan lensa objektif 10× dan 40× untuk orientasi lapangan, kemudian dilanjutkan menggunakan lensa objektif 100× dengan minyak imersi.

Ookista *C. cayetanensis* diidentifikasi berdasarkan ukuran morfologis 8 hingga 10 µm menggunakan mikrometer terkalibrasi. Setiap sediaan diamati secara sistematis dari kiri ke kanan hingga mencapai 100 lapang pandang. Ookista dikategorikan sebagai terwarnai apabila tampak merah muda hingga merah tua akibat menyerap Carbol Fuchsin, dan sebagai tidak terwarnai apabila tampak transparan dengan dinding ookista yang cenderung berkerut.<sup>17</sup>

Kualitas latar belakang dinilai secara semikuantitatif menjadi tiga kategori, yaitu: baik (latar belakang hijau dan bebas sisa Carbol Fuchsin), kurang baik (latar belakang hijau kemerahan dengan sedikit residu Carbol Fuchsin), dan tidak baik (latar belakang merah dengan banyak residu Carbol Fuchsin). Seluruh hasil pembacaan dikonfirmasi oleh pengamat kedua yang independen sebelum dilakukan analisis data.

### **Analisis Statistik**

Data disajikan dalam bentuk tabel dan uraian deskriptif. Uji normalitas dilakukan menggunakan Shapiro-Wilk. Apabila data berdistribusi normal, analisis dilanjutkan menggunakan ANOVA dua arah untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi Carbol Fuchsin, lama perendaman, dan interaksi keduanya terhadap persentase ookista terwarnai. Apabila asumsi normalitas tidak terpenuhi, digunakan uji nonparametrik yang sesuai. Seluruh analisis dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS dengan tingkat kemaknaan  $p < 0,05$ .

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Universitas Muhammadiyah Purwokerto dengan Nomor Registrasi KEPK/UMP/11/III/2025 pada tanggal 2 Maret 2025.

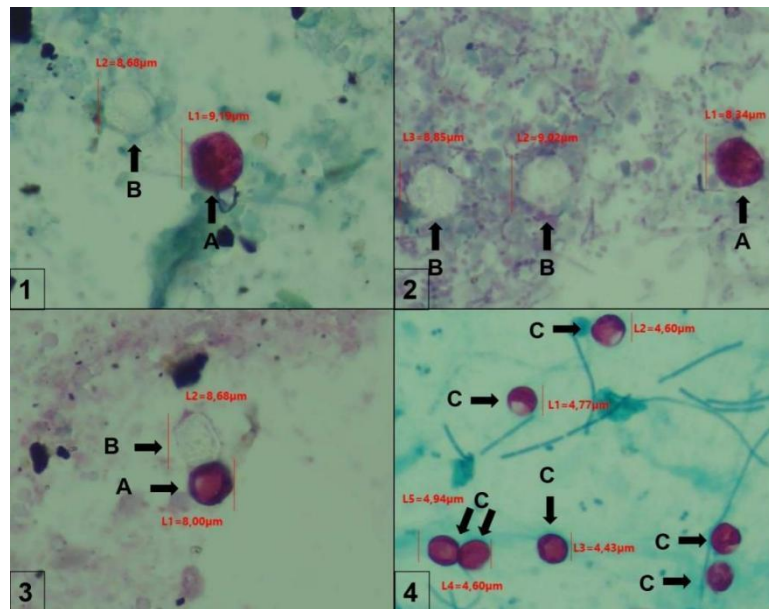
### **Hasil**

Morfologi ookista *C. cayetanensis* dan kualitas pewarnaan latar belakang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan lensa objektif 100X dan minyak imersi. Hasil pengamatan ditampilkan pada Gambar 1.

Sebanyak 27 sediaan *C. cayetanensis*, dianalisis untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi dan lama perendaman Carbol Fuchsin terhadap jumlah ookista terwarnai. Hasil analisis ditunjukkan pada Tabel 1.

Hasil terbaik diperoleh pada konsentrasi 1%, dengan rata-rata persentase ookista yang terwarnai sebesar  $47,86\% \pm 4,67\%$ . Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 0,3% ( $33,68\% \pm 4,34\%$ ) dan 4% ( $36,15\% \pm 5,20\%$ ). Uji statistik ANOVA dua arah menunjukkan bahwa konsentrasi Carbol Fuchsin memberikan pengaruh yang signifikan terhadap persentase ookista terwarnai ( $p < 0,001$ ).

Sementara itu, faktor lama perendaman Carbol Fuchsin tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap persentase ookista terwarnai. Rata-rata persentase ookista yang terwarnai pada lama perendaman 10, 15, dan 20 menit adalah  $39,85 \pm 9,14$ ;  $37,17 \pm 8,33$  dan  $40,68 \pm 6,04$  berturut-turut. Hasil uji ANOVA dua arah menunjukkan tidak terdapat pengaruh yang bermakna dari lama perendaman terhadap persentase ookista terwarnai ( $p = 0,234$ ). Analisis interaksi antara konsentrasi dan lama perendaman Carbol Fuchsin juga menunjukkan hasil yang tidak signifikan ( $p = 0,183$ ).



**Gambar 1. Hasil Pewarnaan Modifikasi Ziehl-Neelsen**  
(A) ookista *C. cayetanensis* terwarna, (B) ookista *C. cayetanensis* tidak terwarna, (C) ookista *Cryptosporidium* sp.; (1) kualitas latar belakang baik, (2) kualitas latar belakang kurang baik, (3) kualitas latar belakang tidak baik, dan (4) ookista *Cryptosporidium* sp. sebagai kontrol pewarnaan mZN

**Tabel 1. Pengaruh Konsentrasi dan Lama Perendaman Carbol Fuchsin Terhadap Persentase Ookista *C. cayetanensis* Terwarna**

| Variabel                                                 | Variasi  | Persentase Ookista<br><i>C. cayetanensis</i><br>Terwarna (% $\pm$ SD) | Jumlah<br>Sediaan | Total<br>Sediaan | Nilai p |
|----------------------------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|---------|
| Konsentrasi Carbol<br>Fuchsin                            | 0,3%     | 33,68 $\pm$ 4,34                                                      | 9                 | 27               | <0,001  |
|                                                          | 1%       | 47,86 $\pm$ 4,67                                                      | 9                 |                  |         |
|                                                          | 4%       | 36,15 $\pm$ 5,20                                                      | 9                 |                  |         |
| Lama perendaman                                          | 10 menit | 39,85 $\pm$ 9,14                                                      | 9                 | 27               | 0,234   |
|                                                          | 15 menit | 37,17 $\pm$ 8,33                                                      | 9                 |                  |         |
|                                                          | 20 menit | 40,68 $\pm$ 6,04                                                      | 9                 |                  |         |
| Interaksi konsentrasi dan lama perendaman Carbol Fuchsin |          |                                                                       |                   |                  | 0.183   |

**Tabel 2. Pengaruh Konsentrasi dan Lama Perendaman Carbol Fuchsin Terhadap Kualitas Latar Belakang Pewarnaan**

| Variabel Perlakuan Carbol Fuchsin | Variasi  | Kualitas Latar Belakang Pewarnaan |             |            | Jumlah Sediaan | Total Sediaan | Nilai p |
|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|-------------|------------|----------------|---------------|---------|
|                                   |          | Baik                              | Kurang Baik | Tidak Baik |                |               |         |
| Konsentrasi                       | 0,3%     | 7                                 | 2           | 0          | 9              | 27            | 0,004   |
|                                   | 1%       | 8                                 | 1           | 0          | 9              |               |         |
|                                   | 4%       | 0                                 | 5           | 4          | 9              |               |         |
| Lama perendaman                   | 10 menit | 6                                 | 0           | 3          | 9              | 27            | 0,128   |
|                                   | 15 menit | 6                                 | 2           | 1          | 9              |               |         |
|                                   | 20 menit | 3                                 | 6           | 0          | 9              |               |         |

Tabel 2 menunjukkan hasil penilaian kualitas latar belakang pewarnaan. Konsentrasi Carbol Fuchsin berpengaruh signifikan terhadap kualitas latar belakang pewarnaan ( $p = 0,004$ ). Pada konsentrasi 0,3%, sebagian besar sediaan menunjukkan kualitas latar belakang yang baik 7 sediaan dan 2 sediaan kurang baik. Sedangkan pada konsentrasi 1% kualitas latar belakang yang baik ditemukan pada 8 sediaan dan 1 sediaan kurang baik. Sebaliknya, pada konsentrasi 4% tidak ditemukan sediaan dengan kualitas latar belakang yang baik; 5 sediaan tergolong kurang baik dan 4 sediaan tergolong tidak baik.

Lama perendaman Carbol Fuchsin tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap kualitas latar belakang pewarnaan ( $p = 0,128$ ). Pada perendaman 10 menit ditemukan 6 sediaan

dengan kualitas baik dan 3 sediaan dengan kualitas tidak baik. Pada perendaman 15 menit ditemukan 6 sediaan dengan kualitas baik, 2 sediaan kurang baik, dan 1 sediaan tidak baik. Pada perendaman 20 menit ditemukan 3 sediaan dengan kualitas baik dan 6 sediaan dengan kualitas kurang baik.

Hasil kombinasi perlakuan ditunjukkan pada Tabel 3. Kombinasi konsentrasi Carbol Fuchsin 1% dan lama perendaman 10 menit menghasilkan rerata persentase ookista *C. cayetanensis* terwarnai tertinggi, yaitu  $48,67 \pm 7,77\%$ . Selain itu, seluruh sediaan pada kelompok tersebut menunjukkan kualitas latar belakang yang baik. Dengan mempertimbangkan kedua parameter tersebut, kombinasi Carbol Fuchsin 1% dan lama perendaman 10 menit merupakan kondisi yang paling optimal dalam penelitian ini.

**Tabel 3. Optimalisasi Konsentrasi dan Lama Perendaman Carbol Fuchsin Terhadap Hasil Pewarnaan Metode Ziehl-Neelsen**

| Konsentrasi Carbol Fuchsin | Lama Perendaman Carbol Fuchsin (Menit) | Jumlah Sediaan (n=27) | Persentase Ookista <i>C. cayetanensis</i> Terwarnai (% $\pm$ SD) | Jumlah Sediaan Kualitas Latar Belakang Baik |
|----------------------------|----------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 0,3%                       | 10                                     | 3                     | $31,16 \pm 1,64$                                                 | 3                                           |
|                            | 15                                     | 3                     | $31,08 \pm 3,45$                                                 | 3                                           |
|                            | 20                                     | 3                     | $38,80 \pm 1,45$                                                 | 1                                           |
| 1%                         | 10                                     | 3                     | $48,67 \pm 7,77$                                                 | 3                                           |
|                            | 15                                     | 3                     | $47,73 \pm 3,28$                                                 | 3                                           |
|                            | 20                                     | 3                     | $47,19 \pm 3,80$                                                 | 2                                           |
| 4%                         | 10                                     | 3                     | $39,73 \pm 6,39$                                                 | 0                                           |
|                            | 15                                     | 3                     | $32,69 \pm 1,41$                                                 | 0                                           |
|                            | 20                                     | 3                     | $36,03 \pm 5,31$                                                 | 0                                           |

## Diskusi

Penelitian ini menunjukkan bahwa keberhasilan pewarnaan modifikasi Ziehl-Neelsen lebih dipengaruhi oleh konsentrasi Carbol Fuchsin dibandingkan dengan lama perendaman. Konsentrasi Carbol Fuchsin berpengaruh signifikan terhadap persentase ookista *C. cayetanensis* terwarnai maupun kualitas latar belakang pewarnaan. Sebaliknya, lama perendaman serta

interaksi antara kedua faktor tersebut tidak menunjukkan pengaruh yang bermakna.

Temuan ini sejalan dengan penelitian Wahid et al<sup>12</sup> yang menunjukkan bahwa variasi konsentrasi Carbol Fuchsin memengaruhi hasil pewarnaan BTA. Namun, hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Setyowatiningsih<sup>13</sup> yang melaporkan bahwa lama perendaman Carbol Fuchsin berpengaruh terhadap kualitas pewarnaan sediaan BTA. Perbedaan ini dapat disebabkan karakteristik

dinding mikroorganisme yang berbeda. Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* memiliki kandungan lipid dan asam mikolat yang lebih kompleks dibandingkan dinding ookista *C. cayetanensis*, sehingga respons terhadap variasi waktu kontak pewarna juga berbeda.

Secara teoritis, Carbol Fuchsin bekerja dengan menembus struktur tahan asam dan berikatan dengan komponen lipid sehingga menghasilkan pewarnaan merah hingga merah tua.<sup>6</sup> Pada konsentrasi 1%, permeabilitas pewarna cukup ideal, konsentrasi 0,3% tidak banyak mewarnai mikroorganisme, dan konsentrasi 4% justru bisa menyebabkan over-staining dan latar belakang menjadi tidak baik sehingga mengganggu visualisasi. Penurunan kualitas pewarnaan pada konsentrasi 4% juga diduga berkaitan dengan proses dekolorisasi menggunakan alkohol asam. Pada kondisi ini, tingginya konsentrasi pewarna dapat menyebabkan peningkatan residu zat warna pada latar belakang sehingga mengganggu visualisasi ookista. Temuan tersebut sejalan dengan rekomendasi Garcia et al<sup>6</sup> dan Dubey et al<sup>8</sup> yang menyebutkan bahwa penggunaan Carbol Fuchsin dengan konsentrasi tinggi memerlukan penyesuaian proses dekolorisasi untuk mempertahankan kualitas hasil pewarnaan. Penurunan densitas ookista *Cryptosporidium sp.* yang terwarna juga terjadi pada kontrol pewarnaan dengan konsentrasi Carbol Fuchsin 4%.

Studi Ma et al<sup>18</sup> menunjukkan penggunaan Carbol Fuchsin 4% dalam metode Kinyoun menghasilkan 11,6% negatif palsu dan 2% positif palsu, konsentrasi terlalu tinggi dapat mengganggu interpretasi mikroskopis pada koksidia *C. cayetanensis* dan *Cytoisospora* dibandingkan dengan mikroskop UV fluoresen, kemampuan teknis mikroskopis dalam mengidentifikasi koksidia tidak terwarna maupun terwarna sangat berpengaruh pada hasil.

Penelitian *C. cayetanensis* sebelumnya belum ada yang membandingkan persentase ookista *C. cayetanensis* yang terwarna dengan metode mZN. Konsentrasi Carbol Fuchsin yang digunakan pada

penelitian seringkali tidak disebutkan secara eksplisit hanya berupa Carbol Fuchsin, basic Carbol Fuchsin, atau Carbol Fuchsin kuat. Variasi konsentrasi Carbol Fuchsin yang berbeda-beda digunakan dalam identifikasi koksidia.<sup>4,6,9,11,19</sup> Konsentrasi Carbol Fuchsin 1% optimal untuk identifikasi ookista *C. cayetanensis* dan kualitas pewarnaan latar belakang terbaik, sejalan dengan konsentrasi Carbol Fuchsin yang digunakan rutin pada pewarnaan bakteri tahan asam sesuai petunjuk teknis ZN pada Bakteri Tahan Asam Direktorat Jenderal P2P tahun 2022.<sup>16</sup>

Lama perendaman Carbol Fuchsin didapatkan tidak berpengaruh signifikan pada hasil pewarnaan modifikasi ZN dilihat dari persentase ookista *C. cayetanensis* yang terwarna dan kualitas pewarnaan latar belakang. Variasi lama perendaman Carbol Fuchsin dari 5 menit sampai dengan 60 menit.<sup>4,6,9,11,20</sup> Pada penelitian ini, lama perendaman yang optimal dengan waktu yang relatif lebih singkat dan kualitas hasil pewarnaan yang sama yaitu 10 menit.

Variasi konsentrasi dan lama perendaman yang optimal adalah konsentrasi Carbol Fuchsin 1% dan lama perendaman 10 menit. Hal ini sejalan dengan petunjuk teknis ZN pada Bakteri Tahan Asam Direktorat Jenderal P2P tahun 2022<sup>15</sup> dan penelitian Al-Ezzy et al<sup>11</sup> yang menunjukkan hasil terbaik pada identifikasi *Cryptosporidium sp.*

Keterbatasan penelitian ini adalah penggunaan satu sampel koleksi *C. cayetanensis* yang berasal dari sumber yang sama sehingga generalisasi hasil perlu dilakukan secara hati-hati. Selain itu, penelitian ini hanya mengevaluasi satu metode pewarnaan, yaitu mZN. Penelitian selanjutnya disarankan melibatkan tiga spesies koksidia dan sampel pasien langsung untuk mengetahui faktor lainnya yang berpengaruh pada hasil pewarnaan mZN.

## Kesimpulan

Kombinasi konsentrasi Carbol Fuchsin 1% dan lama perendaman 10 menit merupakan kondisi yang paling optimal untuk deteksi *C. cayetanensis*.

Pada kondisi tersebut diperoleh persentase ookista terwarnai tertinggi dengan kualitas latar belakang yang baik, sehingga mendukung identifikasi mikroskopis yang lebih jelas.

#### Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Laboratorium Departemen Parasitologi FKUI atas sampel, sarana dan prasarana dalam penelitian ini sehingga penelitian selesai dengan tepat waktu. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Prodi Teknologi Laboratorium Medis Program Sarjana Terapan, Politeknik Kesehatan Kemenkes Jakarta III atas dukungan akademik yang diberikan selama proses penyusunan naskah ini. Penulis juga menyampaikan apresiasi kepada para reviewer dan editor atas masukan serta saran konstruktif yang sangat membantu dalam penyempurnaan dan peningkatan kualitas artikel ini.

#### Kontribusi Penulis

YW dan DI merancang konsep dan metode penelitian. YW melakukan penelitian dan pengumpulan data. Ketiga penulis (YW, DI, IPS) secara kolaboratif melakukan analisis serta interpretasi hasil penelitian, penyusunan artikel, merevisi kritis dan menyetujui versi final yang akan dipublikasikan.

#### Pendanaan

Penelitian ini tidak menerima dukungan pendanaan dari sumber mana pun, baik dari lembaga pemerintah, swasta, maupun organisasi nirlaba.

#### Penyataan Etik

Kaji etik penelitian diperoleh dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Universitas Muhammadiyah Purwokerto dengan Nomor Registrasi: KEPK/UMP/11/III/2025 pada tanggal 2 Maret 2025.

#### Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

#### Deklarasi Penggunaan Kecerdasan Buatan

Isi naskah ini tidak menggunakan kecerdasan buatan dalam penyusunan, penyuntingan, maupun finalisasi. Seluruh isi naskah telah diperiksa, diverifikasi, dan disetujui oleh seluruh penulis, sehingga tanggung jawab penuh tetap berada pada penulis.

#### Daftar Pustaka

1. Mathison BA, Pritt BS. Cyclosporiasis: updates on clinical presentation, pathology, clinical diagnosis, and treatment. *Microorganisms*. 2021;9:1863. doi: 10.3390/microorganisms9091863
2. Almeria S, Chacin-Bonilla L, Maloney JG, Santin M. Cyclospora cayetanensis: a perspective (2020-2023) with emphasis on epidemiology and detection methods. *Microorganisms*. 2023;11:2171. doi: 10.3390/microorganisms11092171
3. Chacin-Bonilla L, Santin M. Cyclospora cayetanensis infection in developed countries: potential endemic foci? *Microorganisms*. 2023;11:540. doi: 10.3390/microorganisms11030540
4. Wulandari Y. Angka infeksi Cyclospora cayetanensis pada pasien yang diperiksa di Laboratorium Parasitologi Klinik FKUI [Karya Tulis Ilmiah]. Jakarta: Universitas MH Thamrin; 2018.
5. Li J, Cui Z, Qi M, Zhang L. Advances in cyclosporiasis diagnosis and therapeutic intervention. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:43. doi: 10.3389/fcimb.2020.00043
6. Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, Paltridge GP, Pillai DR, Procop GW, et al. Laboratory diagnosis of parasites from the gastrointestinal tract. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31:e00025-17. doi: 10.1128/CMR.00025-17
7. Almeria S, Cinar HN, Dubey JP. Cyclospora cayetanensis and cyclosporiasis: an update. *Microorganisms*. 2019;7:317. doi: 10.3390/microorganisms7090317
8. Dubey JP, Khan A, Rosenthal BM. Life cycle and transmission of Cyclospora cayetanensis: knowns and unknowns. *Microorganisms*. 2022;10:118. doi: 10.3390/microorganisms10010118
9. UK NEQAS. Modified Ziehl protocol [Internet]. 2019 [cited 26 Agustus 2024]. Available from: [https://www.ukneqasmicro.org.uk/parasitology/images/pdf/FaecalParasitology/DiagnosticTests/Modified\\_Ziehl.pdf](https://www.ukneqasmicro.org.uk/parasitology/images/pdf/FaecalParasitology/DiagnosticTests/Modified_Ziehl.pdf)
10. Cakir F, Bilden A, Bolacali M, Cicek M. A systematic review of the neglected parasite Cyclospora cayetanensis in Türkiye from 2004 to 2023. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2025;31:1-9. doi: 10.9775/kvfd.2024.32751
11. Al-Ezzy AIA, Khadim AT. Wet mount versus Ziehl-Neelsen stains for diagnosis of Cryptosporidium parvum in calves under one year. *Diyala J Vet Sci*. 2021;1:84-99.
12. Wahid AA, Kodariah L, Aeni SRN, Murtafi M, Yuana R. Pengaruh variasi karbol fuchsin 1% dan 0,3% terhadap hasil pemeriksaan BTA metode Ziehl-Neelsen di Puskesmas Cibeureum Hilir Kota Sukabumi. In: *Prosiding Rakernas VII AIPTLMI*; 2022. p.181-187.
13. Setyowatiningsih L. Pengaruh lama perendaman dengan carbol fuchsin terhadap kualitas pewarnaan sediaan BTA metode Ziehl-Neelsen pada penderita tuberkulosis paru [Skripsi]. Semarang; 2023.
14. Wahdini S, Salim R, Sari IP, Kurniawan A. Brief report: evaluation of Ziehl-Neelsen slide re-staining with 0.4% malachite green for the identification of Cyclospora cayetanensis oocysts. *eJKI*. 2025;13: 1-6. doi: 10.23886/ejki.13.1249.1
15. Centers for Disease Control and Prevention. Stool specimens: staining procedures [Internet]. Atlanta (GA): CDC; 2016 [cited 21 Feb 2025]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/staining.html>
16. Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit. Petunjuk teknis pemeriksaan mikroskopis tuberkulosis 2022 [Internet]. Jakarta: Kementerian

- Kesehatan RI; 2022 [cited 21 Feb 2025]. Available from: <https://tbindonesia.or.id/wp-content/uploads/2024/02/Final-Petunjuk-Teknis-Pemeriksaan-Mikroskopis-2022.pdf>
17. DPDx. Key points for laboratory diagnosis of *Cyclospora cayetanensis* [Internet]. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 2019 [cited 7 Oct 2024]. Available from: [https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/cyclospora\\_benchaid.pdf](https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/cyclospora_benchaid.pdf)
  18. Ma A, Mathison BA, Couturier MR. Shedding new light on *Cyclospora*: how the use of ultraviolet fluorescence microscopy can improve diagnosis of cyclosporiasis. *J Clin Microbiol.* 2025;63:e01084-24. doi: 10.1128/JCM.01084-24
  19. Shahatha SS, Alkubaisy SA, Mousa MO. An epidemiological and diagnostic study of *Cyclospora cayetanensis* parasite in Anbar Province, Iraq. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2021;904:012026. doi: 10.1088/1755-1315/904/1/012026
  20. World Health Organization. Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites. Geneva: World Health Organization; 2019.