Original Research

HEALTH INFORMATION : JURNAL PENELITIAN (HIJP)

Perbandingan Hasil Mikroskopis Basil Tahan Asam antara Pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 dan 10 Menit Berdasarkan Skala IUATLD

Comparison of Acid-Fast Bacilli Microscopic Readings Between Five- and Ten-Minute Carbol Fuchsin Standing Times Based on the IUATLD Scale

Victor Imanuel Glen[1*], Eni Kurniati[2], Ida Nurhayati[3], Ullya Rahmawati[4]

[1,2,3,4] Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Yogyakarta, Indonesia;
*Email korespondensi: victorimanglen@gmail.com

Kata kunci: Basil Tahan Asam, Carbol Fuchsin, Skala IUATLD, Tuberkulosis, Ziehl–Neelsen.

Keywords: *Acid-Fast Bacilli, Carbol Fuchsin, IUATLD Scale, Tuberculosis, Ziehl–Neelsen.*

Poltekkes Kemenkes Kendari, Indonesia
ISSN : 2085-0840
ISSN-e : 2622-5905
Periodicity: Bianual vol. 18 no. 3 2026
jurnaldanhakcipta@poltekkes-kdi.ac.id
Received : 09 Juni 2026
Accepted : 10 November 2026

Funding source: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
DOI : 10.36990/hijp.v18i3.1972
URL : https://myjurnal.poltekkes-kdi.ac.id/index.php/hijp
Contract number: -

Ringkasan: Latar belakang: Rekomendasi durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* pada pewarnaan Ziehl–Neelsen berbeda, yakni 5 menit pada petunjuk reagen dan minimal 10 menit pada pedoman nasional, sedangkan bukti mengenai kategori pembacaan IUATLD masih terbatas. **Tujuan:** Membandingkan hasil pembacaan mikroskopis BTA berdasarkan skala IUATLD antara pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 dan 10 menit. **Metode:** Eksperimen laboratorium rancangan *paired post-test only* menggunakan 16 spesimen sputum positif BTA, masing-masing dibuat dua sediaan. Pembacaan dilakukan tersamar oleh dua pemeriksa. Analisis memakai uji *Wilcoxon signed-rank eksak* dan kappa berbobot linear. **Hasil:** Sebanyak 13 spesimen (81,25%) berkategori sama, sedangkan 3 spesimen (18,75%) meningkat dari 1+ menjadi 2+. Perbedaan tidak bermakna (p = 0,250). Kappa berbobot linear 0,829 (IK 95% 0,57–1,00). **Simpulan:** Belum terdapat bukti perbedaan kategori pembacaan, tetapi kesetaraan kedua durasi belum terbukti. **Saran:** Diperlukan penelitian multilaboratorium dengan spesimen lebih banyak, mencakup kategori negatif dan scanty; durasi 5 menit belum direkomendasikan menggantikan 10 menit.

Abstract: Background: *Recommended carbol fuchsin standing times in Ziehl–Neelsen staining differ: reagent instructions specify 5 minutes, whereas national guidelines specify at least 10 minutes. Evidence on their effect on IUATLD reading categories remains limited.* ***Objective:*** *To compare acid-fast bacilli (AFB) microscopic readings, based on the IUATLD scale, between 5- and 10-minute carbol fuchsin standing times.* ***Methods:*** *This laboratory experiment used a paired post-test only design with 16 AFB-positive sputum specimens, each prepared as two smears. Two examiners performed blinded readings. Data were analyzed using the exact Wilcoxon signed-rank test and linear-weighted kappa.* ***Results:*** *Thirteen specimens (81.25%) showed the same category, while three (18.75%) increased from 1+ to 2+. The*

difference was not significant (p = 0.250). Linear-weighted kappa was 0.829 (95% CI 0.57–1.00). ***Conclusion:*** *No evidence of a difference in reading categories was found, but equivalence of the two durations has not been demonstrated.* ***Suggestion:*** *Multi-laboratory studies with larger samples, including negative and scanty categories, are needed. The 5-minute duration is not yet recommended as a replacement for 10 minutes.*

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) masih menjadi masalah kesehatan masyarakat global dan merupakan salah satu penyebab utama kematian akibat penyakit infeksi. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan bahwa terdapat 10,7 juta kasus TB dan sekitar 1,23 juta kematian akibat TB di seluruh dunia pada tahun 2024 (WHO, 2025a). Pada tahun yang sama, Indonesia menempati posisi kedua setelah India sebagai negara dengan estimasi jumlah kasus TB tertinggi di dunia, dengan kontribusi sekitar 10% terhadap total kasus TB global (WHO, 2025a). Besarnya beban TB tersebut menunjukkan pentingnya penguatan upaya diagnosis dan pemantauan kasus, termasuk melalui pemeriksaan laboratorium.

Pemeriksaan mikroskopis Basil Tahan Asam (BTA) merupakan salah satu metode yang digunakan dalam diagnosis TB, terutama untuk pemantauan respons pengobatan dan evaluasi konversi hasil pemeriksaan sputum. Metode ini relatif sederhana, ekonomis, dan dapat dilakukan di berbagai fasilitas pelayanan kesehatan. (Delgado *et al.,* 2022; Hänscheid *et al*., 2025; Singhal & Myneedu, 2015). Meskipun pemeriksaan Tes Cepat Molekuler (TCM) memiliki sensitivitas yang lebih tinggi, pemeriksaan mikroskopis BTA dengan pewarnaan Ziehl–Neelsen (ZN) masih digunakan secara luas karena aksesibilitas dan biayanya yang relatif rendah (Anwar *et al*., 2023; Giridharan *et al*., 2025; Karuniawati *et al*., 2023; Kemenkes, 2020; Koendhori, 2024; Tapia-Sequeiros *et al*., 2025). Hasil pemeriksaan mikroskopis BTA dapat dilaporkan secara semikuantitatif berdasarkan IUATLD (WHO, 2020, 2025b).

Carbol Fuchsin merupakan zat warna utama dalam metode pewarnaan ZN untuk mewarnai bakteri tahan asam. Pemanasan membantu zat warna menembus dinding sel bakteri yang kaya akan asam mikolat. Setelah sediaan dipanaskan hingga uap muncul, *Carbol Fuchsin* dipertahankan berkontak dengan sediaan selama waktu tertentu, kemudian dibiarkan mendingin. Rangkaian proses tersebut memungkinkan zat warna terperangkap di dalam dinding sel bakteri (Bayot *et al*., 2023). Selanjutnya, sifat tahan asam bakteri memungkinkan zat warna tetap bertahan meskipun sediaan dilunturkan menggunakan asam alkohol (Bayot *et al*., 2023; Hänscheid *et al*., 2025; Tille, 2017; Vilchèze & Kremer, 2017).

Dalam prosedur pewarnaan ZN, terdapat perbedaan rekomendasi durasi proses pewarnaan carbol fuchsin. Panduan pemeriksaan mikroskopis sputum dari Médecins Sans Frontières (MSF) menggunakan durasi 5 menit yang dihitung sejak uap mulai muncul (Médecins Sans Frontières, 2022). Petunjuk penggunaan reagen Ziehl-Neelsen IR dari PT Segara Husada Mandiri juga mencantumkan durasi 5 menit, yaitu pendiaman sediaan selama 5 menit setelah pemanasan hingga uap muncul (PT Segara Husada Mandiri, 2025). Sementara itu, Petunjuk Teknis Pemeriksaan Mikroskopis Tuberkulosis dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia merekomendasikan pendiaman sediaan selama minimal 10 menit setelah pemanasan hingga uap muncul (Kemenkes, 2022). Perbedaan rekomendasi tersebut berpotensi menyebabkan variasi prosedur pemeriksaan antar laboratorium dan memengaruhi

konsistensi hasil pewarnaan yang diperoleh (Paray et al., 2026). Oleh karena itu, perbandingan durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* selama 5 dan 10 menit perlu dilakukan untuk mengevaluasi pengaruhnya terhadap hasil pembacaan mikroskopis BTA.

Beberapa penelitian telah mengevaluasi faktor-faktor teknis yang memengaruhi kualitas pewarnaan ZN. Prakoeswa et al. (2022) menyatakan bahwa pewarnaan tahan asam tetap menjadi metode diagnostik yang relevan dan kualitas hasilnya dipengaruhi oleh ketepatan pelaksanaan prosedur pewarnaan. Penelitian yang dilakukan oleh Maulida et al. (2023) menunjukkan bahwa variasi waktu pendinginan *carbol fuchsin* dapat memengaruhi hasil pemeriksaan basil tahan asam. Selain itu, Maulida et al. (2024) melaporkan bahwa durasi pemanasan *carbol fuchsin* berpengaruh terhadap kualitas pewarnaan preparat BTA. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa tahapan teknis dalam proses pewarnaan dapat memengaruhi kualitas sediaan dan hasil pemeriksaan mikroskopis.

Meskipun beberapa penelitian telah mengevaluasi pengaruh variasi tahapan pewarnaan ZN, penelitian tersebut lebih banyak berfokus pada kualitas sediaan dan karakteristik pewarnaan. Sementara itu, informasi mengenai hasil pembacaan mikroskopis BTA berdasarkan skala IUATLD pada variasi durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* masih terbatas. Durasi pendiaman selama 5 dan 10 menit sama-sama digunakan dalam praktik laboratorium berdasarkan sumber acuan yang berbeda, yaitu petunjuk penggunaan reagen dan pedoman nasional pemeriksaan TB. Keterbatasan informasi tersebut menunjukkan perlunya bukti empiris untuk membandingkan hasil pembacaan mikroskopis BTA pada kedua durasi pendiaman tersebut. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan dalam standardisasi prosedur pemeriksaan dan pemantapan mutu laboratorium TB.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan membandingkan hasil pembacaan mikroskopis BTA antara durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* selama 5 menit dan 10 menit berdasarkan skala IUATLD. Hipotesis penelitian ini adalah terdapat perbedaan hasil pembacaan mikroskopis BTA berdasarkan skala IUATLD antara kedua durasi pendiaman tersebut. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai perbedaan hasil pembacaan mikroskopis BTA pada kedua durasi pendiaman serta menjadi bahan pertimbangan dalam evaluasi prosedur pemeriksaan mikroskopis BTA di laboratorium.

METODE

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan pendekatan kuantitatif dan rancangan *paired post-test only design*. Penelitian dilakukan untuk membandingkan hasil pembacaan mikroskopis BTA pada dua variasi durasi pendiaman *Carbol Fuchsin*, yaitu 5 menit dan 10 menit, menggunakan spesimen sputum yang sama. Setiap spesimen dibuat menjadi dua sediaan apus, yang masing-masing diberi perlakuan sesuai durasi pendiaman. Rancangan berpasangan ini digunakan untuk mengurangi pengaruh variasi biologis antarspesimen, sehingga perbedaan hasil pembacaan dapat dievaluasi berdasarkan dua perlakuan pada spesimen yang sama.

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Januari–Februari 2026 di Laboratorium Rumah Sakit Paru Respira Yogyakarta. Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Rumah Sakit Paru Respira Yogyakarta dengan nomor 03/KEPK/I/2026. Seluruh prosedur penelitian dilaksanakan sesuai dengan prinsip etik penelitian kesehatan.

Populasi dan Sampel

Populasi penelitian adalah seluruh spesimen sputum pasien yang menjalani pemeriksaan mikroskopis BTA atau TCM di Laboratorium Rumah Sakit Paru Respira Yogyakarta selama periode penelitian. Sebanyak 16 spesimen dipilih dengan *purposive sampling* berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Sebanyak 12 spesimen merupakan sisa pemeriksaan (5 sisa TCM dan 7 sisa mikroskopis BTA) yang disimpan pada suhu 2–8 °C. Dari 12 spesimen tersebut, 8 diperiksa pada hari yang sama, 2 setelah satu hari, dan 2 setelah dua hari penyimpanan. Empat spesimen lainnya berasal dari pengambilan sputum ulang pada pasien dengan hasil awal TCM atau BTA positif dan diperiksa pada hari pengambilan. Hasil awal TCM pada 5 spesimen adalah 3 MTB Detected High dan 2 MTB Detected Medium. Hasil awal mikroskopis BTA pada 11 spesimen adalah 1 spesimen 3+, 1 spesimen 2+, 7 spesimen 1+, dan 2 spesimen scanty.

Besar sampel dihitung dengan rumus Federer (1967), yaitu $(n-1)(k-1) \geq 15$. Dengan dua perlakuan (pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 dan 10 menit), diperoleh minimal 16 unit percobaan. Setiap spesimen dibuat menjadi dua sediaan apus, satu untuk tiap perlakuan, sehingga total 32 sediaan. Hasil pembacaan dianalisis secara berpasangan. Rumus Federer tidak memperhitungkan power statistik pada desain berpasangan, sehingga jumlah sampel yang terbatas dapat membatasi kemampuan mendeteksi perbedaan antarperlakuan.

Kriteria inklusi adalah sputum bervolume 3–5 mL, berkarakter mukopurulen, dari pasien dengan hasil awal TCM atau mikroskopis BTA positif, berupa sisa pemeriksaan TCM, sisa pemeriksaan BTA, atau hasil pengambilan ulang. Kriteria eksklusi adalah spesimen terkontaminasi darah atau makanan, menyerupai saliva, tidak valid, atau negatif pada pemeriksaan awal TCM maupun BTA. Seluruh spesimen tetap positif pada mikroskopis BTA di kedua perlakuan. Karena itu, penelitian ini belum dapat menilai kemampuan pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 menit dalam mendeteksi spesimen BTA negatif, atau risiko hasil negatif palsu, terutama pada kepadatan basil rendah. Spesimen scanty hanya dua, sehingga performa pendiaman 5 menit pada kepadatan basil rendah belum dapat dinilai secara memadai.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi spesimen sputum positif TB, larutan *Carbol Fuchsin* 1%, asam alkohol 3%, metilen biru 0,3%, minyak imersi, dan akuades. Alat yang digunakan meliputi kaca objek, rak pewarnaan, lampu spiritus, mikroskop cahaya, serta peralatan laboratorium penunjang lainnya.

Prosedur Penelitian

Spesimen sputum diambil dari bagian purulen tanpa homogenisasi. Setiap spesimen dibuat menjadi dua sediaan apus pada kaca objek terpisah. Apusan diratakan membentuk oval sekitar 2 × 3 cm, dikeringkan pada suhu ruang, lalu difiksasi. Kedua sediaan diwarnai dengan metode Ziehl–Neelsen dengan variasi durasi pendiaman *Carbol Fuchsin*. *Carbol Fuchsin* 1% diteteskan hingga menutupi seluruh permukaan sediaan, lalu dipanaskan hati-hati sampai keluar uap tanpa mendidih atau mengering. Setelah itu, larutan didiamkan selama 5 menit pada sediaan pertama (PT Segara Husada Mandiri, 2025) dan 10 menit pada sediaan kedua (Kemenkes, 2022), dengan waktu diukur menggunakan pengatur waktu. Sediaan kemudian dibilas dengan akuades, didekolorisasi dengan asam alkohol 3%, dan diwarnai tanding dengan metilen biru 0,3%. Tahapan lainnya mengikuti Petunjuk Teknis Pemeriksaan Mikroskopis Tuberkulosis Kementerian Kesehatan Republik Indonesia tahun 2022.

Sediaan diperiksa dengan mikroskop cahaya perbesaran 1.000× menggunakan minyak imersi. Pembacaan dilakukan secara blind oleh dua Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM) yang kompeten dalam mikroskopis TB, tanpa mengetahui kelompok perlakuan untuk meminimalkan bias. Hasil masing-masing pembaca dicatat terpisah. Jika terdapat perbedaan, hasil akhir ditetapkan melalui

consensus reading. Interpretasi menggunakan skala IUATLD (negatif, *scanty*, 1+, 2+, 3+) (Purba & Manihuruk, 2023; WHO, 2020, 2025b).

Penilaian Mutu Sediaan

Mutu pembuatan sediaan mikroskopis BTA dinilai berdasarkan enam komponen, yaitu ukuran, kerataan, ketebalan, pewarnaan, kebersihan, dan kualitas sputum, dengan mengacu pada Petunjuk Teknis Pemeriksaan Mikroskopis Tuberkulosis Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes, 2022). Setiap komponen dinilai menggunakan sistem skoring sesuai dengan definisi operasional dalam panduan tersebut. Skor setiap komponen dijumlahkan untuk memperoleh skor total dengan nilai maksimal 100. Skor total ≥80 dikategorikan sebagai mutu pembuatan sediaan yang baik.

Pengelolaan dan Analisis Data

Data hasil pemeriksaan mikroskopis BTA dicatat, dikodekan, dan ditabulasi menggunakan Microsoft Excel, lalu dianalisis dengan IBM SPSS Statistics versi 27.0. Analisis deskriptif digunakan untuk menggambarkan mutu sediaan berdasarkan kategori dan skor penilaian, serta distribusi kategori hasil pembacaan BTA berdasarkan skala IUATLD pada durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 menit dan 10 menit. Kesepakatan antar-pemeriksa dinilai dengan Cohen's kappa tanpa bobot pada 32 sediaan, berdasarkan hasil pembacaan awal Panelis 1 dan Panelis 2 sebelum consensus reading.

Perbedaan hasil pembacaan antara durasi pendiaman 5 menit dan 10 menit diuji dengan *Wilcoxon Signed-Rank* berpasangan pada 16 spesimen, berdasarkan hasil pembacaan akhir konsensus. *Sign test* eksak dilakukan sebagai analisis tambahan untuk menilai arah perubahan kategori hasil. Pengambilan keputusan statistik didasarkan pada nilai p eksak, dan hasil dinyatakan bermakna apabila $p < 0{,}05$. Kesepakatan hasil pembacaan antara kedua durasi dianalisis dengan Cohen's kappa berbobot (pembobotan linear) pada 16 spesimen berdasarkan kategori hasil pembacaan akhir. Interval kepercayaan 95% (95% CI) dihitung dengan metode *bootstrap* persentil sebanyak 1.000 sampel.

HASIL

Mutu Sediaan Mikroskopis BTA Berdasarkan Durasi Pendiaman Carbol Fuchsin

Tabel 1. Mutu Sediaan Mikroskopis BTA

Parameter	5 menit (n = 16)	10 menit (n = 16)
Mutu baik, n (%)	16 (100,00)	16 (100,00)
Mutu tidak baik, n (%)	0 (0,00)	0 (0,00)
Rerata skor	98,75	96,25
Rentang skor	90–100	90–100

Berdasarkan Tabel 1, seluruh sediaan pada durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 menit dan 10 menit termasuk dalam kategori mutu baik, masing-masing sebanyak 16 sediaan (100,00%). Tidak ditemukan sediaan dengan kategori mutu tidak baik pada kedua durasi pendiaman. Rerata skor mutu sediaan pada durasi 5 menit sebesar 98,75, sedangkan pada durasi 10 menit sebesar 96,25. Kedua kelompok memiliki rentang skor yang sama, yaitu 90–100. Berdasarkan perbandingan skor secara berpasangan, 2 pasangan sediaan memiliki skor lebih tinggi pada durasi 5 menit, 6 pasangan memiliki skor lebih tinggi pada durasi 10 menit, dan 8 pasangan memiliki skor yang sama. Dengan demikian, seluruh sediaan memenuhi kriteria mutu baik pada kedua durasi pendiaman, meskipun terdapat variasi skor mutu pada sebagian pasangan sediaan.

Kesepakatan Pembacaan Mikroskopis BTA Antar-Pemeriksa

Tabel 2. Kesepakatan Pembacaan Mikroskopis BTA Antar-Pemeriksa Berdasarkan Cohen's Kappa Tanpa Bobot

Parameter	Nilai
Cohen's kappa (κ)	0,955
Asymptotic standard error	0,045
Jumlah kasus valid	32

Hasil analisis kesepakatan pembacaan mikroskopis BTA antar-pemeriksa terhadap 32 hasil pembacaan awal menunjukkan nilai Cohen's kappa (κ) sebesar 0,955 dengan galat baku asimtotik sebesar 0,045 (Tabel 2). Nilai kappa tersebut menunjukkan tingkat kesepakatan yang sangat tinggi antara Panelis 1 dan Panelis 2 sebelum dilakukan diskusi konsensus. Hasil ini menggambarkan konsistensi pembacaan antar-pemeriksa pada sediaan yang dinilai.

Hasil Pembacaan Mikroskopis BTA pada Setiap Spesimen

Tabel 3. Hasil pembacaan BTA per spesimen

No.	Kode spesimen	Pembacaan awal	5 menit	10 menit
1	S-01	1+	1+	1+
2	S-02	*MTB Detected Medium*	1+	2+
3	S-03	*MTB Detected High*	3+	3+
4	S-04	1+	1+	1+
5	S-05	2+	2+	2+
6	S-06	1+	1+	1+
7	S-07	1+	1+	1+
8	S-08	1+	1+	1+
9	S-09	*MTB Detected High*	3+	3+
10	S-10	1+	1+	1+
11	S-11	1+	1+	2+
12	S-12	*MTB Detected High*	3+	3+
13	S-13	*Scanty*	*Scanty*	*Scanty*
14	S-14	*MTB Detected Medium*	1+	2+
15	S-15	3+	3+	3+
16	S-16	*Scanty*	*Scanty*	*Scanty*

Catatan: hasil pembacaan disajikan berdasarkan kategori BTA. Jumlah BTA per 100 lapang pandang tidak dicatat secara terpisah selama pemeriksaan sehingga tidak disajikan dalam tabel

Berdasarkan Tabel 3, sebanyak 13 spesimen menunjukkan kategori hasil pembacaan mikroskopis BTA yang sama pada durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 menit dan 10 menit. Sebaliknya, 3 spesimen, yaitu S-02, S-11, dan S-14, menunjukkan perubahan kategori dari 1+ pada durasi 5 menit menjadi 2+ pada durasi 10 menit. Perubahan kategori tersebut sejalan dengan distribusi hasil pembacaan pada Tabel 4, yaitu jumlah sediaan dengan kategori 1+ menurun dari 9 menjadi 6 sediaan, sedangkan jumlah sediaan dengan kategori 2+ meningkat dari 1 menjadi 4 sediaan. Adapun jumlah sediaan dengan kategori *scanty* dan 3+ tetap sama pada kedua durasi pendiaman.

Distribusi Kategori BTA Berdasarkan Durasi Pendiaman Carbol Fuchsin

Tabel 4. Distribusi Kategori Hasil Pembacaan Mikroskopis BTA Berdasarkan Durasi Pendiaman Carbol Fuchsin

Durasi	*Scanty n* (%)	1+ n (%)	2+ n (%)	3+ n (%)	Total n (%)
5 menit	2 (12,50)	9 (56,25)	1 (6,25)	4 (25,00)	16 (100,00)
10 menit	2 (12,50)	6 (37,50)	4 (25,00)	4 (25,00)	16 (100,00)

Berdasarkan Tabel 4, pada durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 menit, kategori 1+ merupakan kategori yang paling banyak ditemukan, yaitu sebanyak 9 sediaan (56,25%), diikuti kategori 3+ sebanyak 4 sediaan (25,00%), kategori *scanty* sebanyak 2 sediaan (12,50%), dan kategori 2+ sebanyak 1 sediaan (6,25%). Pada durasi pendiaman 10 menit, kategori 1+ ditemukan pada 6 sediaan (37,50%), kategori 2+ pada 4 sediaan (25,00%), kategori 3+ pada 4 sediaan (25,00%), dan kategori *scanty* pada 2 sediaan (12,50%). Dibandingkan dengan durasi pendiaman 5 menit, jumlah sediaan pada kategori 1+ pada durasi 10 menit berkurang sebanyak 3 sediaan, sedangkan kategori 2+ bertambah sebanyak 3 sediaan. Sementara itu, jumlah sediaan pada kategori *scanty* dan 3+ tetap sama pada kedua durasi pendiaman.

Tabulasi Silang dan Perubahan Kategori Hasil Pembacaan BTA

Tabel 5. Tabulasi Silang Hasil Pembacaan Mikroskopis BTA Berdasarkan Skala IUATLD pada Durasi Pendiaman Carbol Fuchsin 5 dan 10 Menit (n = 16)

Durasi 5 Menit	Durasi 10 Menit				Total
	Scanty	1+	2+	3+	
Scanty	2	0	0	0	2
1+	0	6	3	0	9
2+	0	0	1	0	1
3+	0	0	0	4	4
Total	**2**	**6**	**4**	**4**	**16**

Berdasarkan Tabel 5, sebanyak 13 dari 16 sediaan (81,25%) menunjukkan kategori hasil pembacaan mikroskopis BTA yang sama pada durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 menit dan 10 menit, sebagaimana tampak pada sel diagonal. Sementara itu, 3 sediaan (18,75%) pada sel di luar diagonal mengalami perubahan kategori dari 1+ pada durasi 5 menit menjadi 2+ pada durasi 10 menit. Seluruh perubahan tersebut berupa peningkatan satu tingkat kategori pada durasi 10 menit, dan tidak ditemukan sediaan yang mengalami penurunan kategori hasil pembacaan.

Arah Perubahan dan Perbedaan Hasil Pembacaan BTA Antar-Durasi

Tabel 6. Arah Perubahan Hasil Pembacaan dari Durasi 5 Menit ke 10 Menit (N = 16)

Arah perubahan	n	%
Menurun (negative ranks)	0	0,00
Meningkat (positive ranks), seluruhnya dari 1+ menjadi 2+	3	18,75
Tetap (ties)	13	81,25
Total	16	100,00

Berdasarkan Tabel 6, sebanyak 13 dari 16 spesimen (81,25%) menunjukkan kategori hasil pembacaan mikroskopis BTA yang tetap pada kedua durasi pendiaman *Carbol Fuchsin*. Sebanyak 3

spesimen (18,75%) mengalami perubahan kategori dari 1+ pada durasi 5 menit menjadi 2+ pada durasi 10 menit. Tidak ditemukan spesimen yang mengalami penurunan kategori hasil pembacaan.

Tabel 7. Hasil Uji Wilcoxon Signed-Rank dan Uji Tanda (Sign Test)

Uji	Statistik	Nilai p (2-sisi)
Wilcoxon Signed-Rank, aproksimasi normal	Z = −1,732	0,083
Wilcoxon Signed-Rank, exact	Jumlah peringkat positif = 6,00	0,250
Uji Tanda, exact (distribusi binomial)	3 selisih positif, 0 negatif	0,250

Dari 16 pasangan sediaan, 13 pasangan memiliki kategori hasil pembacaan yang sama (*ties*) sehingga tidak diikutsertakan dalam perhitungan uji. Analisis dilakukan terhadap 3 pasangan yang mengalami perubahan kategori, seluruhnya berupa peningkatan dari 1+ menjadi 2+. Pada uji Wilcoxon Signed-Rank, jumlah peringkat positif adalah 6,00 dengan rerata peringkat positif 2,00. Uji Wilcoxon Signed-Rank eksak dan uji tanda eksak menghasilkan nilai p dua sisi yang sama, yaitu 0,250 (Tabel 7). Nilai ini lebih besar daripada tingkat signifikansi 0,05, sehingga tidak terdapat bukti statistik yang cukup untuk menyatakan adanya perbedaan kategori hasil pembacaan mikroskopis BTA antara durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 menit dan 10 menit. Namun, hasil ini tidak dapat diartikan sebagai bukti bahwa kedua durasi pendiaman setara, mengingat jumlah pasangan yang dianalisis sangat sedikit sehingga kekuatan uji terbatas.

Kesesuaian Hasil Pembacaan BTA Antar-Durasi Pendiaman Carbol Fuchsin

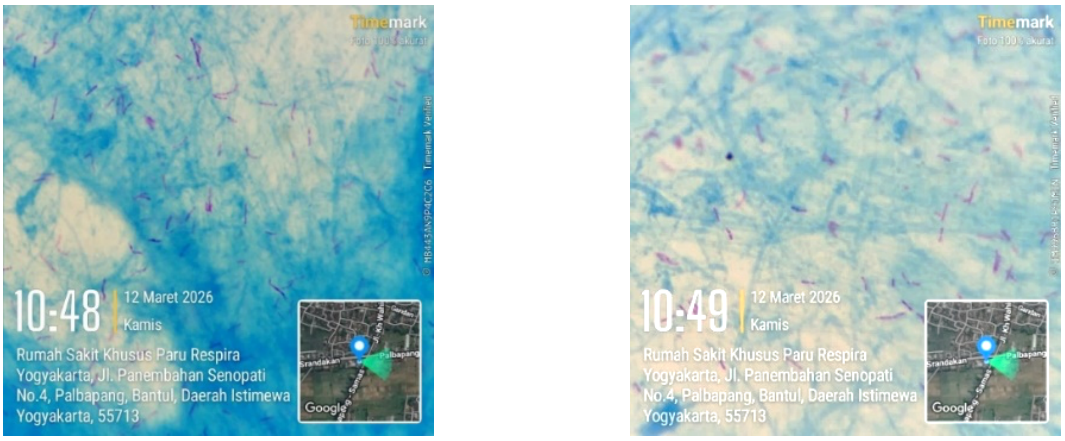
Tabel 8. Hasil Analisis Cohen's Kappa dengan Bootstrap 1.000 Sampel

Parameter	Kappa berbobot linear (utama)	Kappa tanpa bobot (pembanding)
Cohen's Kappa (κ)	0,829	0,730
Bias bootstrap	≈ −0,014	−0,021
Galat baku (standard error) bootstrap	≈ 0,105	0,142
95% CI (bootstrap persentil)	≈ 0,57–1,00	0,429–1,000
Kesepakatan teramati	13/16 (81,25%)	13/16 (81,25%)

Catatan: Kappa tanpa bobot dan IK 95% berasal dari keluaran SPSS. Kappa berbobot linear dan IK 95% dihitung dari tabel silang yang sama menggunakan bootstrap persentil (1.000 sampel) di luar SPSS. Batas bawah IK kappa berbobot dapat bervariasi sekitar 0,01 antar-pengulangan bootstrap. Nilai p tidak dicantumkan.

Berdasarkan Tabel 8, kesepakatan teramati antara pembacaan pada pendiaman 5 menit dan 10 menit sebesar 81,25% (13 dari 16 spesimen). Cohen's kappa tanpa bobot menghasilkan κ = 0,730 (bias bootstrap −0,021; galat baku bootstrap 0,142; IK 95% 0,429–1,000). Cohen's kappa berbobot linear menghasilkan κ yang lebih tinggi, yaitu 0,829 (bias bootstrap −0,014; galat baku bootstrap 0,105; IK 95% sekitar 0,57–1,00). Nilai yang lebih tinggi ini menunjukkan bahwa analisis berbobot memperhitungkan kedekatan antarkategori pada skala ordinal hasil pembacaan BTA, sehingga ketidaksesuaian satu tingkat dibedakan dari ketidaksesuaian yang lebih besar.

Gambar mikroskopis BTA



(A) Sediaan dengan durasi pendiaman 5 menit **(B)** sediaan dengan durasi pendiaman 10 menit

Tabel 8. Gambaran Mikroskopis BTA pada Durasi Pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 dan 10 Menit

Gambar 1 memperlihatkan gambaran mikroskopis BTA pada sediaan sputum yang diwarnai menggunakan metode ZN dengan durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 menit (A) dan 10 menit (B). Pada kedua citra, BTA tampak berbentuk batang berwarna merah dengan latar belakang biru setelah pewarnaan tanding metilen biru. Kedua sediaan menunjukkan kategori BTA 3+ pada pembesaran 1.000× menggunakan minyak imersi. Secara morfologis, BTA dapat tampak sebagai batang lurus atau sedikit melengkung pada pemeriksaan dengan pewarnaan ZN (Widiyanto *et al.*, 2021). Gambar ini disajikan sebagai ilustrasi morfologi BTA pada kedua durasi pendiaman. Perbandingan hasil pembacaan mikroskopis antar-durasi didasarkan pada data seluruh sediaan dan analisis statistik. Gambar disajikan sebagai ilustrasi. Skala bar tidak dicantumkan karena ukuran citra tidak dikalibrasi.

PEMBAHASAN

Belum ada bukti statistik yang cukup untuk menyatakan adanya perbedaan kategori hasil pembacaan mikroskopis BTA antara durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 menit dan 10 menit (uji Wilcoxon signed-rank eksak dua sisi, p = 0,250). Sebanyak 13 dari 16 spesimen (81,25%) menunjukkan kategori yang sama, sedangkan 3 spesimen (18,75%) berubah dari 1+ pada 5 menit menjadi 2+ pada 10 menit. Seluruh perubahan itu mengarah pada peningkatan kepositifan BTA. Hasil ini tidak dapat ditafsirkan sebagai bukti kesetaraan kedua durasi, maupun sebagai dasar untuk menyatakan bahwa durasi 5 menit dapat menggantikan 10 menit. Kesesuaian kategori pada skala ordinal IUATLD menunjukkan Cohen's kappa berbobot linear sebesar 0,829 (IK 95%: 0,57–1,00) dan kappa tanpa bobot sebesar 0,730 (IK 95%: 0,429–1,000). Kappa berbobot linear membedakan ketidaksesuaian satu tingkat (misalnya 1+ menjadi 2+) dari ketidaksesuaian dengan jarak kategori lebih besar. Nilai kappa menunjukkan kesesuaian yang relatif tinggi, tetapi interval kepercayaan yang lebar menandakan estimasi yang masih tidak pasti akibat jumlah spesimen yang terbatas. Dengan demikian, kappa mendukung adanya kesesuaian pada sebagian besar spesimen, tetapi belum dapat dijadikan bukti kesetaraan kedua durasi pendiaman.

Secara teoretis, hasil penelitian ini dapat dijelaskan melalui mekanisme pewarnaan ZN yang melibatkan interaksi *Carbol Fuchsin* dengan dinding sel mikobakteri. Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*

tersusun atas peptidoglikan, arabinogalaktan, dan asam mikolat yang membentuk struktur kompleks dengan kandungan lipid tinggi (Bayot *et al*., 2023; Tille, 2017). Pada metode ZN, pemanasan membantu penetrasi *Carbol Fuchsin* ke dalam dinding sel mikobakteri sehingga basil dapat terwarnai (Putri *et al*., 2025). Dalam penelitian ini, setelah pemanasan hingga muncul uap, *Carbol Fuchsin* didiamkan selama 5 atau 10 menit sesuai kelompok perlakuan. Selanjutnya, proses dekolorisasi menggunakan asam-alkohol menguji kemampuan basil mempertahankan zat warna utama. Basil yang memiliki sifat tahan asam akan mempertahankan *Carbol Fuchsin* setelah dekolorisasi dan tampak merah setelah pemberian zat warna tanding. Kandungan lipid pada dinding sel mikobakteri berperan dalam sifat tahan asam tersebut (Prakoeswa *et al*., 2022; Vilchèze & Kremer, 2017, Paray *et al*, 2026).

Mekanisme pewarnaan ZN tersebut memberikan dasar teoretis untuk memahami proses pewarnaan BTA. Namun, penelitian ini tidak mengukur penetrasi, intensitas, maupun retensi *Carbol Fuchsin* secara langsung. Pengamatan terbatas pada kategori hasil pembacaan mikroskopis BTA berdasarkan skala IUATLD. Oleh karena itu, mekanisme tersebut belum dapat dipastikan sebagai penyebab kesamaan kategori pada 13 spesimen maupun perubahan kategori dari 1+ menjadi 2+ pada 3 spesimen. Perubahan kategori tersebut perlu ditafsirkan berdasarkan hasil penelitian dan keterbatasan prosedur yang digunakan.

Selain karakteristik dinding sel mikobakteri, keberhasilan pewarnaan ZN juga dipengaruhi oleh faktor teknis, seperti kualitas sediaan, ketebalan apusan, kecukupan pemanasan, kualitas reagen, dan ketepatan proses dekolorisasi (Cheesbrough, 2010; Hussey & Zayaitz, 2013). Pada penelitian ini, seluruh 32 sediaan, yang terdiri atas 16 sediaan pada setiap durasi pendiaman Carbol Fuchsin, termasuk dalam kategori mutu baik dengan skor 90–100. Rerata skor mutu sediaan pada durasi pendiaman 5 menit sebesar 98,75, sedangkan pada durasi 10 menit sebesar 96,25. Meskipun seluruh sediaan berada dalam kategori mutu yang sama, perbandingan skor secara berpasangan menunjukkan adanya variasi skor pada sebagian pasangan sediaan. Temuan ini menunjukkan bahwa kategori mutu yang sama tidak selalu disertai skor penilaian yang identik. Mutu sediaan yang baik mendukung kelayakan sediaan untuk pemeriksaan mikroskopis, tetapi tidak dengan sendirinya menjamin kesamaan kategori hasil pembacaan BTA pada kedua durasi pendiaman. Penelitian ini juga tidak menganalisis hubungan antara skor mutu sediaan dan perubahan kategori hasil pembacaan sehingga variasi skor tersebut belum dapat menjelaskan perubahan kategori dari 1+ menjadi 2+ pada 3 spesimen.

Penelitian Maulida *et al*. (2023) mengevaluasi variasi waktu pendinginan *Carbol Fuchsin* setelah pemanasan, yaitu selama 6–12 menit, dengan parameter penilaian berupa mutu sediaan berdasarkan enam kriteria. Tahap tersebut berkaitan dengan penelitian ini karena sama-sama membahas perlakuan terhadap *Carbol Fuchsin* setelah pemanasan. Namun, terdapat perbedaan pada variabel dan parameter hasil yang dinilai. Maulida *et al*. (2023) menilai mutu sediaan, sedangkan penelitian ini membandingkan durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* selama 5 dan 10 menit terhadap kategori hasil pembacaan mikroskopis BTA berdasarkan skala IUATLD. Dengan demikian, hasil kedua penelitian tidak dapat dibandingkan secara langsung sebagai bukti pengaruh durasi terhadap kategori pembacaan BTA. Sementara itu, Maulida *et al*. (2024) mengkaji variasi lama pemanasan Carbol Fuchsin, sehingga penelitian tersebut menjadi rujukan mengenai tahap pemanasan, bukan tahap pendiaman yang menjadi fokus penelitian ini.

Perbandingan protokol pewarnaan juga dilaporkan oleh Deun *et al*. (2005) yang mengevaluasi beberapa variasi pewarnaan Carbol Fuchsin, termasuk metode Ziehl–Neelsen (ZN) panas dan metode Kinyoun dingin. Studi tersebut melaporkan bahwa sensitivitas metode Kinyoun dingin lebih rendah dibandingkan metode ZN panas menggunakan *Carbol Fuchsin* 1% selama 5 menit. Selain itu, metode ZN rutin menggunakan *Carbol Fuchsin* 1% selama 15 menit mendeteksi lebih banyak hasil positif

dibandingkan teknik yang dievaluasi. Temuan tersebut menunjukkan bahwa variasi protokol pewarnaan dapat berkaitan dengan kemampuan deteksi BTA. Namun, Deun *et al.* (2005) merupakan pembanding protokol pewarnaan, bukan pembanding langsung durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* setelah pemanasan. Studi tersebut mengevaluasi variasi metode dan sensitivitas deteksi, sedangkan penelitian ini membandingkan kategori hasil pembacaan mikroskopis pada dua durasi pendiaman, yaitu 5 dan 10 menit, setelah pemanasan. Dalam penelitian ini, 3 spesimen mengalami perubahan kategori dari 1+ menjadi 2+, tetapi seluruh spesimen tetap diklasifikasikan sebagai positif BTA. Dengan demikian, penelitian ini memberikan informasi awal mengenai variasi kategori pembacaan pada tahap pendiaman, tetapi belum dapat menjelaskan apakah durasi pendiaman memengaruhi kemampuan pemeriksaan dalam membedakan spesimen negatif, *scanty*, dan positif.

Perbedaan kategori hasil pembacaan mikroskopis BTA dapat berkaitan dengan distribusi basil yang tidak merata dalam sputum maupun pada sediaan. Kondisi tersebut memungkinkan jumlah basil yang teramati berbeda antar lapang pandang, terutama apabila kepadatan basil berada di sekitar batas antarkategori skala IUATLD (Aulia *et al.*, 2024). Dalam penelitian ini, sputum diambil dari bagian purulen tanpa melalui homogenisasi terlebih dahulu, kemudian dibuat menjadi dua sediaan secara terpisah untuk masing-masing durasi pendiaman Carbol Fuchsin. Prosedur tersebut memungkinkan adanya variasi distribusi basil di antara kedua sediaan. Namun, penelitian ini tidak mengukur distribusi basil secara langsung maupun menganalisis hubungannya dengan perubahan kategori pembacaan. Oleh karena itu, distribusi basil yang tidak merata merupakan salah satu kemungkinan yang perlu dipertimbangkan, tetapi belum dapat dipastikan sebagai penyebab perubahan kategori dari 1+ menjadi 2+ pada 3 spesimen.

Pembacaan mikroskopis BTA bersifat visual sehingga variasi antar-pembaca tetap mungkin terjadi, terutama saat jumlah basil mendekati batas antarkategori. Untuk meminimalkan bias, pembacaan dilakukan secara *blind* oleh dua Ahli Teknologi Laboratorium Medis (ATLM) yang tidak mengetahui kelompok perlakuan. Perbedaan hasil pada pembacaan awal diselesaikan melalui *consensus reading*, yang diperlukan pada satu dari 16 spesimen. Kesepakatan antar-pembaca dari 32 hasil pembacaan awal sangat tinggi (Cohen's kappa = 0,955). Namun, kesepakatan ini tidak menghilangkan kemungkinan variasi akibat distribusi basil yang tidak merata pada sediaan atau perbedaan karakteristik lapang pandang. Karena itu, pemantapan mutu internal dan eksternal tetap diperlukan untuk menjaga konsistensi hasil antar-pemeriksa dan antar-laboratorium (Kemenkes, 2015; Mentula *et al.*, 2022; Mugusi *et al.,* 2025; Weldemhret *et al.*, 2020)

Secara praktis, pendiaman *Carbol Fuchsin* selama 5 menit berpotensi mempersingkat tahap pewarnaan dibandingkan 10 menit. Pada kedua durasi, seluruh spesimen tetap positif BTA. Tiga spesimen berpindah kategori dari 1+ menjadi 2+. Ini menunjukkan variasi kuantifikasi pembacaan mikroskopis yang tetap perlu dicatat. Namun, pergeseran antara 1+ dan 2+ tidak mengubah status positif, sehingga tidak serta-merta mengubah keputusan diagnosis atau pengobatan. Perpindahan antara kategori negatif, scanty, dan positif berpotensi lebih bermakna secara interpretatif. Penelitian ini belum dapat menilai kemampuan kedua durasi dalam membedakan ketiga kategori tersebut, karena seluruh spesimen positif BTA dan hanya dua spesimen berkategori scanty. Karena itu, hasil belum cukup untuk menyatakan durasi 5 menit setara atau dapat menggantikan 10 menit. Penggunaannya sebagai prosedur alternatif memerlukan penelitian lanjutan dengan jumlah spesimen lebih besar yang mencakup kategori negatif, scanty, dan positif.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Sampelnya kecil (16 spesimen) dan seluruhnya positif BTA, sehingga kesesuaian kedua durasi pendiaman pada spesimen negatif belum dapat digambarkan. Hanya satu apusan dibuat untuk setiap kondisi pendiaman, dan sputum purulen diambil

tanpa homogenisasi. Hal ini berpotensi membuat distribusi basil tidak merata antar-apusan, sehingga perbedaan hasil tidak sepenuhnya dapat dikaitkan dengan durasi pendiaman Carbol Fuchsin. Spesimen yang berasal dari sumber dan kondisi penyimpanan beragam juga dapat menambah variasi hasil. Pembacaan dilakukan secara independen dan tersamar oleh dua ATLM. Kesepakatan awal antar-pembaca sangat tinggi (Cohen's kappa 0,955), dengan 1 dari 16 spesimen diselesaikan melalui konsensus. Namun, variasi interpretasi mikroskopis tetap mungkin terjadi. Karena hanya ada 3 pasangan hasil yang berbeda, uji Wilcoxon signed-rank menggunakan nilai p eksak dua sisi (p = 0,250), yang lebih andal daripada aproksimasi normal pada jumlah pasangan berbeda yang sangat sedikit. Terakhir, penelitian ini hanya mengevaluasi hasil mikroskopis tanpa pembanding kultur atau pemeriksaan molekuler, sehingga perubahan kategori hasil belum dapat dikonfirmasi dengan metode rujukan.

Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan bahwa kategori pembacaan mikroskopis BTA pada 13 dari 16 spesimen (81,25%) tidak mengalami perubahan antara durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* 5 dan 10 menit. Perubahan kategori ditemukan pada 3 spesimen, seluruhnya dari 1+ menjadi 2+, tetapi tidak mengubah status hasil pemeriksaan yang tetap positif BTA. Meskipun demikian, hasil uji statistik belum menunjukkan perbedaan yang bermakna, dan temuan ini belum cukup untuk menyatakan bahwa kedua durasi pendiaman setara. Dengan demikian, penggunaan durasi pendiaman 5 menit memberikan informasi awal mengenai kemungkinan mempersingkat tahap pewarnaan, tetapi penerapannya sebagai alternatif prosedur masih memerlukan konfirmasi melalui penelitian dengan jumlah spesimen lebih besar dan karakteristik kategori BTA yang lebih beragam.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ditemukan perbedaan yang bermakna secara statistik pada hasil pembacaan mikroskopis BTA berdasarkan skala IUATLD antara durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* selama 5 dan 10 menit (p = 0,250). Sebanyak 13 spesimen (81,25%) menunjukkan kategori pembacaan yang sama pada kedua durasi pendiaman, sedangkan 3 spesimen (18,75%) mengalami perubahan kategori dari 1+ menjadi 2+. Seluruh spesimen tetap menunjukkan hasil BTA positif. Hasil ini belum membuktikan bahwa kedua durasi menghasilkan pembacaan yang setara atau bahwa durasi 5 menit dapat menggantikan durasi 10 menit.

Penelitian selanjutnya disarankan melibatkan jumlah spesimen yang lebih besar dan beberapa laboratorium, serta mencakup spesimen dengan kategori BTA negatif, *scanty*, dan positif agar kesesuaian hasil pembacaan pada berbagai kategori dapat dievaluasi. Evaluasi juga perlu mencakup konsistensi pembacaan antar-pemeriksa, kualitas pewarnaan, kesesuaian hasil dengan metode kultur atau molekuler, serta efisiensi alur kerja dan biaya. Homogenisasi sputum sebelum pembuatan apusan dan pembuatan apusan ulangan pada setiap kondisi pendiaman perlu dipertimbangkan untuk mengurangi variasi distribusi basil antar-apusan.

REKOMENDASI

Berdasarkan hasil penelitian ini, durasi pendiaman *Carbol Fuchsin* selama 5 menit belum dapat direkomendasikan sebagai pengganti durasi 10 menit dalam prosedur pewarnaan ZN. Laboratorium disarankan tetap mengikuti prosedur yang berlaku hingga tersedia bukti penelitian yang lebih memada.

PERNYATAAN

Ucapan Terimakasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Rumah Sakit Paru Respira Yogyakarta atas izin dan dukungan selama pelaksanaan penelitian. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Sumber Daya Manusia Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia melalui Program Tugas Belajar SDM Kesehatan atas dukungan pendanaan penelitian. Selain itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh Ahli Teknologi Laboratorium Medik dan staf Laboratorium yang telah membantu pelaksanaan penelitian.

Pendanaan

Penelitian ini didukung oleh Program Bantuan Pendanaan Pendidikan Tugas Belajar Sumber Daya Manusia Kesehatan (SDMK) Kementerian Kesehatan Republik Indonesia melalui komponen Bantuan Penunjang/Penelitian.

Kontribusi Setiap Penulis

VIG: berkontribusi dalam pelaksanaan penelitian, pengumpulan dan analisis data, serta penyusunan naskah. **EK:** berkontribusi dalam supervisi penelitian, pengembangan metodologi, dan telaah naskah. **IN:** berkontribusi dalam metodologi penelitian, analisis statistik, dan telaah naskah. **UR:** berkontribusi dalam telaah ilmiah dan revisi naskah. Seluruh penulis telah membaca dan menyetujui naskah akhir.

Pernyataan Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan yang berkaitan dengan penelitian maupun publikasi artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

Anwar, A. Y., Handayani, M. T. P., Nurdin, E., Hi.Lewa, I. B., & Artati. (2023). Comparison of Tuberculosis Examination Using Ziehl-Neelsen Method and Molecular Rapid Test. *Jurnal Kesehatan Manarang*, *9*(3), 215–221. https://doi.org/10.33490/jkm.v9i3.848

Aulia, S., Suksmono, A. B., Mengko, T. R., & Alisjahbana, B. (2024). A Novel Digitized Microscopic Images of ZN-Stained Sputum Smear and Its Classification Based on IUATLD Grades. *IEEE Access*, *12*, 51364–51380. https://doi.org/10.1109/ACCESS.2024.3386208

Bayot, M. L., Mirza, T. M., & Sharma, S. (2023). Acid Fast Bacteria. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537121/

Cheesbrough, M. (2010). *District Laboratory Practice in Tropical Countries Part 1* (2nd ed.). Cambridge

University Press. https://doi.org/10.1017/CBO9780511581304

Delgado, L. G., Postigo, M., Cuadrado, D., Gil-Casanova, S., Martínez Martínez, Á., Linares, M., Merino, P., Gimo, M., Blanco, S., Bassat, Q., Santos, A., García-Basteiro, A. L., Ledesma-Carbayo, M. J., & Luengo-Oroz, M. A. (2022). Remote analysis of sputum smears for Mycobacterium tuberculosis quantification using digital crowdsourcing. *PLoS ONE*, *17*(5 May), 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268494

Deun, A. V., *et al.* (2005). Performance of variations of carbolfuchsin staining of sputum smears for AFB under field conditions. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 9(2), 143–149.

Giridharan, P., Inbaraj, L. R., Frederick, A., Selvaraju, S., Ramraj, B., Thiruvengadam, K., Daniel, B. D., & Padmapriyadarsini, C. (2025). Diagnostic accuracy of screening and diagnostic tests used in a state-wide tuberculosis prevalence survey in India. *Scientific Reports*, *15*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-025-94346-x

Hänscheid, Thomas; Mahomed, Sara; Oliveira, Laila; Pereira, Danielle Segóvia; Grobusch, M. P. (2025). Fluorescent acid-fast stains for diagnosing mycobacteria and beyond: back to the future? *The Lancet Microbe*, *6*(12), 101233. https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2025.101233

Hussey, M. A., & Zayaitz, A. (2013). Acid-Fast Stain Protocols. *American Society For Microbiology Microbe Library*, *September 2008*, 1–12. http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2870-acid-fast-stain-protocols

Karuniawati, A., Burhan, E., Koendhori, E. B., Sari, D., Haryanto, B., Nuryastuti, T., Gayatri, A. A. A. Y., Bahrun, U., Kusumawati, R. L., Sugiyono, R. I., Susanto, N. H., Diana, A., Kosasih, H., Naysilla, A. M., Lokida, D., Neal, A., Siddiqui, S., Lau, C.-Y., & Karyana, M. (2023). Performance of Xpert MTB/RIF and sputum microscopy compared to sputum culture for diagnosis of tuberculosis in seven hospitals in Indonesia. *Frontiers in Medicine*, *9*(January), 1–10. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.909198

Kemenkes. (2020). Strategi Nasional Penanggulangan Tuberkulosis di Indonesia 2020-2024. *Pertemuan Konsolidasi Nasional Penyusunan STRANAS TB*, 135.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2015). Pedoman Jejaring dan Pemantapan Mutu Laboratorium Tuberkulosis. In *Rencana Strategis Kementerian Kesehatan Tahun*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2021). Strategi Nasional Penanggulangan Tuberkulosis 2020–2024. *Kementerian Kesehatan RI*.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2022). *Petunjuk Teknis Pemeriksaan Mikroskopis Tuberkulosis*. https://tbindonesia.or.id/wp-content/uploads/2024/02/Final-Petunjuk-Teknis-Pemeriksaan-Mikroskopis-2022.pdf

Koendhori, S. S. N. M. M. E. B. (2024). Predicting bacillary load in clinically suspected pulmonary tuberculosis patients in Indonesia using Xpert MTB/RIF CT values. *Bali Medical Journal*, *13*(2), 810–816. https://doi.org/10.15562/bmj.v13i2.5212

Maulida, A., Harlita, T. D., & Makkadafi, S. P. (2023). Pengaruh Variasi Waktu Pendinginan Carbol Fuchsin terhadap Hasil Pemeriksaan Basil Tahan Asam. *Klinikal Sains : Jurnal Analis Kesehatan*, *11*(2), 235–248. https://doi.org/10.36341/klinikal_sains.v11i2.3906

Maulida, R., Sartika, F., & Hidayani, A. (2024). Lama Pemanasan Carbol Fuchsin Pada Pewarnaan Preparat BTA. *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology*, *6*(2), 608–613. https://doi.org/10.33084/bjmlt.v6i2.7099

Médecins Sans Frontières. (2022). Appendix 4: Sputum smear microscopy. MSF Medical Guidelines. https://medicalguidelines.msf.org/en/viewport/TUB/english/appendix-4-sputum-smear-microscopy-20323753.html

Mentula, S., Paakkanen, J., & Hyyryläinen, H.-L. (2022). External quality assessment by European mycobacterial laboratories: results of AFB microscopy and identification rounds. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *104*(2), 115757. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2022.115757

Mugusi, S., Lema, J., Ponsian, P., Kamori, D., Kimambo, H., Masanja, P., Anthony, A., Ngemera, M., & Kahwa, A. (2025). Diagnostic accuracy of sputum smear microscopy compared with culture in patients with tuberculosis confirmed by Xpert Mycobacterium tuberculosis/rifampicin assay in Tanzania: A cross-sectional study. *Journal of International Medical Research*, *53*(10), 11–13. https://doi.org/10.1177/03000605251390703

Paray, A. A., Chandra, M., Kaur, A., & Singh, M. (2026). *Acid-fastness in microbiology : The versatility of Ziehl – Neelsen staining technique , its modifications , and integration of artificial intelligence – A brief review*. 1–6. https://doi.org/10.25259/AUJMSR

Prakoeswa, F. R. S., Rumondor, B. B., & Prakoeswa, C. R. S. (2022). Acid-Fast Staining Revisited, a Dated but Versatile Means of Diagnosis. *The Open Microbiology Journal*, *16*(1), 1–5. https://doi.org/10.2174/18742858-v16-e2206081

PT Segara Husada Mandiri. (2025). Ziehl Neelsen IR: Pewarnaan Basil Tahan Asam (BTA) [Insert kit]. Nomor katalog: 0010544 A–D; Lot: 600825-ZN.

Purba, S. K. R., & Manihuruk, F. N. (2023). Analisa Mycobacterium Tuberculosis Pada Penderita Diabetes Melitus Di RSUD Dr. R. M. Djoelham Binjai. *Health Information: Jurnal Penelitian*, *15*, 1–15. https://myjurnal.poltekkes-kdi.ac.id/index.php/hijp

Putri, R. D., Usman, H. A., & Agustina, H. (2025). Ability Of Ziehl-Neelsen And Fite Faraco Staining For Detection Of Mycobacterium Sp. In Tissue Samples : A Literature Review. *Majalah Patologi Indonesia*, *34*(2), 945–951. https://doi.org/10.55816/mpi.v34i2.625

Rosales-Rimache, J., Nunayalle-Vargas, M., Rueda-Torres, L., & Inolopú-Cucche, J. (2022). Performance of Bleach Method Sputum Smear Microscopy for the Diagnosis of Tuberculosis in a Highly Endemic District in Lima, Peru. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *20*(1), 135. https://doi.org/10.3390/ijerph20010135

Singhal, R., & Myneedu, V. P. (2015). Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *International Journal of Mycobacteriology*, *4*(1), 1–6. https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.12.006

Tapia-Sequeiros, G., Hueda-Zavaleta, M., Gómez de la Torre, J. C., Hernandez-Vargas, A., Barletta-Carrillo, C., Flores, C., Piscoche, C., Miranda, C., & Mendoza, A. (2025). Diagnostic Performance of Ziehl-Neelsen Staining and Auramine-Rhodamine Staining Techniques in the Detection of Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *42*(1), 37–45. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2025.421.14062

Tille, P. (2017). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (14th ed.). Elsevier.

Ulfah, P., Lutpiatina, L., Dwiyanti, R. D., & Insana, A. (2025). Comparison of TCM GeneXpert MTB/RIF Ultra Examination Results with AFB Microscopic Examination in Pulmonary TB Patients with MTB Detected. *Tropical Health and Medical Research*, *7*(2), 87–98. https://doi.org/10.35916/thmr.v7i2.135

Vilchèze, C., & Kremer, L. (2017). Acid-fast positive and acid-fast negative Mycobacterium tuberculosis: The Koch paradox. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus: Second Edition*, *1*, 519–532.

https://doi.org/10.1128/9781555819569.ch23

Weldemhret, L., Hailu, A., Gebremedhn, G., Bekuretsion, H., Alemseged, G., Gebreegziabher, G., Tesfahuney, G., Berhe, T., Legesse, L., Kalayu, K., Tesfay, M., & Mehari, K. (2020). Blinded rechecking of sputum smear microscopy performance in public health facilities in Tigray region, Northern Ethiopia: Retrospective cross sectional study. *PLoS ONE*, *15*(10 October), 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239342

Widiyanto, Didik; Budiharjo, Teguh; AP, K. (2021). Morphologic Profile Of Acid–Fast Mycobacterium Tuberculosis Bacteria In Patient Undergoing Four Months Treatment. *International Journal of Health, Education and Social (IJHES)*, *4*(6), 35–45. http://www.ijhes.com

World Health Organization. (2020). *Definitions and reporting framework for tuberculosis* (Issue December 2014).

World Health Organization. (2025a). *WHO Global Tuberculosis Report 2025*.

World Health Organization. (2025b). *WHO Operational Handbook on Tuberculosis. Module 3: Diagnosis*. World Health Organization. https://www.who.int/publications/i/item/9789240110991

.