

---

## RHODAMINE B SEBAGAI PEWARNA ALTERNATIF CARBOL FUCHSIN PADA PERWARNAAN TAHAN ASAM ZIEHL NEELSEN

### Rhodamine B as an Alternative to Carbol Fuchsin in Acid-Fast Staining Using the Ziehl-Neelsen Method

---

Fitri Akbar Fauziyah<sup>1\*</sup>

Dhiah Noalina<sup>2</sup>

Novita Eka Putri<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia

<sup>3</sup>Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia

\*email: fitriakbarfauziyah@gmail.com

---

#### Abstrak

Bakteri merupakan mikroorganisme yang umumnya tidak memiliki warna dan sulit untuk melihat atau mengidentifikasi bentuk selnya di bawah mikroskop. Oleh karena itu, dilakukan pengecatan atau pewarnaan sel bakteri untuk memperjelas bentuknya dan memudahkan identifikasi sel bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi *rhodamine B* sebagai pewarna alternatif *carbol fuchsin* pada pewarnaan Bakteri Tahan Asam metode *Ziehl neelsen*. Metode yang digunakan ialah menggunakan metode Quasi eksperimen dengan desain nonequivalent control group design yaitu dengan adanya kelompok eksperimen dan kontrol. Penelitian dilakukan dengan menggunakan data primer di Rumah Sakit Umum Daerah Wates. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa data skor kriteria pewarnaan pada 24 sediaan dengan 4 perlakuan dan 6 pengulangan adalah pada kontrol positif didapatkan jumlah skor 150, pada *rhodamine B* 4% pelarut *aquades* dan etanol didapatkan skor 90 dengan nilai presentase efektivitas didapatkan 60% dan untuk *rhodamine B* 3,98% pelarut *aquades* yang ditambahkan fenol didapatkan jumlah skor 150 dengan nilai persentase efektivitas 100%. Berdasarkan penelitian yang dilakukan *rhodamine B* 4% pelarut *aquades* dan etanol tidak efektif digunakan sebagai alternatif pengganti *carbol fuchsin* sedangkan hasil penelitian *rhodamine B* 3,98% yang dilarutkan menggunakan *aquades* dan ditambahkan fenol efektif digunakan sebagai pewarna alternatif *carbol fuchsin*.

---

#### Kata Kunci:

Rhodamine B, Pewarnaan Bakteri Tahan Asam, metode Ziehl neelsen, Carbol Fuchsin

#### Keywords:

Rhodamine B, Acid-Fast Staining, Ziehl-Neelsen Method, Carbol Fuchsin

#### Abstract

Bacteria are microorganisms that generally have no color and it is difficult to see or identify their cell shape under a microscope. Therefore, painting or staining of bacterial cells is done to clarify their shape and facilitate the identification of bacterial cells. This study aims to determine the potential of *rhodamine B* as an alternative dye to *carbol fuchsin* in Acid Resistant Bacteria dye *Ziehl neelsen* method. The method used is using the Quasi experimental method with a nonequivalent control group design, namely with the existence of experimental and control groups. The research was conducted using primary data at the Wates Regional General Hospital. The results of this study indicate that the data score of the coloring criteria in 24 preparations with 4 treatments and 6 repetitions is in the positive control obtained a total score of 150, in *rhodamine B* 4% distilled water solvent and ethanol obtained a score of 90 with a percentage value of effectiveness obtained 60% and for *rhodamine B* 3,98% distilled water solvent added phenol obtained a total score of 150 with a percentage value of effectiveness of 100%. Based on the research conducted, *rhodamine B* 4% distilled water and ethanol solvents are not effectively used as an alternative to *carbol fuchsin*, while the results of *rhodamine B* 3,98% research dissolved using distilled water and added phenol are effectively used as an alternative dye to *carbol fuchsin*.

---

## PENDAHULUAN

Bakteri adalah mikroorganisme yang umumnya tidak memiliki warna dan sulit dilihat atau diidentifikasi bentuk selnya di bawah mikroskop karena kontrasnya dengan air dan udara. Untuk itu, pewarnaan sel bakteri diperlukan agar bentuknya lebih jelas dan identifikasi lebih mudah (Rita et al., 2018).

Pewarnaan sangat penting dalam laboratorium mikrobiologi karena memudahkan pengamatan bakteri di bawah mikroskop. Pewarna yang sering digunakan termasuk safranin, *carbol fuchsin*, *crystal violet*, dan *methylen blue*. Di Indonesia, pewarna alami dan tekstil banyak digunakan (Virgianti, 2017).

Faktor-faktor seperti fiksasi, pelunturan warna, substrat, intensifikasi pewarnaan, dan penggunaan pewarna penutup merupakan faktor-faktor yang berdampak pada mikroorganisme pewarnaan, terutama bakteri. Setelah sediaan menyerap zat warna, setelah itu dicuci dengan alkohol sehingga dapat menghilangkan zat warna. Beberapa sediaan bahkan mempunyai ketahanan terhadap alkohol, dan bakteri yang menunjukkan sifat ini disebut sebagai bakteri tahan asam, suatu karakteristik yang unik pada spesies bakteri (Rita et al., 2018).

Metode *Ziehl neelsen* adalah standar untuk mendeteksi bakteri tahan asam (BTA) seperti *Mycobacterium tuberculosis*, yang memiliki dinding sel berlapis lilin dan lemak yang sulit ditembus pewarna. *Carbol fuchsin* digunakan dengan pemanasan dan fenol agar dapat menembus dinding sel. Pewarnaan ini membuat BTA tetap berwarna merah meskipun dicuci dengan asam alkohol, sementara bakteri tidak tahan asam berubah menjadi biru setelah pencucian dengan *methylen blue* (Amelia et al., 2019).

*Carbol fuchsin*, meskipun efektif, memiliki beberapa kelemahan seperti harga yang mahal, ketersediaan yang terbatas, dan toksisitas tinggi yang dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan (MSDS Carbol Fuchsin, 2022). Karena itu, diperlukan alternatif yang lebih murah dan aman.

*Rhodamine B*, merupakan pewarna sintesis yang umum digunakan dalam industri tekstil, larut dalam air dan alkohol, serta relatif murah dan mudah didapat. *Rhodamine B* tidak menimbulkan iritasi kulit dan tidak bersifat toksik akut, menjadikannya kandidat pengganti *carbol fuchsin* (The OSHA Standard 29, 2023). Penelitian ini bertujuan mengevaluasi *rhodamine B* sebagai pewarna alternatif dalam metode pewarnaan *Ziehl neelsen* untuk BTA.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode quasi-eksperimen dengan desain nonequivalent control group, melibatkan kelompok eksperimen dan kontrol. Penelitian dilakukan di Rumah Sakit Umum Daerah Wates pada bulan Juni 2024. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *rhodamine B*, sedangkan variabel terikat adalah pewarnaan Bakteri Tahan Asam (BTA) dengan metode *Ziehl neelsen*. Populasi penelitian adalah sediaan BTA dengan sampel sebanyak 24 sediaan. Pengulangan sampel dihitung menggunakan rumus Federer:

$$\text{Rumus federer} : (n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan : t = *Treatment* / perlakuan

n = *Replikasi* / pengulangan

15 = patokan konstanta minimal dari derajat ketelitian

Hasil jumlah pengulangan sebesar:

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (4-1) \geq 15$$

$$(n-1) (3) \geq 15$$

$$(3n-3) \geq 15$$

$$(3n) \geq 18$$

$$n \geq 6$$

menghasilkan 6 kali pengulangan (Indratama & Yenita, 2019). Data yang digunakan dalam penelitian ini ialah data primer yang diperoleh dari pewarnaan sediaan BTA positif *tuberculosis* menggunakan *rhodamine B* dengan berbagai pelarut. Penilaian kualitas sediaan didasarkan pada enam parameter.

**Tabel I.** Penilaian Kualitas Sediaan Bkteri Tahan Asam

No	Parameter	Kinerja Petugas	Dampak terhadap hasil	Skoring	Definisi Operasional
1	Ukuran	2	5	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2x3 cm (nilai 2)</li> <li>• &lt;/&gt; 2x3 cm (nilai 1)</li> </ul>
2	Kerataan	5	5	25	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kerataan ≥ 80% (nilai 5)</li> <li>• Kerataan 60-80% (nilai 3)</li> <li>• Kerataan &lt;60% (nilai 2)</li> </ul>
3	Ketebalan	3	5	15	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ketebalan baik (nilai 3)</li> <li>• terlalu tebal/tipis (nilai 1)</li> </ul>
4	Pewarnaan	5	5	25	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pewarnaan baik (nilai 5)</li> <li>• Kontras warna kurang jelas (nilai 3)</li> <li>• Warna latar merah (nilai 1)</li> </ul>
5	Kebersihan	3	5	15	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tidak terdapat sisa zat warna/kristal (nilai 3)</li> <li>• Terdapat sisa zat warna/ kristal (nilai 1)</li> </ul>
6	Kualitas dahak	2	5	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sputum diambil yang purulen dan bukan saliva (nilai 2)</li> <li>• Sampel diambil berupa saliva walaupun didalam pot terdapat sputum yang purulen (nilai 1)</li> </ul>
<b>Jumlah</b>				100	

(Kemenkes, 2022)

### PREPARASI SAMPEL

Peneliti melakukan preparasi sampel pada sputum dahak penderita *tuberculosis* dengan cara wadah dahak diberi label identitas.

### PEMBUATAN SEDIAAN DAHAK

Pembuatan sediaan dahak dengan cara mencari dahak yang purulen kemudian dibentuk oval ukuran 3x2 cm diatas kaca objek, setelah dahak diambil peneliti meratakan dengan gerakan spiral kecil dari dalam keluar. Peneliti selanjutnya memfiksasi sediaan diatas api bunsen sebanyak 3 kali

### PEMBUATAN KONSENTRASI

#### RHODAMINE B

Pembuatan konsentrasi *rhodamine B* 4% dengan pelarut *aquades* dilakukan dengan cara menimbang *rhodamine B* sebanyak 2 gram, kemudian tambahkan 50 ml pelarut

*aquades* ke dalam labu ukur, lalu homogenkan larutan hingga larut. Pembuatan konsentrasi *rhodamine B* 4% dengan pelarut etanol, timbang *rhodamine B* sebanyak 2 gram, kemudian tambahkan 50 ml pelarut etanol ke dalam labu ukur, lalu homogenkan larutan hingga larut. Pembuatan konsentrasi *rhodamine B* 3,98% dengan pelarut *aquades* yang ditambahkan fenol, timbang *rhodamine B* sebanyak 2 gram, kemudian tambahkan 50 ml pelarut *aquades* kedalam labu ukur, lalu homogenkan larutan hingga larut dan setelah itu tambahkan 0,25 ml pelarut fenol dan homogenkan.

#### PEWARNAAN ZIEHL NEELSEN

Pewarnaan *Ziehl neelsen* dilakukan dengan cara genangi sediaan dengan *carbol fuchsin* yang dipanaskan diatas api bunsen sampai menguap, setelah menguap tunggu 5 menit lalu cuci dan genangi asam alkohol hingga pucat atau selama 20-30 detik, kemudian cuci dan warnai

dengan *methylen blue* selama 1 menit, setelah pewarnaan kemudian hasilnya dibaca menggunakan mikroskop perbesaran 100x.

## ANALISIS DATA

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif, dengan efektivitas pewarnaan Bakteri Tahan Asam yang dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Persentase efektivitas} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

$$= \frac{\text{Jumlah skor konsentrasi } \textit{rhodamine B}}{\text{Jumlah skor kontrol positif}} \times 100\%$$

Kriteria efektivitas diukur berdasarkan persentase dengan kategori

**Tabel II.** Kriteria Efektivitas Pewarnaan

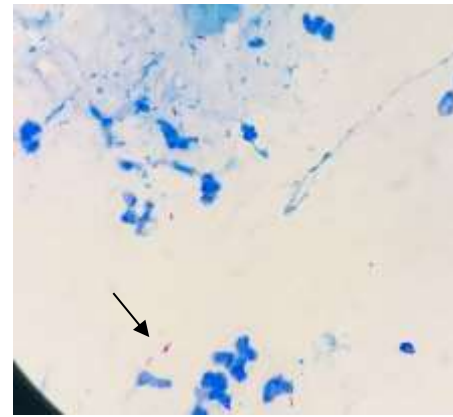
Persentase	Kriteria
>100%	Sangat Efektif
91 – 100 %	Efektif
81 – 90%	Cukup Efektif
71 – 80%	Kurang Efektif
≤60%	Tidak Efektif

(Erika Z. Lasupu, Lintje Kalangi, 2021)

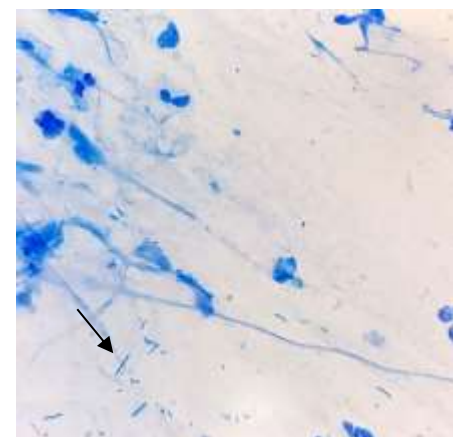
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### HASIL

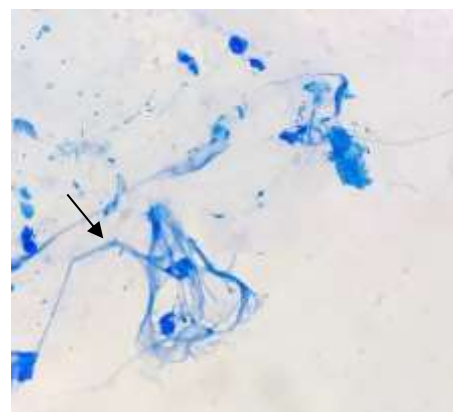
Penelitian dilaksanakan pada Juni 2024 di Laboratorium RSUD Wates. Penelitian ini menggunakan *rhodamine B* sebagai pengganti *carbol fuchsin* untuk pewarnaan Bakteri Tahan Asam metode *Ziehl neelsen*. Larutan *rhodamine B* dibuat dengan tiga variasi: pelarut *aquades*, pelarut etanol, dan pelarut *aquades* ditambah fenol. Hasil pewarnaan Bakteri Tahan Asam diamati secara mikroskopis dengan perbesaran lensa objektif 100x. Hasil pengamatan mikroskopis ditunjukkan pada gambar berikut:



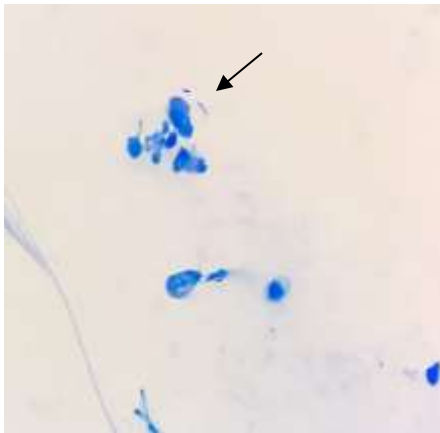
Gambar 1 BTA dengan Pewarnaan *Carbol Fuchsin* (kontrol positif) (Dokumen Pribadi, 2024)



Gambar 2 BTA dengan Pewarnaan *Rhodamine B* 4% dengan Pelarut *Aquades* (Dokumen Pribadi, 2024)



Gambar 3 BTA dengan Pewarnaan *Rhodamine B* 4% dengan Pelarut Etanol (Dokumen Pribadi, 2024)



Gambar 4 BTA dengan Pewarnaan *Rhodamine B* 3,98% dengan Pelarut *Aquades* dan Fenol (Dokumen Pribadi, 2024)

Hasil penelitian selanjutnya berupa skor kriteria pewarnaan dengan menggunakan 24 Sediaan Bakteri Tahan Asam yang digunakan pada pewarnaan metode *Ziehl neelsen* dengan 4 perlakuan dan 6 pengulangan. Data hasil skor kriteria pewarnaan dapat dilihat sebagai berikut:

**Tabel III.** Data Skor Kriteria Pewarnaan

Skor kriteria pewarnaan sediaan Bakteri Tahan Asam				
No	<i>Carbol fuchsin</i> (kontrol positif)	<i>Rhodamine B</i> 4% pelarut <i>aquades</i>	<i>Rhodamine B</i> 4% pelarut etanol	<i>Rhodamine B</i> 3,98% pelarut fenol
1.	25	15	15	25
2.	25	15	15	25
3.	25	15	15	25
4.	25	15	15	25
5.	25	15	15	25
6.	25	15	15	25
<b>jumlah</b>	150	90	90	150

Hasil dari Tabel III menunjukkan bahwa dari 24 sediaan dengan 6 pengulangan didapatkan data hasil skor kriteria pewarnaan yaitu dari pewarna *carbol fuchsin* (kontrol positif) didapatkan 150 poin, sedangkan konsentrasi *rhodamine B* 4% dengan pelarut *aquades* dan etanol didapatkan 90 poin dan konsentrasi *rhodamine B* 3,98% dengan pelarut *aquades* yang ditambahkan fenol didapatkan 150 poin. Data hasil skor kriteria kemudian dihitung persentase dan tingkat keefektifitasnya yang dilakukan dengan rumus berikut:

$$\text{Persentase efektivitas} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

$$= \frac{\text{Jumlah skor konsentrasi } \textit{rhodamine B}}{\text{Jumlah skor kontrol positif}} \times 100\%$$

a. *Rhodamine B* 4% pelarut *aquades*

$$= \frac{90}{150} \times 100 = 60\%$$

b. *Rhodamine B* 4% pelarut etanol

$$= \frac{90}{150} \times 100\% = 60\%$$

c. *Rhodamine B* 3,98% pelarut *aquades* yang ditambahkan fenol

$$= \frac{18}{30} \times 100\% = 100\%$$

## PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan *rhodamine B* sebagai pewarna karena memiliki warna merah cerah yang berfluoresensi (Permatahati & Yanti, 2021). *Rhodamine B* juga termasuk dalam golongan pewarna yang bersifat basa, sama seperti *fuchsin* juga dapat bekerja dengan baik pada bakteri karena bersifat basa. Sitoplasma bakteri bersifat basofilik (suka terhadap basa) sehingga terjadi gaya tarik antara komponen kromofor pada pewarna dengan sel bakteri. Hal tersebut menyebabkan bakteri dapat menyerap pewarna dengan baik (Sundari et al., 2020).

*Rhodamine B* dipakai sebagai alternatif *carbol fuchsin* pada pewarnaan Bakteri Tahan Asam (BTA) metode *Ziehl neelsen* dengan membuat konsentrasi *rhodamine B* menggunakan pelarut *aquades*, etanol, dan *aquades* ditambah fenol. *Carbol fuchsin* digunakan sebagai kontrol positif dalam pewarnaan BTA metode *Ziehl neelsen* dengan 6 pengulangan pada 24 sediaan. Hasil pewarnaan kontrol positif menunjukkan bakteri *tuberculosis* positif dua dilihat dengan pembacaan hasil mikroskopis Bakteri Tahan Asam menggunakan skala *International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases (IUATLD)* yang ditemukan 1-10 BTA dalam 1 lapang pandang, maka hasilnya disebut 2+ (dengan minimal 50 lapang pandang yang diperiksa) yang ditandai dengan berwarna merah kuat, berbentuk basil, dengan latar belakang biru dan tanpa endapan zat warna merah.

Hasil pewarnaan BTA dengan *rhodamine B* menunjukkan bahwa *rhodamine B* 4% dengan pelarut *aquades* dan etanol tidak efektif digunakan karena tidak dapat

mewarnai BTA. Namun, *rhodamine B* 3,98% dengan pelarut *aquades* ditambah fenol menghasilkan skor pewarnaan sebesar 150, dengan efektivitas 100%, ini menunjukkan bahwa *rhodamine B* 4% dengan pelarut *aquades* ditambah fenol dapat digunakan sebagai pewarna alternatif *carbol fuchsin*.

*Rhodamine B* 3,98% pada pelarut *aquades* yang sudah ditambahkan fenol dapat mendeteksi Bakteri Tahan Asam pada metode *Ziehl neelsen* karena dinding bakteri tahan asam memiliki permukaan berlapis lilin dan lemak sehingga menyulitkan cat untuk menyerapnya. Fenol dan pemanasan digunakan agar lilin dan lemak dapat menyerap cat (Amelia et al., 2019).

Kekurangan penelitian ini adalah konsentrasi *rhodamine B* 3,98% dengan pelarut *aquades* ditambah fenol masih belum stabil yang mempengaruhi kualitas pewarnaan. Hambatan pada penelitian ini adalah peneliti tidak mengukur pH pada larutan pengganti *carbol fuchsin*, tidak hanya itu peneliti juga menggunakan fenol cair (bahan kimia teknis) yang menyebabkan hasilnya bisa tidak akurat. Bahan kimia teknis sendiri memiliki tingkat kemurnian yang lebih rendah dibandingkan dengan bahan kimia pro analisis. Disisi lain, bahan kimia pro analisis memiliki kemurnian sangat tinggi, mencapai sekitar 99,5%. (Hadiansyah et al., 2024).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa *rhodamine B* 4% dengan pelarut *aquades* dan etanol tidak efektif digunakan sebagai alternatif pewarna *carbol fuchsin*, sedangkan *rhodamine B* 3,98% dengan pelarut *aquades* yang sudah ditambahkan fenol efektif digunakan sebagai alternatif pengganti *carbol fuchsin*.

## SARAN

Saran dari penelitian ini setelah dilakukan evaluasi adalah perlu dilakukan pengukuran pH pada larutan pengganti *carbol fuchsin*, perlu menggunakan larutan

fenol Pro Analisis agar hasilnya lebih valid, dan Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk uji stabilitasnya.

## DAFTAR PUSTAKA

Amelia, R., Hadijah, S., & Nasir, M. (2019). Pengaruh Konsentrasi Asam Alkohol Terhadap Hasil Pemeriksaan Basil Tahan Asam Metode Ziehl Neelsen. *Jurnal Media Analis Kesehatan*, 10(2), 126. <https://doi.org/10.32382/mak.v10i2.1266>

Erika Z. Lasupu, Lintje Kalangi, L. M. M. (2021). Analisis Efektivitas Dan Efisiensi Pelaksanaan Anggaran Belanja Pada Badan Kesatuan Bangsa Dan Politik Kabupaten Tojo Una-Una. *Jurnal EMBA, Vol.9 No.3(69)*, 1433–1441.

Hadiansyah, M. S., Nabila, R. S., Pratiwi, V. A., Rachmawati, Y., & Romli, U. (2024). Perspektif islam dalam Penggunaan Zat Volatil di Laboratorium. *Jurnal Kajian Pendidikan Umum*, 22(1), 1–10.

Indratama, D., & Yenita, Y. (2019). Uji Efektivitas Antibiotik Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Billimbi* L) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Pandu Husada*, 1(1), 61–65. <https://doi.org/10.30596/jph.v1i1.3874>

Kemenkes. (2022). *Petunjuk Teknis Pemeriksaan Mikroskopis Tuberkulosis. 25 x 16 cm*, 88.

MSDS Carbol Fuchsin. (2022). Material Safety Sheet (MSDS) of carbol fuchsin. *Santa Cruz Biotechnology*, 1577, 1–11. <http://datasheets.scbt.com/sc-214663.pdf>

Permatahati, D. M., & Yanti, L. P. D. (2021). Metode Identifikasi *Rhodamine B* pada Makanan dan Kosmetik. *Bima Nursing Journal*, 2(1), 62. <https://doi.org/10.32807/bnj.v2i1.712>

Rita, E., Dewi, S., Nurwahyunani, A., Sampul, D., Nurwahyunani, A., & Pertama, C. (2018). *Dasar-dasar Mikrobiologi*.

Sundari, Karmila, W., & Faizah. (2020). Pemanfaatan Zat Warna Bunga Rosella Sebagai Pengganti Fuchsin. *Jurnal Teknologi Dan Manajemen Pengelolaan Laboratorium (Temapela)*, 3(1), 25–28.

The OSHA Standard 29. (2023). Safety Data Sheet *Rhodamine B*. *Material Safety Data Sheet*, 4(2), 1–6. <https://shrinkwrapcontainments.com/Images/media/SDS Shrink Film.pdf>

Virgianti, D. P. (2017). Penggunaan Ekstrak Kombinasi Angkak Dan Daun Jati Sebagai Pewarna Penutup Pada Pewarnaan Gram. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-Ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan Dan Farmasi*, 17(1), 66.

<https://doi.org/10.36465/jkbth.v17i1.191>