

PERBANDINGAN TAN THIAM HOK, ZIEHL NEELSEN DAN FLUOROKROM SEBAGAI METODE PEWARNAAN BASIL TAHAN ASAM UNTUK PEMERIKSAAN MIKROSKOPIK SPUTUM

A. Karuniawati¹, E. Risdiyani¹, S. Nilawati¹, Prawoto¹, Y. Rosana¹, B. Alisyahbana²,
I. Parwati³, Wia Melia⁴, T.M. Sudiro¹

1. Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia
2. Bagian Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran, UNPAD, Bandung 40132, Indonesia
3. Laboratorium Mikrobiologi Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, UNPAD, Bandung 40132, Indonesia
4. Perhimpunan Pemberantasan Tuberkulosis Indonesia, Jakarta, Indonesia

E-mail: akaruniawati@yahoo.com

Abstrak

Pemeriksaan dahak secara mikroskopik dengan pewarnaan Basil Tahan Asam (BTA) merupakan pemeriksaan yang sederhana, cepat, murah, dan cukup sensitif untuk mendukung diagnosis penyakit tuberkulosis serta untuk menilai kemajuan pengobatan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan metoda pewarnaan BTA terbaik yang dapat digunakan secara rutin terutama di laboratorium dengan beban pekerjaan yang cukup tinggi. Sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan negatif tiga macam metode pewarnaan BTA, yaitu Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen, dan Fluorokrom, dibandingkan terhadap hasil biakan dahak pada medium padat Lowenstein Jensen sebagai baku emas. Interpretasi hasil pewarnaan mengacu pada skala IUTLD. Pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* didapatkan pada 27 dari 98 spesimen sputum (27,6%) berasal dari 98 penderita tersangka tuberkulosis. Sensitivitas metoda pewarnaan Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen, dan Fluorokrom adalah 62,9%, 81,5%, dan 92,6%, sedangkan spesifisitasnya berturut-turut adalah 92,9%, 91,6%, dan 91,1%. Nilai prediksi positif berturut-turut adalah 77,3%, 78,6%, dan 71,4%, sedangkan nilai prediksi negatif adalah 86,8%, 92,9%, dan 96,8%. Dari penelitian ini didapatkan bahwa Ziehl Neelsen merupakan metoda terbaik dan dapat dilakukan di laboratorium sederhana.

Abstract

Comparison of Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen and Fluorochrome as Acid-Fast Bacilli Staining Methods in Sputum. Because of its simplicity, rapidity, low cost and relatively sensitive, sputum acid-fast bacilli (AFB) smear microscopy is the primary tool for detecting pulmonary tuberculosis and follow up of therapy. This experiment is aimed to determine the best acid-fast staining method that can be used for routine laboratory examination, especially in the high burdened clinical laboratory. We compared the sensitivity, specificity, and the positive and negative predictive value of 3 kinds of methods : Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen and Fluorochrome, using culture on Lowenstein-Jensen media as the gold standard. The smear results were observed using IUTLD scale. Twenty seven of 98 sputum specimens from 98 patients with clinical suspicion of tuberculosis (27,6 %) were positive by culture. The sensitivity of Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen and Fluorochrome were 62,9%, 81,5% and 92,6%, while the specificity were 92,9%, 91,6% and 91,1% respectively. The positive predictive value were 77,3 %, 78,6 %, 71,4 %, and the negative predictive value were 86,8 %, 92,9 %, 96,8 % respectively. Although fluorochrome gave the highest sensitivity, it needs special expensive equipments. We conclude that Ziehl Neelsen is still the method of choice for detecting AFB in sputum microscopically.

Keywords: Acid Fast Staining, Sputum, Pulmonary Tuberculosis, Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen, Fluorochrome, Lowenstein Jensen.

1. Pendahuluan

Penyakit Tuberkulosis (TB) merupakan masalah utama kesehatan masyarakat di Indonesia. Hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT), 1995 menunjukkan bahwa penyakit TB merupakan penyebab kematian nomor 3 setelah

penyakit kardiovaskuler dan penyakit saluran pernafasan pada semua kelompok usia, dan nomor 1 dari golongan penyakit infeksi. Secara kasar diperkirakan pada setiap 100.000 penduduk Indonesia terdapat 130 penderita baru TB paru dengan Basil Tahan Asam (BTA) positif¹.

Selain gejala klinis yang khas dan foto rontgen dada, diagnosis TB pada orang dewasa sangat didukung oleh pemeriksaan mikroskopik BTA pada 3 spesimen dahak penderita yang diambil 3 hari berturut-turut. Dengan ditemukannya BTA pada dahak penderita, maka diagnosis sementara TB dapat ditegakkan, pengobatan dapat dimulai dan sekaligus dapat diketahui pula bahwa penderita berpotensi menularkan penyakitnya. Diagnosis definitif ditetapkan setelah dibuktikan adanya pertumbuhan bakteri pada medium selektif dengan sifat pertumbuhan dan sifat biokimia sesuai dengan *Mycobacterium tuberculosis*².

Mengingat pentingnya pewarnaan BTA pada sputum, maka penelitian ini bertujuan untuk menentukan metode pewarnaan BTA terbaik yang dapat mendukung diagnosis tuberkulosis dan dapat diaplikasikan di pusat-pusat pelayanan kesehatan terutama di puskesmas daerah. Tiga macam metode pewarnaan dibandingkan terhadap hasil biakan sputum pada medium Lowenstein Jensen sebagai baku emas, kemudian ditentukan sensitifitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan negatif dari masing-masing metode pewarnaan. Metode-metode pewarnaan yang dibandingkan adalah Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen, dan Fluorokrom.

2. Metode Penelitian

Sampel. Jumlah sampel sebanyak 98 sputum dari 98 pasien yang dikirim dengan diagnosis sementara tuberkulosis ke laboratorium Mikrobiologi FKUI.

Pengumpulan dahak. Spesimen dahak ditampung dalam pot dahak yang bermulut lebar dengan tutup berulir, tidak mudah pecah dan tidak bocor. Pot disediakan oleh laboratorium. Spesimen yang tidak langsung dikerjakan disimpan di lemari es 4°C.

Pembuatan sediaan. Dari satu spesimen dibuat 4 hapusan dahak masing-masing pada sebuah kaca objek yang telah dilabel dengan nomor kode laboratorium. Setelah pengeringan diudara, hapusan difiksasi dengan melidah-apikan 3-5x selama 3-4 detik. Sediaan yang tidak segera diwarnai, disimpan didalam kotak penyimpanan preparat pada suhu kamar.

Pewarnaan Tan Thiam Hok. Larutan Kinyoun (fuchsin basis 4g, fenol 8ml, alkohol 95% 20ml, H₂O destilata (100ml) dituang pada permukaan sediaan, dibiarkan selama 3 menit, kemudian kelebihan zat warna dibuang dan dicuci dengan air yang mengalir perlahan. Selanjutnya larutan Gabbet (methylene blue 1g, H₂SO₄ 96% 20ml, alkohol absolut 30ml, H₂O destilata 50ml) dituang pada permukaan sediaan, dibiarkan 1 menit kemudian kelebihan zat warna dibuang dan dicuci dengan air yang mengalir perlahan, kemudian sediaan dikeringkan di udara³.

Pewarnaan Ziehl Neelsen. Larutan carbol fuchsin 0,3% dituang pada seluruh permukaan sediaan, kemudian dipanaskan diatas nyala api sampai keluar asap tetapi tidak sampai mendidih atau kering selama 5 menit. Sediaan kemudian dibiarkan dingin selama 5-7 menit lalu kelebihan zat warna dibuang dan dicuci dengan air yang mengalir perlahan. Setelah itu larutan asam alkohol 3% (hydrochloric acid-ethanol) dituang pada sediaan dan dibiarkan 2-4 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1-3 menit, kelebihan larutan dibuang. Larutan methylene blue 0,1% dituang sampai menutup seluruh permukaan, dibiarkan 1 menit lalu larutan dibuang dan dicuci dengan air mengalir⁴.

Pewarnaan Fluorokrom (Auramine O). Sediaan direndam didalam larutan Auramine (Merck), dibiarkan selama 15 menit kemudian dicuci dengan air bebas klorin atau H₂O destilata dan dikeringkan. Sediaan lalu direndam didalam asam alkohol, dibiarkan selama 2 menit, dicuci dengan H₂O destilata dan dikeringkan. Setelah itu sediaan direndam didalam potasium permanganat 0,5%, dibiarkan selama 2 menit, dicuci dengan H₂O destilata dan dikeringkan di udara⁴.

Pembacaan hasil. Sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x dengan meneteskan minyak emersi tanpa menyentuh sediaan untuk mencegah transfer BTA antar sediaan. Pelaporan jumlah BTA sesuai dengan skala IUATLD (*International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases*, lihat Tabel 1).

Tabel 1. Skala IUTLD ¹

Pembacaan dibawah Mikroskop	Pelaporan hasil
Tidak ditemukan BTA dalam 100 lapangan pandang	Negatif
1 – 9 BTA dalam 100 lapangan pandang	Tulis jumlah BTA yang ditemukan
10 – 99 BTA dalam 100 lapangan pandang	1+
1 – 10 BTA dalam 1 lapangan pandang	2+
> 10 BTA dalam 1 lapangan pandang	3+

Catatan: Hasil pembacaan preparat dengan pewarnaan fluorokrom dikonversi dengan membagi jumlah bakteri yang terlihat dengan 4. Pada metode pewarnaan fluorochrome, pembacaan dilakukan dengan pembesaran 450x. Pembacaan preparat dilakukan oleh orang yang berbeda untuk setiap pewarnaan.

Kultur. Setelah proses homogenisasi dengan cara Kubica, sputum ditanam ke medium Lowenstein Jensen dan diinkubasi pada suhu 37°C. Pertumbuhannya dilihat setiap minggu sampai 6 minggu ².

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil biakan menunjukkan bahwa 27 dari 98 sampel sputum (27,55 %) yang diperiksa mengandung *Mycobacterium tuberculosis*. Tabel 2 sampai dengan 4 menunjukkan perbandingan hasil pewarnaan berdasarkan skala IUTLD terhadap hasil biakan yang digunakan sebagai baku standar. Terlihat bahwa dengan pewarnaan Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen dan fluorokrom, berturut-turut didapatkan hasil positif 17,4 %, 23,5 % dan 25,5 % dari 98 sampel sputum.

Tabel 5 memperlihatkan nilai sensitivitas spesifisitas ketiga metode pewarnaan tersebut dibandingkan dengan hasil biakan. Berturut-turut, sensitivitas pewarnaan Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen dan fluorokrom adalah 62,9 %, 81,5 %, 92,6 %; sedangkan nilai spesifisitasnya adalah 92,9 %, 91,6 % dan 91,1 %.

Sebanyak 24 sampel memberikan hasil yang tidak sesuai antara hasil masing-masing pewarnaan dan hasil biakan pada medium Lowenstein Jensen (Tabel 6). Sebelas (11) sampel memberikan hasil BTA positif pada 1, 2 atau 3 macam pewarnaan tetapi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan *Mycobacterium sp.* pada medium, meskipun masa inkubasi telah diperpanjang sampai dengan 8 minggu. Pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* pada 13 sampel menunjukkan hasil BTA yang tidak sesuai antara pewarnaan Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen dan Fluorokrom, bahkan 1 sampel menunjukkan hasil BTA negatif pada ketiga pewarnaan tersebut.

Berbagai metode diagnosis cepat tuberkulosis saat ini telah dikembangkan, diantaranya dengan menggunakan BACTEC, serologi, hibridisasi asam nukleat dan PCR. Metode-metode tersebut selain cepat juga mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang cukup tinggi, tetapi memerlukan biaya yang tidak sedikit serta sulit aplikasinya di negara sedang berkembang karena diperlukan biaya yang besar dan peralatan khusus.

Pewarnaan BTA pada spesimen merupakan metode diagnosis yang paling murah ⁵, cepat, mudah dalam pengerjaannya serta dapat dikerjakan di laboratorium sederhana yang memiliki mikroskop. Dalam strategi

Tabel 2. Perbandingan Hasil Pewarnaan Tan Thiam Hok terhadap Hasil Biakan

Hasil Pewarnaan	Biakan	
	Positif	Negatif
3+	8	2
2+	3	1
1+	3	1
1-9 BTA/100LP	3	1
Negatif	10	66
Total	27	71

Tabel 3. Perbandingan Hasil Pewarnaan Ziehl Neelsen terhadap Hasil Biakan

Hasil Pewarnaan	Biakan	
	positif	negatif
3+	12	2
2+	-	2
1+	7	1
1-9 BTA/100LP	3	1
Negatif	5	65
Total	27	71

Tabel 4. Perbandingan Hasil Pewarnaan Fluorokrom terhadap Hasil Biakan

Hasil Pewarnaan	Biakan	
	positif	negatif
3+	13	2
2+	4	1
1+	4	7
1-9 BTA/100LP	4	1
Negatif	2	60
Total	27	71

Tabel 5. Nilai sensitivitas, spesifitas, prediksi positif dan prediksi negatif 3 macam pewarnaan basil tahan asam

	Tan Thiam Hok	Ziehl Neelsen	Fluorokrom
Sensitivitas	62,9 %	81,5 %	92,6 %
Spesifisitas	92,9 %	91,6 %	91,1 %
Nilai Prediksi Positif	77,3 %	78,6 %	71,4 %
Nilai Prediksi Negatif	86,8 %	92,9 %	96,8 %

Tabel 6. Spesimen yang memberikan hasil tidak sesuai antara pewarnaan dan biakan

No.	Nomer spesimen	Tan Thiam Hok	Ziehl Neelsen	Fluorokrom	Biakan
1.	4013a	-	-	1+	-
2.	4083a	2+	2+	1+	-
3.	6420	-	-	1+	-
4.	5084	-	-	1+	-
5.	6240	-	-	1+	-
6.	6612	-	2+	2+	-
7.	4936	3+	3+	3+	-
8.	6545	3+	3+	3+	-
9.	3047	1+	-	-	-
10.	3973a	1 BTA	9 BTA	1+	-
11.	4083b	-	1+	1+	-
12.	7233a	-	-	-	+
13.	7411b	1+	-	-	+
14.	3946a	-	2 BTA	9 BTA	+
15.	4800	-	1+	1+	+
16.	5432	1+	-	2+	+
17.	5282	-	1+	2+	+
18.	6781	-	3+	3+	+
19.	4062a	-	2 BTA	1+	+

20.	4007a	—	1 BTA	2 BTA	+
21.	4041a	—	—	5 BTA	+
22.	4133b	2 BTA	—	9 BTA	+
23.	3877b	—	3+	3+	+
24.	7465	—	1+	3+	+

DOTS (Direct Observed Treatment Shortcourse chemotherapy) yang direkomendasi WHO dan telah dilakukan di Indonesia, selain adanya gejala khas serta pemeriksaan rontgen dada digunakan cara pewarnaan BTA Ziehl Neelsen untuk penentuan dimulainya pengobatan Obat Anti Tuberkulosis (OAT).

Sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya⁶⁻⁷, pewarnaan dengan metode Ziehl Neelsen mempunyai sensitifitas yang tidak setinggi spesifitasnya. Hal ini bisa terjadi karena terlalu sedikitnya jumlah bakteri dalam sputum. BTA pada sputum secara mikroskopis akan terlihat bila sputum mengandung paling sedikit 10.000 BTA/ml serta hasil pemeriksaan tidak dapat membedakan *M. tuberculosis* dari *Mycobacterium sp.* yang lain.

Pada pewarnaan fluorokrom, bakteri terwarnai sangat kontras dibanding latar belakangnya serta pada pemeriksaan dibawah mikroskop tidak memerlukan pembesaran sampai 1000x. Hal ini dapat mempercepat waktu pengamatan di bawah mikroskop dan bermanfaat pada laboratorium dengan jumlah sampel yang banyak. Pewarnaan ini mempunyai sensitifitas dan spesifitas yang tinggi, tetapi nilai prediksi positif yang tidak cukup tinggi dibanding 2 pewarnaan yang lain. Hal ini disebabkan fluoresensi yang terlihat dapat berasal dari jaringan nonspesifik, debris sel, atau bakteri yang mati, sehingga pengalaman melakukan pewarnaan dan interpretasi hasil sangat dibutuhkan pada metode ini. Apabila terdapat keraguan dalam pembacaan hasil dianjurkan untuk dilakukan pewarnaan Ziehl Neelsen pada preparat tersebut⁴. Meskipun mempunyai sensitifitas dan spesifitas yang cukup tinggi, penggunaan pewarnaan ini di laboratorium di Indonesia tidaklah mudah karena perlunya biaya yang tinggi untuk penyediaan mikroskop fluoresens.

Tabel 5 menunjukkan nilai sensitivitas, spesifisitas, prediksi positif dan negatif dari 3 macam metode pewarnaan basil tahan asam yang dikerjakan dengan hasil kultur sebagai baku emas. Pewarnaan fluorokrom mempunyai sensitifitas yang paling tinggi (92,6%) dibanding 2 metode pewarnaan yang lain, hal ini menunjukkan bahwa metode ini memberikan hasil yang negatif palsu paling rendah. Spesifisitas ketiga pewarnaan memberikan nilai yang hampir sama, yaitu Tan Thiam Hok 92,9%, Ziehl Neelsen 91,6%, dan flurokrom 91,1%. Nilai-nilai ini menunjukkan bahwa ketiganya memberikan hasil positif palsu 7 sampai 8%.

Dengan digunakannya hasil kultur sebagai baku emas, nilai prediksi positif merupakan persentase hasil metode pewarnaan yang memberi hasil positif terhadap kultur yang memang menunjukkan adanya pertumbuhan *M. tuberculosis*. Dari ketiga metode pewarnaan, Ziehl Neelsen mempunyai nilai prediksi positif yang tertinggi, meskipun tidak berbeda jauh dibanding metode yang lain. Nilai prediksi negatif mempunyai pengertian yang sebaliknya, yaitu persentase hasil metode pewarnaan yang negatif terhadap hasil kultur yang tidak terdapat pertumbuhan *M. tuberculosis*. Fluorokrom memberikan nilai prediksi negatif tertinggi dibanding metode yang lain.

Terdapatnya 11 sampel yang memberikan hasil BTA positif pada salah satu, dua atau tiga pewarnaan tetapi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan *M. tuberculosis* atau *Mycobacterium sp.* lain pada medium kemungkinan terjadi karena BTA didalam sputum sudah mati. Pertumbuhan beberapa *Mycobacterium sp.* lain, misalnya *M. bovis* dapat dihambat oleh kandungan gliserol didalam medium yang digunakan dalam penelitian ini juga dapat menjadi penyebab².

Biakan positif dengan hasil pewarnaan BTA yang negatif pada salah satu, 2 atau 3 metode pewarnaan terdapat pada 13 sampel. Hal ini dapat terjadi karena jumlah BTA didalam sputum sedikit atau tidak homogen atau pewarnaan yang digunakan memang tidak cukup sensitif.

4. Kesimpulan

Dari penelitian ini didapatkan bahwa pewarnaan fluorokrom memberikan sensitivitas yang paling tinggi dibanding 2 metode pewarnaan lainnya. Tetapi karena metode tersebut memerlukan peralatan yang sangat mahal sehingga sulit untuk dapat dilaksanakan di sarana kesehatan dengan fasilitas sederhana. Oleh karena itu metode pewarnaan Ziehl Neelsen merupakan pilihan metode yang cukup sederhana dan memberikan sensitivitas dan spesifisitas yang cukup tinggi.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset dan Teknologi melalui Riset Unggulan Terpadu Internasional 2002-2003. Kami juga berterimakasih kepada Prof. Agus Sjahrurachman, Dr. R. Van Crevel dan AZN Van den Zanden atas saran-sarannya.

Daftar Acuan

1. Departemen Kesehatan RI, *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis*. cetakan kelima. Jakarta: Depkes RI 2000: 1-6.
2. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenber PC, Winn Jr WC, editors, *Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1992: 703-715.
3. Tan Thiam Hok. A simple and rapid cold staining method for acid fast bacteria. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85: 753-754.
4. World Health Organization. *Laboratory Services in Tuberculosis Control: Microscopy Part II*. WHO, 1998: 27-34.
5. Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, et. al. Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 1203-1208.
6. Van Cleff MR, Kivihya-Ndugga L, Githui W, Nganga L, Odhiambo J, Klatser PR. A comprehensive study on the efficiency of the routine pulmonary tuberculosis diagnostic process in Nairobi. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 186-189.
7. Catanzaro A, Perry S, Clarridge JE, Dunbar S, Goodnight-White S, LoBue PA, et. al. The Role of Clinical Suspicion in Evaluating a New Diagnostic Test for Active Tuberculosis. *JAMA* 2000; 5: 639-645.