

Perbandingan Berbagai Metode Pengamatan Mycobacterium Tuberculosis secara Mikroskopis

Comparison of Various Methods for Observing Mycobacterium Tuberculosis Microscopically

WIDODO¹
TRI SUGIYATMINI²
DEVI ETEVIA PURLINDA³

*Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Semarang^{1,3}
Jl. Wolter Mongindisi No. 115 Pedurungan Tengah, Semarang
Balepkes dan Pak provinsi Jawa Tengah²
Email: Widodosst125@gmail.com*

Abstrak

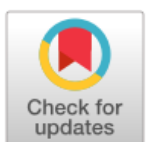
Perkembangan teknologi semakin pesat dalam bidang identifikasi maupun peralatan khusus bidang mikrobiologi, perkembangan metode pewarnaan dan pengamatan mikroskopis berkembang pesat. Metode pewarnaan Ziehl Neelsen masih menjadi alternatif follow up pengobatan alternatif lain dengan menggunakan metode pengecatan Auramin O dengan pengamatan mikroskop fluoresen. Penelitian ini merupakan penelitian Observasional Analitik dan desain penelitian cross sectional untuk melihat perbedaan pembacaan antara pewarnaan Ziehl Neelsen, fluoresen auramin dan pengecatan gram. Kami menggunakan isolat yang telah diidentifikasi sebagai *Mycobacterium tuberculosis* yang kami peroleh dari Balepkes dan Pak provinsi Jawa Tengah dalam kondisi non-aktivasi, dengan autoklaf pada suhu 121 derajat selama 15 menit. Jumlah sampel sebanyak 10 slide dengan pewarnaan Ziehl Neelsen, fluoresen auramin dan pengecatan gram. Hasil penelitian sensitivitas dan spesifisitas antara Ziehl Neelsen dan auramin O sama 100%. Sedangkan metode pengecatan gram dan pengamatan SEM tidak bisa dibandingkan karena hanya dapat mengamati morfologi bakteri. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Auramin O dapat digunakan sebagai alternatif pengganti pengecatan Ziehl Neelsen.

Kata Kunci: Mycobacterium Tuberculosis ; Auramin O ; Ziehl Neelsen

Abstract

Technological developments are increasingly rapid in the field of identification and special equipment in the field of microbiology, the development of staining methods and microscopic observation is growing rapidly. The Ziehl Neelsen staining method is still an alternative follow-up to other alternative treatments using the Auramin O staining method with fluorecne microscope observation. This research is an analytical observational study and a cross sectional research design to see the differences in readings between Ziehl Neelsen staining, fluorecne auramin and gram staining. We used isolates that had been identified as Mycobacterium tuberculosis which we obtained from Balepkes and Pak provinces of Central Java under non-activation conditions, by autoclaving at 121 degrees for 15 minutes. The number of samples was 10 slides with Ziehl Neelsen staining, Fluorecne Auramin and Gram staining. The results of the sensitivity and specificity research between Ziehl Neelsen and auramin O were 100%. Meanwhile, the gram staining method and SEM observation cannot be compared because they can only observe bacterial morphology. From the research results it can be concluded that Auramin O can be used as an alternative Ziehl Neelsen painting agent.

Keyword: Mycobacterium Tuberculosis ; Auramin O ; Ziehl Neelsen



1. Pendahuluan

Pemerintah berupaya keras dalam usaha memberantas penyakit tuberculosisdengan membentuk program Temukan TB Obati Sampai Sembuh (TOS TB) membebaskan masyarakat Indonesia dari penyakit Tuberculosis di tahun2025, pengobatan strategi DOTS merupakan upaya terbaik dalammengobati TB, akantetapi muncul permasalahan lain terkait dengan pengobatan salah satunya timbulnyaresistensi terhadap OAT. Resistensi pada M. tuberculosis terjadi secara spontan untuk INH dengan frekuensi 1 dari 105-106 basil per generasi (Zhang and Yew, 2015), (Zheng et al., 2016). Resistensi M. tuberculosis terhadap obat disebabkan karena adanya mutasi spontanpadagenkromosom selain itu karena pengaruh seleksi strain yang resisten selamaprosesterapi (Kochi and Styblo, 1992). Perkembangan resistensi INH adalah awal munculnya MDR sebagai hasil akuisisi dari mutasi gen untuk target obat yang berbeda, diperberatdengan kasus HIV dan ketidakpatuhan pasien dalam pengobatan (Rattan et al., 1998). Selama ini dalam diaknosa penyakit TB digunakan tiga macam cara untuk menentukan adanya infeksi M. tuberculosis, walaupun masing-masing mempunyai kelebihan dan keterbatasan. Cara identifikasi langsung adanya bakteri tahanasamdengan mikroskop sangat cepat, tetapi kurang sensitif karena sampel harusmengandung minimal 104 sel / per ml. Cara kultur dapat menghasilkan 100% terjadi pertumbuhan, apabila sampel positif, Mycobacteriumpada mediabiakansangat lambat, yaitu antara 4-6 minggu . Cara Rapi *Test Ag MTb* mendeteksi sangatpraktis penggunaannya dalam klinik, tetapi kelemahannya kurang sensitivedankurang spesifik, pemeriksaan fluoresen merupakan salah satu cara mendeteksi mycobacterium yang mungkin bisa dikembangkan sebagai alternatif Perlu pengembangan metode penentuan Mycobateria pada sampel klinis bersifat sensitif, cepat. Dalam penelitian ini kami membandingkan hasil dari tiga metode pengecatan gram, (Ziehl-Neelsen), fluorescent auramine pada pemeriksaan *Mycobacterium tuberculosis* .penelitian mengenai metode pemeriksaan mikroskopis sudah banyak dilakukan diantaranya teknik pengecatan Ziehl Neelsen memiliki keuntungan dalam segi biaya dan prosedur yang mudah dalam proses pewarnaan memiliki kekurangan dalam pengamatan harus mendapatkan pelatihan khusus untuk menjadi ahli dalam identifikasi mikroskopis TBC. Pengecatan fluosen meiliki kelebihan hanya pada kemudahan dalam pengamatan tapi banyak kekurangan diantaranya biaya investasi tinggi untuk metode ini diantaranya mikroskop khusus fluosen dan harga reagen yang relatif mahal, pengecatan gram tidak bisa digunakan dalam pengecatan *Mycobacterium tuberculosis* dikarenakan bakteri ini memeiliki lapisan Asam mikolat yang cukup tebal sehingga pengecatan ini tidak mampu menembus dinding sel. Pengamatan mikroskop elektron memiliki kelebihan dalam ukuran sel yang dapat mencapai 30000X cocok untuk mengamati perubahan dinding sel bakteri akibat perlakuan terhadap obat yang berefek pada dinding sel dan tidak cocok untuk melakukan identifikasi.

2. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian Observasional Analitik dan desain penelitian cross sectional untuk melihat perbedaan pembacaan antara pewarnaan Ziehl neelsen , fluosen auramin dan pegecatan gram. Kami menggunakan isolat yang telah diidentifikasi sebagai *Mycobacterium tuberculosis* yang kami peroleh dari Balepkes dan Pak provinsi Jawa Tengah dalam kondisi non-aktivasi, dengan autoklaf pada suhu 121 derajat selama 15 menit. Jumlah sampel sebanyak 10 slide dengan pewarnaan Ziehl neelsen , fluosen auramin dan pegecatan gram.

Pembuatan preparat metode konvensional untuk identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan dengan cara membuat lingkaran pipih dan tipis dengan ukuran 2 x 3 cm, kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan Ziehl Neelsen (Widodo and Priyatno, 2020), (Widodo et al., 2017), (Zheng and Av-Gay, 2017), (Zheng et al., 2016), (Ludam and Jena, 2019).

Pewarnaan gram sesuai prosedur pengecatan dengan menggunakan gram A yang berisi kristal violet selama 5 menit, dilanjutkan dengan larutan yodium selama 30 detik, penghilangan

warna dengan campuran entanol dan aseton hingga bersih, kemudian digenangi dengan larutan fuchsin selama 60 detik.

Pengecatan fluoresen TB Auramine O menggunakan 4 tahap, tahap pertama fiksasi menggunakan pembakar bunsen pada kaca objek hingga hangat, tahap kedua perendaman dengan TB Auramine O selama maksimal 15 menit, tahap ketiga pencucian dengan aquades dan dekolorisasi. selama 3 menit, tahap keempat yaitu pencucian dengan aquades dan perendaman dengan kalium permanganat selama 4 menit, lakukan pengamatan dengan mikroskop fluoresen.

Pewarnaan Ziehl Neelsen dengan konsentrasi 1 % Carbol-fuchsin, 3% alkohol HCl dan 0,1 Methylene Blue. Bakteri akan berwarna merah muda sedangkan latar belakang berwarna biru (Imtiaz et al., 2021);(G. et al., 2017); (State, 2021)

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mikroskop elektron Hitachi 3000 X, Mikroskop fluoresen leica , mikroskop digital zeiss dengan kamera Axiom dan alat previ color gram. Hasil dianalisis secara diskriptif untuk melihat pengaruh pengecatan. Penelitian dilaksanakan di Balekkes dan pak Provinsi Jawa Tengah, Mikrobiologi Unsoed dan Poltekkes Kemenkes Semarang. Dengan menggunakan Komite Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Semarang No. 0258/EA/KEPK/2022

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil

Hasil pemeriksaan mikroskopis yang dapat dibandingkan hanya pewarnaan Ziehl Neelsen dan fluoresen auramin sedangkan pengecatan gram dan Scanning mikroskopis elektron dibahas secara diskriptif . pada tabel dibawah ini terdapat data pengecatan Ziehl Neelsen dan Auramin O

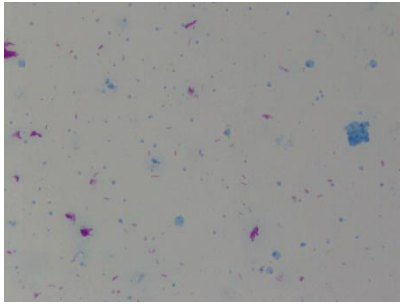
Tabel 1. Hasil Pemeriksaan

Ziehl Neelsen	Auramin Positif	Negatif
Positif	10	0
Negatif	0	5

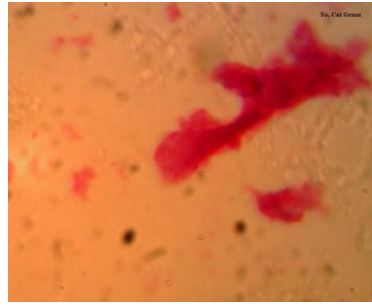
Keterangan Positif : *Mycobacterium tuberculosis*, Negatif :
Escherichia coli

Hasil pemeriksaan dilakukan uji Sensitifitas dimana hasil positif mendapatkan hasil positif antara metode Ziehl Neelsen dan Auramin memiliki nilai 100% , Sedangkan uji spesitifitas dimana hasil negatif mendapatkan hasil negatif dengan nilai 100% . secara mikroskopis masing masing metode ditampilkan pada gambar dibawah ini. Sedangkan hasil perbandingan antara morfologi *Mycobacterium tuberculosis* dengan berbagai metode pengecatan dapat ditampilkan sebagai berikut. Menurut penelitian monika bahwa Auramin o lebih sensitif bila dibandingkan dengan pengecatan Ziehl Neelsen dan memiliki waktu yang lebih singkat dalam melakukan pengamatan (Broor et al., 2023).

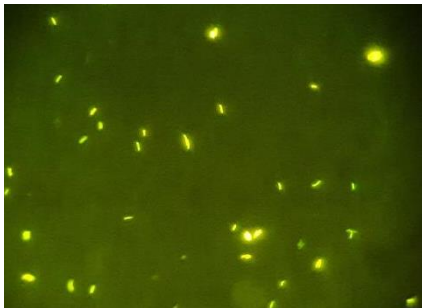
Gambar 1. Morfologi *Mycobacterium tuberculosis* a. Pengecatan gram, b. Pengecatan gram c. Pengecatan fluorescent, d. Mikroskop sem



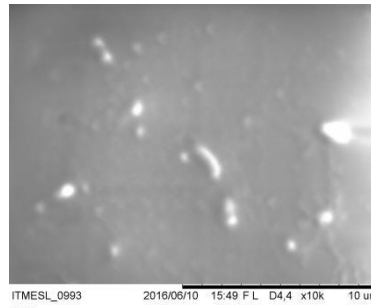
a. Morfologi
Mycobacterium tuberculosis
pengecatan ZN



b. Morfologi
Mycobacterium tuberculosis
pengecatan gram



c. Morfologi
Mycobacterium tuberculosis
fluorescent auramine



d. Morfologi
Mycobacterium tuberculosis
dengan mikroskop sem

Hasil Pengamatan Mikroskopis pada gambar A dengan pewarnaan ZN *Mycobacterium tuberculosis* terwarnai merah Carbol fuksin yang tetap di dalam sel saat dekolonisasi dengan alcohol asam (Ahmed et al., 2019). Keunikan pengecatan ZN adalah adanya proses pemanasan sehingga pori-pori dari sel *M.tuberculosis* yang didominasi oleh lipid terbuka sehingga cairan warna carbolfuksin bisa masuk kedalam sel pada saat dilunturkan dengan asam kuat untuk sel *M.tuberculosis* mampu mempertahankan zat warna sedangkan bakteri selain *Mycobacterium* melepaskan warna. sehingga *M.tuberculosis* dengan pengecatan ZN mempunyai fisualisasi batang merah.

Gambar B sel *M.tuberculosis* yang diwarnai dengan metode gram menunjukkan warna netral atau cat gram tidak mewarnai sel *Mycobacterium tuberculosis* (Hadano, 2013). *M.tuberculosis* tidak mudah diwarnai gentian Violet pada suhu dingin atau tidak terwarnai gram positif (Trifiro et al., 1990). hal ini dikarenakan struktur dinding sel yang kompleks mengandung peptidoglikan. Lebih dari 60 % dinding sel terdiri dari lipid. Bagian lipid dinding sel terdiri dari tiga komponen Lilin D, asam Mycolic. Tingginya konsentrasi lipid pada dinding sel memberikan kemampuan dalam perlawanan terhadap antibiotic, memberikan ketahanan terhadap lisis osmotic, memberikan ketahanan terhadap asam dan senyawa alkali. (Agarwal et al., 2021).

Gambar C. *Mycobacterium tuberculosis* pewarnaan fluorescent auramine pewarnaan fluroscent dengan menggunakan pewarna auramine untuk prosedur hampir sama dengan pewarnaan Ziehl Neelsen. Untuk prosedur dengan auramine slide dihangatkan sampe pada suhu 70 °C lama pengecatan selama 15 menit, pelunturan warna cat dengan alcohol asam dan pemberian latar gelap dengan menggunakan potassium permanganat. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop leica DM 750 yang dilengkapi alat fluorescent dengan led berwarna biru. (Gizaw et al., 2020)

Gambar D. *Mycobacterium tuberculosis* diamati dengan menggunakan mikroskop elektron dengan perbesaran 10000 x sehingga bagian permukaan sel terlihat jelas, dengan menggunakan mikroskop ini sel bakteri tuberculosis yang ukurannya 1 – 4 μm akan nampak lebih jelas dan mudah diamati. Kekurangan dari mikroskop ini adalah tidak dapat digunakan dengan menggunakan pengecatan Ziehl Neelsen maupun fluorescent auramine sehingga tidak dapat membedakan sel apa yang kita amati sebelum kita mengidentifikasi terlebih dahulu.

Metode deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan menggunakan pewarnaan mungkin sudah bergeser fungsi yang awalnya sebagai diagnostik sekarang sebagai follow up pengobatan. Pergeseran ini tentu mengurangi fungsi dan frekuensi penggunaan metode Ziehl neelsen sebagai diagnostik tuberculosis, penelitian kami hanya membandingkan metode pengecatan dan pengamatan *Mycobacterium tuberculosis* untuk menambah khasanah ilmu dalam bidang mikrobiologi.

Pengecatan gram merupakan pengecatan yang sangat populer fungsi utamanya untuk membedakan antara kelompok bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Pengecatan gram tidak cocok digunakan untuk pengecatan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dikarenakan bakteri ini *Mycobacterium tuberculosis* memiliki dinding sel kaya lipid, Asam mikolat (MA) yang berperan dalam patogenesis, virulensi dan pertahanan hidup dalam lingkungan yang keras (Laval et al., 2021).

Asam mikolat tersusun dari rantai panjang 2-alkil, asam lemak 3 hidroksi, tersusun dari asam alfa, metoksi dan keto mikolat mengandung lapisan lilin membuat permukaan hidrofobik dan tidak larut alkohol akan tetapi larut pada eter karena nonpolar (Agarwal et al., 2021).

Asam mikolat (MA), yang memainkan peran penting dalam patogenesis, virulensi, dan kelangsungan hidup dengan melindungi sel terhadap lingkungan yang keras. Penelitian telah menunjukkan bahwa gen yang mengkode enzim yang terlibat dalam sintesis MA sangat penting untuk fungsi mikobakteri. Medeiros, et al (2021). Paling utama tidak mampunya adalah tidak adanya pemanasan pada proses pewarnaan gram.

Pewarnaan Ziehl neelsen dan fluocen auramine memiliki beberapa kesamaan pada metode pemanasan saat pemberian pewarna utama dan dekolonisasi dengan menggunakan alkohol asam, untuk pewarnaan Ziehl neelsen berwarna merah sedangkan pewarnaan auramine berwarna hijau berpendar menggunakan fluocen, kedua metode ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang sama dalam mengidentifikasi *Mycobacterium tuberculosis* tetapi ada perbedaan dalam segi biaya pengecatan fluocen jauh lebih mahal dalam segi investasi peralatan dan reagen.

Pengamatan dengan SEM memiliki keunggulan dalam segi kecepatan dan kemudahan semua sistem sudah otomatis sehingga mudah dalam pengoprasian, beberapa kelemahan diantaranya tidak dapat digunakan untuk diagnostik, investasi peralatan mahal. Memiliki keunggulan ukuran sel bisa diperbesar sampe 30.000 X .

Pengujian terhadap 2 metode yang digunakan dalam mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* Auramin O memiliki sensitivitas yang sama dengan Ziehl Neelsen ditambah keuntungan lebih cepat dalam melakukan pengamatan

4. Simpulan dan Saran

Simpulan

Auramin O memiliki sensitivitas yang sama dengan Ziehl Neelsen sehingga dapat digunakan sebagai pengganti.

Saran

Perlu dilakukan pengujian lebih dengan menggunakan sampel sputum karena pada penelitian ini menggunakan sampel isolat klinis.

5. Daftar Pustaka

- Ahmed, G.M., Mohammed, A.S.A., Taha, A.A., Almatroudi, A., Allemailem, K.S., Babiker, A.Y., Alsammani, M.A. (2019). Comparison of the microwave-heated ziehl-neelsen stain and conventional ziehl-neelsen method in the detection of acid-fast bacilli in lymph node biopsies. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 7, 903–907. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.215>
- Hadano, Y. (2013). Gram-ghost cells. *BMJ Case Rep.* 2012–2013. <https://doi.org/10.1136/bcr-2012-008477>
- Kochi, A., Styblo, K. (1992). *J II'orld Health Organization Tuberculosis Programme.*
- Laval, T., Chaumont, L., Demangel, C. (2021). Not too fat to fight: The emerging role of macrophage fatty acid metabolism in immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol. Rev.* 301, 84–97. <https://doi.org/10.1111/imr.12952>
- Ludam, R., Jena, B. (2019). Microscopic versus culture methods for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*: Our experience. *Int. J. Adv. Res. Med.* 1, 109–111. <https://doi.org/10.22271/27069567.2019.v1.i2b.93>
- Medeiros, T.F., Scheffer, M.C., Verza, M., Salvato, R.S., Schörner, M.A., Barazzetti, F.H., Rovaris, D.B., Bazzo, M.L. (2021). Genomic characterization of variants on mycolic acid metabolism genes in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Santa Catarina, Southern Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 96. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105107>
- Rattan, A., Kalia, A., Ahmad, N. (1998). Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 195–209. <https://doi.org/10.3201/eid0402.980207>
- State, O. (2021). Efficacy of Fluorescence Light Emitting Diode (LED) Microscopy for Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Sputum of Patients Attending a Tertiary Hospital in Osogbo 3.
- Trifiro, S., Bourgault, A.M., Lebel, F., Rene, P. (1990). Ghost mycobacteria on Gram stain. *J. Clin. Microbiol.* 28, 146–147. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.1.146-147.1990>
- Widodo, W., Irianto, A., Pramono, H. (2017). Karakteristik Morfologi *Mycobacterium tuberculosis* yang Terpapar Obat Anti TB Isoniazid (INH) secara Morfologi. *Biosfera* 33, 109. <https://doi.org/10.20884/1.mib.2016.33.3.316>
- Widodo, W., Priyatno, D. (2020). Detection Of The Resistance Of *Mycobacterium Tuberculosis* From Specimens With Tb Patients In Semarang Balkesmas. *J. Ris. Kesehat.* <https://doi.org/10.31983/jrk.v9i1.5583>
- Zhang, Y., Yew, W.W. (2015). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Update 2015. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 19, 1276–1289. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0389>
- Zheng, L.H., Jia, H.Y., Liu, X.J., Sun, H.S., Du, F.J., Pan, L.P., Huang, H.R., Zhang, Z.D. (2016). Modified cytospin slide microscopy method for rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 20, 456–461. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0733>
- Zheng, X., Av-Gay, Y. (2017). System for efficacy and cytotoxicity screening of inhibitors targeting intracellular mycobacterium tuberculosis. *J. Vis. Exp.* 2017, 1–8. <https://doi.org/10.3791/55273>