

Efektifitas Waktu fiksasi Preparat Untuk Pewarnaan Basil Tahan Asam Metode Ziehl Neelsen.

K a l m a *)

*) Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes makassar

ABSTRAK

Sampai saat ini diagnosis tuberkulosis paru yang digunakan secara rutin di laboratorium rumah sakit dan laboratorium pusat kesehatan masyarakat adalah diagnosis bakteriologis teknik mikroskopis basil tahan asam (BTA). Teknik mikroskopis BTA dapat dilakukan dalam waktu relatif singkat, tetapi sensitivitas dan spesifisitas teknik ini relatif rendah dibandingkan teknik kultur. *Underdiagnosis* pada kasus tuberkulosis positif dapat terjadi karena teknik diagnosis kurang sensitif atau kurang spesifik. Salah satu faktor yang dapat menyebabkan sensitivitas dan spesifisitas teknik mikroskopis BTA relatif rendah adalah lama waktu fiksasi preparat yang terlalu singkat atau terlalu lama sehingga sulit dibaca atau dinilai hasilnya. Penelitian dilaksanakan pada tanggal 6 sampai 10 April 2015 di Laboratorium Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Makassar. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan sampel 10 sputum penderita tuberkulosis paru BTA positif. Setiap sampel dibuat 5 preparat sehingga jumlah keseluruhan preparat adalah 50. Dari 50 preparat dibagi menjadi 5 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 10 preparat yang masing-masing dari sampel 1 sampai sampel 10. Kelompok 1 difiksasi 1 detik, kelompok 2 difiksasi 2 detik, kelompok 3 difiksasi 3 detik, kelompok 4 difiksasi 4 detik dan kelompok 5 difiksasi 5 detik. Setelah difiksasi seluruh preparat diwarnai dengan pewarnaan Ziehl Neelsen. Selanjutnya dinilai atau dibaca kualitas hasil pewarnaan. Hasil penelitian diperoleh lama waktu fiksasi preparat yang efektif adalah 3 detik..

Kata kunci : Fiksasi, preparat, waktu.

PENDAHULUAN

Laboratorium Kesehatan adalah sarana kesehatan yang melaksanakan pengukuran, penetapan dan pengujian terhadap bahan yang berasal dari manusia untuk penentuan jenis penyakit, penyebab penyakit, kondisi kesehatan dan faktor yang berpengaruh terhadap kesehatan perorangan dan masyarakat.

Dalam menentukan suatu penyakit atau diagnosis, membantu menegakkan diagnosis, mengendalikan penyakit, memonitoring pengobatan dan mengikuti jalannya suatu penyakit, di perlukan pemeriksaan laboratorium yaitu pemeriksaan specimen yang diambil langsung dari pasien.

Pemeriksaan Bakteriologi merupakan salah satu pemeriksaan laboratorium yang digunakan sebagai penunjang diagnosis yang berkaitan dengan terapi dan prognosis. Untuk mendapatkan diagnosis yang tepat diperlukan hasil pemeriksaan yang teliti, akurat dan cepat. Salah satunya adalah pemeriksaan Basil Tahan Asam.(BTA).

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia. Tuberkulosis adalah suatu penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*.

Underdiagnosis pada kasus TB positif dapat terjadi karena tehnik diagnosis yang kurang sensitive dan atau kurang spesifik (Handojo,2001).

Hasil pemeriksaan mikroskopis sediaan hapus dahak yang tidak tepat akan mengakibatkan pasien dengan tuberkolosis tidak terdiagnosis atau pasien tanpa tuberkulosis mendapatkan pengobatan anti tuberkulosis yang tidak diperlukan. Masalah diagnosis ini sangat mendesak untuk dicari dan ditemukan cara penanggulangannya (Handojo, 2001).

Dalam penanggulangan TB paru, diagnosis ditegakkan melalui pemeriksaan dahak secara langsung. Diagnosis paru yang digunakan secara rutin di Laboratorium klinik, Rumah sakit dan Puskesmas adalah diagnosis secara

bakteriologis dengan teknik mikroskopik terhadap BTA pada sediaan apus dahak. Teknik mikroskopis BTA dapat dilakukannya dalam waktu relatif cepat.

Diagnosis TB *paru* dengan sputum memiliki spesifitas dan tingkat kepercayaan yang tinggi, tetapi tidak tertutup kemungkinan sensitivitas relatif rendah karena dipengaruhi oleh beberapa faktor teknis, sehingga memungkinkan terdapat kasus BTA positif yang tidak terdeteksi.

Untuk meningkatkan sensitivitas pemeriksaan mikroskopik, hendaknya memperhatikan faktor-faktor teknis yang dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan, salah satunya adalah lama waktu fiksasi terhadap preparat untuk pewarnaan BTA metode Ziehl Neelsen (ZN). Fiksasi dilakukan di atas nyala api 2-3 kali dalam waktu 2-3 detik dengan tujuan melekatkan sel bakteri pada obyek glass sehingga pada pewarnaan dengan metode Ziehl Neelsen tidak mudah lepas saat pembilasan. Dengan fiksasi yang baik, benar dan waktu yang tepat dapat meningkatkan sensitivitas pemeriksaan mikroskopis (Depkes RI 2006).

Kesalahan yang dapat terjadi pada pemeriksaan BTA dengan pewarnaan Ziehl Neelsen antara lain waktu fiksasi di atas nyala api yang terlalu singkat sehingga menyebabkan spesimen tidak melekat pada obyek glass dengan baik. Sebaliknya jika waktu fiksasi di atas nyala api terlalu lama dapat menyebabkan spesimen pada obyek glass menjadi rusak sehingga tidak dapat dibaca hasilnya,

Mycobacterium tuberculosis berbentuk batang ramping lurus atau sedikit bengkok dengan kedua ujungnya membulat. Bakteri golongan ini agak sulit untuk diwarnai, tetapi sekali berhasil diwarnai, sulit untuk dihapus dengan zat asam oleh karena itu disebut juga sebagai BTA. Sifat tahan asam *Mycobacterium* adalah karena sifat dinding sel yang tebal yang terdiri dari lapisan him (wax) sejenis zat lilin dan lemak serta asam lemak mikolat.

Bahan pemeriksaan untuk pemeriksaan mikroskopis BTA adalah sputum atau dahak. Sputum terbaik untuk diperiksa adalah sputum pagi hari, karena paling banyak mengandung mikobakteria dibandingkan dengan sputum pada saat-saat lain.

Sputum dikumpulkan/ditampung dalam pot yang bermulut lebar, berpenampang 6 cm atau lebih dengan tutup berulir, tidak mudah pecah dan tidak bocor. Apabila ada pasilitas, specimen tersebut dapat dibuat sediaan apus pada gelas objek lalu difiksasi sebelum dilakukan pewarnaan basil tahan asam.

Fiksasi adalah suatu cara atau teknik pemanasan yang dilakukan terhadap preparat sputum BTA sebelum dilakukan pewarnaan Ziehl Neelsen dengan cara preparat dilewatkan 2-3 kali selama 2-3 detik di atas nyala api lampu spiritus atau nyala api Bunsen dengan tujuan untuk melekatkan preparat dengan baik, mematikan sel-sel bakteri dengan cepat, mengawetkan preparat dan mempermudah pengecatan (Fujiki Akiko, 1998).

Pewarnaan BTA metode Ziehl Neelsen tergolong pewarnaan diferensial yang memilah bakteri menjadi kelompok tahan asam dan tidak tahan. Saat ini terdapat beberapa metode pewarnaan tahan asam yang tersedia di laboratorium klinik. Semua didasarkan atas prinsip yang sama dengan perbedaan-perbedaan yang penting dalam rincian protokol pewarnaannya. Secara umum semua metode memerlukan pembuatan apusan yang tipis, pegeringan diudara dan fiksasi panas. Apusan dialiri oleh zat warna primer penetratif, di lunturkan dengan suatu reagen yang mengandung asam kuat dan diberi warna tandingan dengan zat warna kedua. Ada berbagai metode pewarnaan tahan asam dengan teknik yang berbeda diantaranya Pewarnaan Ziehl Neelsen, *Kinyoun Gabbet*.

Prinsip Pewarnaan BTA metode Ziehl Neelsen :

Dengan pemanasan pada pewarnaan Ziehl Neelsen lapisan/pori-pori lipid pada

bakteri akan melebur sehingga zat warna dapat masuk kedalam tubuh bakteri. Bila preparat dingin zat warna tidak dapat terlepas kembali walaupun dilunturkan dengan asam, berbeda dengan bakteri tidak tahan asam yang zat warna pertama akan luntur sehingga mengambil zat warna kedua pada pewarnaan kedua. Bakteri tahan asam berwarna merah dan bakteri tidak tahan asam berwarna biru.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium, melakukan fiksasi preparat untuk pewarnaan Ziehl Neelsen pada sputum BTA positif dengan lama waktu fiksasi yang berbeda, untuk menentukan lama waktu fiksasi preparat efektif untuk pewarnaan Ziehl

Spesimen atau bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah sputum BTA Positif dari penderita tuberculosis paru sebanyak 10 (sepuluh) penderita. Instrument penelitian yang digunakan adalah mikroskop, rak pewarnaan, slide/objek glass, lampu spritus, sengkli/ose/timer, pinset, pipet, lidi, pot tempat sputum, Korek api, Slide Box. Bahan atau reagesia yang digunakan antara lain: larutan Carbol fuchsin 0,3%, HCI-Alkohol 3%, Methylene Blue 0,3%, Aquadest, dan Oil imersi.

Pembuatan sediaan apusan dahak

Pot dahak dan kaca yang beridentitas sama dengan pot dahak diambil. Pot dahak dibuka dengan hati-hati untuk menghindari percikan dahak. Sediaan apus dahak dibuat dengan ose atau sengkli, dengan urutan : ose dipanaskan di atas nyala api Bunsen sampai merah dan dibiarkan sampai dingin, untuk sterilisasi. Dahak dioleskan secara merata dengan bentuk oval pada permukaan kaca objek dengan ukuran sekitar 2 x 3 cm.

Sediaan yang sudah kering diambil dengan pinset pada sisi yang berlabel dengan sediaan dahak menghadap ke atas. Kemudian sediaan tersebut difiksasi dengan cara dilewatkan di atas nyala api sebanyak 2 - 3 kali (waktu bervariasi yakni: 1", 2", 3", 4" dan 5")

Pewarnaan sediaan menggunakan metode Ziehl Neelsen :

Sediaan dahak yang telah difiksasi diletakkan di atas rak pewarnaan dengan sediaan menghadap ke atas kemudian diteteskan larutan karbol fuchsin 0,3 % sampai seluruh sediaan tertutup larutan tersebut. Sediaan dipanaskan dengan nyala api sampai keluar uap hal ini dilakukan 3 kali dalam waktu 5 menit, selanjutnya didiamkan selama 5 menit setelah pemanasan dihentikan. Sediaan dibilas dengan air mengalir pelan kemudian dituangi dengan HCI- alkohol 3% sampai warna merah fuchsin hilang. Selanjutnya dibilas dengan air mengalir pelan lalu sediaan dituangi dengan methilen blue 0,3% sampai seluruh permukaan sediaan tertutup, kemudian didiamkan selama 20 detik lalu bilas dengan air mengalir pelan. Sediaan dikeringkan di udara terbuka, tidak boleh dipanaskan dengan matahari langsung.

Sediaan yang telah diwarnai diamati atau diperiksa dengan menggunakan mikroskop dengan lensa okuler 10 x dan objektif 100x menggunakan minyak imersi. Pemeriksaan dimulai dari ujung kiri dan digeser terus secara horizontal ke kanan kemudian digeser kebawah, selanjutnya kembali ke kiri.

Penilaian atau pembacaan hasil pewarnaan:

- Sangat kontras : BTA berwarna merah jelas dengan latar belakang biru jelas.
- Kontras : BTA berwarna merah dengan latar belakang biru muda.
- Kurang kontras : BTA berwarna merah muda dengan latar belakang biru kerah-merahan.

Data yang terkumpul ditabulasikan kemudian diuji dengan uji t-studen dan *SPSS rel 11,0 for windows*, uji Analisa Of Variance (ANOVA) untuk membuktikan ada tidaknya perbedaan yang signifikan pada hasil fiksasi preparat untuk pewarnaan metode Ziehl Neelsen dengan perlakuan lama waktu fiksasi berbeda pada sampel penelitian, untuk menentukan lama waktu fiksasi yang efektif untuk pewarnaan BTA metode Ziehl Neelsen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Dari pemeriksaan mikroskop diperoleh hasil sebagai berikut yang dibuat dalam bentuk tabel dibawah ini

Tabel 1. Kualitas hasil pewarnaan basil tahan asam (BTA) metode Ziehl Neelsen dengan waktu fiksasi 1 detik

No	Kode Sampel	Kualitas Hasil Pewarnaan	Skor (bobot)
1	A01	Kurang kontras	1
2	B01	Kurang kontras	1
3	C01	Kurang kontras	1
4	D01	Kurang kontras	1
5	E01	Kontras	2
6	F01	Kurang kontras	1
7	G01	Kurang kontras	1
8	H01	Kontras	2
9	I 01	Kurang kontras	1
10	J01	Kurang kontras	1

Tabel 2 . Kualitas hasil pewarnaan basil tahan asam (BTA) metode Ziehl Neelsen dengan waktu fiksasi 2 detik :

No	Kode Sampel	Kualitas Hasil Pewarnaan	Skor (bobot)
1	A02	Kurang kontras	1
2	B02	Kontras	2
3	C02	Kurang kontras	1
4	D02	Sangat kontras	3
5	E02	Kontras	2
6	F02	Kontras	2
7	G02	Kontras	2
8	H02	Kontras	2
9	I 02	Kontras	2
10	J02	Kontras	2

Tabel 3 : Kualitas hasil pewarnaan basil tahan asam (BTA) metode Ziehl Neelsen dengan waktu fiksasi 3 detik :

No	Kode Sampel	Kualitas Hasil Pewarnaan	Skor (bobot)
1	A03	Sangat kontras	3
2	B03	Sangat kontras	3
3	C03	Kontras	2
4	D03	Sangat kontras	3
5	E03	Sangat kontras	3

6	F03	Sangat kontras	3
7	G03	Sangat kontras	3
8	H03	Kontras	2
9	I 03	Sangat kontras	3
10	J03	Sangat kontras	3

Tabel 4 : Kualitas hasil pewarnaan basil tahan asam (BTA) metode Ziehl Neelsen dengan waktu fiksasi 4 detik :

No	Kode Sampel	Kualitas Hasil Pewarnaan	Skor (bobot)
1	A04	Kontras	2
2	B04	Sangat	3
3	C04	kontras	2
4	D04	Kontras	1
5	E04	Kurang	2
6	F04	kontras	2
7	G04	Kontras	2
8	H04	Kontras	1
9	I 04	Kontras	2
10	J04	Kurang kontras	2
		Kontras	
		Kontras	

Tabel 5 : Kualitas hasil pewarnaan basil tahan asam (BTA) metode Ziehl Neelsen dengan waktu fiksasi 5 detik :

No	Kode Sampel	Kualitas Hasil Pewarnaan	Skor (bobot)
1	A05	Kurang kontras	1
2	B05	Kurang kontras	1
3	C05	Kontras	2
4	D05	Kurang kontras	1
5	E05	Kurang kontras	1
6	F05	Kontras	2
7	G05	Kontras	2
8	H05	Kontras	2
9	I 05	Kurang kontras	1
10	J05	Kurang kontras	1

B. Pembahasan

Berdasarkan hasil pewarnaan, dari 5 (lima) variasi waktu fiksasi yang di teliti ada 3 (tiga) variasi waktu yang memberikan kualitas hasil pewarnaan yang baik yakni 2 detik, 3 detik dan 4 detik. Hasil uji statistik ternyata dari 5 variasi waktu yang diteliti ada satu variasi waktu yang memberikan kualitas hasil pewarnaan yang sangat baik yakni 3 detik.

Hasil penilaian kualitas pewarnaan basil tahan asam metode Ziehl Neelsen dengan lama waktu fiksasi berbeda pada penelitian ini, ternyata untuk lama waktu fiksasi 1(satu) detik dan 5 (lima) detik memberikan kualitas hasil pewarnaan yang tidak baik.

Untuk lama waktu fiksasi 2 detik dengan 5 detik terdapat perbedaan yang signifikan, demikian pula dengan lama waktu fiksasi 3 detik dengan 4 detik, lama waktu fiksasi 3 detik dengan 5 detik dan lama waktu fiksasi 4 detik dengan 5 detik menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Untuk lama waktu fiksasi 4 detik dengan 5 detik meskipun interval waktunya tidak lama, tetapi dengan lama waktu fiksasi 5 detik dapat mengakibatkan kerusakan pada *Mycobacterium tuberculosis* sehingga memungkinkan zat warna metilen biru dapat masuk, bahkan dapat merusak morfologi kuman akibat temperatur yang terlalu tinggi, juga bisa membuat *Mycobacterium tuberculosis* kehilangan sifat asamnya, artinya lama waktu fiksasi 5 detik sudah tidak efektif lagi pada pewarnaan basil tahan asam metode Zierhl Neelsen.

Mycobacterium tuberculosis yang termasuk mikroorganisme bersifat tahan asam, dengan pewarnaan basil tahan asam metode Ziehl Neelsen akan berwarna merah karena mempunyai sifat yang khas, yaitu kemampuan mengikat zat warna karbolfoksin secara kuat sehingga tidak luntur atau tidak hilang meskipun dicuci dengan pelarut zat warna yang kuat dalam hal ini asam dan alcohol.

Jika *Mycobacterium tuberculosis* kehilangan sifat asamnya, maka kemungkinan tidak berwarna merah pada pewarnaan basil tahan asam tetapi berwarna biru. Jika hal ini terjadi akan mengakibatkan negatif palsu pada pemeriksaan mikroskopis basil tahan asam, lain halnya pada lama waktu fiksasi 1 detik, dapat menyebabkan negatif palsu disebabkan karena waktu fiksasi yang singkat membuat daya lengket sputum dan *Mycobacterium tuberculosis* pada obyek glass tidak baik, sehingga saat pembilasan pada pewarnaan basil tahan asam metode

Ziehl Neelsen dapat terlepas. Demikian juga waktu fiksasi 1 detik terlalu singkat waktunya sehingga belum bisa memberikan efek panas yang cukup untuk membuka pori-pori selubung dari *Mycobacterium tuberculosis* dan menyebabkan hasil pemeriksaan negative palsu.

Hasil pemeriksaan mikroskopis basil tahan asam negatif palsu akan berakibat penyakit penderita bertambah parah karena tidak mendapatkan obat anti tubekulosis, dan penderita tersbut akan berperan sebagai sumber penularan penyakit tuberkulosis bagi orang yang sering kontak dengan penderita tersebut.

Bakteri dikatakan tahan asam karena dapat mempertahankan zat warna primer (Carbol Fuchsin) walaupun dicuci dengan larutan peluntur yang mengandung asam dan alcohol. Sebaliknya bakteri yang tidak tahan asam, zat warna primer larut dengan larutan peluntur, sehingga akan menerap zat warna kedua (methilen biru).

Pemeriksaan dahak secara mikroskopis merupakan pemeriksaan yang paling efisien, mudah dan murah, dan hampir semua unit laboratorim dapat melaksanakan. Pemeriksaan spesimen sputum sewaktu pagi sewaktu (SPS) secara mikroskopis langsung nilainya identik dengan pemeriksaan sputum secara kultur atau biakan (Depkes RI, 2006).

Cara pengambilan dahak 3 kali (SPS)

- a. Sewaktu (sputum sewaktu saat kunjungan)
- b. Pagi (keesokan harinya)
- c. Sewaktu (pada saat mengantarkan sputum pagi)

DAFTAR PUSTAKA

Akiko F, 1998 ,TB Mikroskopy. International Koorperation Departemen The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Assosiation.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2006, Pedoman Nasional PenanggulanganTuberkulosis,

DIT JEN PPM DAN PLP
Cetakan 10, Jakarta.

Gani A. 2003, Metode Bakteriologi Diagnostik, Balai Laboratorium Makassar.

Handojo I, 2001. Immunokromatographic Assay. Surabaya: Laboratorium Patologi Klinik

Jawetz, Melnick, Adelberg's, 1991. Medical Microbiology. Nineteenth Edition. USA, Mexico, Canada: Prentice-Hall International Inc.

Misnadiarly, 2006, Tuberkulosis Dan Mikobakterium Atipik, Dian Rakyat, Jakarta.

Rieder HL, Chonde TM, Myking H, Urbanczik R, Laszlo, A, Kim SJ, Van Deun A, Trebucq A, 1998. The Public Health Service Tuberculosis Reference Laboratory and National Laboratory Network. Paris Prance: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.

Sastroasmoro S dan Ismael S, 1995. Dadar-Dasar Penelitian Klinis. Jakarta: Bina Aksara.