



Metode mikrokoloni (slide culture) sebagai metode diagnostic alternative yang lebih cepat untuk diagnosis tuberculosis paru

Microcolony (slide culture) method as an alternative diagnostic method for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis

Eko Budi Koendhori, Setio Harsono

Department of Microbiology, AIRLANGGA UNIVERSITY School of Medicine, Surabaya

KEYWORDS *Mycobacterium tuberculosis; Ziehl Neelsen; Lowenstein Jensen; sputum*

ABSTRACT *Despite wide distribution of pulmonary tuberculosis in Indonesia, its diagnosis is still an important issue to be dealt with. Forty seven sputums from pulmonary tuberculosis patients in Surabaya were examined to detect Mycobacterium tuberculosis using three methods, i.e. the acid fast stain Ziehl Neelsen, microcolony (slide culture) and Lowenstein Jensen. Sputums were collected spontaneously from the patients. All of them were decontaminated and centrifuged. After the supernatant fluids were carefully decanted, the sediments were resuspended in 1 ml of 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and the suspensions were then inoculated on to two 76 x 13 mm glass microscope slides. One of them was stained by Ziehl Neelsen method and the other was inoculated into microcolony media for seven days and the waste suspension was inoculated into Lowenstein Jensen media. The results of the microcolony method analysis were compared with the Ziehl Neelsen staining. Employing McNemar test, a significant difference was observed between the microcolony method and the Ziehl Neelsen staining ($\chi^2 = 5,88$). The sensitivity and specificity of microcolony were 100% and 89% while the Ziehl Neelsen were 60% and 84% respectively. In conclusions microcolony method was better compared with the Ziehl Neelsen staining in the detection of Mycobacterium tuberculosis. Microcolony method was able to reduce time required to detect Mycobacterium tuberculosis in patient suspected with pulmonary tuberculosis.*

Di Indonesia penyakit tuberculosis (TB) masih merupakan masalah kesehatan, dan diperkirakan sekitar 500.000 orang setiap tahunnya menderita TB paru dengan basil tahan asam (BTA) positif. Menurut Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) oleh Departemen Kesehatan tahun 1992 ternyata TB merupakan penyebab kematian ke dua di Indonesia, sedangkan menurut Survey Kesehatan Rumah Tangga tahun 1986 TB masih menduduki peringkat ke empat dalam pola penyebab kematian di Indonesia (Ignatia & Handojo, 1997).

Sampai saat ini diagnosis laboratorium penyakit tuberculosis masih merupakan masalah yang penting di Indonesia (Handojo, 1996). Telah banyak uji laboratorium untuk tuberculosis (TB) yang dikembangkan dan dipakai di Indonesia, namun belum ada satupun yang secara tunggal benar-benar dapat memenuhi syarat dari suatu uji laboratorium yang ideal untuk tuberculosis di Indonesia (Handojo, 1996). Dalam rangka pencarian kasus tuberculosis guna mematahkan rantai penularan penyakit, untuk negara berkembang seperti Indonesia, dibutuhkan sarana diagnostik yang tidak saja bersifat andal (sensitif dan spesifik) tetapi

juga praktis dalam pelaksanaannya dan murah biayanya (Handojo, 1996).

Dalam hal ini, peran uji BTA dahak sebagai uji laboratorium penyaring yang terdepan, masih belum sepenuhnya bisa digantikan oleh uji laboratorium yang lain, sebab sampai saat ini belum ada uji laboratorium untuk TB yang sekaligus lebih sederhana, lebih murah dan lebih spesifik daripada uji BTA dahak. Sayangnya uji BTA dahak ini kurang sensitif (Handojo, 1996; Kim *et al.*, 1984).

Kultur kuman pada media padat merupakan cara pemeriksaan yang paling akurat karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi sebagai diagnosis pasti *Mycobacterium tuberculosis*, akan tetapi metode ini masih memiliki kelemahan dalam hal kecepatannya. Untuk kultur konvensional yang menggunakan media Lowenstein Jensen paling tidak dibutuhkan waktu antara 3-8 minggu (Jonas *et al.*, 1993; Abe *et al.*, 1992).

Correspondence :

Dr. Eko Budi Koendhori, M.Kes., Department of Mikrobiologi, Airlangga University School of Medicine, Surabaya, Jalan Mayjen. Prof. Dr. Moestopo 47, Surabaya, E-mail dr_ekokoeri@yahoo.com

Dalam penelitian ini peneliti memodifikasi tehnik kultur mikrokoloni (slide culture) yang menggunakan darah sebagai bahan baku dari mediana. Dengan tehnik mikrokoloni selain bisa didapatkan hasil yang lebih cepat juga lebih murah karena tidak diperlukan media khusus seperti Lowenstein Jensen atau yang lainnya namun cukup dengan media darah manusia yang bisa diambil dari darah di PMI yang tidak terpakai.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan penelitian diambil dari sputum yang diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi RSUD Dr.Soetomo dan dari Ruang Penyakit Paru RSUD Dr.Soetomo.

Cara Kerja

Pengambilan Spesimen

Spesimen diambil dari sputum pasien secara spontan pada pagi hari, mula-mula pasien disuruh menarik nafas dalam, ditahan sebentar, kemudian dibatukkan dengan kuat. Air liur dan lendir dari hidung dibuang. Sputum harus bebas dari partikel makanan dan sisa kotoran lain (Baron *et al.*, 1992).

Dekontaminasi Spesimen

Semua spesimen didekontaminasi dengan sodium hidroksida. Dua bagian volume dari NaOH 4% dicampur dengan spesimen sputum dalam sebuah tabung mixer dan diaduk selama 15 detik, kemudian didiamkan selama 15 menit dalam suhu ruangan. Selanjutnya ditambahkan 10 bagian volume bufer fosfat 10 mM (pH 7,4), lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 x g selama 30 menit. Setelah supernatan dibuang maka endapannya disuspensikan dengan 1 ml bufer yang sama kemudian dibuat hapusan (Welch *et al.*, 1993; Lennette *et al.*, 1985).

Pembuatan preparat hapus

Gelas obyek ukuran 76 x 26 mm dipotong memanjang sehingga bisa dimasukkan ke dalam tabung screwcapped. Hapusan dibuat dengan jalan menghapuskan sputum yang telah didekontaminasi di atas gelas obyek seluas kurang lebih 25 x10 mm kemudian dibiarkan mengering tanpa pemanasan (Allen, 1981).

Pembuatan media mikrokoloni

Media dasar dibuat dengan jalan mencampurkan satu bagian volume darah dengan dua bagian volume air suling. Untuk lebih memastikan terjadinya lisis darah secara komplit maka ditam-

bahkan larutan steril saponin putih hingga mencapai konsentrasi akhir 500 mg/l. Media kemudian dimasukkan ke dalam tabung *screw-capped* dan bisa disimpan dalam suhu 4° C selama lebih dari 4 minggu (Allen, 1981).

Penanaman dengan metode mikrokoloni

Preparat hapus dimasukkan ke dalam botol yang mengandung media yang telah dibuat sampai hapusannya terendam media dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 37° C. Setelah diinkubasi preparat hapus dikeluarkan dari media, dicuci pelan-pelan dengan air suling kemudian dicelupkan dalam larutan glutaraldehida 2% selama 30 menit. Hapusan kemudian diwarnai dengan pewarnaan Ziehl Neelsen lalu dilihat di bawah mikroskop. Bila ada pertumbuhan mikroorganisma akan terlihat bentukan batang merah bahkan sering membentuk "*cord formation*" (Allen, 1981).

Penanaman pada media Lowenstein Jensen

Sputum yang telah didekontaminasi ditanam pada media Lowenstein Jensen kemudian pertumbuhan koloni kumannya diamati mulai minggu pertama sampai ke delapan. Setelah tampak pertumbuhan koloni kumannya, koloni diambil lalu dibuat hapusan pada gelas obyek kemudian diwarnai dengan pewarnaan Ziehl Neelsen.

Pembacaan hapusan

Ada beberapa kriteria pembacaan hasil pewarnaan Ziehl Neelsen, American Lung Association sebagaimana yang tercantum dalam Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology edisi 9 membuat kriteria sebagaimana terlihat pada Tabel 1 (Baron & Finegold,1992).

Tabel 1. Kriteria hasil pembacaan BTA

Jumlah BTA terlihat	Pelaporan
1-2 per hapusan specimen	negatif
3-9 per hapusan	jarang (+1)
10 atau lebih per hapusan	sedikit (+2)
1 atau lebih per lapang pandang dengan oli imersi	banyak (+3)

Dalam hal ini peneliti menggunakan kriteria yang dibuat oleh American Lung Association tersebut dengan sedikit modifikasi yaitu untuk kriteria penilaian negatif adalah ditemukan BTA sebanyak 0-2 untuk tiap hapusan spesimen, sedangkan untuk penilaian positif (+1), (+2) dan (+3) dianggap sebagai positif saja.

HASIL

1. Perbandingan antara metode mikrokoloni dengan pewarnaan Ziehl Neelsen

Tabel 2. Uji McNemar dari hasil metode mikrokoloni dan Ziehl Neelsen

		Ziehl Neelsen		
		(+)	(-)	Jumlah
Mikro koloni	(+)	16	14	30
	(-)	3	14	17
Jumlah		19	28	47

$$\alpha^2_{hit} = 5,88$$

$$\alpha^2_{tab}(1,1-\alpha) \text{ dengan } \alpha = 0,05 \text{ maka } \alpha^2(1,095) = 3,84$$

karena $\alpha^2_{hit} > \alpha^2_{tab}$ maka berarti ada perbedaan yang bermakna antara hasil pemeriksaan BTA langsung dengan metode mikrokoloni untuk $\alpha = 0,05$

2. Perbandingan waktu antara metode mikrokoloni dan Lowenstein Jensen

Untuk melihat perbandingan waktu antara metode mikrokoloni dan Lowenstein Jensen dilakukan uji t. Hasil uji homogenitas memperlihatkan hasil bahwa ternyata variansi dari ke dua populasi di atas adalah sama atau homogen sehingga dipergunakan uji t untuk populasi yang homogen (pooled).

$$t_h = 7,18; \quad t_{tabel} = 1,734$$

karena $t_h > t_{tabel}$ maka berarti ada perbedaan waktu yang bermakna antara kultur dengan media Lowenstein Jensen dan kultur dengan metode mikrokoloni (slide culture).

3. Uji Diagnostik Metode Mikrokoloni

Hasil uji diagnostik dari metode mikrokoloni pada hari ke tujuh bila dibanding dengan metode standar adalah sebagai berikut:

$$\text{Sensitivitas} = 100\% \quad \text{positive predictive value} = 83,3\%$$

$$\text{Spesifisitas} = 89\% \quad \text{negative predictive value} = 100\%$$

4. Uji Diagnostik Ziehl Neelsen

Hasil uji diagnostik metode Ziehl Neelsen bila dibanding dengan metode standar adalah sebagai berikut:

$$\text{Sensitivitas} = 60\% \quad \text{positive predictive value} = 66,7\%$$

$$\text{Spesifisitas} = 84\% \quad \text{negative predictive value} = 80\%$$

PEMBAHASAN

1. Hasil Pewarnaan Ziehl-Neelsen Dari Hapusan Sedimen Sebelum Dan Setelah Ditanam Pada Metode Mikrokoloni

Pada penelitian ini dari sejumlah 47 sampel didapatkan 14 sampel (30%) positif setelah

ditanam pada metode mikrokoloni yang negatif pada pewarnaan langsung. Hal ini adalah suatu hal yang wajar mengingat dengan metode mikrokoloni berarti kuman *Mycobacterium tuberculosis* dikembang biakkan terlebih dahulu sebelum kemudian diwarnai.

Agar *Mycobacterium tuberculosis* terlihat di bawah mikroskop paling tidak minimal harus ada 10^4 organisme /ml sputum, karena itulah agak sulit didapatkan adanya uji BTA positif pada penderita tuberkulosis non aktif (tertutup) yang biasanya pada kasus ini jumlah organisme yang ada kurang dari 10^4 /ml sputum (Kim *et al.*, 1984).

Mycobacterium tuberculosis, menurut Koneman *et al.* (1985) memiliki waktu replikasi berkisar antara 2 sampai 22 jam, sedangkan menurut Joklik *et al.* (1992) waktu replikasi *Mycobacterium tuberculosis* adalah antara 14 sampai 15 jam. Jadi apabila diambil rata-rata waktu replikasinya 12 jam (sehari dua kali replikasi) maka dalam tujuh hari *Mycobacterium tuberculosis* yang berjumlah 100 bisa menjadi 1638400. Oleh karena itu sebagaimana tampak dalam penelitian ini beberapa sampel yang negatif pada pewarnaan langsung berubah menjadi positif setelah dilakukan penanaman pada metode mikrokoloni (ada 14 sampel atau 30%).

2. Perbandingan waktu terlihatnya BTA pada metode mikrokoloni dan Lowenstein Jensen

Bila melihat rata-rata hari yang diperlukan untuk munculnya BTA, pada metode mikrokoloni adalah empat hari sedangkan pada Lowenstein Jensen adalah 26,8 hari. Jadi jelas dalam hal ini metode mikrokoloni jauh lebih cepat dibanding Lowenstein Jensen dalam mendeteksi keberadaan *Mycobacterium tuberculosis*.

Agar tampak pada pemeriksaan mikroskopik, kuman haruslah berjumlah minimal 10^4 organisme / ml sampel. Jumlah sebesar ini bila kita berasumsi jumlah awal BTA yang ada pada sputum adalah 100 maka akan terpenuhi pada hari ke empat (sejumlah 12.800 - 25.600) sedang bila BTA ditanam pada media Lowenstein Jensen agar tampak secara visual diperlukan jumlah kuman jauh lebih besar sehingga waktu yang dibutuhkan agar terlihat oleh mata sebagai koloni kuman tentunya lebih lama.

3. Validitas metode mikrokoloni

Pada penelitian ini juga didapatkan hasil bahwa sensitivitas dan spesifisitas metode mikrokoloni bila dibandingkan dengan metode standar yang menggunakan Lowenstein Jensen adalah 100% dan 89%.

Meskipun memiliki pertumbuhan relatif lambat dan memiliki dinding sel yang kompleks kaya dengan lemak, kebanyakan Mycobacterium memiliki kebutuhan nutrisi yang sederhana. Mycobacterium memiliki kemampuan untuk memenuhi nutrisinya dari banyak sumber. Kebutuhan nutrisi mereka meliputi oksigen, karbon, nitrogen, fosfor, sodium, potasium, sulfur, besi dan magnesium.

Oksigen biasanya mereka peroleh dari udara, karbondioksida yang sangat esensial bagi pertumbuhannya juga biasanya mereka dapatkan dari udara. Sementara itu, sumber karbon mereka bisa diperoleh dari gula atau asam organik, nitrogen bisa didapat dari amonia, amida organik, asam amino, nitrat dan nitrit (Grange, 1988). Semua bahan nutrisi tersebut bisa didapatkan dari darah yang menjadi bahan baku media yang dipakai oleh metode mikrokoloni (Rapaport, 1990). Dengan demikian apabila memang di dalam sputum yang diperiksa dari penderita tuberkulosis memang mengandung kuman Mycobacterium, maka kuman ini akan mudah untuk tumbuh berkembang biak. Oleh karena itu, sebagaimana terlihat dari penelitian ini ada 14 (30%) sampel yang negatif pada pemeriksaan Ziehl Neelsen ternyata menjadi positif setelah ditanam pada metode mikrokoloni.

Sebagaimana diketahui, bahan baku metode mikrokoloni adalah darah manusia (whole blood) dengan berbagai komponen darah yang ada, dan salah satunya adalah makrofag. Meskipun menurut beberapa literatur dikatakan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* mampu bertahan dan bahkan bermultiplikasi dalam makrofag (Boyd, 1995) namun agar pertumbuhan kuman ini optimal maka dilakukan proses lisis sel darah (termasuk makrofag) dengan menambahkan ke dalam darah tersebut air suling dan saponin.

4. Validitas pewarnaan Ziehl Neelsen dari sedimen langsung

Dalam penelitian ini juga didapatkan hasil bahwa sensitivitas dan spesifisitas pewarnaan Ziehl Neelsen pada sedimen langsung adalah berturut-turut 60% dan 84%. Bila dilihat dari literatur maka hasil ini masih bisa dikatakan tidak jauh berbeda. Goldman *et al.* (1975) dengan 2994 spesimen mendapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas metode Ziehl Neelsen berturut-turut adalah 70% dan 99,9% sementara Burdash *et al.* (1976) pada 6199 spesimen yang diperiksa mendapatkan nilai 42,73% dan 99,7%.

Pemeriksaan mikroskopik Mycobacterium pada sputum perlu memperhatikan beberapa hal berikut:

- Pengambilan bagian tertentu dari sputum untuk dibuat hapusan terkadang memberikan hasil yang lebih baik dibanding dengan pemakaian konsentrat.
- Sebagian sputum yang positif pada kultur ternyata negatif pada pemeriksaan mikroskopis, hal ini disebabkan rendahnya sensitivitas pemeriksaan mikroskopis yang tidak mampu mendeteksi adanya BTA dengan jumlah kurang dari 10^4 organisme /ml sputum.
- Terkadang sulit untuk membedakan adanya artefak tahan asam dari bakteri (Lennette, 1985).

KESIMPULAN

1. Pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen dari sputum setelah ditanam pada media mikrokoloni sensitivitasnya lebih tinggi dibanding apabila tidak ditanam pada media mikrokoloni.
2. Kultur dengan metode mikrokoloni (slide culture) memberikan hasil lebih cepat dibanding kultur dengan media Lowenstein Jensen.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami sampaikan kepada Kepala Bagian Mikrobiologi FK UNAIR yang telah memberi kesempatan untuk melakukan penelitian ini, begitu juga Bapak Zaenal Ponari dan mbak Ida yang membantu bekerja di laboratorium Mikrobiologi FK UNAIR, serta kepada Pak Jarwo, mas Yasri dari bagian Patologi Klinik yang membantu memberikan sebagian bahan-bahan untuk penelitian kami. Tidak lupa kami sampaikan juga kepada Pak Budi Nur Iman yang telah mengoreksi uji statistik dalam penelitian ini. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan itu dengan yang lebih baik.

KEPUSTAKAAN

- Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, Kazumi Y, Takahashi M, Hirano K, Mori T 1992. Comparison of MB-Check, BACTEC, and Egg-Based Media for Recovery of Mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 30:878-881.
- Allen BW 1981. Survival of tubercle bacilli in heat-fixed sputum smears. *J.Clin.Pathol.* 34:719-722.
- Baron EJ and Finegold SM 1992. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.* 9th ed. Mosby. St Louis, pp. 234-248.
- Boyd RF 1995. *Microbial Genetics ; Mycobacterium tuberculosis.* In *Basic Medical Microbiology.* 5th ed. Little Brown and

- Company. Boston, New York, Toronto, London, pp. 61 - 81; 331-334.
- Goldman AL, Halkias DG 1975. Letter: Diagnostic smear of acid-fast bacilli. *Ann Intern Med.* Aug; 83(2):283.
- Grange JM 1988. *Mycobacteria and Human Disease*. Second ed. Edward Arnold Ltd. London, pp. 9-29.
- Handojo I 1996. Perbandingan nilai diagnostik uji DOT-EIA-TB dan Pathozyme - TB complex pada penyakit tuberkulosis. *Media IDI* vol 21 no. 4 hal. 36-40.
- Ignatia ML, Handojo I 1997. Perbandingan nilai diagnostik uji Mycodot dan uji PAP-TB untuk diagnosis tuberkulosis paru. *Media IDI* vol 22 no.4 hal 16-20.
- Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM 1988. *Zinsser Microbiology*. 19th edition. Appleton & Lange. California, pp. 166-167.
- Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM 1992. *Zinsser Microbiology*. 20th edition. Appleton & Lange. California, pp. 497-525.
- Jonas V, Alden MJ, Curry JL, Kamisango K, Knott CA, Lankford R, Wolfe JM, Moore DF 1993. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J.Clin.Microbiol.* 31 (9):2410-2416
- Kim TC, Blackman R.S, Heatwhole KM, Kim T, Rochester DF 1984. Acid-Fast Bacilli in Sputum Smears of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Am.Rev.Respir. Dis* 129 : 264-268.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC 1985. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. fourth ed. J.B.Lippin Company. Philadelphia, pp. 703-755.
- Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. fourth ed. American Society for Microbiology. Washington D.C, pp. 216 - 248.
- Rapaport SI 1990. Blood. In: *Physiological Basis of Medical Practise*, ed.12th. edited by John B West. William and Wilkins. Baltimore. pp. 332-402.
- Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Shaw CH, Gilchrist MJR 1993. Timely Culture for *Mycobacteria* Which Utilizes a Microcolony Methode. *J.Clin.Microbiol.* 31:2178-2184.

Tabel Hasil Penelitian

Dari 47 sampel yang diperiksa didapatkan hasil sebagai berikut :

No	Pemeriksaan langsung	Pemeriksaan mikrokoloni	Pemeriksaan pada LJ
1	(+)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)
5	(+)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)
11	(+)	(+)	(+)
12	(-)	(+)	(+)
13	(-)	(+)	(-)
14	(-)	(+)	(+)
15	(-)	(+)	(-)
16	(-)	(+)	(+)
17	(-)	(+)	#
18	(-)	(+)	#
19	(-)	(+)	#
20	(-)	(-)	(-)
21	(-)	(+)	#
22	(+)	(+)	(+)
23	(-)	(+)	(+)
24	(+)	(+)	#
25	(+)	(+)	#
26	(+)	(+)	#
27	(-)	(+)	#
28	(-)	(+)	#
29	(+)	(+)	#
30	(-)	(-)	(-)
31	(-)	(-)	(-)
32	(-)	(-)	(-)
33	(-)	(+)	#
34	(+)	(-)	(-)
35	(-)	(-)	(-)
36	(+)	(+)	#
37	(+)	(+)	(+)
38	(+)	(+)	#
39	(+)	(+)	#
40	(+)	(+)	#
41	(+)	(+)	#
42	(-)	(+)	#
43	(+)	(+)	#
44	(-)	(-)	(-)
45	(-)	(-)	(-)
46	(-)	(-)	(-)
47	(+)	(+)	(+)

: terkontaminasi