

BTA Examination of Sputum Samples Using the Ziehl-Neelsen Staining Method

Pemeriksaan BTA pada Sampel Sputum Menggunakan Metode Pewarnaan Ziehl-Neelsen

Maylizawati¹, Dezi Handayani^{1*}

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: dezihandayani3252@gmail.com

Abstract

Tuberculosis (TB) remains one of the major public health problems in Indonesia. Early detection is crucial to prevent transmission and complications, especially in areas with limited laboratory facilities. This study aims to detect the presence of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using the Ziehl-Neelsen staining method. The examination was conducted microscopically on stained sputum smears using carbol fuchsin, acid-alcohol, and methylene blue. The results showed acid-fast bacilli (AFB) appearing as bright red rods, with 1+ positivity observed in some samples based on IUATLD classification. Several samples were negative, possibly due to sputum quality or low bacterial load. The Ziehl-Neelsen method proved effective as an initial screening tool for TB diagnosis. Additionally, the study highlights the potential of local endophytic microorganisms as sources of antimicrobial compounds for future TB therapy. This research contributes to strengthening TB diagnostics in rural settings and encourages further exploration of biodiversity-based treatments.

Key words *Acid-Fast Bacilli, Microscopic Diagnosis, Sputum, Tuberculosis, Ziehl-Neelsen*

Abstrak

Tuberkulosis (TBC) masih menjadi salah satu masalah kesehatan masyarakat utama di Indonesia. Deteksi dini kasus TBC sangat penting untuk mencegah penularan dan komplikasi,

terutama di daerah dengan keterbatasan fasilitas laboratorium. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan *Mycobacterium tuberculosis* pada sampel sputum menggunakan metode pewarnaan Ziehl–Neelsen. Pemeriksaan dilakukan dengan metode mikroskopis terhadap sediaan sputum yang telah diwarnai menggunakan carbol fuchsin, asam alkohol, dan metilen biru. Hasil pengamatan menunjukkan basil tahan asam (BTA) berwarna merah fuchsia, dengan hasil positif 1+ pada beberapa sampel, sesuai klasifikasi IUATLD. Sebagian sampel menunjukkan hasil negatif, yang dapat dipengaruhi oleh kualitas sputum atau kepadatan bakteri. Metode Ziehl–Neelsen terbukti efektif sebagai teknik skrining awal TBC. Selain itu, pembahasan diperluas dengan potensi penggunaan senyawa antimikroba dari mikroorganisme endofit lokal sebagai alternatif terapi TBC. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar dalam penguatan diagnosis TBC di daerah dan mendorong eksplorasi terapi berbasis biodiversitas lokal.

Kata Kunci *Basil Tahan Asam, Diagnosis Mikroskopis, Sputum, Tuberkulosis, Ziehl–Neelsen*

Pendahuluan

Tuberkulosis (TBC) masih menjadi salah satu penyakit menular utama di dunia, termasuk di Indonesia (Handayani dkk., 2021). Penyakit ini merupakan infeksi kronis yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan menyebar melalui partikel udara yang keluar saat penderita batuk (Barman dkk., 2025). Berdasarkan data Laporan WHO (2023) menunjukkan bahwa pada tahun 2022, jumlah kasus TBC yang didiagnosis secara global mencapai sekitar 7,5 juta kasus, kemudian meningkat menjadi 8,2 juta kasus pada tahun 2023. Indonesia menjadi negara kedua setelah India dengan kontribusi kasus TBC terbesar di dunia, menyumbang sekitar 10% dari total kasus global. Salah satu tantangan utama dalam pengendalian TBC adalah kesulitan dalam deteksi dini, terutama karena gejala klinis TBC sering kali menyerupai penyakit lain seperti infeksi saluran pernapasan akut, bronkitis kronis, atau pneumonia.

Gejala klinis TBC paru umumnya meliputi batuk yang berlangsung lebih dari dua minggu, disertai demam, penurunan berat badan, dan keringat malam. Meski demikian, manifestasi klinis TBC dapat bervariasi tergantung pada usia, status imun, serta tingkat keparahan penyakit. Variasi gejala ini sering kali menyebabkan keterlambatan diagnosis dan penanganan, yang berdampak pada meningkatnya risiko penularan di masyarakat serta komplikasi klinis pada pasien (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2021).

Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada sputum dapat dilakukan secara Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemeriksaan mikroskopik, dan kultur bakteri.

Pemeriksaan mikroskopis dahak adalah komponen kunci dalam program penanggulangan TB untuk menegakkan diagnosis, evaluasi dan tindak lanjut pengobatan dari pemeriksaan 3 spesimen dahak sewaktu pagi sewaktu (SPS). Pemeriksaan dahak secara mikroskopis merupakan pemeriksaan yang paling mudah, murah, efisien, spesifik dan dapat dilaksanakan di semua unit laboratorium (Ramadhan dkk., 2017).

Menurut *International Standard for Tuberculosis Care*, pemeriksaan dahak merupakan standar emas (*golden standard*) dalam menegakkan diagnosis tuberkulosis, dengan atau tanpa dukungan pemeriksaan radiologi. Jika pemeriksaan dahak tidak memungkinkan, rontgen dada dapat menjadi alternatif diagnostik. Pada anak-anak, tes Mantoux masih digunakan sebagai bagian dari sistem skoring klinis. Namun, penggunaannya pada orang dewasa untuk diagnosis TBC tidak direkomendasikan, mengingat sensitivitasnya rendah. Pemeriksaan serologis juga tidak disarankan karena akurasi yang rendah. Di samping itu, tes darah dapat digunakan sebagai pemeriksaan penunjang untuk mendukung diagnosis tuberkulosis. Pencegahan dan deteksi dini berperan penting dalam menekan angka kejadian, mengurangi biaya pengobatan, serta meningkatkan kualitas hidup pasien (Kusuma, 2019).

Salah satu upaya penting dalam menurunkan angka kejadian TBC adalah melalui deteksi dini dan diagnosis yang akurat. Di berbagai fasilitas pelayanan kesehatan, pemeriksaan sputum secara mikroskopis masih menjadi metode utama dalam mendeteksi infeksi TBC. Pemeriksaan ini dilakukan dengan mengamati bakteri basil tahan asam (BTA) dalam sampel dahak yang diwarnai menggunakan teknik tertentu. Pemilihan metode pewarnaan yang tepat berperan penting dalam meningkatkan akurasi diagnosis, terutama di daerah dengan keterbatasan sarana dan prasarana laboratorium. Penelitian ini dilakukan untuk memeriksa BTA pada Sampel Sputum Menggunakan Metode Pewarnaan Ziehl-Neelsen di Laboratorium RSUD Pandan, Tapanuli Tengah, Sumatera Utara. Pemilihan lokasi ini didasarkan pada peran RSUD Pandan sebagai rumah sakit rujukan di wilayah barat Sumatera Utara yang menangani cukup banyak kasus tuberkulosis paru setiap tahunnya (Dinkes Sumut, 2023). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran aktual tentang efektivitas metode mikroskopis dalam mendeteksi TBC, khususnya di wilayah dengan fasilitas terbatas.

Bahan dan Metode

Lokasi Penelitian

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium RSUD Pandan, Kabupaten Tapanuli Tengah, Provinsi Sumatera Utara.

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat deskriptif yang bertujuan untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan metode pewarnaan Ziehl–Neelsen.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Mikroskop, Rak Pengering, Rak pengecatan, Lidi bambu/tusuk gigi, *Objek Glass*, *Cover glass*, Jas Laboratorium, Sarung tangan (*handscoon*), Spidol, Tisu, Mikroskop, *stop watch*, Korek Api dan Masker. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Sampel/Sputum, Minyak Imersi, Reagen ZN (Carbol Fuchsin 1%, Asam Alkohol 3%, Methylene Blue 0,1%).

Metode

a. Persiapan Pengambilan Spesimen

Sampel diambil dengan kriteria sebagai berikut: 1. Kriteria inklusi; 1) Pasien yang menderita penyakit tuberculosis paru, 2) Pasien dengan suspek tuberculosis paru, 3) Bersedia diambil sputumnya dan menjadi subjek untuk penelitian ini, 4) Pengambilan sampel sesuai prosedur P (Sewaktu pagi) dan S (setelah sarapan). 2. Kriteria eksklusi; 1) Sampel yang diberi adalah air liur bukan sputum, 2) Sputum yang bercampur dengan darah, 3) Sputum yang kotor (berisi sisa makanan).

b. Langkah Kerja

Sputum diambil menggunakan lidi dan dioleskan pada kaca preparat dengan ukuran kira-kira 2x3. Kemudian sediaan difiksasi diatas nyala api sebentar, tunggu hingga sedikit kering setelah itu lanjut ke pewarnaan Ziehl Neelsen. Pada pewarnaan ini tahapan awalnya mengambil sediaan yang telah difiksasi, letakkan pada rak pewarnaan, lalu tetesi sediaan dengan carbol fuchsin 1% hingga menutupi permukaan, setelah itu lewatkan api spritus dibawah sediaan hingga menguap kemudian diamkan selama 5 menit, bilas dengan air yang mengalir, lalu tetesi sediaan dengan asam alcohol 3% sampai luntur, cuci kembali dengan air yang mengalir. Setelah itu tetesi sediaan dengan metilen blue 0,1% dan diamkan selama 20 hingga 30 detik, cuci Kembali dengan air mengalir dan kering kan pada suhu ruang. Selanjutnya diamati dibawah mikroskop (Verina dkk., 2024).

c. Pemeriksaan Hasil

Sediaan yang telah diwarnai kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x menggunakan lensa imersi. Dari pemeriksaan ini akan didapatkan hasil berupa BTA. Berdasarkan skala IUATLD yaitu:

- a. Tidak ditemukan BTA dalam 100 lapang pandang disebut negatif
- b. Ditemukan 1–9 BTA dalam 100 lapang pandang, ditulis jumlah kuman yang ditemukan

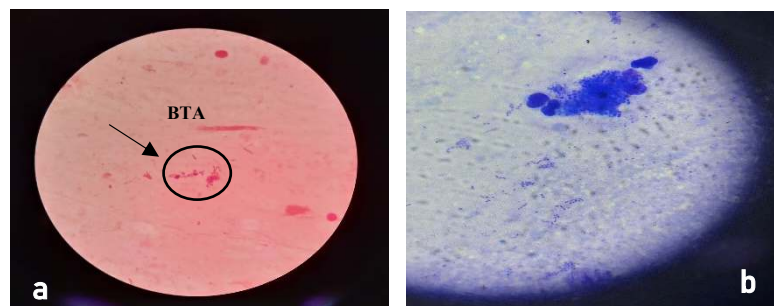
- c. Ditemukan 10–99 BTA dalam 100 lapang pandang disebut positif satu (1+)
- d. Ditemukan 1–10 BTA dalam 1 lapang pandang disebut positif dua (2+)
- e. Ditemukan > 10 BTA dalam 1 lapang pandang disebut positif tiga (3+)

Analisis Data

Hasil pemeriksaan sputum menggunakan metode pewarnaan Ziehl–Neelsen disajikan dalam bentuk dokumentasi mikroskopis berupa gambar sediaan. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif dengan mengamati keberadaan basil tahan asam (BTA),serta intensitas pewarnaan sebagai indikator positif atau negatif infeksi tuberkulosis paru.

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini telah dilakukan pengamatan pemeriksaan BTA terhadap sampel sputum pasien untuk mendeteksi keberadaan *Mycobacterium tuberculosis* (BTA) di Laboratorium RSUD pandan bulan januari 2025. Pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Ziehl–Neelsen. Hasil Pemeriksaan Basil Tahan Asam (BTA) pada prinsipnya adalah melihat bakteri yaitu *Mycobacterium tuberculosis* sebagai penyebab TBC di bawah mikroskop setelah dilakukan pewarnaan sehingga dari pemeriksaan ini akan didapatkan data berupa jumlah kuman TBC yang disesuaikan dengan skala IUATLD sehingga didapatkan hasil berupa dan positif (1+, 2+, 3+) (Dewi, 2019).



Gambar 1. Hasil Pemeriksaan Sputum, a) Positif BTA, b) Negatif BTA

Berdasarkan pemeriksaan dari sediaan sputum pada gambar (a) menunjukkan bahwa terdapat basil tahan asam (BTA) berbentuk batang halus berwarna merah cerah (1–4 μm panjang, 0,3–0,6 μm lebar) yang mengindikasikan keberadaan *Mycobacterium tuberculosis*. Pewarnaan ini menunjukkan hasil positif 1+ berdasarkan klasifikasi International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), yaitu ditemukan 10–99 basil per 100 lapang pandang (Verina dkk., 2024). Morfologi *M. tuberculosis* berbentuk batang lurus atau sedikit melengkung, tidak berspora dan tidak berkapsul. *M. tuberculosis* memiliki dinding sel yang tebal mengandung *wax* dari lipid dan asam mikolat yang menyebabkan bakteri ini sulit ditembus oleh pewarnaan biasa. Sifat ini yang membuat istimewa, karena dapat

bertahan terhadap pencucian warna dengan asam dan alkohol sehingga sering disebut dengan basil tahan asam (BTA). Bakteri ini akan cepat mati bila terkena sinar matahari langsung, tetapi dapat bertahan hidup beberapa jam di tempat yang gelap dan lembab (Making dkk., 2023).

Pada gambar (b) menunjukkan bahwa pada sediaan sputum dengan pewarnaan Ziehl–Neelsen (ZN) tidak terdapat *Basil Tahan Asam*. Dalam pewarnaan ZN, bakteri tahan asam akan berwarna merah (karena karbol fuchsin), sementara latar belakang akan berwarna biru (karena metilen biru sebagai pewarna tandingan). Jika hasilnya negatif, maka bakteri tahan asam tidak terlihat, dan latar belakang akan berwarna biru seluruhnya. Pemeriksaan secara mikroskopis dalam sampel sputum harus mengandung minimal 5000 kuman/ml sputum untuk mendapatkan hasil positif, terdapat banyaknya jaringan lendir akan memperbesar volume sampel sehingga memperkecil kemungkinan mendapatkan sampel yang mengandung bakteri *M. tuberculosis* (Latifah dkk., 2022).

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, termasuk golongan Basil Tahan Asam (BTA). Penyakit ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia, terutama karena keterlambatan diagnosis dan penularan yang tinggi pada penderita TB aktif. Diagnosis awal dilakukan melalui pemeriksaan mikroskopis sputum menggunakan metode pewarnaan Ziehl–Neelsen (ZN), karena metode ini sederhana, murah, dan spesifik untuk mendeteksi bakteri tahan asam (Karolinaa dkk., 2024).

Metode Ziehl–Neelsen juga telah digunakan dalam penelitian Verina dkk. (2024) di Laboratorium Kesehatan Daerah Padang, yang menegaskan pentingnya metode ini dalam mendeteksi TB secara cepat. Selain itu, Misnarliah & Mudrika (2021) menyatakan bahwa metode ZN tetap menunjukkan hasil valid meskipun pewarnaan dilakukan 2–3 hari setelah pengambilan sampel, asalkan penyimpanan sputum dilakukan dengan benar.

Untuk memperkuat urgensi pengendalian TB dan menemukan alternatif terapi, penting untuk meninjau potensi senyawa antimikroba dari mikroorganisme lokal. Penelitian Handayani dkk., (2021) menunjukkan bahwa cendawan endofit dari tanaman *Andalas* (*Morus macroura* Miq.) memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen. Sementara itu, Mulia dkk., (2021) berhasil mengisolasi bakteri endofit dari akar *Taxus sumatrana*, dan menemukan bahwa beberapa isolat memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antimikroba potensial.

Penelitian lain oleh Putri dkk., (2021) mengenai diversitas bakteri endofit pada daun muda dan tua tanaman andaleh juga menunjukkan kekayaan hayati mikroba lokal yang bisa dimanfaatkan dalam pengembangan terapi antimikroba baru. Meskipun penelitian–penelitian tersebut belum langsung terkait dengan TB, namun temuan mereka membuka

peluang dalam pencarian agen antimikroba alternatif yang dapat dikembangkan lebih lanjut untuk mendukung penanganan penyakit menular seperti TB, terutama menghadapi masalah resistensi obat.

Dengan demikian, pemeriksaan BTA melalui metode Ziehl–Neelsen tetap merupakan metode dasar penting dalam mendiagnosis TB, namun strategi pengendalian TB juga perlu diimbangi dengan penelitian lanjutan untuk mencari kandidat senyawa antimikroba baru, salah satunya melalui eksplorasi mikroorganisme endofit dari biodiversitas lokal Indonesia. Upaya tersebut dapat mendukung strategi nasional pengendalian TBC sekaligus membuka peluang inovasi pengobatan berbasis hayati lokal.

Kesimpulan

Hasil positif BTA 1+ menunjukkan bahwa metode Ziehl–Neelsen tetap efektif untuk mendeteksi infeksi aktif M. TB secara langsung dari sampel sputum. Namun, hasil negatif tidak dapat sepenuhnya menyingkirkan kemungkinan TBC, sehingga penting untuk mempertimbangkan pemeriksaan lanjutan seperti Tes Cepat Molekuler (TCM) atau kultur sputum. Selain itu, upaya eksplorasi senyawa antimikroba dari mikroorganisme lokal menjadi langkah penting dalam mendukung pengendalian TBC jangka panjang, khususnya untuk menghadapi resistensi obat.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada UPT RSUD Pandan, Provinsi Sumatera Utara, khususnya kepada Kepala dan staff Laboratorium RSUD Pandan, atas izin fasilitas, dan bimbingan yang telah diberikan selama pelaksanaan kegiatan penelitian dan pengambilan data serta dukungan teknis dan juga kesempatan magang yang diberikan sangat membantu kelancaran penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Barman, M., Panja, M., Mishra, N., & Chakraborty, T. (2025). Epidemic-guided deep learning for spatiotemporal forecasting of Tuberculosis outbreak. *arXiv preprint arXiv: 2502.10786*.
- Dewi, L. P. K. (2019). Pemeriksaan basil tahan asam untuk membantu menegakkan diagnosis penyakit tuberkulosis. *International Journal of Applied Chemistry Research*, 1(1): 16–20.

- Handayani, R., Muda, C. A. K., & Sangadji, N. W. (2021). Knowledge level of multidrug resistant Tuberculosis (MDR-TB) among commuter train users. *International Journal of Nursing and Health Services (IJNHS)*, 4 (6): 662–668.
- Handayani, D., Putri, D. H., & Oktaviani, M. (2021). Antimicrobial activity of endophytic fungi from Andalas (*Morus macroura* Miq.) plant. *In Journal of Physics: Conference Series*, 1940 (1): 012050.
- Karolina, M. E., Lipinwati, L., Nuriyah, N., Siregar, M. I. T., & Hestingtyas, M. (2024). Skrining *Mycobacterium tuberculosis* dengan pengecatan Ziehl Neelsen pada pelajar pondok pesantren Nurul Iman Di Kota Jambi. *Medical Dedication (medic): Jurnal Pengabdian kepada Masyarakat FKIK UNJA*, 7 (1) : 27–33.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2021). *Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis*. Jakarta: Direktorat Jenderal P2P.
- Kusuma, S. A. K. (2019). Deteksi dini tuberkulosis sebagai upaya pencegahan penularan penyakit tuberkulosis dan pengolahan herbal antituberkulosis berbasis riset. *DHARMAKARYA: Jurnal Aplikasi Ipteks untuk Masyarakat*, 8 (2): 124–129.
- Latifah, I., Zuraida, Z., Sulistiawati, R. D., & Susanti, E. (2022). Uji sensitivitas dan uji spesifisitas metode mikroskopis terhadap tes cepat molekuler (TCM) dalam diagnosis *Mycobacterium tuberculosis* pada pasien suspek TB paru di RS. Simpangan Depok. *Anakes: Jurnal Ilmiah Analisis Kesehatan*, 8 (2): 200–208.
- Making, M. A., Banhae, Y. K., Aty, M. Y. V. B., Abanit, Y., Selasa, P., & Israfil, I. (2023). Analisa faktor pengetahuan dan sikap dengan perilaku pencegahan TB paru pada kontak serumah selama era new normal covid 19. *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, 5 (1): 43–50.
- Misnarliah, M., & Mudrika, M. (2021). Pengaruh penundaan pewarnaan preparat bakteri tahan asam metode ziehl neelsen terhadap hasil pemeriksaan mikroskopik. *Jurnal Teknosains Kodepena*, 1 (2): 58–63.
- Mulia, M., Putri, D. H., Advinda, L., & Irdawati, I. (2023). Isolation of endophytic bacteria from taxus root (*Taxus Sumatrana*) and test its potency as producer of antimicrobial compounds. *AL ULUM: JURNAL SAINS DAN TEKNOLOGI*, 9 (1): 21–26.
- Putri, D. H., & Fifendy, M. (2018). Diversitas bakteri endofit pada daun muda dan tua tumbuhan andaleh (*Morus macroura* miq.). *Eksakta: Berkala Ilmiah Bidang MIPA (E-ISSN: 2549-7464)*, 19 (1): 125–130.
- Ramadhan, R., Fitria, E., & Rosdiana, R. (2017). Deteksi mycobacterium tuberculosis dengan pemeriksaan mikroskopis dan teknik pcr pada penderita tuberkulosis paru di puskesmas darul imarah. *Sel Jurnal Penelitian Kesehatan*, 4 (2): 73–80.
- Verina, F. S., Yuniarti, E., & Erlinda, E. (2024). Pemeriksaan bta pada sampel sputum penderita batuk di Laboratorium Kesehatan Daerah Padang. *In Prosiding Seminar Nasional Biologi* 4 (1): 491–498. <https://doi.org/10.24036/prosemmasbio/vol4/979>
- WHO. (2023). *Global Tuberculosis Report*. Geneva: World Health Organization.