



UJI RESISTENSI *Mycobacterium tuberculosis* TERHADAP OBAT ANTI TUBERKULOSIS (OAT) DENGAN METODE PENIPISAN

Erna Widayanti ✉, Siti Harnina Bintari, dan Darwani

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:

Diterima Februari 2013
Disetujui Maret 2013
Dipublikasikan Maret 2013

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis
Anti-tuberculosis drugs.
Resistency
Examination

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui hasil uji resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT dengan metode penipisan. Penelitian ini merupakan penelitian explorasi dengan rancangan *post randomized controlled design*. Sampel dalam penelitian ini adalah enam isolat *M. tuberculosis* yang diperoleh dari penderita BKPM Semarang dengan kriteria Bakteri Tahan Asam (BTA) 1+. Setiap sampel dibuat suspensi dengan kekeruhan Mc Farland 1 kemudian diuji PNB untuk deteksi adanya *Mycobacterium Other Than Tuberculosis* (MOTT). Hasil yang negatif dari uji PNB kemudian diuji resistensi. Uji resistensi ditumbuhkan pada media Lowenstein-Jensen (L-J) sebagai kontrol dan sebagai perlakuan yaitu media L-J yang ditambahkan dengan masing-masing OAT yaitu Isoniazid 0,2 mg/L, Rifampisin 40 mg/L, Streptomisin 4 mg/L dan Etambutanol 2 mg/L. Hasil uji PNB menunjukkan bahwa lima sampel negatif dan satu sampel positif MOTT. Uji resistensi dengan metode penipisan menunjukkan lima sampel sensitif terhadap OAT. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dengan metode penipisan kurang berpengaruh dalam menurunkan resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT.

Abstract

The purpose of this research is to find out the reaction of *M. tuberculosis* resistance to OAT whit dilution method. This research is exploration research with post randomized controlled design. Each sample made as suspension with Mc Farland 1 turbidity then experimented with PNB to detect *Mycobacterium Other Than Tuberculosis* (MOTT). Negative result of PNB experiment then resistance experimented. Resistance experiment grown in Lowenstein-Jensen (L-J) medium as control and were mixed is L-J medium which had been added with each OAT that is Isoniazid 0,2 mg/L, Rifampisin 40 mg/L, Streptomisin 4 mg/L dan Etambutanol 2 mg/L. Experiment result of PNB shows that there are five negative sample and one MOTT positive sample. Resistance experiment with dilution shows that there are 5 sensitive samples to OAT. From the research it can be concluded that by dilution method is not really influencing *M. tuberculosis* resistance experiment to OAT.

© 2013 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lt.1, Jl. Raya Sekaran,
Gunungpati, Semarang, Indonesia 50229
E-mail: nana15290@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* berbentuk batang dan bersifat tahan asam sehingga dikenal juga sebagai Bakteri Tahan Asam (BTA). Tuberkulosis (TBC) merupakan suatu penyakit yang menjadi perhatian dunia karena mudah ditularkan. Penularan penyakit TBC melalui perantaraan ludah atau dahak penderita yang mengandung bakteri *M. tuberculosis*. Pada waktu penderita batuk, butir-butir air ludah beterbangan di udara kemudian terhisap oleh orang yang sehat dan masuk ke dalam parunya. Hal tersebut merupakan salah satu penyebab penyakit tuberkulosis paru mudah tersebar (Gyuton dan Hall 1997).

Penderita TBC meningkat drastis pada dekade terakhir di seluruh dunia. Kegagalan pengobatan TBC pada umumnya terjadi akibat penghentian terapi karena pasien merasa sudah sembuh. Di Indonesia, tuberkulosis merupakan masalah nasional, baik dari sisi angka kematian (*mortalitas*), angka kejadian penyakit, diagnosis dan terapinya. Di Indonesia masalah tuberkulosis menempati urutan kelima setelah India dan China dalam jumlah penderita TBC diantara 22 negara dengan masalah TBC (WHO 2000).

Salah satu permasalahan penanggulangan tuberkulosis adalah pengobatan yang tidak teratur dan pemberian obat yang tidak sesuai dengan koresistensi *M. tuberculosis*. Obat Anti Tuberculosis (OAT) yang digunakan dalam program pengobatan tuberkulosis adalah isoniazid (I), rifampisin (R), streptomisin (S) dan etambutanol (E). Penggunaan rifampisin dan streptomisin hendaknya dihindari untuk mencegah timbulnya resistensi bakteri. Pengobatan penderita harus didahului dengan pemastian diagnosis melalui pemeriksaan radiologik dan laboratorium (Girsang 2002).

Uji resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT di BKPM (Balai Kesehatan Paru Masyarakat) Semarang masih belum akurat karena keterbatasan alat. Salah satu alat yang belum dimiliki BKPM adalah alat untuk mengetahui jumlah sel *M. tuberculosis* yang sesuai dengan ketentuan Mc farland. Keterbatasan alat tersebut menyebabkan hasil uji resistensi kurang akurat

sehingga berpengaruh terhadap pengobatan pasien. Selain itu perlu teknik uji resistensi dengan metode penipisan isolat *M. tuberculosis* agar koloni tidak tumbuh menumpuk sehingga koloni mudah diamati dan dihitung. Di sisi lain, perlu adanya uji Paranitro Benzoid Acid (PNB) untuk memperkuat bahwa isolat yang diuji resistensi adalah *M. tuberculosis* bukan jenis bakteri yang lain (Sjahrurachman *et al.* 2002). Dengan demikian penegakan diagnosis resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT lebih akurat.

METODE PENELITIAN

Isolat *Mycobacterium tuberculosis* diambil dari BKPM Semarang dengan kriteria BTA positif 1. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Yogyakarta. Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dengan rancangan *randomized post test control design*. Sampel yang digunakan adalah 6 isolat *M. tuberculosis* dengan BTA positif 1.

Semua alat dan bahan yang sudah disterilkan diletakkan dalam BSC (*Biosafety cabinet*). Menyiapkan 1 tabung reaksi yang diisi NaCl sebanyak 9 ml. Dalam tabung yang berisi koloni *M. tuberculosis* diambil 1 koloni menggunakan ose. Koloni tersebut dituangkan ke dalam tabung yang berisi NaCl, selanjutnya divortek. Kemudian suspensi tersebut didiamkan sampai mengendap. Setelah mengendap suspensi bagian atas diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam alat densitochek yang bertujuan untuk mengukur kekeruhan Mc Farland 1. Sebanyak 0,1 ml larutan suspensi tersebut diambil dan ditumbuhkan pada media PNB kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 minggu. Hasil uji PNB yang negatif dilanjutkan uji resistensi. Sebanyak 5 tabung yang berisi NaCl 9 ml disiapkan untuk dilakukan penipisan 10^{-1} sampai 10^{-5} . Sebanyak 1 ml larutan suspensi dituangkan ke dalam tabung ke-1. Kemudian diambil 0,1 ml dari larutan tabung ke-1 dituangkan ke tabung ke-2 (cara tersebut dilakukan sampai tabung ke-5). Sebanyak 0,1 ml larutan pada tabung ke-3, ke-4 dan ke-5 masing-masing diambil kemudian ditumbuhkan pada media L-J tanpa obat dan

media L-J + masing-masing OAT yaitu Isoniazid 0,2 mg/L, Rifampisin 40 mg/L, Streptomisin 4 mg/L dan Etambutanol 2 mg/L. Semua tabung yang diuji resistensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 4-8 minggu dengan posisi botol pada ketinggian 30° pada hari pertama, kemudian hari ke-2 botol ditegakkan kembali. Pertumbuhan bakteri diamati pada minggu I sebanyak 2 kali yaitu pada hari ke-4 dan hari ke-7. Pada minggu ke II sampai seterusnya pertumbuhan diamati 1 kali setiap 1 minggu.

Pertumbuhan koloni *M. tuberculosis* dapat dinilai 1 (sensitif) apabila pada media L-J tanpa obat tumbuh *M. tuberculosis* dan pada media L-J yang mengandung obat tidak tumbuh *M. tuberculosis*, dinilai 2 (Resisten) apabila pada media L-J tanpa obat tumbuh *M. tuberculosis* dan pada media L-J yang mengandung obat juga tumbuh *M. tuberculosis*, dinilai 3 (Ragu) apabila pada media L-J tanpa obat tidak tumbuh *M. tuberculosis* dan pada media L-J yang mengandung obat juga tumbuh atau tidak tumbuh *M. tuberculosis* dan dinilai 4 (MOTT) apabila pada media L-J tanpa obat tumbuh *M. tuberculosis* dan pada media PNB tumbuh *M. tuberculosis* (Soemarno 1987).

Pengambilan data dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni *M. tuberculosis* dengan menggunakan *coloni counter*. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan cara proporsional yaitu jumlah koloni (%) pada medium obat dibandingkan dengan jumlah koloni pada medium kontrol dikalikan 100% (Rintiswati dan Wijayanti 1999). Data pertumbuhan koloni *M. tuberculosis* dianalisis secara deskriptif kualitatif (Sujdana 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji PNB dari enam sampel isolat *M. tuberculosis* menunjukkan lima sampel adalah *M. tuberculosis* dan satu sampel termasuk *Mycobacterium Other Than Tuberculosis* (MOTT). Hasil uji resistensi tanpa metode penipisan oleh BKPM menunjukkan tiga sampel sensitif dan tiga sampel resisten terhadap OAT sedangkan dengan metode penipisan menunjukkan lima sampel sensitif terhadap OAT dan satu sampel tidak diuji resistensi karena pada uji PNB terdeteksi adanya pertumbuhan koloni MOTT. Hasil uji PNB, uji resistensi tanpa penipisan dan dengan penipisan isolat *M. tuberculosis* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 1. Hasil uji PNB, uji resistensi tanpa penipisan dan dengan penipisan isolat *M. tuberculosis*

Sampel	Uji PNB	Tanpa penipisan	Dengan penipisan 10 ⁻³ -10 ⁻⁵
Sampel-1	Tidak tumbuh koloni	Sensitif terhadap OAT	Sensitif terhadap OAT
Sampel-2	Tumbuh koloni	Resisten terhadap Rifampisin	Tidak diuji resistensi
Sampel-3	Tidak tumbuh koloni	Sensitif terhadap OAT	Sensitif terhadap OAT
Sampel-4	Tidak tumbuh koloni	Resisten terhadap Isoniazid	Sensitif terhadap OAT
Sampel-5	Tidak tumbuh koloni	Resisten terhadap Isoniazid	Sensitif terhadap OAT
Sampel-6	Tidak tumbuh koloni	Sensitif terhadap OAT	Sensitif terhadap OAT

Tuberkulosis adalah penyakit infeksi menular yang disebabkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Tahun 1980, WHO memperkenalkan program penanggulangan TBC nasional dengan menggunakan strategi *Directly Observed Treatment Shortcourse* (DOTS). Strategi DOTS yang telah dibuktikan dengan berbagai uji coba lapangan dapat memberikan angka kesembuhan yang tinggi. Diperlukan penguatan dalam hal implementasi dari lima komponen strategi DOTS, meliputi komitmen politis dari para pengambil keputusan, dukungan dana dan diagnosis TBC dengan pemeriksaan dahak secara mikroskopis serta kesinambungan persediaan OAT jangka pendek untuk penderita. Di sisi lain perlu pengawasan langsung pengobatan dengan panduan OAT oleh Pengawas Menelan Obat (PMO) dan pencatatan, pelaporan secara baku untuk memudahkan pemantauan evaluasi program TBC (Sjahrurachman *et al.* 2002).

Bakteri dapat resisten terhadap obat antibiotik karena terjadi perubahan genetik. Jumlah sel bakteri yang banyak dapat menimbulkan mutasi. Resistensi dapat terjadi melalui proses adaptasi progresif. Vaskularisasi bakteri yang kurang menyebabkan OAT sulit menembus dinding sel. Bakteri *M. tuberculosis* dapat dikatakan resisten apabila dalam obat yang dianjurkan ditemukan *M. tuberculosis* minimal 1% (Viska 2007). Balai Kesehatan Paru Masyarakat (BKPM) Semarang dalam melakukan metode uji resistensi tanpa metode penipisan secara garis besar adalah sampel dahak penderita diuji secara mikroskopis (1), hasil mikroskopis dengan BTA positif akan diperiksa lebih lanjut dengan uji kultur (2), hasil uji kultur kemudian dibuat suspensi bakteri dengan cara koloni bakteri diinokulasikan dalam larutan NaCl dan dihomogenkan (3). Setelah itu suspensi ditanam dalam media OAT dengan volume yang sama yaitu 0,1 ml (4). Dilanjutkan tahap inkubasi pada suhu 37°C selama 8 minggu (5).

Hasil uji resistensi tanpa metode penipisan yang dilakukan BKPM Semarang, menunjukkan tiga sampel sensitif dan tiga sampel resisten terhadap OAT yaitu rifampisin

dan isoniazid. Sementara hasil uji resistensi dengan metode penipisan menunjukkan lima sampel sensitif terhadap OAT dan satu sampel tidak diuji resistensi karena terdeteksi MOTT. Kurang sensitifnya metode penipisan dapat menentukan resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT kemungkinan karena jumlah sampel yang terbatas.

Tiga sampel (sampel 1, 3 dan 6) menunjukkan pertumbuhan koloni *M. tuberculosis* yang sensitif terhadap OAT baik dengan metode penipisan dan tanpa metode penipisan. Hasil tersebut diduga karena pada uji resistensi tanpa metode penipisan jumlah sel bakteri yang diuji sesuai dengan ketentuan jumlah bakteri yaitu Mc Farland 1. Menurut Sjahrurachman *et al.* (2002), kekeruhan Mc Farland 1 dapat mendapatkan jumlah bakteri lebih rendah yaitu 3×10^8 /ml.

Sampel-2 yang diuji resistensi tanpa metode penipisan, menunjukkan *M. tuberculosis* resisten terhadap rifampisin sedangkan uji resistensi dengan metode penipisan tidak diuji resistensi karena terdeteksi MOTT. Tiga sampel (sampel 2, 4 dan 5) yang diuji tanpa metode penipisan menunjukkan resisten terhadap rifampisin dan isoniazid sedangkan dengan metode penipisan menunjukkan sensitif terhadap OAT. Sampel yang sensitif terhadap OAT diduga karena jumlah bakteri sebanyak Mc Farland 1 dan faktor penipisan secara bertingkat. Penipisan bertingkat bertujuan untuk menurunkan jumlah sel bakteri.

Uji resistensi yang dilakukan oleh BKPM berbeda dengan uji resistensi dalam penelitian ini. Perbedaan uji resistensi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pertama, pembuatan suspensi bakteri dari hasil kultur yang dihomogenkan dan diendapkan untuk diambil supernatan yang jernih. Kemudian supernatan diuji kekeruhan dengan konsentrasi Mc Farland 1. Hal ini dilakukan agar penanaman bakteri pada OAT jumlah selnya sama. Ke dua, dilakukan uji PNB, dengan tujuan untuk memastikan bakteri yang akan di uji resistensi adalah *M. tuberculosis*. Ke tiga, dilakukan uji resistensi dengan metode penipisan 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} . Penipisan bertingkat dilakukan agar koloni

bakteri *M. tuberculosis* yang tumbuh pada media OAT jumlahnya sedikit. Pertumbuhan koloni yang sedikit dapat mempermudah penghitungan dan dimungkinkan tingkat resistensi menjadi rendah. Hal ini sesuai dengan Sindelar *et al.* (2000), bahwa metode konsentrasi pencegahan mutan merupakan ukuran potensi antibiotik. Menurut Zhao *et al.* (2000), metode konsentrasi pencegahan mutan merupakan determinan kapasitas untuk mencegah mutan resisten terhadap obat antibiotik.

Enam sampel yang diambil dari BKPM Semarang telah diuji secara mikroskopis dengan hasil semua sel terlihat berwarna biru (bakteri tahan asam) sehingga dapat dipastikan sel tersebut adalah *M. tuberculosis*. Tetapi setelah diuji PNB ditemukan satu sampel yang positif MOTT (Tabel 3). MOTT ditengarai sulit dibaca pada uji mikroskopis. Infeksi paru yang disebabkan oleh MOTT sangat bervariasi. Hal ini disebabkan oleh kemiripan bentuk dan warna sel pada kedua bakteri tersebut yaitu *M. tuberculosis* dan MOTT setelah pengecatan asam (Restiawati dan Burhan 2011). Penemuan MOTT pada sputum tidak menjadi bukti infeksi MOTT pada paru, kecuali pada apusan BTA negatif dan biakan bakteri pada sputum yang ditemukan dalam jumlah kecil. Hasil penelitian Edsel *et al.* (2007), patogenitas penyakit MOTT mirip dengan penyakit tuberkulosis. Diagnosis infeksi MOTT pada paru dapat ditegakkan dengan kombinasi antara manifestasi klinis, radiologis, bakteriologis dan kriteria histologis yang diusulkan oleh *American Thoracic Society* (ATS) dan *Infectious Disease Society of America* (IDSA) (Restiawati dan Burhan 2011).

Rekomendasi metode pewarnaan basil tahan asam (BTA) untuk spesimen klinis *M. tuberculosis* adalah teknik fluorokrom dan metode *Ziehl-Neelsen* untuk deteksi MOTT, pewarnaan kinyoun untuk mendeteksi species *Mycobacterium*. Tetapi tingkat infeksi MOTT masih rendah sehingga hasil positif lebih mengarah pada *M. tuberculosis* (Sjahrurachman *et al.* 2002).

Penelitian Viska (2007) menunjukkan bahwa, uji resistensi tanpa metode penipisan di RS Persahabatan menunjukkan resistensi

terhadap isoniazid dengan proporsi 5,92% dan rifampisin 1,6%. Resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampisin mencapai proporsi tertinggi yaitu 62,50% dan resistensi terendah adalah isoniazid 16,66% (Rintiswati dan Wijayanti 1999). Penelitian Rintiswati dan Wijayanti (1999), *M. tuberculosis* resisten terhadap obat lini pertama yaitu isoniazid, streptomisin, etambutol, dan rifampisin. Penelitian Xie *et al.* (2005), isoniazid memiliki aktivitas yang tinggi terhadap sel *M. tuberculosis*. Isoniazid dengan konsentrasi tinggi dapat membunuh 99% *M. tuberculosis* dan aktivitas rifampisin terhadap *M. tuberculosis* sangat rendah. *M. tuberculosis* rentan terhadap rifampisin dan streptomisin dengan jumlah inokulum 1×10^{-7} sel/ml tetapi pada isoniazid membutuhkan waktu 10 hari. Hasil kerentanan yang baik pada jumlah inokulum rendah 1×10^{-5} sel/ml meskipun dalam jangka waktu inkubasi yang lama. Jangka waktu inkubasi yang lama dapat memungkinkan mikobakteri terjadi resisten (Logu *et al.* 2001).

Dari hasil penelitian dapat diambil makna positif dan negatif. Makna positifnya pada uji PNB sampel ke-2 menunjukkan MOTT. Dengan hasil tersebut lebih menguatkan jika isolat yang akan ditanam pada OAT bukan *M. tuberculosis* sehingga tidak perlu diuji resistensi. Makna negatifnya yaitu tanpa penipisan masih bisa dimungkinkan hasil yang sensitif terhadap OAT. Hasil tersebut ditunjukkan pada Tabel 3 sampel 1, 3, 4, 5 dan 6.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa uji resistensi dengan metode penipisan kurang berpengaruh menurunkan resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap obat anti tuberkulosis (OAT). Perlu dilakukan penelitian serupa dengan jumlah sampel yang lebih banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama TY & P Wijanarko. 1996. Resistensi primer dan sekunder *M.tbc* di RSUP Persahabatan th 1994. *Jurnal Respirologi Indonesia* 16 (1):77-81

- Edsel TM, A Salvana, S Gregory, B Cooper, A Robert & A Salata. 2007. *Mycobacterium* other than tuberculosis (MOTT) infection: An emerging disease in infliximab-treated patients. *Journal of Infection* 55:484-487
- Girsang M. 2002. Pengobatan standar penderita tbc. *Cermin Dunia Kedokteran* (137):6-8
- Guyton & Hall. 1997. *Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC
- Logu D, P Uda, ML Pellerano, MC Pusceddu, B Saddi & ML Schivo. 2001. Comparison of Two Rapid Colorimetric Methods for Determining Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampin, Isoniazid and Streptomycin in Liquid Medium. *Eur Journal Clin Microbiol Infect* 20:33-39
- Restiawati NM & E Burhan. 2011. Diagnosis dan Penatalaksanaan *Mycobacterium* Other Than Tuberculosis (MOTT). *Jurnal Respirologi Indonesia* 31 (3):156-164
- Rintiswati N & Y Wijayanti. 1999. Kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* terhadap oabat anti tuberculosis. *Berkala Ilmu Kedokteran* 31(2):77-83
- Sindelar, X Zhao, A Liew, Y Dong, T Lu, J Zhou, J Domagala & K Drlica. 2000. Mutant prevention concentration as a measure of fluoroquinolone potency against mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (12): 3337-3343
- Sudjana. 2005. *Metode Statistika*. Bandung: Tarsito Bandung.
- Sjahrurachman, A Ikanungsih, RT Conny, K Aryani, Tjahjani & S Pratiwi. 2002. Pola kuman infeksi saluran pernafasan bawah dan kepekaannya terhadap berbagai antibiotika. *Cermin Dunia Kedokteran* (137):37-40
- Tanjung A & EN Keliat. 1996. Resistensi *M. tb* terhadap obat anti tuberculosis pada penderita tbc paru yang telah mendapatkan pengobatan. *Majalah Kedokteran Indonesia* 46 (5):18-22
- Viska O. 2007. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB). *Jurnal Tuberkulosis Indonesia* 5: 19-23
- World Health Organizatin (WHO). 2000. Overcoming Antimicrobial Resistance. Onlineat:http://www.resistense.int/topics/antimicrobial_resistance/en[diakses tanggal 20 September 2011]
- Xie Z, N Siddiqi & EJ Rubin. 2005. Differential Antibiotic Susceptibilities of Starved *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (11):4778-4780
- Zhao DX, B Kreiswirth & K Drlica. 2000. Mutant prevention concentration as a measure of antibiotic potency: studies with clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (9):2581-2584