

**PERBANDINGAN DETEKSI OOKISTA *Cryptosporidium* sp.  
PADA SAMPEL TINJA DENGAN METODE PEWARNAAN  
MODIFIKASI TAHAN ASAM DAN AURAMIN FENOL**

**TESIS**

**RUDINA AZIMATA ROSYIDAH  
NPM: 6105012062**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN PARASITOLOGI  
JAKARTA  
DESEMBER 2008**

**PERBANDINGAN DETEKSI OOKISTA *Cryptosporidium* sp.  
PADA SAMPEL TINJA DENGAN METODE PEWARNAAN  
MODIFIKASI TAHAN ASAM DAN AURAMIN FENOL**

**TESIS**

**RUDINA AZIMATA ROSYIDAH  
NPM: 6105012062**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN PARASITOLOGI  
JAKARTA  
DESEMBER 2008**

**PERBANDINGAN DETEKSI OOKISTA *Cryptosporidium* sp.  
PADA SAMPEL TINJA DENGAN METODE PEWARNAAN  
MODIFIKASI TAHAN ASAM DAN AURAMIN FENOL**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M. Biomed.)**

**RUDINA AZIMATA ROSYIDAH  
NPM. 6105012062**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN PARASITOLOGI  
JAKARTA  
DESEMBER 2008**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.**

**Nama : Rudina Azimata Rosyidah**

**NPM : 6105012062**

**Tanda Tangan :**



**Tanggal : 3 Desember 2008**

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Rudina Azimata Rosyidah  
NPM : 6105012062  
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi  
Judul Tesis : Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Sampel Tinja dengan Metode Pewarnaan Modifikasi Tahan Asam dan Auramin Fenol

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : dr. Agnes Kurniawan, Ph.D, Sp.ParK (  )

Pembimbing 2 : dr. Sutjahjo Endardjo, M.Sc, Sp.PA(K) (  )

Penguji 1 : Dra. Ridhawati Syam, MS, DAP&E (  )

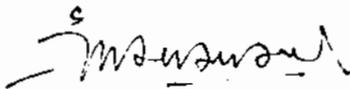
Penguji 2 : dr. Anis Karuniawati, Ph.D, Sp.MK (  )

Penguji 3 : dr. Lia Damayanti, M.Biomed., Sp.PA (  )

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 3 Desember 2008

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



( Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi )

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SubhanahuwaTa'ala, Maha Penguasa Segala, karena atas segala rahmat dan karunia-Nya maka penulis dapat menyelesaikan Tesis ini meskipun masih banyak terdapat kekurangan disana-sini.

Tesis ini dilaksanakan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta. Penelitian dalam Tesis ini berjudul **“Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Sampel Tinja dengan Metode Pewarnaan Modifikasi Tahan Asam dan Auramin Fenol”**.

Selama penelitian Tesis dan proses penyusunan laporan, penulis merasa mendapatkan banyak bantuan dan bimbingan serta dukungan dari segenap pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini dengan segala hormat dan kerendahan hati, penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

1. Dr. dr. Ratna Sitompul, Sp.M (K) sebagai dekan FKUI dan Prof. dr. Menaldi Rasmin, Sp. P (K), FCPP sebagai dekan FKUI periode 2004-2008 yang memberi kesempatan penulis menuntut ilmu di FKUI.
2. Dr. rer. physiol.dr. Septelia Inawati W. sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan pengarahan selama penulis menjalankan pendidikan.
3. Prof. dr. Saleha Sungkar, MS, DAP&E, Sp. ParK sebagai Kepala Departemen Parasitologi FKUI. Dan Dra. Hendri Astuti, MS. sebagai ketua kekhususan Parasitologi atas nasehat dan motivasi selama pendidikan.
4. dr. Agnes Kurniawan, Ph.D., Sp.ParK, sebagai dosen pembimbing I dalam tesis sekaligus dosen wali/ penasehat akademik pada Program Sudi Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi FKUI. Terima kasih atas bimbingan dan dukungan yang diberikan selama penulis mengerjakan tesis.
5. dr. Sutjahjo Endardjo, M.Sc., Sp.PA (K) sebagai dosen pembimbing II dalam tesis. Terima kasih atas bimbingannya dalam penelitian tesis.

6. Prof. Huw V. Smith dan Prof. Anthony M. Grimason atas bimbingan teori dan diskusinya. Juga atas kesediaan dalam konfirmasi hasil penelitian.
7. dr. Herbowo A. Soetomenggolo, Sp.A, atas penggunaan sampelnya.
8. Sdri S. W. Dwintasari, S.Si, atas ijin penggunaan data sekundernya.
9. British Council, proyek penelitian DelpHE 73.
10. Prof. dr. Rianto Setiabudi, Sp.FK, dr. Saptawati dan Dr. Heri Wibowo, MS atas bimbingan metode statistika penelitian.
11. Seluruh staf pengajar/dosen, tata usaha dan karyawan PMIB FKUI dan kekhususan Parasitologi FKUI.
12. Suami Sulthony Hartanto yang selalu memberikan dukungan penuh selama penyelesaian studi. Terima kasih atas kesabaran dan keikhlasannya.
13. Bapak Drs. H. Gunari MH dan ibu Hj. Da'watusholihah, S.Ag sebagai orang tua yang begitu besar perannya dalam mendidik dan membimbing semenjak kecil. Begitu juga dengan bapak dan ibu mertua yang juga sangat mendukung studi ini.
14. Saudara-saudara tercinta, Robithoh A. Islamy sebagai kakak yang sangat berperan dalam dukungan moril maupun materil. Riza A. Rahman, Raisa A. Hamidah. Juga saudara ipar Ulil Hamida, Nina, Hoho, Heny dan Happy yang penulis sayangi.
15. Teman-teman seperjuangan di PMIB FKUI, semoga perjuangan kita memberikan hasil yang bermanfaat untuk masa depan.
16. Semua guru yang telah mendidik semenjak kecil hingga sekarang.
17. Serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan tesis.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu saran, masukan dan kritik untuk kemajuan penulis di masa depan sangat diharapkan. Penulis berharap semoga tesis ini bermanfaat kepada semua pihak dalam proses belajar dan dapat memberikan sumbangan bagi kemajuan ilmu pengetahuan. Amin.

Jakarta, 3 Desember 2008

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rudina Azimata Rosyidah  
NPM : 6105012062  
Program Studi : Pasca Sarjana Ilmu Biomedik  
Departemen : Parasitologi  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Sampel Tinja dengan Metode Pewarnaan Modifikasi Tahan Asam dan Auramin Fenol

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta  
Pada tanggal : 3 Desember 2008  
Yang menyatakan

  
( Rudina Azimata R. )

## ABSTRAK

Nama : Rudina Azimata Rosyidah  
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi  
Judul : Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Sampel Tinja dengan Metode Pewarnaan Modifikasi Tahan Asam dan Auramin Fenol

*Cryptosporidium* sp. adalah parasit protozoa usus intraseluler yang menginfeksi berbagai hewan vertebrata termasuk manusia dan menyebabkan penyakit kriptosporidiosis, juga merupakan agen penyebab diare yang bersifat oportunistik. Gejala yang berulang dan angka penularan yang tinggi akan menurunkan kualitas hidup penderita sehingga diperlukan diagnosis kriptosporidiosis yang cepat secara mikroskopis pada sediaan tinja yang diwarnai. Tesis ini bertujuan membandingkan metode pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA) dan auramin fenol (AF) untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dari sampel tinja dengan dan tanpa konsentrasi. Sensitivitas dan spesifisitas setiap metode dari tinja yang dikonsentrasi, ditentukan dengan PCR\* sebagai baku emas. Penelitian ini adalah penelitian kualitatif dengan desain *cross sectional* menggunakan uji diagnostik. Hasil uji skrining dan tingkat *agreement* dihitung. Dari 130 sampel tinja yang diperiksa, 5,4%, 10%, 10%, 19,2% dan 32,3% positif *Cryptosporidium* sp. dengan metode MTA tanpa konsentrasi, MTA dikonsentrasi, AF tanpa konsentrasi, AF dikonsentrasi dan PCR\*. Hasil positif ookista *Cryptosporidium* sp. lebih banyak ditemukan pada sediaan tinja yang dikonsentrasi. Hasil tidak berbeda bermakna pada perbandingan hasil MTA dengan dan tanpa konsentrasi ( $p=0,07$ ), sedangkan hasil berbeda bermakna pada AF ( $p=0,00$ ). Sensitivitas MTA dan AF tinja konsentrasi adalah 30,9% dan 54,8%; spesifisitas 100% dan 97,7% dibandingkan dengan PCR\*. Metode pewarnaan AF memiliki nilai sensitivitas lebih tinggi, tetapi spesifisitasnya sama dengan MTA. Metode pewarnaan AF dapat digunakan sebagai alternatif dari pewarnaan MTA untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja.

**Kata kunci:**

auramin fenol, *Cryptosporidium* sp., diagnosis, modifikasi tahan asam

## ABSTRACT

Name : Rudina Azimata Rosyidah  
Study Program: Biomedical Science, Department of Parasitology  
Title : Comparison Detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in Fecal Sample with The Modified Acid Fast and Auramine Phenol Staining Method

*Cryptosporidium* sp. is intestinal protozoa parasite intracellular which infect widely vertebrata include human and cause cryptosporidiosis disease, also opportunistic agent for diarrhea. Reinfection and high transmission can decrease quality of life patient, so it needs a quick diagnostic with microscopy analysis to stain fecal smears. The objective of this study is to investigate the comparison of the modified acid fast (MAF) and auramine phenol (Aph) staining method in order to detecting *Cryptosporidium* sp. oocysts from unconcentrated and concentrated fecal sample. The sensitivity and specificity of each method from concentrated fecal sample was determined with PCR\* as the gold standard. The result of the screening test and the levels of agreement were quantified. This research is qualitative interpretation with cross sectional design study which using diagnostic test. Of the 130 fecal samples that has examined, 5,4%, 10%, 10%, 19,2% and 32,3% were positive *Cryptosporidium* sp. by the MAF unconcentrated, MAF concentrated, Aph unconcentrated, Aph concentrated and PCR\* method respectively. The majority of positive *Cryptosporidium* sp. samples were found in concentrated samples. The results have no significant differences between MAF staining with unconcentrated and concentrated fecal sample ( $p=0,07$ ), but there is a significant difference for Aph staining ( $p=0,00$ ). In comparison with PCR\* results, the sensitivities of MAF and Aph concentrated methods were 30,9% and 54,8%; the specificities were 100% and 97,7% respectively. The Aph staining method apparently has more sensitivity than MAF staining method, but has the same specificity. The Aph staining method proved to be a valuable alternative to MAF staining for detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in fecal sample.

**Key words:**

auramine phenol, *Cryptosporidium* sp., diagnostic, modified acid fast

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiv
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Hipotesis.....	6
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>7</b>
2.1 Sejarah Infeksi <i>Cryptosporidium</i> sp.....	7
2.2 Biologi <i>Cryptosporidium</i> sp. ....	8
2.2.1 Klasifikasi <i>Cryptosporidium</i> sp. ....	8
2.2.2 Morfologi <i>Cryptosporidium</i> sp. ....	9
2.2.3 Habitat pada Manusia .....	10
2.2.4 Daur Hidup <i>Cryptosporidium</i> sp. ....	11
2.3 Gambaran Klinis .....	12
2.4 Epidemiologi Kriptosporidiosis .....	14
2.4.1 Distribusi Geografis dan Prevalensi pada Manusia .....	14
2.4.2 Sumber Infeksi dan Cara Transmisi .....	15
2.5 Diagnosis Kriptosporidiosis .....	18
2.5.1 Uji Molekuler .....	19
2.5.2 Uji Serologi .....	20
2.5.3 Pemeriksaan Mikroskopis .....	20
a. Modifikasi Tahan Asam .....	22
b. Auramin Fenol .....	23
<b>3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>25</b>
3.1 Desain Penelitian .....	25
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	25
3.3 Sampel Penelitian .....	25
3.4 Besar Sampel .....	25

3.5	Alat dan Bahan .....	26
3.5.1	Alat .....	26
3.5.2	Bahan .....	27
3.6	Cara Kerja .....	28
3.6.1	Sampel tinja untuk Sediaan Tanpa Konsentrasi .....	28
3.6.2	Teknik Konsentrasi Tinja dengan Air – Eter .....	28
3.6.3	Kontrol Positif .....	28
3.6.4	Teknik Pewarnaan dan Pemeriksaan Sediaan .....	28
3.6.4.1	Pewarnaan MTA .....	28
3.6.4.2	Pewarnaan AF .....	29
3.7	Penilaian Hasil Kerja .....	30
3.8	Definisi Operasional .....	31
3.9	Analisis Data .....	32
3.10	Alur Penelitian .....	33
<b>4.</b>	<b>HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>34</b>
4.1	Hasil Pewarnaan dengan Metode Modifikasi Tahan Asam (MTA) dan Auramin Fenol (AF) .....	34
4.1.1	Hasil Pulasan pada Metode Pewarnaan MTA .....	34
4.1.2	Hasil Pulasan pada Metode Pewarnaan AF .....	35
4.1.3	Waktu Pewarnaan dan Pemeriksaan Sediaan .....	37
4.2	Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan dan Tanpa Konsentrasi dengan Metode MTA dan AF untuk Deteksi Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. ....	38
4.3	Perbandingan Deteksi Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Tinja Konsentrasi Antara Metode Pewarnaan MTA dan AF dengan PCR .....	39
<b>5.</b>	<b>PEMBAHASAN .....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>48</b>
6.1	Kesimpulan .....	48
6.2	Saran .....	48
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>49</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>54</b>
	<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>	<b>62</b>
	<b>SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TESIS .....</b>	<b>64</b>
	<b>DRAFT ARTIKEL</b>	

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Beberapa Spesies dalam Genus <i>Cryptosporidium</i> yang Menginfeksi Manusia .....	9
Tabel 2.2	Pilihan Diagnosis untuk Deteksi <i>Cryptosporidium</i> pada Sampel Tinja .....	18
Tabel 2.3	Kualitas Morfologi Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. yang diisolasi dan diwarnai dengan Berbagai Teknik .....	23
Tabel 4.1	Waktu Pewarnaan dan Pemeriksaan yang dibutuhkan Tiap Sediaan Tinja untuk Metode MTA dan AF .....	37
Tabel 4.2	Jumlah Ookista <i>Cryptosporidium</i> pada pemeriksaan dengan Metode Pewarnaan MTA dan AF .....	37
Tabel 4.3	Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan dan Tanpa Konsentrasi Pada Metode MTA .....	38
Tabel 4.4	Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan dan Konsentrasi pada dengan Metode AF .....	38
Tabel 4.5	Perbandingan Deteksi Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Tinja Konsentrasi dengan Metode MTA dan PCR .....	39
Tabel 4.6	Perbandingan Deteksi Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Tinja Konsentrasi dengan Metode AF dan PCR.....	40

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Ookista <i>C. parvum</i> dengan Mikrograf Elektron (garis skala = 1 $\mu\text{m}$ ) .....	9
Gambar 2.2	Ekskistasi Sporozoit dari Ookista <i>C. Parvum</i> .....	10
Gambar 2.3	Daur Hidup <i>Cryptosporidium parvum</i> Terjadi Dalam Tahap Aseksual dan Seksual .....	12
Gambar 2.4	Cara Transmisi <i>Cryptosporidium</i> sp. ....	16
Gambar 4.1	Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. dengan Pewarnaan MTA pada Tinja Tanpa Konsentrasi (pembesaran 1000x) .....	34
Gambar 4.2	Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. dengan Pewarnaan MTA pada Tinja Konsentrasi (pembesaran 1000x) .....	35
Gambar 4.3	Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. dengan Pewarnaan AF pada Tinja Tanpa Konsentrasi (pembesaran 400x) .....	36
Gambar 4.4	Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. dengan Pewarnaan AF pada Tinja Konsentrasi (pembesaran 400x) .....	36

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi dan Cara Pembuatan Larutan .....	54
Lampiran 2.	Rumus Uji Diagnostik .....	56
Lampiran 3.	Perbandingan Waktu Pemeriksaan Sediaan Negatif dan Positif pada Metode Pewarnaan MTA dan AF .....	57
Lampiran 4.	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Metode MTA dengan (K) dan Tanpa (L) Konsentrasi.....	58
Lampiran 5.	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Metode AF dengan (K) dan Tanpa (L) Konsentrasi.....	59
Lampiran 6.	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Metode MTA Konsentrasi dengan PCR* .....	60
Lampiran 7.	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Metode AF Konsentrasi dengan PCR* .....	61

## DAFTAR SINGKATAN

AF	: auramin fenol
AIDS	: <i>acquired immunodeficiency virus</i>
ARV	: anti retroviral
Balita	: bawah lima tahun
Batita	: bawah tiga tahun
COWP	: <i>cryptosporidium oocyst wall protein</i>
DAPI	: 4'-6-diamidino-2-phenylindole
DIC	: <i>differential interference contrast</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FITC	: <i>fluorescein isothiocyanate</i>
HCl	: hydro chloric
HIV	: <i>human immunodeficiency virus</i>
IF	: immunofluoresensi
IFA	: <i>immunofluorescence assay</i>
IgA	: immunoglobulin A
IgG	: immunoglobulin G
IgM	: immunoglobulin M
IMS	: <i>immunomagnetic separation</i>
mAb	: <i>monoclonal antibody</i>
MTA	: modifikasi taban asam
MZN	: modifikasi Ziehl-Neelsen
PAS	: <i>periodic acid-Schiff</i>
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
PVA	: polivinil alkohol
rRNA	: <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RSUP	: rumah sakit umum pemerintah
SAF	: <i>sodium acetate-acetic acid formalin</i>
sp	: spesies
SPDL	: <i>Scottish Parasite Diagnostic Laboratory</i>
UV	: ultraviolet

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### L1 Latar Belakang

*Cryptosporidium* sp. adalah parasit protozoa usus intraseluler yang menginfeksi berbagai hewan vertebrata termasuk manusia dan menyebabkan penyakit kriptosporidiosis.<sup>1</sup> Protozoa usus ini termasuk ordo Coccidia dan mempunyai distribusi geografis yang luas.<sup>2</sup> Meskipun *Cryptosporidium* sp. sudah diidentifikasi sejak tahun 1907, tetapi 50 tahun kemudian baru diketahui sebagai patogen pada hewan dan 70 tahun kemudian patogen pada manusia. Hal ini disebabkan karena teknik yang kurang efektif dalam mendeteksi parasit pada bahan klinis dan dalam menentukan infeksi serta penyakit yang jelas pada tingkat populasi.<sup>3</sup>

*Cryptosporidium* sp. pertama kali ditemukan oleh Tyzzer pada tahun 1907 di kelenjar lambung tikus laboratorium.<sup>1</sup> Pada tahun 1976, dua kasus kriptosporidiosis pada manusia pertama kali dilaporkan, salah satunya pada anak perempuan berusia di bawah tiga tahun (batita).<sup>4</sup> Kriptosporidiosis pada awalnya dikenal sebagai zoonosis yang dapat menyebabkan penyakit gastrointestinal pada manusia<sup>5</sup> dan merupakan agen penyebab diare yang bersifat oportunistik.<sup>2</sup> Patogen oportunistik terutama pada anak-anak dan individu imunokompromis.<sup>6</sup>

Transmisi parasit dapat terjadi secara langsung melalui hewan dan manusia yang terinfeksi (fekal oral) maupun dari makanan dan air.<sup>2,4</sup> Penularan melalui air yang terkontaminasi dilaporkan menimbulkan wabah terbesar di Milwaukee pada tahun 1993 dan menginfeksi lebih dari 400.000 orang.<sup>4,6</sup> Orang yang menderita kriptosporidiosis umumnya terkait dengan lemahnya sistem imun seperti penderita AIDS dan kanker. Namun dengan adanya kejadian wabah di Milwaukee, individu imunokompeten juga dapat mengalami gejala kriptosporidiosis.<sup>7</sup>

Beberapa peneliti telah melaporkan kejadian kriptosporidiosis pada penderita AIDS dan HIV positif. Seiring dengan meningkatnya angka kejadian HIV/AIDS di dunia maka diperkirakan angka kejadian kriptosporidiosis turut meningkat juga apabila penderita HIV/AIDS tidak mendapat terapi antiretroviral

(ARV).<sup>8</sup> Pada tahun 2001 di Bangkok, Thailand terdapat lima kasus kriptosporidiosis dari 82 (6,1%) anak HIV positif dan pada orang dewasa yang terinfeksi HIV dengan diare kronis sebanyak 20 – 25%.<sup>9</sup> Pada tahun 2004, dilaporkan kasus kriptosporidiosis pada penderita AIDS di Amerika Serikat sebanyak 3-4% dan di Afrika/Haiti lebih dari 50%.<sup>10</sup> Di Indonesia sendiri sampai bulan Juni tahun 2008 telah dilaporkan peningkatan kasus AIDS mencapai 12686 kasus dan 6130 kasus HIV.<sup>11</sup> Studi prevalensi kriptosporidiosis pada individu imunokompeten dari 26 negara, dilaporkan sekitar 0,6 – 20% di negara maju dan 4 – 20% di negara berkembang.<sup>8</sup>

*Cryptosporidium* sp. juga dilaporkan lebih sering menginfeksi anak-anak dan diperkirakan berhubungan erat dengan status imun anak.<sup>12</sup> Prevalensi tertinggi terjadi pada anak usia di bawah 5 tahun.<sup>8</sup> Pada tahun 2000 di Delhi, India terdapat infeksi *Cryptosporidium* sp. pada 24 dari 127 (18,9%) anak yang diare.<sup>13</sup> Perch dkk. (2001) dalam penelitiannya di Afrika Barat, prevalensi kriptosporidiosis terbanyak ada pada anak batita dengan diare, yaitu sebesar 7,7%.<sup>14</sup> Pada tahun 2002 di Goias, Brazil pada anak usia 2 minggu – 10 tahun, ditemukan prevalensi kriptosporidiosis 18,7% (83 dari 445 anak).<sup>15</sup> Pada tahun 2004 di Bangladesh terdapat prevalensi kriptosporidiosis 8,4% pada anak usia kurang dari 5 tahun.<sup>16</sup> Pada tahun 2007 di Malawi pada anak usia kurang dari 5 tahun dengan diare di RS, ditemukan prevalensi kriptosporidiosis 5,9% (50 dari 848 sampel).<sup>17</sup> Di Indonesia, tepatnya di Surabaya pada tahun 1998, prevalensi kriptosporidiosis sebesar 2,8% pada anak diare dan 1,4% pada anak tidak diare.<sup>18</sup> Sedangkan pada tahun 2006 di Jakarta, Soetomenggolo melaporkan bahwa infeksi parasit ini prevalensinya sebesar 2,1% pada anak batita dengan gejala klinis diare dan tidak diare.<sup>19</sup>

Gejala klinis kriptosporidiosis sangat luas mulai dari asimtomatik sampai diare persisten. Diare akut yang sembuh sendiri pada individu imunokompeten sampai diare kronis yang fatal pada penderita imunokompromis.<sup>1,2,5</sup> Diare yang timbul dapat menyerupai kolera<sup>4</sup> dan menyebabkan kehilangan cairan 3-20 liter per hari sehingga dapat terjadi dehidrasi berat.<sup>12</sup> Walaupun penyakit ini dapat sembuh sendiri, tetapi sebanyak 13% anak yang terinfeksi *Cryptosporidium* sp. akan mengalami gejala yang berulang dalam 6 hari sampai 2,5 bulan setelah infeksi yang pertama.<sup>15</sup> Gejala yang berulang dan angka penularan yang tinggi

akan menurunkan kualitas hidup penderita sehingga diagnosis dini kriptosporidiosis diperlukan untuk penatalaksanaan kasus dan mencegah penularan lebih luas.

Sebelum tahun 1978, diagnosis *Cryptosporidium* sp. hanya secara histologi di jaringan dan diobservasi pada permukaan epitel usus dengan mikroskop elektron.<sup>20</sup> Kasus pertama kriptosporidiosis pada manusia didiagnosis dengan biopsi usus dan rektum.<sup>21</sup> Pada tahun 1980, ookista *Cryptosporidium* sp. ditemukan pada spesimen tinja manusia,<sup>22</sup> sehingga diagnosis kriptosporidiosis dapat ditegakkan secara non invasif dengan menemukan ookista *Cryptosporidium* sp. secara mikroskopis pada sediaan tinja yang diwarnai.<sup>23</sup> Beberapa teknik parasitologi untuk mengidentifikasi ookista *Cryptosporidium* sp., antara lain dengan teknik pewarnaan seperti pulasan modifikasi tahan asam/ modifikasi Ziehl-Neelsen (MTA/mZN),<sup>3,23</sup> Kinyoun,<sup>24</sup> safranin,<sup>24</sup> dimetil sulfoksida,<sup>24</sup> Giemsa,<sup>24</sup> auramin fenol (AF),<sup>3,23</sup> dan imunofluoresensi (IF).<sup>25</sup>

Berbagai teknik pengukuran konsentrasi ookista di tinja, dan deteksi antigen kriptosporidiosis juga telah dikembangkan untuk meningkatkan sensitivitas pemeriksaan.<sup>26,27</sup> Penggunaan metode konsentrasi ookista pada sampel tinja dapat meningkatkan sensitivitas deteksi.<sup>28</sup> Beberapa teknik konsentrasi yang digunakan antara lain formalin etil-asetat, formalin eter, air eter, larutan gula Sheater, dan lain-lain.<sup>29</sup> Metode flotasi dan sedimentasi sesuai untuk konsentrasi ookista *Cryptosporidium* sp.<sup>3,28</sup> Konsentrasi air-eter merupakan teknik yang direkomendasikan dalam studi epidemiologi untuk mendapatkan ookista di tinja dalam jumlah banyak.<sup>30</sup>

Metode diagnostik untuk deteksi ookista di tinja juga telah dilakukan dengan menggunakan teknik aglutinasi partikel latex yang dilapisi Ab anti-*Cryptosporidium*, *direct immunofluoresensi* dan ELISA. Meskipun metode-metode tersebut adalah uji imunoserologi yang sensitif dan spesifik, namun membutuhkan keahlian teknik, perlengkapan mahal dan pemeriksa yang berpengalaman.<sup>20,24,25</sup> Begitu juga dengan teknik PCR, yang saat ini memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang paling baik (100%).<sup>31</sup> Oleh karena kelebihanannya itu, PCR digunakan sebagai *gold standard*<sup>32</sup> dalam penelitian ini.

Pewarnaan MTA dengan atau tanpa konsentrasi merupakan metode yang

paling umum digunakan dalam diagnosis laboratorium kriptosporidiosis.<sup>6,23,27</sup> Antara tahun 1978 dan 1980, pewarnaan Giemsa digunakan untuk mendeteksi ookista pada tinja hewan dan manusia,<sup>22</sup> namun ternyata kurang sensitif untuk deteksi ookista.<sup>33</sup> Pada tahun 1981 teknik modifikasi tahan asam Ziehl-Neelsen digunakan untuk mewarnai ookista.<sup>34</sup> Penggunaan pulasan MTA ini terkait dengan sifat protozoa genus *Cryptosporidium* yang tahan asam.<sup>35</sup>

Metode MTA sudah umum digunakan di seluruh dunia, terutama di negara-negara berkembang karena sederhana dan biaya yang relatif murah. Terutama jika modifikasi yang dipilih adalah teknik tanpa pemanasan (*cold staining*). Pada penelitian ini, akan digunakan pewarnaan MTA *cold staining basic fuhsin*. Namun, sensitivitas teknik ini rendah dan sangat bergantung pada ketrampilan serta pengalaman tenaga mikroskopis dalam mengidentifikasi *Cryptosporidium* sp.,<sup>24,26</sup> apalagi bila jumlah ookista sangat sedikit pada tinja.<sup>36</sup> Sebagai alternatif, digunakan teknik auramin fenol (AF) dengan pembacaan hasil menggunakan mikroskop fluoresensi.<sup>37</sup> Pewarnaan AF umumnya digunakan untuk mengidentifikasi *Mycobacterium* spp., namun sekarang sudah dapat dilakukan untuk deteksi *Cryptosporidium* spp.<sup>24</sup>

Sensitivitas pewarnaan MTA dan AF adalah 40,6% dan 93,8%, sedangkan spesifisitas keduanya adalah 52,0% dan 85,7% pada pemeriksaan sampel tinja pasien tanpa gejala diare (32 dari 311; 10,3%) oleh Arrowood.<sup>25</sup> Tidak ada nilai standar baku untuk sensitivitas dan spesifisitas, sehingga bisa berbeda karena faktor tempat, waktu, jumlah sampel dan keahlian pemeriksa. Metode AF memiliki sensitivitas lebih tinggi dan pemeriksaannya lebih cepat dibandingkan MTA.<sup>26</sup> Metode AF atau pewarnaan fluorokrom lebih sensitif, karena dengan mikroskop fluoresensi, ookista *Cryptosporidium* sp. yang berukuran sangat kecil (4-6  $\mu\text{m}$ ) akan berwarna kuning terang sehingga mudah diidentifikasi tanpa perlu perbesaran skala obyektif yang tinggi.<sup>12,24,28,31,33</sup>

Diagnosis yang tepat dan cepat akan sangat membantu penatalaksanaan penderita, karena belum ada obat yang efektif untuk membunuh parasit ini pada penderita HIV. Deteksi ookista di tinja menggunakan teknik fluoresensi dengan pewarnaan AF merupakan alternatif pemecahan masalah. Penggunaan teknik AF pada tinja konsentrasi memungkinkan diagnosis kriptosporidiosis yang lebih cepat

dan akurat pada spesimen klinis, serta untuk skrining cepat pada suatu epidemi.<sup>23,24,29</sup>

Pada penelitian ini, dua metode pewarnaan MTA dan AF pada sampel tinja anak batita dengan konsentrasi dibandingkan sensitivitas dan spesifisitasnya dengan hasil PCR sebagai baku emas. Sensitivitas akan meningkat bilamana dilakukan pemeriksaan lebih dari satu spesimen pada satu sampel dengan konsekuensi membutuhkan waktu lebih lama. Untuk itu diperlukan teknik pemeriksaan laboratorium yang tidak invasif,<sup>3,28</sup> lebih sensitif, spesifik dan efisien terhadap deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja.<sup>24</sup> Semakin sensitif tes diagnosis yang digunakan, akan lebih mudah untuk mengidentifikasi infeksi *Cryptosporidium* sp. yang berintensitas rendah.<sup>12,14,24</sup>

## **I.2 Rumusan Masalah**

Hasil penelitian terdahulu menunjukkan sangat rendahnya prevalensi infeksi *Cryptosporidium* sp. (2,1%) pada anak batita di Bantaran Sungai Ciliwung Kel. Kampung Melayu pada pemeriksaan mikroskopis tinja tanpa dikonsentrasi dengan pewarnaan MTA. Hasil tersebut dirasakan tidak mewakili keadaan yang sebenarnya, maka dilakukan teknik pemeriksaan ulang untuk meningkatkan kemampuan deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dengan metode AF.

Sehingga dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah metode pewarnaan AF lebih baik daripada MTA untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan tinja dengan dan tanpa konsentrasi?
2. Apakah metode pewarnaan AF lebih sensitif dan spesifik daripada MTA dalam mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp.?

## **I.3 Tujuan Penelitian**

### **I.3.1. Tujuan Umum**

Membandingkan metode pewarnaan MTA dengan AF untuk menentukan metode pewarnaan terbaik dalam deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan tinja dengan dan tanpa konsentrasi.

### **I.3.2. Tujuan Khusus**

1. Membandingkan kualitas pulasan dan efisiensi dari kedua metode pewarnaan dalam mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp.
2. Mengetahui frekuensi hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada anak batita di kelurahan Kampung Melayu pada tinja dengan dan tanpa konsentrasi menggunakan metode pewarnaan MTA dan AF.
3. Mengetahui sensitivitas dan spesifisitas metode pewarnaan MTA dan AF dalam mendeteksi infeksi *Cryptosporidium* sp. dibandingkan PCR sebagai baku emas.

### **I.4 Hipotesis**

Metode pewarnaan AF lebih sensitif dan spesifik dibandingkan MTA untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada tinja konsentrasi.

### **I.5 Manfaat**

1. Memberikan informasi tentang deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. secara mikroskopis dan diharapkan metode pewarnaan terbaik dapat digunakan dan diterapkan di laboratorium parasitologi standar di berbagai tempat sehingga membantu diagnosis lebih cepat, khususnya pada survei dan skrining sampel dalam jumlah besar.
2. Memberikan informasi data epidemiologi infeksi *Cryptosporidium* sp. yang dapat digunakan untuk membantu tata laksana penderita dengan kasus diare.
3. Data hasil penelitian dapat digunakan untuk penelitian *Cryptosporidium* sp. selanjutnya.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Sejarah Infeksi *Cryptosporidium* sp.

*Cryptosporidium* sp. merupakan salah satu parasit usus penyebab diare pada manusia yang sampai saat ini belum banyak dilaporkan di Indonesia. Penyakit yang disebabkan oleh parasit ini disebut kriptosporidiosis.<sup>2,6</sup> *Cryptosporidium* sp. pertama kali ditemukan oleh Tyzzer tahun 1907 pada kelenjar lambung mencit yang kemudian diidentifikasi sebagai *Cryptosporidium muris*. Pada tahun 1912, Tyzzer mengidentifikasi *Cryptosporidium* spesies lain di usus halus mencit yang mirip dengan *C. muris*, kemudian diidentifikasi sebagai *C. parvum* (spesies kedua).<sup>1</sup> Pada tahun 1971, Panciera melaporkan kasus kriptosporidiosis pada anak lembu yang diare. Tahun 1976, dilaporkan pertama kali dua kasus kriptosporidiosis pada manusia, salah satunya pada anak perempuan batita dari Nashville dengan gejala diare.<sup>4</sup> Sejak saat itu banyak dilaporkan kasus kriptosporidiosis pada hewan ternak, mamalia, burung, reptilia dan ikan.<sup>4,5</sup>

Kasus kriptosporidiosis sebagai patogen pada manusia mulai banyak dilaporkan antara tahun 1980 dan 1983 yaitu ditemukannya lebih dari 80 kasus di luar negeri,<sup>4,5,23</sup> namun di Indonesia belum menjadi perhatian publik. Perhatian terhadap parasit ini meningkat karena kasus kriptosporidiosis pada manusia banyak dilaporkan dari berbagai negara, antara lain dari Denmark, Venezuela, Australia, Haiti, Selandia Baru, Muangthai, Filipina.<sup>38</sup> Di Indonesia, pada tahun 1990, dilaporkan hasil penelitian pertama tentang *Cryptosporidium* sp.<sup>38</sup> dan dari hasil ini belum dapat disimpulkan *Cryptosporidium* sp. sebagai agen utama penyebab diare, karena tidak diteliti enteropatogen lain seperti virus dan bakteri yang lebih sering sebagai penyebab diare. Namun akhirnya terbukti bahwa *Cryptosporidium* sp. adalah spesies parasit “baru” yang dapat menyebabkan gejala gastrointestinal pada manusia. Selain itu *Cryptosporidium* sp. adalah agen penyebab diare melalui infeksi oportunistik,<sup>2,10</sup> terutama pada anak-anak dan individu imunokompromis seperti pada penderita AIDS dengan manifestasi diare kronis.<sup>7</sup> Infeksi parasit ini juga bisa terjadi pada orang dewasa yang

imunokompeten.<sup>6</sup> Studi epidemiologi, diagnosis dan pengobatan kriptosporidiosis meningkat drastis saat penyakit ini muncul dan menginfeksi banyak orang,<sup>1</sup> terutama setelah terjadi *outbreak* terbesar di Milwaukee pada tahun 1993 dan menginfeksi lebih dari 400.000 orang.<sup>4,6</sup>

## 2.2 Biologi *Cryptosporidium* sp.

### 2.2.1 Klasifikasi *Cryptosporidium* sp.

*Cryptosporidium* sp. adalah parasit Coccidia bersel tunggal, merupakan protozoa enterosit dalam air dengan ukuran sama dengan sel darah merah, yang menginfeksi mukosa usus halus.<sup>6</sup> *Cryptosporidium* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:<sup>1,5,28</sup>

Kingdom	: Protista
Filum	: Apicomplexa
Kelas	: Sporozoasida
Sub Kelas	: Coccidiasina
Ordo	: Eucoccidiorida
Sub Ordo	: Eimeriorina
Familia	: Cryptosporidiidae
Genus	: <i>Cryptosporidium</i>

Selain *Cryptosporidium*, yang termasuk dalam filum Apicomplexa adalah genus *Isospora*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, dll. dan *Cryptosporidium* memiliki ukuran ookista terkecil.<sup>1</sup>

Beberapa pakar menyatakan, ada 16 spesies *Cryptosporidium* (berdasarkan hospesnya) yang menginfeksi ikan, reptil, burung dan mamalia.<sup>1,6,10,39</sup> Yaitu *C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. wairi*, *C. saurophilum*, *C. suis*, *C. scophthalmi*, *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. serpentis*, *C. molnari*, *C. galli*, *C. meleagridis* dan *C. baileyi*.<sup>3,28,39</sup> Hanya delapan spesies yang diduga dapat menginfeksi mamalia terutama manusia (Tabel 2.1).<sup>3</sup>

Dari kedelapan spesies tersebut, yang utama adalah *C. parvum* dan *C. muris*<sup>40,41</sup> yang dibedakan berdasarkan ukuran ookista dan sifat patogenitasnya. *C. parvum* (4,5-5,5  $\mu\text{m}$ ) lebih patogen,<sup>42</sup> karena sering menimbulkan diare pada anak dan individu immunokompromis. Sedangkan *C. muris* (5,5-7,4  $\mu\text{m}$ ) kurang

patogen dibandingkan *C. parvum* dan biasanya dapat ditemukan pada anak-anak maupun orang dewasa.<sup>28,39</sup>

**Tabel 2.1. Beberapa Spesies dalam Genus *Cryptosporidium* yang Menginfeksi Manusia**<sup>39</sup>

Spesies	Ukuran ookista ( $\mu\text{m}$ )	Tempat infeksi	Hospes utama
<i>C. hominis</i>	4,5 x 5,5	Usus halus	Manusia
<i>C. parvum</i>	4,5 x 5,5	Usus halus	Mamalia neonatus, manusia
<i>C. suis</i>	5,05 x 4,41	Usus halus	Babi
<i>C. felis</i>	4,5 x 5,0	Usus halus	Kucing
<i>C. canis</i>	4,95 x 4,71	Usus halus	Anjing
<i>C. meleagridis</i>	4,5 – 4,0 x 4,6 – 5,2	Usus	Kalkun
<i>C. muris</i>	5,5 x 7,4	Perut	Tikus
<i>C. andersoni</i>	5,6 x 7,4	Perut	Sapi, Unta

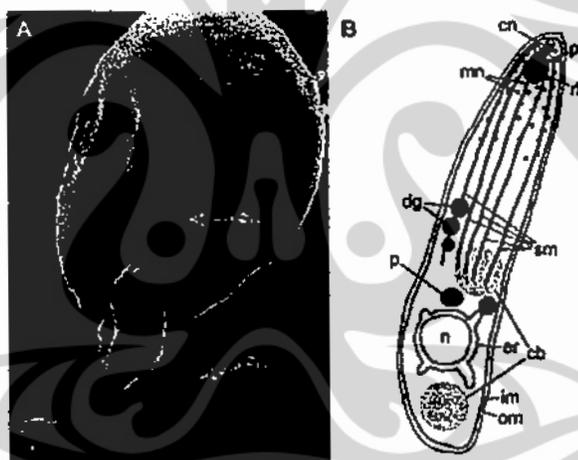
### 2.2.2 Morfologi *Cryptosporidium* sp.

Infeksi *Cryptosporidium* terjadi bila tertelan ookista matang yang dikeluarkan oleh tinja hospes terinfeksi, dengan masa prepaten, yaitu waktu antara infeksi dan pengeluaran ookista selama 4-22 hari untuk manusia,<sup>43</sup> dan bisa lebih dari 30 hari pada individu imunokompeten.<sup>22</sup> Ookista adalah bentuk infeksiif terutama bila telah dikeluarkan dan dalam jumlah banyak. Ookista yang terbentuk ada dua macam, yaitu ookista berdinding tipis dan tebal. Ookista berdinding tipis mengeluarkan sporozoit di dalam usus dan menyebabkan autoinfeksi, sedangkan yang berdinding tebal dikeluarkan bersama dengan tinja. Sporulasi terjadi di luar hospes. Ookista berukuran 4-6  $\mu$ , dindingnya tebal sehingga melindunginya dari berbagai disinfektan (Gambar 2.1).



**Gambar 2.1. Ookista *C. parvum* dengan Mikrograf Elektron (garis skala = 1  $\mu\text{m}$ )<sup>43</sup>**

Ookista matang berisi empat sporozoit yang akan menempel dan memasuki enterosit.<sup>4,6,12,42,44</sup> Sporozoit yang berbentuk seperti pisang dikeluarkan melalui dinding ookista yang terbuka melalui pajanan suhu tubuh, asam, tripsin dan garam empedu (Gambar 2.2 A). Sporozoit *C. parvum* yang diekskistasi berukuran sekitar 3,8 – 5,2 x 0,6 – 1,2  $\mu\text{m}$ . Sporozoit memiliki sebuah ujung kepala yang kecil (Gambar 2.2 A dan B). Mikrotubul yang berperan penting untuk pergerakan keluar dan invasi, terletak di bawah membran plasma. Dalam sporozoit terdapat granula, mikronema, nukleus dan nukleolus, kompleks golgi, membran unit ganda dan retikulum endoplasma. Nukleus berada di bagian mid-terminal posterior. Organela seperti mitokondria dapat dilihat sejajar dengan nukleus (Gambar 2.2 B).<sup>39</sup> Setiap nukleus dari sporozoit mengandung 8 kromosom yang terdiri atas 10,1-10,4 miliar pasang basa DNA dengan sedikit sekali intron.<sup>45</sup>



Gambar 2.2 Ekskistasi Sporozoit dari Ookista *C. Parvum*<sup>39</sup>

### 2.2.3 Habitat pada Manusia

Habitat *Cryptosporidium* sp. pada manusia tidak hanya di usus halus, tetapi juga di organ-organ lain seperti faring, esofagus, lambung, duodenum, yeyunum, ileum, appendix, kolon, rektum, kandung empedu, dan saluran pankreas. Infeksi terberat ditemukan di yeyunum. Pada individu immunokompeten, parasit ini biasanya terbatas di usus halus, sedangkan pada individu immunokompromis dapat ditemukan pada saluran pencernaan dari esofagus ke rektum, juga pada sistem *hepatobiliary* dan saluran pernafasan.<sup>10</sup>

*Cryptosporidium* sp. di dalam usus, melekatkan diri di permukaan sel epitel pada "brush border", sehingga tampak menonjol ke dalam lumen usus. Sedangkan perkembangan parasit terjadi di dalam vakuola parasitoforus. Parasit ini intraseluler, tetapi ekstrasitoplasmik pada brush border sel hospesnya.<sup>6</sup> Melalui pengamatan dengan mikroskop elektron dapat dibuktikan bahwa *Cryptosporidium* melekat pada sel epitel usus secara ekstrasitoplasmik, yaitu hanya melekat dangkal di daerah mikrovili usus, tempat parasit ini bertahan hidup dan bereplikasi.<sup>46</sup> Pada pangkal perlekatan antara parasit dan mikrovili ada daerah yang mengalami fusi, sehingga terjadi kontak langsung antara sel epitel dan parasit. Daerah tersebut mempunyai struktur sangat tipis dan berbentuk lipatan-lipatan. Inilah yang disebut *feder organella* tempat terjadinya aliran nutrisi dari sel hospes ke parasit *Cryptosporidium*.<sup>10,46</sup>

#### 2.2.4 Daur Hidup *Cryptosporidium* sp.

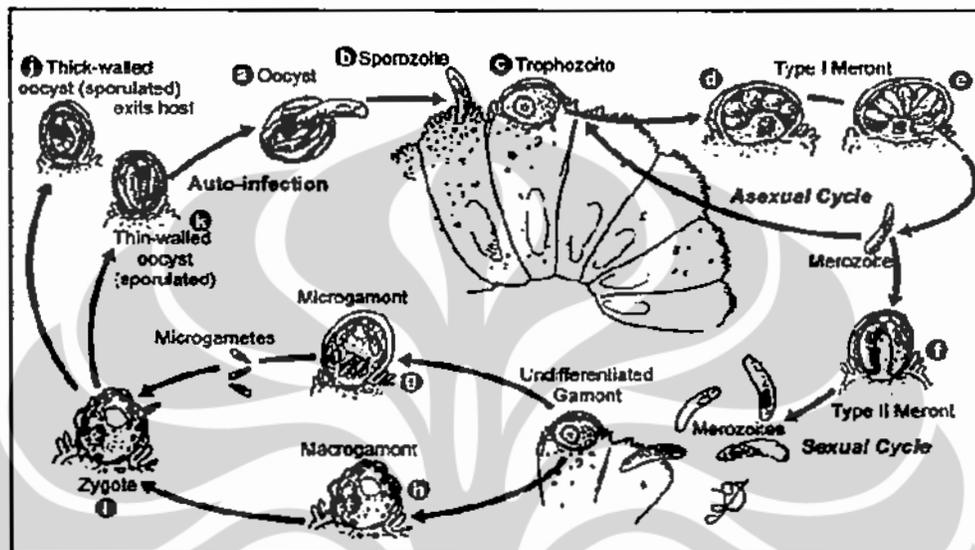
*Cryptosporidium* adalah protozoa yang termasuk kelas sporozoa yang berkembang biak secara aseksual dan seksual bergantian. Dalam daur hidup sporozoa ini terdapat 2 macam cara berkembang biak:<sup>41</sup>

1. Heteroksen : yaitu memerlukan dua hospes untuk melengkapi daur hidupnya (misalnya: *Plasmodium*).
2. Homoksen : yaitu memerlukan satu hospes saja dalam melengkapi daur hidupnya (misalnya: *Isospora*).

*Cryptosporidium* tergolong homoksen dan mampu bertahan hidup serta melakukan transmisi berdasarkan siklus hidupnya yang terdiri dari enam tahap perkembangan. Siklus seksual dan aseksual berlangsung dalam tubuh satu hospes (*monoxenous*) di saluran pencernaan (Gambar 2.3).<sup>1,5,42,44</sup>

Daur hidup *Cryptosporidium* dimulai dari adanya eksistasi, yaitu pecahnya ookista, yang terjadi di traktus gastrointestinalis atas lalu sporozoit keluar dari ookista dan menempel pada sel epitel usus, kemudian sporozoit berubah menjadi trofozoit. Trofozoit dan stadium-stadium selanjutnya hanya terdapat pada permukaan sel epitel, jadi tidak masuk ke dalam sitoplasma epitel tersebut.<sup>12</sup> Trofozoit mengalami skizogoni dengan tiga kali pembelahan inti sehingga dibentuk skizon generasi pertama yang mengandung 8 merozoit.

Kemudian skizon pecah, keluarlah 8 merozoit yang menginfeksi sel epitel lain. Merozoit generasi pertama ini mengalami skizogoni lagi dengan dua kali pembelahan inti sehingga terbentuk skizon generasi kedua yang mengandung 4 merozoit.<sup>12</sup>



Gambar 2.3. Daur Hidup *Cryptosporidium parvum* Terjadi Dalam Tahap Aseksual dan Seksual<sup>5</sup>

Skizon generasi kedua pecah dan 4 merozoit keluar. Kemudian merozoit generasi kedua ini menginfeksi kembali sel epitel lain, ada yang tumbuh menjadi makrogametosit dan ada yang menjadi mikrogametosit. Makrogametosit mengalami perkembangan dan berubah menjadi makrogamet (satu makrogametosit menjadi satu makrogamet). Mikrogametosit mengalami pembelahan inti beberapa kali dan berubah menjadi beberapa mikrogamet (jumlah sekitar 12-16). Satu mikrogamet membuahi satu makrogamet sehingga terbentuk zigot. Kemudian zigot berkembang menjadi ookista yang mengandung empat sporozoit, yang melengkapi daur hidup parasit ini.<sup>12</sup>

### 2.3 Gambaran Klinis

Gejala klinis kriptosporidiosis pada manusia berkaitan erat dengan status kekebalan tubuh penderita. Diare adalah gejala predominan yang ditemukan pada 80-90% kasus.<sup>44</sup> Pada individu imunokompeten, *Cryptosporidium* dapat menyebabkan diare yang biasanya kurang dari sebulan atau diare akut yang dapat sembuh sendiri, tetapi paling banyak infeksi parasit ini asimtomatik pada

individu imunokompeten. Pada individu imunokompromis seperti penderita AIDS, spektrum klinis mulai dari infeksi tanpa gejala, diare akut, dehidrasi, dan malabsorpsi. Sering terjadi gejala klinis berupa diare kronis dalam waktu lama atau menahun. Diare berlangsung selama 4 bulan dan pernah dilaporkan sampai 3 tahun, pada beberapa kasus bisa menyebabkan kematian.<sup>7-10,40,47</sup> Pada anak dengan hipogamaglobulinemia kongenital, dilaporkan diare dapat berlangsung sampai 3 tahun.<sup>10,42</sup> Diare kriptosporidiosis ini dapat ditemukan pada semua golongan umur, termasuk bayi di bawah 1 tahun yang masih menyusu.<sup>6,10,15,16</sup>

Patofisiologi banyaknya cairan yang hilang pada kriptosporidiosis tidak spesifik, bahkan diduga sama dengan toksin kolera. Kriptosporidiosis pada manusia ditandai dengan diare cair, tidak selalu "profus" dan tidak disertai darah. Jumlah cairan yang hilang melalui tinja antara 3-17 liter/hari.<sup>46</sup>

Infeksi tanpa gejala oleh kriptosporidiosis dapat terjadi pada individu imunokompeten maupun immunokompromis. Selain diare, gejala klinis kriptosporidiosis yang pernah dilaporkan antara lain demam ringan, pusing, nyeri ulu hati, sakit perut, mual, muntah, anoreksia, sukar tidur dan nafsu makan berkurang yang berakibat pada penurunan berat badan. Faktor usia individu yang terserang kriptosporidiosis tidak berpengaruh terhadap ada tidaknya gejala klinis.<sup>6,8,10,15,16</sup> Anak yang terinfeksi *C. parvum* memiliki berat badan lebih ringan rata-rata 2,0% daripada anak yang tidak terinfeksi ( $P>0,10$ ), meskipun berat badan tidak berhubungan dengan infeksi.<sup>15</sup>

Diare dan malnutrisi merupakan faktor penting yang secara tidak langsung dapat menyebabkan kematian pada penderita kriptosporidiosis. Diare merupakan mekanisme alamiah tubuh untuk mengeluarkan zat-zat racun yang tidak dikehendaki dari dalam usus.<sup>47</sup> Berdasarkan perjalanan penyakitnya, dibagi menjadi diare akut dan kronis. Diare akut terjadi mendadak dan berlangsung selama 1-2 minggu. Sedangkan diare kronis bisa berlangsung lebih dari tiga minggu setelah meredanya suatu serangan akut.<sup>9,16</sup> Berbagai faktor yang mempengaruhi terjadinya diare karena infeksi parasit adalah malnutrisi, keadaan sanitasi, kebersihan perumahan dan sosial ekonomi, juga karena komplikasi dengan infeksi usus oleh bakteri, virus atau parasit lain.<sup>10,15</sup>

## 2.4 Epidemiologi Kriptosporidiosis

### 2.4.1 Distribusi Geografis dan Prevalensi pada Manusia

Kriptosporidiosis pada manusia mempunyai distribusi yang luas di seluruh dunia.<sup>2,43,48</sup> *Cryptosporidium* sp. juga dapat sebagai penyebab diare epidemik di rumah sakit, pusat pemerintahan dan institusi lainnya di seluruh dunia.<sup>2</sup> Manusia dan hewan pada semua tingkatan usia dapat terinfeksi *Cryptosporidium* sp., mulai dari bayi usia 3 hari (yang mendapat infeksi dari vagina ibu dengan kriptosporidiosis) sampai orang dewasa yang berumur 95 tahun.<sup>48</sup> Yang paling rentan terinfeksi adalah anak-anak usia 1-5 tahun, wanita hamil dan individu immunokompromis.<sup>15,42</sup> Laki-laki cenderung lebih banyak terinfeksi daripada perempuan.<sup>15</sup> Kerentanan terhadap infeksi bervariasi untuk setiap individu, karena faktor latar belakang genetik dan status imun.<sup>8,12,44</sup>

Kriptosporidiosis banyak dilaporkan terutama pada penderita AIDS, dengan prevalensi di Amerika Serikat (AS) sekitar 3-4 % dan di Afrika dan Haiti lebih dari 50 %.<sup>10</sup> Pada penderita AIDS dengan diare di AS sebanyak 10-20% di tahun 1997.<sup>10,12</sup> Di Eropa pada penderita HIV ditemukan kasus kriptosporidiosis 6,6 % dan 3,8 % di Los Angeles, AS pada tahun 1996.<sup>8</sup> Kriptosporidiosis juga dapat terjadi pada orang dengan status immunokompromis yang lain, seperti agammaglobulinemia kongenital, defisiensi IgA, dan kanker.<sup>2,8,12</sup>

Prevalensi kriptosporidiosis pada manusia di Indonesia sampai saat ini masih belum banyak diketahui. Di luar negeri dilaporkan 1 – 18 % kasus dengan keluhan gastroenteritis, terinfeksi dengan *Cryptosporidium*.<sup>10</sup> Prevalensi *Cryptosporidium* pada tinja di Eropa dan Amerika Utara sekitar 1-3 % dan di Asia dan Afrika 5-10 % pada tahun 1991.<sup>5,12</sup> Selama kurun waktu 10 tahun (1990 – 2000) ditemukan prevalensi kriptosporidiosis dari 1,1% - 17,4% di Brazil. Sedangkan di Amerika Latin dari tahun 1989 – 1992, seperti: di Argentina 3,9%, di Costa Rica 4,3%, di Venezuela 10,8%, di Ekuador 11,2%, di Guatemala 18,3%, dan di Haiti 16,7%.<sup>15</sup> Di Manila, Brazil dan Amerika Latin *Cryptosporidium* positif pada 2,6 % dari 735 tinja anak dengan diare. Pada anak usia balita di Bolivia pada tahun 1997, prevalensi *Cryptosporidium* mencapai 32%, meski dengan tanpa gejala.<sup>43</sup> Dilaporkan juga dari suatu penelitian di Peruvia tahun 1997, 63% anak yang positif *Cryptosporidium* mempunyai gejala asimtomatik.<sup>6</sup> Pada

tahun 2005 di Korea pada pasien non HIV, ditemukan 6 dari 522 (1,1%) pasien laki-laki dan 3 dari 420 (0,7%) pasien perempuan yang positif kriptosporidiosis.<sup>49</sup>

Di Indonesia pada tahun 1989, ookista *Cryptosporidium* sp. ditemukan pada 4 dari 413 tinja anak dengan gejala diare di Jakarta.<sup>38</sup> Pada tahun 1990, kasus kriptosporidiosis di beberapa rumah sakit di Jakarta, terdapat 11 (1,3 %) dari 838 anak dengan diare dan 4 (0,65%) dari 617 penderita dewasa yang dirawat di rumah sakit. Katsumata dkk.<sup>18</sup> melaporkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada tahun 1992-1993 di Surabaya sebesar 2,8% pada anak diare dan 1,4% pada anak tidak diare. Sebanyak 172 tinja yang diperiksa, di RSUP Medan pada anak-anak dengan gejala diare terdapat 5 sampel (2,9%) positif dengan ookista *Cryptosporidium* sp.<sup>47</sup>

#### 2.4.2 Sumber Infeksi dan Cara Transmisi

Insiden kriptosporidiosis baru dilaporkan pada masa dekade ini dan masih sedikit orang yang mengetahui jenis parasit *Cryptosporidium* sp., sehingga perhatian terhadap parasit ini masih kurang. Sumber infeksi utama selain tinja yang mengandung ookista adalah sputum penderita kriptosporidiosis paru.<sup>4</sup>

Ada beberapa cara transmisi *Cryptosporidium* sp. yaitu:<sup>43</sup>

##### 1. Transmisi manusia ke manusia

Transmisi dari manusia ke manusia adalah bentuk utama transmisi *Cryptosporidium* sp. Risiko kriptosporidiosis bisa terdapat pada anak dan pekerja di tempat penitipan anak dan rumah sakit,<sup>2</sup> serta orang tua dari anak yang terinfeksi.<sup>6,41</sup> Infeksi *Cryptosporidium* sp. pada umumnya secara fekal oral, dapat kontak langsung dengan penderita.<sup>41</sup> Orang yang bepergian atau wisatawan juga berisiko tinggi terhadap transmisi alami *Cryptosporidium*.<sup>2</sup>

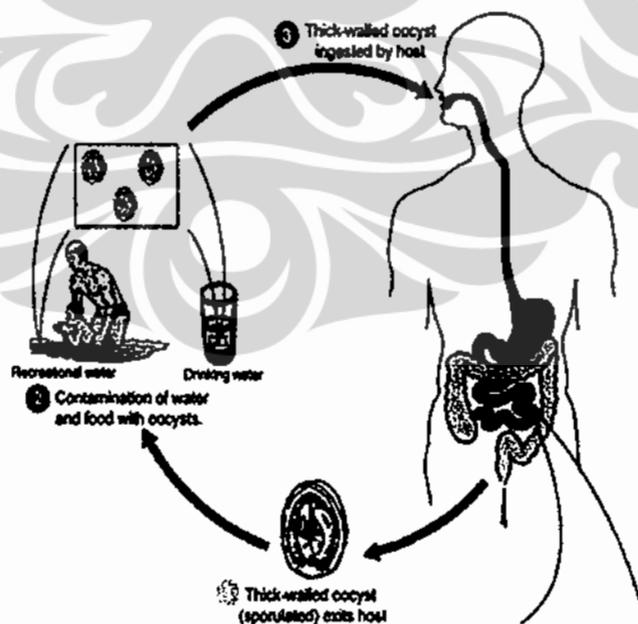
##### 2. Transmisi hewan ke manusia

Umumnya manusia terinfeksi *Cryptosporidium* secara kebetulan dan parasit ini bersifat zoonotik.<sup>48</sup> *Cryptosporidium* yang menginfeksi hewan, dapat menginfeksi manusia atau sebaliknya seperti anak lembu, anak domba, anak babi, kucing, anjing dan tikus dapat menjadi hospes reservoar parasit ini.<sup>42</sup> Terdapat hubungan bermakna antara sapi yang mengeluarkan ookista dan

kejadian infeksi pada manusia.<sup>41</sup> Baik manusia maupun hewan, mempunyai peluang yang sama sebagai sumber penularan *Cryptosporidium*, tanpa melihat ada tidaknya gejala klinis.<sup>16</sup> Telah dilaporkan lebih dari 150 spesies mamalia termasuk hewan jinak, hewan liar dan hewan ternak dapat menginfeksi manusia.<sup>50</sup> Lembu dapat menghasilkan 4,57 ton ookista per tahun di Amerika Serikat.<sup>45</sup>

### 3. Transmisi melalui air minum

Ookista *Cryptosporidium* sp. terdistribusi luas di lingkungan perairan. Kolam renang dan taman air untuk bermain dapat menjadi sumber penularan infeksi ini.<sup>41</sup> Dilaporkan 87% sampel air mentah ditemukan ookista *Cryptosporidium* sp. dan 27% terdapat pada sampel air minum. Ookista *Cryptosporidium* sp. dapat ditransmisikan melalui air minum yang diberi klor, karena klorinasi air minum tidak dapat membunuh ookista *Cryptosporidium* sp.<sup>50</sup> Di Amerika Serikat telah terjadi enam *outbreak* dan semuanya disebabkan oleh air minum yang tercemar.<sup>41</sup> Diperkirakan 1,5 juta konsumen terkena kontaminasi *Cryptosporidium* sp. dari air minum yang diklorinasi dan epidemi penyakit diare yang hebat (hingga mencapai 250.000 orang penderita) serta 104 orang meninggal dunia.<sup>4,8,51</sup>



Gambar 2.4 Cara Transmisi *Cryptosporidium* sp.<sup>41</sup>

Ada empat faktor utama yang dapat memicu terjadinya *outbreak*, yaitu: (i) prevalensi *Cryptosporidium* yang tinggi di sumber air; (ii) ookista *Cryptosporidium* yang tahan/resisten terhadap klorinasi; (iii) metode filtrasi pada air minum tidak efisien menyaring ookista *Cryptosporidium*, karena diameter *Cryptosporidium* sangat kecil; dan (iv) dosis infeksi *Cryptosporidium* untuk manusia sangat rendah.<sup>51</sup>

#### 4. Transmisi melalui udara

Ukuran ookista *Cryptosporidium* sp. yang kecil memudahkan terinhalasi di udara. Penularan melalui udara terjadi dengan cara anak sapi menghirup droplet yang berisi ookista, sehingga terinfeksi *Cryptosporidium* sp.<sup>50</sup>

#### 5. Transmisi melalui makanan

*Cryptosporidium* sp. juga dapat menular melalui makanan yang terkontaminasi ookista. Makanan tersebut biasanya tercemar oleh tinja yang mengandung ookista *Cryptosporidium* sp. dan tidak dimasak atau dipanaskan dahulu sebelum dimakan.<sup>41</sup> Ookista *Cryptosporidium* sp. akan mati jika dipanaskan pada suhu 65-70° C selama 30 menit.<sup>48</sup>

#### 6. Transmisi melalui jalur lain (kondisi cuaca/musim)

Ada penelitian yang menyelidiki pengaruh musim terhadap frekuensi kriptosporidiosis, namun penularan infeksi lebih banyak berkaitan dengan hygiene dan sanitasi lingkungan.<sup>13,15,52</sup> Penelitian di Brazil melaporkan bahwa prevalensi infeksi *Cryptosporidium* sp. lebih tinggi selama musim penghujan.<sup>15</sup> Di Uganda, prevalensi kriptosporidiosis tinggi pada musim penghujan di bulan April-Juni.<sup>52</sup> Dampak hujan menyebabkan ookista *Cryptosporidium* sp. keluar dari tinja yang ada di permukaan tanah. Tren yang sama untuk variasi musiman ini juga diobservasi di wilayah lain di Brazil, Indonesia dan Zambia.<sup>15</sup> Juga di Amerika Serikat (1997), Burkina Faso (1998), dan Afrika Selatan (1991).<sup>52</sup> Di negara tropis, transmisi *Cryptosporidium* sp. pada anak dihubungkan dengan musim penghujan dan transmisi melalui air.

Di Kuwait sangat sedikit hujan dan transmisi *Cryptosporidium* sp. paling banyak selama musim dingin pada bulan November-April.<sup>53</sup>

Penelitian di Meksiko menunjukkan berbagai cara transmisi dari 67 penderita kriptosporidiosis. Faktor penyebabnya yaitu karena bepergian (n=35; 52%), kontak dengan hewan peliharaan/ peternakan (n=16; 24%), di tempat penitipan anak (n=2; 3%), penderita AIDS (n=2; 3%) dan ada yang tidak bepergian maupun kontak dengan hewan (n=12, 18%). Jadi infeksi *Cryptosporidium* sp. menjadi salah satu masalah bagi orang-orang yang bepergian di Meksiko.<sup>54</sup> Kebiasaan mencuci tangan sebagai salah satu cara yang sangat efektif jika diterapkan untuk mencegah transmisi kriptosporidiosis.

## 2.5 Diagnosis Kriptosporidiosis

Ada beberapa uji yang telah dikembangkan untuk diagnosis kriptosporidiosis. Ada tiga metode untuk mendiagnosis *Cryptosporidium* yaitu metode deteksi asam nukleat dengan menggunakan PCR, metode imunologi untuk mendeteksi antigen dan metode pewarnaan untuk mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp. Masing-masing uji ini mempunyai kelebihan dan kekurangan.

Ada beberapa pilihan diagnosis yang bervariasi untuk deteksi *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja klinis (Tabel 2.2).<sup>6</sup> Metode diagnosis dikembangkan menggunakan *C. parvum* karena ketersediaannya yang cukup dan paling patogen menginfeksi manusia dan dapat menyebabkan morbiditas dan/atau mortalitas.<sup>43</sup>

Tabel 2.2. Pilihan Diagnosis untuk Deteksi *Cryptosporidium* pada Sampel Tinja<sup>6</sup>

Teknik	Keuntungan	Kerugian
MTA	Biaya murah	Sensitivitas dan spesifisitas rendah
AF	Skrining cepat	Sensitivitas dan spesifisitas rendah; biaya mahal (alat)
EIA	Sensitif (32,9 ng protein <i>Cryptosporidium</i> ) [Meridian Diagnostic, Inc., Cincinnati, OH]; dibutuhkan training singkat	Biaya mahal
IFA	Sensitif (100 ookista/ml) [Meridian Diagnostic, Inc., Cincinnati, OH]	Biaya mahal
PCR	Sensitif (1 ookista); <i>permits genotyping</i>	Metode tidak distandardisasi; biaya mahal; dibutuhkan peralatan dan training khusus

Sampel tinja dapat disimpan dalam formalin 10%, kalium bikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) 2,5 %, SAF dan PVA. Untuk keperluan uji/analisis molekular, ookista akan lebih baik disimpan dalam  $K_2Cr_2O_7$  2,5% daripada formalin 10% agar DNA tetap utuh.<sup>29</sup>

### 2.5.1 Uji Molekuler

Uji molekuler terutama dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) semakin ditingkatkan untuk diagnosis laboratorium kriptosporidiosis.<sup>31</sup> Metode PCR dapat digunakan untuk meningkatkan deteksi *Cryptosporidium* dalam bahan klinis, menentukan spesies dan identifikasi genotip. Ada tiga tahap yang dilakukan untuk deteksi DNA *Cryptosporidium* yaitu teknik konsentrasi, ekstraksi dan amplifikasi.<sup>50</sup>

Teknik PCR lebih sensitif dan spesifik dalam deteksi ookista *Cryptosporidium* dibandingkan teknik mikroskopis seperti pulasan tahan asam.<sup>31</sup> Teknik PCR dapat mendeteksi <20 ookista/gram tinja atau hanya 1 ookista, sedangkan untuk deteksi secara mikroskopis dibutuhkan 10.000-500.000 ookista/gram tinja.<sup>31,43</sup> Namun, teknik PCR membutuhkan waktu lama, biaya yang mahal dan membutuhkan pemeriksa yang berpengalaman. PCR juga dapat dihambat prosesnya oleh komponen bahan di dalam tinja, termasuk kompleks polisakarida, garam empedu dan bilirubin, sehingga perlu menambah prosedur untuk menghilangkan residu dalam tinja.<sup>6,43</sup>

Tahap pencucian pada teknik konsentrasi dengan menggunakan air tanpa ion yang dilakukan berulang kali dapat membuang residu larutan pengawet sehingga tidak mengganggu hasil PCR.<sup>50</sup> Penggunaan larutan pengawet yang tepat akan mempermudah dalam deteksi DNA *Cryptosporidium*. Ada beberapa gen yang dapat mendeteksi *Cryptosporidium*, yang paling tinggi sensitivitas dan spesifisitasnya ada 2 gen yaitu gen 18S rRNA dan gen *Cryptosporidium oocyst wall protein* (COWP). Gen 18S rRNA dapat mendeteksi 1 ookista, sedangkan gen COWP dapat mendeteksi minimal 10 ookista. Ada teknik nested PCR yang dapat menentukan spesies dari *Cryptosporidium*.<sup>50</sup> Teknik PCR ini membutuhkan biaya yang mahal, tetapi kelebihanannya adalah memiliki sensitivitas dan spesifisitas 100% sehingga digunakan sebagai *gold standard* dalam deteksi *Cryptosporidium*.

### 2.5.2 Uji Serologi

Uji serologi dilakukan dengan mendeteksi antigen dengan antibodi yang dilabel dengan fluoresen dan mendeteksi antigen menggunakan antibodi yang dilabel dengan enzim atau teknik *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Diagnosis dengan metode ini membutuhkan biaya lebih mahal dibandingkan metode pewarnaan. Sensitivitas metode ini masih kurang sempurna meskipun spesifisitas sudah mencapai 98 – 100%.<sup>50</sup> Uji serologi sedikit berperan dalam diagnosis klinis, tetapi dapat digunakan untuk situasi outbreak dan studi epidemiologi.

Umumnya, metode ELISA digunakan untuk mendeteksi antibodi IgM dan IgG. Peningkatan level IgM ditemukan dalam 2 minggu masa pajanan dan bisa bertahan lebih dari setahun pada beberapa individu.<sup>43</sup> Imunodiagnosis berdasarkan tes serologi yang dilakukan sampai hari keenam berlangsungnya penyakit, menunjukkan hasil negatif. Umumnya hasil positif didapat bila tes serologi dilakukan setelah 60-90 hari dan pada 5 dari 7 kasus yang diperiksa, hasil tes masih positif setelah satu tahun.<sup>38</sup>

Deteksi dan identifikasi ookista juga dapat dilakukan dengan imunofluoresensi antibodi monoklonal (IFAT) yang menunjukkan karakteristik garis sutura pada permukaan ookista. Meskipun penggunaan IFAT juga untuk pemeriksaan tinja rutin, tetapi tidak banyak dikembangkan karena biayanya mahal.<sup>29</sup>

Teknik sentrifugasi densitas klasik tidak efisien dalam memisahkan ookista dari debris tinja dan metode terbaru, seperti *immunomagnetic separation* (IMS) belum banyak dikembangkan.<sup>43</sup> IMS dapat mengisolasi sel dari matriks sekitarnya dan untuk menghitung secara kuantitatif kontaminan yang terdapat dalam darah, tinja, makanan dan air. Kombinasi IMS dan PCR dapat digunakan untuk analisis DNA.<sup>44</sup>

### 2.5.3 Pemeriksaan Mikroskopis

Diagnosis ditegakkan dengan menemukan ookista *Cryptosporidium* dalam tinja atau bahan lainnya dari penderita. Pada penderita dengan diare cair yang khas, spesimen tinja hanya berisi sedikit materi tinja, lebih banyak air dan mukus.

Makin padat tinjanya, makin banyak ditemukan artefak yang mirip *Cryptosporidium*.<sup>50</sup>

Ookista dapat dideteksi dengan mikroskop cahaya biasa, fase kontras atau Nomarski *Differential Interference Contrast* (DIC).<sup>50,55</sup> Pemeriksaan tinja secara mikroskopis dilakukan dengan memeriksa sediaan basah yaitu sediaan tinja dalam larutan lugol (yodium). Ookista *Cryptosporidium* pada sediaan basah dilihat dengan mikroskop DIC akan terlihat sebagai spora kecil, ber dinding tebal, tidak berwarna, bentuknya bulat, membias cahaya dan berukuran 4-6  $\mu\text{m}$ . Cara ini yang paling mudah dan murah, namun ukurannya yang kecil dalam larutan lugol menyebabkan parasit ini mudah diabaikan atau disangka sel ragi. Ookista *Cryptosporidium* harus dibedakan dari spora jamur/ ragi (6-10  $\mu\text{m}$ ) dan ookista *Cyclospora* (8-10 $\mu\text{m}$ ) yang lebih besar menggunakan mikrometer okuler, begitu juga spora, bakteri dan debris.<sup>22,43</sup>

Ookista dapat diidentifikasi berdasarkan ukuran untuk membedakannya dari ragi, jamur, atau obyek mikroskopis lain, tetapi sulit untuk menentukan spesiesnya.<sup>50</sup> Pemeriksaan ookista *Cryptosporidium* dan bahan flotasi dengan mikroskop fase kontras merupakan cara yang baik untuk menemukan ookista *Cryptosporidium*. Namun laboratorium umumnya tidak menyediakan mikroskop fase kontras dan laboran belum berpengalaman dalam menggunakannya.<sup>43</sup>

Teknik konsentrasi dilakukan apabila hasilnya negatif pada sediaan langsung. Secara umum, teknik konsentrasi lebih sensitif daripada sediaan langsung.<sup>43</sup> Terdapat tiga teknik konsentrasi, yaitu cara apung/flotasi, endap/sedimentasi dan biakan. Pemilihan teknik yang dilakukan tergantung dari tersedianya alat, waktu, bentuk parasit dan faktor biaya.<sup>5</sup>

Konsentrasi air-eter merupakan teknik yang direkomendasikan dalam studi epidemiologi untuk mendapatkan ookista di tinja dalam jumlah banyak, terutama jika akan dilakukan analisis molekuler lebih lanjut.<sup>30</sup> Sensitivitas dan rata-rata deteksi untuk ookista dalam jumlah sedikit dapat ditingkatkan dengan menggunakan metode konsentrasi dan dilanjutkan dengan pewarnaan.<sup>26,28</sup>

Metode pewarnaan seperti pulasan tahan asam modifikasi Ziehl-Neelsen (MTA/mZN),<sup>3,23,29</sup> Kinyoun,<sup>24</sup> safranin,<sup>24</sup> dimetil sulfoksida,<sup>24</sup> giemsa,<sup>23</sup> hematoksilin-eosin (HE)<sup>20</sup>, periodic acid-Schiff (PAS)<sup>20</sup>, toluidine blue,<sup>20</sup> phenic

fuchsin,<sup>23</sup> methanamine silver,<sup>23</sup> nigrosin,<sup>23</sup> methylen blue/eosin,<sup>23</sup> romanowsky (pewarna Jenner),<sup>23</sup> auramin fenol (AF),<sup>3,23</sup> dan imunofluoresensi (IF).<sup>25</sup>

## Metode pewarnaan

### a. Modifikasi tahan asam

Pewarnaan tahan asam Ziehl-Neelsen (ZN) digunakan oleh Henriksen dan Pohlenz (1981) untuk mendeteksi ookista di tinja sapi yang kemudian dimodifikasi oleh Casemore dkk. (1984) (modifikasi Ziehl-Neelsen, mZN) dan banyak digunakan untuk mewarnai ookista pada sampel tinja.<sup>23,34,50</sup>

Pewarnaan Ziehl-Neelsen (ZN) juga dikenal sebagai pewarnaan/pulasan tahan asam, pertama kali ditemukan oleh dua Doktor dari Jerman, yaitu Frans Ziehl (1859-1926) seorang ahli bakteriologi dan Friedrich Neelsen (1854-1894) seorang ahli patologi. Prosedur pewarnaan ini dikembangkan oleh Paul Ehrlich pada tahun 1882. Awalnya khusus digunakan untuk pewarnaan bakteri dan sekarang juga untuk mengidentifikasi *mycobacteria* tahan asam. Sifat tahan asam yang dimaksudkan adalah sel yang telah diwarnai tahan terhadap penghilangan warna dengan larutan asam organik.<sup>35</sup> Hal ini karena karakteristiknya yang ber dinding tebal dan lipoidal sehingga menyulitkan penetrasi warna. Dinding sel bakteri dan struktur luar protozoa tertentu mengandung asam lemak rantai panjang yang disebut asam mikolat. Asam mikolat membuat mikroorganisme tahan terhadap penghilangan warna dasar oleh alkohol asam dan asam hidroklorat (HCl). Organisme-organisme tahan asam misalnya spesies bakteri genus *Mycobacterium* dan *Nocardia*, dan protozoa genus *Cryptosporidium*.<sup>38</sup>

Pulasan ZN adalah prosedur pewarnaan berbeda yang menggunakan panas untuk memasukkan zat warna *basic fuchsin* ke dalam sel organisme tahan asam. Sedangkan prosedur modifikasi tahan asam (MTA) tidak memerlukan tahap pemanasan seperti ZN.<sup>34</sup> Hasil negatif pada sediaan adalah latar belakang berwarna hijau, sedangkan hasil positif adalah ookista berwarna merah dengan latar belakang berwarna hijau.<sup>23</sup>

Skrining *Cryptosporidium* sp. direkomendasikan menggunakan teknik sederhana atau metodologi standar dengan biaya relatif murah dan kualitas morfologi ookista paling baik seperti pewarnaan MTA ini (Tabel 2.3)<sup>26</sup> sehingga

metode MTA sudah umum digunakan di seluruh dunia, terutama di negara-negara berkembang.<sup>23</sup> Terutama jika modifikasi yang dipilih adalah teknik tanpa pemanasan (*cold staining*).

**Tabel 2.3. Kualitas Morfologi Ookista *Cryptosporidium* sp. yang diisolasi dan diwarnai dengan Berbagai Teknik<sup>26</sup>**

Technique	Organism morphology <sup>a</sup>
Sugar flotation .....	Good-excellent <sup>b</sup>
Formalin sedimentation .....	Fair-good <sup>b</sup>
Iodine .....	Poor
Giemsa .....	Good-excellent
Trichrome .....	Poor-fair
PAS .....	Fair
Modified PAS .....	Poor-fair <sup>b</sup>
Silver methenamine .....	Poor-fair
Acridine orange .....	Poor <sup>c</sup>
Auramine-rhodamine .....	Fair-good <sup>c</sup>
Kinyoun acid-fast .....	Good
Ziehl-Neelsen acid-fast .....	Good-excellent
Modified acid-fast .....	Excellent

<sup>a</sup> Morphology was based on size, color, consistency of shape, and ability to distinguish *Cryptosporidium* from other artifacts.

<sup>b</sup> These specimens were examined under  $\times 400$ ; all other techniques included oil immersion examination at  $\times 1,000$ .

<sup>c</sup> Fluorescent specimens were screened at  $\times 250$ .

#### b. Auramin Fenol

Alternatif lain yang dapat digunakan adalah auramin fenol (AF) sebagai zat fluorokrom/ pewarna fluoresensi non-spesifik, yang memiliki afinitas kuat terhadap dinding sel *Cryptosporidium* sehingga dapat memperlihatkan organisme ini dengan mikroskop fluoresensi.<sup>23</sup> AF menggunakan pewarna negatif *cold strong carbol fuchsin* atau potassium permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) untuk mewarnai ookista pada sampel tinja.<sup>43,50</sup> Pewarna fluoresensi dengan zat fluorokrom untuk diagnosis kriptosporidiosis selain auramin fenol adalah auramin-rhodamine, auramin carbol-fuchsin, acridin orange, dll.<sup>43</sup>

Pewarnaan AF lebih sensitif daripada MTA<sup>23</sup> karena mewarnai dinding luar ookista sama baik dengan struktur bagian dalamnya.<sup>50</sup> Ookista dan sporozoit dapat diperiksa dengan filter fluorescein isothiocyanate (FITC) dan filter ultraviolet (UV) pada mikroskop fluoresensi. Mikroskop fluoresensi yang umum digunakan adalah mikroskop epifluoresensi, dengan transmisi cahaya yang memberikan intensitas lebih tinggi. Pewarnaan imunofluoresensi dapat dilakukan

dengan menggunakan FITC yang dilabel mAb anti- *Cryptosporidium*. Ookista tampak berfluoresensi dengan warna hijau apel (sesuai eksitasi FITC) karena antibodi monoklonal mengikat epitop di dalam dinding ookista, dengan mikroskop epifluoresensi. Fluoresensi interkalator DNA 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) interkalasi dengan nukleus sporozoit dan memperlihatkan *highlights* nukleus. Perbedaan antara AF dan pewarna imunofluoresensi adalah AF non-spesifik dan imunofluoresensi bersifat genus spesifik, namun kedua metode tersebut tidak dapat untuk menentukan spesies *Cryptosporidium*.<sup>28</sup>

Untuk sampel tinja yang mengandung sedikit ookista, menggunakan metode skrining dengan AF yang dilanjutkan dengan metode konfirmasi seperti imunofluoresensi adalah pendekatan spesifik dan sensitif untuk identifikasi ookista *Cryptosporidium*.<sup>24</sup> Deteksi ookista di tinja dengan teknik fluoresensi dengan pewarnaan AF merupakan langkah alternatif karena merupakan prosedur yang mudah dan cepat.<sup>23</sup> Pengembangan teknik ini, terutama dengan teknik konsentrasi memungkinkan diagnosis kriptosporidiosis lebih cepat dan akurat untuk diagnosis spesimen klinis, serta untuk skrining cepat bilamana terjadi suatu epidemi.<sup>23,24,29</sup>

#### **Sensitivitas deteksi pada tinja**

Variasi konsistensi tinja berpengaruh untuk kemudahan deteksi. Ookista lebih mudah dideteksi pada konsentrasi sampel tinja diare yang berair daripada tinja padat. Sensitivitas deteksi untuk tinja yang tidak dikonsentrasi memiliki nilai jumlah batasan  $10^6$  ookista per ml tinja. Setelah tinja dikonsentrasi, antara  $1 \times 10^4$  dan  $5 \times 10^4$  ookista per g dibutuhkan untuk mendapatkan efisiensi deteksi 100%. Untuk sampel tinja, ambang batas efisiensi deteksi 100% menggunakan AF atau FITC-C-mAb adalah  $1 \times 10^3$  ookista per g. Penggunaan FITC-C-mAb tidak memiliki peningkatan sensitivitas yang signifikan dibandingkan pewarnaan konvensional seperti MTA dan AF.<sup>50,55</sup>

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1. Desain Penelitian

Desain penelitian adalah *cross sectional* analitik observasional dengan jenis uji diagnostik.<sup>56</sup> Pada penelitian ini akan dibandingkan deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. secara mikroskopis menggunakan pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA) dan auramin fenol (AF) pada sampel tinja anak batita di bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Departemen Parasitologi dan Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta, untuk pengerjaan sampel dan pemeriksaan hasil sediaan. Waktu penelitian adalah dari bulan Juni 2007 sampai dengan Mei 2008.

### 3.3 Sampel Penelitian

Sampel adalah tinja dari anak batita (usia 0 – 35 bulan) yang bertempat tinggal di bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu. Sampel telah dikoleksi oleh peneliti sebelumnya pada bulan Januari – April 2006 sejumlah 486 dan dikumpulkan dalam botol penampung tinja yang sudah diberi larutan kalium bikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) 2,5%,<sup>3,28</sup> lalu disimpan pada suhu + 4°C.

### 3.4 Besar Sampel

Sampel didapatkan dengan memilih subyek penelitian. Cara pemilihan dilakukan berdasarkan peluang (*probability sampling*) yaitu jenis *systematic sampling* (jika ingin mengambil 1/n dari populasi, tiap pasien no. ke n dipilih sebagai sampel).<sup>56</sup>

Besar sampel ditentukan dengan perhitungan statistik menggunakan rumus beda dua proporsi yang independen:<sup>56</sup>

$$n_1 = n_2 = \frac{(Z\alpha\sqrt{2pq} + ZB\sqrt{p_1q_1 + p_2q_2})^2}{(\Delta p)^2}$$

**Keterangan:**

$n_1 = n_2$  : perkiraan besar sampel untuk masing-masing metode yang digunakan (jumlah minimal sampel).

$\alpha$  : 1-5%, pada umumnya 5% (Z skor untuk  $\alpha$  sebesar 0,05 adalah 1,96)

$\beta$  : 5-20%, pada umumnya 20% (Z skor untuk  $\beta$  sebesar 0,2 adalah 0,842)

$p_1$  : dari literatur (perkiraan proporsi per metode), prevalensi kejadian kriptosporidiosis di daerah bantaran sungai sebesar 2,1%<sup>19</sup> yaitu 0,02.

$q_1$  :  $1 - p_1 = 1 - 0,02 = 0,98$

$\Delta p$  : perbedaan proporsi minimal yang hendak dicapai, ditetapkan 10% (0,1)

$p_2$  :  $p_1 + \Delta p$ ;  $p = \frac{1}{2}(p_1 + p_2)$ ;  $q = 1 - p$

Perhitungan sampel pada penelitian ini adalah:

$$n_1 = n_2 = \frac{(1,96\sqrt{2 \cdot 0,07 \cdot 0,93} + 0,842\sqrt{0,02 \cdot 0,98} + 0,12 \cdot 0,88)^2}{(0,1)^2} = 102 \text{ sampel.}$$

Jadi jumlah sampel tinja minimal untuk masing-masing metode pemeriksaan yang dibutuhkan adalah 102 sampel.

Sampel yang diproses dan diperiksa sejumlah 130 sampel.

**3.5 Alat dan Bahan****3.5.1 Alat**

1. Sarung tangan
2. Masker
3. Gelas beaker 500 ml
4. Gelas ukur 10 ml, 50 ml dan 100 ml
5. Botol kaca gelap 500 ml
6. Pengaduk bahan kaca
7. Timbangan elektrik
8. Penangas air (Kottermann, German)
9. *Magnetic stirer*
10. Tabung 0,5 cc
11. Tabung *eppendorf* 100  $\mu\text{L}$ , 1500  $\mu\text{L}$
12. Pipet tip

13. Pipet mikro 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l.
14. *Vortex* (Maxi Mix II, Mixer-37600, USA),
15. *Centrifuge* (Sorval Biofuge Pico, D-37520, German),
16. Kulkas
17. Freezer  $-20$  °C
18. Kaca obyek (76 x 26 mm)
19. Pensil perak dan spidol
20. Lidi kapas/ *cotton buds*
21. Penjepit slide/ pinset
22. *Coplin jars*
23. Selang/ pipa air
24. Mikroskop cahaya biasa/ *bright field* (Olympus CH20, Japan) dengan lensa obyektif pembesaran 400x dan 1000x.
25. Mikroskop epifluoresensi (Olympus BX-51, Japan) yang dilengkapi filter FITC dengan eksitasi 490 nm dan emisi 550 nm, lensa obyektif pembesaran 200x dan 400x.

### 3.5.2 Bahan

1. Sampel tinja
2. Akuabides
3. Metanol absolut (Merck, cat. no. 1.06009)
4. HCl (Merck, cat. no. 1.00317)
5. *Cold strong Carbol fuchsin* 2,31% (Merck, cat. no. 1.09215)
6. *Malachite green* 0,4% (Merck, cat. no. 1.01398)
7. Auramine O
8. *Phenol crystal*
9. *Potassium permanganate* (KMnO<sub>4</sub>) 0,1 %
10. Minyak imersi

### 3.6 Cara Kerja

#### 3.6.1. Sampel Tinja untuk Sediaan Tanpa Konsentrasi

Jumlah sampel yang didapat ditandai pada kaca obyek dengan pensil perak, satu kaca obyek untuk satu sampel. Sampel tinja diambil 5  $\mu\text{l}$  dengan mikropipet dan dioleskan merata pada kaca obyek.<sup>22,25</sup> Dikeringkan pada suhu kamar lalu difiksasi dengan metanol selama 3 menit.<sup>3,22,27</sup>

#### 3.6.2. Teknik Konsentrasi Tinja dengan Air-Eter:<sup>3,28,30</sup>

1. Sebanyak 200  $\mu\text{l}$  tinja dalam suspensi kalium bikromat diambil lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1500  $\mu\text{l}$ .
2. Akuabides ditambahkan 700  $\mu\text{l}$ , lalu divorteks selama 30 detik.
3. Dietil eter ditambahkan 400  $\mu\text{l}$ , lalu dibolak balik selama 10 kali.
4. Sampel disentrifugasi pada 13,000 x g selama 1 menit.
5. Supernatan dibuang dan disisakan kira-kira 200  $\mu\text{l}$ .
6. Selanjutnya ditambahkan 1 ml akuabides steril dan divorteks selama 30 detik. Langkah 2-5 (pencucian diulangi sebanyak 2 kali).
7. Dengan penambahan 1 ml akuabides, pelet disisakan sebanyak 50  $\mu\text{l}$ .
8. Konsentrat disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C.

#### 3.6.3. Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan adalah tinja yang mengandung ookista *Cryptosporidium* sp., berasal dari CDC Atlanta, USA dan dari pasien HIV/ AIDS yang positif *Cryptosporidium* sp.

#### 3.6.4 Teknik Pewarnaan dan Pemeriksaan Sediaan

##### 3.6.4.1. Pewarnaan Modifikasi Tahan Asam (MTA)<sup>3,23,28</sup>

Tahapan awal adalah menyiapkan reagen pewarnaan MTA sesuai dengan komposisinya (Lampiran 1).

**Metode:** slide sediaan kontrol positif selalu disertakan setiap melakukan prosedur ini.

1. Tinja dioleskan ke atas kaca obyek dengan mikropipet sebanyak 5  $\mu\text{l}$ .

2. Hasil apusan tinja pada kaca obyek dikeringkan pada suhu kamar (60 menit).<sup>37</sup>
3. Sampel pada kaca obyek difiksasi dengan methanol absolut selama 3 menit.
4. Larutan *cold strong* fukhsin karbol 2,31% dituangkan ke atas kaca obyek dan dibiarkan selama 10 menit.
5. Kaca obyek sediaan dibilas dengan air mengalir.
6. Larutan methanol-HCl 1% dituangkan ke atas kaca obyek selama 10 – 15 detik untuk menghilangkan pewarna utama.
7. Kaca obyek sediaan dibilas dengan air mengalir.
8. Larutan *counterstain* malakit hijau 0,4% dituangkan ke atas kaca obyek selama 30 detik untuk mewarnai kembali.
9. Kaca obyek sediaan dibilas dengan air mengalir.
10. Kaca obyek sediaan dikeringkan.

#### **Pemeriksaan Sediaan Hasil Pewarnaan MTA**

Sediaan yang sudah dikeringkan, selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop cahaya/ *bright-field* (Olympus CH20, Japan) menggunakan pembesaran 400x untuk keseluruhan lapang pandang. Keberadaan ookista dikonfirmasi dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak imersi. Ookista akan tampak berwarna merah, berbentuk bulat dan berukuran 4 – 6  $\mu\text{m}$  dengan latar belakang hijau (*pale green*). Tingkatan dan proporsi pewarnaan bervariasi pada tiap-tiap ookista. Ada tidaknya sporozoit dalam ookista juga diperhatikan. Hasil positif jika ditemukan satu atau lebih ookista *Cryptosporidium* sp. pada seluruh lapang pandang. Waktu pewarnaan dan pemeriksaan sediaan juga dicatat.

#### **3.6.4.2. Pewarnaan Auramin Fenol (AF)<sup>3,23,28</sup>**

Tahapan awal adalah menyiapkan reagen pewarnaan AF sesuai dengan komposisinya (Lampiran 1).

**Metode:** slide sediaan kontrol positif selalu disertakan setiap melakukan prosedur ini.

1. Tinja dioleskan ke atas kaca obyek dengan mikropipet sebanyak 5  $\mu\text{l}$ .

2. Hasil apusan tinja pada kaca obyek dikeringkan pada suhu kamar (60 menit).<sup>37</sup>
3. Sampel pada kaca obyek difiksasi dengan methanol selama 3 menit.
4. Larutan pewarna auramin fenol dituangkan ke atas kaca obyek dan dibiarkan selama 10 menit.
5. Kaca obyek sediaan dibilas dengan air mengalir untuk menghilangkan zat pewarna (*excess stain*).
6. Larutan 3% methanol-HCl dituangkan ke atas kaca obyek selama 5 menit untuk menghilangkan pewarna utama.
7. Larutan *counterstain* potassium permanganat (KMnO<sub>4</sub>) 0,1% dituangkan ke atas kaca obyek selama 30 detik untuk mewarnai kembali.
8. Kaca obyek sediaan dikeringkan.

#### **Pemeriksaan Sediaan Hasil Pewarnaan AF**

Ookista *Cryptosporidium* sp. dideteksi menggunakan mikroskop fluoresensi (Olympus BX-51, Japan) yang dilengkapi filter FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) dengan eksitasi 490 nm dan emisi 510 nm. Sediaan diperiksa pada seluruh lapang pandang dengan pembesaran 200x dan dikonfirmasi keberadaan ookista dengan pembesaran 400x. Lalu ookista diukur dan dilihat bentuk fluoresensinya (*fluorescence bodies*). Ookista *Cryptosporidium* sp. tampak berbentuk cincin (*ringshaped*) atau seperti donat berukuran 4-6 µm dan menunjukkan karakteristik fluoresensi (berwarna hijau hingga kuning) yang terang dengan latar belakang gelap. Hasil positif jika ditemukan satu atau lebih ookista *Cryptosporidium* sp. pada seluruh lapang pandang. Waktu pewarnaan dan pemeriksaan sediaan juga dicatat.

#### **3.7. Penilaian Hasil Kerja**

Metode pewarnaan MTA dan AF dilakukan pada 130 sampel. Dilakukan pencatatan waktu yang diperlukan untuk pewarnaan satu sediaan dan waktu yang diperlukan untuk memeriksa satu sediaan. Kemudian dilakukan perbandingan teknik yang terbaik berdasarkan kualitas pulasan, waktu pewarnaan dan waktu pemeriksaan dari 130 sampel. Sampel dinilai hasilnya dengan penilaian kualitatif

atau nominal dikotom (positif dan negatif). Jika ookista dihitung secara semi kuantitatif, dapat dibuat skala sebagai berikut:<sup>28</sup>

- + : < 5 ookista per slide
- ++ : 1 – 10 ookista per lapang pandang
- +++ : 11 atau lebih ookista per lapang pandang

Hasil pemeriksaan dikonfirmasi oleh pemeriksa lain (S.W. Dwintasari, S.Si, dari laboratorium Parasitologi; Prof. Huw V. Smith dan Prof. Anthony M. Grimason dari SPDL Glasgow, Scotland) yang berkompeten di bidangnya sebagai pembanding, baik pewarnaan MTA dan AF untuk validitas hasil.

### 3.8. Definisi Operasional

1. Sampel tinja anak batita merupakan hasil survei peneliti sebelumnya dan menjadi koleksi laboratorium Departemen Parasitologi FKUI.
2. Tinja tanpa konsentrasi adalah tinja yang disimpan dalam kalium bikromat 2,5% dan diproses untuk pewarnaan tanpa melalui prosedur konsentrasi (air-eter).
3. Tinja konsentrasi adalah tinja yang disimpan dalam kalium bikromat 2,5% dan diproses untuk pewarnaan setelah melalui tahap konsentrasi.
4. Waktu pewarnaan adalah waktu yang diperlukan untuk proses pewarnaan mulai dari fiksasi sampai selesai tahap akhir proses pewarnaan dan siap untuk dikeringkan.
5. Waktu pemeriksaan adalah waktu yang diperlukan untuk membaca satu sediaan pada seluruh lapang pandang.
6. Kualitas pulasan dinilai dari:
  - latar belakang pewarnaan
  - kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitarnya
7. Hasil positif dinyatakan apabila ditemukan minimal satu ookista *Cryptosporidium* sp. dalam sediaan pewarnaan MTA dan AF, sebaliknya hasil negatif jika tidak ditemukan ookista.

8. Baku emas (*gold standard*) merupakan standar untuk pembuktian ada atau tidaknya ookista *Cryptosporidium* sp. pada spesimen, dan merupakan metode deteksi terbaik yang ada (meskipun bukan yang termurah atau termudah).<sup>56</sup>
9. Hasil deteksi adalah hasil yang diperoleh dari uji yang diteliti dengan hasil pada pemeriksaan menggunakan baku emas.<sup>56</sup>
10. Sensitivitas adalah proporsi sampel dengan hasil uji deteksi positif (positif benar) dibanding seluruh sampel positif (positif benar + negatif palsu).<sup>56</sup>
11. Spesifisitas adalah proporsi sampel dengan hasil uji deteksi negatif (negatif benar) dibandingkan dengan seluruh sampel yang negatif (negatif benar + positif palsu).<sup>56</sup>

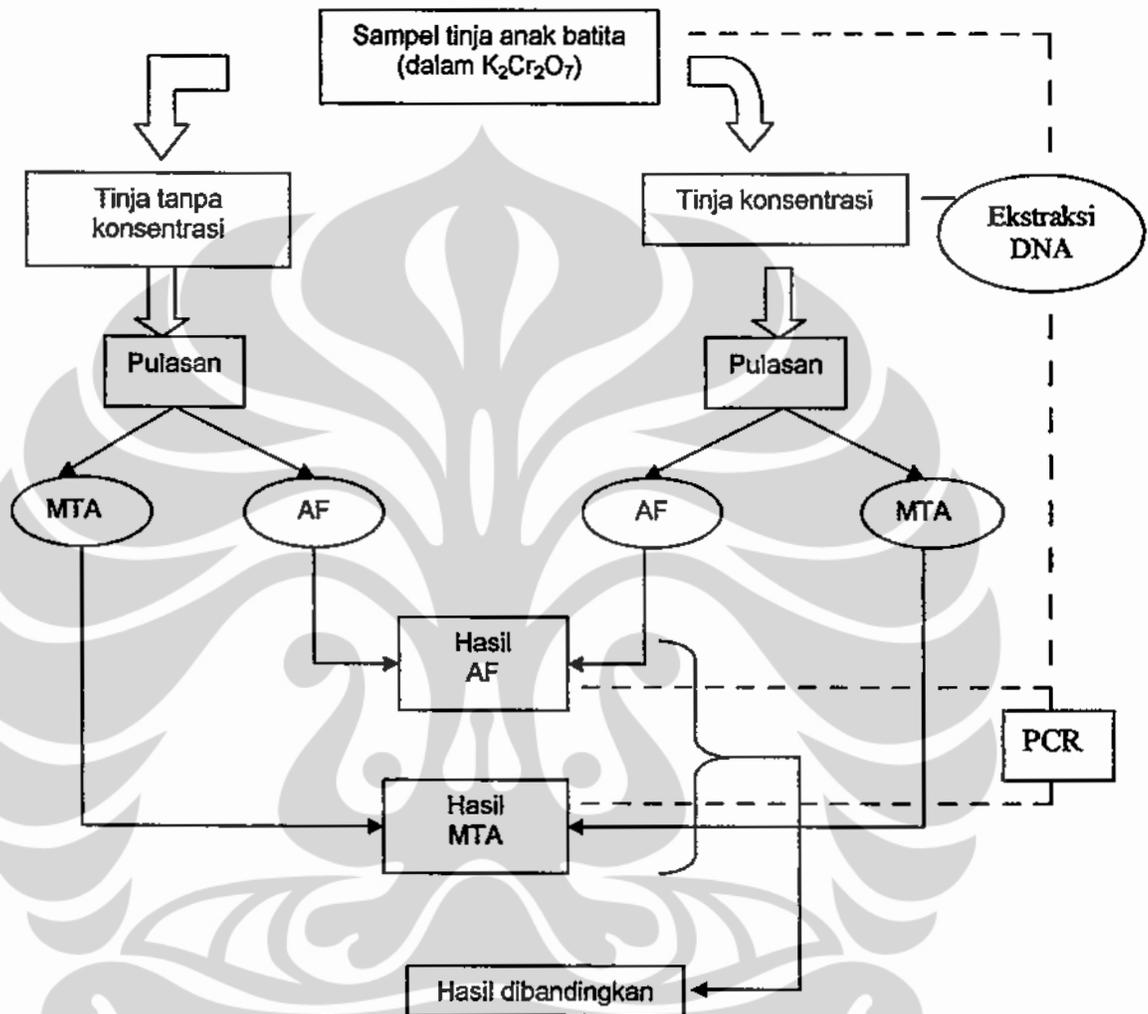
### 3.9. Analisis data

Hasil uji/ pemeriksaan dalam bentuk penilaian kualitatif. Penilaian waktu pewarnaan, waktu pemeriksaan dan kualitas pewarnaan dari metode pewarnaan MTA dan AF dibandingkan. Analisis komparatif secara statistik non-intervensi untuk mengukur kemaknaan perbedaan data proporsi dua metode pemeriksaan (MTA dan AF) sampel tinja dengan dan tanpa konsentrasi, menggunakan uji Mc Nemar (tabel 2x2) dengan nilai  $p < 0,05$  sebagai batas kemaknaan. Disertakan juga nilai koefisien kappa ( $K$ ) untuk menilai hasil:

< 0,2	: <i>slight agreement</i>
0,2 – 0,4	: <i>fair agreement</i>
0,4 – 0,6	: <i>moderate agreement</i>
0,6 – 0,8	: <i>substantial agreement</i>
> 0,8	: <i>excellent agreement</i>

Dihitung sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan negatif dari total jumlah sampel yang diperiksa menggunakan rumus uji diagnostik (Lampiran 2). Dalam penelitian ini, hasil yang didapatkan dari dua metode pewarnaan (MTA dan AF) dibandingkan dengan baku emas yaitu deteksi *Cryptosporidium* sp. dengan metode PCR yang dilakukan oleh peneliti lain, Dwintasari SW (2008). Data dianalisis menggunakan program SPSS 12 *for windows*.

### 3.10 Alur Penelitian



**Keterangan:**

— : Tahapan yang dilakukan peneliti

- - - : Tidak dilakukan peneliti/ data sekunder dari peneliti lain

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1. Hasil Pewarnaan dengan Metode Modifikasi Tahan Asam (MTA) dan Auramin Fenol (AF)

Deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dilakukan terhadap 130 sampel yang diseleksi secara random dari 486 sampel tinja anak berusia di bawah tiga tahun (batita). Pemeriksaan secara mikroskopis dengan dua metode pewarnaan pada sampel tinja dengan dan tanpa konsentrasi, memberikan hasil sebagai berikut:

##### 4.1.1 Hasil Pulasan pada Metode Pewarnaan MTA

Hasil pada sediaan tinja tanpa konsentrasi (a) dan tinja konsentrasi (b):

a. Tinja tanpa konsentrasi:

- Latar belakang *slide* berwarna hijau muda-tua, tampak tebal, lebih gelap, terlihat banyak jamur/ sel ragi, bakteri dan debris/kotoran yang dapat menyulitkan pemeriksaan.
- Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitarnya jelas. Ookista tampak bulat dan berwarna merah muda/pink (Gambar 4.1).



**Gambar 4.1 Ookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan MTA pada Tinja Tanpa Konsentrasi (pembesaran 1000 x)**

b. Tinja konsentrasi:

- Latar belakang *slide* berwarna hijau muda, lebih tipis, tampak lebih terang; sedikit spora jamur/ sel ragi, bakteri dan debris/kotoran
- Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitarnya jelas. Ookista tampak bulat dan berwarna merah muda/pink, isi di dalamnya (sporozoit) terlihat jelas (Gambar 4.2).



**Gambar 4.2 Ookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan MTA pada Tinja Konsentrasi (pembesaran 1000 x)**

**4.1.2 Hasil Pulasan pada Metode Pewarnaan AF**

Hasil pada sediaan tinja tanpa konsentrasi (a) dan konsentrasi (b):

a. Tinja tanpa konsentrasi:

- Latar belakang *slide* gelap; tidak homogen. Lebih tebal, banyak spora jamur dan debris/kotoran yang membias cahaya fluoresens sehingga menyulitkan pemeriksaan.
- Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitarnya jelas. Ookista berbentuk bulat seperti donat/cincin, berwarna kuning-kehijauan dan tampak berpendar terang (Gambar 4.3).



**Gambar 4.3** Ookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan AF pada Tinja Tanpa Konsentrasi (pembesaran 400 x)

b. Tinja konsentrasi:

- Latar belakang *slide* tampak gelap dan homogen. Lebih tipis, sedikit spora jamur dan debris/kotoran sehingga memudahkan pemeriksaan.
- Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitar: jelas, ookista dapat dibedakan dengan sekitarnya. Ookista berbentuk bulat seperti donat/cincin, tampak lebih berpendar terang dan berwarna kuning-kehijauan (Gambar 4.4).



**Gambar 4.4** Ookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan AF pada Tinja Konsentrasi (pembesaran 400x)

### 4.1.3. Waktu Pewarnaan dan Pemeriksaan Sediaan

**Tabel 4.1 Lama Waktu Pewarnaan dan Pemeriksaan yang dibutuhkan Tiap Sediaan Tinja untuk Metode MTA dan AF**

Metode Pewarnaan	Waktu Pewarnaan per slide (menit)	Waktu Pemeriksaan per slide (menit)		Jumlah sediaan
		Tanpa Konsentrasi	Konsentrasi	
MTA	25	± 20	± 12	130
AF	20	± 12	± 10	130

Berdasarkan hasil ini, rata-rata waktu yang dibutuhkan untuk proses pewarnaan kedua metode hampir sama, namun dari segi waktu pemeriksaannya lebih singkat pada tinja konsentrasi daripada tanpa konsentrasi dengan metode AF dibandingkan MTA. Rata-rata waktu yang diperlukan untuk membaca sediaan positif, untuk metode pewarnaan: MTA tanpa konsentrasi menit ke 10, MTA dengan konsentrasi menit ke 7, AF tanpa konsentrasi menit ke 8 dan AF dengan konsentrasi menit ke 3. Metode AF mempunyai waktu pemeriksaan yang lebih singkat secara bermakna ( $p=0,00$ ) dibandingkan MTA (Lampiran 3). Pemeriksaan tetap dilakukan untuk seluruh lapang pandang meskipun hasil deteksi menunjukkan positif ookista *Cryptosporidium* sp. Hal ini bertujuan untuk menghitung jumlah ookista. Waktu yang diperlukan untuk memeriksa setiap sediaan tergantung dari jumlah ookista *Cryptosporidium* sp. Semakin banyak jumlah ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan, maka waktu pemeriksaan akan lebih singkat.

**Tabel 4.2 Jumlah Ookista *Cryptosporidium* pada pemeriksaan dengan Metode Pewarnaan MTA dan AF**

Jumlah Ookista	Jumlah spesimen positif atau negatif dari:			
	MTA		AF	
	TK	K	TK	K
0	123	117	117	105
+	7	13	13	21
++	0	0	0	3
+++	0	0	0	1

Keterangan: TK: tanpa konsentrasi; K: konsentrasi

Pada pewarnaan MTA, rata-rata ditemukan ookista kurang dari 5 (positif satu) tiap sediaan pada hasil positif. Pada metode pewarnaan AF dengan tinja konsentrasi, memberikan hasil bervariasi dari negatif (0) sampai 11 atau lebih ookista per lapang pandang (positif tiga).

#### 4.2 Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan dan Tanpa Konsentrasi dengan Metode MTA dan AF untuk Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp.

**Tabel 4.3. Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan dan Tanpa Konsentrasi pada Metode MTA**

		MTA KONSENTRASI		
		Positif	Negatif	Total
MTA TANPA KONSENTRASI	Positif	6	1	7 (5,4%)
	Negatif	7	116	123 (94,6%)
	Total	13 (10%)	117 (90%)	130 (100%)

Berdasarkan tabel 4.3 didapatkan bahwa pada sampel tinja tanpa konsentrasi dapat dideteksi 7 jumlah sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan pada sampel tinja konsentrasi terdapat 13 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p= 0,070$ ) dengan nilai Kappa=0,570 (Lampiran 4), antara hasil pemeriksaan sampel tinja dengan dan tanpa konsentrasi pada metode MTA.

**Tabel 4.4. Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan dan Tanpa Konsentrasi pada Metode AF**

		AF KONSENTRASI		
		Positif	Negatif	Total
AF TANPA KONSENTRASI	Positif	12	1	13 (10%)
	Negatif	13	104	117 (90%)
	Total	25 (19,2%)	105 (80,8%)	130 (100%)

Berdasarkan tabel 4.4 didapatkan bahwa pada sampel tinja tanpa konsentrasi dapat dideteksi 13 jumlah sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan pada sampel tinja konsentrasi terdapat 25 sampel. Pada uji statistik

dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,002$ ) dengan nilai  $Kappa=0,576$  (Lampiran 5), antara hasil pemeriksaan sampel tinja dengan dan tanpa konsentrasi pada metode AF.

Berdasarkan perbandingan antara tinja dengan dan tanpa konsentrasi, dapat disimpulkan bahwa hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. lebih banyak ditemukan pada tinja konsentrasi. Jadi, untuk perbandingan dengan *gold standard* hanya dilakukan pada sediaan tinja yang dikonsentrasi untuk mengetahui nilai sensitivitas dan spesifisitasnya.

#### 4.3 Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Tinja Konsentrasi Antara Metode Pewarnaan MTA dan AF dengan PCR

**Tabel 4.5. Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Tinja Konsentrasi dengan Metode MTA dan PCR**

		PCR*		
		Positif	Negatif	Total
MTA KONSENTRASI	Positif	13	0	13 (10%)
	Negatif	29	88	117 (90%)
	Total	42 (32,3%)	88 (67,7%)	130 (100%)

Ket: \* : sumber data dari penelitian S W Dwintasari (2008)<sup>27</sup>

Berdasarkan tabel 4.5 didapatkan bahwa pada sampel tinja konsentrasi dengan metode MTA dapat dideteksi 13 jumlah sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan pada sampel tinja hasil PCR\* terdapat 42 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,000$ ) dengan nilai  $Kappa=0,378$  (Lampiran 6), antara hasil pemeriksaan sampel tinja konsentrasi pada metode MTA dengan tinja hasil PCR\* (*gold standard*).

Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas metode MTA konsentrasi terhadap PCR\*:

Sensitivitas : 30,9 %

Spesifisitas : 100 %

Nilai Prediksi Positif (NPP) : 100 %

Nilai Prediksi Negatif (NPN) : 75,2 %

**Tabel 4.6. Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Tinja Konsentrasi dengan Metode AF dan PCR**

AF		PCR*		
		Positif	Negatif	Total
KONSENTRASI	Positif	23	2	25 (19,2%)
	Negatif	19	86	105 (80,8%)
Total		42 (32,3%)	88 (67,7%)	130 (100%)

Ket: \* : sumber data dari penelitian S W Dwintasari (2008)<sup>27</sup>

Berdasarkan tabel 4.6 didapatkan bahwa pada sampel tinja konsentrasi dengan metode AF dapat dideteksi 25 jumlah sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan pada sampel tinja hasil PCR\* terdapat 42 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,000$ ) dengan nilai Kappa=0,587 (Lampiran 7), antara hasil pemeriksaan sampel tinja konsentrasi pada metode AF dengan tinja hasil PCR\* (*gold standard*).

Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas metode AF konsentrasi terhadap PCR\*:

Sensitivitas	: 54,8 %
Spesifisitas	: 97,7 %
Nilai Prediksi Positif (NPP)	: 92,0 %
Nilai Prediksi Negatif (NPN)	: 81,9 %

## BAB 5 PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan sampel tinja dari anak usia batita sebanyak 130 sampel dengan metode pewarnaan MTA dan AF.

Berdasarkan hasil pemeriksaan dengan metode pewarnaan MTA diperoleh sediaan yang mempunyai kontras jelas antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitarnya. Ookista *Cryptosporidium* sp. berwarna merah muda sampai merah dengan latar belakang berwarna hijau, sehingga ookista *Cryptosporidium* sp. dapat dibedakan dengan elemen tinja yang lain seperti sel ragi, bakteri dan debris. Hasil pewarnaan ini sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Casemore *et al.*<sup>29</sup> dan Brook *et al.*<sup>32</sup> Sel ragi juga dapat terwarnai merah muda sampai merah, meskipun lebih banyak terwarnai biru kehijauan. Ukuran sel ragi lebih besar daripada ookista *Cryptosporidium* sp. dan kadang-kadang terlihat bertunas. Bakteri akan terwarnai hijau yang jelas berbeda dengan ookista *Cryptosporidium* sp. Sisa-sisa sel atau debris kadang juga berwarna merah muda sampai merah yang sering meragukan dengan ookista *Cryptosporidium* sp. Tetapi debris atau sisa-sisa sel ini dapat disingkirkan dari diagnosis karena berbentuk tidak teratur. Ookista *Cryptosporidium* sp. tampak berbentuk bulat dengan ukuran 4 – 6  $\mu\text{m}$ , bila ookista matang akan terlihat empat sporozoit yang berbentuk seperti pisang di dalamnya.

Pemeriksaan dengan metode pewarnaan AF pada sediaan terlihat ookista *Cryptosporidium* sp. bentuk bulat seperti donat/cincin berwarna kuning kehijauan dan berpendar terang sehingga mudah dideteksi pada latar belakang berwarna gelap/ hitam. Hal ini sama seperti yang didapatkan pada penelitian Brook *et al.*<sup>32</sup> dan Tee *et al.*<sup>33</sup> Ookista *Cryptosporidium* sp. dapat dibedakan dari sel ragi yang juga berwarna kuning kehijauan serta berukuran lebih besar dan tidak berpendar/berfluoresensi. Pemeriksaan akan lebih sulit jika sel ragi, debris dan sisa-sisa sel berjumlah banyak, sedangkan jumlah ookista sangat sedikit dalam tinja. Kotoran yang sangat banyak pada tinja dapat menyebabkan latar belakang terlalu berfluoresensi, sehingga menyulitkan pemeriksaan. Menurut Weber *et al.*,<sup>27</sup> fluoresensi akan bermasalah pada latar belakang pewarnaan AF jika terdapat

banyak debris. Jadi, hasil pewarnaan lebih baik pada sediaan tinja yang dikonsentrasi.

Pada pewarnaan MTA, untuk sediaan tinja dengan dan tanpa konsentrasi diperlukan waktu yang sama untuk proses pewarnaan, yaitu kurang lebih 25 menit/sediaan. Sedangkan untuk pewarnaan AF, waktu yang diperlukan untuk proses pewarnaan juga sama untuk tinja dengan dan tanpa konsentrasi, yaitu kurang lebih 20 menit/sediaan. Lama pewarnaan dihitung mulai dari fiksasi dengan metanol sampai selesai dibilas dengan air setelah pewarnaan negatif tiap metode. Tapi jika dilakukan sekali pewarnaan pada 10 sediaan sekaligus, bisa menghemat waktu. Seperti pada penelitian Casemore *et al.*<sup>29</sup> misalnya, yang dalam sekali proses pewarnaan menyertakan 16 sediaan. Tapi waktunya jauh lebih singkat (10 menit) karena ada modifikasi waktu pewarnaan. Penggunaan metode MTA tanpa tahap pemanasan selain untuk mempersingkat waktu juga dapat meningkatkan hasil deteksi, seperti penelitian yang dilakukan oleh Martinez *et al.*<sup>20</sup> Modifikasi pada masalah waktu, juga seperti pada tahap pewarnaan dengan carbolfuchsin selama 30 menit<sup>34</sup> menjadi 10 menit<sup>29</sup> saja. Hal ini juga dilakukan pada penelitian Martinez *et al.*<sup>20</sup> Metode MTA ini pelaksanaan dan pembuatannya mudah dengan biaya alat dan bahan yang murah.

Selain mudah didapatkan ookista *Cryptosporidium* sp., faktor kemudahan dalam pemeriksaan sediaan juga dapat diperhitungkan. Yaitu waktu yang dibutuhkan untuk melakukan diagnosis lebih cepat, karena latar belakang sediaan tinja yang dikonsentrasi lebih tipis dan terang, sedikit spora jamur, bakteri dan debris daripada sampel tinja yang tidak dikonsentrasi. Pada metode MTA rata-rata waktu yang dibutuhkan adalah 20 menit tiap sediaan (pada tinja tanpa konsentrasi) dan 12 menit (pada tinja konsentrasi) untuk satu sediaan dengan hasil negatif. Sedangkan untuk hasil diagnosis positif dibutuhkan waktu rata-rata 10 menit tiap sediaan tanpa konsentrasi dan 7 menit untuk sediaan tinja yang dikonsentrasi. Pada penelitian Weber *et al.*,<sup>27</sup> pemeriksaan hasil MTA untuk tinja tanpa konsentrasi dilakukan selama 10 menit, lalu dihitung jumlah ookista yang terdeteksi. Hasil negatif diperiksa keseluruhan lapang pandang. Pada tinja yang dikonsentrasi, waktu pemeriksaan rata-rata kurang dari 10 menit tiap sediaan. Pada penelitian Morgan *et al.*<sup>31</sup>, pemeriksaan sediaan membutuhkan waktu

skrining rata-rata 10 menit sebelum ookista *Cryptosporidium* sp. terdeteksi positif. Sediaan MTA yang negatif dapat diperiksa sampai 60 menit, meskipun waktu normalnya antara 15 – 20 menit.<sup>26</sup>

Sedangkan untuk metode AF, dibutuhkan waktu pemeriksaan sekitar 12 menit tiap sediaan (pada tinja tanpa konsentrasi) dan 10 menit (pada tinja konsentrasi) untuk satu sediaan dengan hasil negatif. Sedangkan untuk hasil positif tiap sediaan dibutuhkan rata-rata 8 menit (pada tinja tanpa konsentrasi) dan 3 menit (pada tinja konsentrasi). Berdasarkan hasil penelitian Rusnak *et al.*,<sup>37</sup> untuk pemeriksaan sediaan MTA yang negatif membutuhkan waktu 14 menit dan yang positif selama 5 menit. Untuk pemeriksaan sediaan AF yang negatif membutuhkan waktu 17 menit dan yang positif hanya kurang dari 1 menit. Ada juga yang hanya membutuhkan waktu 30 detik.<sup>26</sup> Jadi, dapat disimpulkan bahwa pemeriksaan sediaan pada hasil pewarnaan AF membutuhkan waktu lebih singkat dibandingkan MTA untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp., terutama dengan hasil deteksi positif.

Pada penelitian ini, pada tiap metode dilakukan pemeriksaan sediaan di seluruh lapang pandang, mengingat kecilnya kemungkinan ookista yang akan didapatkan pada tinja anak batita atau individu imunokompeten dan tanpa gejala. Berbeda jika menggunakan sampel dari individu yang imunokompromis, kemungkinan mendapatkan ookista lebih besar karena rentan terinfeksi. Peneliti sebelumnya<sup>19</sup> sudah melakukan pemeriksaan tinja dengan pewarnaan tahan asam tanpa konsentrasi. Diharapkan dengan teknik konsentrasi, penelitian ini akan memberikan hasil lebih baik/akurat. Sehingga jika sudah diterapkan pada sampel tinja anak batita dan hasilnya lebih baik atau banyak sampel terdeteksi positif, maka penerapannya pada tingkat kasus lebih tinggi (pada individu imunokompromis) juga akan lebih signifikan hasilnya.

Deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dengan dua metode pewarnaan didapatkan hasil lebih banyak positif pada metode AF daripada MTA. Hal ini juga terkait dengan kualitas apusan sediaan yang baik dan alat (mikroskop) yang digunakan untuk memeriksa. Pewarnaan AF adalah salah satu teknik alternatif karena pewarna fluoresensi ini lebih mudah proses pemeriksaannya. Sehingga sangat tepat digunakan untuk skrining cepat pada jumlah sampel yang besar,

meski untuk melihat morfologi spesies kurang spesifik dan terkadang memberikan hasil positif palsu. Namun, kelemahan ini dapat diantisipasi dengan melakukan studi pendahuluan, mempelajari kontrol positif *Cryptosporidium* sp. yang dilabel FIT-C dan diwarnai dengan AF.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan tinja dengan dan tanpa konsentrasi pada anak batita, diketahui hasilnya lebih banyak positif pada prosedur tinja yang melalui proses konsentrasi pada kedua metode pewarnaan. Menurut Weber *et al.*,<sup>27</sup> ookista *Cryptosporidium* sp. lebih mudah terdeteksi pada sampel tinja yang dikonsentrasi. Jadi, penggunaan teknik konsentrasi memberikan manfaat hasil yang lebih baik.

Teknik konsentrasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah cara sedimentasi, yaitu dengan air-eter. Pemilihan teknik ini didasarkan pada kebutuhan penelitian yang tidak hanya untuk pemeriksaan tinja secara mikroskopis, namun selanjutnya untuk uji tingkat molekuler dengan PCR. Penelitian Bukhari dan Smith (1995)<sup>30</sup> menunjukkan bahwa deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja lebih baik menggunakan konsentrasi air-eter dengan rata-rata ookista yang didapatkan sebanyak 46 – 75%, dibandingkan teknik flotasi densitas sukrosa (24 – 65%) dan flotasi zink sulfat (22 – 41%). Sehingga selain lebih ekonomis dan bermanfaat untuk deteksi di tingkat molekuler, akan mudah didapatkan ookista dalam jumlah banyak.

Hasil tidak berbeda bermakna terdapat pada perbandingan metode MTA dengan dan tanpa konsentrasi ( $p=0,070$ ), yang berarti proporsi hasil deteksi positif keduanya hampir sama. Hal ini terkait dengan sulitnya mendeteksi ookista dalam jumlah sedikit pada tinja, dan dengan MTA meskipun sudah dikonsentrasikan ternyata hanya sedikit yang benar-benar positif. Berbeda dengan teknik AF yang berbeda bermakna antara hasil deteksi pada tinja dengan dan tanpa konsentrasi ( $p=0,002$ ).

Berdasarkan penelitian Tee *et al.*,<sup>33</sup> didapatkan hasil adanya peningkatan jumlah ookista *Cryptosporidium* sp. yang dideteksi secara signifikan pada tinja konsentrasi dibandingkan dengan tinja tanpa konsentrasi ketika diwarnai dengan metode fluoresensi seperti pewarnaan AF. Penggunaan metode pewarnaan MTA saja, masih sulit untuk deteksi ookista karena terkadang luput dari pemeriksaan

terutama untuk infeksi ringan. Dapat juga dikarenakan metode MTA hanya mewarnai sedikit ookista yang ada dibandingkan metode AF.

Dari penelitian ini dihitung nilai sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif (NPP) dan nilai prediksi negatif (NPN) untuk kedua metode pewarnaan pada tinja yang telah konsentrasi terhadap *gold standard*. Pada sediaan tinja MTA dan AF yang dikonsentrasi, didapatkan sensitivitas: 30,9% dan 54,8%; spesifisitas 100% dan 97,7% terhadap PCR dengan NPP: 100% dan 92%; NPN: 75,2% dan 81,9%. Berdasarkan data tersebut, maka metode MTA dan AF mempunyai sensitivitas yang rendah dan spesifisitas yang tinggi terhadap PCR. Nilai sensitivitas dan spesifisitas dapat saling mempengaruhi satu sama lainnya, dimana makin tinggi spesifisitas makin rendah sensitivitasnya demikian juga sebaliknya. Seperti pada penelitian Vastert *et al.* yang mendapatkan hasil pemeriksaan AF dibandingkan PCR, dimana sensitivitasnya 37% dan spesifisitasnya >98%, dengan NPP 100%. Jadi, dapat disimpulkan bahwa teknik mikroskopis adalah metode yang sangat spesifik tetapi kurang sensitif untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada tinja. Pada penelitian Tee *et al.*,<sup>33</sup> sensitivitas MTA 29,7% dan AF 61,5%. Berbeda dengan penelitian Arrowood *et al.*,<sup>25</sup> dimana sensitivitas MTA dan AF adalah 40,6% dan 93,8%, sedangkan spesifisitas keduanya adalah 52,0% dan 85,7%. Perbedaan ini karena variasi pada sampel, konsistensi tinja,<sup>23</sup> alat yang digunakan dan kemampuan pemeriksa pada tiap penelitian. Faktor visual dan psikologis pemeriksa sangat berpengaruh dalam penegakan diagnosis. Tingginya NPP dan NPN pada kedua metode pewarnaan menunjukkan adanya validitas yang cukup untuk memprediksi ada atau tidaknya penyakit pada sampel yang diteliti.

Berdasarkan hasil deteksi positif ookista, metode AF lebih baik dibandingkan MTA. Namun dengan hasil pemeriksaan AF yang dianggap lebih baik, terdapat perbedaan hasil positif dengan *gold standard* yang cukup besar. Hal ini bisa terjadi, karena teknik mikroskopis tidak dapat mendeteksi stadium selain ookista dari siklus hidup *Cryptosporidium* sp. Kelebihan PCR yaitu dapat mendeteksi berbagai stadium dalam siklus hidup *Cryptosporidium* sp. dan DNANYA,<sup>50</sup> sehingga lebih sensitif. Selain dari perbedaan jumlah konsentrasi sampel tinja yang digunakan, untuk teknik mikroskopis sebanyak 5 µl dan PCR 100 µl (1:20). Spesifisitas AF sebenarnya bisa mencapai 100%, karena setelah

dikonfirmasi adanya 2 sampel yang positif AF tetapi negatif PCR\* (positif palsu), ternyata hasilnya positif benar meskipun secara mikroskopis. Hal ini dapat terjadi, karena pada PCR tidak terdeteksi ookista yang kemungkinan sudah ruptur dan tidak mengandung DNA *Cryptosporidium* sp. akibat pengaruh dari penyimpanan sampel tinja di larutan kalium bikromat 2,5% yang banyak zat penghambat untuk PCR.<sup>50</sup> Jika hasil negatif palsu, umumnya karena faktor pembuatan sediaan, karena terlalu sedikit bahan yang diapus pada kaca obyek, bisa juga terlalu tipis atau justru terlalu tebal.

Dari total 130 sampel yang diperiksa, persentase hasil ookista *Cryptosporidium* sp. yang didapatkan untuk pewarnaan MTA tanpa konsentrasi 5,4%, MTA dengan konsentrasi 10%, AF tanpa konsentrasi 10% dan AF dengan konsentrasi 19,2%. PCR\* sebagai baku emas dalam penelitian ini memiliki hasil sebanyak 32,3%.<sup>57</sup> Setiap perbandingan kedua metode, selalu dicantumkan koefisien kappa ( $K$ ) yang memiliki rentang nilai 0 – 1. Berdasarkan penelitian terdahulu<sup>19</sup> dengan menggunakan metode MTA tanpa konsentrasi hanya didapatkan prevalensi 2,1%. Dari keseluruhan teknik mikroskopis yang digunakan pada penelitian ini, hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. terendah didapatkan pada pewarnaan MTA tanpa konsentrasi yaitu sebesar 5,4%. Hal ini sesuai dengan penelitian Morgan *et al.*<sup>31</sup> yang mendapatkan prevalensi 5,6% (29 dari 511 sampel tinja) dengan metode pewarnaan MTA. Sedangkan hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. tertinggi didapatkan pada metode pewarnaan AF dengan tinja konsentrasi, yaitu 19,2% dengan nilai koefisien kappa 0,587 (*moderate agreement*). Hasil ini hampir sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Carvalho-Almeida *et al.*<sup>58</sup> yang memeriksa sampel tinja yang dikonsentrasi dan menggunakan pewarnaan Auramin untuk skrining pada anak usia 0-6 tahun tanpa gejala diare. Prevalensi yang didapatkan adalah 20,3% (13 dari 64 anak), 10 anak berusia satu tahun, tiga anak berusia dua tahun dan tiga anak lainnya berusia tiga tahun. Jadi, anak yang terinfeksi *Cryptosporidium* sp. kesemuanya adalah anak usia tiga tahun ke bawah. Sama seperti penelitian ini, yang menggunakan sampel tinja anak batita.

Pewarnaan AF dapat diterapkan pada laboratorium klinis sebagai prosedur rutin yang dilakukan sehari-hari dan juga skrining karena lebih mudah, efektif

dan juga membutuhkan waktu lebih singkat daripada pewarnaan MTA.<sup>33</sup> Namun mahalnya mikroskop fluoresensi dapat membatasi pengembangan diagnosis ini, karena tidak selalu tersedia di semua laboratorium. Pemeriksa juga harus terbiasa dalam menggunakan mikroskop fluoresensi untuk mencegah hasil positif palsu atau negatif palsu. Selain itu, menurut Garcia *et al.*<sup>26</sup> terkadang morfologi definitifnya sulit dilihat dan tidak selalu dapat dikonfirmasi sebagai ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan pewarnaan permanen.

Pewarnaan MTA tidak terlalu sensitif seperti AF.<sup>23</sup> Pewarnaan AF 13 kali lebih sensitif daripada MTA pada tinja manusia. *Indirect Fluorescent Antibody* (IFA) dan AF memiliki hasil yang sama dan sensitivitasnya tidak berbeda bermakna,<sup>36</sup> seperti uji imunofluoresens umumnya.<sup>33</sup> AF lebih sensitif untuk mendeteksi ookista pada sediaan tinja yang mengandung sangat sedikit ookista.<sup>36</sup> Pada pemeriksaan satu sediaan tinja dengan MTA yang dinyatakan negatif, ternyata dengan AF ditemukan positif tujuh ookista *Cryptosporidium* sp.<sup>26</sup> Jumlah ookista *Cryptosporidium* sp. yang sedikit akan lebih sulit dideteksi dengan pewarnaan MTA daripada AF, tetapi untuk melihat morfologinya lebih baik menggunakan pewarnaan MTA.<sup>24</sup> AF dapat digunakan sebagai alternatif dari MTA untuk diagnosis infeksi *Cryptosporidium* sp.

## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

- 6.1.1 Kualitas pulasan lebih baik pada sediaan tinja yang dikonsentrasi baik pada metode pewarnaan MTA dan AF.
- 6.1.2 Waktu pemeriksaan sediaan untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. lebih singkat menggunakan metode pewarnaan AF daripada MTA.
- 6.1.3 Tidak terdapat perbedaan bermakna antara hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan tinja dengan dan tanpa konsentrasi pada metode pewarnaan MTA.
- 6.1.4 Terdapat perbedaan bermakna antara hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan tinja dengan dan tanpa konsentrasi pada metode pewarnaan AF.
- 6.1.5 Frekuensi hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. tertinggi dari sediaan tinja konsentrasi dengan pewarnaan AF (19,2%) dan terendah dari sediaan tinja tanpa konsentrasi dengan pewarnaan MTA (5,4%).
- 6.1.6 Metode pewarnaan AF lebih sensitif daripada MTA, namun sama spesifiknya dalam deteksi ookista *Cryptosporidium* sp.

#### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan perbandingan metode mikroskopis lainnya untuk mendapatkan hasil uji lebih baik. Jika memungkinkan, semua spesimen tinja dari individu yang bergejala/simtomatik dapat diskriming untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. Peningkatan metode untuk deteksi ookista dapat membantu lebih memahami epidemiologi infeksi *Cryptosporidium* sp.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):458-83.
2. Roy SL, DeLong SM, Stenzel SA. Risk factor for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the united states from 1999 to 2001. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7):2944-51.
3. UK National Reference Method. *Cryptosporidium*: detection and identification in faeces. Standard Operating Procedure-for the examination of faeces for *Cryptosporidium*. Issued by: Veterinary and public health test standardization group on behalf of SGDI. NRM002. 2006:1-12.
4. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(1):67-85.
5. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4(3):325-58.
6. Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):554-63.
7. Petri WJ. Therapy of intestinal protozoa. *Trends in Parasitology* [serial on the internet]. 2003;19(11). Available from: <http://parasites.trends.com>. Diakses tanggal 10 Juni 2007.
8. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(1):145-54.
9. Chokephaibulkit K, Wanachiwanawin D, Tosasuk K, Pavitpok J, Vanprapar N, Chearskul S. Intestinal parasitic infections among human immunodeficiency virus-infected and uninfected children hospitalized with diarrhea in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2001;32(4):770-5.
10. Kourtis AP. Cryptosporidiosis. *E medicine.* 2006. Available from: <http://www.emedicine.com/ped/topic516.htm>. Diakses tanggal 10 Juni 2007.
11. Jumlah pengidap HIV/AIDS di Indonesia sampai 30 Juni 2008. Diunduh dari: [http://www.aidsindonesia.or.id/index.php?option=com\\_content&task=category&sectionid=4&id=15&Itemid=124](http://www.aidsindonesia.or.id/index.php?option=com_content&task=category&sectionid=4&id=15&Itemid=124) Diakses tanggal 24 Juli 2008.
12. Goodgame RW. Understanding intestinal spore-forming protozoa: Cryptosporidia, Microsporidia, Isospora, and Cyclospora. *Annals of Internal Med* [serial online]. 1996;124(4):429-41. Available from: <http://www.annals.org/cgi/content/full/124/4/429>. Diakses tanggal 10 Juni 2007.

13. Kaur R, Rawat D, Kakkar M, Uppal B, Sharma VK. Intestinal parasites in children with diarrhea in Delhi, India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2002;33(4):725-9.
14. Perch M, Sodemann M, Jakobsen MS, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Fischer TK, et al. Seven years experience with *Cryptosporidium parvum* in Guinea-Bissau, West Africa. *Ann Trop Paediatr*. 2001;21:313-8.
15. Pereira MDGC, Atwill ER, Barbosa AP, Silva SAE, Zapata MTAG. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiania, Goias, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(6):787-93.
16. Khan WA, Rogers KA, Karim MM, Ahmed S, Hibberd PL, Calderwood SB, et al. Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, case-control study of clinical features, epidemiology and systemic antibody responses. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(4):412-419.
17. Morse TD, Nichols RAB, Grimason AM, Campbell BM, Tembo KC, Smith HV. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiol Infect*. 2007:1-9.
18. Katsumata T, Hosea D, Wasito EB, Kohno S, Hara K, Soeparto P, et al. Cryptosporidiosis in Indonesia: a hospital-based study and a community-based survey. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:628-32.
19. Soetomenggolo HA. Cryptosporidiosis pada anak usia di bawah tiga tahun di daerah bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu [tesis]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2006.
20. Martinez I, Belda Neto FM. Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2001.
21. McNabb SN, Hensel DM, Welch DF, Heijbel H, McKee GL, Istre GR. Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* sp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. *J Clin Microbiol*. 1985;22(4):587-9.
22. Tzipori S. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol Rev*. 1983;47(1):84-96.
23. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J Clin Pathol*. 1985;38:1337-41.
24. MacPherson DW, McQueen R. Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):198-202.
25. Arrowood MJ, Sterling CR. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *J Clin Microbiol*. 1989;27:1490-5.

26. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1983;18(1):185-90.
27. Weber R, Byan RT and Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 1992;30(11):2869-73.
28. OIE (Office International des Epizooties). Cryptosporidiosis. In manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. 5<sup>th</sup> edition. Paris. 2004. Available from: [http://www.oie.int/eng/normes/en\\_mmanual.htm](http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm). Diakses tanggal 3 Juni 2007.
29. Casemore DP. ACP Broadsheet 128: Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol.* 1991;44:445-51.
30. Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. 1995;33(10):2592-5.
31. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RC. Comparison of PCR and microscopy for detection to *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):995-8.
32. Brook EJ, Christley RM, French NP, Hart CA. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. *Letters in Applied Microbiology.* 2008;46:26-31.
33. Tee GH, Moody AH, Cooke AH, Chiodini PL. Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J Clin Pathol.* 1993;46:555-8.
34. Henriksen SA, Pohlenz JFL. Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand.* 1981;22:594-6.
35. Wistreich GA. Microbiology laboratory. Fundamental and applications. New Jersey: Prentice hall, Inc; 1997.
36. Stibbs HH, Ongerth JE. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *J Clin Microbiol.* 1986;24(4):517-21.
37. Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM, Gaines JK. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1989;27(5):1135-6.
38. Rasad R, Adjung SA, Rukmono B, Sunoto, Suharyono. *Cryptosporidium* infection in children with diarrhea. 25 th Annual Scientific Seminar, Research priorities for Trop Med in the 90's. (Makalah ini telah dikemukakan dalam:

“25<sup>th</sup> Silver Jubilee Seminar of the Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine 23<sup>rd</sup> – 25<sup>th</sup> February 1989”).

39. Smith HV, Nichols RAB. *Cryptosporidium* (Chapter 9) dalam Foodborne Diseases. Shabbir Simjee editor. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007. p.233-76.
40. Sulaiman IM, Hira PR, Zhou Ling, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, et al. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2805-9
41. A.Clinton White Jr. Cryptosporidiosis. In principles and practice of infectious diseases, 6<sup>th</sup> Ed. G Mandell, J Bennet, R Dolin Eds. Elsevier. 2005:3215-28.
42. Palmateer G. *Cryptosporidium parvum* is a very successful and lethal parasite. *Environmental Science and Engineering.* 2003. Available from: <http://www.esemag.com/index.html>. Diakses tanggal 10 Juni 2007.
43. Sears CL, Kirkpatrick BD. Cryptosporidiosis and isosporiasis. In: Gillespie SH, Pearson RD, editors. Principles and practice of clinical parasitology. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001; p.139-59.
44. Smith HV. Environmental aspects of *Cryptosporidium* species: a review. *J Royal Society of Med.* 1990;83:629-31.
45. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):72-97.
46. Southwick FS. *Infectious Diseases in 30 Days.* New York: McGraw-Hill Companies, Inc. Medical Publishing Division; 2003.
47. Ghani, Lannywati. Faktor –faktor risiko diare persisten pada anak balita. Badan Litbangkes Depkes RI. *J Kedokter Trisakti.* 2001.
48. Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):458-83.
49. Lee JK, Song HJ, Yu JR. Prevalence of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea. *The Korean J of Parasitol.* 2005;43(3):111-4.
50. Smith HV. Diagnosis of human and livestock cryptosporidiosis (Chapter 6) dalam *Cryptosporidium and cryptosporidiosis.* Fayer R, Xiao L editor. 2<sup>nd</sup> ed. London: CRC press; 2007. p.173-203.
51. Lim Y, Ahmad RA. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Temuan Orang Asli (aborigine) river system. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2004;35(4):801-10.

52. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Rich SM, Widmer G, et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago hospital, Kumpala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(6):710-5.
53. Sulaiman IM, Hira PR, Zhou Ling, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, et al. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2805-9.
54. Elsser KA, Moricz M, Proctor EM. *Cryptosporidium* infections: a laboratory survey. *CMAJ.* 1986;135:211-3.
55. Morse TD, Nichols RAB, Grimason AM, Campbell BM, Tembo KC, Smith HV. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiol Infect.* 2007:1-9.
56. Sastroasmoro S, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis edisi 2. Jakarta. CV Sagung Seto. 2006.
57. Dwintasari SW. Pengembangan metode PCR untuk deteksi gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada feses yang disimpan dalam larutan kalium bikromat. [tesis]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2008.
58. Carvalho-Almeida TT, Pinto PLS, Quadros CMS, Torres D, Kanamura HY, Casimiro AM. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of Sao Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2006;48(1):27-32.

**Lampiran 1:****Komposisi dan Cara Pembuatan Larutan****Reagen Pewarnaan Modifikasi Tahan Asam (MTA) <sup>3,28</sup>**

1. **Cold strong carbol fuchsin** (Merck, cat. no. 1.09215): menggunakan *commercial suplies*, dengan konsentrasi basic fuchsin 2,31%.

2. **Alkohol asam 1%:**

- |                     |       |
|---------------------|-------|
| - HCl               | 1 ml  |
| - Methanol absolute | 99 ml |

Asam Hidroklorat (HCl) ditambahkan pada methanol dan dicampur dengan baik, lalu dipindahkan ke dalam botol stok reagen. Reagen diberi label data tanggal dan inisial.

3. **Malachite green 0,4%:**

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| - Malachite green | 0,4 g  |
| - Akuabides       | 100 ml |

*Malachite green* ditambahkan ke dalam akuabides dan dicampur dengan magnetic stirer, lalu disaring ke dalam botol reagen stok. Selanjutnya diberi label data tanggal dan inisial.

**Reagen Pewarnaan Auramin Fenol (AF) <sup>3,28</sup>**

1. **Phenol auramine:**

- |                  |        |
|------------------|--------|
| - Auramine O     | 0,3 g  |
| - Phenol crystal | 3,0 g  |
| - Akuabides      | 100 ml |

Fenol kristal ditambahkan ke dalam air, pelan-pelan juga ditambahkan auramin dan disaring dengan kertas saring. Selanjutnya dimasukkan ke dalam botol stok, lalu diberi label data tanggal dan inisial.

2. **Alkohol asam 3%:**

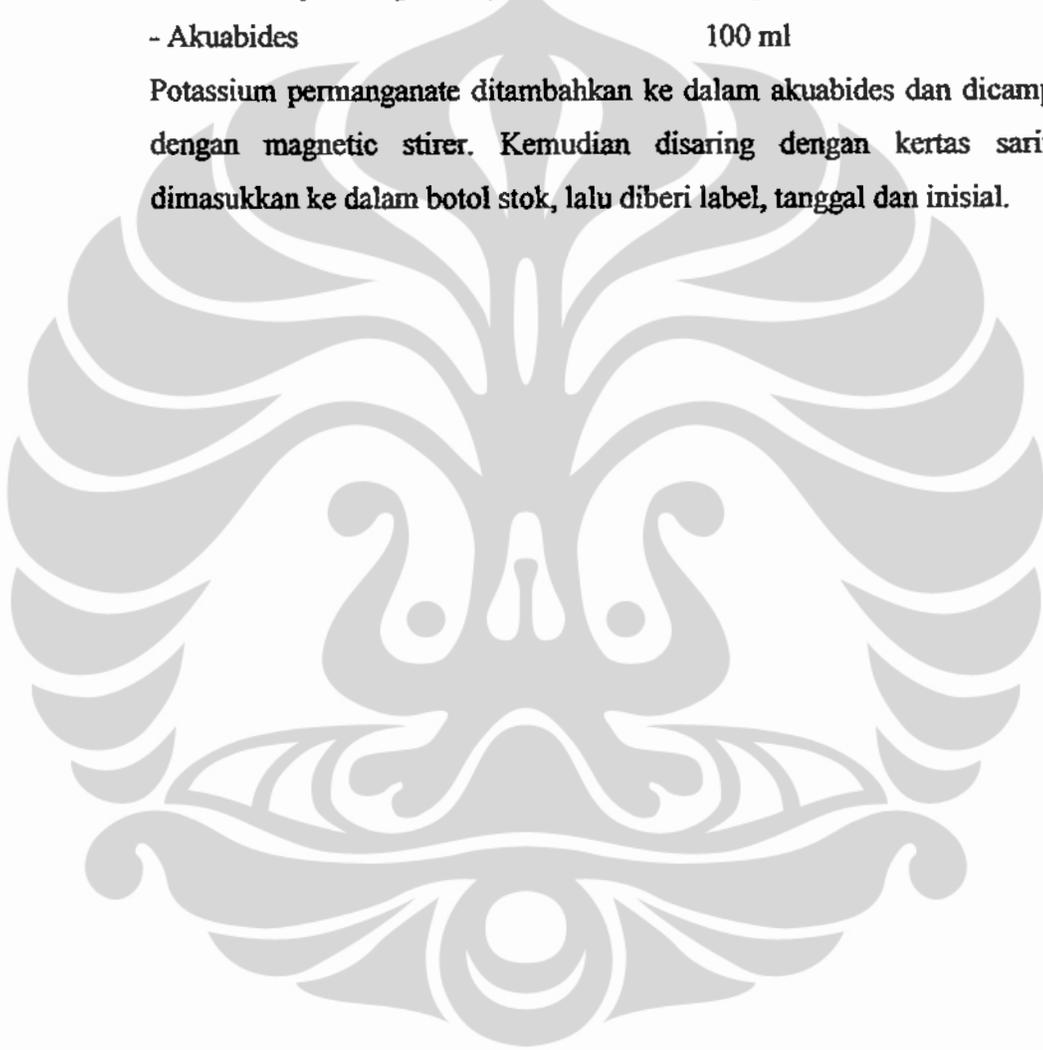
- |                     |       |
|---------------------|-------|
| - HCl               | 3 ml  |
| - Methanol absolute | 97 ml |

Asam hidroklorat (HCL) ditambahkan pada methanol dan dicampur dengan baik. Selanjutnya dipindahkan ke dalam botol stok reagen, lalu diberi label data tanggal dan inisial.

**3. Potassium permanganate 0,1%:**

- Potassium permanganate (PP)                      0,1 g
- Akuabides    100 ml

Potassium permanganate ditambahkan ke dalam akuabides dan dicampur dengan magnetic stirrer. Kemudian disaring dengan kertas saring, dimasukkan ke dalam botol stok, lalu diberi label, tanggal dan inisial.



**Lampiran 2:****Rumus Uji Diagnostik**

		BAKU EMAS		Jumlah
		Positif	Negatif	
UJI	Positif	a (PB)	b (PP)	a+b
	Negatif	c (NP)	d (NB)	c+d
Jumlah		a+c	b+d	a+b+c+d

**Keterangan:**Sensitivitas :  $a / a+c$ Spesifisitas :  $d / b+d$ Nilai Prediksi Positif (NPP) :  $a / a+b$ Nilai Prediksi Negatif (NPN) :  $d / c+d$ 

PB : Positif Benar

PP : Positif Palsu

NP : Negatif Palsu

NB : Negatif Benar

### Lampiran 3.

#### Perbandingan Waktu Pemeriksaan Sediaan Negatif dan Positif pada Metode Pewarnaan MTA dan AF

Analisis perbedaan rerata durasi pemeriksaan sediaan positif dan negatif antara MTA dan AF (non-parametrik test dengan uji Wilcoxon)

Hasil analisis menunjukkan bahwa durasi untuk mengamati sediaan negatif maupun positif secara signifikan metoda AF mempunyai waktu pemeriksaan yang lebih singkat.

Sediaan	Metoda	N	Durasi pemeriksaan (menit) Mean $\pm$ SD	Statistik test
Negatif	MTA	117	13,02 $\pm$ 1,21	Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,00$
	AF	105	10,26 $\pm$ 1,25	
Positif	MTA	25	7,84 $\pm$ 1,14	Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0,01$
	AF	13	2,92 $\pm$ 1,08	

## Lampiran 4.

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada Metode MTA dengan (K) dan Tanpa (L) Konsentrasi

## Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
HASIL MTA (L) * HASIL MTA (K)	130	100.0%	0	.0%	130	100.0%

## HASIL MTA (L) \* HASIL MTA (K) Crosstabulation

			HASIL MTA (K)		Total
			Negatif	Positif	
HASIL MTA (L)	Negatif	Count	116	7	123
		% within HASIL MTA (L)	94.3%	5.7%	100.0%
		% within HASIL MTA (K)	99.1%	53.8%	94.6%
		Std. Residual	.5	-1.5	
HASIL MTA (L)	Positif	Count	1	6	7
		% within HASIL MTA (L)	14.3%	85.7%	100.0%
		% within HASIL MTA (K)	.9%	46.2%	5.4%
		Std. Residual	-2.1	6.3	
Total		Count	117	13	130
		% within HASIL MTA (L)	90.0%	10.0%	100.0%
		% within HASIL MTA (K)	100.0%	100.0%	100.0%

## Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.070 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	130	

a. Binomial distribution used.

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.570	.135	6.865	.000
N of Valid Cases		130			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

## Lampiran 5.

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada Metode AF dengan (K) dan Tanpa (L) Konsentrasi

## Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
HASIL AF (L) *	130	100.0%	0	.0%	130	100.0%
HASIL AF (K)						

## HASIL AF (L) \* HASIL AF (K) Crosstabulation

			HASIL AF (K)		Total
			Negatif	Positif	
HASIL AF (L)	Negatif	Count	104	13	117
		% within HASIL AF (L)	88.9%	11.1%	100.0%
	Positif	% within HASIL AF (K)	99.0%	52.0%	90.0%
		Std. Residual	1.0	-2.0	
Total	Positif	Count	1	12	13
		% within HASIL AF (L)	7.7%	92.3%	100.0%
	% within HASIL AF (K)	1.0%	48.0%	10.0%	
	Std. Residual	-2.9	6.0		
Total		Count	105	25	130
		% within HASIL AF (L)	80.8%	19.2%	100.0%
		% within HASIL AF (K)	100.0%	100.0%	100.0%

## Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.002 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	130	

a. Binomial distribution used.

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.576	.098	7.047	.000
N of Valid Cases		130			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

## Lampiran 6.

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada Metode MTA Konsentrasi dengan PCR\*

## Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
HASIL MTA (K) * HASIL PCR	130	100.0%	0	.0%	130	100.0%

## HASIL MTA (K) \* HASIL PCR Crosstabulation

			HASIL PCR		Total
			Negatif	Positif	
HASIL MTA (K)	Negatif	Count	88	29	117
		% within HASIL MTA (K)	75.2%	24.8%	100.0%
		% within HASIL PCR	100.0%	69.0%	90.0%
		Std. Residual	1.0	-1.4	
	Positif	Count	0	13	13
		% within HASIL MTA (K)	.0%	100.0%	100.0%
		% within HASIL PCR	.0%	31.0%	10.0%
Total	Count	88	42	130	
	% within HASIL MTA (K)	67.7%	32.3%	100.0%	
	% within HASIL PCR	100.0%	100.0%	100.0%	

## Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.000 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	130	

a. Binomial distribution used.

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.378	.080	5.501	.000
N of Valid Cases		130			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

## Lampiran 7.

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada Metode AF Konsentrasi dengan PCR\*

## Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
HASIL AF (K) * HASIL PCR	130	100.0%	0	.0%	130	100.0%

## HASIL AF (K) \* HASIL PCR Crosstabulation

			HASIL PCR		Total
			Negatif	Positif	
HASIL AF (K) Negatif	Count	86	19	105	
	% within HASIL AF (K)	81.9%	18.1%	100.0%	
	% within HASIL PCR	97.7%	45.2%	80.8%	
	Std. Residual	1.8	-2.6		
Positif	Count	2	23	25	
	% within HASIL AF (K)	8.0%	92.0%	100.0%	
	% within HASIL PCR	2.3%	54.8%	19.2%	
	Std. Residual	-3.6	5.3		
Total	Count	88	42	130	
	% within HASIL AF (K)	67.7%	32.3%	100.0%	
	% within HASIL PCR	100.0%	100.0%	100.0%	

## Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.000 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	130	

a. Binomial distribution used.

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.587	.077	7.101	.000
N of Valid Cases		130			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

## RIWAYAT HIDUP



1. Nama lengkap : Rudina Azimata Rosyidah, S.Si
2. NPM : 6105012062
3. Jenis Kelamin : Perempuan
4. Agama : Islam
5. Tempat dan Tgl.Lahir : Ponorogo, 19 Juni 1983
6. Status : Menikah
7. Alamat : Jl. Jend. A. Yani 254 Ponorogo
8. Pekerjaan : -
9. Alamat Instansi : -
10. Riwayat Pendidikan :
  - SD Muhammadiyah 1 Ponorogo tahun: 1989 – 1996
  - SLTP Negeri 1 Ponorogo tahun: 1996 – 1999
  - SMU Negeri 1 Ponorogo tahun: 1999 – 2001
  - S1 Universitas Brawijaya Malang tahun: 2001 – 2005
11. Riwayat Pekerjaan :
  - Kontrak proyek pemantauan/ monitoring kualitas air di waduk Sutami Malang oleh Perum Jasa Tirta I Malang (2004 – 2005).
  - Tentor Primagama Galur dan Sunter Kemayoran Jakarta Pusat (2007).
12. Pengalaman penelitian :
  - PKL (Praktek Kerja Lapang): Pemeriksaan jenis parasit usus dengan teknik konsentrasi apung pada tinja anak sekolah Taman Kanak-kanak di desa Pakis Malang.

- Skripsi: *Dinamika Komunitas Zooplankton di Waduk Sutami Malang (Studi kasus: Awal Musim Penghujan Oktober – Desember 2004).*

13. Publikasi / Karya ilmiah / Skripsi :

- *Dinamika Komunitas Zooplankton di Waduk Sutami Malang (Studi kasus: Awal Musim Penghujan Oktober – Desember 2004).*
- *Sistem Reproduksi Seksual dan Virulensi *Cryptococcus neoformans* Serotipe A.*

14. Sumber dana penelitian Tesis PMIB FKUI: dari British Council, penelitian DelpHE 73

Jakarta, 3 Desember 2008

  
( Rudina Azimata Rosyidah, S.Si.)

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, peserta Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia:

Nama : Rudina Azimata Rosyidah  
NPM : 6105012062  
Kekhususan : Parasitologi

dengan ini menyatakan bahwa tesis saya yang berjudul “Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Sampel Tinja dengan Metode Pewarnaan Modifikasi Tahan Asam dan Auramin Fenol.”

1. disusun dan diselesaikan oleh saya sendiri.
2. bukan merupakan salinan sebagian atau seluruh tesis, karya tulis atau jurnal ilmiah yang pernah disusun orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya. Saya memahami dan menyadari bahwa apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, maka kelulusan saya dan ijazah yang telah diterbitkan dapat dibatalkan.

Jakarta, 3 Desember 2008



( Rudina Azimata R., S.Si.)

## PERBANDINGAN DETEKSI OOKISTA *Cryptosporidium* sp. PADA SAMPEL TINJA DENGAN METODE PEWARNAAN MODIFIKASI TAHAN ASAM DAN AURAMIN FENOL

A. Kurniawan<sup>1</sup>, R.A. Rosyidah<sup>1</sup>, S. Endardjo<sup>2</sup>

1. Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia
2. Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

E-mail: [akatmadja@yahoo.com](mailto:akatmadja@yahoo.com)

### Abstrak

*Cryptosporidium* sp. adalah parasit protozoa usus intraseluler yang menginfeksi berbagai hewan vertebrata termasuk manusia dan menyebabkan penyakit kriptosporidiosis, juga merupakan agen penyebab diare yang bersifat oportunistik. Gejala yang berulang dan angka penularan yang tinggi akan menurunkan kualitas hidup penderita sehingga diperlukan diagnosis kriptosporidiosis yang cepat secara mikroskopis pada sediaan tinja yang diwarnai. Tesis ini bertujuan membandingkan metode pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA) dan auramin fenol (AF) untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dari sampel tinja dengan dan tanpa konsentrasi. Sensitivitas dan spesifisitas setiap metode dari tinja yang dikonsentrasi ditentukan dengan PCR\* sebagai baku emas. Penelitian ini adalah penelitian kualitatif dengan desain *cross sectional* menggunakan uji diagnostik. Hasil uji skrining dan tingkat *agreement* dihitung. Dari 130 sampel tinja yang diperiksa, 5,4%, 10%, 10%, 19,2% dan 32,3% positif *Cryptosporidium* sp. dengan metode MTA tanpa konsentrasi, MTA dikonsentrasi, AF tanpa konsentrasi, AF dikonsentrasi dan PCR\*. Hasil positif ookista *Cryptosporidium* sp. lebih banyak ditemukan pada sediaan tinja yang dikonsentrasi. Hasil tidak berbeda bermakna pada perbandingan hasil MTA dengan dan tanpa konsentrasi ( $p=0,07$ ), sedangkan hasil berbeda bermakna pada AF ( $p=0,00$ ). Sensitivitas MTA dan AF tinja konsentrasi adalah 30,9% dan 54,8%; spesifisitas 100% dan 97,7% dibandingkan dengan PCR\*. Metode pewarnaan AF memiliki nilai sensitivitas lebih tinggi, tetapi spesifisitasnya sama dengan MTA. Metode pewarnaan AF dapat digunakan sebagai alternatif dari pewarnaan MTA untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja.

### Abstract

**Comparison Detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in Fecal Sample with The Modified Acid Fast and Auramine Phenol Staining Method.** *Cryptosporidium* sp. is intestinal protozoa parasite intracellular which infect widely vertebrata include human and cause cryptosporidiosis disease, also opportunistic agent for diarrhea. Reinfection and high transmission can decrease quality of life patient, so it needs a quick diagnostic with microscopy analysis to stain fecal smears. The objective of this study is to investigate the comparison of the modified acid fast (MAF) and auramine phenol (Aph) staining method in order to detecting *Cryptosporidium* sp. oocysts from unconcentrated and concentrated fecal sample. The sensitivity and specificity of each method from concentrated fecal sample was determined with PCR\* as the gold standard. The result of the screening test and the levels of agreement were quantified. This research is qualitative interpretation with cross sectional design study which using diagnostic test. Of the 130 fecal samples that has examined, 5,4%, 10%, 10%, 19,2% and 32,3% were positive *Cryptosporidium* sp. by the MAF unconcentrated, MAF concentrated, Aph unconcentrated, Aph concentrated and PCR\* method respectively. The majority of positive *Cryptosporidium* sp. samples were found in concentrated samples. The results have no significant differences between MAF staining with unconcentrated and concentrated fecal sample ( $p=0,07$ ), but there is a significant difference for Aph staining ( $p=0,00$ ). In comparison with PCR\* results, the sensitivities of MAF and Aph concentrated methods were 30,9% and 54,8%; the specificities were 100% and 97,7% respectively. The Aph staining method apparently has more sensitivity than MAF staining method, but has the same specificity. The Aph staining method proved to be a valuable alternative to MAF staining for detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in fecal sample.

**Key words:** Auramine phenol, *Cryptosporidium* sp., Diagnostic, Modified acid fast

## 1. Pendahuluan

*Cryptosporidium* sp. adalah parasit protozoa usus intraseluler yang menginfeksi berbagai hewan vertebrata termasuk manusia dan menyebabkan penyakit kriptosporidiosis<sup>1</sup>. Protozoa usus ini termasuk ordo Coccidia dan mempunyai distribusi geografis yang luas<sup>2</sup>. *Cryptosporidium* sp. pertama kali ditemukan oleh Tyzzer pada tahun 1907 di kelenjar lambung tikus laboratorium<sup>1</sup>. Pada tahun 1976, 2 kasus kriptosporidiosis pada manusia pertama kali dilaporkan, salah satunya pada anak perempuan berusia di bawah tiga tahun (batita)<sup>3</sup>.

Transmisi parasit dapat terjadi secara langsung melalui hewan dan manusia yang terinfeksi (fekal oral), maupun dari makanan dan air<sup>2,3</sup>. Penularan melalui air yang terkontaminasi dilaporkan menimbulkan wabah terbesar di Milwaukee pada tahun 1993 dan menginfeksi lebih dari 400.000 orang<sup>3,4</sup>. Orang yang menderita kriptosporidiosis umumnya terkait dengan lemahnya sistem imun seperti penderita AIDS dan kanker<sup>5</sup>.

Beberapa peneliti telah melaporkan kejadian kriptosporidiosis pada penderita AIDS dan HIV positif. Pada tahun 2001 di Bangkok, Thailand terdapat kasus kriptosporidiosis 5 dari 82 (6,1%) anak HIV positif dan pada orang dewasa yang terinfeksi HIV dengan diare kronis sebanyak 20 – 25%<sup>6</sup>. Pada tahun 2004, dilaporkan kasus kriptosporidiosis di Amerika Serikat sebanyak 3-4% dan di Afrika/Haiti lebih dari 50% pada penderita AIDS<sup>7</sup>. Di Indonesia sendiri sampai bulan Juni tahun 2008 telah dilaporkan peningkatan kasus AIDS mencapai 12686 kasus dan 6130 kasus HIV<sup>8</sup>. Studi prevalensi kriptosporidiosis pada individu imunokompeten dari 26 negara, dilaporkan sekitar 0,6 – 20% di negara maju dan 4 – 20% di negara berkembang<sup>9</sup>.

*Cryptosporidium* sp. juga dilaporkan lebih sering menginfeksi anak-anak<sup>10</sup>. Prevalensi tertinggi terjadi pada anak usia di bawah 5 tahun<sup>9</sup>. Pada tahun 2000 di Delhi, India terdapat infeksi *Cryptosporidium* sp. pada 24 dari 127 (18,9%) anak yang diare<sup>11</sup>. Penelitian Perch dkk. (2001) di Afrika Barat, prevalensi kriptosporidiosis terbanyak ada pada anak batita dengan diare, yaitu sebesar 7,7%<sup>12</sup>. Pada tahun 2002 di Goias, Brazil ditemukan prevalensi kriptosporidiosis 18,7% (83 dari 445 anak)<sup>13</sup>. Pada tahun 2004 di Bangladesh terdapat prevalensi kriptosporidiosis 8,4% pada anak usia kurang dari 5 tahun (balita)<sup>14</sup>. Pada tahun 2007 di Malawi pada anak balita dengan diare di RS, ditemukan prevalensi kriptosporidiosis (5,9%) 50 dari 848 sampel<sup>15</sup>. Di Indonesia, tepatnya di Surabaya pada tahun 1998, prevalensi kriptosporidiosis sebesar 2,8% pada anak diare dan 1,4% pada anak tidak diare<sup>16</sup>. Sedangkan pada

tahun 2006 di Jakarta, Soetomenggolo melaporkan bahwa infeksi parasit ini prevalensinya sebesar 2,1% pada anak batita dengan gejala klinis diare dan tidak diare<sup>17</sup>.

Gejala klinis kriptosporidiosis sangat luas mulai dari asimtomatik sampai diare persisten. Diare akut yang sembuh sendiri pada individu imunokompeten sampai diare kronik yang fatal pada penderita imunokompromis<sup>1,2</sup>. Sebanyak 13% anak yang terinfeksi *Cryptosporidium* sp. akan mengalami gejala yang berulang dalam 6 hari sampai 2,5 bulan setelah infeksi yang pertama<sup>13</sup>. Gejala berulang dan angka penularan yang tinggi akan menurunkan kualitas hidup penderita sehingga diagnosis dini kriptosporidiosis diperlukan untuk penatalaksanaan kasus dan mencegah penularan lebih luas.

Kasus pertama kriptosporidiosis pada manusia didiagnosis dengan biopsi usus dan rektum<sup>18</sup>. Pada tahun 1980, ookista *Cryptosporidium* sp. ditemukan pada spesimen tinja manusia<sup>19</sup>, sehingga diagnosis kriptosporidiosis dapat ditegakkan secara non invasif dengan menemukan ookista *Cryptosporidium* sp. dengan pemeriksaan mikroskopis pada sedimen tinja yang diwarnai<sup>20</sup>.

Berbagai jenis pemeriksaan teknik konsentrasi tinja, dan deteksi antigen kriptosporidiosis juga telah dikembangkan untuk meningkatkan sensitivitas pemeriksaan<sup>21-23</sup>. Konsentrasi air-eter merupakan teknik yang direkomendasikan dalam studi epidemiologi untuk mendapatkan ookista di tinja dalam jumlah banyak<sup>24,25</sup>.

Metode diagnostik untuk deteksi ookista di tinja juga telah dilakukan dengan menggunakan teknik aglutinasi partikel latex yang dilapisi Ab anti-*Cryptosporidium*, *direct immunofluoresensi* dan ELISA. Meskipun metode-metode tersebut adalah uji imunoserologi yang sensitif dan spesifik, namun membutuhkan keahlian teknik, perlengkapan mahal dan pemeriksa yang berpengalaman<sup>26</sup>. Begitu juga dengan teknik PCR, yang saat ini memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang paling baik (100%)<sup>27,28</sup>.

Antara tahun 1978 dan 1980, pewarnaan Giemsa digunakan untuk mendeteksi ookista

pada tinja hewan dan manusia<sup>19</sup>, namun ternyata kurang sensitif untuk deteksi ookista<sup>29</sup>. Pada tahun 1981 teknik modifikasi tahan asam Ziehl-Neelsen digunakan untuk mewarnai ookista<sup>30</sup>. Metode modifikasi tahan asam (MTA) sudah umum digunakan di seluruh dunia, terutama di negara-negara berkembang karena sederhana dan biaya yang relatif murah<sup>4,20,22</sup>. Namun, sensitivitas teknik ini rendah dan sangat bergantung pada ketrampilan serta pengalaman tenaga mikroskopis dalam mengidentifikasi *Cryptosporidium* sp.<sup>21</sup>. Sebagai alternatif, dipakai teknik auramin fenol (AF) dengan pembacaan hasil menggunakan mikroskop fluoresensi<sup>31</sup>, untuk skrining cepat pada suatu epidemi<sup>20,26</sup>.

Sensitivitas pewarnaan MTA dan AF adalah 40,6% dan 93,8%, sedangkan spesifisitas keduanya adalah 52,0% dan 85,7% pada pemeriksaan sampel tinja pasien tanpa gejala diare oleh Arrowood<sup>32</sup>.

Pada penelitian ini, dua metode pewarnaan MTA dan AF pada sampel tinja anak batita dengan konsentrasi dibandingkan sensitivitas dan spesifisitasnya dalam diagnosis kriptosporidiosis dengan hasil PCR sebagai baku emas. Semakin sensitif tes diagnosis yang digunakan, akan lebih mudah untuk mengidentifikasi infeksi *Cryptosporidium* sp. yang berintensitas rendah<sup>10,12,26</sup>. Diagnosis yang tepat dan cepat akan sangat membantu penatalaksanaan penderita.

## 2. Metode Penelitian

**Bahan dan Cara Kerja.** Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Patologi Anatomi FKUI. Sampel adalah tinja anak batita dengan diare dan tanpa diare yang sudah diberi kalium bikromat 2,5% di Laboratorium Parasitologi FKUI yang dikumpulkan peneliti sebelumnya dari bulan Januari-April 2006 yaitu sebanyak 486 sampel. Peneliti menggunakan 130 sampel untuk diperiksa. Sebagai kontrol adalah tinja positif ookista *Cryptosporidium* sp. dari CDC Atlanta USA dan dari pasien HIV/ AIDS yang positif *Cryptosporidium* sp. Sampel tinja ada yang dikonsentrasi dan tidak. Teknik konsentrasi tinja yang digunakan adalah konsentrasi air-eter<sup>24,25,33</sup> dengan tahapan sesuai prosedur yang ditetapkan. Setelah itu, sampel dengan dan tanpa konsentrasi dibuat sediaan di atas kaca obyek lalu diwarnai dengan metode MTA dan AF.

**Pewarnaan Modifikasi Tahan Asam (MTA)**<sup>20,24,33</sup>. Tinja dioleskan ke atas kaca obyek dengan mikropipet sebanyak 5 µl, lalu dikeringkan pada suhu kamar (60 menit)<sup>31</sup>, kemudian difiksasi dengan methanol absolut selama 3 menit. Larutan

*cold strong* fukhsin karbol 2,31% dituangkan ke atas kaca obyek dan dibiarkan selama 10 menit. Kaca obyek sediaan dibilas dengan air mengalir. Larutan methanol-HCl 1% dituangkan ke atas kaca obyek selama 10 – 15 detik untuk menghilangkan pewarna utama. Kaca obyek sediaan dibilas dengan air mengalir. Larutan *counterstain* malakit hijau 0,4% dituangkan ke atas kaca obyek selama 30 detik untuk mewarnai kembali. Kaca obyek sediaan dibilas dengan air mengalir, lalu dikeringkan.

**Gambaran hasil:** Sediaan diperiksa di bawah mikroskop cahaya/ *bright-field* (Olympus CH20, Japan) pada pembesaran 400x untuk keseluruhan lapang pandang. Keberadaan ookista dikonfirmasi dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak imersi. Ookista tampak berwarna merah, berbentuk bulat dan berukuran 4 – 6 µm dengan latar belakang hijau. Tingkatan dan proporsi pewarnaan bervariasi pada tiap-tiap ookista. Ada tidaknya sporozoit dalam ookista juga diperhatikan.

**Pewarnaan Auramin Fenol (AF)**<sup>20,24,33</sup>.

Tinja dioleskan ke atas kaca obyek dengan mikropipet sebanyak 5 µl, lalu dikeringkan pada suhu kamar (60 menit)<sup>31</sup>. Sampel pada kaca obyek difiksasi dengan methanol selama 3 menit. Larutan pewarna auramin fenol dituangkan ke atas kaca obyek dan dibiarkan selama 10 menit. Kaca obyek sediaan dibilas dengan air mengalir untuk menghilangkan zat pewarna (*excess stain*). Larutan 3% methanol-HCl dituangkan ke atas kaca obyek selama 5 menit untuk menghilangkan pewarna utama. Larutan *counterstain* potassium permanganat (KMnO<sub>4</sub>) 0,1% dituangkan ke atas kaca obyek selama 30 detik untuk mewarnai kembali. Kaca obyek sediaan dikeringkan.

**Gambaran hasil:** Ookista *Cryptosporidium* sp. dideteksi menggunakan mikroskop fluoresensi (Olympus BX-51, Japan) yang dilengkapi filter FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) dengan eksitasi 490 nm dan emisi 510 nm. Sediaan diperiksa pada seluruh lapang pandang dengan pembesaran 200x dan dikonfirmasi keberadaan ookista dengan pembesaran 400x. Dilihat bentuk fluoresensinya, ookista *Cryptosporidium* sp. tampak berbentuk cincin (*ringshaped*) atau seperti donat berukuran 4-6 µm dan menunjukkan karakteristik fluoresensi (berwarna hijau hingga kuning) yang terang dengan latar belakang gelap.

**Penilaian Hasil Kerja.** Teknik pewarnaan MTA dan AF dilakukan pada 130 sampel. Dilakukan pencatatan waktu yang diperlukan untuk pewarnaan satu sediaan dan waktu yang diperlukan untuk memeriksa satu sediaan. Sampel dinilai hasilnya dengan penilaian kualitatif atau nominal dikotom (positif dan negatif). Jika ookista dihitung secara semikuantitatif, dapat dibuat skala numerik sebagai berikut:<sup>24</sup>

- + : < 5 ookista per *slide*
- ++ : 1 – 10 ookista per lapang pandang
- +++ : 11 atau lebih ookista per lapang pandang

Hasil pemeriksaan dikonfirmasi oleh pemeriksa lain yang berkompeten di bidangnya sebagai pembanding, baik pewarnaan MTA dan AF untuk validitas hasil. Hasil positif dinyatakan apabila ditemukan minimal satu ookista *Cryptosporidium* sp. dalam sediaan pewarnaan MTA dan AF, sebaliknya hasil negatif jika tidak ditemukan ookista. Hasil uji/ pemeriksaan dibuat tabulasi hasil evaluasi yang diperoleh (positif atau negatif). Dicatat waktu pewarnaan, waktu pemeriksaan dan kualitas pewarnaan dari dua metode pewarnaan yang berbeda. Analisis komparatif secara statistik non-intervensi untuk mengukur kemaknaan perbedaan data proporsi dua metode pemeriksaan (MTA dan AF) sampel tinja dengan dan tanpa konsentrasi, menggunakan uji Mc Nemar (tabel 2x2) dengan nilai  $p < 0,05$  sebagai batas kemaknaan. Disertakan juga nilai koefisien kappa ( $K$ ) untuk menilai hasil. Dihitung sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan negatif serta prevalensi dari total jumlah sampel tinja yang diperiksa untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. Dalam penelitian ini, *gold standard* berupa teknik PCR (dikerjakan peneliti lain). Data dianalisis menggunakan program SPSS 12 for windows.

### 3. Hasil

#### Hasil Pulasan pada Metode Pewarnaan MTA

##### a. Tinja tanpa konsentrasi:

Latar belakang *slide* berwarna hijau muda-tua, tampak tebal, lebih gelap dan terdapat banyak jamur/ sel ragi, bakteri dan debris/kotoran yang dapat menyulitkan pemeriksaan. Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitar: jelas, ookista dapat dibedakan dengan sekitarnya. Ookista tampak bulat dan berwarna merah muda/pink (Gambar 1).



Gambar 1. Ookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan MTA pada Tinja Tanpa Konsentrasi (pembesaran 1000 x)

##### b. Tinja konsentrasi:

Latar belakang *slide* berwarna hijau muda, lebih tipis, tampak lebih terang; sedikit spora jamur/ sel ragi, bakteri dan debris/ kotoran. Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitar: jelas, ookista dapat dibedakan dengan sekitarnya. Ookista tampak bulat dan berwarna merah muda/pink, isi di dalam ookista (sporozoit) terlihat jelas (Gambar 2).

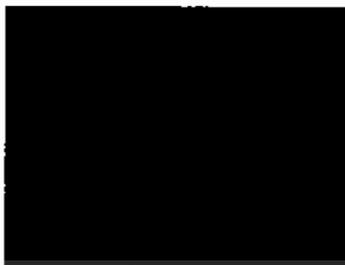


Gambar 2. Ookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan MTA pada Tinja Konsentrasi (pembesaran 1000 x)

#### Hasil Pulasan pada Metode Pewarnaan AF

##### a. Tinja tanpa konsentrasi:

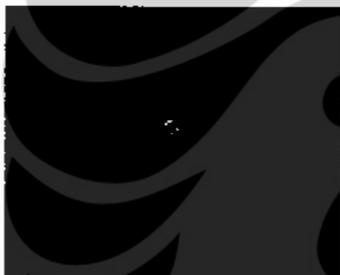
Latar belakang *slide* kurang gelap; kurang homogen; lebih tebal, banyak spora jamur dan debris/kotoran yang membias cahaya fluoresens sehingga menyulitkan pemeriksaan. Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitar: jelas, ookista dapat dibedakan dengan sekitarnya. Ookista berbentuk bulat seperti donat/cincin, berwarna kuning-kehijauan dan tampak berpendar terang (Gambar 3).



Gambar 3. Ookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan pada Tinja Tanpa Konsentrasi (pembesaran 400 x)

b. Tinja konsentrasi:

Latar belakang *slide* tampak gelap dan homogen; lebih tipis, sedikit spora jamur dan debris/kotoran sehingga memudahkan pemeriksaan. Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitar: jelas, ookista dapat dibedakan dengan sekitarnya. Ookista berbentuk bulat seperti donat/cincin, tampak lebih berpendar terang dan berwarna kuning-kehijauan (Gambar 4).



Gambar 4. Ookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan AF pada Tinja Konsentrasi (pembesaran 400x)

Waktu Proses Pewarnaan dan Pemeriksaan Sediaan

Tabel 1. Lama Waktu Pewarnaan dan Pemeriksaan yang dibutuhkan Tiap Sediaan Tinja untuk Metode MTA dan AF

Metode Pewarnaan	Waktu Pewarnaan per slide (menit)	Waktu Pemeriksaan per slide (menit)		Jumlah sediaan
		TK	K	
		MTA	25 ± 20	
AF	20 ± 12	± 10	130	

Keterangan: TK: tanpa konsentrasi  
K: konsentrasi

Tabel 2. Jumlah Ookista *Cryptosporidium* pada Pemeriksaan dengan Metode Pewarnaan MTA dan AF

Jumlah Ookista	Jumlah spesimen positif atau negatif dari:			
	MTA		AF	
	TK	K	TK	K
0	123	117	117	105
+	7	13	13	21
++	0	0	0	3
+++	0	0	0	1

Keterangan: TK: tanpa konsentrasi; K: konsentrasi

Hasil pemeriksaan pada pewarnaan MTA, rata-rata ditemukan ookista kurang dari 5 tiap slide pada hasil positif, jadi hanya positif satu (+). Pada pewarnaan AF, terutama yang dikonsentrasi memberikan hasil bervariasi (Tabel 2).

Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan dan Tanpa Konsentrasi dengan Metode MTA dan AF untuk Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp.

Pada metode pewarnaan MTA, untuk sampel tinja tanpa konsentrasi dapat dideteksi 7 jumlah sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan pada sampel tinja konsentrasi terdapat 13 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,070$ ) dengan nilai  $Kappa=0,570$ , antara hasil pemeriksaan sampel tinja dengan dan tanpa konsentrasi (Tabel 3).

Pada metode pewarnaan AF, untuk sampel tinja tanpa konsentrasi dapat dideteksi 13 jumlah sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan pada sampel tinja konsentrasi terdapat 25 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,002$ ) dengan nilai  $Kappa=0,576$ , antara hasil pemeriksaan sampel tinja dengan dan tanpa konsentrasi (Tabel 4).

Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Tinja Konsentrasi Antara Metode Pewarnaan MTA dan AF dengan PCR (*Gold standard*)

Pada sampel tinja konsentrasi dengan metode MTA dapat dideteksi 13 jumlah sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan pada sampel tinja hasil PCR

terdapat 42 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p= 0,000$ ) dengan nilai

Kappa=0,378, antara hasil pemeriksaan sampel tinja konsentrasi pada metode MTA dengan tinja hasil PCR (Tabel 5).

**Tabel 3. Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan dan Tanpa Konsentrasi pada Metode MTA**

MTA TANPA KONSENTRASI		MTA KONSENTRASI		
		Positif	Negatif	Total
Positif		6	1	7 (5,4%)
Negatif		7	116	123 (94,6%)
Total		13 (10%)	117 (90%)	130 (100%)

**Tabel 4. Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan dan Tanpa Konsentrasi pada Metode AF**

AF TANPA KONSENTRASI		AF KONSENTRASI		
		Positif	Negatif	Total
Positif		12	1	13 (10%)
Negatif		13	104	117 (90%)
Total		25 (19,2%)	105 (80,8%)	130 (100%)

**Tabel 5. Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Tinja Konsentrasi dengan Metode MTA dan PCR**

MTA KONSENTRASI		PCR*		
		Positif	Negatif	Total
Positif		13	0	13 (10%)
Negatif		29	88	117 (90%)
Total		42(32,3%)	88 (67,7%)	130 (100%)

Ket \* Sumber data penelitian dari SW Dwintasari (2008)<sup>24</sup>

**Tabel 6. Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. pada Tinja Konsentrasi dengan Metode AF dan PCR**

AF KONSENTRASI		PCR*		
		Positif	Negatif	Total
Positif		23	2	25 (19,2%)
Negatif		19	86	105 (80,8%)
Total		42 (32,3%)	88 (67,7%)	130 (100%)

Ket \* Sumber data penelitian dari SW Dwintasari (2008)<sup>24</sup>

Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas metode MTA konsentrasi terhadap PCR\*:

Sensitivitas : 30,9 %

Spesifisitas : 100 %

Nilai Prediksi Positif (NPP): 100 %

Nilai Prediksi Negatif (NPN): 75,2 %

Pada sampel tinja konsentrasi dengan metode AF dapat dideteksi 25 jumlah sampel positif kriptosporidiosis, sedangkan pada sampel tinja hasil PCR terdapat 42 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc*

*Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p= 0,000$ ) dengan nilai Kappa=0,587, antara hasil pemeriksaan sampel tinja konsentrasi pada metode AF dengan tinja hasil PCR (Tabel 6).

Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas metode AF konsentrasi terhadap PCR\*:

Sensitivitas : 54,8 %

Spesifisitas : 97,7 %

Nilai Prediksi Positif (NPP): 92,0 %

Nilai Prediksi Negatif (NPN): 81,9

Berdasarkan hasil penelitian Rusnak *et al.*<sup>31</sup>, untuk pemeriksaan sediaan MTA yang negatif membutuhkan waktu 14 menit dan yang positif selama 5 menit. Untuk pemeriksaan sediaan AF yang negatif membutuhkan waktu 17 menit dan yang positif hanya kurang dari 1 menit. Jadi, dapat disimpulkan dari penelitian ini, bahwa pewarnaan AF membutuhkan waktu lebih singkat dibandingkan pewarnaan MTA untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp., terutama dengan hasil diagnosis positif.

Pada penelitian ini, setiap sediaan selalu diperiksa untuk keseluruhan lapang pandang. Mengingat kemungkinan sangat terbatas/ sedikitnya ookista yang akan didapatkan pada tinja anak batita (imunokompeten). Berbeda jika menggunakan sampel dari individu yang positif. Peneliti sebelumnya<sup>17</sup> sudah melakukan pemeriksaan tinja dengan pewarnaan tahan asam tanpa konsentrasi. Diharapkan dengan teknik konsentrasi, penelitian ini akan memberikan hasil lebih baik/akurat.

Diagnosis kriptosporidiosis dengan dua metode pewarnaan didapatkan hasil lebih banyak positif pada metode AF daripada MTA. Hal ini juga terkait dengan kualitas sediaan yang baik, pewarnaan yang tepat dengan reagen yang berkualitas dan alat (mikroskop) yang digunakan untuk memeriksa. Pewarnaan AF adalah salah satu teknik alternatif karena pewarna fluoresensi ini lebih mudah proses pemeriksaannya. Sehingga sangat tepat digunakan untuk skrining cepat pada jumlah sampel yang besar, meski untuk melihat morfologi spesies kurang spesifik dan terkadang memberikan hasil positif palsu. Namun, kelemahan ini dapat diantisipasi dengan melakukan studi pendahuluan, mempelajari kontrol positif *Cryptosporidium* sp. yang dilabel FIT-C dan diwarnai dengan AF.

Hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan tinja dengan dan tanpa konsentrasi lebih banyak positif pada prosedur tinja yang melalui proses konsentrasi pada kedua metode pewarnaan. Jadi, penggunaan teknik konsentrasi (air-eter) dalam penelitian ini, memberikan manfaat hasil yang lebih baik. Pemilihan teknik ini didasarkan pada kebutuhan penelitian yang tidak hanya untuk pemeriksaan tinja secara mikroskopis,

namun selanjutnya untuk uji tingkat molekuler (dengan PCR). Penelitian Bukhari dan Smith (1995)<sup>25</sup> menunjukkan bahwa deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja lebih baik menggunakan konsentrasi air-eter dengan rata-rata ookista yang didapatkan sebanyak 46-75%, dibandingkan teknik flotasi densitas sukrosa (24 - 65%) dan flotasi zink sulfat (22 - 41%). Sehingga selain lebih ekonomis dan bermanfaat untuk deteksi di tingkat molekuler, akan mudah didapatkan ookista dalam jumlah banyak.

Hasil tidak berbeda bermakna hanya pada perbandingan teknik MTA dengan dan tanpa konsentrasi ( $p=0,070$ ), yang berarti proporsi positif keduanya hampir sama. Hal ini terkait dengan sulitnya mendeteksi ookista dalam jumlah sedikit pada tinja, dan dengan MTA meskipun sudah dikonsentrasikan ternyata hanya sedikit yang benar-benar positif. Berbeda dengan teknik AF yang berbeda bermakna antara tinja dengan dan tanpa konsentrasi ( $p=0,00$ ).

Berdasarkan penelitian Tee *et al.*<sup>29</sup>, didapatkan hasil adanya peningkatan jumlah ookista *Cryptosporidium* sp. yang dideteksi secara signifikan pada tinja konsentrasi dibandingkan dengan tinja tanpa konsentrasi ketika diwarnai dengan metode fluoresensi seperti pewarnaan AF. Penggunaan metode pewarnaan MTA saja, masih sulit untuk deteksi ookista, terkadang "missing" terutama untuk infeksi ringan. Dapat juga dikarenakan metode MTA hanya mewarnai sedikit ookista yang ada dibandingkan metode AF.

Pada kedua metode pewarnaan pada tinja yang dikonsentrasi, sensitivitas metode MTA didapatkan 30,9% dan metode AF 54,8% terhadap PCR. Spesifisitas metode MTA didapatkan 100% dan metode AF 97,7% terhadap PCR. Berdasarkan data tersebut, maka metode MTA dan AF mempunyai sensitivitas yang rendah dan spesifisitas yang tinggi terhadap PCR. Nilai sensitivitas dan spesifisitas dapat saling mempengaruhi satu sama lainnya, dimana makin tinggi sensitivitas makin rendah spesifisitasnya demikian juga sebaliknya. Seperti pada penelitian Vastert *et al.* yang mendapatkan hasil pemeriksaan AF dibandingkan PCR, dimana sensitivitasnya 37% dan spesifisitasnya >98%, dengan nilai prediksi positif (NPP) 100%. Jadi, dapat

disimpulkan bahwa teknik mikroskopis adalah metode yang sangat spesifik tetapi kurang sensitif untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada tinja. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Arrowood *et al.*<sup>32</sup>, dimana sensitivitas pewarnaan MTA dan AF adalah 40,6% dan 93,8%, sedangkan spesifisitas keduanya adalah 52,0% dan 85,7%. Perbedaan ini karena variasi pada sampel dan kemampuan pemeriksa pada tiap penelitian.

Metode AF lebih baik dibandingkan MTA dari hasil deteksi positif ookista. Perbedaan hasil positif dengan baku emas cukup besar. Hal ini bisa terjadi, karena teknik mikroskopis tidak dapat mendeteksi stadium selain ookista dari siklus hidup *Cryptosporidium* sp. Pada teknik PCR, kelebihan dapat mendeteksi berbagai stadium dalam siklus hidup *Cryptosporidium* sp. dan DNANYA<sup>36</sup>, sehingga lebih sensitif. Spesifisitas AF sebenarnya bisa mencapai 100%, karena setelah dikonfirmasi adanya 2 sampel yang positif AF tetapi negatif PCR (positif palsu), ternyata hasilnya positif benar meskipun secara mikroskopis. Hal ini dapat terjadi, karena pada PCR tidak terdeteksi ookista yang kemungkinan sudah ruptur dan tidak mengandung DNA *Cryptosporidium* sp. akibat pengaruh dari penyimpanan sampel tinja di larutan kalium bikromat yang banyak zat penghambat untuk PCR.

Frekuensi hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. yang didapatkan untuk pewarnaan MTA tanpa konsentrasi 5,4%, MTA dengan konsentrasi 10%, AF tanpa konsentrasi 10% dan AF dengan konsentrasi 19,2%. PCR sebagai baku emas sebanyak 32,3%. Setiap perbandingan kedua metode, selalu dicantumkan koefisien kappa (*K*) yang memiliki rentang nilai 0 – 1. Berdasarkan penelitian terdahulu<sup>17</sup> dengan metode MTA tanpa konsentrasi hanya didapatkan prevalensi 2,1%. Jadi, dengan teknik konsentrasi dapat meningkatkan sensitivitas deteksi. Dari keseluruhan teknik mikroskopis yang digunakan, metode pewarnaan AF dengan tinja konsentrasi memiliki hasil deteksi tertinggi, yaitu 19,2% dengan nilai koefisien kappa 0,587 (*moderate agreement*).

Pewarnaan AF dapat lebih diterapkan pada laboratorium klinis sebagai prosedur rutin yang dilakukan sehari-hari dan juga skrining

karena lebih mudah dan juga membutuhkan waktu lebih singkat daripada pewarnaan MTA<sup>29</sup>. Pewarnaan MTA tidak terlalu sensitif sebagaimana metode pewarnaan lain seperti AF<sup>20</sup>. Pewarnaan AF lebih sensitif untuk mendeteksi ookista pada sediaan yang mengandung sangat sedikit ookista<sup>37</sup>, tetapi untuk melihat morfologinya lebih baik menggunakan pewarnaan MTA<sup>26</sup>. AF dapat digunakan sebagai alternatif dari MTA untuk deteksi infeksi *Cryptosporidium* sp.

## 5. Kesimpulan

Kualitas pulasan lebih baik pada sediaan tinja yang dikonsentrasi baik pada metode pewarnaan MTA dan AF. Waktu pemeriksaan sediaan untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. lebih singkat menggunakan metode pewarnaan AF daripada MTA. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan tinja dengan dan tanpa konsentrasi pada metode pewarnaan MTA. Terdapat perbedaan bermakna antara hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sediaan tinja dengan dan tanpa konsentrasi pada metode pewarnaan AF. Frekuensi hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. tertinggi dari sediaan tinja konsentrasi dengan pewarnaan AF (19,2%) dan terendah dari sediaan tinja tanpa konsentrasi dengan pewarnaan MTA (5,4%). Metode pewarnaan AF lebih sensitif daripada MTA, namun sama spesifiknya dalam deteksi ookista *Cryptosporidium* sp.

## Daftar Acuan

1. Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev* 1986; 50(4): 458-83.
2. Roy SL, DeLong SM, Stenzel SA. Risk factor for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the united states from 1999 to 2001. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7): 2944-51.
3. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(1): 67-85.
4. Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 554-63.

5. Petri WJ. Therapy of intestinal protozoa. Trends in Parasitology [serial on the internet]. 2003;19(11). Available from: <http://parasites.trends.com>. Diakses tanggal 10 Juni 2007.
6. Choekhaibulkit K, Wanachiwanawin D, Tosasuk K, Pavitpok J, Vanprapar N, Chearskul S. Intestinal parasitic infections among human immunodeficiency virus-infected and uninfected children hospitalized with diarrhea in Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2001; 32(4): 770-5.
7. Kourtis AP. Cryptosporidiosis. E medicine. 2006. Available from: <http://www.emedicine.com/med/topic516.htm> Diakses tanggal 10 Juni 2007.
8. Jumlah pengidap HIV/AIDS di Indonesia sampai 30 Juni 2008. Diunduh dari: [http://www.aidsindonesia.or.id/index.php?option=com\\_content&task=category&sectionid=4&id=15&Itemid=124](http://www.aidsindonesia.or.id/index.php?option=com_content&task=category&sectionid=4&id=15&Itemid=124) Diakses tanggal 24 Juli 2008.
9. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2002; 15(1): 145-54.
10. Goodgame RW. Understanding intestinal spore-forming protozoa: Cryptosporidia, Microsporidia, Isospora, and Cyclospora. Annals of Internal Med [serial online]. 1996;124(4):429-41. Available from: <http://www.annals.org/cgi/content/full/124/4/429> Diakses tanggal 10 Juni 2007.
11. Kaur R, Rawat D, Kakkar M, Uppal B, Sharma VK. Intestinal parasites in children with diarrhea in Delhi, India. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2002; 33(4): 725-9.
12. Perch M, Sodemann M, Jakobsen MS, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Fischer TK, et al. Seven years experience with *Cryptosporidium parvum* in Guinea-Bissau, West Africa. Ann Trop Paediatr 2001; 21: 313-8.
13. Pereira MDGC, Atwill ER, Barbosa AP, Silva SAE, Zapata MTAG. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiania, Goias, Brazil. Am J Trop Med Hyg 2002; 66(6): 787-93.
14. Khan WA, Rogers KA, Karim MM, Ahmed S, Hibberd PL, Calderwood SB, et al. Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, case-control study of clinical features, epidemiology and systemic antibody responses. Am J Trop Med Hyg 2004; 71(4): 412-419.
15. Morse TD, Nichols RAB, Grimason AM, Campbell BM, Tembo KC, Smith HV. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. Epidemiol Infect 2007: 1-9.
16. Katsumata T, Hosea D, Wasito EB, Kohno S, Hara K, Soeparto P, et al. Cryptosporidiosis in Indonesia: a hospital-based study and a community-based survey. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 628-32.
17. Soetomenggolo HA. Cryptosporidiosis pada anak usia di bawah tiga tahun di daerah bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu [tesis]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2006.
18. McNabb SN, Hensel DM, Welch DF, Heijbel H, McKee GL, Istre GR. Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* sp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. J Clin Microbiol 1985; 22(4): 587-9.
19. Tzipori S. Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol Rev. 1983;47(1):84-96.
20. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J Clin Pathol 1985; 38: 1337-41.
21. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. J Clin Microbiol 1983; 18(1): 185-90.
22. Weber R, Byan RT and Juranek DD. Improved stool concentration

- procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1992; 30(11): 2869-73.
23. Casemore DP. ACP Broadsheet 128: Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol* 1991;44: 445-51.
  24. OIE (Office International des Epizooties). Cryptosporidiosis. In manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. 5<sup>th</sup> edition. Paris. 2004. Available from: <http://www.oie.int/eng/normes/en mmannual.htm> Diakses tanggal 3 Juni 2007.
  25. Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. 1995; 33(10): 2592-5.
  26. MacPherson DW, McQueen R. Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J Clin Microbiol* 1993; 31(2): 198-202.
  27. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RC. Comparison of PCR and microscopy for detection to *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol* 1998; 36(4): 995-8.
  28. Brook EJ, Christley RM, French NP, Hart CA. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. *Letters in Applied Microbiology* 2008; 46: 26-31.
  29. Tee GH, Moody AH, Cooke AH, Chiodini PL. Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J Clin Pathol* 1993; 46: 555-8.
  30. Henriksen SA, Pohlenz JFL. Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 1981; 22: 594-6.
  31. Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM, Gaines JK. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1989; 27(5): 1135-6.
  32. Arrowood MJ, Sterling CR. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1490-5.
  33. UK National Reference Method. *Cryptosporidium*: detection and identification in faeces. Standard Operating Procedure for the examination of faeces for *Cryptosporidium*. Issued by: Veterinary and public health test standardization group on behalf of SGDA. NRM002. 2006:1-12.
  34. Dwintasari SW. Pengembangan metode PCR untuk deteksi gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada feses yang disimpan dalam larutan kalium bikromat. [tesis]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2008.
  35. Martinez I, Belda Neto FM. Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2001.
  36. Smith HV. Diagnosis of human and livestock cryptosporidiosis (Chapter 6) dalam *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R, Xiao L editor. 2<sup>nd</sup> ed. London: CRC press; 2007. p.173-203.
  37. Stibbs HH, Ongerth JE. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *J Clin Microbiol* 1986; 24(4):517-21.