

**PENETAPAN SPESIES DAN VARIETAS *CRYPTOCOCCUS*
YANG DIISOLASI DARI PENDERITA AIDS DENGAN
KRIPTOKOKOSIS**

TESIS

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

**ZAIRA NAFTASSA
NPM: 6105012127**



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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Zaira Naftassa

NPM : 6105012127

Tanda Tangan : 

Tanggal : 20 Desember 2008



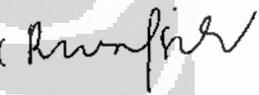
HALAMAN PENGESAHAN

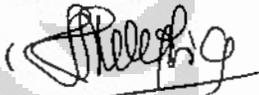
Tesis ini diajukan oleh

Nama : Zaira Naftassa
NPM : 6105012127
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi
Judul Tesis : Penetapan Spesies dan Varietas *Cryptococcus* yang Diisolasi dari Penderita AIDS dengan Kriptokokosis

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I: Prof. Dr. dr. Retno W, MS, SpParK ()

Pembimbing II: Dra. Mulyati, MS: ()

Penguji I : dr. Agnes Kurniawan, PhD, Sp ParK ()

Penguji II : dr. Budiman Bela, Sp MK ()

Penguji III : dr. Indra. G. Mansyur, Sp And ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 15 Desember 2008

Mengetahui
Ketua Program Studi Biomedik

(Dr. Rer. Physiol. dr. Septelia Inawati .W)

Kata Pengantar

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya, akhirnya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul "Penetapan Spesies dan Varietas *Cryptococcus* pada Penderita AIDS dengan Kriptokokosis" sebagai syarat menyelesaikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi.

Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada Dr. dr. Ratna Sitompul, SpM(K), sebagai Dekan FKUI, yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk menuntut ilmu di FKUI. Ucapan Terimakasih kepada Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati W sebagai Ketua Program studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah banyak memberikan pengarahan selama penulis menjalankan pendidikan di institusi ini. kepada Dra. Hendri Astuti, MS. Sebagai ketua kekhususan Parasitologi, penulis mengucapkan rasa terimakasih, atas segala saran, dan nasehat yang diberikan selama penulis menimba ilmu di bagian Parasitologi FKUI.

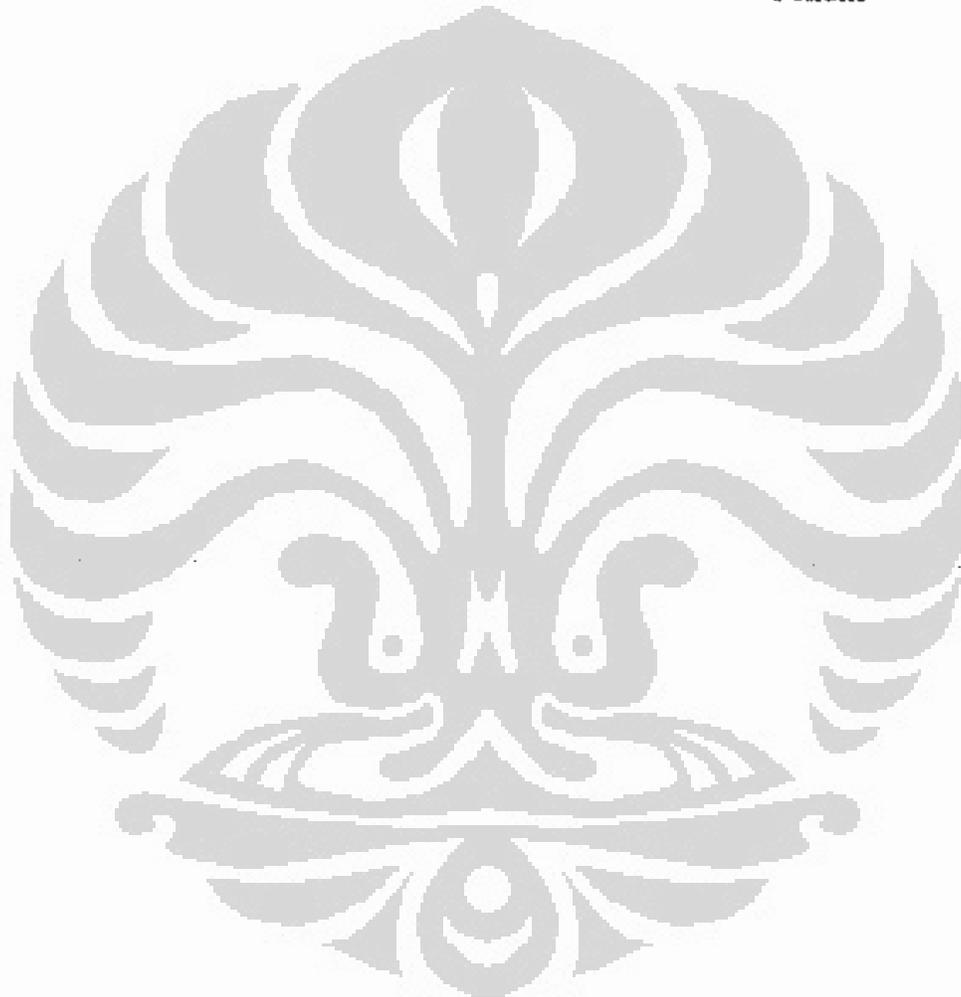
Penghargaan dan rasa terimakasih yang tak terhingga kepada Prof. Dr. Dr. Retno Wahyuningsih, MS, SpParK sebagai pembimbing I tesis dan Pembimbing Akademik yang bukan hanya telah memberikan nasehat dan motivasi, tetapi juga telah banyak mencurahkan waktu untuk membimbing penulis dengan sabar, selama penulis menuntut ilmu di Kekhususan Parasitologi FKUI, hingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Penghargaan dan ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada dra. Mulyati, MS sebagai pembimbing II tesis yang telah memberikan saran dan motivasi, juga kesabaran beliau bagi penulis dalam penyelesaian tesis ini. Penghargaan dan terimakasih penulis haturkan juga kepada Prof. dr. Saleha Sungkar, MS, DAP&E sebagai Kepala Departemen Parasitologi FKUI dan semua dosen-dosen serta staf Parasitologi FKUI.

Terimakasih juga penulis sampaikan kepada orangtua, keluarga, dan teman-teman Pasca Sarjana Biomedik atas segala motivasi dan perhatian yang diberikan.

Penulis sadar bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Tetapi penulis berharap, semoga tesis ini bermanfaat dan dapat pula memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan.

Jakarta, Agustus 2008

Penulis



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

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

Nama : Zaira Naftassa
NPM : 6105012127
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:

Penetapan Spesies dan Varietas *Cryptococcus* yang Diisolasi dari Penderita AIDS dengan Kriptokokosis

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan 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 : 20 Desember 2008

Yang Menyatakan



(Zaira Naftassa)

ABSTRAK

Nama : Zaira Naftassa
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi
Judul : Penetapan Spesies dan Varietas *Cryptococcus* pada Penderita AIDS dengan Kriptokokosis

Cryptococcus merupakan khamir bersimpai yang menyebabkan kriptokokosis dan pada era HIV/AIDS jumlah kasus meningkat tajam. Manifestasi klinik kriptokokosis berbeda sesuai dengan spesies dan serotipe, sehingga identifikasi menjadi sangat penting. Selain itu penetapan spesies penting untuk studi epidemiologis kriptokokosis. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk mengidentifikasi spesies dan serotipe serta virulensi jamur. Selain itu ingin diketahui penyebaran penyakit di Jabodetabek. Bahan yang diperiksa adalah 40 isolat koleksi Departemen Parasitologi FKUI dan 25 isolat dari cairan otak kulit dan darah. Metode pemeriksaan terdiri atas uji asimilasi (kit API 20C AUX), uji pembentukan *germ tube*, biakan pada medium CGB dan CDBT dan NSA. Penyebaran kasus kriptokokosis didapatkan berdasarkan domisili pasien. Hasil uji asimilasi didapatkan *Cr. neoformans* (64 isolat), *Cr. laurentii* var. *laurentii* (1 isolat). Hasil uji pembentukan *germ tube* didapatkan bahwa jamur yang diteliti bukan golongan *Candida*. Penetapan spesies dengan medium CGB didapatkan seluruh isolat adalah *Cr. neoformans*. Hasil penetapan serotipe dengan medium CDBT didapatkan seluruh isolat adalah *Cr. neoformans* serotipe A. Uji virulensi dengan medium NSA memperlihatkan pembentukan pigmen melanin pada semua isolat. Data demografis menunjukkan distribusi penderita kriptokokosis di lima wilayah DKI, Bogor dan Bandung.

Kata kunci: *Cryptococcus*, serotipe HIV/AIDS, melanin, distribusi pasien

ABSTRACT

Species and Serotype Identification of *Cryptococcus* isolated from AIDS Patients with Cryptococcosis

Cryptococcus is encapsulated yeast that caused Cryptococcosis in human. In the era of HIV/AIDS there is an increased number of cryptococcosis. Its clinical manifestation varied according to the species, so species identification is quite important. Furthermore species identification is also important in epidemiology study. This descriptive study aimed to identify species and serotype of *Cryptococcus* and also its virulence. The study also aimed to know the distribution of Cryptococcosis in Jabodetabek. There were 40 isolates from the collection of Department of Parasitology FKUI, and other 25 isolates were isolated from spinal fluid, blood and skin. The study was done using API 20C AUX, *germ tube* formation test, CGB for the differentiation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*, and, CDBT for serotyping and melanine production by plating the isolates on niger seed agar. The study on the distribution of the disease was based on patients residence. The results were, 64 isolates of *Cr. neoformans* and 1 *Cr. laurentii*. *Germ tube* formation test is negative. Identification of species with CGB agar showed all isolates were *Cr. neoformans*. Serotype identification with CDBT were all serotype A. All isolate were capable of forming melanin when growth on NSA. Demographic data of the patients shows a wide distribution including 5 areas of DKI, Bogor and Bandung.

Key words: *Cryptococcus*, serotype HIV/AIDS, melanine, patient distribution

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	5
1.4 Manfaat	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Kriptokokosis.....	7
2.2 Biologi <i>Cryptococcus</i>	7
2.3 Klinis Kriptokokosis.....	10
2.3.1 Kriptokokosis pada hospes imunokompeten.....	11
2.3.2 Kriptokokosis pada HIV/ AIDS.....	12
2.4 Respons Imun pada Kriptokokosis.....	13
3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Desain Penelitian	16
3.2 Populasi dan Sampel Penelitian	17
3.2.1. Populasi.....	
3.2.2. Sampel.....	
3.5 Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	17
3.6.1 Alat Penelitian	17
3.6.2 Bahan Penelitian	18
3.7 Cara Kerja.....	20
1. Pembuatan Medium SDA.....	20
2. Pembuatan Medium NSA.....	21
3. Pembuatan Agar CGB.....	22
4. Pembuatan Medium CDBT	23
3.8 Pemeriksaan Bahan Klinik.....	24

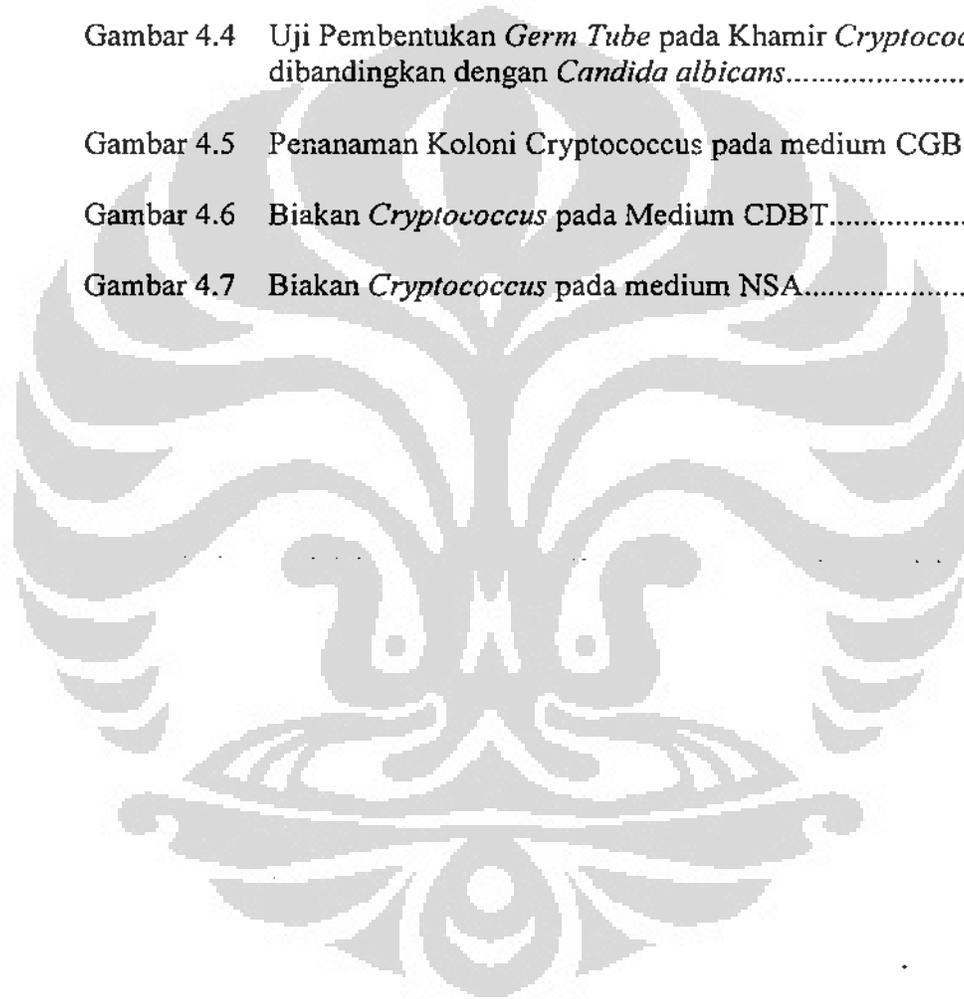
3.8.1 Membedakan Spesies <i>Cr. Neoformans</i> dari khamir dan Spesies <i>Cryptococcus</i> Lain dengan Uji Asimilasi (Kit API 20C AUX).....	25
3.8.2 Uji Fisiologik dengan <i>Germ Tube Formation Test</i> (GT test).....	27
3.8.3 Membedakan <i>Cr. neoformans</i> dan <i>Cr. gattii</i>	28
3.8.4 Membedakan <i>Cr. neoformans</i> varietas <i>neoformans</i> (serotipe D) dan <i>Cr. neoformans</i> varietas <i>grubii</i> (serotipe A).....	28
3.8.5 Pembentukan Pigmen Melanin Diamati dengan Menumbuhkan Jamur pada Medium NSA.....	28
3.9 Prosedur Pengumpulan Data Demografis dan Geografis Pasien...	29
Alur Penelitian.....	30
4. HASIL PENELITIAN	32
4.1 Data Demografis dan Geografis	32
4.2 Penelitian Mikologi.....	34
4.3 Penelitian virulensi.....	39
5. PEMBAHASAN	40
6. KESIMPULAN DAN SARAN	50
6.1 Kesimpulan	50
6.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Spesies <i>Cryptococcus</i> (selain <i>Cr. neoformans</i>) dan habitatnya.....	7-8
Tabel 3.2	Pola Asimilasi <i>Cryptococcus</i> sp pada API 20C AUX.....	27
Tabel 4.3	Bahan Klinik Asal Isolat <i>Cryptococcus</i>	32
Tabel 4.4	Data Demografis dan Geografis Pasien.....	33
Tabel 4.5	Hasil Pemeriksaan Isolat Klinik <i>Cryptococcus</i> yang Diisolasi dari 65 pasien AIDS.....	35
Tabel 4.6	Hasil Pola Asimilasi Karbohidrat Isolat <i>Cryptococcus</i> pada Kit API 20C AUX.....	37
Tabel 4.7	Pembentukan Melanin pada Medium <i>Niger Seed Agar</i>	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Khamir <i>Cryptococcus</i> dengan Pemeriksaan Tinta India.....	9
Gambar 3.2	Asimilasi Karbohidrat Khamir dengan Kit API 20C AUX.....	26
Gambar 4.	<i>Cryptococcus</i> pada pemeriksaan Tinta India.....	
3a	Koloni Khamir <i>Cryptococcus</i>	34
3b		35
Gambar 4.4	Uji Pembentukan <i>Germ Tube</i> pada Khamir <i>Cryptococcus</i> dibandingkan dengan <i>Candida albicans</i>	36
Gambar 4.5	Penanaman Koloni <i>Cryptococcus</i> pada medium CGB.	38
Gambar 4.6	Biakan <i>Cryptococcus</i> pada Medium CDBT.....	38
Gambar 4.7	Biakan <i>Cryptococcus</i> pada medium NSA.....	39



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada penderita gangguan sistem imun berat yang disebabkan oleh infeksi HIV, terjadi penurunan imunitas yang dapat diketahui dari turunnya jumlah sel CD₄⁺ dalam darah. Apabila hitung sel tersebut <200/ µl akan muncul berbagai infeksi oportunistik yang dapat disebabkan oleh protozoa, bakteri, virus ataupun jamur. Jamur yang dapat menyebabkan infeksi oportunistik antara lain *Cryptococcus neoformans*, dan infeksiya disebut dengan kriptokokosis. Kriptokokosis akan muncul apabila jumlah sel CD₄⁺ menurun hingga 100 sel/µl atau kurang.¹

Cryptococcus yang berada di alam (biasanya terdapat pada kotoran burung merpati dan pepohonan) memasuki tubuh inang melalui inhalasi sel ragi (basidiospora) terdehidrasi ke dalam paru. Dalam paru jamur akan menjalani proses rehidrasi dan selanjutnya tergantung pada kondisi pasien, dapat menjadi saprofit pada individu imunokompeten atau meluas pada individu imunokompromis seperti AIDS. Setelah beberapa waktu, jamur tersebut akan menyebar secara hematogen ke berbagai organ.

Cryptococcus penyebab kriptokokosis dibedakan menjadi dua spesies, yaitu *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii*. Kedua spesies itu memiliki wilayah distribusi yang berbeda. *Cr. neoformans* ditemukan di berbagai belahan dunia serta erat kaitannya dengan sumber di alam yaitu tanah atau lingkungan yang tercemar kotoran burung merpati.^{1,2} *Cr. gattii* diketahui memiliki distribusi di wilayah beriklim tropis dan subtropis seperti Australia dan Kanada bagian barat.^{1,3,5}

Terdapat dua varietas *Cr. neoformans* yaitu *Cr. neoformans* varietas *neoformans* (serotipe D) dan *Cr. neoformans* varietas *grubii* (serotipe A).⁴ *Cr. neoformans* varietas *grubii* lebih sering ditemukan pada pasien AIDS sedangkan *Cr. gattii* biasanya ditemukan pada pasien imunokompeten.^{1,6,7}

Selain itu *Cryptococcus* lain yang dapat ditemukan pada manusia adalah *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* dan *Cryptococcus uniguttulatus*. Ketiga spesies itu memang tidak menjadi penyebab utama kriptokokosis pada manusia, tetapi ditemukan pada kasus-kasus pasien AIDS meskipun jarang.^{8,9,10,11,12} *Cr. albidus* dan *Cr. laurentii* memiliki habitat yang kosmopolit, diantaranya pada tanaman, air, udara, mamalia, dan kadang pada orang sehat jamur-jamur tersebut ditemukan di permukaan kulit sebagai saprofit.¹

Prevalensi kriptokokosis meningeal pada penderita AIDS di India sebesar 2,09%,¹⁷ di Thailand 15%¹³ pada orang dewasa dan sebesar 2,97% pada anak-anak.¹⁴ Di Malawi 0,1%, Afrika 15%,¹⁵ Eropa Barat 2-10%¹⁶, Kamboja 18%,¹⁸ dan pada umumnya penderita laki-laki.^{17,15,16,18} Di Indonesia, khususnya Jakarta, data Departemen Parasitologi FKUI, pemeriksaan cairan otak 102 pasien AIDS yang menunjukkan gejala meningeal ternyata sebanyak 21,9% menderita kriptokokosis yang dibuktikan dengan pemeriksaan tinta India dan isolasi jamur.¹⁹

Manifestasi klinis pada kriptokokosis agak berbeda antara penderita imunokompeten dan imunokompromis (AIDS). Pada pasien AIDS manifestasi klinis yang paling sering didiagnosis adalah meningitis. Penyakit tersebut mempunyai angka kematian yang tinggi dan bila terlambat diobati selain berakibat fatal juga dapat mengakibatkan kecacatan meskipun pasien sembuh.^{1,20}

Manifestasi klinis lain yang ditemukan adalah kriptokokosis kulit dan kriptokokemia. Pada kulit kelainan yang timbul tidak khas, dapat menyerupai kelainan kulit biasa, misalnya akneform, menyerupai moluskum contagiosum, sampai kelainan kulit berat seperti selulitis atau abses.^{1,20}

Kriptokokosis pada penderita imunokompeten umumnya memiliki manifestasi klinis pulmoner meskipun kadang-kadang ditemukan kriptokokosis meningeal. Apabila terjadi kriptokokosis meningeal sering berhubungan dengan kelainan otak yang lain seperti hidrosefalus, atau kejang berulang.¹

Isolasi jamur yang dilakukan di departemen Parasitologi FKUI hingga saat ini belum mencapai identifikasi spesies, sehingga belum diketahui secara pasti spesies penyebabnya. Hal itu terjadi karena diperlukan diagnosis sesegera mungkin sebagai dasar pemberian terapi. Pemberian terapi dini akan mencegah kecacatan dan kematian. Untuk itu identifikasi sampai ke tingkat spesies dan serotipe sangat penting, mengingat patogenesis, manifestasi klinik, serta epidemiologi yang berbeda pada masing-masing spesies, sehingga hal itu akan sangat berperan dalam tatalaksana dan pencegahan penyakit.

Patogenitas *Cryptococcus* ditentukan oleh beberapa hal, antara lain kemampuan tumbuh pada suhu tinggi (37 - 40°C), kapsul polisakarida, dan produksi melanin.^{1,21} Faktor tersebut disebut juga dengan faktor virulensi jamur.

Kemampuan jamur untuk tumbuh dan beradaptasi pada suhu normal tubuh manusia menjadi salah satu alasan spesies tersebut mampu menimbulkan kriptokokosis. Faktor virulensi lain adalah kapsul polisakarida, glucuronoxylomannan (GXM). Jamur mutan yang tidak berkapsul bersifat kurang virulen terhadap binatang percobaan. Faktor virulensi ketiga adalah pigmen melanin berwarna coklat gelap, yang dihasilkan dari pemecahan kompleks difenolik. Melanin melindungi jamur terhadap pengaruh sinar matahari di alam dan pengaruh sistem kekebalan manusia. Pada medium *niger seed/ bird seed agar* (NSA) yang mengandung kompleks fenol atau L-Dopa dapat diamati pembentukan melanin setelah jamur ditanam selama 5-7 hari. *Cryptococcus* tumbuh sebagai koloni ragi berwarna coklat gelap.^{1,21}

Untuk membedakan spesies *Cryptococcus* dapat dilakukan berdasarkan asimilasi dan fermentasi karbohidrat dengan API 20C System Kit. Jamur yang diinokulasikan pada sistem tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar (30°C) selama 72 jam. Setelah inkubasi hasil positif akan terlihat sebagai kekeruhan pada sumur karbohidrat yang ditumbuhi jamur.^{22,23,26}

Untuk membedakan *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii* dapat dilakukan secara biokimia dengan memakai medium biakan solid *canavanine-glycine-bromthymol blue* (CGB). *Cr. gattii*, serotipe B dan C mampu mengolah *glycine*

sehingga terjadi perubahan warna, sedangkan *Cr. neoformans* tidak mengasimilasi *glycine*.³¹ Untuk membedakannya dari khamir lain terutama *Candida albicans* maka dilakukan uji pembentukan *germ tube*. Sel ragi/ khamir *Cryptococcus* tidak membentuk *germ tube* sebagaimana *C. albicans*.³²

Untuk membedakan *Cr. neoformans* serotipe A dan D jamur ditanam pada media agar *Creatinine dextrose bromthymol thymine* (CDBT). *Cr. neoformans* serotipe A tidak menyebabkan perubahan warna medium, sedangkan serotipe D menyebabkan medium berubah warna menjadi jingga terang dalam lima hari.^{4,33}

1.2 Rumusan Masalah

Di Jakarta, telah terjadi peningkatan tajam jumlah pasien terinfeksi HIV yang akhirnya mencapai taraf AIDS. Pada kondisi tersebut terjadi kerusakan sistem kekebalan yang mengundang infeksi oportunistik yang antara lain disebabkan oleh khamir *Cryptococcus*. Di Jakarta dan sekitarnya prevalensi kriptokokosis sebesar 21,9% pada pasien terinfeksi HIV dengan gejala SSP. Saat diagnosis ditegakkan identifikasi jamur hanya sampai ke tingkat genus. belum sampai ke tingkat spesies, apalagi serotipe. Identifikasi spesies dan serotipe sangat berpengaruh terhadap pemahaman tentang gejala klinis, epidemiologi, dan tatalaksana pasien. Untuk itu sangat diperlukan penetapan spesies dan serotipe. Penting pula untuk mengetahui ada tidaknya pembentukan melanin sebagai faktor virulensi sehingga salah satu sifat biologis yang penting dalam infeksi, dapat diketahui.

Cryptococcus merupakan jamur yang erat kaitannya dengan alam. Alam merupakan sumber infeksi *Cryptococcus*.^{1,27,34} Dengan mempelajari penyebaran geografis maka hal itu dapat dijadikan dasar untuk melakukan studi epidemiologi.

1.3 Pertanyaan Penelitian

1. Apakah spesies *Cryptococcus* penyebab kriptokokosis meningeal pada pasien AIDS di Jabodetabek?
2. Apakah serotipe *Cryptococcus* penyebab kriptokokosis meningeal pada pasien AIDS di Jabodetabek?
3. Apakah *Cryptococcus* galur jabodetabek memproduksi melanin sebagai faktor virulen?
4. Bagaimana penyebaran pasien AIDS dengan kriptokokosis di Jabodetabek?

1.3.1 Tujuan Umum:

1. Mengetahui spesies dan serotipe *Cryptococcus* penyebab meningitis dan kelainan kulit pada pasien AIDS.
2. Mengetahui penyebaran kriptokokosis meningeal di wilayah Jabodetabek.

1.3.2 Tujuan Khusus Penelitian

1. Membedakan spesies *Cryptococcus* dengan kit API 20C AUX.
2. Membedakan *Cryptococcus* dan *C. albicans* dengan uji pembentukan germ tube
3. Membedakan *Cr. gattii* dan *Cr. neoformans* dengan medium CGB
4. Membedakan *Cr. neoformans* varietas grubii (serotype A) dengan *Cr. neoformans* varietas neoformans (serotype D) dengan medium CDBT.
5. Mengetahui faktor virulensi *Cryptococcus* dengan uji pembentukan melanin (media NSA).
6. Mengetahui data demografis berupa alamat pasien untuk mengetahui penyebaran kriptokokosis di Jabodetabek

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat bagi peneliti

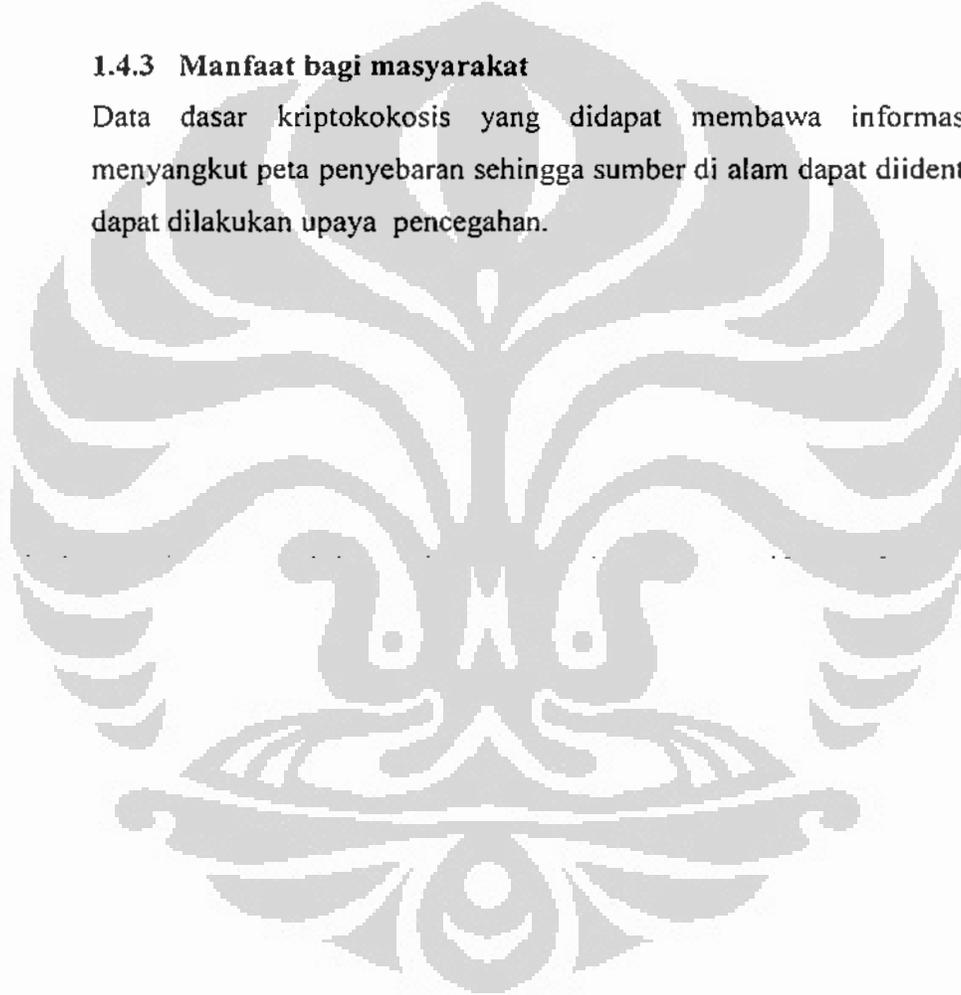
Melalui penelitian ini peneliti diharapkan mampu menerapkan ilmu pengetahuan yang diperoleh selama masa perkuliahan, juga sebagai sarana

1.4.2 Manfaat bagi institusi

Hasil yang didapatkan merupakan data dasar kriptokokosis pada penderita AIDS dengan gejala meningitis di Jakarta. Data tersebut akan bermanfaat dalam tatalaksana penyakit, epidemiologi, pencegahan dan pengambilan kebijakan terhadap infeksi pada pasien AIDS. Selain itu, data juga bermanfaat dalam penyusunan panduan diagnosis dan penatalaksanaan kriptokokosis. Isolat yang diteliti dapat menjadi bagian kekayaan hayati Indonesia.

1.4.3 Manfaat bagi masyarakat

Data dasar kriptokokosis yang didapat membawa informasi penting menyangkut peta penyebaran sehingga sumber di alam dapat diidentifikasi dan dapat dilakukan upaya pencegahan.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kriptokokosis

Kriptokokosis adalah infeksi yang disebabkan oleh khamir berkapsul *Cryptococcus*. Kriptokokosis ditemukan di seluruh dunia, dan pada awalnya hanya dikenal *Cryptococcus neoformans* sebagai spesies yang berperan dalam infeksi pada manusia.¹ Sejak dimulainya pandemi AIDS infeksi *Cryptococcus* di berbagai belahan dunia semakin meningkat, diiringi munculnya berbagai spesies *Cryptococcus* lain, seperti *Cr. gattii*, *Cr. laurentii* dan *Cr. albidus*.^{2,3,5,8,9,10,11} Pada penderita gangguan sistem imun berat yang disebabkan oleh infeksi HIV, terjadi penurunan imunitas yang dapat diketahui dari turunnya jumlah sel CD₄⁺ dalam darah (< 200 sel/μl). Kriptokokosis akan muncul apabila jumlah sel CD₄⁺ menurun hingga 100 sel/μl atau kurang.¹

2.2 Biologi *Cryptococcus*

Cryptococcus merupakan jamur khamir yang memiliki lebih dari 40 spesies, dan penyebarannya ditemukan di berbagai sumber (udara, air, tanah, buah, makanan, pohon, bahkan hewan dan mamalia).

Tabel 1. Spesies *Cryptococcus* (selain *Cr. neoformans*) dan Habitatnya

Species	Location
<i>Cryptococcus albidus</i>	Air, wine, soil, leaves, cheese, mammals
<i>Cryptococcus amyloletus</i>	frass of bark beetles
<i>Cryptococcus aquaticus</i>	Scum on water
<i>Cryptococcus asgardensis</i>	Soil in Antarctica
<i>Cryptococcus ater</i>	Human
<i>Cryptococcus baldrensis</i>	Soil in Antarctica
<i>Cryptococcus bhutanensis</i>	Soil in Himalayas
<i>Cryptococcus consortiumis</i>	Soil in Antarctica
<i>Cryptococcus curiosus</i>	Frozen <i>Sillago japonica</i> in Japan
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Mammals, sea
<i>Cryptococcus dimerrae</i>	Pasture

<i>Cryptococcus elinovii</i>	Soil
<i>Cryptococcus feraegula</i>	<i>Papio papio</i> , <i>Rhea americana</i>
<i>Cryptococcus flavus</i>	Air
<i>Cryptococcus friedmannii</i>	Rock fragment in Antarctica
<i>Cryptococcus fuscescens</i>	Soil in the former USSR
<i>Cryptococcus gastricus</i>	Soil, musk ox
<i>Cryptococcus hempflingii</i>	Soil in Antarctica
<i>Cryptococcus heveanensis</i>	rubber
<i>Cryptococcus himalayensis</i>	Soil in Himalayas
<i>Cryptococcus huempii</i>	Rotten <i>Laurelia sempervirens</i> in Chile
<i>Cryptococcus humicolus</i>	Soil, trees, toadstools, mushrooms, water, pulp
<i>Cryptococcus hungaricus</i>	Soil, water, cereals, flowers
<i>Cryptococcus kuetzingii</i>	Fruit of medlar, air, humans
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Wine, flowers, leaves, insect frass, water, fruit, beans mail, soil, air, shrimp, mammals
<i>Cryptococcus lupi</i>	Gravel in Antarctica
<i>Cryptococcus luteolus</i>	Air, leaves
<i>Cryptococcus macerans</i>	Flax, flowers, deer
<i>Cryptococcus magnus</i>	Air
<i>Cryptococcus marinus</i>	Sea
<i>Cryptococcus podzolieus</i>	Soil
<i>Cryptococcus skinneri</i>	Insect frass in <i>Tsuga heterophylla</i>
<i>Cryptococcus socialis</i>	Soil in Antarctica
<i>Cryptococcus terreus</i>	Soil
<i>Cryptococcus tsukubaensis</i>	Flowers
<i>Cryptococcus tyrolensis</i>	Soil in Antarctica
<i>Cryptococcus vishniacii</i>	Soil in Antarctica
<i>Cryptococcus wrightensis</i>	Soil in Antarctica

Dikutip dari: Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC: ASM Press;1998

Tetapi yang dapat menimbulkan infeksi / bersifat patogen pada manusia sampai saat ini adalah *Cr. neoformans*, terutama pada penderita HIV/ AIDS, dan *Cr. gattii*, yang lebih sering ditemukan pada hospes imunokompeten (non HIV/ AIDS). Jamur tersebut dapat menimbulkan infeksi oportunistik yang disebut dengan kriptokokosis.^{1,5,6,7}

Klasifikasi *Cr. neoformans* (taksonomi):¹

Kingdom : Fungi
 Phylum : Basidiomycota
 Subphylum : Basidiomycotina
 Class : Urediniomycetes
 Order : Sporidiales (Filobasidiales)
 Family : Sporidiobolaceae (Filobasidiaceae)
 Genus : Filobasidiella (*Cryptococcus*)

Gambar 1. Khamir *Cryptococcus* dengan Pemeriksaan Tinta India



Dikutip dari: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/>

Teleomorf:

- a. *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (serotipe A dan D)
- b. *Filobasidiella bacillispora* (serotipe B dan C)¹

Anamorf:

- a. *Cryptococcus neoformans* varietas *neoformans* (serotipe D) dan varietas *grubii* (serotipe A)
- b. *Cryptococcus gattii* (serotipe B dan C)¹

Kedua spesies tersebut memiliki distribusi wilayah yang berbeda. *Cr. neoformans* ditemukan diberbagai belahan dunia serta erat kaitannya dengan sumber di alam yaitu tanah atau lingkungan yang tercemar dengan kotoran burung merpati.^{1,28,31} Sedangkan

Cr. gattii diketahui memiliki distribusi di wilayah beriklim tropis dan subtropis seperti Australia dan Kanada bagian barat.^{1,2,3,5,27}

Pada awalnya, *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii* merupakan satu spesies yang terdiri atas dua varietas, yaitu *Cr. neoformans* var. *neoformans* dan *Cr. neoformans* var. *gattii*. Berdasarkan perbedaan fenotip, genetik, uji serologi, biokimia dengan uji pada medium agar CGB, kriteria epidemiologi, maupun perbedaan bentuk klinis yang ditimbulkan kemudian *Cr. neoformans* var. *gattii* menjadi *Cr. gattii*.^{3,5} Kini terdapat dua varietas *Cr. neoformans* yaitu *Cr. neoformans* varietas *neoformans* (serotipe D), dan *Cr. neoformans* varietas *grubii* (serotipe A), serta *Cr. gattii* (serotipe B dan C) sebagai spesies tersendiri.^{1,3,4} *Cr. neoformans* var. *grubii* atau serotipe A lebih sering ditemukan pada pasien terinfeksi HIV, sedangkan *Cr. gattii* biasanya ditemukan pada pasien imunokompeten.^{1,6,7}

Spesies lain yang ditemukan juga pada manusia adalah *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* dan *Cryptococcus uniguttulatus*. Ketiga spesies ini memang tidak menjadi penyebab utama kriptokokosis pada manusia, tetapi ditemukan pada kasus-kasus AIDS.^{8,9,10,11,12} *Cr. albidus* dan *Cr. laurentii* memiliki habitat yang kosmopolit, diantaranya pada tanaman, air, udara, mamalia, dan kadang pada orang sehat jamur-jamur tersebut ditemukan di permukaan kulit sebagai saprofit.¹

Pada pasien AIDS bentuk klinis kriptokokosis yang paling sering didiagnosis adalah meningitis kriptokokus yang disebabkan *Cr. neoformans* var. *grubii* (serotipe A).^{1,4} *Cr. gattii* mempunyai afinitas yang lebih besar terhadap parenkim otak¹ dan jarang dilaporkan menginfeksi penderita AIDS. Selain itu gejala klinis yang ditimbulkan oleh *Cr. gattii* lebih berat karena biasanya disertai perdarahan paru.^{1,6,7}

2.3 Klinis kriptokokosis

Gejala klinis kriptokokosis dimulai dari inhalasi sel khamir *Cryptococcus* haploid yang terdehidrasi (dari lingkungan), dengan diameter sangat kecil ($\leq 5 \mu\text{m}$) dan kapsul yang sangat tipis. Selanjutnya khamir yang tidak dikeluarkan oleh mekanisme imun non spesifik di saluran nafas, maka akan terus masuk ke alveoli. Di dalam paru, khamir akan mengalami rehidrasi (diameter membesar), dan terjadi penebalan kapsul. Dalam paru, jamur dapat hidup sebagai saprofit atau patogen, tergantung keadaan imunitas hospes.

Sebagai patogen jamur dapat berdiseminasi ke organ lain di luar paru seperti otak, kulit, jantung, hati, dan ginjal.^{1,20,24}

2.3.1 Kriptokokosis pada hospes imunokompeten

Kriptokokosis memiliki gambaran klinis yang bermacam-macam, dan berbeda antara penderita imunokompeten dengan imunokompromis (HIV/ AIDS). Pada hospes imunokompeten, bentuk klinis yang paling sering ditemukan adalah kriptokokosis pulmoner (nodul paru, infiltrat, kavitas).¹

Infeksi diawali dengan inhalasi spora atau sel khamir *Cryptococcus*. Dalam kondisi tertentu kriptokokosis dapat menyebar ke organ tubuh lain.

Pada kelompok pasien imunokompeten, kriptokokosis pulmoner dapat disertai dengan kelainan penyerta, misalnya keganasan, tuberkulosis, diabetes, proteinosis alveolar atau pemphigus vulgaris. Selain itu ditemukan pula kriptokokosis pada pasien-pasien dengan infeksi paru yang tidak memperlihatkan gejala, tetapi dengan radiografi terlihat gambaran abnormal paru, misalnya nodul soliter pada paru yang menyerupai tumor ganas.

Gejala paru lain adalah pneumonia, hingga dapat terjadi perumonitis tergantung besarnya inokulum jamur yang ada dalam paru. Gejala-gejala lain adalah batuk, nyeri dada, peningkatan produksi sputum, penurunan berat badan dan demam, serta hemoptisis. Ditemukan pula gejala sesak nafas dan keringat malam hari.¹

Gambaran klinis lain yaitu urtikaria pada kriptokokal pulmoner menyerupai alergi, dan mirip dengan tumor *Pancoast*, atau dapat menyebabkan bendungan vena cava superior. Kriptokokosis pulmoner seringkali ditemukan bersama-sama dengan penyakit paru penyerta seperti COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*), penyakit paru interstitial, dan keganasan pada paru, tetapi juga dapat menimbulkan gambaran histopatologi murni dari kelainan kriptokokosis tanpa penyerta lain dalam paru. Misalnya, kriptokokosis pulmoner dapat menyebabkan pneumonia kronik eosinofilik, dan bronkiolitis obliterans yang menyebabkan pneumonia, bahkan dapat menyerupai gambaran sarkoidosis.

Komplikasi yang dapat timbul yaitu kavitasi atau ruptur kriptokokoma pulmoner, atau menyerupai kelainan paru lain seperti toksisitas obat.¹

Meskipun gejala kriptokokosis pulmoner pada hospes imunokompeten dapat menghasilkan gambaran klinis yang menyerupai berbagai kelainan penyakit pada paru, tetapi pada dasarnya sifat kriptokokosis pulmoner pada kelompok pasien ini umumnya tidak menampakkan gejala, atau bersifat tenang dan baru tampak dengan radiografi. Gambaran klinis yang tenang ini juga menyerupai tuberkulosis tanpa gejala atau histoplasmosis. Disamping itu *Cr. neoformans* dalam jaringan paru biasanya tidak mengakibatkan banyak jaringan parut, atau menimbulkan enkapsulasi seperti pada tuberkulosis dan tidak membentuk kalsium pada fokus nekrotik paru seperti pada histoplasmosis.

Pada kriptokokosis pulmoner dapat terjadi efusi pleura, baik dengan atau tanpa kelainan penyerta, dan bisa terjadi pada penderita imunokompeten maupun imunokompromis (juga HIV/AIDS). Cairan eksudat mengandung antigen polisakarida.¹

2.3.2 Kriptokokosis pada HIV/ AIDS

Pada penderita kriptokokosis dengan AIDS, kriptokokosis pulmoner lebih jarang ditemukan dibandingkan kriptokokosis meningeal. Kriptokokosis pulmoner pada kelompok pasien ini akan mudah menyebar ke susunan saraf pusat dan menjadi kriptokokosis meningeal. Umumnya kriptokokosis pulmoner pada kelompok pasien ini disertai demam, batuk-batuk, sesak nafas, penurunan berat badan dan sakit kepala. Dapat ditemukan pula gejala nyeri dada pleuritik yang berat dan hemoptisis. Pada kasus pneumonia dapat timbul pneumothorak. Pada pemeriksaan fisik ditemukan limfadenopati, *chest rales*, takipnoe, splenomegali, dan kandidosis oral. Gambaran hipoksia sangat bervariasi, disertai sindroma pernafasan akut dari yang ringan sampai berat, dan hipoksia bersifat menetap akibatnya kesulitan dalam ventilasi mekanik.¹

Gambaran klinis kriptokokosis meningeal meskipun lebih dominan pada penderita HIV/ AIDS, tetapi gejala-gejala yang timbul dengan hospes imunokompeten umumnya serupa. Hal yang membedakan lagi adalah lamanya gejala meningeal pada penderita AIDS lebih pendek dibandingkan dengan gejala meningeal hospes imunokompeten. Pada

penderita non AIDS, gejala yang timbul sebelum diagnosis lamanya 2 – 4 minggu, tapi gejala neurologis meningitis kronik dapat muncul hingga 4- 6 minggu.

Gambaran klinis yang umum pada kriptokokosis meningeal ini adalah sakit kepala, demam, letargi, mual muntah, perubahan kepribadian, penurunan daya ingat, gangguan kesadaran stupor sampai koma. Umumnya lamanya gejala berlangsung selama 2 – 4 minggu. Gejala-gejala neurologi seperti kaku kuduk dan gangguan – gangguan pada nervus kranialis umumnya ditemukan pada penderita dengan HIV/ AIDS.

Selain itu pada penderita kriptokokosis meningeal dengan AIDS umumnya juga ditemukan kriptokokosis di berbagai organ tubuh lain seperti paru, kulit, prostat, darah, baik sebelum ataupun sesudah ditegakkannya diagnosis kriptokokosis susunan saraf pusat.

Manifestasi klinis pada kulit, yaitu kriptokokosis kulit memiliki bentuk kelainan yang tidak khas, dapat menyerupai kelainan kulit biasa, misalnya akneform, menyerupai moluskum kontagiosum. sampai kelainan kulit berat seperti selulitis atau abses. Kriptokokosis kulit juga dapat menyerupai penyakit kulit lain, seperti karsinoma sel basal, *pyoderma gangrenosum*, atau bahkan penyakit virus *Varicella*. Umumnya berbagai kelainan kulit disebabkan oleh *Cr. neoformans* meskipun *Cr. gattii* juga dapat menimbulkan kelainan kulit.¹

2.4 Respons Imun pada Kriptokokosis

Perjalanan kriptokokosis dalam tubuh manusia dipengaruhi oleh jumlah inokulum jamur yang terinhalasi, virulensi organisme, dan keadaan imunitas seluler tubuh. Apabila spora *Cryptococcus* terhirup, maka mekanisme pertahanan terhadap jamur tersebut pertama kali di paru adalah makrofag alveolar. Pada percobaan *in vitro* makrofag alveolar mampu berikatan dan memfagosit sel jamur *Cryptococcus*, dalam serum manusia yang mengandung opsonin, misalnya C3. Pada penderita AIDS, jumlah opsonin sangat rendah atau hampir tidak ada, baik yang bersifat *oxidative dependent* maupun *oxidative independent killing*. Selain itu, dengan adanya protein *envelope gp 120* akan menghambat pemusnahan makrofag biasa terhadap *Cryptococcus*. Apabila mekanisme pertahanan imunitas pertama di alveolar gagal, *Cryptococcus* akan mudah masuk ke peredaran darah, selanjutnya akan menyebar ke berbagai organ, seperti otak. dan lain-

lain, maka mekanisme pertahanan lanjut diperlukan. Pada model percobaan, sel-sel antara lain neutrofil, sel *natural killer* (NK), sel mikroglial yang menyerupai makrofag, dan sel T limfosit mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan *Cryptococcus*. Sitokin, khususnya interleukin-2 dan γ -interferon yang dilepaskan oleh sel fagositik dan limfosit, berperan memicu pemusnahan jamur *Cryptococcus*.²⁴

Sel T helper (CD_4^+ limfosit) menstimulasi makrofag dalam hal aktivitas mikrobisidal, dan pada stadium akhir infeksi HIV terjadinya deplesi CD_4^+ menurunkan aktivitas makrofag. Infeksi oleh virus HIV strain tropik makrofag juga dapat menyebabkan defek fungsi dan kerja makrofag.

Pada model percobaan dengan kera Rhesus, infeksi *Cryptococcus* secara *in vivo* dan *in vitro* pada kera yang terinfeksi *simian immunodeficiency virus* memang tidak menunjukkan penurunan aktivitas makrofag atau stimulasi sel T yang menyebabkan CD_4^+ limfopenia, tetapi makrofag alveolar pada kera dengan gejala AIDS mengalami penurunan fungsi kerja fungisidal. Penelitian ini memperlihatkan adanya defek makrofag pada AIDS merupakan konsekuensi deplesi sel CD_4^+ .¹

2.5 *Diagnosis dan pemeriksaan mikologi kriptokokosis*

Penegakan diagnosis kriptokokosis lebih dititikberatkan pada diagnostik laboratorium, berdasarkan gejala/ bentuk klinis yang muncul dan keadaan penyakit/ kelainan penyerta pasien yang berhubungan dengan infeksi ini, selain HIV/ AIDS, seperti yang telah disebutkan diatas. Salah satu metode diagnostik yang cukup mudah untuk kriptokokosis adalah pemeriksaan sampel pasien dengan tinta india (*india ink preparation*), terutama untuk meningitis kriptokokus. Pemeriksaan dengan tinta india terbukti positif pada lebih dari 80 % pasien AIDS dengan kriptokokus meningitis, dan positif pada 30 – 50 % pasien non AIDS dengan kriptokokus meningitis.¹

Sel khamir dapat ditemukan di berbagai lokasi jaringan dan organ dengan metode sediaan dari yang non spesifik sampai pada metode sediaan spesifik untuk jamur. Kecuali dengan pewarnaan Gram, kapsul *Cryptococcus* tidak terlihat dengan jelas. Tetapi ada teknik pewarnaan khususnya untuk melihat kapsul *Cryptococcus*, misalnya *mucicarmine*, *periodic-acid schiff*, dan sediaan *alcian blue*.¹

Pemeriksaan dengan tinta India memberikan hasil yang jelas mengenai struktur khamir *Cryptococcus*, apabila bahan klinik yang diperiksa berasal dari cairan otak. Akan tetapi terdapat pemeriksaan lanjutan untuk jenis bahan klinik selain cairan otak, misalnya spesimen kulit dan darah. Untuk semua bahan klinik kecuali darah, umumnya dilakukan pemeriksaan langsung dengan KOH 10% dilanjutkan dengan menanam bahan klinik pada medium agar Sabouraud dan agar *Niger seed* (NSA).³¹ Pemeriksaan dengan medium agar Sabouraud dapat mengetahui morfologi khamir *Cryptococcus* yang tumbuh, dan untuk melengkapinya dilakukan uji pembentukan *germ tube*. Uji ini dimaksudkan untuk melihat perbedaan khamir *Cryptococcus* dan khamir *Candida albicans*. Dibawah pemeriksaan mikroskop dengan pembesaran 400X khamir *C. albicans* akan memperlihatkan tunas berkecambah.

Penanaman bahan klinik pada medium NSA bertujuan untuk mengamati pembentukan melanin pada *Cryptococcus*. Melanin diketahui berfungsi sebagai faktor virulensi jamur yang menentukan patogenitasnya pada hospes.^{1,21} Koloni *Cryptococcus* yang tumbuh berupa koloni khamir berwarna coklat tengguli dengan permukaan halus.

Pemeriksaan mikologi lain yang dapat menunjang diagnosis adalah suatu pemeriksaan dengan menanam bahan klinik pada medium agar *canavanine glycine bromthymol blue* (CGB), yang bertujuan untuk membedakan spesies *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii*.³² Selanjutnya adalah pemeriksaan dengan medium *creatinine dextrose bromthymol thymine* (CDBT), yang bertujuan membedakan *Cr. neoformans* varietas *neoformans* (*Cr. neoformans* serotipe D) dan *Cr. neoformans* varietas *grubii* (*Cr. neoformans* serotipe A).^{4,33} Kemudian suatu pemeriksaan yang menghasilkan jawaban sampai ke tingkat spesies dari suatu galur atau spesimen yang akan diperiksa adalah kit API 20C AUX (Biomerieux, Prancis). Pemeriksaan dengan kit tersebut bertujuan untuk membedakan spesies *Cryptococcus* dan khamir lain berdasarkan pola asimilasi karbohidrat jamur tersebut.²⁶

Ketiga pemeriksaan diatas diharapkan akan memberikan manfaat lebih jauh dalam hal penegakkan diagnosa di bidang mikologi, khususnya *Cryptococcus*, sebagai penyebab kriptokokosis. Sehingga pengambilan kebijakan pengobatan pada pasien kriptokokosis dapat dilakukan dengan tepat.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 *Desain penelitian*

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Ada tiga aspek yang dipelajari, yaitu penelitian untuk menetapkan spesies dan serotipe, faktor virulensi, dan penelitian tentang data geografis dan demografis penderita.

Penelitian bagian pertama merupakan penelitian mikologi yang terdiri atas 1) Penelitian tentang uji asimilasi menggunakan kit API 20C AUX (Biomerieux – Prancis) untuk membedakan *Cryptococcus* dengan khamir lain dan *Cryptococcus* spesies lain. 2) Penelitian untuk membedakan khamir *Cryptococcus* dengan *Candida albicans* dengan melakukan uji pembentukan *germ tube* (*germ tube formation test*, GT) 3) Penelitian untuk membedakan *Cryptococcus neoformans* dan *Cr. gattii* dengan menumbuhkan jamur yang diteliti pada media *Canavanine Glycine Bromthymol blue* (CGB) 4) Penelitian untuk menetapkan serotipe *Cryptococcus* yaitu membedakan *Cr. neoformans varietas neoformans* (serotipe D) dan *Cr. neoformans varietas grubii* (serotipe A) dengan menumbuhkan jamur pada medium agar *creatinine dextrose bromthymol thymine* (CDBT). Penelitian bagian kedua merupakan penelitian tentang virulensi jamur yaitu mempelajari pembentukan pigmen melanin dengan menumbuhkan jamur pada medium kultur *niger seed agar* (NSA).

Pada penelitian bagian ke tiga akan dicatat informasi demografis dan geografis pasien untuk pemetaan wilayah penyebaran kriptokokosis.

3.2. *Lokasi penelitian*

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikologi Departemen Parasitologi FKUI.

3. 3 Populasi dan sampel penelitian

3.3.1. Populasi:

Populasi yang diteliti adalah pasien AIDS dengan gangguan SSP, sepsis atau dengan kelainan kulit karena *Cryptococcus*.

3.3.2 Sampel:

Sampel yang diteliti adalah :

Isolat yang berasal dari cairan otak, bahan kulit dan darah penderita AIDS dengan kriptokokosis yang dikirim dari RS Cipto Mangunkusumo, RS Kanker Dharmais Jakarta, dan RS Hasan Sadikin Bandung untuk keperluan diagnosis.

3. 4 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan sejak bulan Agustus 2007 – Juli 2008

3.5 Jumlah Sampel

Sampel yang diteliti adalah sebanyak 65 isolat, dikumpulkan selama 1 tahun (Agustus 2007 – Juli 2008)

3. 6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat-alat

Peralatan yang digunakan pada identifikasi *Cryptococcus* adalah sebagai berikut:

1. Gelas objek
2. Gelas tutup
3. Tabung kultur (steril)
4. Sengkelit (ujung bulat dan lurus)
5. Bunsen
6. Pipet
7. Inkubator
8. Kotak plastik (tempat penyimpanan kultur jamur)
9. Lemari pendingin

10. Cawan petri (steril)
12. Tabung millipore (steril)
13. Filter millipore ukuran 0,22 μm (steril)
14. *Suction* (pompa penghisap)
15. Pipa karet penghisap
16. Gelas beaker
17. Labu erlenmeyer
18. Pipet
19. Autoklaf
20. API web-API 20 C AUX software (Biomérieux-France).
21. Kamera digital

3.6.2 Bahan

3.6.2.a. Bahan Klinik

A. Isolat koleksi yang sudah disimpan terlebih dahulu di Departemen Parasitologi (40 isolat). Sisanya sebanyak 25 isolat diisolasi dari bahan klinik yang baru.

B. Bahan klinik yang digunakan adalah cairan otak, kulit dan darah penderita AIDS dengan dugaan kriptokokosis yang dikirim ke Departemen Parasitologi FKUI.

3.6.2.b. Bahan Habis Pakai

Bahan-bahan yang digunakan pada identifikasi *Cryptococcus* adalah sebagai berikut:

- a. 1. Tissue
2. API 20C AUX (sistem identifikasi spesies Biomérieux - France)
 - Medium API 20C AUX 7 ml/ ampul
 - Nampan berisi sumur karbohidrat API 20C AUX
 - Wadah nampan tertutup

3. Media CGB (untuk 250 ml agar)

Larutan A terdiri atas:

- | | | |
|-----------------------------|---------|--|
| a. Glisin | 2,5 g | (Kat no.1.04201.0100, Merck, Jerman) |
| b. KH_2PO_4 | 0,25 g | (Kat no.1.04873.0250, Merck, Jerman) |
| c. MgSO_4 | 0,25 g | (Kat no.1.05886.0500, Merck, Jerman) |
| d. Thiamin HCl | 0,25 mg | (Kat no.1.08181.0025, Merck, Jerman) |
| e. L-Canavanine Sulfat | 7,5 mg | (Kat no.116K7034, Sigma-Aldrich, Jerman) |
| f. Akuades | 25 ml | |

Larutan B terdiri dari:

- | | | |
|-------------------|-------|--------------------------------------|
| a. Bromtimol biru | 0,1 g | (Kat no.1.03026.0005, Merck, Jerman) |
| b. NaOH 0.01 N | 16 ml | |
| c. Akuades | 9 ml | |

Media agar dan campuran akhir terdiri dari:

- | | |
|---------------|--------|
| a. Akuades | 220 ml |
| b. Larutan B | 5 ml |
| c. Larutan A | 25 ml |
| d. Agar Bacto | 5 g |

4. Media *creatinine dextrose bromthymol thymine* (CDBT).

Bahan-bahan:

Larutan A (untuk 1 liter larutan agar):

- | | | |
|--|--------|--|
| a. Kreatinin | 1 g | |
| b. KH_2PO_4 | 1 g | (Kat no.1.04873.0250, Merck, Jerman) |
| c. <i>Thymine</i> | 0,1 g | (Kat no.057KI064, Sigma-Aldrich, Jerman) |
| d. Dekstrosa | 0,5 g | |
| e. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g | (Kat no.1.05886.0500, Merck, Jerman) |
| f. Akuadestillata | 980 ml | |

Larutan B (larutan *Bromthymol blue*):

- | | | |
|-------------------|-------|--------------------------------------|
| a. Bromtimol biru | 0,4 g | (Kat no.1.03026.0005, Merck, Jerman) |
| b. NaOH 0.01 N | 64 ml | |

c. Akuadestilata 36 ml

Untuk membuat media sebanyak 1 liter maka larutan A dan B dicampur dengan komposisi berikut dan disertai penambahan agar:

a. Larutan A 980 ml

b. Larutan B 20 ml

c. Agar Bacto (BD 214010) 20 g

5. Tinta India (tinta cina)

6. Media ASD (untuk 500 mL agar) dengan kloramfenikol

a. Agar Sabouraud 20 g (Kat. No. 210950, Difco, USA)

b. Kloramfenikol 250 mg

c. Akuades 500 ml

7. Media NSA (untuk 500 mL agar)

a. *Guizotia abyssinica* 35 g

b. Glukosa 0,5 g

c. KH_2PO_4 0,5 g (Kat no.1.04873.0250, Merck, Jerman)

d. Kreatinin 0,35 g (Merck, Jerman)

e. Agar Bacto 10 g

f. Akuades 500 ml

g. Kloramfenikol 0,025 g

8. Uji fisiologis dengan melihat pembentukan *germ tube* (GT):

Putih telur 2 ml/tabung ukuran 5 ml.

3.7. Cara Kerja

1. Pembuatan medium *Sabouraud dextrose agar* (SDA)

a. Agar Sabouraud ditimbang sebanyak 32,5 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 1000 ml dan ditambahkan 500 ml akuadestilata.

- b. Larutan medium dipanaskan hingga homogen, selanjutnya dimasukkan kloramfenikol (kapsul) 250 mg
- c. Selanjutnya medium dituang kedalam tabung-tabung biakan sebanyak 10 ml dan ditutup kapas penutup. Kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 20 menit.
- e. Setelah selesai disterilisasi, tabung biakan yang berisi medium agar steril diletakkan miring dengan posisi bagian mulut tabung lebih tinggi, dan dibiarkan pada suhu kamar sampai dingin dan mengeras.
- f. Medium dalam tabung yang telah dingin siap digunakan

2. Pembuatan medium *Niger seed agar* (NSA) untuk 500 ml agar

- a. Ditimbang *Guizotia abyssinica* (*bird seed* = makanan burung) sebanyak 35 gram
- b. *Bird seed* digiling menggunakan blender kering, dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer ukuran 1000 mL.
- c. Selanjutnya ditambahkan akuadestilata sebanyak 500 ml, dan direbus hingga mendidih selama 30 menit (rebusan diperhatikan jangan sampai meluap)
- b. Setelah mendidih, rebusan *bird seed* disaring dengan kertas saring Whatman no. 1 dan langsung dimasukkan dalam labu erlenmeyer ukuran 1000 mL, volume cairan disesuaikan sampai mencapai 500 ml dengan menambahkan akuadestilata.
- c. Glukosa (0,5 g), KH_2PO_4 (0,5 g), kreatinin (0,35 g), agar Bacto (10 g), dan kloramfenikol (0,025 g) yang telah ditimbang dimasukkan kedalam labu erlenmeyer tersebut.
- d. Jumlah cairan dalam labu disesuaikan sampai dengan 500 mL
- e. Cairan medium dihomogenisasi dengan merebus hingga mendidih.
- f. Kemudian cairan disterilisasi dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 20 menit.
- g. Disiapkan cawan-cawan petri steril

h. Setelah medium selesai disterilisasi, langsung dituangkan perlahan-lahan ke dalam cawan petri steril tersebut secara aseptik.

i. Medium yang telah dituangkan ke dalam cawan petri dibiarkan pada suhu ruangan hingga dingin dan mengeras, dan kemudian siap untuk digunakan

3. Pembuatan agar *Canavanine Glycine-Bromthymol blue* / CGB (250 ml)

3.1 Persiapan pembuatan medium CGB:

a. Untuk membuat larutan A, ditimbang *Glycine*, KH_2PO_4 , MgSO_4 , Thiamin HCl, dan L-Canavanin sulfat sesuai resep. Semua bahan tersebut dimasukkan dalam labu erlenmeyer ukuran 50 ml dan ditambahkan akuadestilata sebanyak 25 ml. Selanjutnya dilakukan penyesuaian pH hingga 5,6 (dengan HCl 1 N)

b. Larutan tersebut disterilisasi dengan penyaringan, dengan langkah sebagai berikut:

- Disiapkan alat sterilisasi untuk larutan A yang terdiri atas pompa penghisap listrik dan pipa penghisap yang dibersihkan dengan kapas alkohol sebelum digunakan.

- Labu penampung cairan filtrat (labu berlubang pada leher dilengkapi dengan tutup dan sumbat karet, dan kertas saring (Sartorius 0,22 μm) semua alat sudah dalam keadaan aseptik/ steril dan terpasang baik.

- Pipa karet dihubungkan dengan pompa penghisap, dan ujung yang lain setelah dibersihkan dengan kapas alkohol dihubungkan dengan lubang kecil pada leher labu penampung.

- Sesudah semua alat terpasang, pompa penghisap dinyalakan, kemudian dengan hati-hati penutup labu dibuka (seluruh proses secara aseptik) dan larutan A dituangkan sedikit-sedikit ke dalam labu penampung. Larutan akan tersaring melalui kertas saring yang telah dipasang

- Setelah selesai proses filtrasi, diperoleh larutan A steril, yang dapat disimpan dalam pendingin (suhu $\pm 4^\circ\text{C}$) sampai digunakan.

c. Pembuatan larutan B, dilakukan dengan lebih dulu menimbang Bromtimol biru yang dicampur dengan larutan NaOH 0,01 N (16 ml). Kedua bahan

tersebut dicampurkan dalam labu erlenmeyer ukuran 50 ml dan ditambahkan akuadestilata sebanyak 9 ml.

d. Pembuatan medium agar dimulai dengan menimbang agar Bacto (BD 214010) sebanyak 5 g. Kemudian agar tersebut ditambah larutan B sebanyak 5 ml, selanjutnya dilakukan pemanasan diatas stirer sampai homogen selama 15 menit. Setelah homogen, warna medium menjadi hijau kekuningan. Campuran agar dan larutan B disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121°C, selama 20 menit.

e. Sesudah sterilisasi selesai campuran larutan B dan agar Bacto didinginkan hingga mencapai suhu 48 – 50°C

f. Larutan A dikeluarkan dari lemari es dan dihangatkan pada suhu kamar. Sebanyak 25 ml larutan A dituangkan kedalam labu berisi campuran agar Bacto dan larutan B. Suhu dijaga tetap 48°C dengan meletakkannya dalam penangas air (48 - 50°C).

g. Disiapkan cawan petri steril sebagai wadah medium

h. Medium segera dituangkan dalam cawan petri steril (secara aseptik dengan memanaskan mulut labu pada saat menuangkan medium cair ke cawan petri). Proses penuangan dilakukan sesegera mungkin untuk menghindari kontaminasi.

i. Medium dibiarkan pada suhu kamar sampai mengeras, kemudian langsung disimpan dalam lemari pendingin (suhu $\pm 4 - 8^{\circ}\text{C}$) hingga saatnya digunakan.

j. Apabila akan digunakan, medium CGB lebih dulu dikeluarkan dari lemari pendingin dan disesuaikan dengan suhu kamar.

4. Pembuatan medium *creatinine dextrose bromthymol thymine* (CDBT):

a. Bahan-bahan larutan A lebih dulu ditimbang dan ditampung dalam labu erlenmeyer. Kemudian ditambahkan akuadestilata sebanyak 980 ml Dilakukan penyesuaian pH hingga 5,6 dengan HCl 1 N.

b. Selanjutnya larutan A disimpan dalam lemari pendingin (suhu $\pm 4 - 8^{\circ}\text{C}$)

- c. Untuk membuat larutan B, Bromtimol biru ditimbang dalam 64 ml NaOH 0,01 N, Kemudian ditambahkan 36 ml akuadestilata.
- d. Tahap terakhir adalah pembuatan medium dengan mencampurkan larutan A sebanyak 980 ml dan larutan B sebanyak 20 ml dalam labu erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan 20 g agar Bacto.
- e. Labu berisi larutan medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- f. Sesudah sterilisasi, medium didinginkan hingga mencapai suhu 48°C - 50°C.
- g. Disiapkan cawan petri steril sebagai wadah medium.
- h. Kemudian medium dituang kedalam cawan petri steril secara aseptik dengan memanaskan mulut tabung setiap kali akan menuang larutan agar. Proses ini dilakukan sesegera mungkin untuk menghindari kontaminasi.
- i. Agar dibiarkan mengeras pada suhu kamar, selanjutnya siap untuk digunakan.

3.8 Pemeriksaan bahan klinik

Untuk menemukan dan mengisolasi *Cryptococcus* dari cairan otak dilakukan pemeriksaan sebagai berikut :

1. Pemeriksaan langsung dengan tinta India:

Cairan otak diputar pada kecepatan 5000 rpm selama 5 – 10 menit, sehingga diperoleh endapan. Kemudian endapan diambil dengan sengkeli bulat steril, lalu dicampurkan dengan satu tetes tinta India (tinta Cina) diatas kaca objek, dan ditutup dengan kaca penutup. Selanjutnya sediaan dibaca dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x diteruskan dengan pembesaran 400x. Sediaan dinyatakan (+) *Cryptococcus* apabila ditemukan sel ragi berkapsul. Bila ditemukan jamur selanjutnya bahan klinik dibiak pada agar SDA.

2. Penanaman pada medium SDA:

Endapan diambil dengan sengkeli bulat steril. Selanjutnya sengkeli digoreskan pada seluruh permukaan medium SDA dan biakan diamati setiap hari. Biakan dinyatakan positif apabila tampak pertumbuhan koloni ragi dalam

waktu 3-10 hari. Bila dalam 10 hari tidak ada pertumbuhan biakan dianggap negatif.

Untuk menetapkan apakah koloni yang tumbuh memang *Cryptococcus*, dilakukan pemeriksaan mikroskopis dengan tinta India dengan cara sama seperti di atas.

3. Isolasi *Cryptococcus* dari bahan klinik lain (kulit, darah).

Bahan klinik langsung ditanam pada agar SDA. Untuk memastikan koloni yang tumbuh, diletakkan pada kaca objek, lalu ditetaskan satu tetes tinta Cina (India), dan dicampurkan dengan bantuan sengkeli bulat diatas gelas objek. Sediaan ditutup dengan kaca penutup. Selanjutnya dilakukan pembacaan dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x dan 400x. Biakan dinyatakan (+) *Cryptococcus* apabila ditemukan sel ragi berkapsul.

4. Isolat koleksi Departemen Parasitologi FKUI :

Dilakukan kultur ulang pada medium SDA dengan mengambil sedikit koloni *Cryptococcus* dari tabung biakan yang lama dan ditanam pada medium SDA yang baru.

3.8.1 Membedakan spesies *Cryptococcus neoformans* dari khamir dan spesies *Cryptococcus* lain dengan uji asimilasi (kit API 20C AUX-Biomerieux-Prancis).

Koloni *Cryptococcus* yang dipakai harus berumur 18 – 24 jam, sehingga harus dilakukan pembiakan ulang pada medium SDA. Selanjutnya dilakukan uji asimilasi karbohidrat seperti berikut ini:

- a. Disiapkan 2 ml larutan NaCl sebagai media tanam.
- b. Disuspensikan sedikit biakan *Cryptococcus* pada larutan NaCl tersebut sambil dihomogenisasi dengan bantuan sengkeli bulat steril. Kekeruhan suspensi dibandingkan dengan larutan McFarland 2 (standar).
- c. Disiapkan nampan API 20C AUX, yang terdiri atas 20 sumur berisi karbohidrat yang berbeda-beda, dan tutup nampan yang tersedia. Sumur

karbohidrat yang paling kiri merupakan kontrol negatif (tidak berisi karbohidrat). Di dasar sumur tampak garis merah untuk memudahkan pembacaan. Hasil pembacaan dicatat dan disesuaikan dengan pola yang terdapat dalam program API web software. Pembacaan dilakukan dengan mata telanjang, dengan bantuan garis merah di dasar tabung dan dibandingkan dengan kontrol negatif/ jernih (Gambar 2). Sesuai dengan spesies yang tumbuh akan didapat pola asimilasi yang berbeda. Hasil pembacaan disesuaikan dengan pola standar, sehingga spesies yang tepat dapat diketahui.

Gambar 2. Asimilasi Karbohidrat dengan API 20C AUX

0 Glu Gly	2KG ARA XYL	ADO XLT GAL	INO SOR MDG	NAG CEL LAC	MAL SAC TRE	MLZ RAF

Ket. Gambar 2: komposisi karbohidrat dalam kit API 20C AUX untuk identifikasi spesies, mulai dari ujung kiri adalah kontrol negatif (0). Sumur terletak dibawah masing-masing kolom nama/ singkatan karbohidrat, yang akan diisi suspensi jamur. Terdapat garis/ strip merah untuk memudahkan pembacaan. Kekeruhan dibaca positif, jernih dibaca negatif.

d. Suspensi jamur dalam NaCl diambil sebanyak 100 μ l dengan pipet steril, dimasukkan dalam ampul API 20C AUX. Homogenisasi dilakukan dengan pipet dan tidak boleh terbentuk gelembung udara.

e. Selanjutnya inokulum dalam ampul medium API 20C AUX diteteskan dengan bantuan pipet steril ke dalam masing-masing sumur yang tersedia, dimulai dari tabung kontrol negatif di ujung kiri. Permukaan sumur setelah diisi harus cembung atau datar.

f. Nampan ditutup dengan penutup yang tersedia. Selanjutnya masing- masing nampan diberi label pada bagian tepi nampan dan diinkubasi pada suhu kamar (27 - 31°C).

Pengamatan dilakukan pada 48 jam dan 72 jam untuk melihat kekeruhan pada tabung. Pertumbuhan dicatat dan disesuaikan dengan pola yang terdapat dalam program API web software. Hasil positif bila tampak kekeruhan pada sumur yang telah diinokulasi jamur.

Tabel 2. Pola Asimilasi *Cryptococcus* sp dengan API 20C AUX

Jenis karbohidrat	Spesies <i>Cryptococcus</i>				
	<i>Cr. n</i>	<i>Cr. l</i>	<i>Cr. alb</i>	<i>Cr. ter</i>	<i>Cr. un</i>
D-Glucosa	+	+	+	+	+
Glycerol	-	+/-	-	-	+/-
Calcium 2-keto-gluconat	+	+	+	+	+
L-arabinosa	+/-	+	+	+	+
D-xylosa	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	-	-	+/-
Xylitol	-	+	-	-	-
D-galactosa	+	+	+/-	+	-
Inositol	+	+	+	+	+
D-sorbitol	+	+	+	+	+
Methyl- α D-glucopiranosid	+	+	+	+	+
N-asetyl glucosamin	+	+	-	+	+
D-cellobiose	+/-	+	+	+	-
D-lactosa	-	+	+/-	+	-
D-maltosa	+	+	+	-	+
D-sacharosa	+	+	+	-	+
D-trehalosa	+	+	+	+	+
D-melezitosa	+	+	+	-	+
D-raffinosa	+	+	+	-	+/-

Ket. Tabel. 2: Pola asimilasi karbohidrat *Cryptococcus* sp. Nilai positif menunjukkan adanya kekeruhan pada sumur, nilai (+/-) menunjukkan bahwa kekeruhan sangat lemah hingga hampir negatif (jernih), sedangkan nilai negatif menunjukkan tidak ada kekeruhan pada sumur (jernih). *Cr. n* = *Cr. neoformans*, *Cr. l* = *Cr. laurentii*, *Cr. alb* = *Cr. albidus*, *Cr. ter* = *Cr. terreus*, *Cr. un* = *Cr. unigutulatus*. (Sumber Ref. API 20C AUX, no. 20210)

3.8.2 Uji fisiologik dengan *germ tube formation test* (GT test).

Untuk membedakan khamir *Cryptococcus* dengan *Candida albicans*, dilakukan penanaman *Cryptococcus* (koloni diambil dari biakan SDA berumur 24 – 72 jam) pada putih telur (2 ml). Dilakukan homogenisasi dengan sengkeliit lurus steril. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C, selama 2 – 3 jam. Setelah inkubasi dilakukan pemeriksaan mikroskopis untuk mencari *germ tube*, yaitu sel ragi bertunas panjang atau berkecambah. Khamir *Cryptococcus* tidak membentuk *germ tube*.

3.8.3 Membedakan *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii*

Untuk membedakannya digunakan media agar CGB dengan cara:

- a. Sampel *Cryptococcus* dari medium SDA ditanam pada medium agar CGB. Penanaman ini dilakukan dalam ruang steril (*hoed*) untuk menghindari kontaminasi.
- b. Biakan diinkubasi pada suhu kamar. Diamati pertumbuhan jamur dan perubahan warna medium sampai lima hari.

Apabila koloni yang tumbuh adalah *Cryptococcus gattii*, medium berubah warna menjadi biru tembaga. Medium agar tetap berwarna kuning cerah apabila koloni yang tumbuh adalah *Cr. neoformans*.

3.8.4 Membedakan *Cr. neoformans* varietas *neoformans* (serotipe D) dan *Cr. neoformans* varietas *grubii* (serotipe A).

- a. Untuk menanam pada medium agar CDBT sebelumnya isolat ditanam pada medium SDA. Jamur yang digunakan berumur 24 – 48 jam. Selanjutnya isolat ditanam pada agar CDBT dan diinkubasi pada suhu 28°C.
- b. Pengamatan dilakukan selama lima hari. Apabila koloni yang tumbuh *Cr. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D), koloni yang tumbuh berwarna merah cerah diikuti dengan perubahan warna medium CDBT dari kuning terang menjadi oranye pada hari ke lima. Apabila koloni yang tumbuh *Cr. neoformans* var. *grubii* (serotipe A), koloni yang tumbuh berwarna pucat (krem jingga) dan warna medium tidak berubah.

3.8.5 Pembentukan pigmen melanin diamati dengan menumbuhkan jamur pada medium *niger seed agar* (NSA).

Semua sampel yang sudah dikultur pada medium SDA, selanjutnya dibiak pada agar NSA.

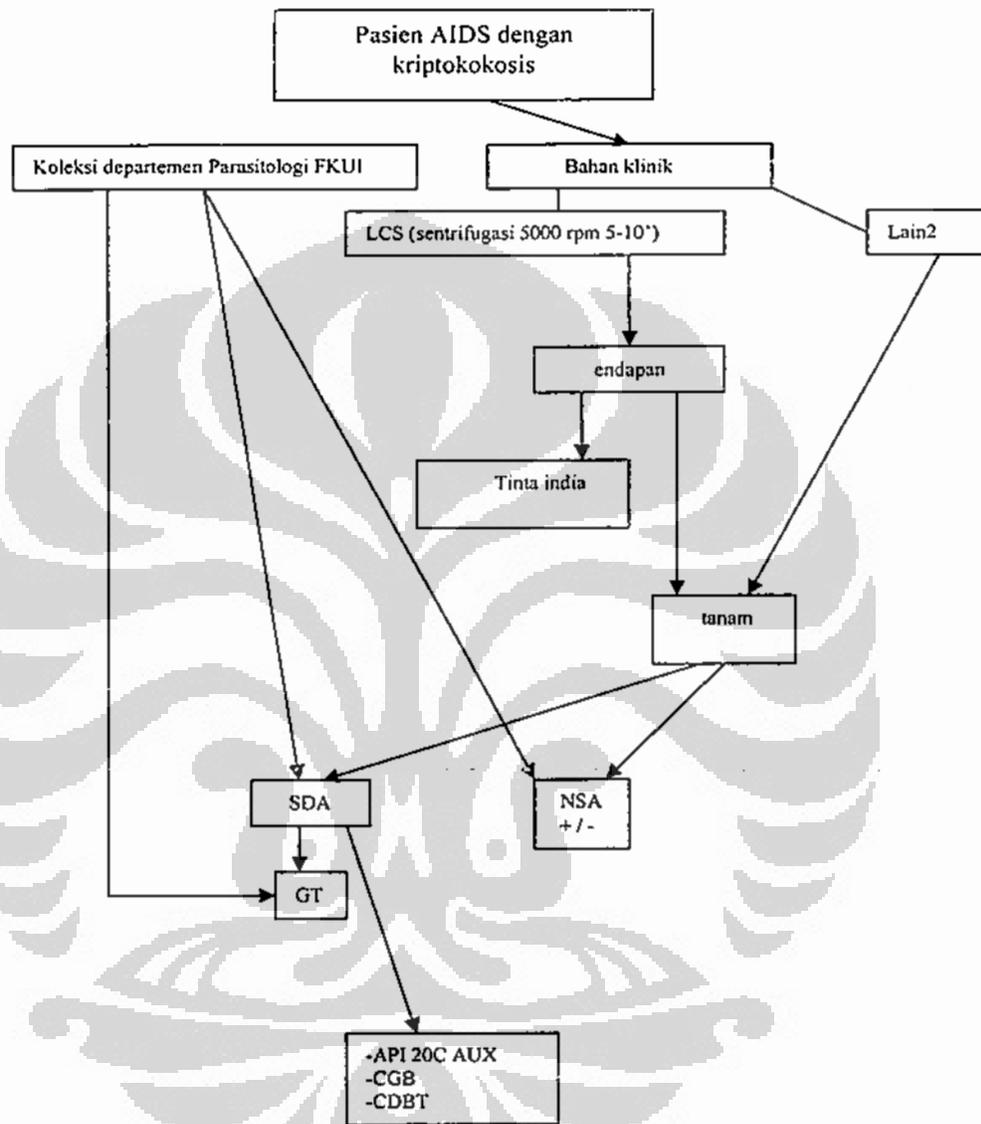
Caranya dengan mengambil sedikit isolat *Cryptococcus* dari medium SDA dengan sengkeli steril berujung bulat. Kemudian sengkeli digoreskan keseluruh permukaan medium NSA. Biakan diinkubasi pada suhu kamar dan diamati setiap hari selama satu minggu. Hasil positif bila koloni yang tumbuh berwarna coklat tengguli, mukoid dengan permukaan halus.

3.9 Prosedur pengumpulan data demografis dan geografis

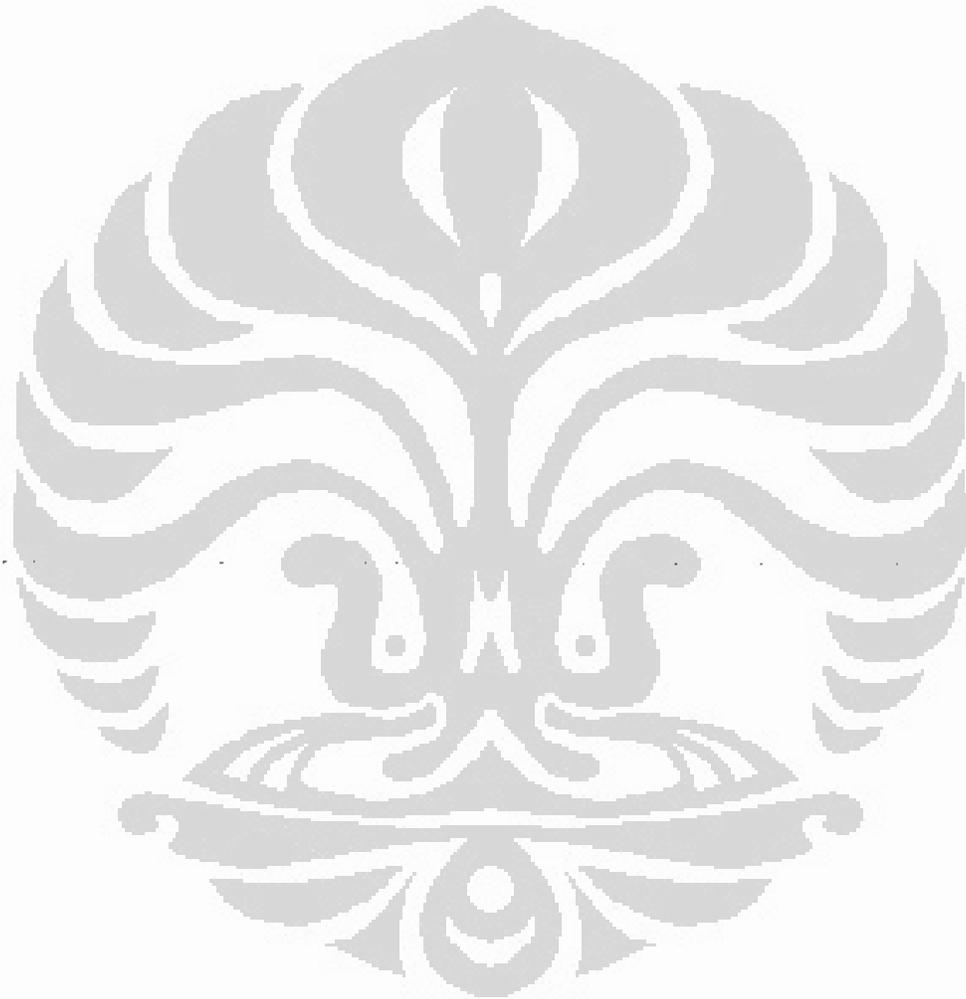
Data geografis dan demografis didapat dari catatan pasien dan bantuan Departemen Neurologi (FKUI-RSCM)



Alur Penelitian



Untuk keperluan epidemiologi, dikumpulkan data demografi (nama, umur, jenis kelamin) dan geografis (alamat) penderita untuk melihat penyebaran penyakit di Jakarta dan sekitarnya.



BAB 4

HASIL PENELITIAN

Selama kurun waktu penelitian sejak Agustus 2007 – Juli 2008 telah diteliti 65 isolat *Cryptococcus* yang diisolasi dari pasien AIDS dengan kriptokokosis. Pasien AIDS tersebut terdiri atas enam puluh satu orang penderita kriptokokosis meningeal, dua orang penderita kriptokokosis kulit, dan dua orang penderita kriptokokemia (Tabel 3)

Tabel 3. Bahan Klinik Asal Isolat *Cryptococcus*

Diagnosis	Bahan klinik	n
- Kriptokokosis meningeal	cairan otak	61
- Kriptokokosis kulit	kulit	2
- Kriptokokemia	darah	2

4.1 Data Demografis dan geografis

Pasien AIDS yang menderita kriptokokosis terdiri atas 40 orang laki-laki dan 12 orang perempuan. Dari total 65 pasien hanya 52 orang yang disertai dengan data demografis. Kelompok usia antara 25 – 30 tahun merupakan kelompok usia terbanyak. Sebagian besar pasien bertempat tinggal di wilayah Jabodetabek dan sebagian kecil berasal dari Bandung (Tabel 4).

Tabel 4. Data Demografis dan Geografis Pasien

Jenis kelamin	Jumlah
Laki – laki	40
Perempuan	12

Usia	
20 – 25	14
25 – 30	23
31 – 35	4
36 – 40	2
> 40	-

Domisili	Jumlah
Jakarta Pusat	5
Jakarta Selatan	7
Jakarta Timur	7
Jakarta Barat	1
Jakarta Utara	1
Bekasi	1
Tangerang	-
Depok	-
Bogor	1
Bandung	4

Dari total 65 pasien yang diteliti, hanya 27 pasien yang disertai data alamat tempat tinggal (domisili). Pasien tersebut beraasal dari berbagai wilayah di Jakarta. Di Jakarta Selatan dan Jakarta Timur masing-masing tujuh pasien, sedangkan wilayah lain berkisar antara satu sampai lima orang. Pasien dari Bandung tidak disertai data rinci tentang wilayah tempat tinggal.

4.2 Penelitian mikologi

Pengumpulan bahan dilakukan sejak Agustus 2007 – Juli 2008. Dari total 65 isolat yang diteliti, sebanyak 40 isolat merupakan isolat koleksi Departemen Parasitologi FKUI. Isolat tersebut diisolasi dari pasien AIDS dengan kriptokokosis. Sisanya adalah isolat yang diisolasi dari pasien AIDS dengan dugaan kriptokokosis yang bahan kliniknya dikirim ke laboratorium Mikologi untuk kepentingan diagnosis. Bahan klinik yang diperiksa berupa 45 bahan cairan otak, dua spesimen kulit dan 2 spesimen darah penderita AIDS yang diduga kriptokokosis. Dari 45 bahan cairan otak yang diperiksa, sebanyak 21 isolat positif *Cryptococcus* dengan pemeriksaan tinta India. Sedangkan untuk isolasi jamur dari bahan klinik kulit dan darah langsung ditanam pada medium SDA. Pada medium tersebut jamur tumbuh sebagai koloni khamir berwarna putih krem, mukoid dengan permukaan halus (Gambar 2b). Baik pada pemeriksaan mikroskopis cairan otak dan koloni jamur dengan tinta India, ditemukan sel ragi bulat tunggal atau bertunas dan berkapsul/ bersimpai (Gambar 4a).

Gambar 3. a. *Cryptococcus* pada Pemeriksaan Tinta India
b. Koloni Khamir *Cryptococcus*





3b.

Tabel 5. Hasil Pemeriksaan Isolat Klinik *Cryptococcus* yang Diisolasi dari 65 Pasien AIDS

Pemeriksaan mikologi	Hasil
Uji pembentukan germ tube	
Positif	-
Negatif	65
Asimilasi karbohidrat (API 20C AUX)	
<i>Cr. neoformans</i>	64
<i>Cr. laurentii</i>	1
Khamir lain	-
Penetapan spesies dengan medium Canavanine glycine bromthymol Blue (CGB)	
<i>Cr. neoformans</i>	65
<i>Cr. gattii</i>	-
Penetapan serotipe <i>Cr. neoformans</i> Dengan medium creatinine dextrose Bromthymol thymine (CDBT)	
<i>Cr. neoformans</i> serotipe A	65
<i>Cr. neoformans</i> serotipe D	-

Dari pemeriksaan *germ tube* terhadap 65 isolat klinik *Cryptococcus*, sesudah inkubasi dalam putih telur pada suhu 37°C selama 2-3 jam, didapatkan bahwa khamir yang diteliti tidak ada yang membentuk tunas berkecambah (Tabel 5)

Gambar 4. Uji Pembentukan *GermTube* pada Khamir *Cryptococcus* Dibandingkan dengan *Candida albicans*



Sistem identifikasi dengan kit API 20C AUX berjalan dengan baik yang ditandai oleh kontrol negatif yang selalu negatif (jernih, tidak ada kontaminasi). Hasil pemeriksaan asimilasi karbohidrat (kit API 20C AUX-Biomerieux, Prancis), pada pengamatan 72 jam, didapatkan bahwa hampir seluruh isolat yang diteliti teridentifikasi sebagai *Cr. neoformans* (Tabel 3). Profil atau pola asimilasi karbohidrat yang didapatkan pada penelitian ini tercantum pada Tabel 6. Apabila dirujuk pada API web software ternyata hasil identifikasi tidak mencapai 100 % (83 – 99%). Satu isolat teridentifikasi sebagai *Cryptococcus laurentii* (70,9%) dan *Cr. neoformans* (28,8%). Berdasarkan pola asimilasi karbohidrat (tabel 3), isolat tersebut sesuai dengan *Cr. laurentii*, tetapi ada perbedaan pada satu karbohidrat yaitu Methyl- α D-glucopiranosid, menunjukkan reaksi negatif. Untuk memastikan hasil tersebut, pemeriksaan diulang dan memberikan hasil yang sama (Tabel 6).

Tabel 6. Hasil Pola Asimilasi Isolat *Cryptococcus* pada Kit API 20C AUX

Karbohidrat	48 jam		72 jam	
	Positif	negatif	positif	negatif
Glu	65	-	65	-
Gly	-	65	-	65
2KG	65	-	65	-
ARA	46	19	56	9
XYL	50	15	65	-
ADO	40	25	65	-
XLT	-	65	5	60
GAL	65	0	65	0
INO	9	56	64	1
SOR	65	-	65	-
MDG	61	1	64	1
NAG	60	5	60	5
CEL	6	59	40	25
LAC	-	65	-	65
MAL	65	-	65	-
SAC	65	-	65	-
TRE	47	18	62	3
MLZ	64	1	64	1
RAF	56	9	63	2

Ket. Tabel 6: Pembacaan kekeruhan pada sumur karbohidrat dari 65 isolat yang dirujuk pada API web software (Biomérieux-France) untuk mendapatkan pola asimilasi yang sesuai dengan spesies yang dicari

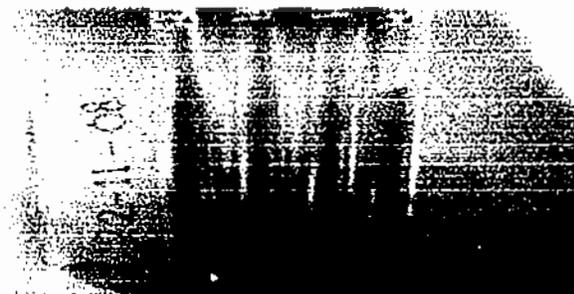
Hasil penetapan spesies *Cryptococcus* untuk membedakan *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii* memperlihatkan hasil bahwa 65 isolat yang diperiksa seluruhnya adalah *Cr. neoformans* (Tabel 5). Pada medium agar CGB, tidak ditemukan pertumbuhan koloni dan perubahan agar menjadi biru terang.

Gambar. 5 : . Penanaman koloni *Cryptococcus* pada medium CGB. Hasil (-)



Hasil penetapan serotipe *Cryptococcus neoformans* (serotipe A dan D), menunjukkan seluruh sampel yang ditanam pada medium CDBT tumbuh sebagai koloni ragi yang berwarna kuning pucat. Hingga hari ke lima pengamatan tidak terjadi perubahan warna medium dari kuning terang menjadi jingga/ oranye yang menunjukkan bahwa jamur tersebut *Cr. neoformans* var. *grubii* atau *Cr. neoformans* serotipe A (Tabel 5).

Gambar 6. Biakan *Cryptococcus* pada Medium CDBT



4.3 Penelitian virulensi

Tabel 7. Pembentukan Melanin pada Medium Niger Seed Agar

Pembentukan melanin	Jumlah	
	+	-
Isolat yang diperiksa	65	-
Jumlah	65 isolat	

Ket. Tabel 7. Pada uji virulensi yaitu pembentukan pigmen melanin, sesudah tujuh hari pengamatan, semua sampel tumbuh sebagai koloni berwarna coklat gelap dengan permukaan halus. Koloni coklat tengguli menunjukkan pembentukan melanin.

Uji virulensi dilakukan dengan melihat pembentukan melanin pada agar NSA. Seluruh isolat membentuk melanin, yang terlihat dengan tumbuhnya koloni ragi berwarna coklat tengguli dengan permukaan halus pada medium tersebut setelah dua hari inokulasi pada suhu kamar (Tabel 7).

Gambar 7. Biakan *Cryptococcus* pada Medium NSA



BAB 5 PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan penetapan spesies dan serotipe 65 isolat *Cryptococcus* yang diisolasi dari bahan klinik yang berasal dari penderita AIDS. Galur *Cryptococcus* tersebut sebagian merupakan isolat yang telah disimpan sebagai koleksi Departemen Parasitologi FKUI dan 25 isolat diisolasi dari bahan klinik yang berasal dari cairan otak, kulit dan darah penderita AIDS dengan kriptokokosis. Bahan klinik yang diteliti baik cairan otak, kulit, maupun darah berasal dari pasien AIDS penderita kriptokokosis. Pada pasien terinfeksi HIV terjadi penurunan CD₄⁺ sampai pada titik kritis < 200 sel/ mm³. Pada kondisi diatas pasien AIDS mudah terinfeksi oleh *Cryptococcus* dan infeksi dapat menyebar dengan cepat karena rendahnya imunitas. Setelah di inhalasi maka *Cryptococcus* akan menyebar ke organ lain terutama otak, yang merupakan tempat predileksi. Pada pasien AIDS penyebaran terjadi lebih cepat dan dapat meluas ke berbagai organ selain otak.¹ Penelitian ini membuktikan bahwa kriptokokosis dapat menyerang kulit, dan dapat menyebabkan kriptokokemia, selain meningitis.⁴¹

Untuk menetapkan spesies dan serotipe dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan uji pembentukan *germ tube*, uji asimilasi karbohidrat dengan kit API 20C AUX, penetapan spesies dengan medium CGB, dan penetapan serotipe *Cr. neoformans* dengan medium CDBT. Penelitian tentang virulensi dilakukan dengan menumbuhkan jamur pada agar NSA. Juga dikumpulkan

data demografis dan geografis penderita kriptokokosis di wilayah Jabodetabek dan Bandung untuk melihat penyebaran penyakit.

Golongan khamir, termasuk *Cryptococcus*, memerlukan sumber karbon untuk metabolismenya. Karbohidrat akan diasimilasi untuk mendapatkan karbon untuk kelangsungan hidupnya. Kemampuan *Cryptococcus* untuk mengasimilasi karbohidrat akan membentuk pola spesifik bergantung pada sifat biokimiawi yang sesuai dengan spesiesnya. Berdasarkan hal itu dipilih uji asimilasi untuk mengidentifikasi spesies *Cr. neoformans*. Kit API 20C AUX merupakan kit dengan deret gula untuk uji asimilasi. Uji tersebut positif apabila tampak kekeruhan pada sumur uji, yang merupakan tanda pertumbuhan jamur. Pembacaan dilakukan pada 48 jam, namun ada beberapa jenis karbohidrat yang proses asimilasinya lambat, sehingga untuk jenis karbohidrat yang mengalami proses asimilasi lambat, hasil baru dapat dibaca sesudah 72 jam.

Pembacaan kemudian disesuaikan dengan pola asimilasi dalam *database* yang ada dalam perangkat lunak API Software (Biomerieux, Prancis), yaitu *analytical profile index* atau indeks analitik yang disusun membentuk nomor profil dan selanjutnya memperlihatkan rujukan spesies yang diteliti. Dari seluruh sampel yang diteliti, sebanyak 64 isolat membentuk pola asimilasi yang sesuai dengan *Cr. neoformans*. Pembacaan hasil dengan API *web software* menunjukkan tingkat identifikasinya hanya 83 – 99%. Tingkat identifikasi yang tak mencapai 100% agaknya terletak pada variasi dalam spesies, yang tidak terbaca oleh sistem karena sistem dalam *database*

tersebut kurang lengkap (Smith et al).³⁷ Selain itu kemampuan untuk mengasimilasi gula berbeda antar galur dalam spesies *Cryptococcus*. Misalnya arabinosa dapat memberikan hasil positif atau negatif, sehingga dalam penyesuaian dengan index analitik *software* tidak didapat hasil 100% identik.

Pembacaan dengan API web *software* menunjukkan satu isolat teridentifikasi sebagai *Cr. laurentii* dengan tingkat kesamaan 70,9%. *Cr. neoformans* kesetaraannya hanya 29,1%. Pola asimilasi karbohidrat untuk isolat tersebut meskipun sesuai dengan *Cr. laurentii* namun memperlihatkan hasil negatif pada asimilasi methyl- α D-glucopiranoside (MDG). Pengulangan dengan kit yang sama memberikan hasil yang sama. Menurut Lodder²⁶ *Cr. laurentii* var. *laurentii* dapat memberikan reaksi negatif pada asimilasi MDG. Sehingga disimpulkan bahwa isolat tersebut adalah *Cr. laurentii* varietas *laurentii*. Varietas tersebut tidak dapat menggunakan MDG sebagai sumber karbon.

API web *software* menyatakan peluang identifikasi isolat tersebut sebagai *Cr. neoformans* hanya sebesar 29,1%. Hal itu mungkin karena pasien tersebut terinfeksi oleh galur *Cr. neoformans* yang memiliki pola genetik berbeda yang tidak terbaca oleh API web *software*. Hal itu misalnya terjadi pada *Candida nivariensis* yang akan teridentifikasi sebagai *Candida glabrata* pada uji asimilasi.³⁵ Pembedaan saat ini hanya dapat dilakukan pada analisis molekular.

Kit API 20C AUX bukanlah kit yang berdiri sendiri. Oleh produsen dianjurkan untuk melakukan uji morfologi untuk pemastian identifikasi. Dalam

penelitian ini dilakukan uji pembentukan *germ tube* untuk menegaskan bahwa jamur uji bukanlah *Candida*.

Uji pembentukan *germ tube* dilakukan dengan medium putih telur untuk merangsang pembentukan *germ tube*. Medium ini mudah diperoleh dan disiapkan, serta murah. Metode uji pembentukan *germ tube* pertama kali ditemukan oleh Reynolds dan Braude³⁶ sebagai uji fisiologik yang khas dan dibentuk oleh *C. albicans*. Selanjutnya diketahui bahwa selain oleh *C. albicans* *germ tube* juga dibentuk oleh *Candida tropicalis*³⁸ *Candida dubliniensis*³⁹ dan *Candida stellatoidea*⁴⁰

Khamir selain dari golongan *Candida* tidak membentuk tunas/kecambah dengan uji tersebut. Pada uji pembentukan *germ tube* yang dilakukan dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa khamir yang diuji tidak ada yang membentuk *germ tube*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa khamir yang diuji bukan golongan *Candida*. Khamir *Cryptococcus* tidak membentuk tunas berkecambah, seperti pada sel khamir *Candida*.

Pada awalnya *Cr. neoformans* terdiri atas *Cr. neoformans* var. *neoformans* dan *Cr. neoformans* var. *gattii*. Kit API 20C AUX hanya dapat membedakan *Cr. neoformans* dari spesies lain seperti *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, dan lain-lain.³⁷ Saat ini *Cr. neoformans* var. *gattii* telah menjadi spesies tersendiri^{2,3,5,6} sehingga diperlukan cara pemeriksaan lain untuk membedakan *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii*, yaitu media *canavanine glycine bromthymol blue* (CGB).³²

Medium CGB dibuat pertama kali dibuat untuk membedakan *Cr. neoformans*, var. *neoformans* (serotipe A dan D) dan *Cr. neoformans* varietas *gattii* (serotipe B dan C). Medium selektif tersebut dikembangkan oleh Kwon Chung *et al.*³² yang berhasil membedakan *Cr. neoformans* serotipe A, D dan B, C berdasarkan kemampuan jamur menetralkan *L-canavanine*, yang bersifat toksik terhadap *Cr. neoformans* serotipe A, D. Hasil yang diharapkan adalah perubahan warna medium menjadi biru terang bila yang tumbuh adalah *Cr. gattii*, sedangkan *Cr. neoformans* tidak merubah warna medium. *Cryptococcus* spesies lain akan memperlihatkan perubahan warna medium dari kuning cerah menjadi hijau.

Pada penelitian ini seluruh sampel yang diperiksa, tidak tumbuh, dan tidak terjadi perubahan warna medium CGB. Dapat disimpulkan bahwa seluruh isolat yang diteliti adalah *Cr. neoformans*, termasuk satu isolat yang teridentifikasi sebagai *Cr. laurentii* pada kit API. *Cr. neoformans* peka terhadap *L-Canavanine* yang terdapat dalam medium CGB sehingga tidak dapat tumbuh dan tidak menggunakan glisin sebagai sumber karbon, sehingga tidak terjadi perubahan warna.³²

Hal itu terjadi karena *Cr. neoformans* tidak memiliki sistem metabolisme yang mampu mengubah *canavanine* yang bersifat toksik, menjadi komponen senyawa non toksik, artinya tidak mampu menetralkan toksisitas *canavanine*. Jalur metabolisme khusus itu dimiliki oleh *Cr. gattii*. Sehingga pada medium CGB, spesies tersebut mampu tumbuh, selanjutnya untuk pertumbuhannya ia menguraikan *glycine* untuk mengambil karbon dari zat

tersebut. Proses penguraian *glycine* yang menghasilkan karbon mengakibatkan kenaikan pH medium menjadi basa, sehingga mengembalikan warna indikator Bromtimol biru pada agar yang semula berwarna kuning muda.³²

Franzot *et al*¹ menyatakan ada serotipe baru yang tergabung dalam *Cr. neoformans*, yaitu *Cr. neoformans* varietas *grubii* atau *Cr. neoformans* serotipe A. Berdasarkan penetapan spesies dengan medium CGB dan kit API 20C AUX didapatkan bahwa hampir seluruh isolat yang diteliti adalah *Cr. neoformans*. Untuk itu perlu dilakukan uji penetapan serotipe dengan menggunakan medium CDBT. Medium selektif untuk penetapan serotipe *Cr. neoformans*. Medium tersebut mampu membedakan *Cr. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D) dan *Cr. neoformans* var. *grubii* (serotipe A). Seluruh sampel yang ditanam tumbuh sebagai koloni pucat kekuningan dan tidak mengubah warna medium menjadi jingga/ oranye. Sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat tersebut adalah *Cr. neoformans* var. *grubii* atau *Cr. neoformans* serotipe A. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian di berbagai negara yang menemukan bahwa penyebab utama kriptokokosis pada AIDS adalah *Cr. neoformans* var. *grubii* (serotipe A).⁴⁶ Selain itu kriptokokosis pada AIDS juga dapat disebabkan oleh *Cr. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D), namun penyebarannya hanya terbatas di wilayah Eropa⁴⁵. Sementara itu beberapa kasus kriptokokosis *gattii* pada AIDS dilaporkan di Afrika Selatan dan Amerika..^{29,44}

Cr. neoformans serotipe A diketahui menyebabkan kriptokokosis pada penderita dengan gangguan imunitas terutama penderita AIDS. Gambaran

klinis yang paling sering ditemukan pada penderita AIDS adalah meningitis,^{1,24} meskipun dapat ditemukan penyebaran ke organ lain seperti yang tercermin dalam bahan klinik yang digunakan dalam penelitian ini. Pada penelitian ini juga ditemukan bentuk klinis yang paling banyak yaitu meningitis. Kriptokokosis *neoformans* diketahui lebih sering menyebabkan meningitis dibandingkan dengan kriptokokosis *gattii*. Kriptokokosis *gattii* biasanya menyerang hospes imunokompeten meskipun pernah dilaporkan menyebabkan kelainan pada penderita AIDS. Kelainan yang disebabkan oleh *Cr. neoformans* biasanya terbatas pada selaput otak sedangkan kriptokokosis *gattii* juga menimbulkan kelainan parenkim misalnya massa pada otak. Adanya massa di otak dapat disalah diagnosis dengan penyebab lain misalnya toksoplasmosis pada AIDS yang biasanya menyebabkan tumor pada otak.⁴⁷ Kelainan SSP yang disebabkan kriptokokosis *gattii* biasanya juga disertai dengan perdarahan paru sehingga gambaran klinisnya menjadi lebih berat.^{6,45} Hal itu penting dalam tatalaksana karena meskipun obat yang diperlukan sama, yaitu amfoterisin B dan flusitosin, namun penanganan pasien juga harus memperhatikan adanya perdarahan paru dan peningkatan tekanan intrakranial oleh massa di otak.^{6,29,48}

Uji virulensi terhadap isolat yang diteliti menunjukkan bahwa semua isolat mampu membentuk pigmen melanin pada medium NSA. Pembentukan melanin menunjukkan bahwa isolat tersebut memproduksi melanin sebagai faktor virulen. Pigmen melanin merupakan salah satu faktor virulensi jamur yang menentukan patogenitasnya terhadap hospes dan melindungi jamur

terhadap pengaruh sistem kekebalan tubuh hospes. Selain itu pigmen melanin berfungsi melindungi *Cryptococcus* terhadap pengaruh sinar matahari dan oksidasi oleh lingkungan.^{1,21}

Dikembangkannya medium selektif bagi *Cryptococcus* berdasarkan beberapa hal, yaitu 1) *Cryptococcus* sp, *Cr. neoformans* tumbuh lebih lambat dibandingkan khamir lain 2) Sebagai medium identifikasi yang dapat membedakan *Cryptococcus*, khususnya *Cr. neoformans* dari khamir lain. Sehingga dalam medium selektif tersebut diberikan penambahan zat / substansi yang dapat merangsang pertumbuhan koloni *Cryptococcus*, mencegah pertumbuhan bakterial atau organisme penghambat pertumbuhan *Cryptococcus*, dan sekaligus memperlihatkan perbedaan identifikasi jamur tersebut dibandingkan dengan khamir lain. Penambahan Antibiotik dan medium dengan kadar pH yang rendah untuk mencegah pertumbuhan bakteri pengganggu. Faktor lain sebagai penghambat tumbuhnya jamur pengganggu adalah dengan melakukan inkubasi medium pada suhu 37°C dan penambahan bifenil 0,1% pada medium agar selektif *Cryptococcus*.¹

Bird seed agar atau *niger seed* agar (BSA / NSA), merupakan medium selektif *Cryptococcus*, yang pertama kali dikembangkan oleh Staib.⁴⁹ Medium tersebut mengandung tanaman *Guizotia abyssinica* (*bird seed*) yang memungkinkan *Cr. neoformans*, membentuk melanin dari *bird seed*. Selain untuk mengetahui pembentukan faktor virulen koloni khamir berwarna coklat hingga coklat gelap (coklat tengguli) dapat bersifat untuk identifikasi *Cryptococcus*. Dalam penelitian lain oleh Currie *et al*⁵⁰ berhasil pula

dikembangkan medium bird seed dengan penambahan bifenil dan L-Dopa. L-Dopa berfungsi mempercepat pembentukan pigmen melanin.¹

Dari hasil pencatatan demografis, ternyata sebagian besar penderita AIDS dengan kriptokokosis adalah laki-laki yang tinggal di Jakarta dan sekitarnya. Laki-laki memiliki peluang untuk mendapatkan kriptokokosis karena dua hal. Kriptokokosis adalah penyakit yang berasal dari lingkungan,^{3,53} dan laki-laki dianggap lebih terpajan terhadap lingkungan. Selain itu, melihat bahwa jumlah laki-laki penderita AIDS lebih banyak maka laki-laki yang terpajan tentu lebih banyak dibandingkan perempuan. Alasan kedua, diketahui bahwa estrogen menghambat pertumbuhan jamur secara *in vitro*⁵¹, sehingga kriptokokosis pada perempuan lebih sedikit.⁵²

Usia 25 – 30 tahun merupakan kelompok terbanyak, diikuti kelompok usia 20-24 tahun. Selama ini diketahui untuk Jakarta dan sekitarnya penderita AIDS berada pada rentang usia tersebut. Hal itu tidak berbeda dengan penelitian Mboi dan Smith⁵⁴ yang menyatakan bahwa infeksi HIV di Jabodetabek berhubungan dengan penggunaan narkoba suntik pada usia remaja yang memungkinkan infeksi HIV. Pasien akan memasuki fase AIDS dalam waktu 5-10 tahun kemudian.

Berdasarkan domisili pasien AIDS dengan kriptokokosis ternyata penderita tinggal di wilayah Jabodetabek, Bogor dan Bandung. Di Jakarta, pasien tersebar di lima wilayah DKI Jakarta, dan yang terbanyak di Jakarta Selatan dan Jakarta Timur. Di Bandung ada 4 pasien dan Bogor 1 pasien. Di wilayah Tangerang dan Depok tidak tercatat ada penderita AIDS dengan

kriptokokosis. Penyebaran tersebut tampaknya lebih luas daripada hal yang tercatat, karena dari 65 pasien hanya 27 pasien yang disertai data domisili yang jelas. Sehingga besar kemungkinan penyebaran pasien juga meliputi Tangerang dan Depok, mengingat bahwa pasien AIDS terdistribusi di seluruh wilayah Jabodetabek. Hal itu menunjukkan bahwa sumber penularan kriptokokosis ditemukan di semua wilayah tersebut. Di Jakarta dan Bekasi telah diisolasi *Cryptococcus* pada kotoran merpati.³⁰ Tampaknya sumber infeksi juga terdapat di daerah pasien tersebut berdomisili. Saat ini diketahui sumber infeksi *Cryptococcus* lain, misalnya debu rumah, pepohonan, sarang lebah dan buah-buahan.^{28,31} Sumber infeksi juga mungkin berada di sekitar tempat tinggal penderita AIDS dengan kriptokokosis. Hal itu perlu diteliti lebih jauh sehingga sumber penularan dapat diidentifikasi. Diidentifikasi habitat *Cryptococcus*, di alam memungkinkan untuk dilakukan upaya pencegahan.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Untuk membedakan *Cr. neoformans* dengan *Cryptococcus* dan khamir lain dengan kit API 20C AUX memperlihatkan jamur yang diteliti adalah *Cr. neoformans* dan *Cr. laurentii* varietas *laurentii*.
2. Hasil uji pembentukan *germ tube* memperlihatkan bahwa jamur yang diteliti bukan golongan *Candida*.
3. Uji penetapan spesies *Cryptococcus* dengan medium CGB, ternyata jamur yang diuji adalah *Cr. neoformans*.
4. Penetapan serotipe *Cr. neoformans* dengan agar CDBT menunjukkan bahwa jamur yang diuji adalah *Cr. neoformans* var. *grubii*.
5. Uji virulensi memperlihatkan pembentukan pigmen melanin pada semua isolat.

6.2 Saran

Diperlukan uji molekular untuk menentukan pola genetik isolat *Cryptococcus* yang diteliti sehingga didapat profil genetiknya, berdasarkan hasil identifikasi spesies *Cryptococcus* yang didapat pada uji asimilasi karbohidrat dengan kit API 20C AUX.

DAFTAR PUSTAKA

1. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC: ASM Press;1998
2. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceed Nation Acad Sci* 2004; 101 (49): 17258-63
3. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1642-1644
4. Franzot S, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:838-40
5. Duncan C, Schwantje H, Campbell SC, Bartlett K. *Cryptococcus gattii* in wildlife of Vancouver Island, British Columbia, Canada. *J Wildlife Dis* 2006;42(1):175-8
6. Taylor MB, Chadwick D, Barkham T, First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a patient in Singapore. *J Clin Microbiol* 2002;28:3098-9
7. Lacaz C, Heins-Vaccari EM, Hernandez-Arriagada GL, Martins E, Prearo C, Corim SM, Martins M. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002;44(4):225-8
8. Cheng MF, Chiou CC, Liu YC, Wang HZ, Hsieh KS. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1608-1611
9. Ellis D. *Cryptococcus albidus*. Diunduh dari http://www.mycology.adelaide.au/fungal_descriptions/yeasts/Cryptococcus/C_albidus.html 28/11/2008
10. Garelick JM. Scleral ulceration caused by *Cryptococcus albidus* in a patient with acquired immune deficiency syndrome *Cornea* 2004;23:730-1
11. Olivares LRC, Espinosa RA, Santos GRP, Martinez RL. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in Mexico and their comparison with some Latin American Countries. *Rev Lat-amer Microbiol* 2000;42:35-40
12. Kordosis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, Legakis NJ. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococemia in AIDS patients. *Med Mycol* 1998; 36: 335-9
13. Inverarity D, Bradshaw Q, Wright P, Grant A. The Spectrum of HIV related disease in rural Central Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 2002;33(4): 822-31
14. Likasitwattanakul S, Poneprasert B, Sirisanthana V. Cryptococcosis in HIV-infected children. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 2004;35 (4): 935-9

15. Milogo A, Ki-Zerbo GA, Andonaba JB, Lankoandé D, Sawadogo A, Yaméogo I, *et al.* Cryptococcal meningitis in HIV-infected patients at Bobo-Dioulasso hospital (Burkina Faso). *Bull Soc Pathol Exot* 2004; 119-21
16. Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Laporte A, French *Cryptococcosis* study group. Epidemiology of *Cryptococcosis* in France: A-9-Year Survey (1985-1993) *Clin Inf Dis* 1996;23: 82-90
17. Lakshmi V, Sudha T, Teja VD, Umabala P. Prevalence of central nervous system cryptococcosis in human immunodeficiency virus reactive hospitalized patients. *Indian J Med Microbiol* 2007;25:146-149
18. Micol R, Lortholary O, Sar B, Laureillard D, Ngeeth C, Dousset J, *et al.* Prevalence, determinant of positivity, and clinical utility of cryptococcal antigenemia in Cambodian HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45(5):55-9
19. Syam R, Adawiyah R, Wahyuningsih R. Deteksi *Cryptococcus neoformans* pada pemeriksaan cairan otak penderita HIV/AIDS: morfologik dan serologic. disampaikan pada symposium Parasitologi, Juni 2007
20. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995;8 (4):515-48
21. Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. *Synopses*. 1998;4 (1):71-80
22. Buesching WJ, Kurek K, Roberts GD. Evaluation of the modified API 20C system for identification of clinically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1979;9(5):565-9
23. Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1967-70
24. Baddley JW, Dismukes WE. Cryptococcosis. In Dismukes WE, Pappas PG, Sobbel JD, editors. *Clinical Mycology*. New York: Oxford University Press;2003.p.188-48
25. Budiarto E. Metodologi penelitian Kedokteran. 1st ed Jakarta: EGC; 2004.
26. Lodder J. 2nd Ed. The yeasts: a taxonomic study. 2nd ed. North Holland Publishing Company, 1970
27. Kwon-Chung KJ. Cryptococcosis. In: Kwon Chung KJ, Bennet JE, editors. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992 :397-446
28. Sorell TC, Ellis D. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:42-3
29. Chaturvedi S, Dyavaiah M, Larsen RA, Chaturvedi V. *Cryptococcus gattii* in AIDS patients, southern California. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 (11):1686-92
30. Baroni F, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB, Gambale W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. *Rev inst Med Trop S Paulo* 2006;48(2):71-5
31. Wahyuningsih R. Diagnosis kriptokokosis: pemeriksaan mikologi dan interpretasinya. *Maj Kedok Indon.* 2005;12:730-3
32. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennet JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D)

- and *Cryptococcus gattii* (serotypes B and C). J Clin Microbiol. 1982;15(3): 535-7
33. Ellis D, Davis S, Alexiou A, Handke R, Bartley R. Descriptions of medical fungi. 2nd ed. Adelaide: Nexus Print Solution;2007.p.52-4
 34. Rippon JW. Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2nd ed. Philadelphia: W. B Saunders Company; 1988.p.581-609
 35. Wahyuningsih R, Sahbandar IN, Theelen B, Hagen F, Poot G, Meis JF, Rozalyani A, Syam R, Boekhout T. *Candida nivariensis* isolated from an Indonesian human immunodeficiency virus infected patient suffering from oropharyngeal candidiasis. J Clin Microbiol. 2008; 46:388-91
 36. Reynolds R, Braude A. The filament-inducing property of blood for *Candida albicans*: its nature and significance. Clin Res Proc 1956;4:40.
 37. Smith MB, Dunklee D, Vu H, Woods GL. Comparative Performance of the RapID Yeast Plus System and the API 20C AUX Clinical Yeast System. J Clin Microbiol 1999;37(8): 2697-98
 38. El Jannah SM. Identifikasi isolat *Candida* dari berbagai bahan klinik dengan CHROMagar *Candida* dibandingkan metode konvensional 2004. Tesis. Universitas Indonesia
 39. Park BG, Lee MK. Appropriate condition of germ tube formation as presumptive identification test for *Candida albicans*. Korean J Med Mycol 2008; 13(1): 20-5
 40. Casal M, Linares MJ. Preliminary evaluation of a new test for the rapid differentiation of *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. Mycopathologia 1983; 81(1): 63-4
 41. Pasqualotto AC, Severo CB, Oliveira FM, Severo LC. Cryptococcemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiological agent. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 143-46
 42. Jain N, Wiekles BL, Keller SM, Fu J, Casadevall A, Jain P, Ragan MA, Banerjee U, Fries BC. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. J Clin Microbiol 2005; 43(11): 5733-42
 43. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, *et al.* Serotyping of 467 *Cr. neoformans* isolates for clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 73-7
 44. Karstaldt AS, Grewe-Brown HH, Dromer F. Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*, serotype C in AIDS patients in Soweto, South Africa. Med Mycol 2002; 40: 7-11
 45. Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated meningitis. AIDS 2007; 21: 2119-29
 46. Charlier C, Dromer F, Lévêque C, Chartier L, Cordoliani YS, Fontanet A, *et al.* Cryptococcal neuroradiological lesions correlate with severity during cryptococcal meningoencephalitis in HIV-positive patients in the HAART era. Plos one 2008; 3(4): 1-7
 47. Halonen SK. Immune response to *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. In: Lindsay DS, Weiss LM, editors. Opportunistic

- infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004: 67-88
48. Colom MF, Frasés S, Ferrer C, Jover A, Andreu M, Reus S, *et al.* First case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in Spain. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3548-50
 49. Staib F. The perfect state of *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidiella neoformans*, on pigeon manure filtrate agar. *Zentralbl bakteriol Hyg Abt I Orig* 1981; 248: 575-8
 50. Currie BP, Freundlich LF, Casadevall A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical isolates in New York City. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1188-92
 51. Diamond RD. Effects of stimulation and suppression of cell-mediated immunity on experimental cryptococcosis. *Infect Immun* 1977; 17: 187-94
 52. Levitz SM. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev Infect Dis* 1982; 53: 283-92
 53. Ellis D, Pfeiffer TJ. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 321-325
 54. Mboi N, Smith KH. Current status of HIV/AIDS in Indonesia and prospect for its spread. Dalam: 'Indonesia,' fighting a rising tide: the response to AIDS in East Asia. Yamamoto T, Itoh S penyunting. Tokyo: Japan center for international exchange 2006.p.96-118

Penetapan Spesies dan Varietas *Cryptococcus* yang diisolasi dari Pasien AIDS dengan Kriptokokosis

Retno Wahyuningsih,* Zaira Naftassa,* Mulyati

Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Cryptococcus merupakan khamir bersimpai yang menyebabkan kriptokokosis dan pada era HIV/AIDS jumlah kasus meningkat tajam. Manifestasi klinik kriptokokosis berbeda sesuai dengan spesies dan serotipe, sehingga identifikasi menjadi sangat penting. Selain itu penetapan spesies penting untuk studi epidemiologis kriptokokosis. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk mengidentifikasi spesies dan serotipe serta virulensi jamur. Selain itu ingin diketahui penyebaran penyakit di Jabodetabek. Bahan yang diperiksa adalah 40 isolat koleksi Departemen Parasitologi FKUI dan 25 isolat dari cairan otak kulit dan darah. Metode pemeriksaan terdiri atas uji asimilasi (kit API 20C AUX), uji pembentukan *germ tube*, biakan pada medium CGB dan CDBT dan NSA. Penyebaran kasus kriptokokosis didapatkan berdasarkan domisili pasien. Hasil uji asimilasi didapatkan *Cr. neoformans* (64 isolat), *Cr. laurentii* var. *laurentii* (1 isolat). Hasil uji pembentukan *germ tube* didapatkan bahwa jamur yang diteliti bukan golongan *Candida*. Penetapan spesies dengan medium CGB didapatkan seluruh isolat adalah *Cr. neoformans*. Hasil penetapan serotipe dengan medium CDBT didapatkan seluruh isolat adalah *Cr. neoformans* serotipe A. Uji virulensi dengan medium NSA memperlihatkan pembentukan pigmen melanin pada semua isolat. Data demografis menunjukkan distribusi penderita kriptokokosis di lima wilayah DKI, Bogor dan Bandung.

Kata kunci: *Cryptococcus*, serotipe HIV/AIDS, melanin, distribusi pasien

Pada penderita gangguan sistem imun berat yang disebabkan oleh infeksi HIV, terjadi penurunan imunitas yang dapat diketahui dari turunnya jumlah sel CD₄⁺ dalam darah. Apabila hitung sel tersebut <200/ μ l akan muncul berbagai infeksi oportunistik yang dapat disebabkan oleh protozoa, bakteri, virus ataupun jamur. Jamur yang dapat menyebabkan infeksi oportunistik antara lain *Cryptococcus neoformans*, dan infeksiinya disebut dengan kriptokokosis. Kriptokokosis akan muncul apabila jumlah sel CD₄⁺ menurun hingga 100 sel/ μ l atau kurang.¹ *Cryptococcus* yang berada di alam (biasanya terdapat pada kotoran burung merpati dan pepohonan) memasuki tubuh inang melalui inhalasi sel ragi (basidiospora) terdehidrasi ke dalam paru. Dalam paru jamur akan menjalani proses rehidrasi dan selanjutnya tergantung pada kondisi pasien, dapat menjadi saprofit pada individu imunokompeten atau meluas pada individu imunokompromis seperti AIDS. Setelah beberapa waktu, jamur tersebut akan menyebar secara hematogen ke berbagai organ. *Cryptococcus* penyebab kriptokokosis dibedakan menjadi dua spesies, yaitu *Cr. neoformans* dan

Cr. gattii. Kedua spesies itu memiliki wilayah distribusi yang berbeda. *Cr. neoformans* ditemukan di berbagai belahan dunia serta erat kaitannya dengan sumber di alam yaitu tanah atau lingkungan yang tercemar kotoran burung merpati.^{1,2} *Cr. gattii* diketahui memiliki distribusi di wilayah beriklim tropis dan subtropis seperti Australia dan Kanada bagian barat.^{1,3,5}

Terdapat dua varietas *Cr. neoformans* yaitu *Cr. neoformans* varietas *neoformans* (serotipe D) dan *Cr. neoformans* varietas *grubii* (serotipe A).⁴ *Cr. neoformans* varietas *grubii* lebih sering ditemukan pada pasien AIDS sedangkan *Cr. gattii* biasanya ditemukan pada pasien imunokompeten.^{1,6,7} Selain itu *Cryptococcus* lain yang dapat ditemukan pada manusia adalah *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* dan *Cryptococcus uniguttulatus*. Ketiga spesies itu memang tidak menjadi penyebab utama kriptokokosis pada manusia, tetapi ditemukan pada kasus-kasus pasien AIDS meskipun jarang.^{8,9,10,11,12} *Cr. albidus* dan *Cr. laurentii* memiliki habitat yang kosmopolit, diantaranya pada tanaman, air, udara, mamalia, dan kadang pada

orang sehat jamur-jamur tersebut ditemukan di permukaan kulit sebagai saprofit.¹

Prevalensi kriptokokosis meningeal pada penderita AIDS di India sebesar 2,09%,¹⁷ di Thailand 15%¹³ pada orang dewasa dan sebesar 2,97% pada anak-anak.¹⁴ Di Malawi 0,1%, Afrika 15%,¹⁵ Eropa Barat 2-10%¹⁶, Kamboja 18%,¹⁸ dan pada umumnya penderita laki-laki.^{17,15,16,18} Di Indonesia, khususnya Jakarta, data Departemen Parasitologi FKUI, pemeriksaan cairan otak 102 pasien AIDS yang menunjukkan gejala meningeal ternyata sebanyak 21,9% menderita kriptokokosis yang dibuktikan dengan pemeriksaan tinta India dan isolasi jamur.¹⁹

Manifestasi klinis pada kriptokokosis agak berbeda antara penderita imunokompeten dan imunokompromis (AIDS). Pada pasien AIDS manifestasi klinis yang paling sering didiagnosis adalah meningitis. Penyakit tersebut mempunyai angka kematian yang tinggi dan bila terlambat diobati selain berakibat fatal juga dapat mengakibatkan kecacatan meskipun pasien sembuh.^{1,20}

Manifestasi klinis lain yang ditemukan adalah kriptokokosis kulit dan kriptokokemia. Pada kulit kelainan yang timbul tidak khas, dapat menyerupai kelainan kulit biasa, misalnya aknefom, menyerupai moluskum contagiosum, sampai kelainan kulit berat seperti selulitis atau abses.^{1,20}

Kriptokokosis pada penderita imunokompeten umumnya memiliki manifestasi klinis pulmoner meskipun kadang-kadang ditemukan kriptokokosis meningeal. Apabila terjadi kriptokokosis meningeal sering berhubungan dengan kelainan otak yang lain seperti hidrosefalus, atau kejang berulang.¹

Isolasi jamur yang dilakukan di departemen Parasitologi FKUI hingga saat ini belum mencapai identifikasi spesies, sehingga belum diketahui secara pasti spesies penyebabnya. Hal itu terjadi karena diperlukan diagnosis sesegera mungkin sebagai dasar pemberian terapi. Pemberian terapi dini akan mencegah kecacatan dan kematian. Untuk itu identifikasi sampai ke tingkat spesies dan serotipe sangat penting, mengingat patogenesis, manifestasi klinik, serta epidemiologi yang berbeda pada masing-masing spesies, sehingga hal itu akan sangat berperan dalam tatalaksana dan pencegahan penyakit.

Patogenitas *Cryptococcus* ditentukan oleh beberapa hal, antara lain kemampuan tumbuh pada suhu tinggi (37 - 40°C), kapsul polisakarida, dan produksi melanin.^{1,21} Faktor

tersebut disebut juga dengan faktor virulensi jamur.

Kemampuan jamur untuk tumbuh dan beradaptasi pada suhu normal tubuh manusia menjadi salah satu alasan spesies tersebut mampu menimbulkan kriptokokosis. Faktor virulensi lain adalah kapsul polisakarida, glucuronoxylomannan (GXM). Jamur mutan yang tidak berkapsul bersifat kurang virulen terhadap binatang percobaan. Faktor virulensi ketiga adalah pigmen melanin berwarna coklat gelap, yang dihasilkan dari pemecahan kompleks difenolik. Melanin melindungi jamur terhadap pengaruh sinar matahari di alam dan pengaruh sistem kekebalan manusia. Pada medium *niger seed/ bird seed agar* (NSA) yang mengandung kompleks fenol atau L-Dopa dapat diamati pembentukan melanin setelah jamur ditanam selama 5-7 hari. *Cryptococcus* tumbuh sebagai koloni ragi berwarna coklat gelap.^{1,21}

Untuk membedakan spesies *Cryptococcus* dapat dilakukan berdasarkan asimilasi dan fermentasi karbohidrat dengan API 20C System Kit. Jamur yang diinokulasikan pada sistem tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar (30°C) selama 72 jam. Setelah inkubasi hasil positif akan terlihat sebagai kekeruhan pada sumur karbohidrat yang ditumbuhi jamur.^{22,23,25}

Untuk membedakan *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii* dapat dilakukan secara biokimia dengan memakai medium biakan solid *canavanine-glycine-bromthymol blue* (CGB). *Cr. gattii*, serotipe B dan C mampu mengolah *glycine* sehingga terjadi perubahan warna, sedangkan *Cr. neoformans* tidak mengasimilasi *glycine*.³¹ Untuk membedakannya dari khamir lain terutama *Candida albicans* maka dilakukan uji pembentukan *germ tube*. Sel ragi/ khamir *Cryptococcus* tidak membentuk *germ tube* sebagaimana *C. albicans*.³⁰

Untuk membedakan *Cr. neoformans* serotipe A dan D jamur ditanam pada media agar *Creatinine dextrose bromthymol thymine* (CDBT). *Cr. neoformans* serotipe A tidak menyebabkan perubahan warna medium, sedangkan serotipe D menyebabkan medium berubah warna menjadi jingga terang dalam lima hari.^{4,31}

1. Bahan dan Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan di Departemen Parasitologi, Universitas Indonesia. Sampel yang diteliti dikumpulkan sejak Agustus 2007 - Juli 2008 yaitu 65 isolat *Cryptococcus* yang diisolasi dari pasien AIDS dengan kriptokokosis, terdiri dari 61 spesimen cairan otak, 2 spesimen kulit

dan 2 spesimen darah. Ada tiga aspek yang dipelajari, yaitu penelitian untuk menetapkan spesies dan serotipe, faktor virulensi, dan penelitian tentang data geografis dan demografis penderita.

Penelitian bagian pertama merupakan penelitian mikologi yang terdiri atas 1) Penelitian tentang uji asimilasi menggunakan kit API 20C AUX (Biomerieux - Prancis) untuk membedakan *Cryptococcus* dengan khamir lain dan *Cryptococcus* spesies lain. 2) Penelitian untuk membedakan khamir *Cryptococcus* dengan *Candida albicans* dengan melakukan uji pembentukan *germ tube* (*germ tube formation test*, GT) 3) Penelitian untuk membedakan *Cryptococcus neoformans* dan *Cr. gattii* dengan menumbuhkan jamur yang diteliti pada media *Canavanine Glycine Bromthymol blue* (CGB) 4) Penelitian untuk menetapkan serotipe *Cryptococcus* yaitu membedakan *Cr. neoformans varietas neoformans* (serotipe D) dan *Cr. neoformans varietas grubii* (serotipe A) dengan menumbuhkan jamur pada medium agar *creatinine dextrose bromthymol thymine* (CDBT). Penelitian bagian kedua merupakan penelitian tentang virulensi jamur yaitu mempelajari pembentukan pigmen melanin dengan menumbuhkan jamur pada medium kultur *niger seed agar* (NSA).

Pada penelitian bagian ke tiga akan dicatat informasi demografis dan geografis pasien untuk pemetaan wilayah penyebaran kriptokokosis.

2. Isolasi *Cryptococcus*

Untuk menemukan dan mengisolasi *Cryptococcus* dari cairan otak dilakukan pemeriksaan sebagai berikut :

1. Pemeriksaan langsung dengan tinta India:

Cairan otak diputar pada kecepatan 5000 rpm selama 5 - 10 menit, sehingga diperoleh endapan. Kemudian endapan diambil dengan sengkeli bulat steril, lalu dicampurkan dengan satu tetes tinta India (tinta Cina) diatas kaca objek, dan ditutup dengan kaca penutup. Selanjutnya sediaan dibaca dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x diteruskan dengan pembesaran 400x. Sediaan dinyatakan (+) *Cryptococcus* apabila ditemukan sel ragi berkapsul. Bila ditemukan jamur selanjutnya bahan klinik dibiak pada agar SDA.

2. Penanaman pada medium SDA:

Endapan diambil dengan sengkeli bulat steril. Selanjutnya sengkeli digoreskan pada seluruh permukaan medium SDA dan biakan diamati

setiap hari. Biakan dinyatakan positif apabila tampak pertumbuhan koloni ragi dalam waktu 3-10 hari. Bila dalam 10 hari tidak ada pertumbuhan biakan dianggap negatif.

Untuk menetapkan apakah koloni yang tumbuh memang *Cryptococcus*, dilakukan pemeriksaan mikroskopis dengan tinta India dengan cara sama seperti di atas.

3. Isolasi *Cryptococcus* dari bahan klinik lain (kulit, darah).

Bahan klinik langsung ditanam pada agar SDA. Untuk memastikan koloni yang tumbuh, untuk diletakkan pada kaca objek, lalu ditetaskan satu tetes tinta Cina (India), dan dicampurkan dengan bantuan sengkeli bulat diatas gelas objek. Sediaan ditutup dengan kaca penutup. Selanjutnya dilakukan pembacaan dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x dan 400x. Biakan dinyatakan (+) *Cryptococcus* apabila ditemukan sel ragi berkapsul.

4. Isolat koleksi Departemen Parasitologi FKUI : Dilakukan kultur ulang pada medium SDA dengan mengambil sedikit koloni *Cryptococcus* dari tabung biakan yang lama dan ditanam pada medium SDA yang baru.

Membedakan Spesies *Cr. neoformans* dari Khamir dan spesies *Cryptococcus* lain dengan Uji Asimilasi (Kit API 20C AUX)

Koloni *Cryptococcus* yang dipakai harus berumur 18 - 24 jam, sehingga harus dilakukan pembiakan ulang pada medium SDA. Selanjutnya dilakukan uji asimilasi karbohidrat seperti berikut ini:

a. Disiapkan 2 ml larutan NaCl sebagai media tanam.

b. Disuspensikan sedikit biakan *Cryptococcus* pada larutan NaCl tersebut sambil dihomogenisasi dengan bantuan sengkeli bulat steril. Kekeruhan suspensi dibandingkan dengan larutan McFarland 2 (standar).

c. Disiapkan nampan API 20C AUX, yang terdiri atas 20 sumur berisi karbohidrat yang berbeda-beda, dan tutup nampan yang tersedia. Sumur karbohidrat yang paling kiri merupakan kontrol negatif (tidak berisi karbohidrat). Di dasar sumur tampak garis merah untuk memudahkan pembacaan. Hasil pembacaan dicatat dan disesuaikan dengan pola yang terdapat dalam program API web software. Pembacaan dilakukan dengan mata telanjang, dengan bantuan garis merah di dasar tabung dan dibandingkan dengan kontrol negatif/ jernih. Sesuai dengan spesies yang tumbuh akan didapat pola asimilasi yang berbeda. Hasil pembacaan

disesuaikan dengan pola standar, sehingga spesies yang tepat dapat diketahui.

d. Suspensi jamur dalam NaCl diambil sebanyak 100 µl dengan pipet steril, dimasukkan dalam ampul API 20C AUX. Homogenisasi dilakukan dengan pipet dan tidak boleh terbentuk gelembung udara.

e. Selanjutnya inokulum dalam ampul medium API 20C AUX diteteskan dengan bantuan pipet steril ke dalam masing-masing sumur yang tersedia, dimulai dari tabung kontrol negatif di ujung kiri. Permukaan sumur setelah diisi harus cembung atau datar.

f. Nampan ditutup dengan penutup yang tersedia. Selanjutnya masing-masing nampan diberi label pada bagian tepi nampan dan diinkubasi pada suhu kamar (27 - 31°C).

Pengamatan dilakukan pada 48 jam dan 72 jam untuk melihat kekeruhan pada tabung. Pertumbuhan dicatat dan disesuaikan dengan pola yang terdapat dalam program API web software. Hasil positif bila tampak kekeruhan pada sumur yang telah diinokulasi jamur.

Uji fisiologik dengan *germ tube formation test* (GT test).

Untuk membedakan khamir *Cryptococcus* dengan *Candida albicans*, dilakukan penanaman *Cryptococcus* (koloni diambil dari biakan SDA berumur 24 - 72 jam) pada putih telur (2 ml). Dilakukan homogenisasi dengan sengkeliit lurus steril. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C, selama 2 - 3 jam. Setelah inkubasi dilakukan pemeriksaan mikroskopis untuk mencari *germ tube*, yaitu sel ragi bertunas panjang atau berkecambah. Khamir *Cryptococcus* tidak membentuk *germ tube*.

Membedakan *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii*

Untuk membedakannya digunakan media agar CGB dengan cara:

a. Sampel *Cryptococcus* dari medium SDA ditanam pada medium agar CGB. Penanaman ini dilakukan dalam ruang steril (*hood*) untuk menghindarkan kontaminasi.

b. Biakan diinkubasi pada suhu kamar. Diamati pertumbuhan jamur dan perubahan warna medium sampai lima hari.

Apabila koloni yang tumbuh adalah *Cryptococcus gattii*, medium berubah warna menjadi biru tembaga. Medium agar tetap berwarna kuning cerah apabila koloni yang tumbuh adalah *Cr. neoformans*.

Membedakan *Cr. neoformans* varietas *neoformans* (serotipe D) dan *Cr. neoformans* varietas *grubii* (serotipe A).

a. Untuk menanam pada medium agar CDBT sebelumnya isolat ditanam pada medium SDA. Jamur yang digunakan berumur 24 - 48 jam. Selanjutnya isolat ditanam pada agar CDBT dan diinkubasi pada suhu 28°C.

b. Pengamatan dilakukan selama lima hari. Apabila koloni yang tumbuh *Cr. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D), koloni yang tumbuh berwarna merah cerah diikuti dengan perubahan warna medium CDBT dari kuning terang menjadi oranye pada hari ke lima. Apabila koloni yang tumbuh *Cr. neoformans* var. *grubii* (serotipe A), koloni yang tumbuh berwarna pucat (krem jingga) dan warna medium tidak berubah.

Pembentukan pigmen melanin diamati dengan menumbuhkan jamur pada medium *niger seed agar* (NSA).

Semua sampel yang sudah dikultur pada medium SDA, selanjutnya dibiak pada agar NSA.

Caranya dengan mengambil sedikit isolat *Cryptococcus* dari medium SDA dengan sengkeliit steril berujung bulat. Kemudian sengkeliit digoreskan keseluruhan permukaan medium NSA. Biakan diinkubasi pada suhu kamar dan diamati setiap hari selama satu minggu. Hasil positif bila koloni yang tumbuh berwarna coklat tengguli, mukoid dengan permukaan halus.

Prosedur pengumpulan data demografis dan geografis

Data geografis dan demografis didapat dari catatan pasien dan bantuan Departemen Neurologi (FKUI-RSCM)

3. Hasil Penelitian

Selama kurun waktu penelitian sejak Agustus 2007 - Juli 2008 telah diteliti 65 isolat *Cryptococcus* yang diisolasi dari pasien AIDS dengan kriptokokosis. Pasien AIDS tersebut terdiri atas enam puluh satu orang penderita kriptokokosis meningeal, dua orang penderita kriptokokosis kulit, dan dua orang penderita kriptokokemia

Data Demografis dan geografis

Pasien AIDS yang menderita kriptokokosis terdiri atas 40 orang laki-laki dan 12 orang perempuan. Dari total 65 pasien hanya 52 orang yang disertai dengan data demografis. Kelompok usia antara 25 – 30 tahun merupakan kelompok usia terbanyak. Sebagian besar pasien bertempat tinggal di wilayah Jabodetabek dan sebagian kecil berasal dari Bandung.

Dari total 65 pasien yang diteliti, hanya 27 pasien yang disertai data alamat tempat tinggal (domisili). Pasien tersebut berasal dari berbagai wilayah di Jakarta. Di Jakarta Selatan dan Jakarta Timur masing-masing tujuh pasien, sedangkan wilayah lain berkisar antara satu sampai lima orang. Pasien dari Bandung tidak disertai data rinci tentang wilayah tempat tinggal.

Penelitian mikologi

Pengumpulan bahan dilakukan sejak Agustus 2007 – Juli 2008. Dari total 65 isolat yang diteliti, sebanyak 40 isolat merupakan isolat koleksi Departemen Parasitologi FKUI. Isolat tersebut diisolasi dari pasien AIDS dengan kriptokokosis. Sisanya adalah isolat yang diisolasi dari pasien AIDS dengan dugaan kriptokokosis yang bahan kliniknya dikirim ke Departemen Mikologi untuk kepentingan diagnosis. Bahan klinik yang diperiksa berupa 45 bahan cairan otak, dua spesimen kulit dan 2 spesimen darah penderita AIDS yang diduga kriptokokosis. Dari 45 bahan cairan otak yang diperiksa, sebanyak 21 isolat positif *Cryptococcus* dengan pemeriksaan tinta India (Gambar 1a). Sedangkan untuk isolasi jamur dari bahan klinik kulit dan darah langsung ditanam pada medium SDA. Pada medium tersebut jamur tumbuh sebagai koloni khamir berwarna putih krem, mukoid dengan permukaan halus (Gambar 1b). Baik pada pemeriksaan mikroskopis cairan otak dan koloni jamur dengan tinta India, ditemukan sel ragi bulat tunggal atau bertunas dan berkapsul/bersimpai.

Dari pemeriksaan *germ tube* terhadap 65 isolat klinik *Cryptococcus*, sesudah inkubasi dalam putih telur pada suhu 37°C selama 2-3 jam, didapatkan bahwa khamir yang diteliti tidak ada yang membentuk tunas berkecambah.

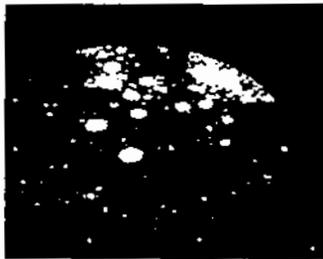
Sistem identifikasi dengan kit API 20C AUX berjalan dengan baik yang ditandai oleh kontrol negatif yang selalu negatif (jernih, tidak ada kontaminasi). Hasil pemeriksaan asimilasi karbohidrat (kit API 20C AUX-Biomérieux, Prancis), pada pengamatan 72 jam, didapatkan bahwa hampir seluruh isolat yang diteliti teridentifikasi sebagai *Cr. neoformans*. Setelah dirujuk pada API web software ternyata hasil identifikasi tidak mencapai 100 % (83 – 99%). Satu isolat teridentifikasi sebagai *Cryptococcus laurentii* (70,9%) dan *Cr. neoformans* (28,8%). Berdasarkan pola asimilasi karbohidrat (tabel 3), isolat tersebut sesuai dengan *Cr. laurentii*, tetapi ada perbedaan pada satu karbohidrat yaitu Methyl- α -D-glucopiranosid, menunjukkan reaksi negatif. Untuk memastikan hasil tersebut, pemeriksaan diulang dan memberikan hasil yang sama.

Hasil penetapan spesies *Cryptococcus* untuk membedakan *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii* memperlihatkan hasil bahwa 65 isolat yang diperiksa seluruhnya adalah *Cr. neoformans*. Pada medium agar CGB, tidak ditemukan pertumbuhan koloni dan perubahan agar menjadi biru terang (Gambar 3).

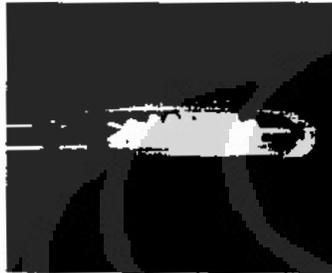
Hasil penetapan serotipe *Cryptococcus neoformans* (serotipe A dan D), menunjukkan seluruh sampel yang ditanam pada medium CDBT tumbuh sebagai koloni ragi yang berwarna kuning pucat. Hingga hari ke lima pengamatan tidak terjadi perubahan warna medium dari kuning terang menjadi jingga/oranye yang menunjukkan bahwa jamur tersebut *Cr. neoformans* var. *grubii* atau *Cr. neoformans* serotipe A (Gambar 4).

Penelitian Virulensi

Uji virulensi dilakukan dengan melihat pembentukan melanin pada agar NSA. Seluruh isolat membentuk melanin, yang terlihat dengan tumbuhnya koloni ragi berwarna coklat tengguli dengan permukaan halus pada medium tersebut setelah dua hari inokulasi pada suhu kamar (Gambar 5).



Gambar 1.a. Sel khamir *Cryptococcus*. Berkapsul/ simpat pada pemeriksaan tinta India (400x)



Gambar 1.b. Koloni khamir *Cryptococcus* pada medium agar SDA.



2b



2b

Gambar 2. a & b. Memperlihatkan perbedaan gambaran sel khamir (uji fisiologik) pada *germ tube test* antara *Candida sp* (atas) dan *Cryptococcus* (bawah).



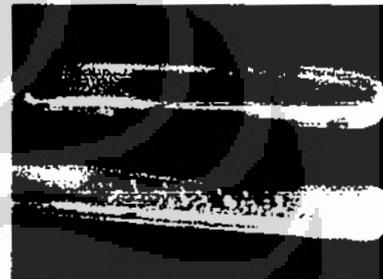
3.

Gambar 3. Koloni *Cr. neoformans* yang ditanam pada medium CGB. Hasil (-)



5.

Gambar 4. Biakan *Cryptococcus* pada medium CDBT. Hasil: pertumbuhan koloni kuning pucat, perubahan warna medium (-). *Cr. neoformans* serotipe A.



6.

Gambar 5. Koloni *Cryptococcus* pada medium NSA/ BSA. Tampak pertumbuhan koloni berwarna coklat. Pembentukan pigmen melanin (+).

4. Diskusi

Pada penelitian ini dilakukan penetapan spesies dan serotipe 65 isolat *Cryptococcus* yang diisolasi dari bahan klinik yang berasal dari penderita AIDS. Galur *Cryptococcus* tersebut sebagian merupakan isolat yang telah disimpan sebagai koleksi Departemen Parasitologi FKUI dan 25 isolat diisolasi dari bahan klinik yang berasal dari cairan otak, kulit dan darah penderita AIDS dengan kriptokokosis. Bahan klinik yang diteliti baik cairan otak, kulit, maupun darah berasal dari pasien AIDS penderita kriptokokosis. Pada pasien terinfeksi HIV terjadi penurunan CD_4^+ sampai pada titik kritis < 200 sel/ mm^3 . Pada kondisi diatas pasien AIDS mudah terinfeksi oleh *Cryptococcus* dan infeksi dapat menyebar dengan cepat karena rendahnya imunitas. Setelah di inhalasi maka *Cryptococcus* akan menyebar ke organ lain terutama otak, yang merupakan tempat predileksi. Pada pasien AIDS penyebaran terjadi lebih cepat dan dapat meluas ke berbagai organ selain otak.¹ Penelitian ini membuktikan bahwa kriptokokosis dapat

menyerang kulit, dan dapat menyebabkan kriptokokemia, selain meningitis.³⁸

Untuk menetapkan spesies dan serotipe dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan uji pembentukan *germ tube*, uji asimilasi karbohidrat dengan kit API 20C AUX, penetapan spesies dengan medium CGB, dan penetapan serotipe *Cr. neoformans* dengan medium CDBT. Penelitian tentang virulensi dilakukan dengan menumbuhkan jamur pada agar NSA. Juga dikumpulkan data demografis dan geografis penderita kriptokokosis di wilayah Jabodetabek dan Bandung untuk melihat penyebaran penyakit.

Golongan khamir, termasuk *Cryptococcus*, memerlukan sumber karbon untuk metabolismenya. Karbohidrat akan diasimilasi untuk mendapatkan karbon untuk kelangsungan hidupnya. Kemampuan *Cryptococcus* untuk mengasimilasi karbohidrat akan membentuk pola spesifik bergantung pada sifat biokimiawi yang sesuai dengan spesiesnya. Berdasarkan hal itu dipilih uji asimilasi untuk mengidentifikasi spesies *Cr. neoformans*. Kit API 20C AUX merupakan kit dengan deret gula untuk uji asimilasi. Uji tersebut positif apabila tampak kekeruhan pada sumur uji, yang merupakan tanda pertumbuhan jamur. Pembacaan dilakukan pada 48 jam, namun ada beberapa jenis karbohidrat yang proses asimilasinya lambat, sehingga untuk jenis karbohidrat yang mengalami proses asimilasi lambat, hasil baru dapat dibaca sesudah 72 jam.

Pembacaan kemudian disesuaikan dengan pola asimilasi dalam *database* yang ada dalam perangkat lunak API Software (Biomerieux, Francis), yaitu *analytical profile index* atau indeks analitik yang disusun membentuk nomor profil, dan selanjutnya memperlihatkan rujukan spesies yang diteliti. Dari seluruh sampel yang diteliti, sebanyak 64 isolat membentuk pola asimilasi yang sesuai dengan *Cr. neoformans*. Pembacaan hasil dengan API *web software* menunjukkan tingkat identifikasinya hanya 83 – 99%. Tingkat identifikasi yang tak mencapai 100% agaknya terletak pada variasi dalam spesies, yang tidak terbaca oleh sistem karena sistem dalam *database* tersebut kurang lengkap (Smith *et al*).³⁴ Selain itu kemampuan untuk mengasimilasi gula berbeda antar galur dalam spesies *Cryptococcus*. Misalnya arabinosa dapat memberikan hasil positif atau negatif, sehingga dalam penyesuaian dengan index analitik *software* tidak didapat hasil 100% identik.

Pembacaan dengan API *web software* menunjukkan satu isolat teridentifikasi sebagai

Cr. laurentii dengan tingkat kesamaan 70,9%. *Cr. neoformans* kesetaraannya hanya 29,1%. Pola asimilasi karbohidrat untuk isolat tersebut meskipun sesuai dengan *Cr. laurentii* namun memperlihatkan hasil negatif pada asimilasi methyl- α D-glucopiranoside (MDG). Pengulangan dengan kit yang sama memberikan hasil yang sama. Menurut Lodder²⁵ *Cr. laurentii* var. *laurentii* dapat memberikan reaksi negatif pada asimilasi MDG. Sehingga disimpulkan bahwa isolat tersebut adalah *Cr. laurentii* varietas *laurentii*. Varietas tersebut tidak dapat menggunakan MDG sebagai sumber karbon.

API *web software* menyatakan peluang identifikasi isolat tersebut sebagai *Cr. neoformans* hanya sebesar 29,1%. Hal itu mungkin karena pasien tersebut terinfeksi oleh galur *Cr. neoformans* yang memiliki pola genetik berbeda yang tidak terbaca oleh API *web software*. Hal itu misalnya terjadi pada *Candida nivariensis* yang akan teridentifikasi sebagai *Candida glabrata* pada uji asimilasi.³² Perbedaan saat ini hanya dapat dilakukan pada analisis molekular.

Kit API 20C AUX bukanlah kit yang berdiri sendiri. Oleh produsen dianjurkan untuk melakukan uji morfologi untuk pemastian identifikasi. Dalam penelitian ini dilakukan uji pembentukan *germ tube* untuk menegaskan bahwa jamur uji bukanlah *Candida*.

Uji pembentukan *germ tube* dilakukan dengan medium putih telur untuk merangsang pembentukan *germ tube*. Medium ini mudah diperoleh dan disiapkan, serta murah. Metode uji pembentukan *germ tube* pertama kali ditemukan oleh Reynolds dan Braude³³ sebagai uji fisiologik yang khas dan dibentuk oleh *C. albicans*. Selanjutnya diketahui bahwa selain oleh *C. albicans* *germ tube* juga dibentuk oleh *Candida tropicalis*³⁵, *Candida dubliniensis*³⁶ dan *Candida stelatoidea*³⁷

Khamir selain dari golongan *Candida* tidak membentuk tunas/ kecambah dengan uji tersebut. Pada uji pembentukan *germ tube* yang dilakukan dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa khamir yang diuji tidak ada yang membentuk *germ tube*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa khamir yang diuji bukan golongan *Candida*. Khamir *Cryptococcus* tidak membentuk tunas berkecambah, seperti pada sel khamir *Candida*.

Pada awalnya *Cr. neoformans* terdiri atas *Cr. neoformans* var. *neoformans* dan *Cr. neoformans* var. *gattii*. Kit API 20C AUX hanya dapat membedakan *Cr. neoformans* dari spesies lain seperti *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, dan lain-lain.³⁴ Saat ini *Cr. neoformans* var. *gattii* telah menjadi

spesies tersendiri^{2,3,5,6} sehingga diperlukan cara pemeriksaan lain untuk membedakan *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii*, yaitu media *canavanine glycine bromthymol blue* (CGB).³⁰ Medium CGB dibuat pertama kali dibuat untuk membedakan *Cr. neoformans*, var. *neoformans* (serotipe A dan D) dan *Cr. neoformans* varietas *gattii* (serotipe B dan C). Medium selektif tersebut dikembangkan oleh Kwon Chung *et al.*³⁰ yang berhasil membedakan *Cr. neoformans* serotipe A, D dan B, C berdasarkan kemampuan jamur menetralkan *L-canavanine*, yang bersifat toksik terhadap *Cr. neoformans* serotipe A, D. Hasil yang diharapkan adalah perubahan warna medium menjadi biru terang bila yang tumbuh adalah *Cr. gattii*, sedangkan *Cr. neoformans* tidak merubah warna medium. *Cryptococcus* spesies lain akan memperlihatkan perubahan warna medium dari kuning cerah menjadi hijau. Pada penelitian ini seluruh sampel yang diperiksa, tidak tumbuh, dan tidak terjadi perubahan warna medium CGB. Dapat disimpulkan bahwa seluruh isolat yang diteliti adalah *Cr. neoformans*, termasuk satu isolat yang teridentifikasi sebagai *Cr. laurentii* pada kit API. *Cr. neoformans* peka terhadap *L-Canavanine* yang terdapat dalam medium CGB sehingga tidak dapat tumbuh dan tidak menggunakan glisin sebagai sumber karbon, sehingga tidak terjadi perubahan warna.³⁰ Hal itu terjadi karena *Cr. neoformans* tidak memiliki sistem metabolisme yang mampu mengubah *canavanine* yang bersifat toksik, menjadi komponen senyawa non toksik, artinya tidak mampu menetralkan toksisitas *canavanine*. Jalur metabolisme khusus itu dimiliki oleh *Cr. gattii*. Sehingga pada medium CGB, spesies tersebut mampu tumbuh, selanjutnya untuk pertumbuhannya ia menguraikan *glycine* untuk mengambil karbon dari zat tersebut. Proses penguraian *glycine* yang menghasilkan karbon mengakibatkan kenaikan pH medium menjadi basa, sehingga mengembalikan warna indikator Bromtimol biru pada agar yang semula berwarna kuning muda.³⁰ Franzot *et al.*⁴ menyatakan ada serotipe baru yang tergabung dalam *Cr. neoformans*, yaitu *Cr. neoformans* varietas *grubii* atau *Cr. neoformans* serotipe A. Berdasarkan penetapan spesies dengan medium CGB dan kit API 20C AUX didapatkan bahwa hampir seluruh isolat yang diteliti adalah *Cr. neoformans*. Untuk itu perlu dilakukan uji penetapan serotipe dengan menggunakan medium CDBT. Medium selektif untuk penetapan serotipe *Cr. neoformans*. Medium tersebut mampu membedakan *Cr.*

neoformans var. *neoformans* (serotipe D) dan *Cr. neoformans* var. *grubii* (serotipe A). Seluruh sampel yang ditanam tumbuh sebagai koloni pucat kekuningan dan tidak mengubah warna medium menjadi jingga/ oranye. Sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat tersebut adalah *Cr. neoformans* var. *grubii* atau *Cr. neoformans* serotipe A. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian di berbagai negara yang menemukan bahwa penyebab utama kriptokokosis pada AIDS adalah *Cr. neoformans* var. *grubii* (serotipe A).⁴¹ Selain itu kriptokokosis pada AIDS juga dapat disebabkan oleh *Cr. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D), namun penyebarannya hanya terbatas di wilayah Eropa.⁴⁰ Sementara itu beberapa kasus kriptokokosis *gattii* pada AIDS dilaporkan di Afrika Selatan dan Amerika.^{27,39} *Cr. neoformans* serotipe A diketahui menyebabkan kriptokokosis pada penderita dengan gangguan imunitas terutama penderita AIDS. Gambaran klinis yang paling sering ditemukan pada penderita AIDS adalah meningitis,^{1,24} meskipun dapat ditemukan penyebaran ke organ lain seperti yang tercermin dalam bahan klinik yang digunakan dalam penelitian ini. Pada penelitian ini juga ditemukan bentuk klinis yang paling banyak yaitu meningitis. Kriptokokosis *neoformans* diketahui lebih sering menyebabkan meningitis dibandingkan dengan kriptokokosis *gattii*. Kriptokokosis *gattii* biasanya menyerang hospes imunokompeten meskipun pernah dilaporkan menyebabkan kelainan pada penderita AIDS. Kelainan yang disebabkan oleh *Cr. neoformans* biasanya terbatas pada selaput otak sedangkan kriptokokosis *gattii* juga menimbulkan kelainan parenkim misalnya massa pada otak. Adanya massa di otak dapat disalah diagnosis dengan penyebab lain misalnya toksoplasmosis pada AIDS yang biasanya menyebabkan tumor pada otak.⁴² Kelainan SSP yang disebabkan kriptokokosis *gattii* biasanya juga disertai dengan perdarahan paru sehingga gambaran klinisnya menjadi lebih berat.^{6,43} Hal itu penting dalam tatalaksana karena meskipun obat yang diperlukan sama, yaitu amfoterisin B dan flusitosin, namun penanganan pasien juga harus memperhatikan adanya perdarahan paru dan peningkatan tekanan intrakranial oleh massa di otak.^{6,27,43} Uji virulensi terhadap isolat yang diteliti menunjukkan bahwa semua isolat mampu membentuk pigmen melanin pada medium NSA. Pembentukan melanin menunjukkan bahwa isolat tersebut memproduksi melanin sebagai

faktor virulen. Pigmen melanin merupakan salah satu faktor virulensi jamur yang menentukan patogenitasnya terhadap hospes dan melindungi jamur terhadap pengaruh sistem kekebalan tubuh hospes. Selain itu pigmen melanin berfungsi melindungi *Cryptococcus* terhadap pengaruh sinar matahari dan oksidasi oleh lingkungan.^{1,21}

Dikembangkannya medium selektif bagi *Cryptococcus* berdasarkan beberapa hal, yaitu 1) *Cryptococcus* sp, *Cr. neoformans* tumbuh lebih lambat dibandingkan khamir lain 2) Sebagai medium identifikasi yang dapat membedakan *Cryptococcus*, khususnya *Cr. neoformans* dari khamir lain. Sehingga dalam medium selektif tersebut diberikan penambahan zat / substansi yang dapat merangsang pertumbuhan koloni *Cryptococcus*, mencegah pertumbuhan bakterial atau organisme penghambat pertumbuhan *Cryptococcus*, dan sekaligus memperlihatkan perbedaan identifikasi jamur tersebut dibandingkan dengan khamir lain. Penambahan Antibiotik dan medium dengan kadar pH yang rendah untuk mencegah pertumbuhan bakteri pengganggu. Faktor lain sebagai penghambat tumbuhnya jamur pengganggu adalah dengan melakukan inkubasi medium pada suhu 37°C dan penambahan bifenil 0,1% pada medium agar selektif *Cryptococcus*.¹

Bird seed agar atau *niger seed* agar (BSA / NSA), merupakan medium selektif *Cryptococcus*, yang pertama kali dikembangkan oleh Staib.⁴⁴ Medium tersebut mengandung tanaman *Guizotia abyssinica* (*bird seed*) yang memungkinkan *Cr. neoformans*, membentuk melanin dari *bird seed*. Selain untuk mengetahui pembentukan faktor virulen koloni khamir berwarna coklat hingga coklat gelap (coklat tengguli) dapat bersifat untuk identifikasi *Cryptococcus*. Dalam penelitian lain oleh Currie *et al*⁴⁵ berhasil pula dikembangkan medium *bird seed* dengan penambahan bifenil dan L-Dopa. L-Dopa berfungsi mempercepat pembentukan pigmen melanin.¹

Dari hasil pencatatan demografis, ternyata sebagian besar penderita AIDS dengan kriptokokosis adalah laki-laki yang tinggal di Jakarta dan sekitarnya. Laki-laki memiliki peluang untuk mendapatkan kriptokokosis karena dua hal. Kriptokokosis adalah penyakit yang berasal dari lingkungan,^{3,48} dan laki-laki dianggap lebih terpajan terhadap lingkungan. Selain itu, melihat bahwa jumlah laki-laki penderita AIDS lebih banyak maka laki-laki yang terpajan tentu lebih banyak dibandingkan perempuan. Alasan kedua, diketahui bahwa estrogen menghambat pertumbuhan jamur secara

*in vitro*⁴⁶, sehingga kriptokokosis pada perempuan lebih sedikit.⁴⁷

Usia 25 – 30 tahun merupakan kelompok terbanyak, diikuti kelompok usia 20-24 tahun. Selama ini diketahui untuk Jakarta dan sekitarnya penderita AIDS berada pada rentang usia tersebut. Hal itu tidak berbeda dengan penelitian Mboi dan Smith⁴⁹ yang menyatakan bahwa infeksi HIV di Jabodetabek berhubungan dengan penggunaan narkoba suntik pada usia remaja yang memungkinkan infeksi HIV. Pasien akan memasuki fase AIDS dalam waktu 5-10 tahun kemudian.

Berdasarkan domisili pasien AIDS dengan kriptokokosis ternyata penderita tinggal di wilayah Jabodetabek, Bogor dan Bandung. Di Jakarta, pasien tersebar di lima wilayah DKI Jakarta, dan yang terbanyak di Jakarta Selatan dan Jakarta Timur. Di Bandung ada 4 pasien dan Bogor 1 pasien. Di wilayah Tangerang dan Depok tidak tercatat ada penderita AIDS dengan kriptokokosis. Penyebaran tersebut tampaknya lebih luas daripada hal yang tercatat, karena dari 65 pasien hanya 27 pasien yang disertai data domisili yang jelas. Sehingga besar kemungkinan penyebaran pasien juga meliputi Tangerang dan Depok, mengingat bahwa pasien AIDS terdistribusi di seluruh wilayah Jabodetabek. Hal itu menunjukkan bahwa sumber penularan kriptokokosis ditemukan di semua wilayah tersebut. Di Jakarta dan Bekasi telah diisolasi *Cryptococcus* pada kotoran merpati.²⁸ Tampaknya sumber infeksi juga terdapat di daerah pasien tersebut berdomisili. Saat ini diketahui sumber infeksi *Cryptococcus* lain, misalnya debu rumah, pepohonan, sarang lebah dan buah-buahan.^{26,29} Sumber infeksi juga mungkin berada di sekitar tempat tinggal penderita AIDS dengan kriptokokosis. Hal itu perlu diteliti lebih jauh sehingga sumber penularan dapat diidentifikasi. Didokumentasikannya habitat *Cryptococcus*, di alam memungkinkan untuk dilakukan upaya pencegahan.

Daftar Pustaka

1. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC: ASM Press;1998
2. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceed Nation Acad Sci* 2004; 101 (49): 17258-63
3. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1642-1644
4. Franzot S, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:838-40
5. Duncan C, Schwantje H, Campbell SC, Bartlett K. *Cryptococcus gattii* in wildlife of Vancouver Island, British Columbia, Canada. *J Wildlife Dis* 2006;42(1):175-8
6. Taylor MB, Chadwick D, Barkham T. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a patient in Singapore. *J Clin Microbiol* 2002;28:3098-9
7. Lacaz C, Heins-Vaccari EM, Hernandez-Arriagada GL, Martins E, Prearo C, Corim SM, Martins M. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002;44(4):225-8
8. Cheng MF, Chiou CC, Liu YC, Wang HZ, Hsieh KS. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1608-1611
9. Ellis D. *Cryptococcus albidus*. Diunduh dari http://www.mycology.adelaide.au/fungal_descriptions/yeasts/Cryptococcus/C_albidus.html 28/11/2008
10. Garelick JM. Scleral ulceration caused by *Cryptococcus albidus* in a patient with acquired immune deficiency syndrome *Cornea* 2004;23:730-1
11. Olivares LRC, Espinosa RA, Santos GRP, Martinez RL. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in Mexico and their comparison with some Latin American Countries. *Rev Lat-amer Microbiol* 2000;42:35-40
12. Kordosis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, Legakis NJ. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococemia in AIDS patients. *Med Mycol* 1998; 36: 335-9
13. Inverarity D, Bradshaw Q, Wright P, Grant A. The Spectrum of HIV related disease in rural Central Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 2002;33(4): 822-31
14. Likasitwattanukul S, Poneprasert B, Sirisanthana V. Cryptococcosis in HIV-infected children. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 2004;35 (4): 935-9
15. Milogo A, Ki-Zerbo GA, Andonaba JB, Lankoandé D, Sawadogo A, Yaméogo I, et al. Cryptococcal meningitis in HIV-infected patients at Bobo-Dioulasso hospital (Burkina Faso). *Bull Soc Pathol Exot* 2004: 119-21
16. Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Laporte A, French *Cryptococcosis* study group. Epidemiology of *Cryptococcosis* in France: A-9-Year Survey (1985-1993) *Clin Inf Dis* 1996;23: 82-90
17. Lakshmi V, Sudha T, Teja VD, Umabala P. Prevalence of central nervous system cryptococcosis in human immunodeficiency virus reactive hospitalized patients. *Indian J Med Microbiol* 2007;25:146-149
18. Micol R, Lortholary O, Sar B, Laureillard D, Ngeth C, Dousset J, et al. Prevalence, determinant of positivity, and clinical utility of cryptococcal antigenemia in Cambodian HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45(5):55-9
19. Syam R, Adawiyah R, Wahyuningsih R. Deteksi *Cryptococcus neoformans* pada pemeriksaan cairan otak penderita HIV/AIDS: morfologik dan serologic. disampaikan pada symposium Parasitologi, Juni 2007
20. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995;8 (4):515-48
21. Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. *Synopses*.1998;4 (1):71-80
22. Buesching WJ, Kurek K, Roberts GD. Evaluation of the modified API 20C system for identification of clinically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1979;9(5):565-9
23. Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6):1967-70
24. Baddley JW, Dismukes WE. *Cryptococcosis*. In Dismukes WE, Pappas PG, Sobbel JD, editors. *Clinical Mycology*. New York: Oxford University Press;2003.p.188-48

25. Lodder J. 2nd Ed. The yeasts: a taxonomic study. 2nd ed. North Holland Publishing Company, 1970
26. Sorell TC, Ellis D. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol 1997;14:42-3
27. Chaturvedi S, Dyavaiah M, Larsen RA, Chaturvedi V. *Cryptococcus gattii* in AIDS patients, southern California. Emerg Infect Dis 2005; 11 (11):1686-92
28. Baroni F, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB, Gambale W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 2006;48(2):71-5
29. Wahyuningsih R. Diagnosis kriptokokosis: pemeriksaan mikologi dan interpretasinya. Maj Kedok Indon. 2005;12:730-3
30. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennet JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus gattii* (serotypes B and C). J Clin Microbiol. 1982;15(3): 535-7
31. Ellis D, Davis S, Alexiou A, Handke R, Bartley R. Descriptions of medical fungi. 2nd ed. Adelaide: Nexus Print Solution;2007.p.52-4
32. Wahyuningsih R, Sahbandar IN, Theelen B, Hagen F, Poot G, Meis JF, Rozalyani A, Syam R, Boekhout T. *Candida nivariensis* isolated from an Indonesian human immunodeficiency virus infected patient suffering from oropharyngeal candidiasis. J Clin Microbiol. 2008; 46:388-91
33. Reynolds R, Braude A. The filament-inducing property of blood for *Candida albicans*: its nature and significance. Clin Res Proc 1956;4:40.
34. Smith MB, Dunklee D, Vu H, Woods GL. Comparative Performance of the RapID Yeast Plus System and the API 20C AUX Clinical Yeast System. J Clin Microbiol 1999;37(8): 2697-98
35. El Jannah SM. Identifikasi isolat *Candida* dari berbagai bahan klinik dengan CHROMagar *Candida* dibandingkan metode konvensional 2004. Tesis. Universitas Indonesia
36. Park BG, Lee MK. Appropriate condition of germ tube formation as presumptive identification test for *Candida albicans*. Korean J Med Mycol 2008; 13(1): 20-5
37. Casal M, Linares MJ. Preliminary evaluation of a new test for the rapid differentiation of *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. Mycopathologia 1983; 81(1): 63-4
38. Pasqualotto AC, Severo CB, Oliveira FM, Severo LC. Cryptococemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiological agent. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 143-46
39. Karstaldt AS, Grewe-Brown HH, Dromer F. Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*, serotype C in AIDS patients in Soweto, South Africa. Med Mycol 2002; 40: 7-11
40. Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated meningitis. AIDS 2007; 21: 2119-29
41. Charlier C, Dromer F, Lévêque C, Chartier L, Cordoliani YS, Fontanet A, et al. Cryptococcal neuroradiological lesions correlate with severity during cryptococcal meningoencephalitis in HIV-positive patients in the HAART era. Plos one 2008; 3(4): 1-7
42. Halonen SK. Immune response to *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. In: Lindsay DS, Weiss LM, editors. Opportunistic infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004: 67-88
43. Colom MF, Frasés S, Ferrer C, Jover A, Andreu M, Reus S, et al. First case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in Spain. J Clin Microbiol 2005; 43(7): 3548-50
44. Staib F. The perfect state of *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidiella neoformans*, on pigeon manure filtrate agar. Zentralbl bakteriol Hyg Abt 1 Orig 1981; 248: 575-8
45. Currie BP, Freundlich LF, Casadevall A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical isolates in New York City. J Clin Microbiol 1994; 32: 1188-92
46. Diamond RD. Effects of stimulation and suppression of cell-mediated immunity on experimental cryptococcosis. Infect Immun 1977; 17: 187-94
47. Levitz SM. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. Rev Infect Dis 1982; 53: 283-92
48. Ellis D, Pfeiffer TJ. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. Eur J Epidemiol 1992; 8: 321-325
49. Mboi N, Smith KH. Current status of HIV/AIDS in Indonesia and prospect for its spread. Dalam: 'Indonesia,' fighting a rising tide: the response to AIDS in East Asia. Yamamoto T, Itoh S penyunting. Tokyo: Japan center for international exchange 2006.p.96-118



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat

Pos Box 1358 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236 Fax. : 31930372, 3157288 e-mail : office@fk.ui.ac.id

NOMOR : *SIL* /PT02.FK/ETIK/2008

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL — CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:
The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:

"PENETAPAN NILAI BATAS ANTIGEN GLUCURONOXYLOMANNAN (GXM) PADA PASIEN AIDS DENGAN KRIPTOKOKOSIS MENINGEAL"

Peneliti Utama : dr. ROBIATUL ADAWIYAH
Name of the principal investigator

Nama Institusi : PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK FKUI

dan telah menyetujui protocol tersebut di atas.
and approved the above mentioned proposal.

Jakarta, 8 September 2008



Chairman
Ketua

Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

RIWAYAT HIDUP



1. **Nama Lengkap** : dr. Zaira Naftassa
2. **NPM** : 6105012127
3. **Tempat/Tanggal Lahir** : Jakarta/ 30 Oktober 1977
4. **Agama** : Islam
5. **Alamat tinggal** : Jl. Pondok Kelapa III A9/ 7, Jakarta Timur
6. **Pekerjaan** : Dokter umum
7. **Riwayat Pendidikan**
 - Sekolah Dasar Negeri 05 Jakarta Timur tahun 1990
 - Tamat Sekolah Menengah Pertama Negeri 252 Jakarta tahun 1993
 - Tamat Sekolah Menengah Umum Negeri 81 Jakarta tahun 1996
 - Profesi Dokter dari FK Trisakti Jakarta tahun 2004
8. **Riwayat Pekerjaan** : Dosen pembantu STIKES Thamrin, Pondok Gede, Jakarta (tahun 2005)
9. **Pengalaman Penelitian** : Penetapan Spesies dan Varietas *Cryptococcus* yang diisolasi dari Penderita AIDS dengan Kriptokokosis (Tesis, 2008)
10. **Publikasi** : -
11. **Sumber Dana Penelitian**
Tesis PMIB FKUI : Sebagian dana sendiri, dan didanai Bagian Parasitologi FKUI

Jakarta, 15 Desember 2008

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Zaira Naftassa', written over a faint watermark of a traditional Indonesian motif.

(Zaira Naftassa)