

**MIKROSPORIDIA PADA PENDERITA AIDS DENGAN
DIARE KRONIS DI JAKARTA**

TESIS

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

**ESY MARYANTI
NPM: 0606000075**



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

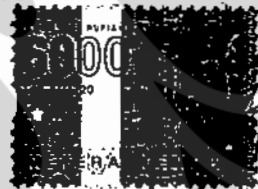
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Esy Maryanti

NPM : 0606000075

Tanda Tangan :



Tanggal : 24 Oktober 2008

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh


Nama : Esy Maryanti
NPM : 0606000075
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi
Judul Tesis : Mikrosporidia pada Penderita AIDS dengan Diare Kronis di Jakarta

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 : dr. Agnes Kurniawan, Ph.D,SpParK ()

Pembimbing II : dr. Lisawati Susanto, MS,SpParK ()

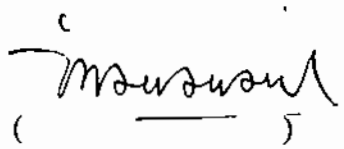
Penguji I : Prof.Dr.dr.Retno Wahyuningsih,MS,SpParK ()

Penguji II : Dr.dr. Aida SD Suriadiredja, SpKK ()

Penguji III : dr. Budiman Bela, SpMK ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 24 Oktober 2008

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI
Dr.rer physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi ()

Kata Pengantar

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Mikrosporidia pada Penderita AIDS dengan Diare Kronis di Jakarta” sebagai syarat menyelesaikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terimakasih kepada Dr. dr. Ratna Sitompul,SpM(K), sebagai Dekan FKUI yang telah memberi kesempatan penulis untuk menuntut ilmu di FKUI. 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. Ucapan terimakasih penulis tujukan kepada Dra.Hendri Astuti, MS. sebagai ketua kekhususan Parasitologi atas nasehat dan motivasi selama pendidikan.

Penghargaan dan ucapan terimakasih sedalam-dalamnya kepada dr.Agnes Kurniawan,PhD,SpParK sebagai pembimbing I tesis dan Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, dukungan dan motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini. Penghargaan dan ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada dr.Lisawati Susanto,MS,SpParK sebagai pembimbing II tesis yang telah memberikan bimbingan dalam penyelesaian tesis ini. Terimakasih penulis haturkan juga kepada Prof.dr.Saleha Sungkar,MS, DAP&E sebagai Kepala Departemen Parasitologi FKUI.

Terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya tidak lupa penulis sampaikan kepada semua dosen Departemen Parasitologi yang telah banyak memberikan ilmunya kepada penulis. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada pihak British Council proyek penelitian Del PHE 73 yang telah membiayai penelitian ini.

Kepada Apa dan Ama yang telah memberikan dukungan, nasehat, dan doa-doa yang tulus sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan ini, juga kepada saudara-saudaraku elda, eva, dan dodi atas dukungannya. Terimakasih juga penulis ucapkan kepada seseorang yang selalu memberikan semangat,

motivasi, hiburan dan doanya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Tidak lupa ucapan terimakasih kepada pimpinan dan rekan-rekan di FK Unri dan kepada mbak adah, dwi, rudina, nieni, kak nina, suri, uul, ika, cici, vita, erwin, fregi, jano dan teman-teman Pasca Sarjana Biomedik lainnya.

Penulis sadar tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Semoga tesis ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan.

Jakarta, Oktober 2008



(Esy Maryanti)

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

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

Nama : Esy Maryanti
NPM : 0606000075
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:

Mikrosporidia pada Penderita AIDS dengan Diare Kronis di Jakarta

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 : 24 Oktober 2008

Yang Menyatakan



(Esy Maryanti)

ABSTRAK

Nama : Esy Maryanti
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi
Judul : Mikrosporidia pada Penderita AIDS dengan Diare Kronis di Jakarta

Mikrosporidia merupakan *emerging parasite* pada manusia yang dapat menyebabkan kelainan intestinal, muskular, okular dan sistemik. Infeksi mikrosporidia terutama terjadi pada penderita HIV/AIDS, dan yang sering dilaporkan yaitu mikrosporidiosis intestinal dengan gejala diare kronis dan *wasting syndrome* yang akan memperberat keadaan penderita AIDS. Di Indonesia sampai saat ini belum ada data-data mikrosporidia dan infeksi yang ditimbulkannya, sedangkan kasus HIV/AIDS makin bertambah secara cepat dan merupakan suatu ancaman global. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis di Jakarta dan korelasi jumlah CD4 dengan densitas mikrosporidia. Sebanyak 126 sampel tinja penderita AIDS dengan diare kronis yang dirujuk ke Laboratorium Parasitologi FKUI dari berbagai Rumah Sakit di Jakarta diperiksa dengan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop dan dihitung densitas spora mikrosporidia. Pada penelitian ini diperoleh prevalensi mikrosporidiosis intestinal sebesar 7,1% dengan pewarnaan kromotrop standar dan 6,3% dengan *quick-hot* gram kromotrop serta tidak terdapat perbedaan bermakna antara kedua teknik tersebut ($p=1,00$). Terdapat korelasi yang negatif antara densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4 ($p=0,00$; $r=-0,979$). Dari penelitian ini dapat disimpulkan prevalensi mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis cukup rendah. Teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop dapat digunakan untuk mendeteksi mikrosporidia pada tinja. Pada penderita AIDS dengan jumlah CD4 yang rendah didapatkan densitas mikrosporidia yang tinggi.

Kata kunci:

Mikrosporidiosis intestinal, diagnosis, modifikasi trikrom, CD4.

ABSTRACT

Name : Esy Maryanti
Study Program : Biomedic Science (Major Parasitology)
Title : Microsporidia in AIDS Patients with Chronic Diarrhoea in Jakarta

Microsporidia is an emerging parasite in human which infect gastrointestinal tract, muscular, ocular and systemic. Microsporidia infection is primarily a disease of HIV/AIDS patients. Intestinal microsporidia is most common infection and associated with chronic diarrhoea and wasting syndrome which worsened patient condition. Until now, there is no available data on this parasite in Indonesia. The objective of this study was to determine the prevalence of intestinal microsporidia among the AIDS patient with chronic diarrhoea in Jakarta and to determine the correlation between microsporidia's density and CD4 count. A number of 126 stools from AIDS patients with chronic diarrhoea referred to Parasitology Laboratory FKUI were examined by standard chromotrope staining and quick-hot gram chromotrope. The result showed the prevalence of intestinal microsporidia is 7.1% by standard chromotrope staining and 6.3% by quick-hot gram chromotrope. There is no significant difference between positive cases microsporidia ($p=1.00$). A negative correlation between the density of microsporidia and CD4 cell counts ($p=0.00$; $r=-0.979$) was observed. In conclusion prevalence of microsporidia among AIDS patients with chronic diarrhoea is low. Standard chromotrope staining and quick-hot gram chromotrope can be used to detect microsporidia. The density of microsporidia was higher in patient with low CD4 cell counts.

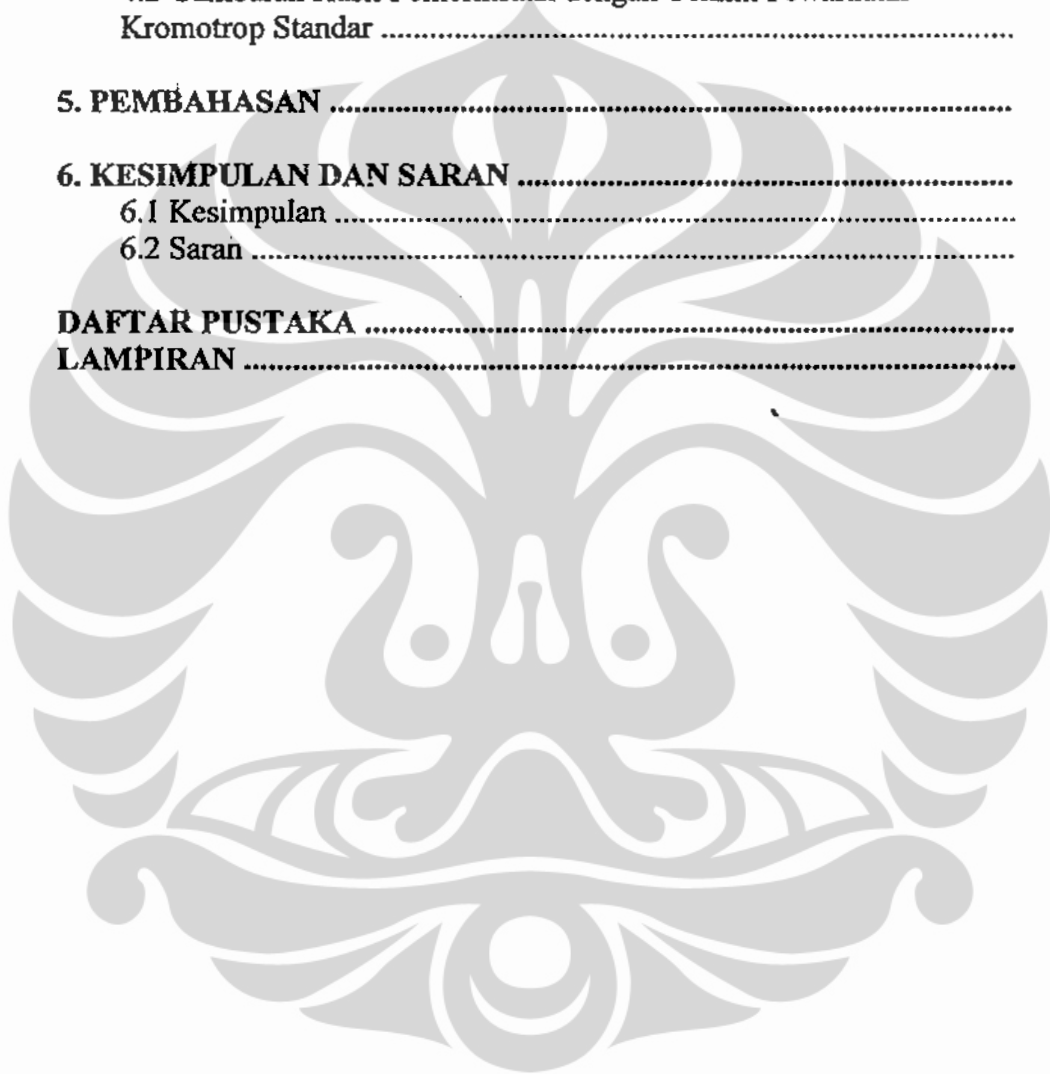
Key words:

Intestinal microsporidiosis, diagnosis, modified trichrome stain, CD4 count.

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	4
1.4 Manfaat	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Biologi Mikrosporidia	6
2.1.1 Karakteristik Mikrosporidia	6
2.1.2 Siklus Hidup Mikrosporidia	7
2.1.3 Spesies yang Menginfeksi Manusia	9
2.1.4 Habitat pada Manusia	9
2.1.5 Infeksi dan Penyakit	10
2.2 Epidemiologi Mikrosporidiosis	11
2.2.1 Distribusi Geografis dan Prevalensi pada Manusia	11
2.2.2 Sumber Infeksi dan Cara Transmisi	12
2.3 Diagnosis Mikrosporidiosis	14
2.3.1 Uji Molekuler	14
2.3.2 Uji Serologi	15
2.3.3 Pemeriksaan Mikroskopis	15
3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Desain Penelitian	19
3.2 Lokasi Penelitian	19
3.3 Sampel Penelitian	19
3.4 Besar Sampel	19
3.5 Pengumpulan Sampel	20
3.6 Pemeriksaan Tinja	20
3.6.1 Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar	20
3.6.2 Teknik Pewarnaan <i>Quick-hot</i> Gram Kromotrop	22
3.7 Penilaian Hasil Kerja	24
3.8 Definisi Operasional	24
3.9 Analisis dan Pengolahan Data	25
3.10 Alur Penelitian	26

4. HASIL PENELITIAN	27
4.1 Hasil Pewarnaan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar dan <i>Quick-hot</i> Gram Kromotrop	27
4.1.1 Kualitas Pulasan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar	27
4.1.2 Kualitas Pulasan dengan Teknik Pewarnaan <i>Quick-hot</i> Gram Kromotrop	28
4.1.3 Waktu Proses Pewarnaan dan Waktu Pemeriksaan	28
4.2 Gambaran Hasil Pemeriksaan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar	29
5. PEMBAHASAN	32
6. KESIMPULAN DAN SARAN	37
6.1 Kesimpulan	37
6.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	43

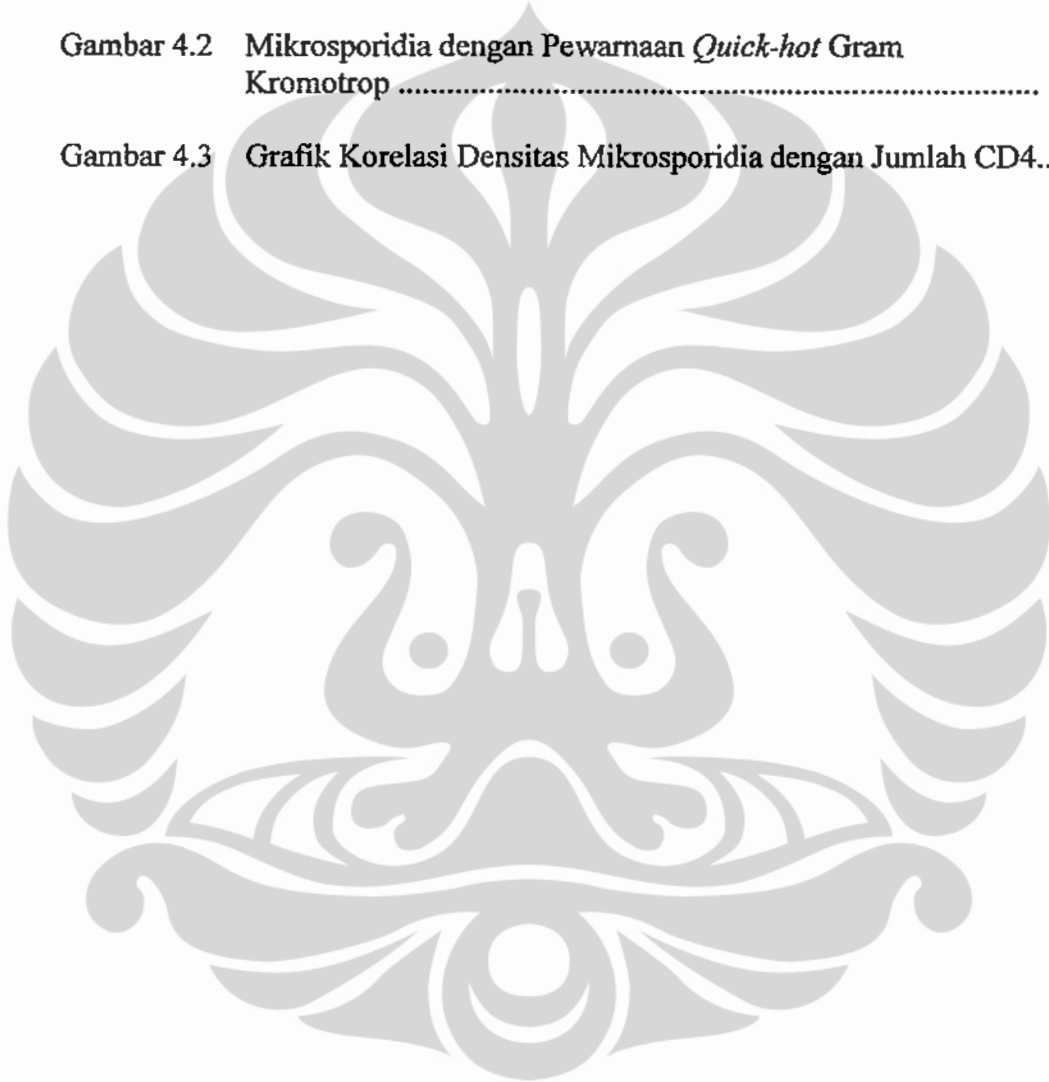


DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Family, Genus dan Spesies Mikrosporidia yang Menginfeksi Manusia	9
Tabel 2.2	Habitat Spesies Mikrosporidia yang Menginfeksi Manusia	9
Tabel 4.1	Hasil Pembacaan Sediaan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar dan <i>Quick-hot</i> Gram Kromotrop	29
Tabel 4.2	Hasil Pemeriksaan Berdasarkan Karakteristik Penderita AIDS dengan Diare kronis	30
Tabel 4.3	Densitas Mikrosporidia, Jumlah CD4 dan Parasit Usus Lain yang Ditemukan pada Sampel Positif Mikrosporidia	30
Tabel 4.4	Nilai Korelasi Densitas Mikrosporidia dengan Jumlah CD4	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Mikrosporidia	7
Gambar 2.2	Siklus Hidup Mikrosporidia	8
Gambar 4.1	Mikrosporidia dengan Pewarnaan Kromotrop Standar	27
Gambar 4.2	Mikrosporidia dengan Pewarnaan <i>Quick-hot</i> Gram Kromotrop	28
Gambar 4.3	Grafik Korelasi Densitas Mikrosporidia dengan Jumlah CD4..	31



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) merupakan penyakit imunodefisiensi didapat yang disebabkan oleh *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). HIV adalah virus retro yang menginfeksi sistem imun terutama sel T CD4 yang memiliki reseptor dengan afinitas tinggi untuk HIV. Jumlah penderita AIDS di dunia semakin hari semakin bertambah. Dilaporkan lebih dari 40 juta orang di dunia telah terinfeksi oleh HIV.¹ Di Indonesia sampai bulan Maret tahun 2008 telah dilaporkan peningkatan jumlah kasus AIDS mencapai 11868 kasus dan HIV positif sebanyak 6130 kasus.²

Diare merupakan salah satu gejala yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas tinggi pada penderita yang terinfeksi dengan HIV. Diare inilah yang menjadi salah satu alasan penderita AIDS datang berobat.³ Diare dapat disebabkan oleh berbagai macam organisme seperti virus, bakteri, parasit maupun jamur. Mikrosporidia merupakan salah satu parasit yang ditemukan pada tinja penderita AIDS dengan diare kronis. Dilaporkan 5-50% penderita diare kronis tersebut terinfeksi dengan mikrosporidia.⁴

Mikrosporidia merupakan parasit obligat intraselular yang dapat menyebabkan infeksi pada hewan dan manusia.⁵ Parasit ini sudah ditemukan lebih dari seratus tahun yang lalu pada hewan. Pada tahun 1922 mikrosporidia dilaporkan pertama kali menginfeksi vertebrata yaitu pada tikus dan kemudian pada tahun 1959 pertama kali parasit ini dilaporkan dapat menginfeksi manusia.⁶

Saat ini diketahui ada 14 spesies mikrosporidia yang dapat menginfeksi manusia terutama pada individu imunokompromais.⁷ Diantara 14 spesies tersebut, *Enterocytozoon bieneusi* dan *Encephalitozoon intestinalis* merupakan mikrosporidia yang tersering ditemukan pada penderita AIDS dan diantara dua spesies itu *Enterocytozoon bieneusi* yang paling banyak dilaporkan.⁸

Mikrosporidiosis adalah penyakit yang disebabkan oleh mikrosporidia dan merupakan *an emerging and opportunistic infection* pada manusia.⁷ Dulu penyakit ini masih merupakan penyakit yang tidak umum pada manusia sampai terjadinya

kasus pandemi AIDS pada tahun 1985, dimana dilaporkan kasus pertama mikrosporidiosis pada penderita AIDS. Sejak saat itu sampai tahun 1994 lebih dari 400 kasus mikrosporidiosis dilaporkan pada penderita AIDS dan kemudian dinyatakan bahwa mikrosporidia merupakan patogen oportunistik pada penderita AIDS.⁵

Pada tahun 1999 di Perancis dilaporkan 26% kasus mikrosporidiosis intestinalis pada penderita AIDS,⁹ di Thailand pada tahun 1998 sampai 2001 dilaporkan oleh Wanachiwanawin *et al* dikutip dari Mungthin M (2006), rata-rata prevalensi infeksi *Enterocytozoon bieneusi* 11-33% pada penderita AIDS dewasa, dan 10,8-25,3% pada penderita HIV anak.¹⁰ Pada tahun 2000 dan 2001 di Zimbabwe dan Guinea Bisseau terdapat 18% dan 11% kasus mikrosporidiosis intestinalis pada penderita AIDS dengan diare kronis.¹¹ Di India tahun 2005 terdapat 10% kasus infeksi mikrosporidiosis intestinal pada penderita AIDS dengan diare kronis.¹²

Sebelum ada ART (*Antiretroviral Therapy*), prevalensi mikrosporidiosis intestinal tinggi pada penderita AIDS dengan diare kronis,¹³ antara lain di Columbia pada tahun 1992 dilaporkan sebanyak 32% kasus mikrosporidiosis pada penderita AIDS dengan diare kronis.¹⁴ Sejak digunakannya ART pada tahun 1995-1996, prevalensi mikrosporidiosis intestinal pada penderita HIV/AIDS di negara-negara maju menurun.¹³ Di negara-negara berkembang seperti Afrika dimana penggunaan ART masih terbatas prevalensi mikrosporidiosis intestinal masih tinggi,¹⁵ sedangkan di Indonesia sampai sekarang data-data tentang mikrosporidiosis belum pernah dilaporkan.

Selain pada penderita HIV/AIDS, mikrosporidiosis juga dilaporkan terdapat pada penderita penyakit keganasan seperti *acute myeloid leucemia* (AML). Di Malaysia tahun 2004 dilaporkan 93 kasus mikrosporidiosis intestinal pada penderita yang dirawat di salah satu rumah sakit, 28 diantaranya terdapat pada penyakit keganasan terutama AML.¹⁶

Pada individu yang imunokompeten, mikrosporidiosis intestinal juga pernah dilaporkan yaitu 9 dari 148 pelancong dengan diare (*traveler's diarrhea*) di Jerman pada tahun 2001.¹⁷ Di Austria tahun 2005 dilaporkan terdapat 21 kasus mikrosporidiosis pada pelancong dengan diare kronis.¹⁸

Gejala klinis mikrosporidiosis tergantung dari organ yang diinfeksi, dapat berupa kelainan intestinal, okular, muskular dan sistemik, yang lebih sering pada penderita HIV/AIDS adalah mikrosporidiosis intestinal dengan gejala diare kronis dan *wasting syndrome*. Diare bisa terjadi tiga sampai tujuh kali perhari bahkan bisa lebih dari 20 kali per hari, tinja lunak atau encer tanpa darah, kadang demam, anoreksia, mual, muntah dan penurunan berat badan sekitar 2 kg/bulan. Diare yang berkepanjangan disertai penurunan berat badan akan berlanjut menjadi kaheksia merupakan faktor yang mempercepat terjadinya kematian pada penderita AIDS.^{5,19}

Respons imun seluler mempunyai peran utama dalam mengontrol infeksi mikrosporidia.²⁰ Mikrosporidiosis yang disebabkan oleh *E.bieneusi* lebih sering terjadi pada penderita dengan imunodefisiensi seluler berat yaitu bila jumlah CD4 turun yaitu $<100\text{sel/mm}^3$.²¹ Pada tahun 1998 di California dilaporkan dari 37 penderita AIDS dengan diare yang disebabkan oleh mikrosporidia, 20 diantaranya mempunyai jumlah sel $\text{CD4} \leq 49/\text{mm}^3$ dan 11 orang yang mempunyai $\text{CD4} \geq 100/\text{mm}^3$.²² Dilaporkan juga bahwa diare yang disebabkan oleh *E.bieneusi* bersifat *self-limiting* pada penderita HIV dengan jumlah sel $\text{CD4} > 100\text{ sel/mm}^3$.¹⁷

Diagnosis mikrosporidiosis intestinal yaitu dengan menemukan mikrosporidia di tinja. Di luar negeri teknik pemeriksaannya sudah banyak dikembangkan mulai dari pemeriksaan mikroskopis dengan mikroskop cahaya sampai diagnosis molekuler.¹³ Pemeriksaan mikroskopis dengan menemukan spora mikrosporidia masih merupakan diagnosis yang umum dilakukan untuk menegakkan diagnosis mikrosporidiosis.^{5,10} Ukuran mikrosporidia yang sangat kecil memerlukan ketelitian pemeriksa dalam mendeteksi parasit ini, disamping memerlukan pewarnaan khusus agar dapat dibedakan dengan organisme lain di tinja seperti sel ragi dan bakteri. Pewarnaan yang biasa digunakan yaitu pewarnaan kromotrop standar yang mempunyai sensitivitas 88%²³ dan 72,7%⁸, serta spesifitas 90%²³ akan tetapi proses pewarnaan ini membutuhkan waktu yang lama yaitu ± 120 menit, sehingga diperlukan teknik lain yang lebih cepat dan tepat. Teknik *quick-hot* gram kromotrop merupakan modifikasi teknik kromotrop dimana proses lebih cepat dengan latar belakang lebih terang sehingga mikrosporidia lebih mudah terdeteksi.²⁴

Berdasarkan besarnya permasalahan HIV/AIDS dan beratnya dampak mikrosporidiosis intestinal pada penderita AIDS terutama dengan jumlah CD4 yang rendah, serta tidak adanya data-data mikrosporidiosis intestinal di Indonesia maka perlu dilakukan penelitian tentang mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis.

1.2. Rumusan Masalah

Semakin meningkatnya kasus HIV/AIDS dan infeksi oportunistik yang terjadi, salah satunya infeksi mikrosporidia yang merupakan *emerging parasitic infection* dan beratnya dampak infeksi ini pada penderita AIDS terutama dengan jumlah CD4 yang rendah serta tidak adanya data-data di Indonesia tentang parasit ini dan infeksi yang ditimbulkannya maka muncul pertanyaan. Berapakah prevalensi mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis?, Bagaimana hasil pemeriksaan deteksi mikrosporidia dengan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop? dan bagaimana hubungan antara densitas mikrosporidia dengan jumlah sel CD4 pada penderita AIDS dengan diare kronis?

1.3. Tujuan

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui prevalensi mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis di Jakarta.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mendeteksi mikrosporidia pada tinja penderita AIDS dengan diare kronis menggunakan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop.
2. Membandingkan kualitas pulasan dan efisiensi dari kedua teknik pewarnaan dalam mendeteksi mikrosporidia.
3. Menghitung densitas mikrosporidia
4. Mengetahui korelasi densitas mikrosporidia dengan jumlah sel CD4 pada penderita AIDS dengan diare kronis.

1.4. Manfaat

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

Melalui penelitian ini peneliti dapat menerapkan dan memanfaatkan ilmu yang didapat selama kuliah. Penelitian ini juga sebagai sarana untuk melatih cara berpikir dan membuat penelitian berdasarkan metodologi penelitian yang baik dan benar.

1.4.2 Manfaat Bagi Institusi

Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan peran serta institusi melalui karya ilmiah penelitian infeksi parasit pada penderita imunokompromis.

1.4.3 Manfaat Bagi Pelayanan Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang teknik deteksi mikrosporidia secara mikroskopis yang dapat dipakai dan dilakukan di laboratorium parasitologi standar di berbagai tempat sehingga membantu klinikus, serta untuk keperluan surveilans. Diharapkan juga penelitian ini dapat membantu dalam tata laksana penderita HIV/AIDS dengan diare kronis.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biologi Mikrosporidia

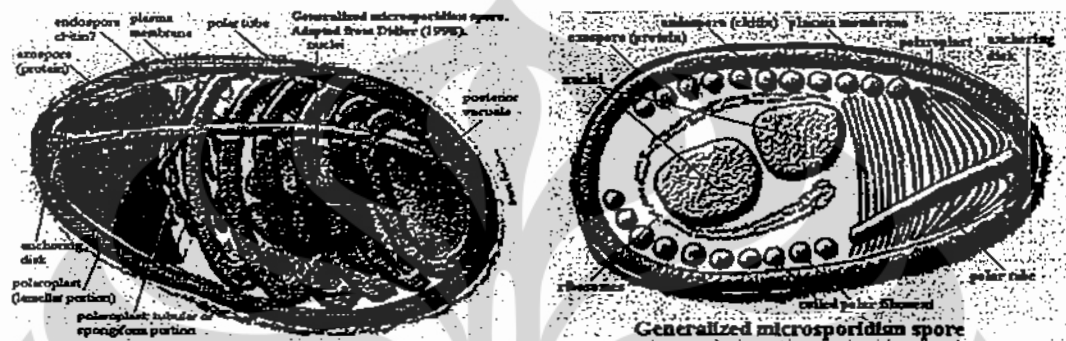
2.1.1 Karakteristik Mikrosporidia

Mikrosporidia merupakan parasit obligat intraselular bersel tunggal yang berbentuk spora dan mempunyai ciri eukariotik maupun prokariotik. Ciri eukariotiknya yaitu adanya inti dengan membran inti, sistem membran intrasitoplasmik dan pembelahan inti secara mitosis intra nuklear. Inti mikrosporidia dapat monokariotik atau diplokariotik. Monokariotik terdapat pada genus *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora* dan *Trachipleistophora*. Inti diplokariotik terdapat pada genus *Brachiola*, *Nosema* dan *Vittaforma*. Ciri prokariotik yaitu mempunyai ribosom yang berukuran seperti ukuran organisme prokariotik dan mempunyai subunit RNA kecil. Mikrosporidia tidak mempunyai mitokondria, peroksisom dan aparatus golgi sejati yang merupakan organel yang dimiliki oleh organisme eukariotik. Mikrosporidia dapat memproduksi protein seperti mitokondria (*mitochondrial-like proteins*) yaitu *mitochondrial heat shock protein (HSP 70)*.^{5,20}

Mikrosporidia direklasifikasi ke dalam fungi, berdasarkan atas adanya kitin di dinding spora, gen HSP 70 mitokondria, analisis filogenetik gen penyandi β tubulin, sebagian besar sub unit RNA polymerase II, TATA box binding protein, faktor translokasi elongasi EF-1 α dan EF 2, dan glutamil sintase yang mempunyai kesamaan karakter antara mikrosporidia dengan fungi.^{7,25}

Spora mikrosporidia relatif tahan terhadap lingkungan karena dilingkupi oleh lapisan luar (eksospora) yang terdiri atas glikoprotein yang *electron dense* dan lapisan dalam (endospora) yang *electron luscent* yang terdiri atas kitin. Membran plasma menutupi sitoplasma yang terdiri dari *anchoring disc anterior*, *membran golgi like apparatus*, membran inti, vakuol posterior dan filamen polar yang berawal di ujung anterior dan kemudian membentuk spiral pada bagian posterior spora seperti terlihat pada gambar 2.1. Filamen polar ini membedakan mikrosporidia dari organisme sel tunggal lain dan digunakan untuk menginfeksi sel hospes.^{7,26}

Perubahan tekanan osmotik atau pH menyebabkan vakuol posterior akan membengkak karena masuknya air. Selanjutnya tekanan akan mendorong sitoplasma dan inti (mengandung sporoplasma yang merupakan materi infeksi) sehingga menyebabkan filamen polar dikeluarkan dan materi yang infeksi diinjeksikan ke dalam sel hospes.²⁷



Gambar 2.1. Struktur Mikrosporidia²⁸ Dinding sel terdiri atas dua lapis: eksospora (glikoprotein) dan endospora (kitin). Mempunyai inti, *polaroplast*, *anchoring disc* dan filamen polar yang berfungsi menginjeksikan sporoplasma ke dalam sel hospes.

Ukuran mikrosporidia yang menginfeksi manusia bervariasi antara 1,0-3,0 μm x 1,5-4 μm .⁶ Spora mikrosporidia tahan di udara terbuka sehingga mempermudah transmisi ke sel hospes baru melalui air dan makanan yang terkontaminasi dengan spora. Dalam air, spora biasanya hidup lebih dari satu tahun pada suhu 4°C.¹⁹ Dalam jaringan yang terinfeksi spora dapat bertahan lebih lama lagi dan spora akan mati dengan pemberian etanol 70% selama 10 menit.²⁶

2.1.2. Siklus Hidup Mikrosporidia

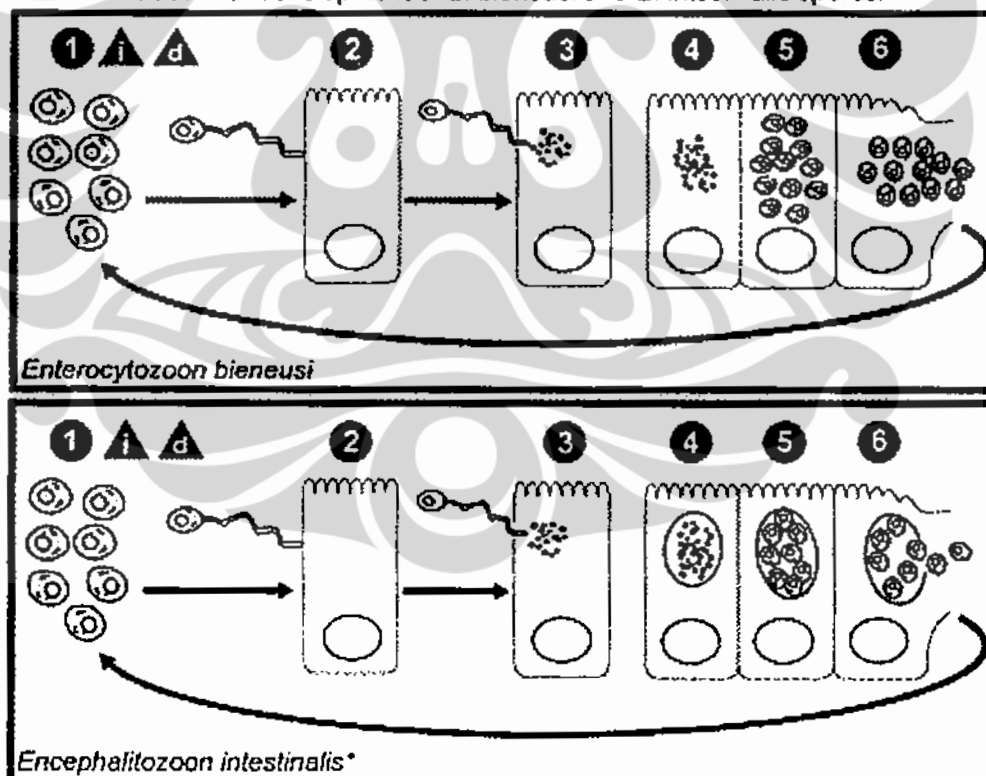
Siklus hidup mikrosporidia pada manusia dibagi dalam tiga fase yaitu fase infeksi, merogoni dan sporogoni. Fase infeksi dimulai dari tertelannya atau terhirupnya spora mikrosporidia oleh individu yang rentan.²⁷ Setelah itu, spora dirangsang untuk melepaskan *coiled polar filament* yang berubah menjadi *polar tubule* dan akan menginjeksikan materi infeksi sporoplasma ke dalam sitoplasma sel hospes. Filamen ini akan keluar bila dipicu oleh rangsangan lingkungan yang sesuai. Contohnya cairan usus halus yang akan membuat filamen ini mampu berpenetrasi ke dalam sel hospes.²⁹

Proses merogoni terjadi pada saat sporoplasma berkembang menjadi meron, dan memperbanyak diri secara belah pasang. Selanjutnya terjadi proses differensiasi spora yang disebut sporogoni, yaitu terbentuknya sporon kemudian menjadi sporoblast, yang nanti akan dilepaskan menjadi spora bila sel hospes ruptur.³⁰ Spora dikeluarkan melalui feses, urin dan sekret pemapasan tergantung spesies yang menginfeksi.²⁶

Proses merogoni dan sporogoni ini berbeda sesuai spesies. Pada *Enterocytozoon bieneusi*, spesies yang paling banyak menginfeksi manusia, proses merogoni dan sporogoni terjadi dalam kontak langsung dengan sitoplasma sel hospes, sedangkan pada *Encephalitozoon sp.* proses sporogoni terjadi dalam vakuol parasitoforus.³¹ Siklus hidup mikrosporidia ini dapat dilihat pada gambar 2.2.

Pada mikrosporidiosis manusia, seluruh siklus hidupnya terdapat dalam tubuh manusia, tidak mempunyai hospes perantara ataupun vektor.⁵

Intracellular development of *E. bieneusi* and *E. intestinalis* spores.



*Development inside parasitophorous vacuole also occurs in *E. hellem* and *E. cuniculi*.

Gambar 2.2. Siklus Hidup Mikrosporidia³¹

Ket : Terdiri atas tiga fase: infeksi, merogoni dan sporogoni. Pada *E. bieneusi* merogoni dan sporogoni terjadi dalam kontak langsung dengan sitoplasma. Pada genus *Encephalitozoon* terjadi dalam vakuol parasitoforus.

2.1.3. Spesies yang menginfeksi manusia

Tabel 2.1. Family, Genus dan Spesies Mikrosporidia yang Menginfeksi Manusia²⁸

Family	Genus	Spesies
Nesematidea	<i>Braciola</i>	<i>B. algerae</i> , <i>B. vesicularum</i>
Encephalitozoonidea	<i>Encephalitozoon</i>	<i>E. cuniculi</i> , <i>E. hellem</i> , <i>E. intestinalis</i> (Syn. <i>Septata intestinalis</i>)
Enterocytozoonidea	<i>Enterocytozoon</i>	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>
Microsporidea	<i>Microsporidium</i>	<i>M. ceylonensis</i> , <i>M. africanum</i>
Nosematidea	<i>Nosema</i>	<i>N. ocularum</i> , <i>N. connori</i> (Syn. <i>B. connori</i>)
	<i>Vittaforma</i>	<i>Vittaforma corneae</i> (syn. <i>Nosema corneum</i>)
Pleistophoridae	<i>Pleistophora</i>	<i>Pleistophora sp.</i>
	<i>Trachipleistophora</i>	<i>T. hominis</i> , <i>T. anthropophthera</i>

Diantara 14 spesies yang dapat menginfeksi manusia seperti yang terlihat pada tabel 2.1, terdapat dua spesies yang sering ditemukan yaitu *Enterocytozoon bieneusi* dan *Encephalitozoon intestinalis*. Kedua spesies tersebut banyak menginfeksi pasien imunokompromis terutama penderita AIDS.³²

2.1.4. Habitat pada Manusia

Habitat mikrosporidia pada manusia bisa terdapat pada berbagai organ seperti terlihat pada tabel berikut:

Tabel 2.2. Habitat Spesies Mikrosporidia yang Menginfeksi Manusia¹⁹

Spesies	Habitat
<i>E. bieneusi</i>	Epitel usus halus, saluran empedu, kandung empedu, duktus pankreatikus.
<i>E. hellem</i>	Epitel konjunktiva, epitel kornea, epitel sino-nasal, mukosa trakeo-bronkial, ginjal, uretra, vesica urinaria dan prostat.
<i>E. cuniculi</i>	Epitel bronkus dan bronkiolus, lidah dan peritoneum.
<i>E. intestinalis</i>	Hati dan usus halus
<i>Nosema connori</i>	Semua organ
<i>Vittaforma corneae</i>	Stroma kornea
<i>Pleistophora sp.</i>	Otot
<i>Microsporidium ceylonensis</i>	Stroma kornea
<i>Microsporidium africanum</i>	Stroma kornea
<i>B. algerae</i> , <i>B. Vesicularum</i>	Mata, kulit dan otot dalam
<i>N.ocularum</i>	Mata
<i>T. hominis</i>	Otot, mata, diseminata
<i>T. antropophthera</i>	Semua organ

2.1.5. Infeksi dan Penyakit

Gejala klinis mikrosporidiosis tergantung pada status imun hospes dan organ yang terinfeksi. Infeksi kronis tanpa gejala klinis biasanya terjadi pada hospes yang imunokompeten. Pada beberapa kasus, infeksi pada hospes imunokompeten dapat menimbulkan gejala klinis ringan yang timbul beberapa waktu setelah terinfeksi.³³

Manifestasi klinis yang paling umum dari mikrosporidiosis yang disebabkan oleh *E.bieneusi* dan *E.intestinalis* adalah diare. Penderita AIDS dengan jumlah sel CD4 \leq 100/ μ l darah paling rentan untuk mengalami diare kronis yang bisa disertai dengan demam, kehilangan nafsu makan dan menyebabkan penurunan berat badan yang progresif. Pada penderita AIDS yang terinfeksi dengan *E.bieneusi* pada traktus biliaris dapat terjadi kolangitis atau kolesistitis. Infeksi oleh *E.bieneusi* tersebut menyebabkan penyakit yang relatif terlokalisir.³⁴ Penyakit dengan spektrum yang luas dilaporkan pada spesies mikrosporidia yang lain.^{20,30}

Mikrosporidia merupakan patogen oportunistik karena paling sering menyebabkan penyakit bila status imun dari hospes yang terinfeksi menurun. Pada beberapa studi prospektif dilaporkan bahwa individu dengan jumlah sel CD4 \geq 200/mm³ darah, infeksi mikrosporidia bertendensi menjadi diare yang *self-limiting*. Bila jumlah sel CD4 \leq 100/mm³ darah keberadaan mikrosporidia bertendensi menjadi diare kronis.³⁵ Bervariasinya gejala klinis pada orang yang terinfeksi mikrosporidia tergantung pada status imun individu ketika terinfeksi mikrosporidia. Ini dapat digambarkan pada dua keadaan yang ekstrim yaitu orang-orang yang terpajan atau terinfeksi dengan mikrosporidia sebelum terinfeksi HIV maka tubuh mampu membangkitkan respons imun yang dapat bertahan beberapa waktu, tetapi bila telah terjadi imunodefisiensi pada waktu infeksi awal dengan mikrosporidia maka tubuh tidak mampu membangkitkan respons imun protektif sehingga muncul gejala.^{5,30,34}

Pada hospes imunokompromis, mikrosporidia hampir selalu menimbulkan penyakit dan sering berakibat kematian. Tikus *athymic*, SCID dan IFN γ *receptor knock-out* yang diinfeksi dengan *Encephalitozoon sp*, *Trachipleistohora hominis* atau *V.cornea* akan menimbulkan gejala hepatitis lethal dan asites. Kelinci dengan

infeksi kronis *E.cuniculi* dan mendapat terapi siklofosamid akan memperlihatkan gejala inkontinensia, tremor, paresis dan paralisis anggota gerak sebelum akhirnya mati. Infeksi *E.cuniculi* pada kera dapat menyebabkan kematian janin dan bayi baru lahir karena abortus spontan. Pada anak anjing, infeksi dapat menyebabkan gagal ginjal sedangkan pada kuda menimbulkan plasentitis dan abortus.^{7,30}

Tikus yang secara sengaja diinfeksi dengan *E.cuniculi*, kadang menderita asites yang sembuh dalam dua minggu setelah inokulasi. Pada kelinci kadang-kadang timbul paralisis, kejang, dan tortikolis.³³ Pada manusia imunokompeten, yaitu pada turis dilaporkan, gejala diare timbul selama 2-3 minggu dan akan sembuh sendiri (*self-limiting diarrhea*).^{17,18}

Infeksi *E.bieneusi* dan *Encephalitozoon sp* pada pasien transplantasi organ yang mendapat terapi immunosupresi, menyebabkan gejala lemah/*fatigue*, demam, mual dan diare. Pada anak-anak di daerah tropis infeksi mikrosporidia terutama oleh *E.bieneusi* menyebabkan diare kronis khususnya pada penderita malnutrisi.¹¹ Penelitian di Spanyol melaporkan bahwa orang lanjut usia rentan terhadap infeksi mikrosporidia yang mungkin berkaitan dengan penurunan sistem imun akibat proses penuaan.³⁶

Pada karnivora, *E.cuniculi* juga dapat menginfeksi anjing peliharaan dan rubah. Infeksi pada hewan menyebabkan terbentuknya kompleks imun dan kelainan ginjal karena respons hiperimun.³⁰ Perbedaan gejala klinis yang muncul menandakan bahwa respons hipo atau hiperimun terhadap mikrosporidia memberi kontribusi terhadap timbulnya gejala penyakit.³³

2.2. Epidemiologi Mikrosporidiosis

2.2.1. Distribusi Geografis dan Prevalensi pada Manusia

Mikrosporidia tersebar luas di seluruh dunia, beberapa spesies mikrosporidia menginfeksi manusia dan hewan seperti anjing, babi, kera dan kelinci.³⁰ Mikrosporidia sebagai agen infeksi oportunistik telah dilaporkan di berbagai negara maju dan berkembang yaitu Argentina, Australia, Bostwana, Brazil, Canada, Perancis, Jerman, India, Italia, Jepang, Belanda, Nigeria, Selandia Baru, Spanyol, Srilangka, Swedia, Swiss, Thailand, Uganda, UK, USA dan Zambia.²⁸

Spora mikrosporidia dapat ditemukan di sumber air di negara maju dan negara berkembang tapi mikrosporidiosis tetap merupakan penyakit yang terutama terdapat pada penderita HIV/AIDS.²⁸ *E. bienersi* merupakan mikrosporidia utama yang menimbulkan kerusakan di traktus digestivus dan sering diidentifikasi pada penderita AIDS. *E. bienersi* ini pertama kali dilaporkan pada tahun 1985 sebagai penyebab diare kronis dan *wasting syndrome* pada penderita AIDS.³² *E. bienersi* merupakan patogen di usus halus dan bertanggung jawab terhadap 30-70% kasus AIDS dengan diare dan *wasting syndrome*.³⁷

Mikrosporidiosis pada manusia tersebar luas tetapi prevalensinya bervariasi karena lokasi dan metode deteksi yang berbeda. Pada penderita AIDS dengan diare kronis prevalensi mikrosporidiosis intestinal berkisar 2% - 50%.^{9,10}

Pada tahun 1996 di Brazil dilaporkan terdapat 46% kasus mikrosporidiosis intestinal pada penderita HIV dengan diare kronis dan kemudian pada tahun 2000 dilaporkan terjadi penurunan prevalensi yaitu 27,5% dari 40 sampel menggunakan teknik pewarnaan kromotrop standar dan gram kromotrop³⁸ Tahun 2002-2003 di Uganda terdapat 32,9% dari 243 sampel anak HIV dengan diare terinfeksi mikrosporidia intestinal menggunakan teknik PCR.¹⁵ Tahun 2006 di Kamerun dilaporkan terdapat 6,5% kasus mikrosporidiosis intestinal dari 46 penderita HIV dengan diare menggunakan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *fluorochrome staining*,³⁹ sedangkan di Nigeria tahun 2007 dilaporkan terdapat 7,29% mikrosporidiosis intestinal dari 142 penderita HIV/AIDS menggunakan pewarnaan Giemsa dan ELISA.⁴⁰

2.2.2. Sumber Infeksi dan Cara Transmisi

Masih sedikit penelitian tentang sumber dan cara transmisi infeksi mikrosporidia. Hal ini disebabkan karena mikrosporidiosis merupakan penyakit yang relatif baru muncul. Data tentang sumber dan cara transmisi berasal dari laporan kasus mikrosporidiosis manusia yang terinfeksi secara alamiah atau eksperimental pada hewan. Berdasarkan kenyataan bahwa mikrosporidia tersebar luas di alam dan infeksi tersebar di seluruh dunia, diduga ada beberapa cara transmisi dan sumber infeksi.⁴¹

a. Antar Manusia (transmisi secara vertikal dan horizontal)

Transmisi secara vertikal dari induk kepada janin, dilaporkan terjadi pada tikus, kelinci, karnivora dan primata. Transmisi mikrosporidiosis secara vertikal pada manusia belum pernah dilaporkan.⁴¹

Transmisi secara horizontal pada manusia terjadi secara fekal-oral, inhalasi udara yang terkontaminasi spora dan tertelan bersama makanan dan air yang terkontaminasi.¹³

Faktor yang mendukung transmisi horizontal yaitu homoseksual, pemakaian obat intravena, terpajan air di kolam renang, atau pekerjaan yang kontak dengan air.^{13,41}

Transmisi horizontal mikrosporidia yang terjadi diantara sesama hewan, sangat mungkin juga terjadi pada manusia dengan spesies yang sama. Tikus sehat yang dimasukkan sekandang dengan tikus yang terinfeksi dengan *E.cuniculi*, maka tikus sehat tersebut dapat terinfeksi dengan *E.cuniculi*. Secara eksperimental, hewan dapat diinfeksi dengan *E.bieneusi*, *Encephalitozoon sp* atau *B.algerae* melalui makanan, inokulasi intrarektal, atau inokulasi organisme ke mata.⁴¹

b. Hewan (transmisi zoonotik)

- Transmisi zoonotik secara langsung : infeksi langsung dari hewan ke manusia. Contohnya hewan rumah seperti ayam dan itik.⁴²
- Transmisi zoonotik tidak langsung : infeksi dari hewan ke manusia melalui makanan, air dan udara yang terkontaminasi dengan mikrosporidia⁴¹

c. Air (*Waterborne transmission*)

Spora mikrosporidia dari hewan dengan mudah diekskresikan bersama urin dan fesesnya sehingga dapat masuk ke tempat penampungan air.⁴¹

Spora mikrosporidia tahan terhadap lingkungan dan dapat bertahan cukup lama dalam air. Sporanya sangat kecil dan tidak mudah terjaring

waktu filtrasi. Mikrosporidia yang menginfeksi manusia ditemukan dalam berbagai sumber air termasuk air tanah dan air yang tercemar.⁴³ Pada studi epidemiologi, mikrosporidiosis pada manusia terjadi melalui air tempat rekreasi, air di tempat bekerja dan air minum.⁹ Suatu penelitian di Ghana melaporkan 51,2% air minum kemasan di Accra tercemar dengan mikrosporidia, disamping protozoa lain seperti *Cryptosporidium parvum* 63% dan *Cyclospora cayetenensis* 59,3%.⁴⁴

d. Makanan (*Foodborne transmission*)

Mikrosporidia juga bisa ditularkan melalui makanan yang terkontaminasi atau yang tidak dimasak dengan baik^{13,41} misalnya makan daging ikan yang mengandung *Pleistophora sp* yang tidak dimasak dengan baik.⁴¹

e. Insekta (*vectorborne transmission*)

F. hominis dapat ditularkan oleh nyamuk (*Anopheles quadrimaculatus* dan *Culex quinquefasciatus*) ke hospes mamalia melalui gigitan.⁴¹

2.3. Diagnosis Mikrosporidiosis

Diagnosis mikrosporidiosis tergantung kepada identifikasi spora mikrosporidia dalam bahan klinis. Pada mikrosporidiosis intestinal dilakukan identifikasi spora mikrosporidia dalam tinja penderita dengan diare.¹⁰

Ada beberapa uji yang telah dikembangkan untuk diagnosis mikrosporidiosis. Mulai dari uji molekuler sampai uji sederhana dengan teknik pewarnaan menggunakan mikroskop cahaya. Masing-masing uji ini mempunyai kelebihan dan kekurangan.

2.3.1. Uji Molekuler

Uji molekuler terutama dengan metode *Polymerase chain reaction* (PCR) terus ditingkatkan untuk diagnosis laboratorium mikrosporidiosis.⁴⁵ Metode PCR dapat meningkatkan deteksi mikrosporidia dalam bahan klinis dan dapat mengidentifikasi spesies.⁴⁶ Ekstraksi DNA dari mikrosporidia harus merusak dinding spora dengan *glass-bead beating*, *boiling* dan *digestion* dengan proteinase

K, litikase dan kitinase atau dengan menggunakan kit yang sudah tersedia. Pada metode PCR ini digunakan primer untuk diagnostik target gen rRNA mikrosporidia.⁷ Dengan menggunakan metode PCR, mikrosporidia bisa terdeteksi bila terdapat 10^2 spora/ml tinja sedangkan dengan pemeriksaan mikroskopis baru bisa dideteksi bila terdapat 10^4 spora/ml.⁴⁶ Metode PCR ini mempunyai nilai sensitivitas yang sangat tinggi tetapi metode PCR ini hanya tersedia pada laboratorium riset dan merupakan metode dengan biaya mahal dan memakan waktu sehingga tidak dapat digunakan untuk pemeriksaan rutin terutama pada negara-negara berkembang.⁴⁵ Tahun 2007, Graczyk *et al* melaporkan uji FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) untuk diagnosis mikrosporidiosis intestinal pada penderita HIV/AIDS. Uji FISH ini merupakan uji spesies spesifik untuk spora mikrosporidia, tetapi teknik itu hanya tersedia pada laboratorium riset.⁸

2.3.2. Uji Serologi

Uji serologi dapat berupa deteksi antibodi dalam serum penderita. Antibodi monoklonal dan poliklonal digunakan untuk deteksi spora mikrosporidia dengan *immunofluorescence test* (IFAT). Dilaporkan tes imunofluoresen ini sangat spesifik untuk mendeteksi *E.cuniculi* dalam sekret hidung penderita AIDS.²⁰ Untuk deteksi antibodi dalam serum penderita, selain IFAT juga dapat digunakan ELISA dan western blot. Uji serologi untuk mendeteksi antibodi *Encephalitozoon sp* sudah banyak dikembangkan tapi ketersediaan tes ini masih terbatas.¹⁹

2.3.3. Pemeriksaan Mikroskopis

Diagnosis infeksi mikrosporidia yaitu dengan menemukan mikrosporidia pada bahan pemeriksaan dengan mikroskop cahaya atau dengan mikroskop elektron. Spora mikrosporidia yang biasanya diidentifikasi berukuran 1-2,5 μ m pada banyak spesies yang ditemukan pada manusia.⁴⁶ Kultur sel untuk diagnosis mikrosporidiosis juga sudah pernah dilaporkan tetapi tes ini rumit dan memakan biaya.¹⁰

Diagnosis definitif mikrosporidiosis pada penderita AIDS pertama kali berdasarkan pada *transmission electron microscopy* (TEM) untuk melihat secara spesifik filamen polar. TEM penting untuk melihat gambaran ultrastruktur dari perkembangan dan pematangan organisme dan untuk klasifikasi taksonomi dari spesies baru. TEM tidak rutin digunakan untuk studi diagnostik dalam skala besar karena memerlukan keahlian khusus, memakan waktu dan biaya serta relatif tidak sensitif.^{5,7,20}

TEM penting untuk mengidentifikasi spesies berdasarkan gambaran ultrastruktur. Deteksi mikrosporidia dalam spesimen tanpa menentukan spesies dapat dideteksi dengan menggunakan mikroskop cahaya. Morfologi mikrosporidia dapat dilihat dengan mikroskop cahaya bila metode pewarnaan yang digunakan dapat membedakan spora mikrosporidia yang kecil dengan sel-sel lainnya atau debris.^{5,46}

Teknik histokimia digunakan secara rutin untuk mendeteksi mikrosporidia dalam bahan klinis seperti urin, tinja, cairan aspirasi dan jaringan. *Optical fluorescent brighteners* seperti Uvitex 2B, Calcofluor White dan Fungifluor adalah relatif sensitif dan efisien untuk skrining. Teknik ini menggunakan mikroskop fluoresen. Tetapi ketiga teknik ini mempunyai kelemahan yaitu sering menimbulkan hasil positif palsu untuk diagnosis mikrosporidiosis.⁷

Pemeriksaan dengan teknik pewarnaan Gram dan Silver juga bisa untuk mendeteksi mikrosporidia tetapi hanya digunakan untuk deteksi mikrosporidia di jaringan biopsi, tidak untuk spesimen tinja. Pewarnaan Giemsa juga dapat digunakan untuk mendeteksi mikrosporidia di dalam tinja tapi tidak dianjurkan karena sangat sulit membedakan mikrosporidia dengan komponen tinja yang lain terutama debris tetapi untuk spesimen lain seperti cairan tubuh dan jaringan biopsi usus yang sangat sedikit debris dan artefak, pewarnaan Giemsa dapat dianjurkan.^{20,29,46}

Selain teknik pewarnaan tersebut, teknik pewarnaan trikrom Weber atau yang disebut juga sebagai teknik pewarnaan kromotrop merupakan teknik pewarnaan standar dan terbaik yang dianjurkan untuk deteksi mikrosporidia dalam bahan klinis.⁴⁷

a. Deteksi Mikrosporidia pada Tinja Menggunakan Pewarnaan Kromotrop Standar

Diagnosis laboratorium mikrosporidiosis intestinal dengan menggunakan mikroskop cahaya sangat luas pemakaiannya terutama pada negara-negara berkembang dimana mikroskop elektron dan fasilitas uji molekuler tidak tersedia untuk pemeriksaan rutin.⁴⁷

Teknik pewarnaan kromotrop untuk pemeriksaan spesimen tinja dengan menggunakan mikroskop cahaya sama prosedurnya dengan pewarnaan trikrom oleh Wheatley yang secara rutin digunakan untuk pemeriksaan parasitologi terhadap spesimen tinja pada banyak laboratorium di Amerika. Konsentrasi kromotrop pada larutan pewarnaan ini yaitu 10 kali lebih tinggi dan waktu pewarnaannya lebih lama yaitu \pm 2jam.

Pada teknik pewarnaan kromotrop ini spora *E.bieneusi* berukuran 0,9-1,5 μ m berbentuk oval dan refraktil. Dinding spora akan berwarna pink muda sampai merah. Beberapa spora terlihat transparan dan yang lain akan terlihat antara merah muda-merah dengan latar belakang berwarna hijau. Beberapa elemen tinja lain seperti sel ragi dan bakteri mungkin juga akan terwarnai merah, tapi dapat dibedakan dari spora mikrosporidia berdasarkan ukuran, bentuk dan pola pewarnaan.^{5,45}

Dalam mendeteksi mikrosporidia pada spesimen tinja menggunakan mikroskop cahaya, kontrol positif haruslah selalu digunakan, dan perlu latihan pemeriksaan yang terus menerus dan adekuat agar dapat mendeteksi dengan tepat.⁴⁸

Teknik pewarnaan kromotrop standar untuk deteksi mikrosporidia ini ditemukan oleh Weber dan koleganya yang sering juga disebut sebagai teknik modifikasi trikrom Weber.^{48,49}

b. Pewarnaan *Quick-hot* Gram Kromotrop

Teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop merupakan teknik modifikasi dari teknik kromotrop standar. Teknik ini dapat mendeteksi spora mikrosporidia dalam bahan klinis seperti tinja, urin, saliva, cairan nasofaring dan

sampel *Broncho Alveolar Lavage* (BAL) yang sudah diawetkan dengan formalin serta jaringan yang sudah diparafin.²⁴

Sejak ditemukannya teknik pewarnaan modifikasi trikrom Weber yang sekarang lebih sering disebut pewarnaan kromotrop standar, dilaporkan dapat menghasilkan pewarnaan yang berbeda pada spora mikrosporidia pada apusan tinja dan spesimen sitologi. Di waktu yang sama, pewarnaan Gram jaringan ditemukan sebagai metode yang bagus untuk mendeteksi spora mikrosporidia dalam spesimen yang sudah diawetkan dengan formalin dan jaringan yang sudah di parafin.²⁴

Teknik *quick-hot* gram kromotrop untuk diagnosis mikrosporidiosis pada manusia mempunyai keuntungan dari kedua teknik pewarnaan kromotrop dan pewarnaan gram yaitu cepat, tidak mahal dan sederhana untuk mendeteksi spora mikrosporidia dalam spesimen klinis termasuk tinja, cairan tubuh dan spesimen sitologi lainnya.^{24,45}

Pada teknik ini sampel diwarnai dengan kromotrop pada suhu 50 - 55°C, spora mikrosporidia akan berwarna ungu gelap dengan latar belakang hijau pucat. Waktu pewarnaan lebih cepat dibandingkan dengan pewarnaan kromotrop standar, yaitu pada pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop hanya membutuhkan waktu 5 menit.²⁴ Teknik ini cepat, dapat dipercaya dan sederhana serta dapat dengan mudah digunakan pada laboratorium-laboratorium klinik. Beberapa pusat kesehatan dan rumah sakit di US⁵⁰ dan Brazil⁵¹ menggunakan teknik pewarnaan ini untuk pemeriksaan mikrosporidia.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dengan rancangan *cross sectional*. Untuk mengetahui prevalensi mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis di Jakarta dan mengetahui korelasi antara nilai densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4.

3.2. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. Waktu penelitian adalah dari bulan November 2007 sampai dengan Juli 2008.

3.3. Sampel Penelitian

Sampel adalah tinja penderita AIDS dengan diare kronis yang dikirim dari berbagai rumah sakit di Jakarta untuk dilakukan pemeriksaan tinja lengkap di Laboratorium Parasitologi FKUI

3.4. Besar Sampel

$$n = \frac{Z\alpha^2 pq}{d^2}$$

Keterangan :

α : tingkat kemaknaan sebesar 5% (0,05)

$Z\alpha$: Z skor untuk α sebesar 0,05 adalah 1,96

p : Perkiraan proporsi kejadian mikrosporidiosis intestinal pada penderita AIDS yaitu 11%

q : $1-p = 1-0,11 = 0,89$

d : Ketelitian, ditetapkan 5,5% (0,055)

n : Perkiraan jumlah sampel

$$n = \frac{(1,96)^2 \times 0,11 \times 0,89}{0,055^2} = 125$$

Jadi jumlah sampel minimal 125 sampel tinja penderita AIDS dengan diare kronis.

3.5. Pengumpulan sampel

Sampel adalah tinja penderita AIDS dengan diare kronis yang tidak diketahui status terapi antivirusnya yang berasal dari berbagai rumah sakit di Jakarta yang dikirim ke Laboratorium Parasitologi FKUI dari bulan September 2007 - Mei 2008. Tinja diberi larutan pengawet formalin 10% dengan perbandingan 1:3, sebagai kontrol positif adalah tinja positif mikrosporidia dari CDC Atlanta, USA.

3.6. Pemeriksaan Tinja

Pemeriksaan mikrosporidia dari tinja yang diawetkan dengan formalin 10%, dilakukan dengan 2 teknik pewarnaan yaitu teknik pewarnaan kromotrop standar dan teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop.

3.6.1. Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar

3.6.1.1 Alat dan bahan yang diperlukan

1. Kaca benda
2. Kaca tutup
3. Pipet mikro
4. Lidi kapas/*cotton buds*
5. Lidi aplikator
6. Pinset
7. Pensil kaca dan Spidol
8. *Choplin jar*
9. Botol coklat 100 ml
10. Serum
11. Kromotrop 2R
12. Fast Green
13. Asam Phosphotungstat
14. Asam Asetat Glasial
15. Aquades

16. Alkohol Asam
17. Alkohol 95%
18. Xylol
19. Entelan
20. Mikroskop cahaya

3.6.1.2 Cara Kerja

1. Cara Pembuatan Larutan Kromotrop Standar

Kromotrop 2R sebanyak 6gr dicampur dengan fast green 0,15 gr, dan asam posphotungstat 0,7 gr. Setelah itu ditambahkan asam asetat glasial 3 ml dan dibiarkan selama 30 menit, lalu ditambahkan aquades sampai 100 ml.

2. Cara mewarnai dengan pewarnaan kromotrop⁴⁸

- a. Tinja yang sudah ada dalam larutan formalin 10% diambil dengan pipet mikro sebanyak 10 μ l lalu diletakkan pada kaca tutup yang sebelumnya sudah diolesi dengan serum, tinja dioleskan dengan lidi aplikator dan kemudian dibiarkan kering.
- b. Dilakukan fiksasi dengan metanol absolut 5 menit
- c. Diwarnai dengan kromotrop selama 90 menit
- d. Setelah diwarnai dengan kromotrop dibilas dengan Alkohol asam 90% selama 1-3 detik
- e. Kemudian dibilas dengan alkohol 95% dan 100% masing-masing selama 3 menit.
- f. Setelah dibilas dengan alkohol, dilakukan pembilasan dengan xylol sebanyak dua kali masing-masing selama 10 menit.
- g. Sediaan dikeringkan dan kemudian di *mounting*
- h. Sediaan kemudian diperiksa dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000x dengan minyak imersi

Untuk satu sampel dibuat 2 sediaan (duplo). Kontrol positif selalu disertakan tiap 10 sediaan.

Identifikasi mikrosporidia :

Spora mikrosporidia akan tampak berwarna merah muda (pink) sampai merah yang berukuran 1,0-1,6 x 0,9 μm berbentuk oval dengan "belt" melintang. Pemeriksaan dilakukan pada seluruh lapang pandang pada masing-masing sediaan dengan perbesaran 1000x. Hasil dinyatakan negatif bila tidak ditemukan mikrosporidia.

3.6.2. Teknik Pewarnaan dengan *Quick-hot* Gram Kromotrop

3.6.2.1 Alat dan Bahan yang Diperlukan

1. Kaca benda
2. Kaca tutup
3. Pipet mikro
4. Pipet 3ml
5. Lidi kapas/*cotton buds*
6. Lidi aplikator
7. Pinset
8. Pensil kaca dan Spidol
9. *Choplin jar*
10. Botol coklat 100 ml
11. Bunsen
12. Waterbath dengan suhu 55°C
13. Serum
14. Larutan Gentian Violet
15. Larutan Iodin
16. Larutan *decolorizer* (HCl Alkohol)
17. Kromotrop 2R
18. Fast Green
19. Asam Phosphotungstat
20. Asam Asetat Glasial
21. Aquades
22. Alkohol Asam
23. Alkohol 100%

24. Alkohol 95%
25. Entelan
26. Mikroskop cahaya

3.6.2.2 Cara Kerja

1. Cara Pembuatan Larutan kromotrop untuk *Quick-hot Gram Kromotrop*

Kromotrop 2R sebanyak 1gr dicampur dengan fast green 0,15 gr, dan asam posphotungstat 0,25 gr. Lalu ditambahkan asam asetat glasial 3ml dan dibiarkan selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan aquades sampai 100 ml.

2. Cara Mewarnai dengan Pewarnaan *Quick-hot Gram Kromotrop*²⁴

- a. Tinja dalam larutan formalin 10% diambil dengan pipet mikro sebanyak 10 µl lalu diletakkan diatas kaca benda yang sebelumnya sudah diolesi dengan serum, dan dioleskan dengan lidi aplikator kemudian dibiarkan kering.
- b. Sediaan difiksasi dengan cara dilewatkan diatas api 3x, masing-masing 1 detik. Kemudian didinginkan pada suhu kamar.
- c. Sediaan diwarnai dengan larutan gentian violet dan dibiarkan 30 detik, setelah itu sediaan dibilas dengan air mengalir.
- d. Selama 30 detik sediaan diwarnai dengan larutan Gram iodine dan kemudian dibilas dengan *decolorizer*.
- e. Setelah itu dibilas dengan air mengalir.
- f. Sediaan diwarnai dengan kromotrop pada suhu 55°C selama 1 menit.
- g. Setelah diwarnai dengan kromotrop, dibilas dengan alkohol asam 90% selama 1-3 detik.
- h. Kemudian sediaan dibilas berturut-turut dengan alkohol 95%, alkohol 100%, alkohol 100%, masing-masing selama 30 detik.
- i. Sediaan dikeringkan dan dimounting
- j. Setelah kering, sediaan diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

Untuk satu sampel dibuat 2 sediaan (duplo). Kontrol positif selalu disertakan tiap 10 sediaan.

Identifikasi mikrosporidia :

Spora mikrosporidia akan tampak berwarna ungu/violet yang berukuran 1,0-1,6 x 0,9 μm berbentuk oval dengan dinding spora yang jelas dan gambaran *a belt-like stripe*. Pemeriksaan dilakukan pada seluruh lapang pandang dengan perbesaran 1000x. Hasil dinyatakan negatif bila tidak ditemukan mikrosporidia.

3.7. Penilaian Hasil Kerja

Teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop dilakukan pada 126 sampel. Dilakukan pencatatan waktu yang diperlukan untuk pewarnaan satu sediaan dan waktu yang diperlukan untuk memeriksa satu sediaan. Kemudian dilakukan pemilihan teknik yang terbaik berdasarkan kualitas pulasan, waktu pewarnaan dan waktu pemeriksaan dari 126 sampel.

Sampel yang positif dari teknik pewarnaan yang dipilih dilakukan perhitungan kuantitatif untuk menentukan densitas mikrosporidia dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x dengan minyak imersi. Sediaan dibaca dibawah mikroskop dimulai dari sudut kiri berlanjut ke kanan dan seterusnya secara sistematis.

(Hasil dari dua teknik pewarnaan ini dikonfirmasi ke Laboratorium rujukan.)

3.8. Definisi Operasional

1. Waktu pewarnaan adalah waktu yang diperlukan untuk proses pewarnaan mulai dari fiksasi sampai selesai tahap akhir proses pewarnaan dan siap untuk dikeringkan.
2. Waktu pemeriksaan adalah waktu yang diperlukan untuk membaca satu sediaan pada seluruh lapang pandang.
3. Kualitas pulasan dinilai dari:
 - latar belakang pewarnaan
 - kontras antara mikrosporidia dengan sekitarnya

4. Densitas mikrosporidia adalah jumlah spora mikrosporidia dalam 100 lapang pandang dengan menggunakan perbesaran 1000x.
5. Diare kronis yaitu diare yang terjadi lebih dari 28 hari dimana tidak ada fase 7 hari bebas diare.⁴² Data diare kronis dan data jumlah sel CD4 diambil dari data sekunder

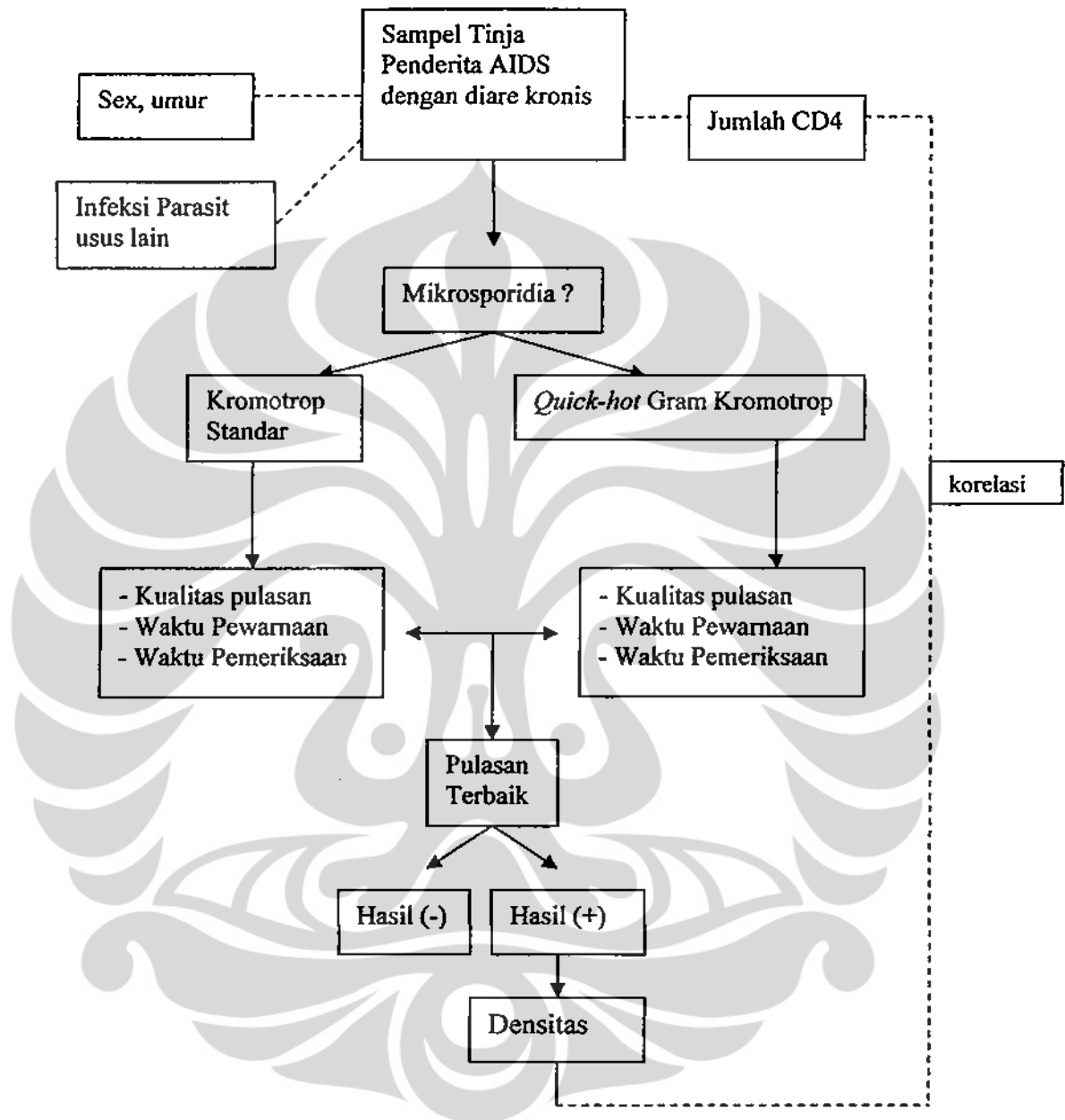
3.9. Analisis atau Pengolahan Data

Data prevalensi yaitu dibuat dalam bentuk tabulasi dari hasil pemeriksaan mikrosporidia negatif (-) dan positif (+), waktu pewarnaan, waktu pemeriksaan dan kualitas pewarnaan dari teknik pewarnaan kromotrop standar dan teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop. Perbedaan hasil antara kedua teknik tersebut diuji secara statistik dengan Mc Nemar test. Kemudian dipilih satu teknik yang terbaik, dan dihitung densitas mikrosporidiana.

Analisis bivariat untuk mengetahui hubungan densitas mikrosporidia dengan jumlah sel CD4 melalui uji korelasi.

Analisis statistik menggunakan program SPSS 11,5 *for windows*.

3.10. Alur Penelitian



BAB 4

HASIL

4.1. Hasil Pewarnaan dengan Teknik Kromotrop Standar dan Teknik *Quick-hot* Gram Kromotrop

Pulasan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop dilakukan terhadap 126 sampel tinja penderita AIDS dengan diare kronis, masing-masing sampel dibuat duplo, maka didapat hasil sebagai berikut :

4.1.1. Kualitas Pulasan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar

- a. Latar belakang/ *background slide* berwarna hijau pucat.
- b. Kontras antara mikrosporidia dengan sekitar : jelas, spora mikrosporidia dapat dibedakan dengan sekitarnya. Spora mikrosporidia berwarna merah muda/pink. Tampak garis diagonal (*belt-like strip*) melingkari spora mikrosporidia. (Gambar 4.1)



Gambar 4.1. Mikrosporidia dengan Pewarnaan Kromotrop Standar Menggunakan Perbesaran 1000x.

4.1.2 Kualitas Pulasan dengan Teknik Pewarnaan *Quick-hot* Gram Kromotrop

- a. Latar belakang/ *background slide* terang berwarna hijau sangat pucat.
- b. Kontras antara mikrosporidia dengan sekitar : kurang jelas, spora mikrosporidia dapat dibedakan dengan sekitarnya tetapi kadang sukar dibedakan dengan bakteri yang juga berwarna ungu kebiruan. Spora mikrosporidia berwarna mulai dari ungu gelap, sampai ungu kebiru-biruan. Kadang tampak garis diagonal (*belt-like strip*) melingkari spora mikrosporidia. (Gambar 4.2)



Gambar 4.2. Mikrosporidia dengan Pewarnaan *Quick-hot* Gram Kromotrop Menggunakan Perbesaran 1000x.

4.1.3. Waktu Proses Pewarnaan dan Waktu Pemeriksaan

Pada teknik pewarnaan kromotrop standar, peneliti memerlukan waktu untuk proses pewarnaan kurang lebih 126 menit/slide dan waktu pemeriksaan kurang lebih 20 menit/slide. Pada teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop, waktu untuk proses pewarnaan lebih cepat yaitu memerlukan waktu kurang lebih 9 menit/slide dan waktu pemeriksaan kurang lebih 45 menit/slide. Berdasarkan hasil ini proses pewarnaan teknik

kromotrop standar lebih lama dibandingkan dengan teknik *quick-hot gram* kromotrop, namun dari segi waktu pemeriksaannya lebih cepat.

Tabel 4.1. Hasil Pembacaan Sediaan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar dan *Quick-hot Gram* Kromotrop

	Kromotrop Standar			Total
		+	-	
<i>Quick-hot Gram</i> Kromotrop	+	8	0	8 (6,3%)
	-	1	117	118 (93,7%)
Total		9 (7,1%)	117 (92,9%)	126 (100%)

Berdasarkan tabel 4.1 didapatkan bahwa jumlah penderita mikrosporidiosis yang dideteksi dengan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot gram* kromotrop hampir sama. Pada uji statistik dengan Mc Nemar test tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara hasil pembacaan kedua teknik tersebut ($p=1,00$).

4.2. Gambaran Hasil Pemeriksaan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar

Dari 126 sampel yang diperiksa dengan teknik pewarnaan kromotrop standar didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 4.2. Hasil Pemeriksaan Berdasarkan Karakteristik Penderita AIDS dengan Diare Kronis

Hasil pemeriksaan	Jenis kelamin		Umur (thn)	
	Laki-laki	Perempuan	<30	≥30
Positif	9	0	5	4
Negatif	93	24	71	46
Total	102 (81%)	24 (19%)	76(60%)	50(40%)

Pada tabel 4.2 didapatkan bahwa sampel tinja yang positif mikrosporidia semuanya berasal dari penderita laki-laki dengan jumlah CD4 $<200/\text{mm}^3$ seperti terlihat pada tabel 4.3. Sebanyak 6 dari 9 penderita dengan mikrosporidia positif

di tinja mempunyai jumlah $CD4 < 50/mm^3$. Satu penderita mempunyai $CD4 50-100/mm^3$ dan dua penderita mempunyai $CD4 > 100-200/mm^3$. Pada tabel 4.3 juga terlihat bahwa 7 dari 9 sampel yang positif mikrosporidia ditemukan *Blastocystis hominis*. Dari 126 sampel pada penelitian ini, *B.hominis* merupakan protozoa yang paling sering ditemukan yaitu 73% (infeksi tunggal dan campur).

Tabel 4.3. Densitas Mikrosporidia, Jumlah CD4 dan Parasit Usus Lain yang Ditemukan pada Sampel Positif Mikrosporidia

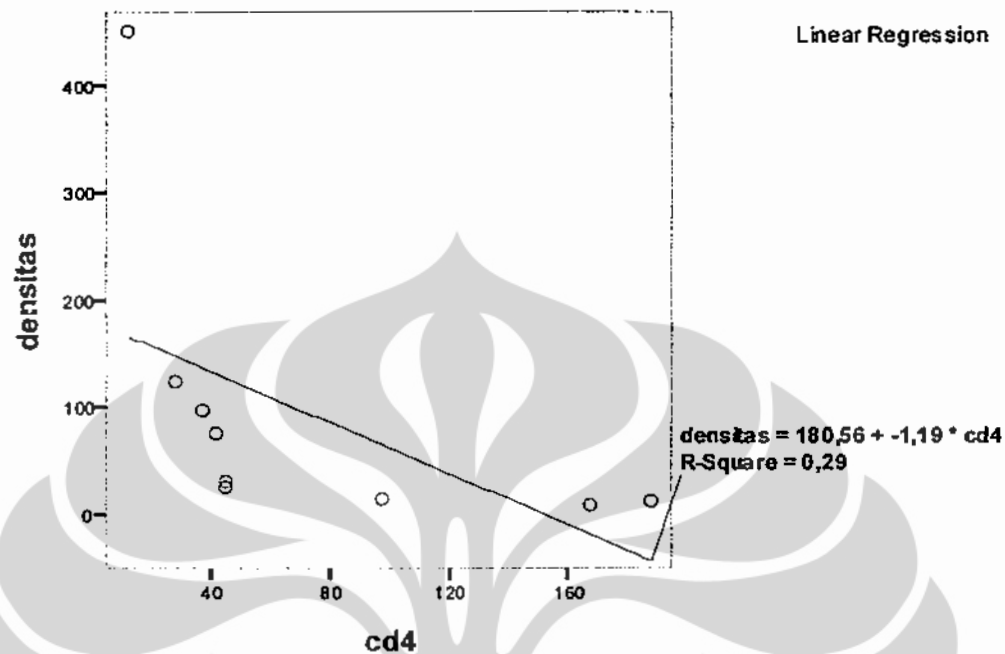
Densitas Mikrosporidia	Jumlah CD4 (/mm ³)	Parasit Usus Lain
12	188	<i>B.hominis</i>
75	42	<i>B.hominis</i>
30	45	Tidak ada
15	98	<i>B.hominis</i>
125	28	<i>B.hominis</i>
25	45	<i>E.histolytica/E.dispar</i> , <i>B.hominis</i>
450	12	<i>B.hominis</i>
98	37	<i>B.hominis</i>
8	168	Tidak ada

Densitas mikrosporidia dihitung hanya pada 9 sampel tinja yang positif mikrosporidia dengan jumlah spora antara 8 sampai 450 spora dalam 100 lapang pandang.

Tabel 4.4. Nilai Korelasi Densitas Mikrosporidia dengan Jumlah CD4

	Nilai	Jumlah CD4	Densitas mikrosporidia
Jumlah CD4	Koefisien korelasi	1,000	-0,979**
	Sig. (2-tailed)		0,000
	Total	9	9
Densitas mikrosporidia	Koefisien korelasi	-0,979**	1,000
	Sig. (2-tailed)	0,000	
	Total	9	9

** Bermakna



Gambar 4.3. Grafik Korelasi Densitas Mikrosporidia dengan Jumlah CD4

Hasil uji korelasi dengan uji Spearmans memperlihatkan adanya hubungan bermakna ($p=0,00$; $r=-0,979$) antara densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4 seperti terlihat pada tabel 4.4. Untuk melihat pengaruh jumlah CD4 terhadap tingginya densitas mikrosporidia dilakukan uji analisis regresi dan hasilnya seperti tampak pada grafik di gambar 4.3. Hasil ini menunjukkan korelasi negatif yaitu bahwa semakin rendah jumlah CD4 maka semakin tinggi densitas mikrosporidia. Sembilan sampel tinja mikrosporidia positif didapatkan enam sampel terinfeksi dengan *Blastocystis hominis* dan satu sampel terinfeksi dengan *Blastocystis hominis* dan *Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar*. Hanya dua sampel yang tidak terinfeksi dengan parasit usus lain.

BAB 5

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan sampel tinja penderita AIDS dengan diare kronis sebanyak 126 sampel dengan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop.

Berdasarkan hasil pemeriksaan dengan teknik pewarnaan kromotrop standar diperoleh sediaan mempunyai kontras yang jelas antara spora mikrosporidia dengan sekitar yaitu spora mikrosporidia berwarna merah muda sampai merah dengan latar belakang berwarna hijau pucat sehingga spora mikrosporidia dapat dibedakan dengan elemen tinja yang lain yaitu sel ragi, bakteri serta debris. Ini sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Weber *et al.*⁵ Sel ragi juga akan berwarna merah muda-merah tetapi mempunyai ukuran yang lebih besar dari spora mikrosporidia dan kadang-kadang terlihat bertunas. Bakteri akan terwarnai hijau atau abu-abu transparan yang jelas berbeda dengan spora mikrosporidia. Sisa-sisa sel atau debris kadang berwarna merah muda dan merah yang sering meragukan dengan spora mikrosporidia tetapi ini dapat disingkirkan karena debris atau sisa-sisa sel mempunyai bentuk yang tidak teratur dan dalamnya transparan/ kosong. Berbeda dengan spora mikrosporidia yang mempunyai "belt" yang melingkarinya. *Belt* ini merupakan filamen polar yang merupakan ciri khas mikrosporidia yang membedakannya dari organisme lain.⁷

Pemeriksaan dengan teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop pada sediaan terlihat spora mikrosporidia berwarna ungu gelap dan ungu kebiruan dengan latar belakang berwarna hijau pucat. Hal ini sama seperti yang didapatkan pada penelitian oleh Moura *et al.*²⁴ Spora mikrosporidia dapat dibedakan dari sel ragi yang juga berwarna ungu gelap serta berukuran lebih besar, sedangkan terhadap bakteri, spora mikrosporidia agak susah dibedakan karena ukuran yang hampir sama dan juga terwarnai sama yaitu ungu kebiruan.

Dilihat dari lamanya proses pewarnaan dan pemeriksaan, peneliti memerlukan waktu untuk proses pewarnaan kromotrop standar lebih kurang 126 menit, mulai dari fiksasi dengan metanol sampai selesai dibilas dengan xylol terakhir. Ini sedikit berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Weber *et al*

yaitu hanya membutuhkan waktu 121 menit.⁵ Perbedaan ini mungkin disebabkan karena pada penelitian tersebut tidak memperhitungkan waktu pengeringan antar tahap, sedangkan pada penelitian ini waktu pengeringan antara satu tahap ke tahap berikutnya dihitung.

Waktu yang dibutuhkan untuk mengeringkan tinja sebelum difiksasi dengan metanol kurang lebih 15 menit dan waktu yang dibutuhkan untuk mengeringkan sediaan sebelum di mounting kurang lebih 10 menit. Jadi secara keseluruhan waktu yang diperlukan peneliti mulai dari pembuatan apusan tinja sampai di mounting pada teknik pewarnaan kromotrop standar kurang lebih 151 menit/slide.

Pada proses pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop, peneliti memerlukan waktu yang lebih cepat dari teknik pewarnaan kromotrop standar yaitu kurang lebih 9 menit. Hal ini juga sedikit berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Moura *et al* yang menyebutkan hanya membutuhkan waktu 5 menit untuk proses pewarnaan dengan teknik ini.²⁴ Perbedaan ini disebabkan karena pada penelitian yang dilakukan oleh Moura *et al* hanya menghitung waktu pewarnaan tanpa memperhitungkan waktu yang dibutuhkan untuk pengeringan antar satu tahap ke tahap berikutnya. Waktu yang dibutuhkan untuk mengeringkan tinja sebelum difiksasi dengan waktu untuk pengeringan sebelum di mounting pada teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop sama dengan kromotrop standar yaitu kurang lebih 15 menit dan 10 menit. Secara keseluruhan waktu yang diperlukan mulai dari pembuatan apusan tinja sampai di mounting pada teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop kurang lebih 34 menit/slide.

Untuk proses pemeriksaan pada teknik kromotrop standar, peneliti membutuhkan waktu lebih cepat yaitu kurang lebih 20 menit sedangkan dengan teknik *quick-hot* gram kromotrop peneliti membutuhkan waktu kurang lebih 45 menit. Untuk hasil pembacaan sediaan dengan pewarnaan kromotrop standar didapatkan 9 sampel yang positif mikrosporidia. Pada *quick-hot* gram kromotrop terdapat 8 sampel positif mikrosporidia yang juga positif dengan kromotrop standar, tetapi satu sampel negatif, ini mungkin disebabkan karena jumlah spora mikrosporidia yang terlalu sedikit yaitu densitas mikrosporidia dengan pewarnaan

kromotrop standar yaitu 8 spora mikrosporidia dalam 100 lapang pandang dan bakteri sangat banyak pada sampel ini sehingga susah untuk dideteksi.

Berdasarkan hal tersebut maka peneliti memilih pewarnaan kromotrop standar untuk menghitung densitas mikrosporidia. Walaupun pada kromotrop standar dibutuhkan waktu yang lama untuk proses pewarnaan tetapi lebih cepat dalam pemeriksaan untuk mendeteksi mikrosporidia. Pada teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop sulit membedakan antara spora mikrosporidia dengan bakteri yang terwarnai sama.

Pada penelitian ini, dengan teknik pewarnaan kromotrop standar didapatkan hasil 9 buah sampel mikrosporidia positif dari 126 (7,1%) sampel tinja penderita AIDS dengan diare kronis. Di Kano Nigeria pada tahun 2007 dilaporkan prevalensi mikrosporidiosis intestinal pada penderita AIDS sebesar 7,29% dan tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian ini, pada penelitian tersebut digunakan teknik ELISA dan pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan modifikasi Giemsa.⁴⁰ Hal ini berbeda dengan di Lima, Peru pada tahun 2005 dilaporkan prevalensi mikrosporidiosis intestinal pada penderita HIV/AIDS yaitu 67 (3%) dari 2652 sampel, yang menggunakan teknik pewarnaan kromotrop standar untuk deteksi mikrosporidia.⁴²

Di India pada tahun 2002 prevalensi mikrosporidiosis yaitu 2,5% dari 120 sampel tinja penderita HIV positif dengan dan tanpa diare. Penelitian di India ini menggunakan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop.⁵²

Perbedaan prevalensi ini mungkin disebabkan karena daerah yang berbeda, kriteria subyek penelitian dan ketersediaan *highly active antiretroviral therapy* (HAART) di negara tersebut, dimana sejak penggunaan HAART mulai tahun 1996 prevalensi mikrosporidiosis pada penderita AIDS mulai menurun, dimana sebelum luasnya penggunaan HAART di USA prevalensi mikrosporidiosis intestinal 14,1% sampai 34,8%, dan setelah penggunaan HAART, berkurang menjadi 1,5%.⁵⁰ Di Australia dilaporkan juga bahwa terjadi penurunan insiden mikrosporidiosis intestinal dari 11% pada tahun 1996 menjadi 0% pada tahun 2006.⁵³ Tapi pada negara-negara berkembang yang ketersediaan ART masih kurang, prevalensi mikrosporidiosis intestinal masih tinggi.¹³

Rendahnya prevalensi mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis pada penelitian ini bisa juga disebabkan karena pengambilan sampel yang hanya satu kali.

Jumlah CD4 sebagai komponen sistem imun mempunyai peran dalam mengontrol infeksi terhadap mikrosporidia.²⁰ Dari sembilan sampel tinja yang positif mikrosporidia, enam penderita mempunyai jumlah CD4 $<50/\text{mm}^3$. Penelitian yang dilakukan di Kano-Nigeria 2007, didapatkan enam dari 14 penderita mikrosporidiosis intestinalis juga mempunyai jumlah CD4 $<50/\mu\text{l}$.⁴⁰ Beberapa penelitian sebelumnya juga menyebutkan bahwa mikrosporidiosis intestinal terjadi pada penderita HIV/AIDS dengan jumlah CD4 yang rendah yaitu $<100/\text{mm}^3$.^{21,42}

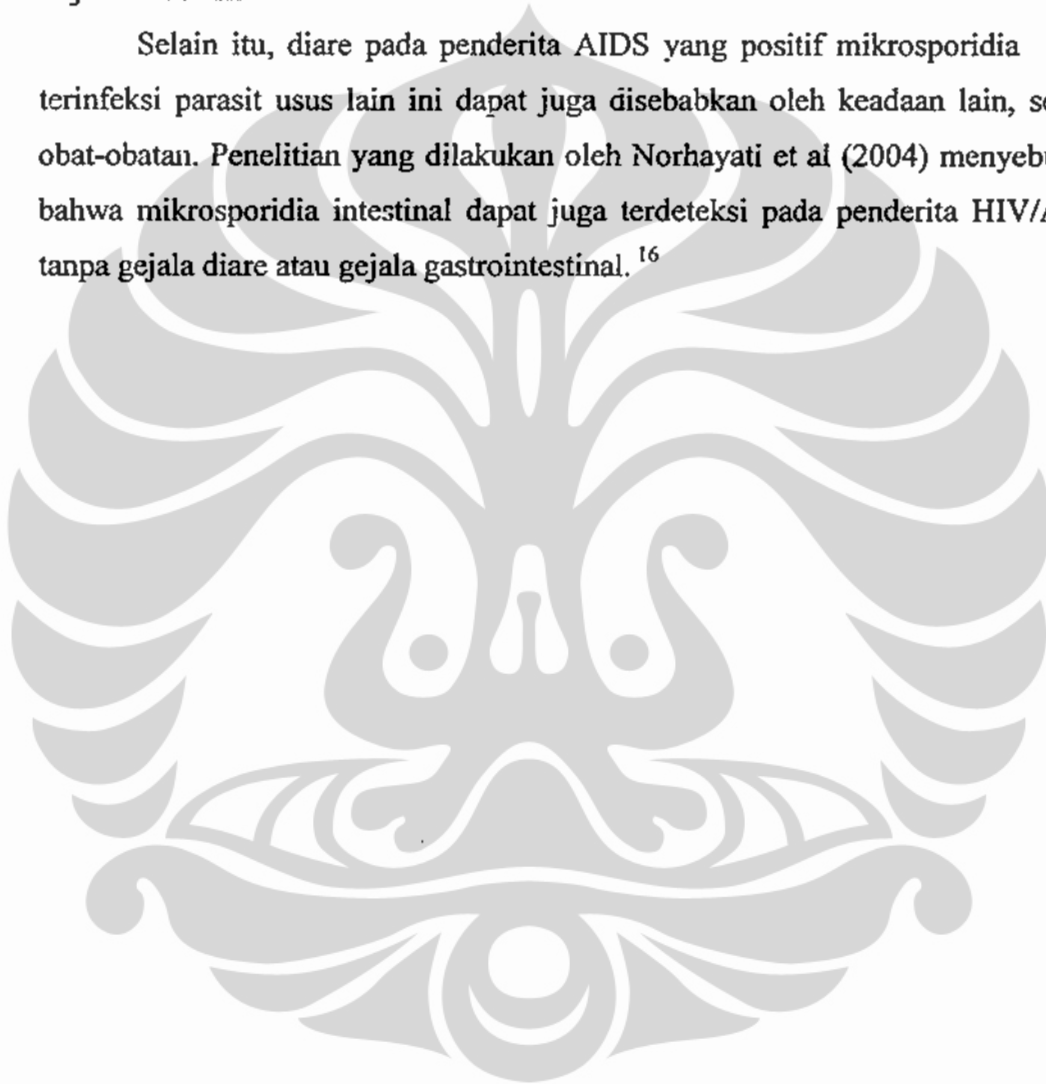
Dari hasil uji korelasi antara densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4 memperlihatkan adanya hubungan bermakna. Korelasi antara densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4 secara statistik pada penelitian ini mempunyai korelasi yang negatif yaitu semakin rendah jumlah CD4 maka semakin tinggi densitas mikrosporidia. Pada penelitian yang dilakukan oleh Cotte *et al* dinyatakan bahwa status imun sangat berperan dalam terjadinya infeksi mikrosporidia.⁹ Jadi dapat dinyatakan bila jumlah CD4 semakin turun maka densitas mikrosporidia semakin tinggi dan diikuti dengan infeksi yang semakin berat.

Selain mikrosporidia, pada tinja penderita juga ditemukan parasit usus lain. Enam dari sembilan sampel yang positif mikrosporidia ditemukan *Blastocystis hominis* dan satu sampel koinfeksi dengan *B.hominis* dan *E.histolytica/ E.dispar*. Dua sampel tidak ditemukan infeksi parasit usus lain. *B.hominis* juga merupakan protozoa usus terbanyak (73% n=126) yang ditemukan dari seluruh sampel pada penelitian ini. Hasil ini hampir sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Kurniawan A, et al (2007) di Jakarta dimana *B.hominis* merupakan parasit yang paling umum ditemukan (72,4%, n=318) pada penderita HIV/AIDS.⁵⁴

Pada penelitian ini mikrosporidia dapat merupakan salah satu penyebab diare kronis pada sembilan sampel yang terdeteksi dengan parasit ini atau bisa juga diare disebabkan oleh karena koinfeksi dengan parasit lain yaitu *B.hominis*

dan *E.histolytica*. Selain parasit usus, diare pada penderita mungkin juga disebabkan oleh jamur atau bakteri yang juga terlihat pada pemeriksaan mikroskopis bersama-sama dengan mikrosporidia, akan tetapi tidak diketahui jenis bakterinya apakah komensal atau patogen, berasal dari tubuh penderita atau kontaminan sebab tidak dilakukan identifikasi bakteri atau jamur, dan kontainer tinja tidak steril.

Selain itu, diare pada penderita AIDS yang positif mikrosporidia tanpa terinfeksi parasit usus lain ini dapat juga disebabkan oleh keadaan lain, seperti obat-obatan. Penelitian yang dilakukan oleh Norhayati et al (2004) menyebutkan bahwa mikrosporidia intestinal dapat juga terdeteksi pada penderita HIV/AIDS tanpa gejala diare atau gejala gastrointestinal.¹⁶



BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Prevalensi mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis cukup rendah.
2. Teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop dapat digunakan untuk mendeteksi mikrosporidia dalam tinja.
3. Teknik pewarnaan kromotrop standar lebih baik dibandingkan dengan *quick-hot* gram kromotrop untuk deteksi mikrosporidia dari segi kualitas pulasan dan waktu pemeriksaan.
4. Pada penderita AIDS, semakin rendah jumlah CD4 maka densitas mikrosporidia semakin tinggi.

6.2. Saran

Perlu penelitian lebih lanjut untuk prevalensi mikrosporidia pada penderita HIV/AIDS dengan dan tanpa diare, serta perlu penelitian untuk menentukan spesies mikrosporidia yang ditemukan pada penderita AIDS dengan diare kronis di Indonesia dengan uji molekuler dan uji lain.

DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaja KG. Defisiensi imun. Dalam: *Imunologi dasar*. Edisi ke7. Jakarta: Balai penerbit FKUI; 2006. hal.334-57.
2. Jumlah kasus HIV/AIDS di Indonesia sampai 31 Maret 2008. Diunduh dari: <http://www.aidsindonesia.or.id>. Tanggal 14 juli 2008
3. Weber R, Ledergerber B, Zbinden R, Altwegg M, Pfyffer GE, Spysen MA, et al. Enteric infection and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1473-80.
4. Fischer J, West J, Agochukwu N, Suire C, Hale-Donze H. Induction of host chemotactic response by *Encephalitozoon spp.* *Infection and Immunity* 2007; 75 (4): 1619-25.
5. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidia infections. *Rev Clin Microbiol* 1994; 7: 426-61.
6. Fedorko DP, Hijazi YM. Application of molecular techniques to the diagnosis of microsporidia infection. *Emerging Inf Dis* 1996; 2(3): 183-91.
7. Didier ES. Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 2005; 94: 61-76.
8. Graczyk KT, Johansson MA, Tamang L, Visvesvara GS, Moura LS, DaSilva AS, et al. Retrospective species identifications of microsporidian spores in diarrheic fecal samples from HIV/AIDS patients by multiplexed fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (4): 1255-60.
9. Cotte L, Rabodonirina M, Chapus F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, et al. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without HIV infection. *J Infect Dis* 1999; 180(6): 2003-8.
10. Mungthin M. The zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi* in Thailand. *Thai J Vet Med* 2006; 36 (2): 9-18.
11. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyossi D, Bukholt MA, Tzipori S. *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67(3): 299-303.
12. Kumar SS, Ananthan S, Joyee AG. Detection of *Enterocytozoon bieneusi* by PCR using species-specific primer in stool samples of HIV patients. *Indian J Med Res* 2005; 121: 215-9.
13. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18 (3): 423-45.

14. Kotler DP, Orenstein JM. Prevalences of microsporidiosis in AIDS patients with chronic diarrhea. *Int Conf AIDS* 1992; 8.
15. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeerakitaka S, Ndeezi G, Downing R, Feng X, et al. Cryptosporidiosis and microsporidiosis in Ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the HIV. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73 (5): 921-5.
16. Norhayati M, Azlin M, Rukman, Chan BT, Sabiha P, Fatmah MS, Rozlida AR, et al. Prevalence of intestinal microsporidiosis in patients with and without gastrointestinal symptoms in Malaysian hospital setting. *Unknown* 2004.
17. Muller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheur G, Salzberger B, Franzen C. Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1630-2.
18. Wichro E, Hoelzi D, Krause R, Bertha G, Reinthaler F, Wenisch C. Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(2): 285-7.
19. Omalu IJC, Duhliska DD, Anyanwu GI, Pam VA, Inyama PU. Human microsporidial infections. *OJHAS* 2006; 5.
20. Canning EU. Mikrosporidia. In: Gillespie SH, Pearson RD, editors. *Principle and practice of clinical parasitology*. London: John Wiley & Sons Ltd; 2001. p. 171-95.
21. Microsporidiosis. In *Immunocompromised hosts*. *CID* 2006;42:119-20.
22. Conteas Cn, Berlin GW, Speck CE, Pandhumas SS, Lariviere MJ, Fu C. Modification of the clinical course of intestinal microsporidiosis in AIDS patients by immune status and anti-human immunodeficiency virus therapy. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58(5): 555-8.
23. Ignatus R, Henschel S, Liesenfeld O, Mansmann U, Schmidt W, Koppe S et al. Comparative evaluation of modified trichrome and uvitex 2B Stains for detection of low numbers of microsporidial spores in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(9): 2266-9.
24. Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F. A new and improved quick-hot gram chromotrope technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue section. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 888-93.

25. Vossbrinck CR, Andreadis TG, Weiss LM. Phylogenetics: taxonomy and the microsporidia as derived fungi. In Lindsay DS, Weiss LM, editors. *Opportunistic infections: Toxoplasma, Sarcocystis and Mikrosporidia*. Boston: Kluwer academic publisher; 2004. p. 189-213.
26. Microspora. In: Kayser FH, Biez KA, Eckert J, Zinkernagel RN, editors. *Medical microbiology*. New York: Thieme; 2005. p.538-42.
27. Southern TR, Jolly CE, Hayman RJ. Augmentation of microsporidia adherence and host cell infection by divalent cations. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 260: 143-9.
28. Cheng L, Smith S. *Microsporidia 2006*. Diunduh dari www.stanford.edu tanggal: 18 Agustus 2007
29. Franzen C. How do Microsporidia invade cells?. *Folia Parasitologica* 2005; 52: 36-40.
30. Didier ES. Microsporidiosis. *Clin Infect Dis* 1998;27:1-8
31. CDC. Life cycle Microsporidia in microsporidiosis. Diunduh dari www.dpd.cdc.gov tanggal 18 Agustus 2007.
32. Snowden KF. Zoonotic microsporidia from animals and arthropods with a discussion of human infections. In Lindsay DS, Weiss LM, editors. *Opportunistic infections: Toxoplasma, Sarcocystis and Mikrosporidia*. Boston: Kluwer academic publisher; 2004. p.123-34.
33. Snowden KF, Shaddock JA. Mikrosporidia of higher vertebrate. In: Wittner M, Weiss L.(Eds). *The microsporidia and microsporidiosis 1999*. American Society of Microbiology, Washington DC, 1999. p.393-419.
34. Khan IA, Didier ES. Insight into the immune response to Mikrosporidia. In Lindsay DS, Weiss LM, editors. *Opportunistic infections: Toxoplasma, Sarcocystis and mikrosporidia*. Boston: Kluwer academic publisher; 2004. p. 135-57.
35. Walker M, Kublin JG, Zunt JR. Parasitic central nervous system infections immunocompromised hosts: malaria, microsporidiosis, leishmaniasis and african trypanosomiasis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 115-25.
36. Lores B, Lopez M, Arias C, Fenoy S, Torres J, Del Aguila C. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienewisi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo Spain. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 918-21.
37. Wasson K, Peper RL. Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol* 2000; 37: 113-28.

38. Brasil P, Lima DB, Paiva DD, Lobo MSC, Sodre FC, Silva SP, et al. Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42(6).
39. Sarfati C, Burgeois A, Menotti J, Liegeois F, Moyou-Somo R, Delaporte E, et al. Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74(1): 162-4.
40. Omalu ICJ, Duhlińska DD, Anyanwu GI, Pam VA, Inyama PU. Seroprevalence of microsporidiosis in immunocompromised patients in Kano-Nigeria. *The Internet Journal of Parasitic Diseases* 2007; 1 (2).
41. Didier ES, Sovall ME, Green LC, Briendley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of Microsporidiosis; Sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology* 2004; 126:145-66.
42. Bern C, Kawai V, Vargas D, Rabke-Verani J, Williamson J, Chavez-Valdez R, et al. The Epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima Peru. *J Infect Dis* 2005; 191: 1658-64.
43. Rochelle PA. Development and evaluation of procedures for detection of infectious microsporidia in source waters. In *Research on microorganisms in drinking water progress review workshop*. Cincinnati, Ohio; August 5-7 2003.
44. Kwakye-Nuako G, Borketey PB, Mensah-Attipoe I, Asmah RH, Ayeche-Kumi PF. Sachet drinking water in Accra: The potential threats of transmission of enteric pathogenic protozoan organisms. *Ghana Med J* 2007; 41(2): 62-7.
45. CDC. Microsporidia infection (microsporidiosis) In *Infectious Diseases* September 2006.
46. Garcia LS. Laboratory Identification of the microsporidia. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (6): 1892-901.
47. Fagbenro-Beyioku AF, Oyibo WA, Onuoha SU, Ukaegbu CB, Ojuromi OT. Evaluation of microscopic staining techniques for the diagnosis of opportunistic protozoan infections in a developing country. *The Internet J Trop Med* 2007; 3(2).
48. Staining procedures. In *National standard metode*. 2007. Diunduh dari: www.evaluations-standards.org.uk. tanggal : 27 Mei 2007

49. Smith HV, Girdwood RWA. Detection of microsporidia spores in faecal smears using trichrom chromotrope stain (weber et.al.1991). Scottish parasite diagnostic laboratory standard operating procedure. 1998.
50. Dworkin MS, Buskin SE, Davidson AJ, Cohn DL, Morse A, Inungu J, et al. Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus infected patients with diarrhea in Major United States Cities. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007; 49(6): 339-42.
51. Goncalves EMN, Uemura IH, Orban H, Castilho VLP, Corbett EDP, et al. Microsporidiosis in a Brazilian University Hospital. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007; 48(6): 351-2.
52. Mohandas K, Sehgal R, Sud A, Malla N. Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-Seropositive individuals in Northern India. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 83-4.
53. Van Hal SJ, Muthiah K, Matthews G, Harkness J, Stark D, Cooper D, et al. Declining incidence of intestinal microsporidiosis and reduction in AIDS-related mortality following introduction of HAART in Sydney Australia. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 1096-100.
54. Kurniawan A, Dwintasari SW, Poespa I, Karyadi T, Yuniastuti E, Djauzi S, et al. Opportunistic intestinal parasites infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta Indonesia. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. In press 2008.
55. Sastroasmoro S. Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis edisi 2. Jakarta. CV Sagung Seto.2006.
56. Sugiyono. Statistika untuk penelitian. Bandung. CV Alfabeta. 2003



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.a

NOMOR : 203 /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:

"DETEKSI MIKROSPORIDIA PADA TINJA PENDERITA AIDS DENGAN DIARE KRONIS MENGGUNAKAN TEKNIK PEWARNAAN KROMOTROP DAN QUICK-HOT GRAM KROMOTROP".

Peneliti Utama : dr. ESY MARYANTI
Name of the principal investigator

Nama Institusi : PARASITOLOGI FKUI

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



09 Juni 2008

Chairman
Ketua

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

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

Mikrosporidia pada Penderita AIDS dengan Diare Kronis di Jakarta

Agnes Kurniawan,* Esy Maryanti,[‡] Lisawati Susanto*

* Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

[‡] Mahasiswa Program Pasca Sarjana Ilmu Biomedik Kekhususan Parasitologi FKUI

Abstrak: Mikrosporidia merupakan *emerging parasite* pada manusia yang dapat menyebabkan kelainan intestinal, muskular, okular dan sistemik. Infeksi mikrosporidia terutama terjadi pada penderita HIV/AIDS, dan yang sering dilaporkan yaitu mikrosporidiosis intestinal dengan gejala diare kronis dan *wasting syndrome* yang akan memperberat keadaan penderita AIDS. Di Indonesia sampai saat ini belum ada data-data tentang mikrosporidia dan infeksi yang ditimbulkannya sedangkan kasus HIV/AIDS makin bertambah secara cepat dan merupakan suatu ancaman global. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi mikrosporidia intestinal pada penderita AIDS dengan diare kronis di Jakarta dan korelasi jumlah CD4 dengan densitas mikrosporidia. Sebanyak 126 sampel tinja penderita AIDS dengan diare kronis yang dikumpulkan di Laboratorium Parasitologi FKUI diperiksa dengan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop dan dihitung densitas spora mikrosporidia. Pada penelitian ini diperoleh prevalensi mikrosporidia intestinal pada penderita AIDS dengan diare kronis sebesar 7,1% menggunakan pewarnaan kromotrop standar dan 6,3% dengan *quick-hot* gram kromotrop serta tidak terdapat perbedaan bermakna antara kedua teknik tersebut ($p=1,00$). Terdapat korelasi yang negatif antara densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4 ($p=0,00, r=-0,979$). Dari penelitian ini dapat disimpulkan prevalensi mikrosporidia intestinal pada penderita AIDS dengan diare kronis cukup rendah. Teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop dapat digunakan untuk mendeteksi mikrosporidia pada tinja. Pada penderita AIDS dengan jumlah CD4 yang rendah didapatkan densitas mikrosporidia yang tinggi.

Kata kunci : Mikrosporidiosis intestinal, diagnosis, modifikasi trikrom, CD4

Microsporidia in AIDS Patients with Chronic Diarrhoea in Jakarta

Agnes Kurniawan,* Esy Maryanti,[§] Lisawati Susanto*

* Department of Parasitology Faculty of Medicine, University of Indonesia

[§] Student of Biomedic Science Major Parasitology Faculty of Medicine, University of Indonesia

Microsporidia is an emerging parasite in human which infect gastrointestinal tract, muscular, ocular and systemic. Microsporidia infection is primarily a disease of HIV/AIDS patients. Intestinal microsporidia is most common infection and associated with chronic diarrhoea and wasting syndrome which worsened patient condition. Until now, there is no available data on this parasite in Indonesia. The objective of this study was to determine the prevalence of intestinal microsporidia among the AIDS patient with chronic diarrhoea in Jakarta and to determine the correlation between microsporidia's density and CD4 count. A number of 126 stools from AIDS patients with chronic diarrhoea referred to Parasitology Laboratory FKUI were examined by standard chromotrope staining and quick-hot gram chromotrope. The result showed the prevalence of intestinal microsporidia is 7.1% by standard chromotrope staining and 6.3% by quick-hot gram chromotrope. There is no significant difference between positive cases microsporidia ($p=1.00$). A negative correlation between the density of microsporidia and CD4 cell counts ($p=0.00$; $r=-0.979$) was observed. In conclusion prevalence of microsporidia among AIDS patients with chronic diarrhoea is low. Standard chromotrope staining and quick-hot gram chromotrope can be used to detect microsporidia. The density of microsporidia was higher in patient with low CD4 cell counts.

Key words:

Intestinal microsporidiosis, diagnosis, modified trichrome stain, CD4 count.

Pendahuluan

Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) merupakan penyakit imunodefisiensi didapat yang disebabkan oleh *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). HIV adalah virus retro yang menginfeksi sistem imun terutama sel T CD4 yang memiliki reseptor dengan afinitas tinggi untuk HIV. Jumlah penderita AIDS di dunia semakin hari semakin bertambah.¹ Di Indonesia sampai bulan Maret tahun 2008 telah dilaporkan peningkatan jumlah kasus AIDS mencapai 11868 kasus dan 6130 kasus HIV positif.²

Diare merupakan salah satu gejala yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas tinggi pada penderita yang terinfeksi dengan HIV. Diare inilah yang menjadi salah satu alasan penderita AIDS datang berobat.³ Mikrosporidia

merupakan salah satu parasit yang ditemukan pada tinja penderita AIDS dengan diare kronis. Dilaporkan 5-50% penderita diare kronis ini terinfeksi dengan mikrosporidia.⁴

Saat ini diketahui ada 14 spesies mikrosporidia yang dapat menginfeksi manusia terutama pada individu immunokompromis.⁵ Diantara 14 spesies tersebut, *Enterocytozoon bieneusi* dan *Encephalitozoon intestinalis* yang tersering ditemukan pada penderita AIDS dan diantara dua spesies ini *Enterocytozoon bieneusi* yang paling banyak dilaporkan.⁶

Mikrosporidiosis adalah penyakit yang disebabkan oleh mikrosporidia dan merupakan *an emerging and opportunistic infection* pada manusia.⁵ Pada tahun 1999 di

Perancis dilaporkan 26% kasus mikrosporidiosis intestinalis pada penderita AIDS,⁷ Pada tahun 2000 dan 2001 di Zimbabwe dan Guinea Bisseau terdapat 18% dan 11% kasus mikrosporidiosis intestinalis pada penderita AIDS dengan diare kronis.⁸ Di India tahun 2005 terdapat 10% kasus infeksi mikrosporidiosis intestinal pada penderita AIDS dengan diare kronis.⁹

Sebelum ada ART (*Antiretroviral Therapy*), prevalensi mikrosporidiosis intestinal tinggi pada penderita AIDS dengan diare kronis.¹⁰ Sejak digunakannya ART pada tahun 1995-1996, prevalensi mikrosporidiosis intestinal pada penderita HIV/AIDS di negara-negara maju menurun.¹⁰ Di negara-negara berkembang seperti Afrika dimana penggunaan ART masih terbatas prevalensi mikrosporidiosis intestinal masih tinggi.¹¹ Sedangkan di Indonesia sampai sekarang data-data tentang mikrosporidiosis belum pernah dilaporkan.

Gejala klinis mikrosporidiosis intestinal adalah diare kronis dan *wasting syndrome*. Diare bisa terjadi tiga sampai tujuh kali sehari bahkan bisa lebih dari 20 kali per hari, tinja lunak atau encer tanpa darah, kadang demam, anoreksia, mual, muntah dan penurunan berat badan sekitar 2 kg/bulan. Diare yang berkepanjangan disertai penurunan berat badan akan berlanjut menjadi kaheksia merupakan faktor yang mempercepat terjadinya kematian pada penderita AIDS.¹²

Respons imun seluler mempunyai peran utama dalam mengontrol infeksi mikrosporidia.¹³ Mikrosporidiosis yang disebabkan oleh *E. bienersi* lebih sering terjadi pada penderita dengan imunodefisiensi seluler berat yaitu bila jumlah CD4 turun yaitu $< 100/\text{mm}^3$.¹⁴

Diagnosis mikrosporidiosis intestinal yaitu dengan menemukan mikrosporidia di tinja.¹⁰ Pemeriksaan mikroskopis dengan menemukan spora mikrosporidia masih merupakan diagnosis yang umum dilakukan untuk

menegakkan diagnosis mikrosporidiosis.¹²

Ukuran mikrosporidia yang sangat kecil, memerlukan ketelitian pemeriksa dalam mendeteksi parasit ini, disamping pewarnaan khusus agar dapat dibedakan dengan organisme lain di tinja seperti sel ragi dan bakteri. Pewarnaan yang biasa digunakan yaitu pewarnaan kromotrop yang mempunyai sensitivitas 88%¹⁵ dan 72,7%⁶, akan tetapi proses pewarnaan ini membutuhkan waktu yang lama yaitu ± 120 menit, sehingga diperlukan teknik lain yang lebih cepat dan tepat. Teknik *quick-hot* gram kromotrop merupakan modifikasi teknik kromotrop dimana proses lebih cepat dan latar belakang lebih terang sehingga mikrosporidia lebih mudah terdeteksi.¹⁶

Berdasarkan besarnya permasalahan HIV/AIDS dan beratnya dampak mikrosporidiosis intestinal pada penderita AIDS terutama dengan jumlah CD4 yang rendah, serta tidak adanya data-data tentang mikrosporidia dan infeksi yang ditimbulkannya di Indonesia maka perlu dilakukan penelitian tentang mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis.

Bahan dan Cara Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi FKUI. Sampel adalah tinja penderita AIDS dengan diare kronis yang tidak diketahui status terapi antivirusnya yang berasal dari berbagai rumah sakit di Jakarta yang dikirim ke Laboratorium Parasitologi FKUI dari bulan September 2007 - Mei 2008. Tinja diberi larutan pengawet formalin 10% dengan perbandingan 1:3, sebagai kontrol positif adalah tinja positif mikrosporidia dari CDC Atlanta, USA. Data klinis penderita dan jumlah CD4 diambil dari data sekunder.

Pemeriksaan tinja dengan pewarnaan kromotrop standar¹⁷

Tinja sebanyak 10 μ l diletakkan pada kaca tutup lalu dioleskan dengan

lidi aplikator dan kemudian dibiarkan kering. Dilakukan fiksasi dengan metanol absolut 5 menit. Diwarnai dengan kromotrop selama 90 menit, setelah diwarnai dengan kromotrop dibilas dengan Alkohol asam 90% selama 1-3 detik. Kemudian dibilas dengan alkohol 95% dan 100% masing-masing selama 3 menit. Setelah dibilas dengan alkohol, dilakukan pembilasan dengan xylol sebanyak dua kali masing-masing selama 10 menit. Sediaan dikeringkan dan kemudian di *mounting*. Sediaan kemudian diperiksa dengan mikroskop perbesaran 1000x dengan minyak imersi. Untuk satu sampel dibuat 2 sediaan (duplo). Kontrol positif selalu disertakan tiap 10 sediaan.

Identifikasi mikrosporidia : Spora mikrosporidia akan tampak berwarna merah muda yang berukuran 1,0-1,6 x 0,9 μm berbentuk oval dengan "belt" melintang. Pemeriksaan dilakukan pada seluruh lapang pandang pada masing-masing sediaan dengan perbesaran 1000x. Hasil dinyatakan negatif bila tidak ditemukan mikrosporidia.

Pemeriksaan tinja dengan pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop¹⁶

Tinja sebanyak 10 μl diletakkan diatas kaca objek lalu dioleskan dengan lidi aplikator kemudian dibiarkan kering. Sediaan difiksasi dengan cara dilewatkan diatas api 3x, masing-masing 1 detik. Kemudian didinginkan pada suhu kamar. Sediaan diwarnai dengan solusi gentian violet dan dibiarkan 30 detik, setelah itu sediaan dibilas dengan air mengalir. Selama 30 detik sediaan diwarnai dengan solusi Gram iodine dan kemudian dibilas dengan *decolorizer*. Setelah itu dibilas dengan air mengalir dan diwarnai dengan kromotrop pada suhu 55°C selama 1 menit, lalu dibilas dengan alkohol asam 90% selama 1-3 detik. Kemudian sediaan dibilas berturut-turut dengan alkohol 95%, alkohol 100%, alkohol 100%, masing-

masing selama 30 detik. Sediaan dikeringkan dan dimounting. Setelah kering, sediaan diperiksa dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000x. Untuk satu sampel dibuat 2 sediaan (duplo). Kontrol positif selalu disertakan tiap 10 sediaan.

Identifikasi mikrosporidia : Spora mikrosporidia akan tampak berwarna ungu/violet yang berukuran 1,0-1,6 x 0,9 μm berbentuk oval dengan dinding spora yang jelas dan gambaran *a belt-like stripe*. Pemeriksaan dilakukan pada seluruh lapang pandang dengan perbesaran 1000x. Hasil dinyatakan negatif bila tidak ditemukan mikrosporidia.

Penilaian Hasil Kerja

Teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop dilakukan pada 126 sampel. Dilakukan pencatatan waktu yang diperlukan untuk pewarnaan satu sediaan dan waktu yang diperlukan untuk memeriksa satu sediaan. Kemudian dilakukan pemilihan teknik yang terbaik berdasarkan waktu pewarnaan, waktu pemeriksaan dan kualitas sediaan dari 126 sampel.

Sampel yang positif dari teknik pewarnaan yang dipilih dilakukan perhitungan kuantitatif untuk menentukan densitas mikrosporidia menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x. Sediaan dibaca dibawah mikroskop dimulai dari sudut kiri berlanjut ke kanan dan seterusnya secara sistematis.

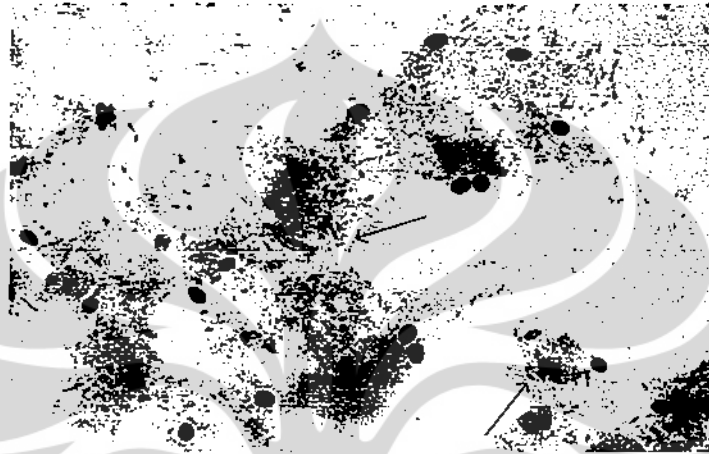
Waktu pewarnaan adalah waktu yang diperlukan untuk proses pewarnaan mulai dari fiksasi sampai selesai tahap akhir proses pewarnaan dan siap untuk dikeringkan. Waktu pemeriksaan adalah waktu yang diperlukan untuk membaca satu sediaan pada seluruh lapang pandang. Kualitas pulasan dinilai dari: latar belakang pewarnaan dan kontras antara mikrosporidia dengan sekitar.

Hasil

Kualitas Pulasan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar

Latar belakang berwarna hijau pucat.
Kontras antara mikrosporidia dengan sekitar : jelas, spora mikrosporidia dapat dibedakan dengan sekitarnya.

Spora mikrosporidia berwarna merah muda. Tampak garis diagonal (*belt-like strip*) melingkari spora mikrosporidia. (Gambar1).

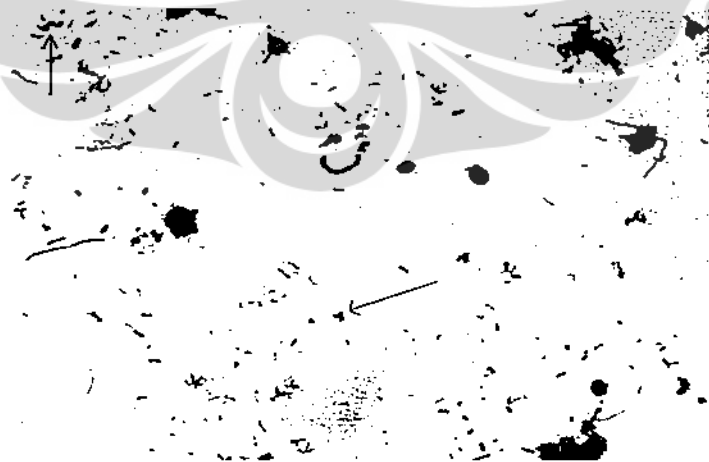


Gambar 1. Mikrosporidia dengan Pewarnaan Kromotrop Standar Menggunakan Perbesaran 1000x

Kualitas Pulasan dengan Teknik Pewarnaan *Quick-hot* Gram Kromotrop

Latar belakang terang berwarna hijau sangat pucat.
Kontras antara mikrosporidia dengan sekitar : kurang jelas, spora mikrosporidia dapat dibedakan dengan sekitarnya tetapi kadang sukar dibedakan dengan bakteri yang juga

berwarna ungu kebiruan. Spora mikrosporidia berwarna mulai dari ungu gelap, sampai ungu kebiru-biruan. Kadang tampak garis diagonal (*belt-like strip*) melingkari spora mikrosporidia. (Gambar2)



Gambar 2. Mikrosporidia dengan Pewarnaan *Quick-hot* Gram Kromotrop Menggunakan Perbesaran 1000x

Waktu Proses Pewarnaan dan Waktu Pemeriksaan

Pada teknik pewarnaan kromotrop standar, peneliti memerlukan waktu untuk proses pewarnaan kurang lebih 126 menit/slide dan waktu pemeriksaan kurang lebih 20 menit/slide. Pada teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop, waktu untuk proses pewarnaan lebih cepat yaitu memerlukan waktu kurang lebih 9 menit/slide dan waktu pemeriksaan kurang lebih 45 menit/slide. Berdasarkan hasil ini proses pewarnaan teknik kromotrop standar lebih lama dibandingkan dengan teknik *quick-hot* gram kromotrop, namun dari segi waktu pemeriksaannya lebih cepat.

Tabel 1. Hasil Pembacaan Sediaan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar dan *Quick-hot* Gram Kromotrop

	Kromotrop Standar			Total
	+	-		
Quick-hot Gram Kromotrop	8	0		8/126 (6,3%)
	1	117		118/126 (93,7%)
Total	9/126 (7,1%)	117/126 (92,9%)		126 (100%)

Berdasarkan tabel 1 didapatkan bahwa jumlah penderita mikrosporidiosis yang dideteksi dengan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop hampir sama. Pada uji statistik dengan Mc Nemar test tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara hasil dari kedua teknik tersebut ($p=1,00$).

Gambaran Hasil Pemeriksaan dengan Teknik Pewarnaan Kromotrop Standar

Dari 126 sampel yang diperiksa dengan teknik pewarnaan kromotrop standar didapatkan hasil seperti yang terlihat pada tabel 2 yaitu didapatkan bahwa sampel tinja yang positif mikrosporidia semuanya berasal dari penderita laki-laki dengan jumlah CD4 <200/mm³ seperti terlihat pada tabel 3. Sebanyak 6 dari 9 penderita dengan mikrosporidia positif di tinja mempunyai jumlah CD4 <50/ mm³. Satu penderita mempunyai CD4 50-100/mm³ dan dua penderita mempunyai CD4 >100-200/mm³. Pada tabel 3 juga terlihat bahwa 7 dari 9 sampel yang positif mikrosporidia ditemukan *Blastocystis hominis*. Dari 126 sampel pada penelitian ini, *B.hominis* merupakan protozoa yang paling sering ditemukan yaitu 73% (infeksi tunggal dan campur).

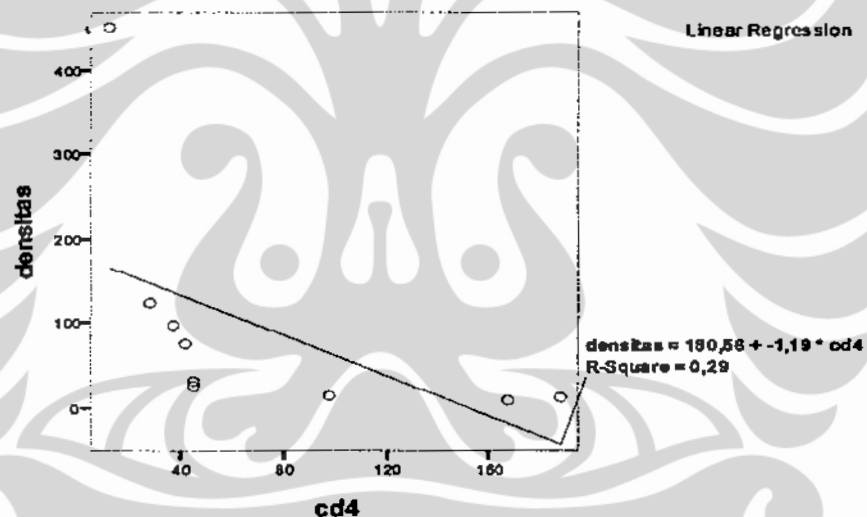
Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Berdasarkan Karakteristik Penderita AIDS dengan Diare Kronis

Hasil pemeriksaan	Jenis kelamin		Umur (thn)	
	Laki-laki	Perempuan	<30	≥30
Positif	9	0	5	4
Negatif	93	24	71	46
Total	102 (81%)	24 (19%)	76(60%)	50(40%)

Tabel 3. Densitas Mikrosporidia, Jumlah CD4 dan Parasit Usus Lain yang Ditemukan pada Sampel Mikrosporidia Positif

Densitas Mikrosporidia	Jumlah CD4 (/ul)	Parasit Usus Lain
12	188	<i>B.hominis</i>
75	42	<i>B.hominis</i>
30	45	Tidak ada
15	98	<i>B.hominis</i>
125	28	<i>B.hominis</i>
25	45	<i>E.histolytica/E.dispar</i> , <i>B.hominis</i>
450	12	<i>B.hominis</i>
98	37	<i>B.hominis</i>
8	168	Tidak ada

Densitas Mikrosporidia dihitung hanya pada 9 sampel tinja yang positif Mikrosporidia dengan jumlah spora antara 8 sampai 450 spora dalam 100 lapang pandang.



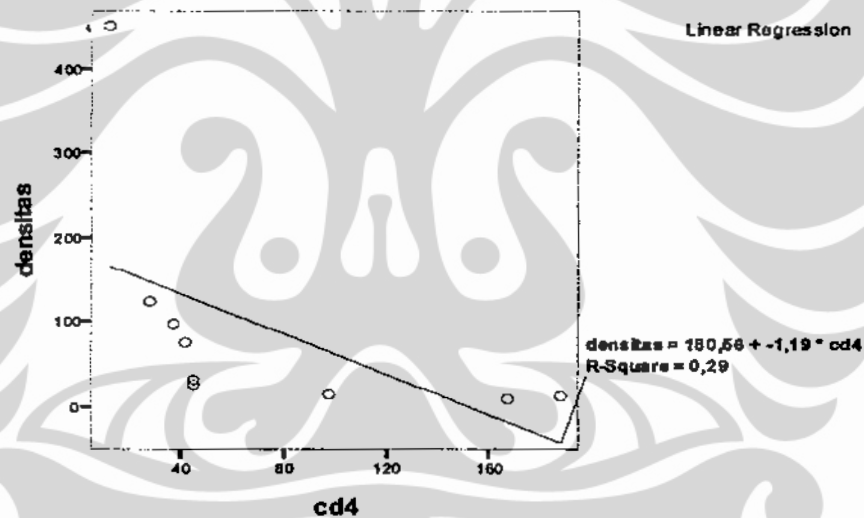
Gambar 3. Grafik Korelasi Densitas Mikrosporidia dengan Jumlah CD4

Hasil uji korelasi dengan uji Spearmans memperlihatkan adanya hubungan bermakna ($p=0,00$; $r=-0,979$) antara densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4 seperti terlihat pada tabel 4.4. Untuk melihat pengaruh jumlah CD4 terhadap tingginya densitas mikrosporidia dilakukan uji analisis regresi dan hasilnya seperti tampak pada grafik di gambar 4.3. Hasil ini menunjukkan korelasi negatif yaitu bahwa semakin rendah jumlah CD4 maka semakin tinggi densitas mikrosporidia. Sembilan sampel tinja mikrosporidia positif didapatkan enam sampel terinfeksi dengan *Blastocystis hominis* dan satu sampel terinfeksi dengan *Blastocystis hominis* dan *Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar*. Hanya dua sampel yang tidak terinfeksi dengan parasit usus lain.

Tabel 3. Densitas Mikrosporidia, Jumlah CD4 dan Parasit Usus Lain yang Ditemukan pada Sampel Mikrosporidia Positif

Densitas Mikrosporidia	Jumlah CD4 (/ul)	Parasit Usus Lain
12	188	<i>B.hominis</i>
75	42	<i>B.hominis</i>
30	45	Tidak ada
15	98	<i>B.hominis</i>
125	28	<i>B.hominis</i>
25	45	<i>E.histolytica/E.dispar</i> , <i>B.hominis</i>
450	12	<i>B.hominis</i>
98	37	<i>B.hominis</i>
8	168	Tidak ada

Densitas Mikrosporidia dihitung hanya pada 9 sampel tinja yang positif Mikrosporidia dengan jumlah spora antara 8 sampai 450 spora dalam 100 lapang pandang.



Gambar 3. Grafik Korelasi Densitas Mikrosporidia dengan Jumlah CD4

Hasil uji korelasi dengan uji Spearmans memperlihatkan adanya hubungan bermakna ($p=0,00$; $r=-0,979$) antara densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4 seperti terlihat pada tabel 4.4. Untuk melihat pengaruh jumlah CD4 terhadap tingginya densitas mikrosporidia dilakukan uji analisis regresi dan hasilnya seperti tampak pada grafik di gambar 4.3. Hasil ini menunjukkan korelasi negatif yaitu bahwa semakin rendah jumlah CD4 maka semakin tinggi densitas mikrosporidia. Sembilan sampel tinja mikrosporidia positif didapatkan enam sampel terinfeksi dengan *Blastocystis hominis* dan satu sampel terinfeksi dengan *Blastocystis hominis* dan *Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar*. Hanya dua sampel yang tidak terinfeksi dengan parasit usus lain.

Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan sampel tinja penderita AIDS dengan diare kronis sebanyak 126 sampel dengan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop.

Berdasarkan hasil pemeriksaan dengan teknik pewarnaan kromotrop standar diperoleh sediaannya mempunyai kontras yang jelas antara spora mikrosporidia dengan sekitar yaitu spora mikrosporidia berwarna merah muda sampai merah dengan latar belakang berwarna hijau pucat sehingga spora mikrosporidia dapat dibedakan dengan elemen tinja yang lain yaitu sel ragi, bakteri serta debris. Ini sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Weber *et al.*¹² Sel ragi juga akan berwarna merah muda-merah tetapi mempunyai ukuran yang lebih besar dari spora mikrosporidia dan kadang-kadang terlihat bertunas. Bakteri akan terwarnai hijau atau abu-abu transparan yang jelas berbeda dengan spora mikrosporidia. Sisa-sisa sel atau debris kadang berwarna merah muda dan merah yang sering meragukan dengan spora mikrosporidia tetapi ini dapat disingkirkan karena debris atau sisa-sisa sel mempunyai bentuk yang tidak teratur dan dalamnya transparan/ kosong. Berbeda dengan spora mikrosporidia yang mempunyai "belt" yang melingkarinya. Belt ini merupakan filamen polar yang merupakan ciri khas mikrosporidia yang membedakannya dari organisme lain.⁵

Pemeriksaan dengan teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop pada sediaan terlihat spora mikrosporidia berwarna ungu gelap dan ungu kebiruan dengan latar belakang berwarna hijau pucat. Hal ini sama seperti yang didapatkan pada penelitian oleh Moura *et al.*¹⁶ Spora mikrosporidia dapat dibedakan dari sel ragi yang juga berwarna ungu gelap serta berukuran lebih besar, sedangkan terhadap bakteri, spora mikrosporidia agak susah dibedakan karena ukuran yang hampir

sama dan juga terwarnai sama yaitu ungu kebiruan. Dilihat dari lamanya proses pewarnaan dan pemeriksaan, maka proses pewarnaan kromotrop standar membutuhkan waktu yang lama, rata-rata 126 menit, mulai dari fiksasi dengan metanol sampai selesai dibilas dengan xylol terakhir. Ini sedikit berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Weber *et al* yaitu hanya membutuhkan waktu 120 menit.¹² Perbedaan ini mungkin disebabkan karena pada penelitian tersebut tidak memperhitungkan waktu pengeringan antar tahap, sedangkan pada penelitian ini waktu pengeringan antara satu tahap ke tahap berikutnya dihitung.

Waktu yang dibutuhkan untuk mengeringkan tinja sebelum difiksasi dengan metanol kurang lebih 15 menit dan waktu yang dibutuhkan untuk mengeringkan sediaan sebelum di mounting kurang lebih 10 menit. Jadi secara keseluruhan waktu yang diperlukan peneliti mulai dari pembuatan apusan tinja sampai di mounting pada teknik pewarnaan kromotrop standar kurang lebih 151 menit/slide.

Pada proses pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop, peneliti memerlukan waktu yang lebih cepat dari teknik pewarnaan kromotrop standar yaitu kurang lebih 9 menit. Hal ini juga sedikit berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Moura *et al* yang menyebutkan hanya membutuhkan waktu 5 menit untuk proses pewarnaan dengan teknik ini.¹⁶ Perbedaan ini disebabkan karena pada penelitian yang dilakukan oleh Moura *et al* hanya menghitung waktu pewarnaan tanpa memperhitungkan waktu yang dibutuhkan untuk pengeringan antar satu tahap ke tahap berikutnya. Waktu yang dibutuhkan untuk mengeringkan tinja sebelum difiksasi dengan waktu untuk pengeringan sebelum di mounting pada teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop sama dengan kromotrop standar yaitu kurang lebih 15 menit dan 10 menit. Secara keseluruhan waktu yang diperlukan mulai dari pembuatan

apusan tinja sampai di mounting pada teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop kurang lebih 34 menit/slide.

Untuk proses pemeriksaan pada teknik kromotrop standar, peneliti membutuhkan waktu lebih cepat yaitu kurang lebih 20 menit sedangkan dengan teknik *quick-hot* gram kromotrop peneliti membutuhkan waktu kurang lebih 45 menit. Untuk hasil pemeriksaan dengan pewarnaan kromotrop standar didapatkan 9 sampel yang positif mikrosporidia. Pada *quick-hot* gram kromotrop terdapat 8 sampel positif mikrosporidia yang juga positif dengan kromotrop standar, tetapi satu sampel negatif, ini mungkin disebabkan karena jumlah spora mikrosporidia yang terlalu sedikit yaitu densitas mikrosporidia dengan pewarnaan kromotrop standar yaitu 8 spora mikrosporidia dalam 100 lapang pandang dan bakteri sangat banyak pada sampel ini sehingga susah untuk dideteksi.

Berdasarkan hal tersebut maka peneliti memilih pewarnaan kromotrop standar untuk menghitung densitas mikrosporidia. Walaupun pada kromotrop standar dibutuhkan waktu yang lama untuk proses pewarnaan tetapi lebih cepat dalam pemeriksaan untuk mendeteksi mikrosporidia. Pada teknik pewarnaan *quick-hot* gram kromotrop sulit membedakan antara spora mikrosporidia dengan bakteri yang terwarnai sama.

Pada penelitian ini, dengan teknik pewarnaan kromotrop standar didapatkan hasil 9 buah sampel mikrosporidia positif dari 126 (7,1%) sampel tinja penderita AIDS dengan diare kronis. Di Kano Nigeria pada tahun 2007 dilaporkan prevalensi mikrosporidiosis intestinal pada penderita AIDS sebesar 7,29% dan tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian ini, pada penelitian tersebut digunakan teknik ELISA dan pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan modifikasi Giemsa.¹⁹ Hal ini berbeda dengan di Lima, Peru pada tahun 2005 dilaporkan prevalensi mikrosporidiosis

intestinal pada penderita HIV/AIDS yaitu 67 (3%) dari 2652 sampel, yang menggunakan teknik pewarnaan kromotrop standar untuk deteksi mikrosporidia.²⁰

Di India pada tahun 2002 prevalensi mikrosporidiosis yaitu 2,5% dari 120 sampel tinja penderita HIV positif dengan dan tanpa diare. Penelitian di India ini menggunakan teknik pewarnaan kromotrop standar dan *quick-hot* gram kromotrop.²¹

Perbedaan prevalensi ini mungkin disebabkan karena daerah yang berbeda, kriteria subyek penelitian dan ketersediaan *highly active antiretroviral therapy* (HAART) di negara tersebut, dimana sejak penggunaan HAART mulai tahun 1996 prevalensi mikrosporidiosis pada penderita AIDS mulai menurun, dimana sebelum luasnya penggunaan HAART di USA prevalensi mikrosporidiosis intestinal 14,1% sampai 34,8%, dan setelah penggunaan HAART, berkurang menjadi 1,5%.²² Di Australia dilaporkan juga bahwa terjadi penurunan insiden mikrosporidiosis intestinal dari 11% pada tahun 1996 menjadi 0% pada tahun 2006.²³ Tapi pada negara-negara berkembang yang ketersediaan ART masih kurang, prevalensi mikrosporidiosis intestinal masih tinggi.¹⁰

Rendahnya prevalensi mikrosporidia pada penderita AIDS dengan diare kronis pada penelitian ini bisa juga disebabkan karena pengambilan sampel yang hanya satu kali.

Jumlah CD4 sebagai komponen sistem imun mempunyai peran dalam mengontrol infeksi terhadap mikrosporidia.¹³ Dari sembilan sampel tinja yang positif mikrosporidia, enam penderita mempunyai jumlah CD4 <50/mm³. Penelitian yang dilakukan di Kano-Nigeria 2007, didapatkan enam dari 14 penderita mikrosporidiosis intestinalis juga mempunyai jumlah CD4 <50/μl.¹⁹ Beberapa penelitian sebelumnya juga menyebutkan bahwa mikrosporidiosis intestinal terjadi pada

penderita HIV/AIDS dengan jumlah CD4 yang rendah yaitu $<100/\text{mm}^3$.^{14,20}

Dari hasil uji korelasi antara densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4 memperlihatkan adanya hubungan bermakna. Korelasi antara densitas mikrosporidia dengan jumlah CD4 secara statistik pada penelitian ini mempunyai korelasi yang negatif yaitu semakin rendah jumlah CD4 maka semakin tinggi densitas mikrosporidia. Pada penelitian yang dilakukan oleh Cotte *et al* dinyatakan bahwa status imun sangat berperan dalam terjadinya infeksi mikrosporidia.⁷ Jadi dapat dinyatakan bila jumlah CD4 semakin turun maka densitas mikrosporidia semakin tinggi dan diikuti dengan infeksi yang semakin berat.

Selain mikrosporidia, pada tinja penderita juga ditemukan parasit usus lain. Enam dari sembilan sampel yang positif mikrosporidia ditemukan *Blastocystis hominis* dan satu sampel koinfeksi dengan *B.hominis* dan *E.histolytica/ E.dispar*. Dua sampel tidak ditemukan infeksi parasit usus lain. *B.hominis* juga merupakan protozoa usus terbanyak (73% n=126) yang ditemukan dari seluruh sampel pada penelitian ini. Hasil ini hampir sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Kurniawan A, *et al* (2007) di Jakarta dimana *B.hominis* merupakan parasit yang paling umum ditemukan (72,4%, n=318) pada penderita HIV/AIDS.²⁴

Pada penelitian ini mikrosporidia dapat merupakan salah satu penyebab diare kronis pada sembilan sampel yang terdeteksi dengan parasit ini atau bisa juga diare oleh karena koinfeksi dengan parasit lain yaitu *B.hominis* dan *E.histolytica*. Selain parasit usus, diare pada penderita mungkin juga disebabkan oleh jamur atau bakteri yang juga terlihat pada pemeriksaan mikroskopis bersama-sama dengan mikrosporidia, akan tetapi tidak diketahui jenis bakterinya apakah komensal atau patogen, berasal dari tubuh penderita atau kontaminan sebab tidak dilakukan identifikasi bakteri atau jamur, dan kontainer tinja tidak steril.

Selain itu, diare pada penderita AIDS yang positif mikrosporidia tanpa terinfeksi parasit usus lain ini dapat juga disebabkan oleh keadaan lain, seperti obat-obatan. Penelitian yang dilakukan oleh Norhayati *et al* (2004) menyebutkan bahwa mikrosporidia intestinal dapat juga terdeteksi pada penderita HIV/AIDS tanpa gejala diare atau gejala gastrointestinal.¹⁸

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada pihak British Council proyek penelitian Del PHE 73 yang telah membiayai penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Baratawidjaja KG. Defisiensi imun. Dalam: Imunologi dasar. Edisi ke7. Jakarta: Balai penerbit FKUI; 2006. hal.334-57.
2. Jumlah kasus HIV/AIDS di Indonesia sampai 31 Maret 2008. Diunduh dari: <http://www.aidsindonesia.or.id>. Tanggal 14 juli 2008.
3. Weber R, Ledergerber B, Zbinden R, Altwegg M, Pfyffer GE, Spysler MA, *et al*. Enteric infection and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons. Arch Intern Med 1999; 159: 1473-80.
4. Fischer J, West J, Agochukwu N, Suire C, Hale-Donze H. Induction of host chemotactic response by *Encephalitozoon spp*. Infection and Immunity 2007; 75 (4): 1619-25.
5. Didier ES. Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Trop 2005; 94: 61-76.
6. Graczyk KT, Johansson MA, Tamang L, Visvesvara GS, Moura LS, DaSilva AS, *et al*. Retrospective species identifications of microsporidian spores in diarrheic fecal samples from HIV/AIDS patients by multiplexed fluorescence in situ

- hybridization. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (4): 1255-60.
7. Cotte L, Rabodonirina M, Chapus F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, et al. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without HIV infection. *J Infect Dis* 1999; 180(6): 2003-8.
 8. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyossi D, Bukholt MA, Tzipori S. *Enterocytozoon bienersi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67(3): 299-303.
 9. Kumar SS, Ananthan S, Joyee AG. Detection of *Enterocytozoon bienersi* by PCR using species-specific primer in stool samples of HIV patients. *Indian J Med Res* 2005; 121: 215-9.
 10. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18 (3): 423-45.
 11. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeerakitaka S, Ndeezi G, Downing R, Feng X, et al. Cryptosporidiosis and microsporidiosis in Ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the HIV. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73 (5): 921-5.
 12. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidia infections. *Rev Clin Microbiol* 1994; 7: 426-61.
 13. Canning EU. Microsporidia. In: Gillespie SH, Pearson RD, editors. *Principle and practice of clinical parasitology*. London: John Wiley & Sons Ltd; 2001. p. 171-95.
 14. Microsporidiosis. In Immunocompromised hosts. *CID* 2006; 42: 119-20.
 15. Ignatus R, Henschel S, Liesenfeld O, Mansmann U, Schmidt W, Koppe S et al. Comparative evaluation of modified trichrome and uvitex 2B Stains for detection of low numbers of microsporidian spores in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(9): 2266-9.
 16. Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F. A new and improved quick-hot gram chromotrope technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue section. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 888-93.
 17. Staining procedures. In National standard metode. 2007. Diunduh dari: www.evaluations-standards.org.uk. tanggal : 27 Mei 2007
 18. Norhayati M, Azlin M, Rukman, Chan BT, Sabiha P, Fatmah MS, Rozlida AR, et al. Prevalence of intestinal microsporidiosis in patients with and without gastrointestinal symptoms in Malaysian hospital setting. Unknown 2004.
 19. Omalu ICJ, Duhlińska DD, Anyanwu GI, Pam VA, Inyama PU. Seroprevalence of microsporidiosis in immunocompromised patients in Kano-Nigeria. *The Internet Journal of Parasitic Diseases* 2007; 1 (2).
 20. Bern C, Kawai V, Vargas D, Rabke-Verani J, Williamson J, Chavez-Valdez R, et al. The Epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima Peru. *J Infect Dis* 2005; 191: 1658-64.
 21. Mohandas K, Sehgal R, Sud A, Malla N. Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-Seropositive individuals in Northern India. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 83-4.
 22. Dworkin MS, Buskin SE, Davidson AJ, Cohn DL, Morse A, Inungu J, et al. Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus

infected patients with diarrhea in Major United States Cities. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007; 49(6): 339-42.

23. Van Hal SJ, Muthiah K, Matthews G, Harkness J, Stark D, Cooper D, et al. Declining incidence of intestinal microsporidiosis and reduction in AIDS-related mortality following introduction of HAART in Sydney Australia. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 1096-100.

24. Kurniawan A, Dwintasari SW, Poespa I, Karyadi T, Yuniastuti E, Djauzi S, et al. Opportunistic intestinal parasites infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta Indonesia. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. In press 2008.

25. Sastroasmoro S, Ismael S. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis edisi 2*. Jakarta. CV Sagung Seto. 2006.



RIWAYAT HIDUP

Nama Lengkap : dr. Esy Maryanti
Jenis Kelamin : Perempuan
Tempat/Tanggal Lahir : Pekanbaru/ 7 April 1979
Agama : Islam



Riwayat Pendidikan

- Tamat Sekolah Dasar Negeri 004 Sukajadi Pekanbaru tahun 1991
- Tamat Sekolah Menengah Pertama Negeri 1 Pekanbaru tahun 1994
- Tamat Sekolah Menengah Umum Negeri V Pekanbaru tahun 1997
- Selesai Profesi Dokter dari FK UNAND Padang tahun 2003

Riwayat Pekerjaan

Tahun 2003 – 2004 : Dokter Jaga Umum di Klinik Dokter Umum Pekanbaru
Tahun 2005 -- sekarang : Staf Pengajar Parasitologi di FK UNRI Riau

Karya Ilmiah

- Pola Penggunaan Obat di Rumah Tangga dalam Upaya Pengobatan Sendiri di Kelurahan Jati Kotamadya Padang

Sumber Dana Penelitian : Kerjasama dengan British Council Proyek Penelitian Del PHE 73.

Penulis

(dr. Esy Maryanti)