

**DETEKSI KRIPTOSPORIDIOSIS PADA ANAK BATITA  
MENGUNAKAN METODE IMUNOFLUORESEN  
FITC (C-mAb)**

**TESIS**

**IKA PUSPA SARI  
NPM: 0606150731**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI  
JAKARTA  
JUNI 2009**

**DETEKSI KRIPTOSPORIDIOSIS PADA ANAK BATITA  
MENGUNAKAN METODE IMUNOFLUORESEN  
FITC (C-mAb)**

**TESIS**

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

**IKA PUSPA SARI  
NPM: 0606150731**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI  
JAKARTA  
JUNI 2009**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

**Nama : Ika Puspa Sari**

**NPM : 0606150731**

**Tanda Tangan :**

*Ika Puspa Sari*



**Tanggal : 1 Juni 2009**

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Ika Puspa Sari  
NPM : 0606150731  
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Imunologi  
Judul Tesis : Deteksi Kriptosporidiosis pada Anak Batita  
Menggunakan Metode Imunofluoresen FITC-CmAb

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

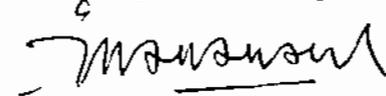
### DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : dr. Agnes Kumiawan, Sp.ParK., Ph.D (  )  
Pembimbing 2 : Dra. Ria Kodariah, MS (  )  
Penguji 1 : dr. Indra G. Mansur, DHES., SpAnd (  )  
Penguji 2 : Dra. Hendry Astuti, MS (  )  
Penguji 3 : dr. Anis Karuniawati, SpMK., PhD (  )

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 1 Juni 2009

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



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

## KATA PENGANTAR

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

Tesis ini dilaksanakan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta. Penelitian dalam Tesis ini berjudul “**Deteksi Kriptosporidiosis pada Anak Batita Menggunakan Metode Imunofluoresen FITC (CmAb)**”.

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

1. Dr. dr. Ratna Sitompul, Sp.M (K) sebagai dekan FKUI dan Prof. dr. Menaldi Rasmin, Sp. P (K), FCPP sebagai dekan FKUI periode 2004-2008 yang memberi kesempatan penulis menuntut ilmu di FKUI.
2. Dr. rer. physiol.dr. Septelia Inawati W. sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan pengarahan selama penulis menjalankan pendidikan.
3. Prof. dr. Saleha Sungkar, MS, DAP&E, Sp. ParK sebagai Kepala Departemen Parasitologi FKUI. Dan DR. Drs. Heri Wibowo, MBiomed. sebagai ketua kekhususan Imunologi atas nasehat dan motivasi selama pendidikan.
4. dr. Agnes Kurniawan, Ph.D., Sp.ParK, sebagai dosen pembimbing I dalam tesis sekaligus dosen wali/ penasehat akademik pada Program Sudi Ilmu Biomedik Kekhususan Imunologi FKUI. Terima kasih atas bimbingan dan dukungan yang diberikan selama penulis mengerjakan tesis.
5. Dra. Ria Kodariah, MS. sebagai dosen pembimbing II dalam tesis. Terima kasih atas bimbingannya dalam penelitian tesis.
6. dr. Herbowo A. Soetomenggolo, Sp.A, atas penggunaan sampelnya.
7. Sdri S. W. Dwintasari, S.Si, atas izin penggunaan data sekundernya.

8. Sdri Rudina Azimata Rosyidah, S. Si. atas ijin penggunaan data sekundernya.
9. British Council, proyek penelitian DelpHE 73.
10. dr. Saptawati dan Dr. Heri Wibowo, MS atas bimbingan metode statistika penelitian.
11. Seluruh staf pengajar/dosen, tata usaha dan karyawan PMIB FKUI dan kekhususan Parasitologi FKUI.
12. Suami Fatahillah Abdul Syukur yang selalu memberikan dukungan penuh selama penyelesaian studi. Terima kasih atas kesabaran dan keikhlasannya.
13. Ibu Hj. Sumini sebagai orang tua yang begitu besar perannya dalam mendidik dan membimbing semenjak kecil.
14. Saudari-saudari tercinta, Latifa Dwi Astuti dan Titiek Kusmawati sebagai adik yang sangat berperan dalam dukungan moril. Juga ananda Aisha Rahma Aulia yang penulis sayangi.
15. Teman-teman seperjuangan di PMIB FKUI, semoga perjuangan kita memberikan hasil yang bermanfaat untuk masa depan.
16. Semua guru yang telah mendidik semenjak kecil hingga sekarang.
17. Serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan tesis.

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

Jakarta, 1 Juni 2009

Penulis

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

---

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

Nama : Ika Puspa Sari  
NPM : 0606150731  
Program Studi : Pasca Sarjana Ilmu Biomedik  
Departemen : Imunologi  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis karya : Tesis

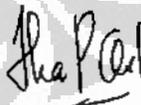
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Deteksi Kriptosporidiosis pada Anak Batita Menggunakan Metode Imunofluoresen FITC-CmAb**

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta  
Pada tanggal : 1 Juni 2009  
Yang menyatakan



( Ika Puspa Sari )

## ABSTRAK

Nama : Ika Puspa Sari  
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Immunologi  
Judul : Deteksi Kriptosporidiosis pada Anak Batita Menggunakan Metode Imunofluoresen FITC-CmAb

Kriptosporidiosis adalah penyakit parasitik yang disebabkan oleh *Cryptosporidium* sp, parasit koksidia intraseluler pada manusia dan hewan dan merupakan agen yang menyebabkan enterokolitis. *Cryptosporidium* sp. dapat menyebabkan penyakit gastrointestinal pada manusia, terutama anak-anak dan penderita imunodefisiensi. Angka kejadian infeksi umumnya lebih tinggi pada anak-anak dibandingkan orang dewasa. Gejala klinis kriptosporidiosis sangat luas mulai dari asimtomatik sampai diare persisten. Selain menyebabkan diare, infeksi ini juga dapat menyebabkan malnutrisi. Selama ini metode pulasan modifikasi tahan asam merupakan nilai baku emas bagi pemeriksaan *Cryptosporidium* sp. Namun sensitivitas teknik ini rendah dan sangat bergantung pada ketrampilan serta pengalaman tenaga mikroskopis dalam melihat *Cryptosporidium* sp. Deteksi ookista *Cryptosporidium* dengan antibodi monoklonal terhadap dinding ookista *Cryptosporidium* (CmAbs) merupakan metode yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi ookista dari apusan tinja dibandingkan metode pewarnaan konvensional. Penelitian ini, menggunakan teknik imunofluoresen dengan antibodi monoklonal yang telah dilabel oleh FITC untuk deteksi kriptosporidiosis pada batita. Hasilnya akan dibandingkan dengan PCR dalam hal sensitivitas dan spesifisitas. Penelitian ini adalah penelitian kualitatif dengan desain *cross sectional* menggunakan uji diagnostik. Hasil uji skrining dan tingkat *agreement* dihitung. Dari 239 sampel tinja yang diperiksa, didapatkan frekuensi kriptosporidiosis pada anak batita sebanyak 24,3%. Kriptosporidiosis umum terjadi pada populasi anak-anak di bawah tiga tahun. Dibandingkan dengan metode konvensional yaitu pewarnaan modifikasi tahan asam dan auramin fenol, deteksi kriptosporidiosis dengan pemeriksaan imunofluoresen langsung lebih sensitif dan lebih spesifik ( $p=0,000$ ). Dibandingkan dengan PCR, pemeriksaan imunofluoresen langsung memiliki sensitivitas 86,2% dan spesifisitas 98,9%. Sehingga dapat digunakan sebagai alternatif untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja terutama untuk studi epidemiologi atau skrining. Penilaian terhadap adanya faktor resiko jenis kelamin, status gizi dan diare ternyata didapatkan hasil tidak bermakna.

**Kata kunci:**

*Cryptosporidium* sp., Batita, FITC-CmAb, Imunofluoresen langsung

## ABSTRACT

Name : Ika Puspa Sari  
Study Program: Biomedical Science, Immunology  
Title : Cryptosporidiosis detection on toddlers using direct immunofluorescent method FITC-C-MAb.

Cryptosporidiosis is a parasitic disease caused by *Cryptosporidium* sp, coccidian parasite intracellular in human and animal. *Cryptosporidium* sp can cause gastrointestinal diseases in human, particularly in children and immunodeficiency individuals. Generally, the incidence higher among children than the adults. The clinical manifestations are wide, ranging from asymptomatic to persistent diarrhea and malnutrition in children. Modified acid fast staining method has been a gold standard to detect *Cryptosporidium* sp, however, this technique has low sensitivity and depends much on the experience and skill of the technician. Detection of *Cryptosporidium* sp oocyst using monoclonal antibody to *Cryptosporidium* sp wall (CmAbs) is a more sensitive and specific method to determine an oocyst from stool. The objective of this study is to determine cryptosporidiosis proportion between toddlers by FITC monoclonal antibody technique. The result will be compared to PCR on its sensitivity and specificity to cryptosporidiosis diagnosis. This research is qualitative interpretation with cross sectional design study which using diagnostic test. The result of the screening test and the levels of agreement were quantified. Of 239 fecal samples examined, there were 24,3% positive oocyst *Cryptosporidium* sp. Cryptosporidiosis is common in children under three years old population. Comparing to conventional methods, MTA and AF, cryptosporidiosis detection using direct immunofluorescent test is more sensitive and specific ( $p=0,000$ ). Comparing to PCR technique, direct immunofluorescent test has sensitivity 86,2% and specificity 98,9%. Statistically, direct immunofluorescent test can be used as an alternative method to detect *Cryptosporidium* sp. compared to PCR ( $p=0,065$ ), in particular for epidemiologic study or population screening. Evaluation on risk factors such as sex, malnutrition and diarrhea symptom appear that there is no significant differences.

**Key words:**

*Cryptosporidium* sp., toddlers, FITC-CmAb, direct immunofluorescent

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiv
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Hipotesis .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Kriptosporidiosis .....	6
2.1.1 Kriptosporidiosis pada individu imunokompeten .....	6
2.1.2 Kriptosporidiosis pada individu imunokompromis .....	7
2.1.3 Kriptosporidiosis pada anak .....	8
2.1.4 Gambaran klinis dan Riwayat Infeksi .....	9
2.1.5 Siklus Hidup <i>Cryptosporidium</i> sp. ....	10
2.1.6 Patofisiologi Kriptosporidiosis .....	12
2.1.7 Respon imun hospes .....	14
2.2 Faktor yang Mempengaruhi Infeksi Parasitik .....	16
2.3 Diagnosis Kriptosporidiosis .....	17
2.3.1 Metode Pewarnaan .....	17
2.3.2 Metode PCR .....	18
2.3.3 Metode Imunologi .....	19
a. Deteksi Antibodi <i>Cryptosporidium</i> dengan ELISA .....	19
b. Deteksi Antigen <i>Cryptosporidium</i> dengan IFA .....	19
2.4 Teknik Imunofluoresen .....	20
2.4.1 Metode dan Persiapan .....	22
<b>3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>24</b>
3.1 Desain Penelitian .....	24
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	24

3.3	Sampel Penelitian .....	24
3.4	Besar Sampel .....	24
3.5	Alat dan Bahan .....	25
3.5.1	Alat .....	25
3.5.2	Bahan .....	26
3.6	Cara Kerja .....	26
3.6.1	Teknik Konsentrasi Tinja dengan Air – Eter .....	26
3.6.2	Sampel Tinja Sediaan Konsentrasi untuk Apusan <i>Air-Dried</i> .....	27
3.6.3	Kontrol Positif .....	27
3.6.4	Teknik Imunofluoresen langsung .....	27
3.6.4.1	Pemeriksaan Sediaan Hasil Tes Imunofluoresen Langsung.....	28
3.6.4.1	Pemeriksaan Sediaan Hasil Tes Imunofluoresen Langsung dengan Filter DAPI.....	29
3.7	Penilaian Hasil Kerja .....	29
3.8	Definisi Operasional .....	29
3.9	Analisis Data .....	30
3.10	Alur Penelitian .....	31
<b>4.</b>	<b>HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>32</b>
4.1	Karakteristik sampel .....	32
4.2	Hasil Pemeriksaan dengan Uji Imunofluoresen.....	32
4.2.1	Hasil Pulasan pada Metode Pewarnaan Imunofluoresen....	33
4.2.2	Hasil Pemeriksaan Sediaan.....	34
4.3	Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan Konsentrasi dengan Metode MTA, AF dan Imunofluoresen untuk Deteksi <i>Ookista Cryptosporidium</i> sp.....	35
4.4	Distribusi karakteristik subyek berdasarkan <i>Cryptosporidium</i> positif pada pemeriksaan IFA.....	37
4.4	Hubungan antara status gizi dengan terjadinya infeksi <i>Cryptosporidium</i> sp pada batita.....	38
4.5	Hubungan antara kejadian diare dengan terjadinya infeksi <i>Cryptosporidium</i> sp pada batita.....	38
<b>5.</b>	<b>PEMBAHASAN .....</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>45</b>
6.1	Kesimpulan .....	45
6.2	Saran .....	45
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>46</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>51</b>
	<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>	<b>58</b>
	<b>SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TESIS .....</b>	<b>61</b>
	<b>DRAFT ARTIKEL .....</b>	<b>61</b>

## DAFTAR TABEL

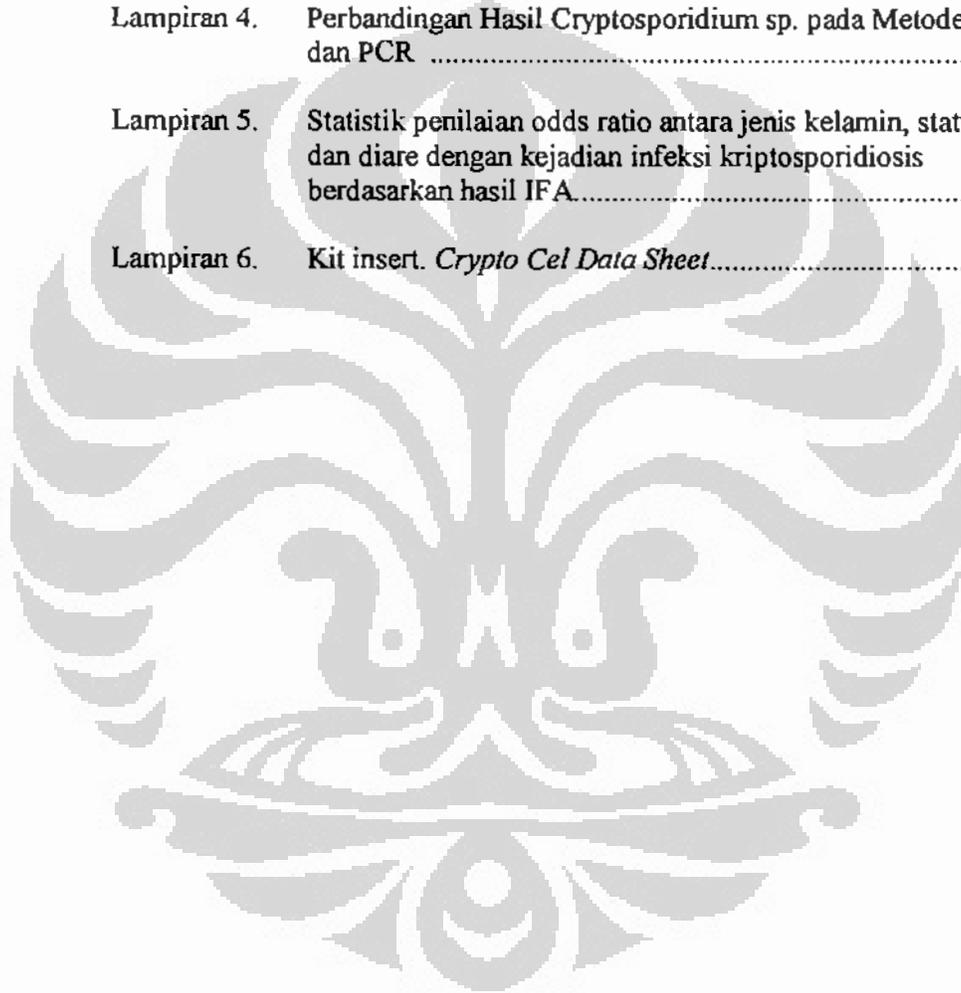
Tabel 4.1	Karakteristik Subyek.....	32
Tabel 4.2	Perbandingan tiga metode pemeriksaan untuk diagnosis <i>Cryptosporidium</i> sp.....	34
Tabel 4.3	Hasil penilaian semi kuantitatif dengan metode IFA.....	35
Tabel 4.4	Jumlah Sporozoit pada Ookista Sampel Positif <i>Cryptosporidium</i> sp.....	35
Tabel 4.5	Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan Konsentrasi pada Metode MTA, dan Imunofluoresen .....	36
Tabel 4.6	Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan Konsentrasi pada Metode AF dan IFA.....	36
Tabel 4.7	Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan Konsentrasi pada Metode IFA dan PCR.....	37
Tabel 4.8	Distribusi Karakteristik Batita <i>Cryptosporidium</i> sp. positif pada pemeriksaan IFA.....	38

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Siklus hidup <i>Cryptosporidium</i> sp.....	11
Gambar 2.2	Vili usus halus yang terinfeksi dengan keempat protozoa yang membentuk spora usus. Parasit matang dan memperbanyak diri intraselular di dalam enterosit, dan menghasilkan partikel (spora atau ookista) untuk kemudian dikeluarkan bersama feses.....	13
Gambar 2.3	Vili pada orang yang terinfeksi <i>Cryptosporidium</i> sp.....	14
Gambar 2.4	Teknik Imunofluoresen direk (langsung) dan indirek (tidak langsung).....	23
Gambar 4.1	Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. dengan Pewarnaan Imunofluoresen pada Tinja Konsentrasi dilihat dengan FITC (pembesaran 400 x).....	33
Gambar 4.2	Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp. dengan Pewarnaan Imunofluoresen pada Tinja Konsentrasi dengan DAPI (pembesaran 400 x).....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Rumus Uji Diagnostik .....	51
Lampiran 2.	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Metode MTA dan IFA .....	52
Lampiran 3.	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Metode AF dan IFA .....	53
Lampiran 4.	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Metode IFA dan PCR .....	54
Lampiran 5.	Statistik penilaian odds ratio antara jenis kelamin, status gizi dan diare dengan kejadian infeksi kriptosporidiosis berdasarkan hasil IFA.....	55
Lampiran 6.	Kit insert. <i>Crypto Cel Data Sheet</i> .....	56



## DAFTAR SINGKATAN

AF	: auramin fenol
AIDS	: <i>acquired immunodeficiency virus</i>
Balita	: bawah lima tahun
Batita	: bawah tiga tahun
COWP	: <i>cryptosporidium oocyst wall protein</i>
DAPI	: 4'-6-diamidino-2-phenylindole
DIC	: <i>differential interference contrast</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FITC	: <i>fluorescein isothiocyanate</i>
HAART	: <i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>
HCl	: hydro chloric
HIV	: <i>human immunodeficiency virus</i>
IFA	: <i>immunofluorescence assay</i>
IgA	: immunoglobulin A
IgG	: immunoglobulin G
IgM	: immunoglobulin M
mAb	: <i>monoclonal antibody</i>
MTA	: modifikasi tahan asam
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
sp	: spesies
UV	: ultraviolet

## BAB 1 PENDAHULUAN

### L1 Latar Belakang

Kriptosporidiosis adalah penyakit parasitik yang disebabkan oleh *Cryptosporidium*, parasit protozoa oportunistik yang termasuk dalam filum Apicomplexa. *Cryptosporidium* sp. adalah parasit koksidia intraseluler pada manusia dan hewan dan merupakan agen yang menyebabkan enterokolitis.<sup>1</sup> Walaupun kriptosporidiosis pada awalnya dikenal sebagai zoonosis, ternyata *Cryptosporidium* sp. dapat menyebabkan penyakit gastrointestinal pada manusia, terutama anak-anak dan penderita imunodefisiensi.<sup>2-4</sup> *Cryptosporidium* sp. pertama kali ditemukan pada anak berusia tiga tahun pada tahun 1976.<sup>3</sup> Setelah itu *Cryptosporidium* sp. dilaporkan menimbulkan wabah epidemik di daerah Milwaukee pada tahun 1993 yang menginfeksi 400.000 orang.<sup>3,5</sup> Angka kejadian kriptosporidiosis yang tercatat di Amerika Serikat tetap tinggi yaitu pada tahun 1999, 2001, dan 2002 dilaporkan terdapat 2.769, 3.787 dan 3.016 kasus.<sup>6,8</sup> Prevalensi kriptosporidiosis di negara berkembang diperkirakan berkisar 5-20%.<sup>7</sup> *Cryptosporidium* sp. lebih sering menginfeksi anak-anak. Beberapa laporan menyebutkan bahwa angka kejadian infeksi umumnya lebih tinggi pada anak-anak dibandingkan orang dewasa dan juga lebih tinggi pada anak-anak yang tinggal di daerah perkotaan dari pada pedesaan.<sup>9</sup> Prevalensi tertinggi pada anak usia di bawah 5 tahun.<sup>1,6,7</sup> Perch dkk. mendapatkan prevalensi terbanyak pada anak penderita diare di Afrika Barat yang berusia di bawah 3 tahun (batita) sebesar 7,7% dengan metode pemeriksaan modifikasi Ziehl Neelsen dan hal ini diperkirakan berhubungan erat dengan status imunnya.<sup>10-12</sup> Di Indonesia pun telah dilakukan penelitian tentang prevalensi kriptosporidiosis pada anak-anak. Katsumata et al pada tahun 1992-1993 mendapatkan prevalensi kriptosporidiosis sebesar 2,8% pada anak diare dan 1,4% pada anak tidak diare di Surabaya.<sup>13</sup> Sedangkan pada tahun 2006 di Jakarta, Soetomenggolo mendapatkan prevalensi sebesar 2,1% pada anak batita yang bermukim di bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu.<sup>14</sup> Rendahnya prevalensi yang didapatkan pada penelitian tersebut mungkin tidak sesuai dengan yang sebenarnya dikarenakan metode pemeriksaan yang kurang sensitif sedangkan jumlah ookista pada sampel terlalu sedikit.<sup>1</sup>

Gejala klinis kriptosporidiosis sangat luas mulai dari asimtomatik sampai diare persisten. Diare yang timbul dapat menyerupai kolera dan menyebabkan kehilangan cairan 3-20 liter per hari sehingga dapat terjadi dehidrasi berat.<sup>3,12</sup> Walaupun penyakit ini dapat sembuh sendiri tetapi sebuah penelitian di Brazil seperti dikutip Pereira menyebutkan bahwa 13% anak yang terinfeksi *Cryptosporidium* sp. akan mengalami gejala yang berulang dalam 6 hari sampai 2,5 bulan setelah infeksi yang pertama.<sup>11</sup> Selain menyebabkan diare, infeksi ini juga menyebabkan malnutrisi. Hipotesis ini didukung oleh penelitian kohort dari 1064 anak-anak di Guinea-Bissau. Anak-anak yang menderita kriptosporidiosis baik anak laki-laki dan perempuan rata-rata kehilangan 392 dan 294 gram dalam 180 hari.<sup>10</sup> Penelitian lain juga menemukan adanya pengaruh jangka panjang pada pertumbuhan anak dengan kriptosporidiosis. Sehingga diduga ada keterkaitan antara malnutrisi dengan kriptosporidiosis, baik dengan terhambatnya pertumbuhan anak atau infeksi *Cryptosporidium* dapat lebih parah pada anak-anak yang telah menderita malnutrisi.<sup>15</sup>

Diagnosis kriptosporidiosis pada prinsipnya adalah dengan menemukan ookista *Cryptosporidium* sp. secara mikroskopis pada sediaan feses yang dipulas. Beberapa teknik parasitologi untuk mengidentifikasi ookista *Cryptosporidium* sp., antara lain dengan teknik pewarnaan seperti pulasan tahan asam modifikasi Ziehl-Neelsen (mZN), pewarnaan dengan fluorokrom auramin fenol (AF), dan metode imunofluoresensi (IF).<sup>1</sup> Penggunaan metode konsentrasi ookista dalam sampel feses dapat meningkatkan sensitivitas dan rata-rata deteksi.<sup>16,17</sup> Beberapa teknik konsentrasi yang digunakan antara lain Formalin Etil-Asetat (FEA), Formalin Eter, larutan gula Sheater, dan lain-lain. Baik metode flotasi dan sedimentasi, sesuai untuk konsentrasi ookista *Cryptosporidium* sp.<sup>17,18</sup>

Selama ini metode pulasan modifikasi tahan asam merupakan nilai baku emas bagi pemeriksaan *Cryptosporidium* sp. Metode modifikasi tahan asam sudah umum digunakan di seluruh dunia, terutama di negara-negara berkembang karena biaya relatif murah. Namun, sensitivitas teknik ini rendah dan sangat bergantung pada ketrampilan serta pengalaman tenaga mikroskopis dalam melihat *Cryptosporidium* sp.<sup>1,2</sup> Sedangkan sensitivitas deteksi untuk kombinasi teknik konsentrasi dan imunofluoresen dapat mencapai 10.000 ookista per gram tinja cair dan 50.000 per gram tinja padat.<sup>12,17</sup>

Tidak dapat dipungkiri bahwa sebagian besar pasien yang didiagnosis infeksi ini memiliki gejala klinis yang jelas, dengan berbagai tingkat keparahan diare. Bila jumlah ookista yang dikeluarkan di tinja cukup banyak, maka deteksi ookista secara mikroskopik lebih mudah ditegakkan. Tetapi pada pasien yang memiliki sedikit ookista pada tinjanya, pada pemeriksaan mikroskopik dengan pulasan tahan asam dari tinja konsentrasi dapat memberikan hasil negatif. Ada hubungan antara jumlah parasit pada tinja dan gejala klinis yang terlihat pada pasien.<sup>19,20</sup>

Sensitivitas akan meningkat bilamana dilakukan pemeriksaan lebih dari satu spesimen pada satu sampel dengan konsekuensi akan membutuhkan waktu lebih lama. Untuk itu diperlukan teknik pemeriksaan yang lebih sensitif dan spesifik serta efisien terhadap diagnosis primer kriptosporidiosis.<sup>2</sup> Semakin sensitif tes diagnostik yang digunakan, akan lebih mudah untuk mengidentifikasi infeksi yang berintensitas rendah.<sup>1,2,10</sup>

Alternatif lain yang dapat digunakan adalah auramin fenol (AF) sebagai zat fluorokrom/pewarna fluoresensi, yang memiliki afinitas kuat terhadap dinding sel *Cryptosporidium* sehingga ookista tampak berfluoresensi dan mudah ditangkap mata. Rosyidah et al (2008) meneliti bahwa frekuensi infeksi *Cryptosporidium* sp. pada anak batita di Kp. Melayu dengan pewarnaan AF adalah 19,2%, jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil yang didapat oleh peneliti sebelumnya.<sup>21</sup> Tetapi untuk sampel tinja yang mengandung sedikit ookista, metode AF kurang spesifik, oleh karena itu harus dikonfirmasi dengan pemeriksaan imunofluoresensi yang bersifat genus spesifik.<sup>20,21</sup>

Deteksi ookista *Cryptosporidium* dengan antibodi monoklonal terhadap dinding ookista *Cryptosporidium* (CmAbs) merupakan metode yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi ookista dari apusan tinja dibandingkan metode pewarnaan konvensional. Banyak antibodi komersial yang telah dikembangkan untuk mendeteksi epitop ookista *Cryptosporidium* sp. Dengan mikroskop fluoresens, ookista *Cryptosporidium* sp. yang berikatan dengan FITC-CmAb akan berwarna hijau apel (green apple) sehingga mudah diidentifikasi tanpa perlu pembesaran skala obyektif yang tinggi.<sup>1,2,12,17,18,22</sup>

Berdasarkan hal-hal tersebut, antibodi monoklonal diharapkan dapat menjadi metode alternatif karena mempunyai spesifisitas dan sensitifitas yang lebih tinggi, terutama bila pasien yang diperiksa dalam jumlah besar dan gejala yang sangat minimal.

Laporan yang ada mengenai metode ini juga mengindikasikan bahwa angka kejadian yang dihasilkan akan lebih akurat. Metode menggunakan antibodi monoklonal ini juga dapat mengeliminasi adanya kemungkinan *false-positive* dan *false-negative* yang biasanya terjadi pada metode pewarnaan rutin, modifikasi tahan asam.<sup>1,2,12,19</sup>

Pada penelitian ini, akan dilakukan deteksi kriptosporidiosis pada anak balita menggunakan teknik imunofluoresen menggunakan antibodi monoklonal terhadap *Cryptosporidium* sp. yang telah dilabel oleh FITC. Hasilnya akan dibandingkan dengan AF dalam hal sensitivitas pada diagnosis kriptosporidiosis, serta hubungannya dengan gejala klinis dan status imun.<sup>1</sup>

## **I.2. Rumusan masalah**

Infeksi *Cryptosporidium* pada anak balita menyebabkan diare dan malnutrisi sehingga diperlukan metode yang spesifik dan sensitif untuk mendeteksi adanya infeksi *Cryptosporidium*. Rendahnya prevalensi kriptosporidiosis pada anak usia di bawah tiga tahun (batita) di bantaran sungai Ciliwung Kampung Melayu, yaitu sebesar 2,1 % (n = 489) pada pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan modifikasi tahan asam dan 19% (n = 130) dengan teknik pulasan AF menandakan bahwa perbedaan teknik pemeriksaan yang dilakukan terhadap *Cryptosporidium* sp. menghasilkan perbedaan prevalensi yang cukup besar. Hal ini disebabkan karena kemampuan teknisi yang berbeda dan adanya reaksi silang dengan jamur atau debris yang dapat menyebabkan tingginya angka *false positif*. Sehingga diperlukan metode lain yang dapat mengatasi kelemahan-kelemahan tersebut. Jika dilakukan skrining dalam populasi umum yang besar dapat terjadi *false negative* atau pun *false positive* karena beberapa organisme lain seperti jamur dan debris yang morfologinya mirip dapat ikut terwarnai. Sehingga dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

- Apakah dengan pemeriksaan imunofluoresen menggunakan FITC dimana antibodi monoklonal akan mengenali epitop yang spesifik terhadap *Cryptosporidium* akan didapatkan hasil yang lebih akurat?
- Bagaimana hubungan antara status gizi dan diare dengan kemungkinan terjadinya kriptosporidiosis pada anak-anak?

### **I.3. Tujuan**

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

Mendeteksi kriptosporidiosis pada anak batita di bantaran sungai Ciliwung dengan uji imunofluoresen langsung menggunakan antibodi monoklonal terhadap ookista *Cryptosporidium* sp. yang dilabel FITC (FITC-CmAb).

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

1. Mengetahui frekuensi kriptosporidiosis pada anak usia di bawah tiga tahun (batita) di bantaran sungai Ciliwung Kampung Melayu pada sediaan tinja konsentrat dengan teknik imunofluoresen menggunakan FITC-CmAb.
2. Menilai sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan teknik pewarnaan tahan asam dan auramin fenol terhadap teknik imunofluoresen FITC-CmAb untuk pemeriksaan *Cryptosporidium* sp.
3. Menilai sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan teknik imunofluoresen FITC-CmAb terhadap teknik PCR sebagai metode baku emas untuk pemeriksaan *Cryptosporidium* sp.
4. Mengetahui hubungan antara status gizi dengan kejadian infeksi *Cryptosporidium* sp pada batita yang tinggal di bantaran sungai Ciliwung.
5. Mengetahui hubungan diare dengan kejadian infeksi *Cryptosporidium* sp. pada batita yang tinggal di bantaran sungai Ciliwung.

#### **I.4. Hipotesis**

Deteksi kriptosporidiosis pada batita dengan menggunakan teknik imunofluoresen langsung lebih sensitif dan spesifik dibandingkan dengan teknik pemeriksaan tahan asam dan auramin fenol.

#### **I.5. Manfaat**

Dengan dikembangkannya metode diagnosis *Cryptosporidium* sp. dengan metode imunofluoresen menggunakan label FITC-CmAb, diharapkan dapat membantu menentukan prevalensi *Cryptosporidium* sp. yang sesungguhnya di masyarakat Indonesia sehingga dapat dilakukan upaya-upaya pengobatan dan pencegahan yang sesuai.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Kriptosporidiosis

*Cryptosporidium* sp. adalah protozoa enterik patogen yang pertama kali ditemukan oleh Tyzzer hampir 100 tahun yang lalu di dalam epitel lambung mencit. Ketika itu parasit ini tidak dianggap sebagai agen infeksius pada manusia sampai tahun 1976 saat diidentifikasi dari anak perempuan berumur 3,5 tahun dengan enterokolitis. Setelah ditemukannya epidemik AIDS pada tahun 1980an dan terjadinya wabah pencemaran air pada tahun 1990an, *Cryptosporidium* sp. disadari sebagai patogen enterik yang penting. Pada orang dewasa normal, infeksi dapat sembuh dengan sendirinya, tetapi pada orang dengan defisiensi imun selular, infeksi dapat berkembang menjadi persisten. Pada anak-anak di negara berkembang, kriptosporidiosis dapat menyebabkan malnutrisi dan hambatan perkembangan. Di Amerika Serikat, seroprevalensi *Cryptosporidium* sp. 25-35 persen. Seroprevalensi dapat meningkat pada daerah yang kurang berkembang di Amerika Serikat dan negara berkembang.<sup>1,7,23</sup>

##### 2.1.1. Kriptosporidiosis pada individu imunokompeten

Kriptosporidiosis pada manusia ditemukan kosmopolit dan ditemukan di seluruh dunia. Manusia dan hewan pada semua tingkatan umur, umumnya rentan terhadap infeksi *Cryptosporidium* sp. Prevalensi kriptosporidiosis pada manusia di Indonesia sampai saat ini belum banyak diketahui. Akan tetapi di luar negeri terdapat antara 1 – 18 % kasus dengan keluhan gastroenteritis, pada pemeriksaan laboratorium *Cryptosporidium* sp. positif. Prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada spesimen tinja sekitar 1-3% di Eropa dan Amerika Utara dan 5-10% di Asia dan Afrika.<sup>5,7</sup>

*Cryptosporidium* sp. juga menjadi salah satu penyebab diare pada pelancong, diare epidemik di rumah sakit, pusat pemerintahan dan institusi lainnya di seluruh dunia. Faktor risiko kriptosporidiosis lainnya diantaranya pekerja di pusat asuhan harian anak-anak (*Day Care Center*), orang tua dari anak yang terinfeksi, wisatawan (*international traveller*), perenang yang menelan air saat berenang di kolam renang, danau, sungai, dan perairan lain, serta orang yang meminum air dari sumber yang terkontaminasi atau meminum air yang tidak masak. Risiko terinfeksi cukup

bervariasi untuk setiap individu, karena dipengaruhi oleh latar belakang genetik dan status imun yang dapat mempengaruhi kerentanan terhadap infeksi.<sup>5</sup>

Durasi episode diare akibat kriptosporidiosis pada individu yang fungsi kekebalan tubuhnya normal, biasanya kurang dari 1 bulan dan dapat sembuh.<sup>5</sup>

### 2.1.2. Kriptosporidiosis pada individu immunokompromis

Kriptosporidiosis sering terjadi pada pasien immunokompromis, seperti pasien AIDS, orang dengan immunodefisiensi primer, dan kanker dan pasien transplan yang menjalani terapi immunosupresan. Biasanya sering dihubungkan dengan diare kronis yang dapat mengancam jiwa.<sup>5,7</sup>

Tidak seperti individu immunokompeten dimana kriptosporidiosis biasanya dapat sembuh sendiri, orang dengan AIDS sangat rentan dan dapat mengalami kriptosporidiosis yang sangat parah dengan manifestasi diare masif yang kronik. Faktor yang merupakan predisposisi pasien ini pada kriptosporidiosis kronik adalah keterlibatan respon imun. Individu yang terinfeksi HIV dapat menderita kriptosporidiosis yang parah dan kronis. Flanigan dkk menyatakan bahwa pasien dengan jumlah sel CD4 lebih besar dari 180 sel/mm<sup>3</sup> dapat sembuh dari infeksi secara spontan sedangkan 87% pasien dengan jumlah sel CD4 kurang dari 180 sel/mm<sup>3</sup> umumnya akan mengalami diare persisten.<sup>5,7,24</sup>

Kriptosporidiosis pada pasien dengan AIDS akan bermanifestasi dalam beberapa gambaran klinis. Manabe dkk telah menetapkan 4 kategori gambaran klinis kriptosporidiosis yang berhubungan dengan AIDS: diare seperti kolera yang membutuhkan terapi rehidrasi intravena (33%), diare kronik (36%), diare intermiten (15%) dan diare transien/sementara (15%).<sup>5,24</sup>

Walaupun saluran intestinal merupakan tempat utama kriptosporidiosis, sistem organ lain juga dapat terlibat diantaranya: paru-paru, telinga tengah, saluran empedu, pankreas dan lambung. Organ tersebut lebih dianggap menggambarkan penyebaran luminal infeksi primer saluran intestinal dibandingkan infeksi ekstraintestinal primer atau infeksi diseminata. Saluran empedu merupakan lokasi yang paling sering untuk terjadinya infeksi ekstraintestinal. Wakil dkk menemukan bahwa pasien HIV positif yang terpajan air yang tercemar *Cryptosporidium* memiliki resiko yang lebih tinggi untuk terjadinya gangguan saluran empedu dan kematian dalam satu tahun jika jumlah sel CD4 kurang dari 50 sel/mm<sup>3</sup>.<sup>5</sup>

Sejak diperkenalkannya HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) untuk tatalaksana pasien terinfeksi HIV, angka morbiditas dan mortalitas keseluruhan disebabkan infeksi oportunistik menurun secara signifikan. Beberapa penelitian secara spesifik menyebutkan penurunan prevalensi kriptosporidiosis setelah diberikan HAART. Juga diketahui bahwa perbaikan fungsi sistem imun dengan HAART membantu kesembuhan kriptosporidiosis pada beberapa pasien.<sup>5</sup>

### 2.1.3. Kriptosporidiosis pada anak

*Cryptosporidium* sp. dikenal sebagai penyebab diare terutama pada anak-anak di negara berkembang. Beberapa penelitian telah menyatakan bahwa kriptosporidiosis paling sering mengenai anak-anak kurang dari 1 tahun<sup>5,25,26</sup> dan berhubungan dengan malnutrisi, atau keduanya. Chekley dkk melakukan penelitian kohort pada anak-anak Peru berumur 0-3 bulan selama 2 tahun untuk menjawab pertanyaan tersebut. Pemeriksaan antropometrik dilakukan setiap bulan sedangkan koleksi tinja dan pemeriksaannya dilakukan seminggu sekali. Deteksi *Cryptosporidium* sp. menggunakan pemeriksaan mikroskopik MTA dan imunofluoresen. Insidens kriptosporidiosis pada penelitian ini cukup tinggi (45%); dan disimpulkan bahwa berat badan rendah merupakan faktor resiko yang signifikan untuk kriptosporidiosis. Pada penelitian ini juga dilaporkan bahwa anak-anak dengan pertumbuhan terhambat memiliki resiko yang lebih tinggi sebesar 1,52 kali dibandingkan yang normal.<sup>25</sup>

Anak dengan kriptosporidiosis simtomatik perkembangannya lebih lambat pada bulan pertama infeksi. Yang menarik, penelitian ini mengidentifikasi adanya persentase infeksi asimtomatik yang besar (63%). Efek dari kriptosporidiosis asimtomatik adalah berat badan kurang dibandingkan anak-anak kontrol. Akibatnya, diduga bahwa kriptosporidiosis dapat menyebabkan malnutrisi pada anak-anak yang sebelumnya normal.<sup>5,24</sup>

Faktor resiko lain yang berhubungan dengan infeksi *C. parvum* diantaranya defisiensi vitamin A, kurang mendapatkan ASI, dan ditempatkan di tempat penitipan anak gabung.<sup>23</sup>

Faktor-faktor yang menentukan apakah infeksi primer akan menyebabkan gejala atau tidak belum dapat diketahui. Pada penelitian anak-anak di Brazil, Agnew dkk mencoba menggali mekanisme yang mungkin terlibat dalam terjadinya malnutrisi pasca kriptosporidiosis.<sup>26</sup> Pada studi kasus kontrol anak-anak yang dimonitor sejak lahir, anak-anak yang berumur kurang dari satu tahun ditemukan mengalami diare

masif dan cair, yang bukan disebabkan karena episode awal atau berulang dari kriptosporidiosis. Hanya 14% dari anak-anak ini yang dari awal mengalami koinfeksi dengan patogen sekunder diantaranya *Salmonella sp*, *Shigella flexneri*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, dan *Giardia lamblia*. Mekanisme diare masih belum jelas tetapi mungkin melibatkan malabsorpsi persisten disebabkan rusaknya vili usus oleh *Cryptosporidium sp*. atau meningkatnya kerentanan terhadap patogen enterik lainnya. Penyebab lain, gangguan sistem imun dapat juga terjadi pada anak-anak ini.<sup>5</sup>

#### 2.1.4. Gambaran klinis dan Riwayat Infeksi

Kriptosporidiosis pada orang dewasa dan anak-anak yang imunokompeten biasanya sembuh sendiri. Pada beberapa orang terinfeksi tanpa gejala, ternyata ookista banyak dikeluarkan. Penelitian pada sukarelawan orang dewasa sehat memperlihatkan bahwa 10 ookista sudah cukup untuk menyebabkan infeksi dan menimbulkan gejala. Diare akut dan persisten dapat terjadi pada infeksi *Cryptosporidium sp*. Kriptosporidiosis ditandai oleh diare cair dan *profuse* yang berhubungan dengan nyeri abdomen. Pada beberapa kasus, demam (35% pada diare akut dan 63% pada diare persisten), malaise, nausea, muntah-muntah (44% pada diare akut dan 50% pada diare persisten), dan hilang nafsu makan. Feses tinja juga mungkin mengandung darah (14% pada diare akut dan 31% pada diare persisten), lendir (21% pada diare akut dan 19% pada diare persisten), leukosit (28% pada diare akut dan 38% pada diare persisten), dan laktoferin (67% pada diare akut dan 75% pada diare persisten) pada anak-anak dengan infeksi *Cryptosporidium sp*.<sup>23</sup>

Penelitian di Brazil menemukan bahwa onset gejala umumnya terjadi 5-10 hari setelah menelan ookista dan berakhir 4-7 hari. Gejala dapat berlangsung selama 5 minggu pada hospes yang imunokompeten.<sup>23,26</sup>

Pada penelitian kohort terpisah di Brazil, 13 (7%) dari 189 anak-anak yang diikuti sejak lahir selama 4 tahun ditemukan mengalami infeksi berulang *Cryptosporidium*. Pada penelitian ini, kopatogen yang paling sering ditemukan adalah enteroagregative (38,6%), enterotoksigenik (14%) dan *Escherichia coli* adherent (13,6%), *Giardia lamblia* (6,8%) dan helmint (13,6%). Pada wabah *Cryptosporidium sp*. di Wisconsin, hasil laboratorium mengkonfirmasi bahwa infeksi berulang terjadi sebesar 39% setelah sembuh. Ookista dari individu yang terinfeksi dapat terus dikeluarkan bahkan setelah gejala hilang.<sup>23</sup>

Gejala pemapasan atas juga terkadang berhubungan dengan infeksi *Cryptosporidium* sp. dan telah ditemukan pada kurang lebih 15% kasus anak-anak. Gejala ini dapat terjadi pada pasien imunokompeten dan imunokompromis yang terinfeksi *Cryptosporidium* sp. Gejala pemapasan diantaranya bronkitis kronik pada pasien AIDS, batuk dan sekresi lendir, sesak napas dan nyeri toraks. Sedangkan, infeksi *Cryptosporidium* sp. pada saluran napas bawah lebih jarang terjadi dan hanya pada pasien imunokompromis.<sup>23,24</sup>

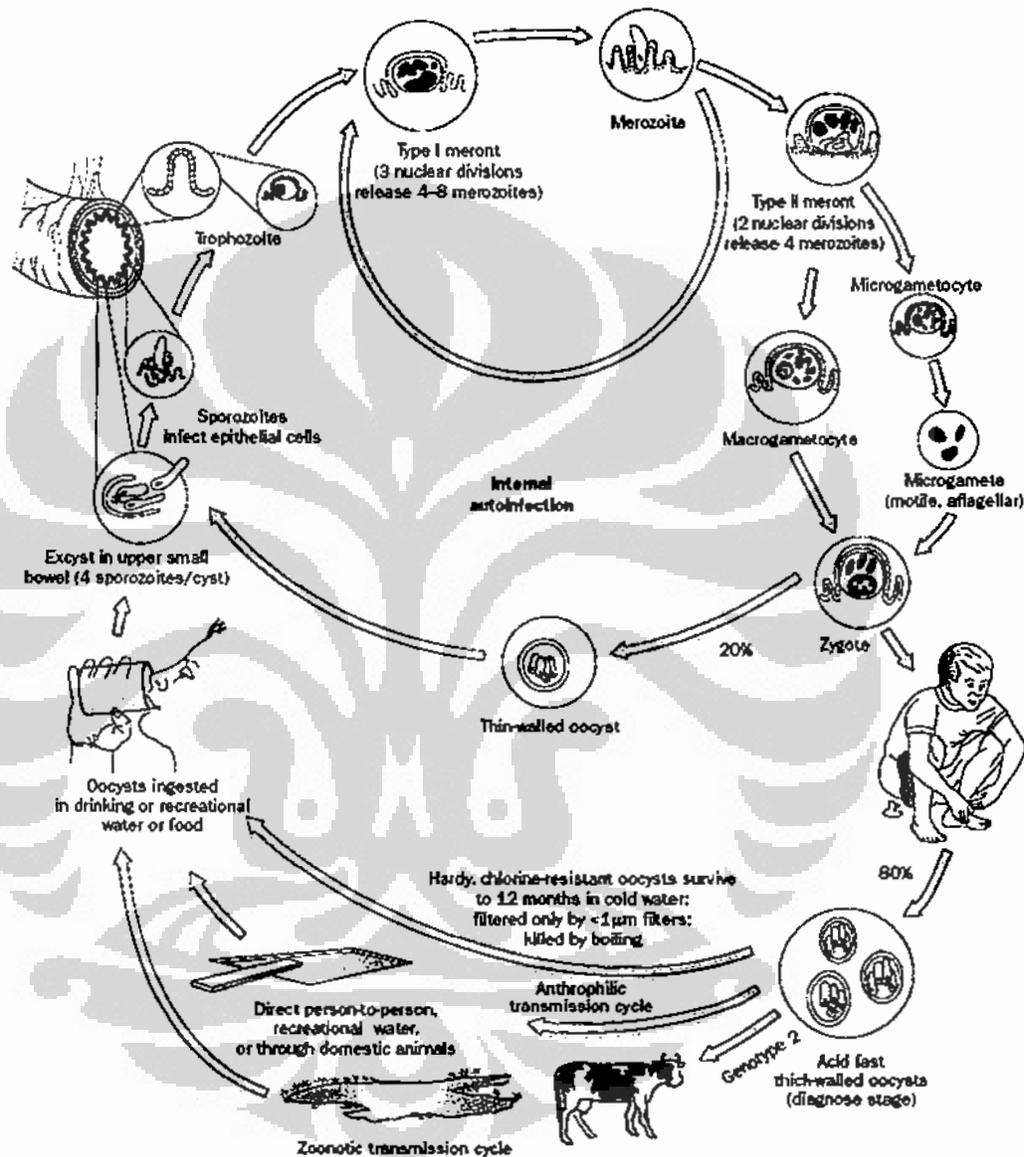
Pada anak-anak dan orang yang imunokompromis, kriptosporidiosis dapat menjadi masalah serius dan membahayakan jiwa. Di negara-negara berkembang, seperti Uganda, kriptosporidiosis berhubungan dengan siklus diare yang parah, malnutrisi, gangguan perkembangan fisik, dan berkurangnya fungsi kognitif. Pada studi anak-anak di Peru yang berumur 0-3 bulan, infeksi *Cryptosporidium* sp. tanpa gejala berhubungan dengan berkurangnya pertumbuhan (kurang 162 gram) dan meningkatnya malnutrisi, dibanding mereka yang tanpa diare dan infeksi. Kriptosporidiosis diseminata dapat terjadi pada individu dengan AIDS yang parah yaitu bila jumlah sel T CD4  $\leq 750$  sel/mm<sup>3</sup> pada anak-anak berusia < 12 bulan,  $\leq 500$  sel/mm<sup>3</sup> pada anak-anak yang berumur 1-5 tahun,  $\leq 200$  sel/mm<sup>3</sup> pada anak-anak yang berumur 6-12 tahun, dan 200 sel/mm<sup>3</sup> pada orang dewasa dan remaja.<sup>23</sup>

#### 2.1.5. Siklus hidup

Siklus hidup *Cryptosporidium* terlihat pada gambar 1. Siklus hidup monoksen ookista *Cryptosporidium* terdiri dari beberapa stadium perkembangan, yaitu siklus seksual dan aseksual. Difasilitasi oleh perubahan suhu, pH, adanya garam empedu dan enzim pankreas, dinding ookista pecah dan diekskistasi 4 sporozoit dari masing-masing ookista. Ujung anterior dari sporozoit menempel pada permukaan luminal sel epitel saluran yang terinfeksi. Sporozoit dikelilingi oleh mikrovili. Siklus hidup endogen parasit terjadi di dalam vakuol parasitophorus. Membran vakuol parasitophorus dipercaya melindungi ookista dari sistem imun hospes dan lingkungan ekstraselular, dan membantu melindungi perkembangan parasit. Penempelan yang unik atau adanya organel perantara yang secara langsung memisahkan parasit dengan sitoplasma sel hospes bertanggung jawab untuk memasok nutrisi dan energi dari sel hospes. Selama stadium invasif siklus hidup parasit, organel sekretorik di dalam kompleks apikal parasit (rhoptri, mikronema, dan granula densa) mengeluarkan protein yang memfasilitasi perlekatan dan invasi sel hospes. Protein permukaan dan

atau kompleks apikal yang telah diketahui diantaranya GP900, p53, CSL, TRAP-C1, cp15, cp47, dan gp15/40.<sup>23,27</sup>

**Gambar 2.1. Siklus hidup *Cryptosporidium* sp.<sup>28</sup>**



Sporozoit akan merusak mikrovili disekitarnya yang melindungi sel hospes, dan menembus enterosit yeyunum terminal dan ileum, membungkus dirinya dalam kompartemen ekstrasitoplasmik. Dalam vakuol, sporozoit matang menjadi trofozoit, kemudian mengalami perkembangan dan pematangan diikuti oleh 3 kali pembelahan inti sebagai meron tipe I. Meron tipe I ruptur, melepaskan 6-8 merozoit yang menginvasi sel epitel usus yang terdekat/di sebelahnya dan matang menjadi meron

tipe I (sumber autoinfeksi internal dengan cara amplifikasi jumlah parasit) atau meron tipe II. Meron tipe II matang dan melepaskan makrogametosit atau mikrogametosit. Fertilisasi terjadi ketika mikrogametosit matang bergabung dengan makrogametosit matang. Selanjutnya diikuti oleh pembentukan zigot dan berkembang menjadi dua jenis kista : kista berdinding tipis (kurang lebih 20% dari kista total yang terbentuk), yang merupakan sumber kedua autoinfeksi internal, dan kista berdinding tebal (kurang lebih 80% dari kista) yang bersifat stabil pada lingkungan sekitarnya, mengandung empat sporozoit yang dapat diekskresikan dan menyebar. Faktor-faktor yang memudahkan perkembangan kista yang berdinding tipis dan kista berdinding tebal masih belum jelas.<sup>23,28</sup>

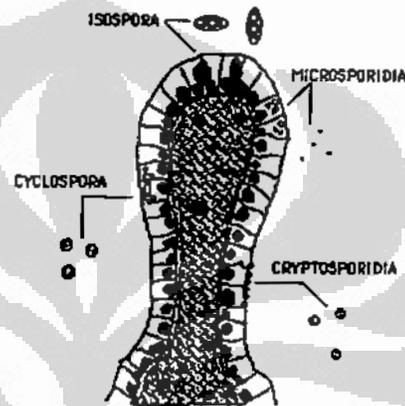
#### 2.1.6. Patofisiologi Kriptosporidiosis

Kriptosporidiosis adalah infeksi oportunistik yang disebabkan oleh coccidia *C. parvum*, yang dapat ditularkan ke manusia melalui kontak dengan kotoran hewan yang mengkontaminasi air dan makanan. Patogenitas *Cryptosporidium* sp. telah dibuktikan pada beberapa penelitian dimana dilakukan transmisi buatan pada bermacam-macam hewan dengan cara isolasi dan purifikasi ookista *Cryptosporidium* sp.<sup>29</sup> *C. parvum* telah menyebabkan beberapa epidemi penyakit diare melalui pencemaran air minum. Spora *C. parvum* yang tertelan bersama air atau makanan yang terkontaminasi akan masuk ke saluran cerna, sporozoit akan keluar dan menginvasi epitel usus, kemudian bereplikasi secara intraselular.<sup>5</sup>

Habitat *Cryptosporidium* sp. pada hospes, ternyata tidak hanya di usus halus, akan tetapi ditemukan pula di organ-organ lain saluran pencernaan dan pernafasan yaitu kolon, sekum, rektum, kloaka, lambung, saluran empedu, hati, pankreas, trakea, bronkus, bronkiolus serta paru-paru. Pada orang immunokompeten, parasit biasanya terbatas di usus halus, sedangkan pada orang immunokompromis dapat ditemukan pada saluran pencernaan dari esofagus ke rektum, juga pada sistem *hepatobilier* dan saluran pernafasan.<sup>29</sup>

Di usus, *Cryptosporidium* sp. biasanya melekatkan diri di permukaan sel epitel pada *brush border*, sehingga tampak menonjol ke dalam lumen usus. Sedangkan perkembangan parasit terjadi di dalam vakuola parasitophorous. Parasit ini intraseluler, tetapi ekstrasitoplasmik pada brush border sel hospesnya. Melalui pengamatan dengan mikroskop elektron dapat dibuktikan bahwa *Cryptosporidium* sp melekat pada sel epitel usus secara ekstrasitoplasmik, yaitu hanya melekat dangkal di

daerah mikrovili usus, tempat parasit ini bertahan hidup dan bereplikasi. Pada pangkal perlekatan antara parasit dan mikrovili ada daerah yang mengalami fusi, sehingga terjadi kontak langsung antara sel epitel dan parasit. Daerah tersebut mempunyai struktur sangat tipis dan berbentuk lipatan-lipatan. Inilah yang disebut *feder organella* tempat terjadinya aliran nutrisi dari sel hospes ke *Cryptosporidium* sp. Untuk lebih jelasnya berikut disajikan skema cara melekatnya *Cryptosporidium* sp. pada sel epitel usus.<sup>29,31</sup>



Gambar 2.2. Vili usus halus yang terinfeksi dengan keempat protozoa yang membentuk spora usus. Parasit matang dan memperbanyak diri intraselular di dalam enterosit, dan menghasilkan partikel (spora atau ookista) untuk kemudian dikeluarkan bersama feses. .

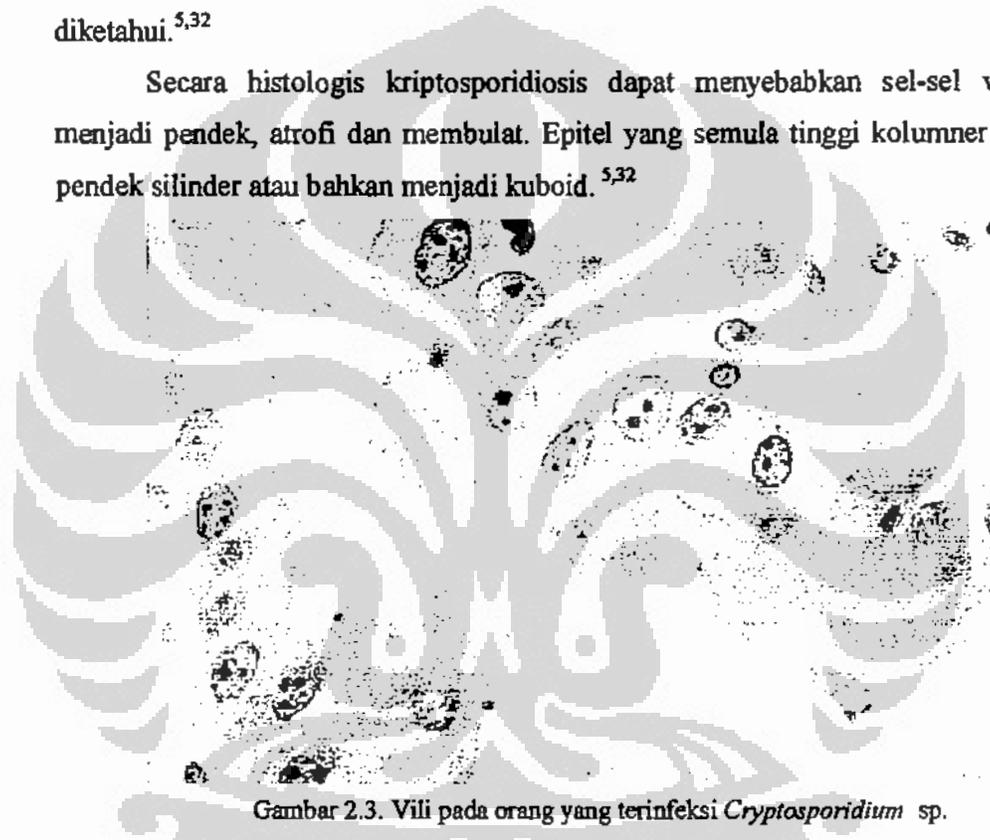
*Cryptosporidium* sp. dapat mempengaruhi transpor ion usus dan menyebabkan inflamasi pada mikrovili usus. Akibat melekatnya *Cryptosporidium* sp. pada mikrovilli usus, maka sel-sel mikrovilli dan *brush border* rusak, terutama yang terletak di ujung-ujung vilus, sehingga akhirnya mikrovili menjadi atrofi. Oleh karena itu maka permukaan vili usus untuk absorpsi menjadi sempit, sehingga terjadi malabsorpsi dan sekresi yang berlebihan lalu menimbulkan diare. Pada infeksi berat, diare cair profus dapat terjadi, karena selain terjadi gangguan absorpsi, pencernaan juga terganggu.<sup>29,31,32</sup>

Secara umum, diare dapat terjadi karena penyerapan usus tidak normal dan sekresi meningkat sehingga gerakan usus menjadi cepat atau feses cair. Proses ini diregulasi oleh sel epitel usus yang terinfeksi oleh *Cryptosporidium* sp. Transpor ion usus yang terganggu akan bereaksi dan menyebabkan diare kriptosporidiosis.<sup>5</sup>

Pada kriptosporidiosis kronis, diare dapat terjadi berbulan-bulan, bahkan hingga menimbulkan penurunan kekebalan tubuh hospes. Penelitian kriptosporidiosis pada hewan menunjukkan, bahwa aktivitas enzim terutama di daerah ileum berkurang. Hal ini terjadi karena diduga parasit menghasilkan toksin.<sup>29</sup>

Gambaran patologi yang berhubungan dengan kriptosporidiosis tidak spesifik. Secara makroskopis serupa dengan semua kasus enteritis yaitu menunjukkan inflamasi dan hiperemi pada mukosa usus. Suatu bukti cukup kuat tentang adanya infeksi usus, yaitu dengan melihat luasnya lesi, sehingga berat ringannya infeksi dapat diketahui.<sup>5,32</sup>

Secara histologis kriptosporidiosis dapat menyebabkan sel-sel vili usus menjadi pendek, atrofi dan membulat. Epitel yang semula tinggi kolumnar menjadi pendek silinder atau bahkan menjadi kuboid.<sup>5,32</sup>



Gambar 2.3. Vili pada orang yang terinfeksi *Cryptosporidium* sp.

#### 2.1.7. Respon Imun Hospes

Penelitian epidemiologi memperlihatkan adanya imunitas protektif terhadap infeksi *Cryptosporidium* sp. Sebagai contoh pekerja di peternakan yang mengalami infeksi *Cryptosporidium* berulang, gejala klinis infeksi kedua dan ketiga lebih ringan dibandingkan yang pertama. Fenomena yang sama juga terjadi pada daerah endemis kriptosporidiosis dimana penduduk lokal hanya mendapatkan infeksi ringan atau tanpa gejala, tetapi bagi pendatang bisa menyebabkan sakit. Lama diare karena infeksi *Cryptosporidium* rata-rata sekitar 20 hari pada anak-anak di Peru tetapi lebih dari 40 hari bagi pendatang di Nepal. Eksistensi imun protektif ini didukung oleh observasi

dari gejala umum infeksi *Cryptosporidium* pada penduduk lokal di wilayah endemik yang terjadi pada bayi dan anak kecil. Meskipun infeksi berat dan bahkan letal dapat terjadi pada anak dengan fungsi imun yang terlihat normal, namun dapat juga terjadi pada anak dengan disfungsi sel-T (seperti pada infeksi HIV) dan kerusakan antibodi (seperti defisiensi IgA). Infeksi *Cryptosporidium* yang sering terjadi pada individu immunokompromis menunjukkan bahwa mekanisme imun secara efektif akan menjaga jumlah parasit tetap sedikit pada orang immunokompeten.<sup>12</sup>

Infeksi *Cryptosporidium* sp. akut jangka panjang akan membentuk antibodi humoral pada semua orang immunokompeten dan pasien dengan HIV/AIDS. Penelitian pada manusia mengindikasikan bahwa antibodi di usus dapat mengurangi jumlah parasit, tetapi antibodi tersebut tidak melindungi pasien AIDS dari infeksi parasit berat. Kekebalan yang dimediasi sel T dibutuhkan untuk mencegah infeksi *Cryptosporidium* yang berat pada manusia. Peningkatan jumlah sel-T dan fungsi imun dapat diasosiasikan dengan berkurangnya jumlah parasit pada pasien dengan AIDS.<sup>12</sup>

Respon imun hospes terhadap infeksi *Cryptosporidium parvum* masih belum dapat dipahami dengan jelas. Percobaan pada hewan seperti pada mencit menunjukkan kekebalan alami terhadap infeksi. Diketahui pula bahwa mekanisme yang bertanggungjawab untuk mengeliminasi *Cryptosporidium* dari saluran pencernaan melibatkan peran dari interferon gamma (INF- $\gamma$ ), meskipun mekanisme sitokin dalam kekebalan ini tidak jelas. Selain itu limfosit T CD4 juga dibutuhkan untuk resolusi baik kriptosporidiosis akut maupun kronis. Percobaan infeksi dengan mencit menunjukkan bahwa imunitas tergantung pada jumlah sel T CD4 yang meningkat dalam limfosit intraepitel usus dan kadar interleukin-12 (IL-12) dan interferon gamma (INF- $\gamma$ ). Peran dari sel T CD8 tidak jelas, tetapi mereka berperan dalam mengontrol infeksi pada mencit.<sup>7</sup>

Banyak hal dapat diketahui tentang respon imun terhadap infeksi *Cryptosporidium* yang dipelajari dari model mencit. Meskipun model itu berguna, tetapi memiliki banyak keterbatasan. Pertama, mencit dewasa yang immunokompeten tidak mudah terinfeksi *C. parvum*. Hanya anak mencit (lebih muda 26 hari) yang rentan infeksi. Kedua, hanya sedikit model mencit percobaan yang mirip dengan infeksi pada manusia, umumnya sejak terinfeksi mencit tidak menunjukkan gejala diare. Kecuali pada mencit dengan defisiensi interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) dapat mudah terinfeksi oleh sedikit ookista dan mengalami penurunan berat badan dan *wasting* atau

bahkan mati. Mencit dengan gangguan sistem imun berat *severe combined immunodeficiency* (SCID mouse) menjadi rentan terhadap infeksi *C. parvum*, dan sudah dikembangkan untuk mempelajari imunologi kriptosporidiosis.<sup>5,7</sup>

Dua kunci komponen imun yang dibutuhkan untuk pencegahan dan/atau resolusi kriptosporidiosis adalah limfosit CD4<sup>+</sup> dan IFN- $\gamma$ . Pengosongan IFN- $\gamma$  dengan injeksi intraperitoneal antibodi anti- IFN-  $\gamma$  memperpendek masa prepaten, peningkatan ekskresi ookista, dan gejala klinis lebih berat dan akhirnya mati.<sup>5</sup>

Tikus dengan limfosit CD4<sup>+</sup> yang tidak berfungsi baik, lebih mudah terkena infeksi daripada tikus kontrol dan tidak dapat sembuh sempurna dari infeksi. Sedangkan tikus dengan defisiensi CD8 dapat sembuh dan mengatasi infeksinya. Sitokin IL-12 dapat menginduksi produksi IFN-  $\gamma$ , sehingga pemberian IL-12 pada tikus dapat mencegah atau berpengaruh besar dalam mengurangi berat infeksi. Oleh karena itu, pada percobaan infeksi tikus ini bukan TNF (*Tumor Necrosing Factor*) dan bukan pula sel NK (*Natural Killer Cells*) yang diperlukan dalam mengatasi infeksi.<sup>5</sup>

## 2.2. Faktor yang Mempengaruhi Infeksi Parasitik

Menurut WHO, terdapat berbagai faktor yang dapat mempengaruhi terjadinya diare yang disebabkan parasit diantaranya malnutrisi, keadaan sanitasi dan kebersihan perorangan, keadaan sosial ekonomi, komplikasi dengan infeksi usus lainnya yang disebabkan bakteri atau parasit lain.<sup>11, 29</sup>

Kelainan patologis yang timbul pada infeksi parasit merupakan hasil interaksi antara faktor hospes dan faktor parasit itu sendiri.<sup>30</sup>

### 1. Faktor Hospes

Faktor hospes yang berpengaruh adalah faktor lingkungan, kerentanan alamiah, status gizi, adanya penyakit lain dan respon imun. Faktor lingkungan seperti buruknya sanitasi dan keterbatasan air bersih merupakan faktor yang mempermudah terjadinya infeksi. Kerentanan alamiah akan memperburuk keadaan penyakit atau memudahkan terjadinya infeksi. Penyakit lain yang diderita hospes bersamaan dengan infeksi usus parasitik terutama penyakit kronis sangat mempengaruhi perjalanan infeksi parasit. Menurunnya respon imun juga dapat mempengaruhi perjalanan klinis infeksi parasitik.

## 2. Faktor parasit

Derajat virulensi dan patogenitas yang dimiliki parasit ikut menentukan akhir perjalanan suatu penyakit dan manifestasinya bervariasi dari subklinis sampai berat sekali dan berakibat fatal.

## 3. Faktor populasi parasit

Kepadatan populasi parasit pada infeksi cacing usus menentukan beratnya infeksi. Infeksi dengan jumlah cacing yang sedikit memberikan gejala lebih ringan dibandingkan jumlah cacing yang banyak dapat mengakibatkan infeksi yang berat.

### 2.3. Diagnosis

Diagnosis kriptosporidiosis berdasarkan identifikasi ookista (atau komponen ookista) sferis berukuran  $5\mu\text{m}$  di tinja atau stadium intraselular dalam spesimen biopsi mukosa gastrointestinal manusia. Pada potongan jaringan, pewarnaan sederhana hematoxylin dan eosin sudah memadai untuk dapat mengidentifikasi morfologi stadium hidup intraselular parasit ini dengan lokasi apikal yang khas pada sel epitel usus. Biopsi mukosa juga dapat mengidentifikasi kopatogen lain yang penting seperti cytomegalovirus. Pada sebuah studi, mukosa duodenum terinfeksi pada 93% pasien AIDS dengan kriptosporidiosis, sehingga lokasi ini merupakan tempat biopsi yang sering dilakukan untuk pasien ini.<sup>5</sup>

Berbagai pilihan diagnostik tersedia untuk deteksi *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja klinis. Jenis pemeriksaan yang digunakan oleh laboratorium akan tergantung pada beberapa faktor, terutama biaya dan tingkat pengalaman teknis.

#### 2.3.1. Metode Pewarnaan

Skринing menggunakan Auramin Fenol dari apusan sedimen tinja diikuti pewarnaan modifikasi Ziehl-Neelsen (acid-fast/tahan asam) merupakan pemeriksaan yang sensitif dan spesifik untuk identifikasi ookista *Cryptosporidium* sp. di tinja. Kriteria morfologi yang jelas harus digunakan untuk diagnosis sehingga dapat menghindari keraguan dengan ookista lain, seperti ookista *Cyclospora*, yang secara signifikan lebih besar ( $10\mu\text{m}$ ). Jika pemeriksaan ini cukup memadai untuk mendiagnosis kriptosporidiosis pada individu terinfeksi HIV simtomatik yang mengeluarkan milyaran ookista, tingkat sensitivitasnya masih diragukan bila digunakan untuk menskrining individu yang imunokompeten, pasien yang tidak

memiliki gejala, atau sampel lingkungan. Sehingga tes tambahan lain dikembangkan untuk memperbaiki pewarnaan tahan asam. Selain itu kriptosporidiosis kadang kurang dapat didiagnosis (unnderdiagnosed) karena klinisi gagal mempertimbangkan diagnosis ini pada pasien dengan gejala diare (terutama pada orang dewasa yang imunokompeten dan anak-anak) dan tidak meminta analisis feses untuk *Cryptosporidium*. Pemeriksaan *Cryptosporidium* seharusnya dimasukkan secara rutin pada analisis feses parasit.<sup>5</sup>

### 2.3.2. Metode PCR

Untuk meningkatkan deteksi *Cryptosporidium* dari bahan klinis dapat digunakan metode PCR, karena sekaligus dapat menentukan spesies dan identifikasi genotip.<sup>19</sup>

Deteksi ookista *Cryptosporidium* dengan teknik PCR lebih sensitif dan spesifik dibandingkan teknik mikroskopis seperti pulasan tahan asam.<sup>22</sup> Teknik PCR dapat mendeteksi <20 ookista/gram tinja atau hanya 1 ookista, sedangkan untuk deteksi secara mikroskopis memerlukan 10.000-500.000 ookista/gram tinja.<sup>22,33</sup> Kelemahannya, teknik PCR membutuhkan waktu yang lebih lama, biaya yang mahal dan membutuhkan pemeriksa yang terlatih. PCR juga dapat dihambat prosesnya oleh komponen bahan di dalam tinja, termasuk kompleks polisakarida, garam empedu dan bilirubin, sehingga perlu menambah prosedur untuk menghilangkan inhibitor dalam tinja.<sup>5,33</sup>

Beberapa faktor juga dapat mempersulit deteksi menggunakan PCR di tinja. Fiksasi standar dalam formalin 10% dapat mereduksi sensitivitas PCR, terutama jika sampel telah difiksasi dalam waktu yang lama. Dengan melakukan pencucian pada teknik konsentrasi menggunakan air tanpa ion yang dilakukan berulang kali diharapkan dapat membuang residu larutan fiksatif sehingga tidak mengganggu hasil PCR. Penggunaan larutan fiksatif yang tepat akan mempermudah dalam deteksi DNA *Cryptosporidium*.<sup>19</sup>

Ada beberapa gen yang dapat digunakan untuk mendeteksi *Cryptosporidium*, yang paling tinggi sensitivitas dan spesifisitasnya ada 2 gen yaitu gen 18S rRNA dan gen *Cryptosporidium oocyst wall protein* (COWP). Gen 18S rRNA dapat mendeteksi 1 ookista, sedangkan gen COWP dapat mendeteksi minimal 10 ookista. Ada teknik nested PCR yang dapat menentukan spesies dari *Cryptosporidium*.<sup>19</sup>

### 2.3.3. Metode Immunologi

Uji imunologi dilakukan dengan mendeteksi antigen menggunakan antibodi yang dilabel zat fluoresen atau teknik *immunofluorescent assay* dan mendeteksi antigen menggunakan antibodi yang dilabel dengan enzim atau teknik *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Diagnosis dengan metode ini membutuhkan biaya yang lebih mahal dibandingkan metode pewarnaan. Sensitivitas metode ini cukup tinggi dan spesifisitasnya sudah mencapai 98 – 100%. Uji imunologi dapat berperan dalam diagnosis klinis, terutama pada situasi endemi/wabah dan studi epidemiologi.<sup>19</sup>

#### a. Deteksi Antibodi *Cryptosporidium* dengan ELISA

Metode ELISA digunakan untuk mendeteksi antibodi IgM dan IgG. Peningkatan level IgM ditemukan dalam 2 minggu masa pajanan dan bisa bertahan lebih dari setahun pada beberapa individu.<sup>34</sup> Immunodiagnosis berdasarkan tes serologi yang dilakukan sampai hari keenam berlangsungnya penyakit, menunjukkan hasil negatif. Umumnya hasil IgG positif didapat bila tes serologi dilakukan setelah 60-90 hari, pada 5 dari 7 kasus yang diperiksa hasil tes masih positif setelah satu tahun.<sup>35</sup>

#### b. Deteksi Antigen *Cryptosporidium* dengan IFA

Saat ini pemeriksaan imunofluoresen (*immunofluorescence assays* (IFA)) mulai meningkat penggunaannya untuk mendeteksi ookista *Cryptosporidium* secara mikroskopik, terutama di negara-negara industri. Dibandingkan dengan pewarnaan tahan asam, IFA memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang lebih.<sup>36,37,38</sup> Banyak kit komersial IFA yang dipasarkan untuk diagnosis *Cryptosporidium*, beberapa memiliki reagen yang dapat bersama-sama mendeteksi kista *Giardia*. Diantaranya adalah kit Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* dari Meridian Bioscience, *Giardia/Crypto IF* kit dari TechLab, Monofluo *Cryptosporidium* kit dari Sanofi Diagnostics Pasteur, *Crypto/Giardia Cel* kit dari TCS Biosciences, dan Aqua-Glo G/C kit from Waterborne, dan Cryptocel dari Cellabs. Karena tingginya sensitivitas dan spesifisitas, IFA telah digunakan dalam beberapa penelitian sebagai standar baku atau sebagai uji.<sup>24,37</sup> Sebagian besar antibodi monoklonal yang digunakan untuk deteksi secara

imunofluoresen ookista *Cryptosporidium* mengenali epitop karbohidrat pada dinding ookista.<sup>24</sup> Walaupun antibodi monoklonal yang digunakan dalam kit komersial IFA dapat berreaksi dengan ookista hampir seluruh spesies *Cryptosporidium*, IFA tidak dapat membuat diagnosis hingga tingkat spesies. Sensitivitas sebagian besar metode mikroskopik umumnya rendah. Deteksi pada kombinasi konsentrasi etil asetat dan IFA memperlihatkan bahwa terdapat 10.000 ookista per gram pada tinja cair dan 50.000 ookista per gram dalam tinja padat.<sup>39,40</sup> Sensitivitas pewarnaan tahan asam 10 kali lebih rendah<sup>39</sup>, mungkin dikarenakan pewarnaan tahan asam tersebut tidak selalu mewarnai semua ookista.<sup>41</sup>

Pemeriksaan imunofluoresensi dilakukan dengan menggunakan FITC yang dilabel mAb anti- *Cryptosporidium*. Ookista tampak berfluoresensi dengan warna hijau apel (sesuai eksitasi FITC) karena antibodi monoklonal mengikat epitop di dalam dinding ookista, dengan mikroskop epifluoresensi. Penambahan DAPI, suatu interkalator DNA 4'-6-diamidino-2-phenylindole sebagai counter staining, akan berinterkalasi dengan nukleus sporozoit dan memperlihatkan *highlights* nukleus. Pewarnaan DAPI memperlihatkan inti sporozoit di dalam ookista, baik yang tampak maupun tidak tampak. Saat ookista bergerak-gerak untuk mulai bersporulasi, ditunjukkan ada empat inti yang berfluoresens pada obyek dan hal ini membantu proses identifikasi.<sup>17</sup>

Untuk sampel tinja yang mengandung sedikit ookista, menggunakan metode skrining dengan AF yang dilanjutkan dengan metode konfirmasi seperti imunofluoresensi adalah pendekatan spesifik dan sensitif untuk identifikasi ookista *Cryptosporidium*. Pengembangan teknik ini, terutama dengan teknik konsentrasi memungkinkan diagnosis kriptosporidiosis lebih akurat untuk diagnosis spesimen klinis, serta untuk skrining bilamana terjadi suatu epidemi.<sup>2,42</sup>

#### 2.4. Teknik Imunofluoresen

Imunofluoresen dapat digunakan sebagai teknik kimia atau sitokimia untuk mendeteksi dan melokalisasi antigen di dalam sel atau jaringan. Antibodi spesifik dikonjugasikan pada zat fluoresen tanpa mengubah reaktifitas imunologis, sehingga dapat menjadi pendeteksi yang sensitif terhadap antigen jaringan tersebut. Antibodi yang dikonjugasikan ditambahkan pada sel atau jaringan dan terfiksasi pada antigen, sehingga membentuk kompleks imun. Antibodi yang tidak terikat akan dihilangkan dengan pencucian, dan hasil diamati dengan menggunakan mikroskop fluoresen.

Adaptasi dari mikroskop regular ini mengandung sumber cahaya dengan intensitas yang tinggi, filter eksitasi untuk menghasilkan panjang gelombang tertentu yang dapat mengaktivasi fluoresen, dan filter barrier untuk menghilangkan cahaya dengan panjang gelombang yang mengganggu. Ketika diamati pada mikroskop fluoresen dengan latar belakang yang gelap, antigen yang berikatan secara spesifik pada antibodi berfluoresensi akan dideteksi oleh warna yang cerah tersebut.<sup>43</sup>

Fluoresen adalah emisi cahaya monokrom, yaitu panjang gelombang yang dikeluarkan saat sebuah substansi diiradiasi oleh cahaya dengan berbagai warna berbeda. Panjang gelombang yang dikeluarkan adalah pada tingkat/level energi yang lebih rendah daripada cahaya yang diabsorpsi. Fluorokrom seperti rhodamin atau fluoresen yang digunakan di laboratorium klinik memiliki karakteristik spektrum absorpsi dan emisi masing-masing. *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) adalah zat kimia fluoresen yang akan berikatan secara kovalen pada protein utama antibodi dengan pH tinggi melalui residu  $\epsilon$ -amino dari lisin dan gugus amino terminal. Absorpsi maksimum terjadi pada panjang gelombang 490-495 nm, dan dapat mengeluarkan warna hijau khas pada 517 nm. *Tetra methylrhodamine isothiocyanate*, yang mengeluarkan warna merah, memiliki absorpsi maksimum pada 550 nm dan emisi maksimal pada 580 nm (untuk konjugat protein-rhodamin). Sehingga, eksitasi dan filter barrier yang berbeda harus digunakan untuk memvisualisasikan karakteristik warna hijau atau merah dari zat fluoresen ini. Idealnya, panjang gelombang hampir sama dengan eksitasi maksimum dari zat fluoresen tersebut. Sehingga, filter barrier diharapkan dapat menghilangkan semua warna kecuali spektrum panjang gelombang yang dikeluarkan. Pada prakteknya, keluarnya warna cerah dari fluoresen yang diamati oleh mata tergantung pada 3 faktor yaitu 1). Kemampuan zat fluoresen mengubah cahaya yang masuk menjadi cahaya fluoresen. 2). Konsentrasi zat fluoresen pada spesimen jaringan/sel, dan 3). Intensitas radiasi yang dieksitasi. (diabsorpsi).<sup>43</sup>

Mikroskop yang digunakan untuk melihat spesimen imunofluoresen adalah modifikasi mikroskop cahaya transmisi standar. Pada tahun 1967, Ploem memperkenalkan sistem epi-iluminasi yang menggunakan iluminator vertikal dan cermin dikroik. Pada sistem ini cahaya eksitasi diarahkan/fokus langsung pada spesimen jaringan melalui lensa objektif. Cahaya fluoresen yang dikeluarkan dari spesimen epi-iluminasi kemudian ditransmisikan ke mata melalui cermin dikroik.

Cermin dikroik melewatkan cahaya dari panjang gelombang yang dipilih pada satu arah yang sama, bukan pada arah yang berlawanan.

Terdapat beberapa keuntungan pada sistem Ploem ini. Fluoresen dapat dikombinasikan dengan cahaya transmisi untuk pemeriksaan fase kontras jaringan, untuk memberi gambaran morfologi yang lebih baik dan fluoresensi. Juga, sistem filter yang dapat diubah-ubah membuat pemeriksaan yang cepat pada berbagai panjang gelombang untuk pewarnaan menggunakan fluorokrom ganda, misalnya merah (rhodamin dan fluorescein, berturut-turut). Keuntungan dalam teknik ini memberikan sensitivitas terbaik untuk pemeriksaan fluoresen membran sel pada limfosit hidup.<sup>43</sup>

#### 2.4.1. Metode dan Persiapan<sup>43</sup>

Umumnya antigen dapat dideteksi pada potongan terfiksasi atau suspensi sel hidup dengan imunofluoresen. Sehingga menghasilkan kombinasi sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Langkah-langkah dalam imunofluoresen diantaranya persiapan antiserum atau antibodi yang murni, konjugasi dengan zat warna fluoresen, dan diakhiri oleh prosedur pewarnaan.

Pada imunofluoresen, antiserum terhadap antigen yang akan dideteksi dihasilkan dari spesies yang heterolog. Antibodi monoklonal yang murni dapat digunakan dan dipersiapkan sebagai berikut. Antiserum harus mengandung sejumlah miligram antibodi per mililiter. Spesifisitas harus mencapai level yang dapat dideteksi dalam difusi ganda biasa atau teknik imunoelektroforesis. Metode yang sensitif lainnya adalah inhibisi hemaglutinasi, RIA, dan ELISA. Antibodi yang tidak diinginkan yang tersisa dalam konjugat atau reagen antiglobulin untuk uji dapat dibuang/dihilangkan dengan imunosorben yang tidak larut atau dicegah untuk berikatan dengan penggunaan antibodi monoklonal.

Setelah mendapatkan antiserum dengan potensi dan spesifisitas yang baik, fraksi  $\gamma$ -globulin disiapkan dengan cara presipitasi amonium sulfat dan kromatografi perpindahan ion DEAE-selulosa. Sebaiknya hanya memurnikan sebagian serum  $\gamma$ -globulin saja, karena konjugasi terhadap antibodi yang mungkin terjadi sebanyak mungkin harus dibatasi. Hal ini akan meningkatkan efisiensi pewarnaan dan menghindari pewarnaan non-spesifik oleh protein serum non antibodi terkonjugasi fluorokrom yang dapat menempel pada komponen jaringan.

Terdapat dua teknik Pewarnaan Imunofluoresen yaitu:<sup>43</sup>

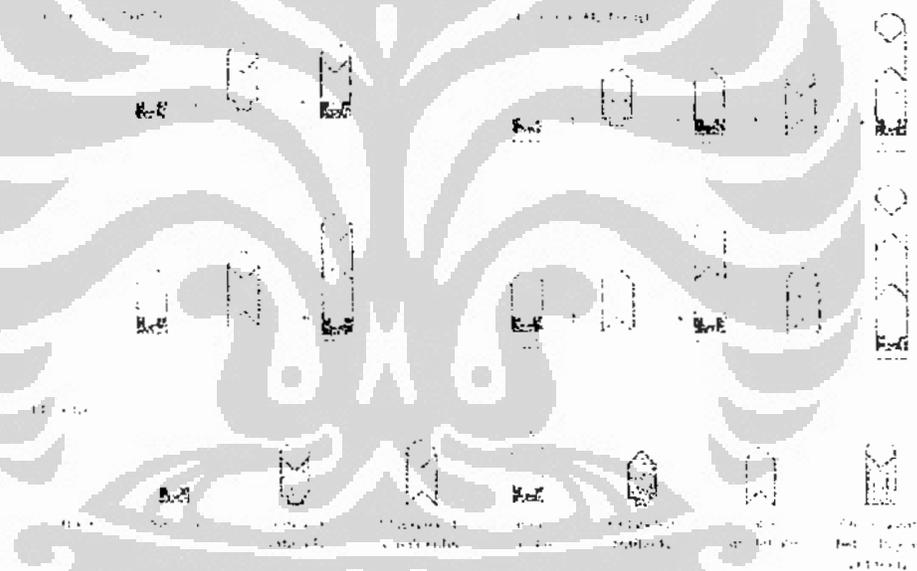
#### A. Imunofluoresen langsung

Pada teknik ini, antiserum yang dikonjugasikan ditambahkan secara langsung pada jaringan atau suspensi sel yang hidup. (gambar 12-34).

#### B. Imunofluoresen tidak langsung

Teknik ini untuk mendeteksi antibodi dalam serum. Metode ini dasarnya adalah adaptasi reaksi antiglobulin (tes Coombs) atau teknik antibodi ganda. Spesifisitas harus diperiksa dengan diagram dan dilanjutkan dengan metode blocking dan netralisasi.

Beberapa perbedaan dalam pewarnaan ini diantaranya: 1. antiserum antikomplemen yang terkonjugasi untuk deteksi kompleks imun mengandung komplemen, dan 2. pewarnaan ganda dengan rhodamin dan konjugat fluoresen.



Gambar 2.4. Teknik Imunofluoresen direk (langsung) dan indirek (tidak langsung)

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1. Desain Penelitian

Desain penelitian adalah *cross sectional* analitik observasional dengan jenis uji diagnostik.<sup>44</sup>

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Departemen Parasitologi dan Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta, untuk pengerjaan sampel dan pemeriksaan hasil sediaan. Waktu penelitian adalah dari bulan Oktober 2008 sampai dengan Februari 2009.

### 3.3 Sampel Penelitian

Sampel adalah tinja dari anak batita (usia 0 – 36 bulan) yang tinggal di bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu. Sampel telah dikoleksi oleh peneliti sebelumnya (Soetomenggolo, 2008)<sup>14</sup> pada bulan Januari – April 2006 sejumlah 486 yang disimpan dalam larutan pengawet kalium bikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) 2,5%,<sup>3,30</sup> pada suhu + 4°C.

### 3.4 Besar Sampel

Sampel didapatkan dengan memilih subyek penelitian. Cara pemilihan dilakukan berdasarkan peluang (*probability sampling*) yaitu jenis *systematic sampling*.<sup>44</sup>

Besar sampel ditentukan dengan perhitungan statistik menggunakan rumus untuk uji diagnostik:<sup>44</sup>

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \times P(1-P)}{d^2}$$

#### Keterangan:

- n : besar sampel untuk masing-masing metode yang digunakan (jumlah minimal sampel).  
 $Z_{\alpha}$  : 95%, interval kepercayaan (Z skor untuk  $\alpha$  sebesar 0,05 adalah 1,96)

- P : dari literatur (perkiraan proporsi per metode), prevalensi kriptosporidiosis menggunakan metode imunofluoresen yaitu  $28,3\% = 0,283$
- d : perbedaan proporsi yang hendak dicapai, ditetapkan  $\pm 6\% = 0,06$

Perhitungan sampel pada penelitian ini adalah:

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,283 (1 - 0,283)}{(0,06)^2} = 216,4$$

Sehingga jumlah sampel feses minimal untuk masing-masing metode pemeriksaan yang dibutuhkan adalah  $217 + 10\%(217) = 239$  sampel.

Sampel yang diproses dan diperiksa sejumlah 239 sampel.

### 3.5 Alat dan Bahan

#### 3.5.1 Alat

1. Sarung tangan
2. Masker
3. Gelas beaker 500 ml
4. Gelas ukur 10 ml, 50 ml dan 100 ml
5. Botol kaca gelap 500 ml
6. *Magnetic stirer*
7. Tabung 0,5 cc
8. Tabung *ependorf* 100  $\mu$ L, 1500  $\mu$ L
9. Pipet tip
10. Kontainer tertutup
11. *Paper towel*
12. Inkubator 37°C
13. Pompa hisap
14. Pipet mikro 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l.
15. *Vortex* (Maxi Mix II, Mixer-37600, USA),
16. *Centrifuge* (Sorval Biofuge Pico, D-37520, German),
17. Kulkas
18. Freezer -20 °C

19. Kaca obyektif (76 x 26 mm)
20. Kaca tutup
21. Spidol
22. Penjepit slide/ pinset
23. *Coplin jars*
24. Selang/ pipa air
25. Mikroskop cahaya biasa/ *bright field* (Olympus CH20, Japan) dengan lensa obyektif pembesaran 400x dan 1000x.
26. Mikroskop epifluoresensi (Olympus BX-51, Japan) yang dilengkapi filter FITC dengan eksitasi 490 nm dan emisi 550 nm, lensa obyektif pembesaran 200x dan 400x.

### 3.5.2 Bahan

1. Sampel tinja
2. Akuabides
3. Metanol absolut (Merck, Cat. No. 1.06009)
4. MAb anti-Cryptosporidium Crypto-cel (Cellabs Cat. No. Z1RR1)
5. DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) (SIGMA- Aldrich Cat. No. D-8417)
6. PBS pH 7,2
7. Medium *Mounting*
8. Minyak imersi

### 3.6 Cara Kerja

#### 3.6.1. Teknik Konsentrasi Tinja dengan Air-Eter:<sup>3,31,33</sup>

1. Sebanyak 200  $\mu$ l tinja dalam suspensi kalium bikromat diambil lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1500  $\mu$ l.
2. Akuabides ditambahkan 700  $\mu$ l, lalu divorteks selama 30 detik.
3. Dietil eter ditambahkan 400  $\mu$ l, lalu dibolak balik selama 10 kali.
4. Sampel disentrifugasi pada 13,000 x g selama 1 menit.
5. Supernatan dibuang dan disisakan kira-kira 200  $\mu$ l.

6. Selanjutnya ditambahkan 1 ml akuabides steril dan divorteks selama 30 detik. Langkah 2-5 (pencucian diulangi sebanyak 2 kali).
7. Dengan penambahan 1 ml akuabides, pelet disisakan sebanyak 50  $\mu$ l.
8. Konsentrat disimpan di dalam kulkas pada suhu 4°C.

### 3.6.2. Sampel Tinja Sediaan Konsentrasi untuk Apusan *Air-Dried*

Sampel tinja diambil 5  $\mu$ l dengan mikropipet dan dioleskan merata pada sumur yang terdapat di kaca obyek.<sup>23,27</sup> Dikeringkan pada suhu kamar lalu difiksasi dengan metanol dingin selama 5 menit.<sup>3,23,29</sup>

### 3.6.3. Kontrol Positif

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

### 3.6.4. Teknik Imunofluoresen langsung<sup>3,24,30</sup>

#### Metode:

1. Larutan siap pakai monoklonal antibodi (mAb) anti-*Cryptosporidium* (Crypto-cel Reagent, Cellabs Cat. No. Z1RR1, lampiran 6) sebanyak 10  $\mu$ l ditambahkan ke dalam sumur pada kaca objek. Dipastikan telah menutupi semua sumur.
2. Kaca objek tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *humidity chamber* dengan meletakkannya di atas batang gelas yang dialasi tissue basah.
3. *Humidity chamber* dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu rata-rata 37° C selama 30 menit.
4. Kemudian kaca objek tersebut dimiringkan untuk memudahkan aspirasi kelebihan FITC-CmAb dari tepi tiap sumur pada kaca objek dengan menggunakan pompa hisap dengan menempatkan ujung aspirator lebih dekat, tetapi tidak sampai menempel/mengenai larutan dalam sumur. Prosedur ini diulangi untuk setiap sumur.

5. DAPI (*stock solution* konsentrasi 5mg/mL) dalam larutan PBS (1:5000) sebanyak 50  $\mu$ L ditambahkan pada setiap sumur dan biarkan selama 2 menit pada suhu kamar.
6. Selanjutnya diaspirasi dari tiap sumur dengan pompa hisap menggunakan metode yang sama seperti prosedur no.4.
7. Kemudian 50  $\mu$ L akuabides ditambahkan pada tiap sumur dan dibiarkan kira-kira selama 1 menit pada suhu kamar.
8. *Mounting medium* sebanyak  $\pm$  18  $\mu$ L ditambahkan tiap sumur lalu diberi kaca tutup.
9. Kaca tutup dibiarkan beberapa saat supaya kering.
10. Cat kuku (*clear nail varnish*) ditambahkan dengan hati-hati (menggunakan sikat/brush) di bagian pinggir kaca tutup, menggunakan lebar sikat sebagai panduan. Dipastikan sekitar kaca tutup tidak terdapat celah. Cat kuku dibiarkan kering pada suhu kamar sebelum kaca objek tersebut diberi label nomor slide masing-masing.
11. Selanjutnya disimpan pada suhu kamar dan gelap hingga waktunya dilakukan proses penghitungan (*enumeration*).

Sediaan kontrol positif selalu disertakan setiap melakukan prosedur ini pada sumur pertama.

#### 3.6.4.1. Pemeriksaan Sediaan Hasil Tes Imunofluoresen Langsung

*Ookista Cryptosporidium* sp. dideteksi menggunakan mikroskop fluoresensi (Olympus BX-51, Japan) yang dilengkapi filter FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) dengan eksitasi 490 nm dan emisi 510 nm. Sediaan diperiksa pada seluruh lapang pandang dengan pembesaran 200x dan dikonfirmasi keberadaan ookista dengan pembesaran 400x. Lalu ookista diukur dan dilihat bentuk yang berfluoresensi (*fluorescence bodies*). *Ookista Cryptosporidium* sp. tampak berfluoresensi lebih terang pada bagian tepinya dari pada bagian tengah berukuran 4-6  $\mu$ m yang berwarna hijau apel (*green apple*) terang dengan latar belakang gelap. Hasil positif jika ditemukan satu atau lebih ookista *Cryptosporidium* sp. pada seluruh lapang pandang.

### 3.6.4.2. Pemeriksaan Sediaan Hasil Tes Imunofluoresen Langsung dengan Filter DAPI

Ookista *Cryptosporidium* sp. dideteksi menggunakan mikroskop fluoresensi (Olympus BX-51, Japan) yang dilengkapi filter DAPI. Sediaan diperiksa pada seluruh lapang pandang dengan pembesaran 400x. Ookista *Cryptosporidium* sp. tampak berbentuk bulat seperti cincin berwarna biru dan tampak berpendar terang serta tampak titik-titik sporozoit berwarna biru gelap. Lalu ookista *Cryptosporidium* yang telah terdeteksi tersebut dinilai inti sporozoitnya.

### 3.7. Penilaian Hasil Kerja

Metode pemeriksaan imunofluoresen langsung dilakukan pada 239 sampel. Sampel dinilai secara kualitatif atau nominal dikotom (positif dan negatif). Ookista dihitung secara semi kuantitatif, dengan skala sebagai berikut:<sup>17</sup>

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

### 3.8. Definisi Operasional

1. Sampel tinja anak batita merupakan hasil survei peneliti sebelumnya dan menjadi koleksi laboratorium Departemen Parasitologi FKUI.
2. Tinja konsentrat adalah tinja yang diproses untuk pewarnaan setelah melalui tahap konsentrasi.
3. IFA (Immunofluorescent Assay) adalah uji imunofluoresensi langsung menggunakan antibody terhadap *Cryptosporidium* sp. yang telah dilabel FITC.
4. Diare adalah peningkatan frekuensi defekasi (>3x/hari), dan atau perubahan konsistensi tinja menjadi lebih cair.
5. Status gizi ditentukan berdasarkan berat badan ideal menurut tinggi badan (BB/TB) pada kurva CDC-NCHS 2000 dengan klasifikasi sebagai berikut: BB/TB  $\geq$  90% tergolong gizi baik, BB/TB 70% hingga <90% adalah gizi kurang, sedangkan BB/TB <70% termasuk gizi buruk. Adapun dalam

penelitian ini, gizi kurang dimasukkan dalam kategori gizi buruk untuk analisis statistik.

6. Hasil positif dinyatakan apabila ditemukan minimal satu ookista *Cryptosporidium* sp. dalam sediaan, sebaliknya hasil negatif jika tidak ditemukan ookista.
7. Baku emas (*gold standard*) merupakan standar untuk pembuktian ada atau tidaknya ookista *Cryptosporidium* sp. pada spesimen, dan merupakan metode deteksi terbaik yang ada (meskipun bukan yang termurah atau termudah).<sup>44</sup>
8. Hasil deteksi adalah hasil yang diperoleh dari uji yang diteliti dengan hasil pada pemeriksaan menggunakan baku emas.<sup>44</sup>
9. Sensitivitas adalah proporsi sampel dengan hasil uji deteksi positif (positif benar) dibanding seluruh sampel positif (positif benar + negatif palsu).<sup>44</sup>
10. Spesifisitas adalah proporsi sampel dengan hasil uji deteksi negatif (negatif benar) dibandingkan dengan seluruh sampel yang negatif (negatif benar + positif palsu).<sup>44</sup>

### 3.9. Analisis data

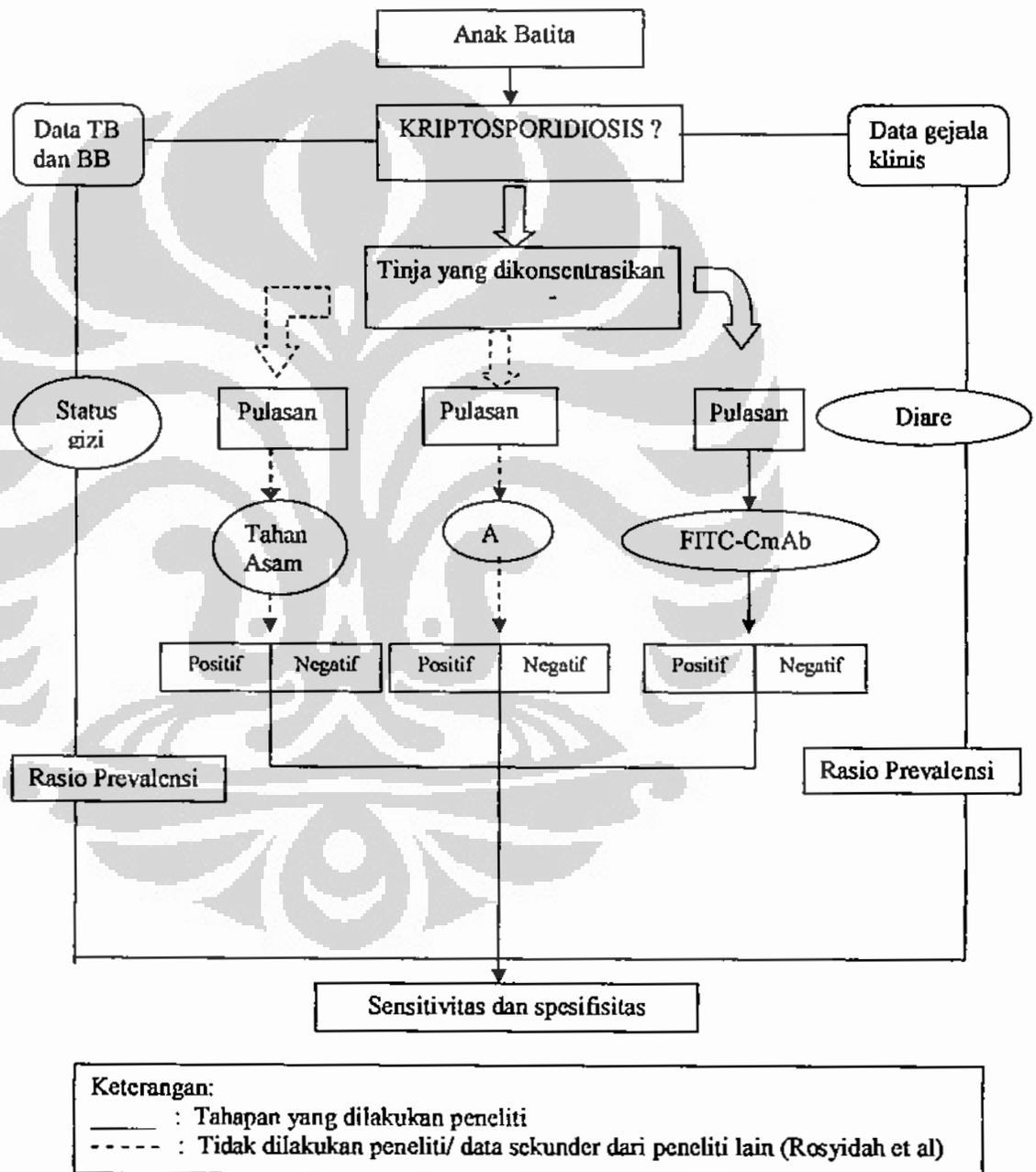
Hasil uji/ pemeriksaan dalam bentuk penilaian kualitatif. Analisis komparatif secara statistik untuk mengukur kemaknaan perbedaan data proporsi antara ketiga metode pemeriksaan (MTA, AF dan IFA), menggunakan uji Mc Nemar (tabel 2x2) dengan nilai  $p < 0,05$  sebagai batas kemaknaan. Disertakan juga nilai koefisien kappa ( $K$ ) untuk menilai hasil:

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

Dihitung sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan negatif dari total jumlah sampel yang diperiksa menggunakan rumus uji diagnostik (lampiran 1). Dalam penelitian ini, hasil yang didapatkan dari metode imunofluoresen menggunakan FITC C-mAb dibandingkan terhadap deteksi *Cryptosporidium* sp. dengan metode MTA dan Auramin Fenol yang telah dilakukan oleh peneliti lain,

Rudina Azimata Rosyidah.<sup>21</sup> Penilaian juga dilakukan dengan membandingkan hasil yang didapat dengan metode IFA dan PCR. Data metode PCR merupakan data sekunder yang telah dilakukan oleh peneliti terdahulu, Sri Wahyuni Dwintarsi<sup>45</sup>

### 3. Alur Penelitian



## BAB 4 HASIL PENELITIAN

### 4.1 Karakteristik Sampel

Pada penelitian ini, peneliti mengambil sampel tinja anak-anak berumur di bawah tiga tahun dari populasi umum yang tinggal di pinggiran Kali Ciliwung sebanyak 239 sampel dari 486 sampel yang telah dikumpulkan oleh peneliti terdahulu. Dari sampel yang terpilih sebagian besar sampel berumur 2-3 tahun (43,5%) dan berjenis kelamin laki-laki (53,6%); anak dengan diare sebanyak 50 orang (20,9%), sedangkan anak dengan gizi buruk sebanyak 54 orang (22,6%), tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Karakteristik subyek**

Karakteristik	Jumlah (n = 239)	%
Umur (bulan; (median, range)	21 (1-36)	
<b>Umur</b>		
0-11 bulan	62	25,9
12-23 bulan	70	29,3
24-36 bulan	104	43,5
Tidak ada data	3	1,3
<b>Jenis kelamin</b>		
Perempuan	110	46,0
Laki-laki	128	53,6
Tidak ada data	1	0,4
<b>Gejala</b>		
Diare	50	20,9
Tidak diare	187	78,2
Tidak ada data	2	0,9
<b>Gizi</b>		
Buruk	54	22,6
Baik	184	77,0
Tidak ada data	1	0,4

### 4.2. Hasil Pemeriksaan ookista *Cryptosporidium sp* dengan Uji

#### Imunofluoresen

Deteksi ookista *Cryptosporidium sp.* dilakukan terhadap 239 sampel yang diseleksi secara random dari 486 sampel tinja anak berusia di bawah tiga tahun (batita). Pemeriksaan secara mikroskopis dengan metode pewarnaan imunofluoresen pada 239 sampel tinja yang telah dikonsentrasi, memberikan hasil sebagai berikut:

#### 4.2.1 Hasil Pulasan pada Metode Pewarnaan Imunofluoresen



**Gambar 4.1** Ookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan Imunofluoresen pada Tinja Konsentrasi dilihat dengan FITC (pembesaran 400 x) skala  $1:10^{-5}$

Hasil pada sediaan tinja konsentrasi dengan FITC:

- Latar belakang *slide* gelap; homogen. Lebih tipis, tampak sedikit spora jamur dan debris/kotoran yang membias cahaya fluoresens.
- Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitarnya jelas. Pada gambar 4.1, ookista berbentuk bulat dengan bagian tepi tampak lebih berfluoresensi dari pada bagian tengah berwarna hijau apel dan tampak berpendar terang (tanda panah).

Hasil dengan pewarnaan Imunofluoresen pada Tinja dengan DAPI:

- Latar belakang *slide* biru gelap; tidak homogen. Lebih tebal, banyak spora jamur dan debris/kotoran yang membias cahaya fluoresens sehingga menyulitkan pemeriksaan.
- Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitarnya jelas. Ookista berbentuk bulat, berwarna biru dan tampak berpendar terang.
- Pada gambar 4.2, tampak 3 inti di dalam ookista (tanda panah).



**Gambar 4.2** Ookista *Cryptosporidium* sp. (tanda panah) pada pewarnaan FITC tampak bulat berwarna biru pucat, berdiameter 4-6  $\mu\text{m}$ , di dalamnya tampak 3 inti berwarna biru terang tewarnai dengan DAPI, menunjukkan adanya sporozoit di dalam ookista (pembesaran 400 x)

#### 4.2.2 Hasil Pemeriksaan Sediaan

Untuk mengetahui keberhasilan teknik imunofluoresen, maka digunakan kontrol positif yaitu feses penderita kriptosporidiosis yang berasal dari Departemen Parasitologi FKUI. Hasil pemeriksaan dinyatakan positif bila ditemukan ookista *Cryptosporidium* sp dan dihitung jumlahnya pada setiap slide.

**Tabel 4.2. Perbandingan tiga metode pemeriksaan untuk diagnosis *Cryptosporidium* sp.**

Metode	Sampel positif, n= 239	
	Jumlah	%
Modifikasi Tahan Asam <sup>21</sup>	9	3,7%
Auramin Fenol <sup>21</sup>	25	10,5%
<i>Direct Immunofluoresence</i>	58	24,3%

Dari table 4.2, didapatkan hasil pemeriksaan IFA pada sampel yang positif terinfeksi *Cryptosporidium* sebesar 24,3%, sedangkan dibandingkan dengan data

sekunder hasil pemeriksaan menggunakan pewarnaan MTA dan AF dari tinja konsentrat yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya<sup>21</sup> didapatkan hasil positif sebesar 3,7% dan 10,5% berturut-turut.

**Tabel 4.3. Hasil penilaian semi kuantitatif deteksi ookista *Cryptosporidium* dengan metode IFA**

Penilaian semikuantitatif	Jumlah
0	181
+	38
++	20
+++	0

Berdasarkan penilaian semikuantitatif, jumlah ookista yang ditemukan dengan metode IFA sebagian besar dengan intensitas rendah (+1) (Tabel 4.3). Sedangkan +2 ditemukan pada 20 sampel dan +3 tidak ditemukan.

**Tabel 4.4. Jumlah Sporozoit pada Ookista Sampel Positif *Cryptosporidium* sp**

Jumlah Sporozoit	Jumlah Sampel	Pengelompokan Sampel
0	17	
0 dan 1	17	
0 dan 2	5	
0, 1 dan 2	9	54
0,1 dan 3	1	
0,2 dan 3	3	
0,1,2 dan 3	2	
2	1	
1 dan 2	1	4
2 dan 3	1	
1,2 dan 3	1	
Total	58	58

Dengan penambahan DAPI, dapat terlihat adanya sporozoit di dalam ookista, sehingga dapat dihitung jumlahnya. Dari hasil pemeriksaan tersebut (tabel 4.4) terlihat bahwa 17 sampel yang ditemukan ookistanya tidak memiliki sporozoit lagi (kosong). Sejumlah 54 sampel memiliki ookista dengan sporozoit yang kosong. Sedangkan 4 sampel memiliki ookista dengan sporozoit satu, dua dan/atau tiga.

#### 4.3. Perbandingan Hasil Pemeriksaan Tinja Konsentrasi dengan Metode MTA, AF, PCR dan IFA untuk Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp.

Berdasarkan tabel 4.5 didapatkan bahwa pada sampel tinja konsentrasi dengan pewarnaan MTA dapat dideteksi 9 sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan dengan IFA terdapat 58 sampel positif. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* terdapat perbedaan bermakna ( $p= 0,000$ ) dengan nilai *Kappa* = 0,186 atau *slight agreement* (Lampiran 2), antara hasil pemeriksaan sampel tinja dengan teknik MTA dan IFA.

**Tabel 4.5. Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* dari Tinja Konsentrat dengan Metode MTA dan Imunofluoresen**

		IFA		Total
		Positif	Negatif	
MTA*	Positif	8	1	9
	Negatif	50	180	230
Total		58	181	239

Ket: \* : sumber data dari penelitian Rudina Azimata R (2008)<sup>20</sup>

Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas metode MTA terhadap IFA 13,8 % dan 99,4 %. Sedangkan Nilai Prediksi Positif (NPP) 88,8 % dan Nilai Prediksi Negatif (NPN) 78,2 %

**Tabel 4.6. Perbandingan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* dari Tinja Konsentrat dengan Metode AF dan IFA**

		IFA		Total
		Positif	Negatif	
AF*	Positif	23	2	25
	Negatif	35	179	214
Total		58	181	239

Ket: \* : sumber data dari penelitian Rudina Azimata R (2008)<sup>20</sup>

Berdasarkan tabel 4.6. didapatkan bahwa pada sampel tinja konsentrasi dengan pewarnaan AF dapat dideteksi 25 sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan pada sampel tinja konsentrasi dengan metode IFA terdapat 58 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan perbedaan bermakna ( $p= 0,000$ ) dengan nilai *Kappa*=0,478 atau *moderate agreement* (Lampiran 3) untuk

kemampuan deteksi ookista *Cryptosporidium* dari tinja konsentrasi dengan kedua teknik tersebut.

Sensitivitas dan spesifisitas metode AF terhadap IFA untuk mendeteksi ookista *Cryptosporidium* dari tinja konsentersasi adalah 39.6% dan 98.8% dengan Nilai Prediksi Positif (NPP) 92 % dan Nilai Prediksi Negatif (NPN) 83,6 %

**Tabel 4.7. Perbandingan Deteksi Infeksi *Cryptosporidium* dari Tinja Konsentrasi dengan Metode IFA dan PCR**

IFA		PCR**		Total
		Positif	Negatif	
	Positif	56	2	58
	Negatif	9	172	181
<b>Total</b>		<b>65</b>	<b>174</b>	<b>239</b>

Ket: \*\* : sumber data dari penelitian Sri Wahyuni Dwintasari (2008)<sup>45</sup>

Berdasarkan tabel 4.7. didapatkan bahwa dengan teknik IFA dapat dideteksi 58 sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan dengan metode PCR didapatkan 65 sampel positif. Uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antara kedua metode tersebut dalam mendeteksi infeksi *Cryptosporidium* ( $p= 0,065$ ) dengan nilai *Kappa*=0,880 atau *excellent agreement* (Lampiran 4).

Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas metode IFA terhadap PCR yaitu 86.2% dan 98.9% dengan Nilai Prediksi Positif (NPP) 96,6 % dan Nilai Prediksi Negatif (NPN) 95 %

#### 4.4. Distribusi karakteristik subyek berdasarkan hasil pemeriksaan IFA.

Tabel 4.8. menggambarkan distribusi sampel positif kriptosporidiosis pada pemeriksaan IFA dan karakteristiknya berdasarkan usia, jenis kelamin, status diare dan status gizinya.

Sebagian besar sampel berumur antara 2-3 tahun; 14 dari 239 anak (5,9%) dengan diare. Analisis dengan rasio prevalensi didapatkan kemungkinan resiko anak perempuan terinfeksi *Cryptosporidium* 1,22 kali lebih besar dari pada anak laki-laki.

**Tabel 4.8. Distribusi Karakteristik Batita *Cryptosporidium* sp. positif pada pemeriksaan IFA**

Karakteristik	<i>Cryptosporidium</i> sp. positif	<i>Cryptosporidium</i> sp. negatif	RP*	IK95%**
Umur [bulan; (median, range)]	22 (1-36)			
<b>Umur</b>				
0-11 bulan	11	51		
12-23 bulan	19	51	-	
24-36 bulan	28	76		
<b>Jenis kelamin</b>				
Perempuan	29	81	1,22	0,67-2,21
Laki-laki	29	99		
<b>Gejala</b>				
Diare	14	36	0,79	0,39-1,60
Tidak diare	44	143		
<b>Gizi</b>				
Buruk	10	44	1,55	0,73-3,33
Baik	48	136		

\*RP = Rasio Prevalensi

\*\*IK95% = Interval Kepercayaan 95%

#### 4.5. Hubungan antara status gizi dengan terjadinya infeksi *Cryptosporidium* sp pada batita

Pada tabel 4.8. terlihat bahwa ada 10 dari 58 anak positif *Cryptosporidium* memiliki status gizi buruk, sisanya dengan status gizi baik. Pada penilaian rasio prevalensi didapatkan nilai 1,55 dengan interval kepercayaan 95% sebesar 0,73-3,33 menunjukkan bahwa anak dengan gizi baik memiliki peluang terinfeksi *Cryptosporidium* sebanyak 1,55 kali dibandingkan yang gizi buruk; akan tetapi hal ini tidak bermakna secara statistik.

#### 4.6. Hubungan antara kejadian diare dengan terjadinya infeksi *Cryptosporidium* sp pada batita

Berdasarkan tabel 4.8. didapatkan bahwa 15 dari 58 anak yang terinfeksi *Cryptosporidium* mengalami gejala diare, sedangkan sisanya tidak. Pada penilaian rasio prevalensi didapatkan nilai 0,79 dengan interval kepercayaan 95% sebesar 0,39-1,60 menunjukkan bahwa diare bukan merupakan gejala yang menandakan bahwa batita tersebut terinfeksi *Cryptosporidium* sp.

## BAB 5

### PEMBAHASAN

Peneliti menggunakan sampel tinja anak-anak berumur di bawah tiga tahun dari populasi umum yang tinggal di pinggiran Kali Ciliwung sebanyak 239 sampel yang merupakan koleksi Dept. Parasitologi FKUI dan sudah tersimpan selama 2 tahun.

Pada penelitian ini, pemeriksaan sediaan dilakukan di seluruh lapang pandang untuk setiap metode, hal ini dikarenakan kecilnya kemungkinan ookista yang akan didapatkan pada tinja anak batita atau individu imunokompeten dan tanpa gejala. Berbeda jika menggunakan sampel dari individu yang imunokompromis, kemungkinan mendapatkan ookista lebih besar karena rentan terinfeksi.

Berdasarkan hasil pemeriksaan dengan metode imunofluoresen menggunakan FITC-C-MAb terlihat ookista *Cryptosporidium* sp. berbentuk bulat dengan fluoresensi lebih jelas pada bagian tepi dari pada bagian tengah, berwarna hijau terang sehingga mudah dideteksi pada latar belakang berwarna gelap/ hitam. Hal ini sama seperti yang didapatkan pada penelitian *Stibbs*,<sup>20</sup> ookista *Cryptosporidium* sp. dapat dibedakan dari sel ragi yang juga berwarna kuning kehijauan serta berukuran lebih besar dan tidak berpendar/berfluoresensi. Pemeriksaan akan lebih sulit jika sel ragi, debris dan sisa-sisa sel berjumlah banyak, sedangkan jumlah ookista sangat sedikit dalam tinja. Kotoran yang sangat banyak pada tinja dapat menyebabkan latar belakang terlalu berfluoresensi, sehingga pada saat optimasi menyulitkan pemeriksaan. Oleh karena itu, sebelum dilakukan pemeriksaan imunofluoresen langsung, terlebih dahulu sampel dikonsentrasi. Teknik konsentrasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah cara sedimentasi, yaitu dengan air-eter. Pemilihan teknik ini didasarkan pada kebutuhan penelitian yang tidak hanya untuk pemeriksaan tinja secara mikroskopis, namun selanjutnya untuk uji tingkat molekuler dengan PCR. Penelitian Bukhari dan Smith (1995)<sup>48</sup> menunjukkan bahwa deteksi ookista *Cyptosporidium* sp. pada sampel tinja lebih baik menggunakan konsentrasi air-eter dengan rata-rata ookista yang didapatkan sebanyak 46 – 75%, dibandingkan

teknik flotasi densitas sukrosa (24 – 65%) dan flotasi zink sulfat (22 – 41%). Sehingga selain lebih ekonomis dan bermanfaat untuk deteksi di tingkat molekuler, akan mudah didapatkan ookista dalam jumlah banyak. Soetomenggolo dkk<sup>14</sup> sudah melakukan pemeriksaan tinja dengan pewarnaan tahan asam tanpa konsentrasi dan ternyata kurang memuaskan. Diharapkan dengan teknik konsentrasi, penelitian ini akan memberikan hasil lebih baik/akurat.

Pada penelitian ini digunakan produk antibodi monoklonal terhadap *Cryptosporidium* sp dari Cellabs Pte, Australia. Reagen antibodi monoklonal menciit yang telah dilabel fluoresein akan berikatan secara spesifik terhadap protein dinding sel ookista *Cryptosporidium* sp dari spesimen. Kit uji ini tidak memiliki reaksi silang dengan *Eimeria tenella*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas hominis*, *Isospora belli*, *Microsporidium* sp, *Penumocystis carinii*, *Candida* sp, *Aspergillus* sp, *Listeria* sp, *Legionella* sp, *Erysipelothix* sp, *Escherichia* sp, *Lactobacillus* sp, *Sterptococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Bacillus* sp, *Clostridium* sp, *Brochotrix* sp dan *Corynebacterium* sp (kit insert, lampiran 6).

Pemeriksaan imunofluoresen ini kemudian dibandingkan dengan pemeriksaan lain yaitu pewarnaan modifikasi tahan asam (Ziehl Neelsen) dan pewarnaan Auramin Fenol. Dengan teknik modifikasi tahan asam ditemukan 9 sampel (3,7%) positif, metode pewarnaan Auramin fenol menjadi 25 (10,5%), dan metode IFA memberikan hasil positif tertinggi 58 (24,3%) karena dapat mendeteksi ookista bahkan jika jumlah ookistanya rendah dalam sampel. Sedangkan dengan pemeriksaan MTA dan Auramin Fenol, zat pewarna tidak seluruhnya mewarnai seluruh ookista yang ada sehingga sulit untuk dapat mendeteksi ookista pada infeksi ringan kriptosporidiosis dan asimtomatik.<sup>36</sup>

Hal ini juga terkait dengan kualitas apusan sediaan yang baik dan alat (mikroskop) yang digunakan untuk memeriksa. Pemeriksaan menggunakan metode IFA adalah salah satu teknik alternatif karena proses pemeriksaan dengan cara ini lebih mudah. Sehingga sangat tepat digunakan untuk skrining cepat pada jumlah sampel yang besar, meskipun untuk melihat morfologi spesies kurang spesifik dibandingkan pewarnaan MTA. Namun, kelemahan ini dapat diantisipasi dengan melakukan studi pendahuluan dan mempelajari kontrol positif *Cryptosporidium* sp. yang dilabel FIT-C. Selain itu dengan prosedur penambahan

DAPI pada sediaan, dapat dilihat adanya inti sporozoit dalam ookista, sehingga memperkecil kemungkinan adanya positif palsu.

Selain itu, dilakukannya pengembangan metode imunofluoresen langsung dengan menambahkan DAPI juga untuk menilai viabilitas ookista yang terdeteksi berdasarkan ada atau tidaknya sporozoit dan atau isi granular. Le Chevallier et al menyimpulkan bahwa ookista yang terdeteksi pada konsentrat air berpotensi viabel. Ookista yang viabel mengandung empat sporozoit. Pada pemeriksaan dengan filter DAPI ternyata tidak ada satupun ookista yang memiliki empat sporozoit. Sehingga disimpulkan bahwa ookista pada sampel positif sebagian besar sudah tidak intak lagi ketika dikeringkan pada slide mikroskop. Hal ini mungkin disebabkan karena sampel yang digunakan sudah lama disimpan.

Kemudahan mengenali inti sporozoit, memberikan keuntungan tambahan untuk identifikasi ookista sehingga tidak perlu dilakukan pemeriksaan menggunakan mikroskop DIC (*differential interference contrast*) untuk mengetahui struktur yang terdapat di dalam ookista. Terlebih lagi, adanya ookista yang rusak, dengan satu sampai empat inti sporozoit yang berfluoresen dalam berbagai ukuran dalam ookista akan membantu identifikasi.<sup>49</sup> Kelebihan penambahan DAPI lainnya adalah ookista *Cryptosporidium* dapat dengan mudah dideteksi hanya dengan pembesaran 400x dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskopik MTA yang memerlukan pembesaran 1000x.

Pada pemeriksaan menggunakan filter DAPI ini ternyata sebagian besar ookista yang ditemukan tidak dapat terlihat lagi sporozoitnya, sedangkan ookista yang memiliki satu, dua dan/atau tiga sporozoit hanya 4 (7,4%) dari 239 sampel tinja yang diperiksa. Kelompok ookista dengan inti sporozoit kosong mungkin menggambarkan ookista yang dalam fase transisi antara ookista yang mengandung satu sporozoit dan ookista kosong. Antibodi monoklonal spesifik terhadap dinding internal ookista dapat menambah nilai dalam membedakan ookista kosong dengan kontaminan yang memiliki ukuran dan bentuk sama dengan ookista *Cryptosporidium*.

Pengembangan metode deteksi fluoregenik menawarkan kaakuratan dan ketelitian yang lebih baik bagi teknisi untuk menentukan ookista dengan fluoresen

FTTC (C-mAb), ookista yang bersporulasi dan otomatis menurunkan hasil yang positif palsu dan negatif palsu.

Penelitian Arrowood dkk<sup>36</sup> melaporkan bahwa penggunaan reagen antibodi monoklonal fluoresen dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas dalam mendeteksi ookista *Cryptosporidium* dan akan sangat berguna untuk program skrining dalam studi epidemiologi.<sup>36</sup>

Pada penelitian ini juga dibandingkan pemeriksaan IFA dengan pemeriksaan PCR dimana didapatkan hasil bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna di antara keduanya ( $p = 0,065$ , kappa 0,880 (*excellent agreement*)). Hasil ini menandakan bahwa pemeriksaan IFA dapat menjadi alternatif untuk mengatasi *false negative* dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang hampir sama, dimana sensitivitasnya 86,2% dan spesifisitasnya >98%, dengan NPP 96,6% dan NPN 95%. Tingginya NPP dan NPN pada metode pemeriksaan menunjukkan adanya validitas yang cukup untuk memprediksi ada atau tidaknya infeksi pada sampel yang diteliti.

Ditemukannya perbedaan hasil positif pada pemeriksaan IFA dengan *gold standard* yaitu PCR karena keterbatasan teknik mikroskopis untuk mendeteksi stadium selain ookista dari siklus hidup *Cryptosporidium* sp. sedangkan PCR memiliki kelebihan dapat mendeteksi berbagai stadium. Selain itu juga dari perbedaan jumlah konsentrasi sampel tinja yang digunakan, untuk teknik IFA sebanyak 10  $\mu$ l dari tinja konsentrasi sedangkan untuk ekstraksi DNA (PCR) membutuhkan 100  $\mu$ l (1:10).

Dari total 239 sampel yang diperiksa, proporsi sampel positif *Cryptosporidium* sp. dengan pewarnaan MTA sebesar 3,7%, AF 10,5% dan IFA 24,3%. Dari keseluruhan teknik mikroskopis yang digunakan pada penelitian ini, hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. terendah didapatkan pada pewarnaan MTA konsentrasi yaitu sebesar 3,7%. Hal ini hampir sama dengan penelitian Morgan *et al.*<sup>32</sup> yang mendapatkan prevalensi 5,6% (29 dari 511 sampel tinja) dengan metode pewarnaan MTA. Sedangkan hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. tertinggi didapatkan pada metode pewarnaan IFA. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Rivera *et al.*<sup>50</sup> yang memeriksa sampel tinja yang dikonsentrasi dan menggunakan imunofluoresen untuk skrining pada pasien

kanker tanpa gejala diare. Prevalensi yang didapatkan adalah 28,3% (15 dari 53 pasien).

IFA lebih sensitif untuk mendeteksi ookista pada sediaan tinja yang mengandung sangat sedikit ookista.<sup>37</sup> Jumlah ookista *Cryptosporidium* sp. yang sedikit akan lebih sulit dideteksi dengan pewarnaan MTA dan AF daripada IFA.<sup>25</sup> Hal ini disebabkan karena antibodi monoklonal terhadap protein dinding ookista *Cryptosporidium* sp dengan kekuatan afinitas dan aviditasnya berikatan secara spesifik pada epitopnya membentuk kompleks antigen antibodi sehingga kemungkinan untuk didapatkan hasil positif palsu atau negatif palsu sangat minimal. Oleh karena itu, IFA dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk diagnosis infeksi *Cryptosporidium* sp. Metode IFA dapat diterapkan pada laboratorium klinis yang telah memiliki mikroskop fluoresen sebagai prosedur rutin yang dilakukan sehari-hari dan juga skrining karena lebih mudah dan efektif daripada pewarnaan konvensional.<sup>35</sup>

Kriptosporidiosis merupakan penyakit parasitik yang umum terjadi pada populasi umum anak-anak di bawah tiga tahun seperti yang telah dilaporkan Tumwine JK dkk,<sup>51</sup> bahwa infeksi *Cryptosporidium* paling banyak terjadi pada anak-anak berusia 3-36 bulan. Selain itu pada analisis statistik, anak perempuan memiliki kemungkinan 1,22 kali lebih rentan dari pada anak laki-laki. Hal ini sesuai dengan penelitian Al-Hindi dkk<sup>46</sup> yang mendapatkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak perempuan ( $28/138 = 20,3\%$ ) lebih tinggi dari pada anak laki-laki ( $34/278 = 12,2\%$ ) dengan nilai  $p = 0,03$ .

Anak-anak yang terinfeksi pada penelitian ini ternyata sebagian besar tidak menampakkan gejala diare (75,9%). Hal ini didukung oleh penelitian penelitian Al-Hindi dkk<sup>46</sup> dimana prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak tanpa diare ( $56/280 = 20,0\%$ ) lebih tinggi dibandingkan anak diare ( $6/136 = 4,4\%$ ) dengan nilai  $p = 0,001$  dan Checkley dkk<sup>25</sup> dimana 63% anak-anak yang diskriming *Cryptosporidium* adalah asimtomatik. Palit<sup>47</sup> menyatakan bahwa proporsi yang besar penderita kriptosporidiosis yang asimtomatik mungkin disebabkan karena fenomena “wash out” dimana adanya onset diare akut maka tingkat deteksi orang yang asimtomatik “vis a vis” akan meningkat. Tingginya prevalensi kriptosporidiosis pada penelitian ini mungkin disebabkan karena

sampel berasal dari daerah bantaran Kali Ciliwung, dimana sebagian besar status ekonominya rendah. Ditambah lagi dengan kondisi tempat tinggal yang kumuh dan padat, ketersediaan air bersih, dan ketiadaan fasilitas pembuangan sampah yang baik, intake makanan yang sudah terkontaminasi dan lain-lain.<sup>14,49,52</sup>

Status gizi pada anak-anak batita yang diperiksa ternyata bukan merupakan faktor resiko untuk terjadinya kriptosporidiosis. Hal ini sesuai dengan penelitian Tumwine<sup>51</sup> yang melaporkan bahwa tidak ada hubungan yang signifikan antara malnutrisi dengan kriptosporidiosis.

Hasil yang tidak menunjukkan adanya hubungan antara diare dan status gizi tersebut menandakan bahwa sangat sulit mendiagnosis kriptosporidiosis berdasarkan atas gejala klinis dan pemeriksaan fisik saja. Dengan semakin meningkatnya frekuensi kejadian kriptosporidiosis pada anak batita di daerah perkotaan khususnya di daerah kumuh dan bantaran sungai, oleh karena itu perlu ditunjang oleh pemeriksaan tinja yang cukup sensitif dan spesifik untuk menegakkan diagnosis penyakit parasitik ini. Untuk keperluan epidemiologi dan skrining, pemeriksaan IFA cukup menjanjikan untuk menggantikan pemeriksaan konvensional. Terlebih jika laboratorium telah dilengkapi oleh mikroskop fluoresen.

## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

- 6.1.1 Frekuensi kriptosporidiosis pada anak di bawah tiga tahun di bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu pada sediaan tinja konsentrat dengan teknik imunofluoresen menggunakan FITC-CmAb cukup tinggi
- 6.1.2 Metode pemeriksaan MTA dan AF kurang sensitif dan spesifik dibandingkan metode imunofluoresen (IFA) dalam deteksi ookista *Cryptosporidium* sp.
- 6.1.3 Metode pemeriksaan imunofluoresen dapat dijadikan alternatif untuk deteksi kriptosporidiosis dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tidak jauh berbeda dengan PCR.
- 6.1.4 Tidak terdapat hubungan antara status gizi dengan kejadian infeksi *Cryptosporidium* sp pada balita yang tinggal di bantaran sungai Ciliwung.
- 6.1.5 Tidak terdapat hubungan antara diare dengan kejadian infeksi *Cryptosporidium* sp pada balita yang tinggal di bantaran sungai Ciliwung.

#### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan desain yang lebih baik dan jangka waktu penelitian yang lebih lama agar dapat diketahui ada tidaknya hubungan kejadian kriptosporidiosis dengan status gizi dan diare dengan memperhatikan faktor-faktor yang mungkin mempengaruhi prevalensi kriptosporidiosis seperti sanitasi dan sumber air. Jika memungkinkan, menggunakan spesimen tinja segar sehingga didapatkan penilaian viabilitas ookista *Cryptosporidium* sp yang lebih akurat.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Campbell DM, Flanagan PA. Laboratory examination for *Cryptosporidium* spp. in Scotland. *J Clin Pathol*. 1992;45:914-6.
2. MacPershon DW, McQueen R. Cryptosporidiosis: multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):198-202.
3. A. Clinton White Jr. Cryptosporidiosis: In principles and practice of infectious diseases.. In G Mandell, J Bennet, R Dolin editors. 6<sup>th</sup> ed. Elsevier; Amsterdam. 2005. p. 3215-8.
4. Roy SL, DeLong SM, Stenzel SA. Risk factor for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the united states from 1999 to 2001. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):2944-51.
5. Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Reviews*. 1999;554-63.
6. Hlavsa MC, Watson JC, Beach MJ. Cryptosporidiosis surveillance – United States 1999-2002: Diunduh dari:  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5401a1.htm> 24 Desember 2006
7. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol*. 2002;15(1):145-54.
8. Jumlah pengidap HIV/AIDS di Indonesia sampai 31 Maret 2006. Diunduh dari:  
<http://www.bakohumas.depkominfo.go.id/index.php?modul=texy&page=detail&textID=416>. 24 Desember 2006.
9. Adjei AA, Armah H, Rodrigues O, Renner L, Borketey P, Ayeh-Kumi P, et al. *Cryptosporidium* Spp., a frequent cause of diarrhea among children at the Korle-Bu teaching hospital, Accra, Ghana. *Jpn J Infect Dis*. 2004;57:216-9.
10. Perch M, Sodemann M, Jakobsen MS, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Fischer TK, dkk. Seven years experience with *Cryptosporidium parvum* in Guinea-Bissau, West Africa. *Ann Trop Paediatr*. 2001;21:313-8.
11. Pereira MGC, Atwill ER, Barbosa AP, Silva SAE, Zapata MTAG. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiania, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(6):787-93.

12. Goodgame, R.W. Understanding intestinal spore-forming protozoa: Cryptosporidia, Microsporidia, Isospora, and Cyclospora. 1996; 124(4): 429-41. Diunduh dari: <http://www.annals.org/cgi/content/full/124/4/429> .23 Desember 2006.
13. Katsumata T, Hosea D, Wasito EB, Kohno S, Hara K, Soeparto P, dkk. Cryptosporidiosis in Indonesia: a hospital-based study and a community-based survey. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:628-32.
14. Soetomenggolo HA, Firmansyah A, Kurniawan A, Pujiastuti P. Cryptosporidiosis pada anak usia dibawah tiga tahun di daerah bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu. *Paediatr Indones* 2008;48(2):99-102.
15. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and Clinical Features of *Cryptosporidium* Infection in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002 Jan;15(1):145-54.
16. Weber R, Bryan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocyst in fecal specimens. *Appl Environ Microbiol.* 1992;30(11):2869-73.
17. OIE (Office International des Epizooties). Cryptosporidiosis in manual of standards for laboratory test and vaccines. 5<sup>th</sup> edition. Paris. 2004. Diunduh dari: [http://www.oie.int/eng/normes/en\\_mmanual.htm](http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm). 23 Desember 2006.
18. Uga S, Rai SK, Kimura K, Rai G, Kimura D, Wakasugi M. Parasites detected from diarrheal stool samples collected in Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2004;35(1):19-23.
19. Smith HV. Diagnosis of human and livestock cryptosporidiosis. In Fayer R, Xiao L editors dalam *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2<sup>nd</sup> ed. London: CRC press; 2007.p.173-203.
20. Stibbs HH, Ongerth JE. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *J Clin Microbiol.* 1986;24(4):517-21.
21. Rosyidah RA Kurniawan A, , Endardjo S. Perbandingan deteksi ookista *Cryptosporidium sp.* pada sampel tinja dengan metode pewarnaan modifikasi tahan asam dan auramin fenol. Jakarta: Universitas Indonesia, 2008. Tesis.
22. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RC. Comparison of PCR and microscopy for detection to *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol* 1998;36:995-8.
23. Huang DB, Chappell C, Okhuysen PC. Cryptosporidiosis in children. *Seminars in Pediatric Infectious Disease* 2004;15:253-259.

24. Xiao L, Cama V. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis (Chapter 4) dalam *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R, Xiao L editor. 2<sup>nd</sup> ed. London: CRC press; 2007.p.57-108.
25. Checkley W, Gilman RH, Epstein LD, Suarez M, Diaz JF, Cabrera L, et al. Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: their acute effect on weight gain in Peruvian children. *American Journal of Epidemiology*. 1997;145(2):156-63.
26. Agnew DG, Lima AM, Newman RD, Wuhib T, Moore RD, Guerrant RI, Sears CI. Cryptosporidiosis in northwestern Brazilian children: association with increased diarrhea morbidity. *J. Infec. Dis*. 1998;177:754-760.
27. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research* 2004;38:818-862.
28. Kosek M, Alcantara C, Lima AAM, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: an update. *The Lancet infectious Disease* 2001;1:262-268.
29. Kourtis, A.P. Cryptosporidiosis. *E medicine*. 2006 Feb. Available from: <http://www.emedicine.com/pcd/topic516.htm>.
30. Ghani, Lannywati. Faktor –faktor risiko diare persisten pada anak balita.. Badan Litbangkes Depkes RI. *J Kedokter Trisakti*. 2001.
31. Southwick, F.S. *Infectious Diseases in 30 Days*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc. Medical Publishing Division; 2003.
32. McPhee, S.J., Lingappa, V.R., Ganong, W.F., Lange, J.D. *Pathophysiology of disease. An introduction to clinical medicine*. Third edition. International edition. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2000.
33. Palmateer G. *Cryptosporidium parvum* is a very successful and lethal parasite. *Environmental Science and Engineering*. 2003. Available from: . Diakses tanggal 10 Juni 2007.
34. Sears CL, Kirkpatrick BD. Cryptosporidiosis and isosporiasis. In: Gillespie SH, Pearson RD, editors. *Principles and practice of clinical parasitology*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001; p.139-59.
35. Rasad R, Adjung SA, Rukmono B, Sunoto, Suharyono. *Cryptosporidium* infection in children with diarrhea. 25<sup>th</sup> Annual Scientific Seminar, Research priorities for Trop Med in the 90's. (Makalah ini telah dikemukakan dalam: "25<sup>th</sup> Silver Jubilee Seminar of the Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine 23 rd – 25 th February 1989").

36. Arrowood, M. J., and Sterling, C. R., 1989, Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection, *J. Clin. Microbiol.* 27:1490–1495.
37. Johnston, S. P., Ballard, M. M., Beach, M. J., Causser, L., and Wilkins, P. P., 2003, Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens, *J. Clin. Microbiol.* 41:623–626.
38. Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., Clavel, A., del Cacho, E., and Lopez-Bernad, F., 1996, Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs, *Vet. Parasitol.* 67:75–81.
39. Weber, R., Bryan, R.T., Bishop, H. S., Wahlquist, S. P., Sullivan, J. J., and Juranek, D. D., 1991, Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: Evidence for low sensitivity of current diagnostic methods, *J. Clin. Microbiol.* 29:1323–1327.
40. Webster, K. A., Pow, J. D., Giles, M., Catchpole, J., and Woodward, M. J., 1993, Detection of *Cryptosporidium parvum* using a specific polymerase chain reaction, *Vet. Parasitol.* 50:35–44.
41. Garcia, L. S., Brewer, T. C., and Bruckner, D. A., 1987, Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies, *J. Clin. Microbiol.* 25:119–121.
42. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J Clin Pathol.* 1985;38:1337-41.
43. Stites DP, Terr AI, Parsi TG. Immunohistochemical techniques (Chapter 12) in *Basic and Clinical Immunology*. Connecticut 8<sup>th</sup> ed. Appleton Lange:1994.p.178-182.
44. Sastroasmoro S, Ismael S. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis edisi 2*. Jakarta. CV Sagung Seto. 2006.
45. Dwintasari SW. *Pengembangan metode PCR untuk deteksi gen 18S rRNA Cryptosporidium sp. pada feses yang disimpan dalam larutan kalium bikromat*. [tesis]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2008.
46. Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. 1995;33(10):2592-5.

47. Smith HV, Campbell BM, Paton CA, Nichols AB. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in water concentrates determined by using 4',6'-diamidino-2-phenylindole and immunofluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(10):5198-201.
48. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Rich SM, Widmer G, et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago hospital, Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(6):710-15.
49. Palit A, Sur D, MitraDhar K, Saha MR. Asymptomatic Cryptosporidiosis in periurban slum setting in Kolkata, India – a pilot study. *Jpn J Infect.* 2005;58:110-11.
50. Leach CT, Koo FC, Kuhl TL, Hilsenbeck SG, Jenson HB. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in children along the Texas-Mexico border and associated risk factors. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(5):656-61.
51. Goncalves EMN, da Silva AJ, Eduardo MBP, Uemura H, Moura INS, Castilho VLP, Corbett CEP. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in Sao Paulo. *Clinics.* 2006;61(2):119-26.

**Lampiran 1:****Rumus Uji Diagnostik**

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

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

PB : Positif Benar

PP : Positif Palsu

NP : Negatif Palsu

NB : Negatif Benar

## Lampiran 2.

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada Metode MTA dengan IFA

## Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MTA * IFA	239	100.0%	0	.0%	239	100.0%

## MTA \* IFA Crosstabulation

			IFA		Total
			negatif	positif	
MTA negatif	Count	180	50	230	
	% within MTA	78.3%	21.7%	100.0%	
	% within IFA	99.4%	86.2%	96.2%	
	% of Total	75.3%	20.9%	96.2%	
positif	Count	1	8	9	
	% within MTA	11.1%	88.9%	100.0%	
	% within IFA	.6%	13.8%	3.8%	
	% of Total	.4%	3.3%	3.8%	
Total	Count	181	58	239	
	% within MTA	75.7%	24.3%	100.0%	
	% within IFA	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	75.7%	24.3%	100.0%	

## Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.000 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	239	

a. Binomial distribution used.

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.186	.060	4.610	.000
N of Valid Cases		239			

a. Not assuming the null hypothesis.

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

## Lampiran 3.

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada Metode AF dengan IFA

## Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
AF * IFA	239	100.0%	0	.0%	239	100.0%

## AF \* IFA Crosstabulation

			IFA		Total
			negatif	positif	negatif
AF	negatif	Count	179	35	214
		% within AF	83.6%	16.4%	100.0%
		% within IFA	98.9%	60.3%	89.5%
		% of Total	74.9%	14.6%	89.5%
	positif	Count	2	23	25
		% within AF	8.0%	92.0%	100.0%
		% within IFA	1.1%	39.7%	10.5%
		% of Total	.8%	9.6%	10.5%
Total		Count	181	58	239
		% within AF	75.7%	24.3%	100.0%
		% within IFA	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	75.7%	24.3%	100.0%

## Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.000 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	239	

a. Binomial distribution used.

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.478	.069	8.348	.000
N of Valid Cases		239			

a. Not assuming the null hypothesis.

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

## Lampiran 4.

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada Metode IFA dengan gold standar PCR\*

## Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
IFA * PCR	239	100.0%	0	.0%	239	100.0%

## IFA \* PCR Crosstabulation

			PCR		Total
			negatif	positif	
IFA	negatif	Count	172	9	181
		% within IFA	95.0%	5.0%	100.0%
		% within PCR	98.9%	13.8%	75.7%
		% of Total	72.0%	3.8%	75.7%
positif	positif	Count	2	56	58
		% within IFA	3.4%	96.6%	100.0%
		% within PCR	1.1%	86.2%	24.3%
		% of Total	.8%	23.4%	24.3%
Total	Total	Count	174	65	239
		% within IFA	72.8%	27.2%	100.0%
		% within PCR	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	72.8%	27.2%	100.0%

## Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.065 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	239	

a. Binomial distribution used.

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.880	.035	13.640	.000
N of Valid Cases		239			

a. Not assuming the null hypothesis.

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

### Lampiran 5.

Statistik penilaian odds ratio antara jenis kelamin, status gizi dan diare dengan kejadian infeksi Cryptosporidiosis berdasarkan hasil IFA

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step	JKelamin	.201	.302	.441	1	.507	1.222	.676	2.211
1	Constant	1.027	.216	22.530	1	.000	2.793		

a. Variable(s) entered on step 1: JKelamin.

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step	Gizi	.440	.388	1.284	1	.257	1.553	.725	3.325
1	Constant	1.041	.168	38.481	1	.000	2.833		

a. Variable(s) entered on step 1: Gizi.

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step	Diare	-.234	.359	.425	1	.514	.791	.391	1.599
1	Constant	1.179	.172	48.743	1	.000	3.250		

a. Variable(s) entered on step 1: Diare.



## Cellabs Product Profile

# CRYPTO CEL

### INTENDED USE AND PRINCIPLE OF THE TEST

The Crypto Cel IF Test is an *in vitro* direct immunofluorescence test for the detection of *Cryptosporidium* in faecal and environmental specimens. The fluorescein-labelled mouse monoclonal antibody reagent binds specifically to *Cryptosporidium* in the specimen. *Cryptosporidium* display bright green fluorescence with typical morphology.

### CONTENTS OF THE KIT

The Crypto Cel range is available in a number of formats, including: 10 Test Demo (KR1 Demo), 50 Test (KR1), 200 Test Bulk (with or without Evans Blue), Positive Control Slide only, and Mounting Fluid only. Note that the Crypto Cel Reagent has been optimised for use with Cellabs *Cryptosporidium* Positive Control Slide and Mounting Fluid.

	KR1 Demo	KR1 Standard	Bulk
<b>RR1</b> Crypto Cel Reagent	0.25mL	1.25mL	5mL
<b>CR</b> Positive Control Slide (Single Use only)	1	1	-
<b>RMG</b> Mounting Fluid	2.5mL	2.5mL	-
<i>Tests</i>	<i>10</i>	<i>50</i>	<i>200</i>

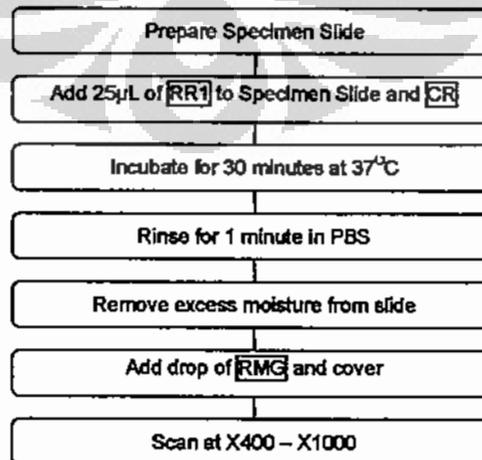
All components should be stored at 2-8°C, and are supplied ready for use. Expiry dates are clearly marked on each kit component and on the box and do not change once opened.

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microscope slides with 6-8mm diameter wells
- Methanol for specimen fixation
- Precision pipette for delivering 25µL
- Humid chamber
- Wash bath
- Phosphate buffered saline (PBS) for washing step
- Cover slips
- Non-fluorescing immersion oil
- Fluorescence microscope with filter system for FITC (maximum excitation wavelength 490nm, mean emission wavelength 530nm) and x400-x1000 magnification

### DIAGRAM FOR USE

Use Cellabs Instructions for Use Insert contained in kit when performing test, and refer to Material Safety Data Sheet (MSDS) for further information.





## Cellabs Product Profile

### READING AND INTERPRETATION OF RESULTS AND DIAGNOSIS

*Cryptosporidium* oocysts fluoresce bright apple green (with typical morphology) against a background of yellow/reddish brown counterstained material. Results should be compared with the Positive Control Slide.

### PERFORMANCE DATA FOR CRYPTO CEL

#### Sensitivity/Specificity

A	n = 210 faecal specimens. Crypto Cel versus another commercial Crypto IFA.	Sensitivity: 100% Specificity: 100%
B	Crypto Cel versus other detection methods. The Crypto Cel detected the greatest number of oocysts per sample. In comparison with the Crypto Cel the other methods were:	Giemsa: 12.2% sensitive Modified Ziehl Neelsen: 29.7% sensitive Phenol-auramine: 61.5% sensitive

#### Repeatability & Reproducibility

5 identical antigen samples were tested by 3 different operators and there was 100% correlation in the results.

#### Cross reactivity

The Crypto Cel does not cross react with:

*Eimeria tenella*  
*Toxoplasma gondii*  
*Giardia lamblia*  
*Trichomonas hominis*  
*Isopora belli*  
*Microsporidium sp.*  
*Pneumocystis carinii*  
*Candida sp.*  
*Aspergillus sp.*  
*Listeria sp.*

*Legionella sp.*  
*Erysipelothrix sp.*  
*Escherichia sp.*  
*Lactobacillus sp.*  
*Streptococcus sp.*  
*Staphylococcus sp.*  
*Bacillus sp.*  
*Clostridium sp.*  
*Brochothrix sp.*  
*Corynebacterium sp.*

#### For Ordering Assistance:

See Your Local Distributor:

OR

Cellabs Pty Ltd  
Unit 7, 27 Dale Street (PO Box 421)  
Brookvale, NSW 2100 Australia  
Tel: +61 2 9905 0133 Fax: +61 2 9905 6426  
Web: <http://www.cellabs.com.au>  
Email: [sales@cellabs.com.au](mailto:sales@cellabs.com.au)



Authorised Representative in the European Community:

MDCI Ltd  
Arundel House  
1 Liverpool Gardens  
Worthing, West Sussex BN11 1SL  
United Kingdom

## RIWAYAT HIDUP



1. Nama lengkap : dr. Ika Puspa Sari
2. NPM : 0606150731
3. Jenis Kelamin : Perempuan
4. Agama : Islam
5. Tempat dan Tgl.Lahir : Purworejo, 19 Mei 1978
6. Status : Menikah
7. Alamat : Jl. Agung Raya II No.45 Lenteng  
Agung, Jakarta Selatan
8. Pekerjaan : -
9. Alamat Instansi : Dept. Parasitologi FKUI, Jl. Salemba 6  
Jakarta Pusat
10. Riwayat Pendidikan :
  - SD 04 Kalibata tahun: 1984 – 1989
  - SLTP Negeri 182 Mampang tahun: 1989 – 1992
  - SMU Negeri 28 Jakarta tahun: 1992 – 1995
  - S1 FK Universitas Indonesia tahun: 1995 – 2002
11. Riwayat Pekerjaan :
  - Dokter Umum Balai Pengobatan Muhammadiyah, Kp. Melayu (2001-2002)
  - Dokter Umum Klinik Citra 24 jam Cipinang Besar Selatan (2001-2002)
  - Dokter Umum SDIT Ummul Quro Depok (2002).
  - Campus Child Care Provider, University of Wisconsin, Madison, USA (2002).

- Dokter Umum Klinik THT dr. Djoko Waspodo, SpTHT, Depok (2003-2005)
- Dokter Jaga IGD RSIA Budhi Jaya (2003)
- Dokter Karyawan PT. SCTI Ciracas (2004-2005)
- Staf Pengajar Departemen Parasitologi FKUI (2005-sekarang)

12. Pengalaman penelitian :

- Pengetahuan, Sikap dan Perilaku Ibu tentang kekurangan asupan yodium pada anak-anak balita di kecamatan Utan Kayu. (2000)
- Pemahaman tentang Sex pada anak-anak SMU di Kecamatan Cengkareng (2001)
- Perilaku pasien Schizophrenia setelah pulang dari perawatan Rumah Sakit (2002)

13. Publikasi / Karya ilmiah / Skripsi :

- Puspasari I, Dwintasari SW, Kurniawan A. Cyclosporiasis pada penderita AIDS dengan diare. Dipresentasikan di Simposium Nasional Parasitologi dan Penyakit Tropis di Bali 25-26 Agustus 2007.
- Kurniawan A, Puspasari I, Dwintasari SW, Connelly L, Nichols RAB, Smith HV. Cryptosporidiosis in HIV Infected Patients (a preliminary study). Dipresentasikan di Kongres Nasional II dan Temu Ilmiah Perhimpunan Dokter Spesialis Parasitologi Klinik Indonesia, 8 September 2007
- Kurniawan A, Dwintasari SW, Sari IP, 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. 2009.
- Kurniawan A, Dwintasari SW, Puspasari I, Connelly L, Nichols RAB, Smith HV. Cryptosporidium hominis among the HIV AIDS in Jakarta, Indonesia. Dipresentasikan di Scientific Program, Bangkok, 13 Oktober 2008.

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

Jakarta, 19 Mei 2009



( dr. Ika Puspa Sari)



## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

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

Nama : Ika Puspa Sari  
NPM : 0606150731  
Kekhususan : Imunologi

dengan ini menyatakan bahwa tesis saya yang berjudul “Deteksi Kriptosporidiosis pada Anak Batita Menggunakan Metode Imunofluoresen FITC (CmAb).”

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

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

Jakarta, 1 Juni 2009



( dr. Ika Puspa Sari)

Draft Artikel

## DETEKSI KRIPTOSPORIDIOSIS PADA ANAK BATITA MENGGUNAKAN METODE IMUNOFLOURESEN FITC (C-mAb)

A. Kumiawan<sup>1</sup>, IP. Sari<sup>1</sup>, R. Kodariah<sup>1</sup>

1. Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia  
2. Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia  
E-mail: [akatmadia@yahoo.com](mailto:akatmadia@yahoo.com)

### Abstrak

Kriptosporidiosis adalah penyakit parasitik yang disebabkan oleh *Cryptosporidium* sp, parasit koksidia intraseluler pada manusia dan hewan dan merupakan agen yang menyebabkan enterokolitis. *Cryptosporidium* sp. dapat menyebabkan penyakit gastrointestinal pada manusia, terutama anak-anak dan penderita imunodefisiensi. Angka kejadian infeksi umumnya lebih tinggi pada anak-anak dibandingkan orang dewasa. Gejala klinis kriptosporidiosis sangat luas mulai dari asimtomatik sampai diare persisten. Selain menyebabkan diare, infeksi ini juga dapat menyebabkan malnutrisi. Selama ini metode pulasan modifikasi tahan asam merupakan nilai baku emas bagi pemeriksaan *Cryptosporidium* sp. Namun sensitivitas teknik ini rendah dan sangat bergantung pada ketrampilan serta pengalaman tenaga mikroskopis dalam melihat *Cryptosporidium* sp. Deteksi ookista *Cryptosporidium* dengan antihodi monoklonal terhadap dinding ookista *Cryptosporidium* (CmAbs) merupakan metode yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi ookista dari apusan tinja dibandingkan metode pewarnaan konvensional. Penelitian ini, menggunakan teknik imunofluoresen dengan antibodi monoklonal yang telah dilabel oleh FITC untuk deteksi kriptosporidiosis pada batita. Hasilnya akan dibandingkan dengan PCR dalam hal sensitivitas dan spesifisitas. Penelitian ini adalah penelitian kualitatif dengan desain *cross sectional* menggunakan uji diagnostik. Hasil uji skrining dan tingkat *agreement* dihitung. Dari 239 sampel tinja yang diperiksa, didapatkan frekuensi kriptosporidiosis pada anak batita sebanyak 24,3%. Kriptosporidiosis umum terjadi pada populasi anak-anak di bawah tiga tahun. Dibandingkan dengan metode konvensional yaitu pewarnaan modifikasi tahan asam dan auramin fenol, deteksi kriptosporidiosis dengan pemeriksaan imunofluoresen langsung lebih sensitif dan lebih spesifik ( $p=0,000$ ). Dibandingkan dengan PCR, pemeriksaan imunofluoresen langsung memiliki sensitivitas 86,2% dan spesifisitas 98,9%. Sehingga dapat digunakan sebagai alternatif untuk deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja terutama untuk studi epidemiologi atau skrining. Penilaian terhadap adanya faktor resiko jenis kelamin, status gizi dan diare ternyata didapatkan hasil tidak bermakna.

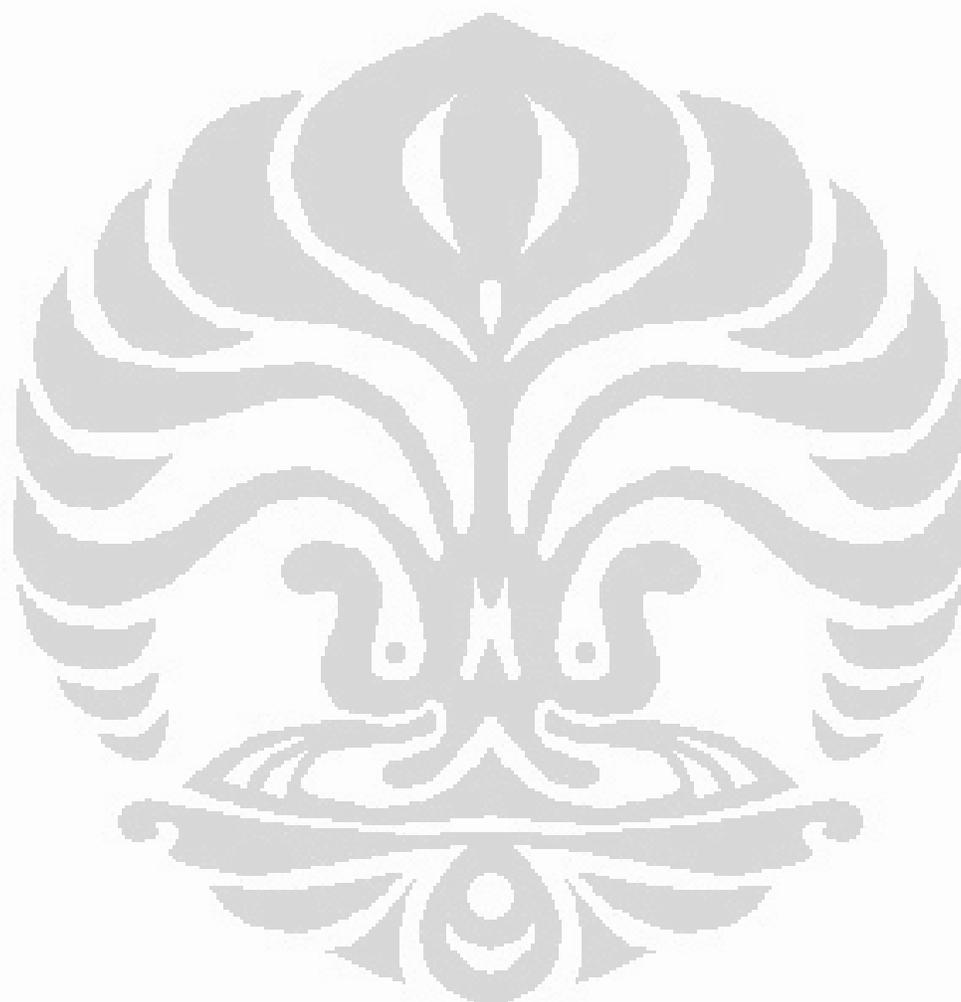
### Abstract

**Kriptosporidiosis detection on toddlers using direct immunofluorescent method FITC-C-MAb.** Kriptosporidiosis is a parasitic disease caused by *Cryptosporidium* sp, coccidian parasite intracellular in human and animal. *Cryptosporidium* sp can cause gastrointestinal diseases in human, particularly in children and immunodeficiency individuals. Generally, the incidence higher among children than the adults. The clinical manifestations are wide, ranging from asymptomatic to persistent diarrhea and malnutrition in children. Modified acid fast staining method has been a gold standard to detect *Cryptosporidium* sp, however, this technique has low sensitivity and depends much on the experience and skill of the technician. Detection of *Cryptosporidium* sp oocyst using monoclonal antibody to *Cryptosporidium* sp wall (CmAbs) is a more sensitive and specific method to determine an oocyst from stool. The objective of this study is to determine kriptosporidiosis proportion between toddlers by FITC monoclonal antibody technique. The result will be compared to PCR on its sensitivity and specificity to kriptosporidiosis diagnosis. This research is qualitative interpretation with cross sectional design study which using diagnostic test. The result of the screening test and the levels of agreement were quantified. Of 239 fecal samples examined, there were 24,3% positive oocyst *Cryptosporidium* sp. Kriptosporidiosis is common in children under three years old population. Comparing to conventional methods, MTA and AF, kriptosporidiosis detection using direct immunofluorescent test is more sensitive and specific ( $p=0,000$ ). Comparing to PCR technique, direct immunofluorescent test has sensitivity 86,2% and specificity 98,9%. Statistically, direct immunofluorescent test can be used as an alternative method to detect

*Cryptosporidium* sp. compared to PCR ( $p=0,065$ ), in particular for epidemiologic study or population screening. Evaluation on risk factors such as sex, malnutrition and diarrhea symptom appear that there is no significant differences.

**Key words:** *Cryptosporidium* sp., toddlers, FITC-CmAb, direct immunofluorescent

---



## L PENDAHULUAN

Kriptosporidiosis adalah penyakit parasitik yang disebabkan oleh *Cryptosporidium*, parasit protozoa oportunistik yang termasuk dalam filum Apicomplexa. *Cryptosporidium* sp. adalah parasit koksidia intraseluler pada manusia dan hewan dan merupakan agen yang menyebabkan enterokolitis.<sup>1</sup> Walaupun kriptosporidiosis pada awalnya dikenal sebagai zoonosis, ternyata *Cryptosporidium* sp. dapat menyebabkan penyakit gastrointestinal pada manusia, terutama anak-anak dan penderita imunodefisiensi.<sup>2-4</sup> Prevalensi kriptosporidiosis di negara berkembang diperkirakan berkisar 5-20%.<sup>5</sup> *Cryptosporidium* sp. lebih sering menginfeksi anak-anak. Beberapa laporan menyebutkan bahwa angka kejadian infeksi umumnya meningkat pada anak-anak dibandingkan orang dewasa dan juga lebih besar pada anak-anak yang tinggal di daerah perkotaan dari pada pedesaan.<sup>7</sup> Prevalensi tertinggi pada anak usia di bawah 5 tahun.<sup>1,5,6</sup> Perch dkk mendapatkan prevalensi terbanyak pada anak penderita diare di Afrika Barat yang berusia di bawah 3 tahun (batita) sebesar 7,7% dengan metode pemeriksaan modifikasi Ziehl Neelsen dan hal ini diperkirakan berhubungan erat dengan status imun.<sup>8,9,10</sup> Di Indonesia pun telah dilakukan penelitian tentang prevalensi kriptosporidiosis pada anak-anak. Katsumata et al pada tahun 1992-1993 mendapatkan prevalensi kriptosporidiosis sebesar 2,8% pada anak diare dan 1,4% pada anak tidak diare di Surabaya.<sup>11</sup> Sedangkan pada tahun 2006 di Jakarta, Soetomenggolo mendapatkan prevalensi sebesar 2,1% pada anak batita yang bermukim di bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu.<sup>12</sup> Rendahnya prevalensi yang didapatkan pada penelitian tersebut mungkin tidak sesuai dengan yang sebenarnya dikarenakan metode pemeriksaan yang kurang sensitif sedangkan jumlah ookista pada sampel terlalu sedikit.

Gejala klinis kriptosporidiosis sangat luas mulai dari asimtomatik sampai diare persisten. Diare yang timbul dapat menyerupai kolera dan menyebabkan kehilangan cairan 3-20 liter per hari sehingga dapat terjadi dehidrasi berat.<sup>3,10</sup> Walaupun penyakit ini dapat sembuh sendiri tetapi sebuah penelitian di Brazil seperti dikutip Pereira menyebutkan bahwa 13% anak yang terinfeksi *Cryptosporidium* sp. akan mengalami gejala yang berulang dalam 6 hari sampai 2,5 bulan setelah infeksi yang pertama.<sup>9</sup> Selain menyebabkan diare, infeksi ini juga menyebabkan malnutrisi. Hipotesis ini didukung oleh penelitian kohort dari 1064 anak-anak di Guinea-Bissau. Anak-anak yang

menderita kriptosporidiosis baik anak laki-laki dan perempuan rata-rata kehilangan 392 dan 294 gram dalam 180 hari.<sup>8</sup> Penelitian lain juga menemukan adanya pengaruh jangka panjang pada pertumbuhan anak dengan kriptosporidiosis. Sehingga diduga ada keterkaitan antara malnutrisi dengan kriptosporidiosis, baik dengan terhambatnya pertumbuhan anak atau infeksi *Cryptosporidium* dapat lebih parah pada anak-anak yang telah menderita malnutrisi.<sup>13</sup>

Diagnosis kriptosporidiosis pada prinsipnya adalah dengan menemukan ookista *Cryptosporidium* sp. secara mikroskopis pada sediaan feses yang dipulas. Beberapa teknik parasitologi untuk mengidentifikasi ookista *Cryptosporidium* sp., antara lain dengan teknik pewarnaan seperti pulasan tahan asam modifikasi Ziehl-Neelsen (mZN), pewarnaan dengan fluorokrom auramin fenol (AF), dan metode imunofluoresensi (IF).<sup>1</sup> Penggunaan metode konsentrasi ookista dalam sampel feses dapat meningkatkan sensitivitas dan rata-rata deteksi.<sup>14,15</sup>

Selama ini metode pulasan modifikasi tahan asam merupakan nilai baku emas bagi pemeriksaan *Cryptosporidium* sp. Namun, sensitivitas teknik ini rendah dan sangat bergantung pada ketrampilan serta pengalaman tenaga mikroskopis dalam melihat *Cryptosporidium* sp.<sup>12</sup>

Bila jumlah ookista yang dikeluarkan di tinja cukup banyak, maka deteksi ookista secara mikroskopik lebih mudah ditegakkan. Tetapi pada pasien yang memiliki sedikit ookista pada tinjanya, pada pemeriksaan mikroskopik dengan pulasan tahan asam dari tinja konsentrasi dapat memberikan hasil negatif.<sup>17,18</sup>

Sensitivitas akan meningkat bilamana dilakukan pemeriksaan lebih dari satu spesimen pada satu sampel dengan konsekuensi akan membutuhkan waktu lebih lama. Untuk itu diperlukan teknik pemeriksaan yang spesifik dan lebih sensitif serta efisien terhadap diagnosis primer kriptosporidiosis.<sup>2</sup> Semakin sensitif tes diagnosa yang digunakan, akan lebih mudah untuk mengidentifikasi infeksi yang berintensitas rendah.<sup>1,2,8</sup>

Rosyidah et al (2008) meneliti bahwa frekuensi infeksi *Cryptosporidium* sp. pada anak batita di Kp. Melayu dengan pewarnaan Auramin Fenol (AF) adalah 19,2%, jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil yang didapat oleh peneliti sebelumnya.<sup>19</sup> Tetapi untuk sampel tinja yang mengandung sedikit ookista, metode AF kurang spesifik, oleh karena itu harus dikonfirmasi dengan pemeriksaan imunofluoresensi yang bersifat genus spesifik.<sup>18,19</sup>

Deteksi ookista *Cryptosporidium* dengan antibodi monoklonal terhadap dinding ookista *Cryptosporidium* (CmAbs) merupakan metode yang spesifik dan sensitif untuk mendeteksi ookista dari apusan tinja dibandingkan metode pewarnaan konvensional. Banyak antibodi komersial yang telah dikembangkan untuk mendeteksi epitop ookista *Cryptosporidium* sp. Ketika paratop antibodi dalam FITC-C-mAbs berikatan dengan epitop permukaan ookista, fluoresensi yang tervisualisasi memperlihatkan diameter ookista sehingga mempermudah analisis morfometrik. Dengan mikroskop fluoresensi, ookista *Cryptosporidium* sp. yang berikatan dengan FITC-CmAb akan berwarna hijau apel (green apple) sehingga mudah diidentifikasi tanpa perlu perbesaran skala obyektif yang tinggi.<sup>1,2,10,15,16,20</sup>

Berdasarkan hal-hal tersebut, antibodi monoklonal diharapkan dapat menjadi metode alternatif karena mempunyai spesifisitas dan sensitifitas yang lebih besar, terutama bila pasien yang diperiksa dalam jumlah besar dan gejala yang sangat minimal. Laporan yang ada mengenai metode ini juga mengindikasikan bahwa angka kejadian yang dihasilkan akan lebih akurat. Metode menggunakan antibodi monoklonal ini juga dapat mengeliminasi adanya kemungkinan *false-positive* dan *false-negative* yang biasanya terjadi pada metode pewarnaan rutin, modifikasi tahan asam.<sup>1,2,10,17</sup>

Pengembangan teknik ini, terutama dengan teknik konsentrasi memungkinkan diagnosis kriptosporidiosis lebih akurat dan dapat dimanfaatkan tidak saja untuk diagnosis spesimen klinis tapi juga spesimen yang berasal di lingkungan dan untuk skrining pada kejadian epidemi.<sup>12</sup>

Pada penelitian ini, akan dilakukan deteksi kriptosporidiosis pada anak batita menggunakan teknik imunofluoresen menggunakan antibodi monoklonal terhadap *Cryptosporidium* sp. yang telah dilabel oleh FITC. Hasilnya akan dibandingkan dengan AF dalam hal sensitivitas pada diagnosis kriptosporidiosis, serta hubungannya dengan gejala klinis dan status imun.<sup>1</sup>

## 2. Metode Penelitian

**Bahan dan Cara Kerja.** Desain penelitian adalah *cross sectional* analitik observasional dengan jenis uji diagnostik.<sup>28</sup> Penelitian ini dilaksanakan di Departemen Parasitologi dan Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta, untuk pengerjaan sampel dan pemeriksaan hasil sediaan. Waktu penelitian adalah dari bulan Oktober 2008 sampai dengan Februari 2009. Sampel adalah tinja dari anak batita

(usia 0 – 35 bulan) yang tinggal di bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu. Sampel telah dikoleksi oleh peneliti sebelumnya pada bulan Januari – April 2006 yang disimpan dalam larutan pengawet kalium bikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) 2,5%,<sup>3,23</sup> pada suhu + 4°C. Cara pemilihan dilakukan berdasarkan peluang (*probability sampling*) yaitu jenis *systematic sampling*.<sup>28</sup> Besar sampel ditentukan dengan perhitungan statistik menggunakan rumus beda dua proporsi yang dependen.<sup>28</sup> Sampel yang diproses dan diperiksa sejumlah 239 sampel. Kontrol positif yang digunakan adalah tinja yang mengandung ookista *Cryptosporidium* sp., berasal dari CDC Atlanta, USA dan dari pasien HIV/ AIDS yang positif *Cryptosporidium* sp. Sampel tinja dikonsentrasi dengan teknik konsentrasi tinja yang digunakan adalah konsentrasi air-eter. Setelah itu, sampel dengan konsentrasi dibuat sediaan di atas kaca obyek lalu dilanjutkan dengan metode imunofluoresen.

## Teknik Imunofluoresen langsung<sup>12,21,23</sup>

Sampel tinja diambil 5 µl dengan mikropipet dan dioleskan merata pada sumur yang terdapat di kaca obyek. Dikeringkan pada suhu kamar lalu difiksasi dengan metanol dingin selama 5 menit. Tambahkan 50 µl monoklonal antibodi (mAb) anti-*Cryptosporidium* yang bekerja sebagai *dilution* di dalam sumur tiap slide. Letakkan slide yang telah disiapkan pada *humidity chamber* dan inkubasi dalam inkubator dengan suhu rata-rata 37° C selama 30 menit. Aspirasi kelebihan FITC-CmAb dari tepi tiap slide well. Tambahkan 50 µL dari 1:5000 DAPI dalam larutan PBS pada setiap sumur dan biarkan selama 2 menit pada suhu kamar. Aspirasi campuran 1:5000 DAPI dalam larutan PBS dari tiap sumur. Kemudian tambahkan 50 µL akunbides pada tiap sumur dan biarkan selama 1 menit pada suhu kamar. Tambahkan *mounting medium* tutup dengan cat kuku (clear nail varnish). Biarkan cat kuku kering pada suhu kamar. Simpan slide uji pada suhu kamar di dalam gelap hingga waktunya dilakukan untuk proses penghitungan (*enumeration*). Slide sediaan kontrol positif selalu disertakan setiap melakukan prosedur ini.

**Gambaran Hasil.** Ookista *Cryptosporidium* sp. dideteksi menggunakan mikroskop fluoresensi (Olympus BX-51, Japan) yang dilengkapi filter FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) dan DAPI dengan eksitasi 490 nm dan emisi 510 nm. Sediaan diperiksa pada seluruh lapang pandang dengan pembesaran 200x dan dikonfirmasi keberadaan ookista dengan pembesaran 400x. Ookista

*Cryptosporidium* sp. tampak berbentuk cincin (*ringshaped*) atau seperti donat berukuran 4-6  $\mu\text{m}$  yang berfluoresensi (hijau hingga kuning/*green apple*) terang dengan latar belakang gelap. Hasil positif jika ditemukan satu atau lebih ookista *Cryptosporidium* sp. pada seluruh lapang pandang.

**Penilaian Hasil Kerja.** Metode pemeriksaan imunofluoresen langsung dilakukan pada 239 sampel. Sampel dinilai secara kualitatif atau nominal dikotom (positif dan negatif). Ookista dihitung secara semi kuantitatif dengan skala sebagai berikut.<sup>15</sup>

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

Hasil uji/ pemeriksaan dalam bentuk penilaian kualitatif. Analisis komparatif menggunakan uji Mc Nemar (tabel 2x2) dengan nilai  $p < 0,05$  sebagai batas kemaknaan. Disertakan juga nilai koefisien kappa ( $K$ ) untuk menilai hasil. Dihitung sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan negatif dari total jumlah sampel yang diperiksa menggunakan rumus uji diagnostik.

Kategori	Jumlah total	<i>Cryptosporidium</i> sp. positif	% positif
<b>Umur</b>			
0-11 bulan	62 (25,9%)	11	4,7
12-23 bulan	70 (29,3%)	19	8,1
24-36 bulan	104 (43,5%)	28	11,8
<b>Jenis kelamin</b>			
Laki-laki	128 (53,6)	29	12,1
Perempuan	110 (46%)	29	12,1
<b>Gejala</b>			
Diare	50 (20,9%)	14	5,9
Tidak diare	187 (78,2%)	44	18,6
<b>Gizi</b>			
Baik	184 (77,3%)	48	20,2
Buruk	54 (22,7%)	10	4,2

Tabel 4.1. Karakteristik sampel

### 3. HASIL

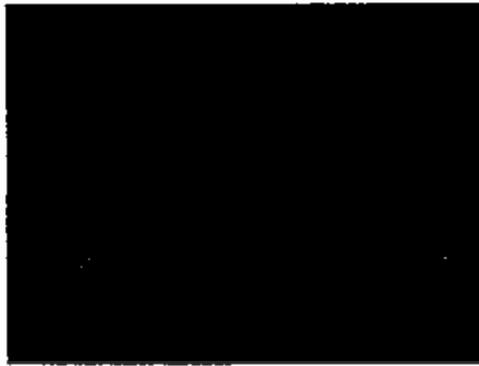
**Karakteristik Sampel.** Pada penelitian ini, peneliti mengambil sampel tinja anak-anak berumur di bawah tiga tahun dari populasi umum yang tinggal di pinggiran Kali Ciliwung sebanyak 239 sampel dari 486 sampel yang dikumpulkan. Dari sampel yang terpilih 25,9% berumur kurang dari 1 tahun, 29,3% berumur 1- kurang dari 2 tahun, dan 43,5% berumur 2-3 tahun. Sebagian besar berasal dari anak laki-laki (53,6%). Dari sampel yang positif kriptosporidiosis dengan pemeriksaan IFA,

didapatkan hanya 24,1% mengalami diare dan sebagian besar (11,8%) berumur antara 2-3 tahun. Dan frekuensi kejadian pada anak laki-laki dan perempuan sama.

**Hasil Pemeriksaan dengan Uji Imunofluoresen.** Deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dilakukan terhadap 239 sampel yang diseleksi secara random dari 486 sampel tinja anak berusia di bawah tiga tahun (balita). Pemeriksaan secara mikroskopis dengan metode pewarnaan imunofluoresen pada sampel tinja dengan konsentrasi, memberikan hasil sebagai berikut.

Hasil pada sediaan tinja konsentrasi dengan FITC: Latar belakang *slide* gelap; homogen. Lebih tipis, tampak sedikit spora jamur dan debris/kotoran yang membias cahaya fluoresens. Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitarnya jelas. Ookista berbentuk bulat seperti donat/cincin, berwarna kuning-kehijauan dan tampak berpendar terang (Gambar 4.1).

Hasil dengan pewarnaan Imunofluoresen pada Tinja dengan DAPI: Latar belakang *slide* biru gelap; tidak homogen. Lebih tebal, banyak spora jamur dan debris/kotoran yang membias cahaya fluoresens sehingga menyulitkan pemeriksaan. Kontras antara ookista *Cryptosporidium* sp. dengan sekitarnya jelas. Ookista berbentuk bulat seperti donat/cincin, berwarna biru dan tampak berpendar terang. Tampak 3 inti di dalam ookista (Gambar 4.2).



Gambar 4.1 Oookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan Imunofluoresen pada tinja Konsentrasi dilihat dengan FITC (pembesaran 400 x)



Gambar 4.2 Oookista *Cryptosporidium* sp. dengan Pewarnaan Imunofluoresen pada Tinja Konsentrasi dengan DAPI (pembesaran 400 x)

Hasil Pemeriksaan Sediaan. Hasil pemeriksaan dinyatakan positif bila ditemukan oookista *Cryptosporidium* sp dan dihitung jumlahnya pada setiap slide. Hasil pemeriksaan direct imunofluoresen pada sampel dibandingkan dengan pemeriksaan menggunakan pewarnaan modifikasi tahan asam dan auramin fenol terlihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.2 Perbandingan tiga metode pemeriksaan untuk diagnosis *Cryptosporidium* sp.

Metode	Sampel positif, n= 239	
	Jumlah	%
Modifikasi Tahan Asam*	9	3,7%
Auramin Fenol*	25	10,5%
Direct Immunofluoresence	58	24,3%

Berdasarkan penilaian jumlah oookista yang ditemukan dari metode IFA sebagian besar memberikan hasil negatif (Tabel 4.2.).

Tabel 4.3 Hasil penilaian semi kuantitatif dengan metode IFA

Penilaian semikuantitatif	IFA
0	181
+	38
++	20
+++	0

Pada pemeriksaan imunofluoresen didapatkan hasil 38 sampel positif satu dan 20 sampel positif dua.

Dengan penambahan DAPI, dapat terlihat adanya jumlah sporozoit di dalam oookista, sehingga dapat dihitung jumlah sporozoit yang terlihat. Dari hasil pemeriksaan tersebut ternyata diketahui bahwa sebagian besar (59,6%) oookista yang ditemukan tidak memiliki sporozoit lagi (kosong). Yang memiliki inti sporozoit satu sebanyak 22%, inti sporozoit dua sebanyak 15%, dan inti sporozoit tiga hanya 3,5%. Tidak ditemukan adanya oookista yang memiliki inti empat

Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan Konsentrasi dengan Metode MTA dan Imunofluoresen untuk Deteksi Oookista *Cryptosporidium* sp. Berdasarkan tabel 4.4 didapatkan bahwa pada sampel tinja konsentrasi dengan pewarnaan MTA dapat dideteksi 9 jumlah sampel positif *Cryptosporidium* sp., sedangkan pada sampel tinja konsentrasi dengan IFA terdapat 58 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p= 0,000$ ) dengan nilai *Kappa* = 0,186 (Lampiran 2), antara hasil pemeriksaan sampel tinja dengan MTA dan IFA. Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas metode MTA\* terhadap IFA:

Sensitivitas: 13,8 %

Spesifisitas: 99,4 %

Nilai Prediksi Positif (NPP): 88,8 %

Nilai Prediksi Negatif (NPN): 78,2 %

Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan Konsentrasi pada Metode AF dan IFA. Berdasarkan tabel 4.5 didapatkan bahwa pada sampel tinja konsentrasi dengan pewarnaan AF dapat dideteksi 25 jumlah

pada sampel tinja konsentrasi dengan metode IFA terdapat 58 sampel. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p= 0,000$ ) dengan nilai  $Kappa=0,478$ , antara hasil pemeriksaan sampel tinja dengan metode AF dan IFA. Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas metode AF\* konsentrasi terhadap IFA:

Sensitivitas: 39,6 %  
 Spesifisitas: 98,8 %  
 Nilai Prediksi Positif (NPP): 92 %  
 Nilai Prediksi Negatif (NPN): 83,6 %

**Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan Konsentrasi pada Metode IFA dan PCR.** Berdasarkan tabel 4.6 didapatkan

**Tabel 4.4. Perbandingan hasil pemeriksaan sampel tinja dengan konsentrasi pada metode MTA, dan Imunofluoresen**

		IFA		Total
		Positif	Negatif	
MTA	Positif	8	1	9
	Negatif	50	180	230
Total		58	181	239

**Tabel 4.5. Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan Konsentrasi pada Metode AF dan IFA**

		IFA		Total
		Positif	Negatif	
AF	Positif	23	2	25
	Negatif	35	179	214
Total		58	181	239

**Tabel 4.6. Perbandingan Hasil Pemeriksaan Sampel Tinja dengan Konsentrasi pada Metode IFA dan PCR**

		PCR		Total
		Positif	Negatif	
IFA	Positif	56	2	58
	Negatif	9	172	181
Total		65	174	239

**Hubungan antara status gizi dengan terjadinya infeksi *Cryptosporidium sp* pada batita.**

Berdasarkan tabel 4.7 didapatkan bahwa hanya terdapat 10 anak yang positif kriptosporidiosis yang memiliki gizi buruk. Sebagian besar anak yang terinfeksi *Cryptosporidium* memiliki status gizi baik. Pada penilaian odds ratio didapatkan nilai 1,55 dengan interval kepercayaan 95% sebesar 0,73-3,33 menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan bermakna.

bahwa pada sampel tinja konsentrasi dengan IFA dapat dideteksi 58 jumlah sampel positif *Cryptosporidium sp.*, sedangkan pada sampel dengan metode PCR terdapat 65 sampel positif. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p= 0,065$ ) dengan nilai  $Kappa=0,880$ , antara hasil pemeriksaan sampel tinja dengan metode IFA dan PCR. Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas metode IFA konsentrasi terhadap PCR\*\*:

Sensitivitas: 86,2 %  
 Spesifisitas: 98,9 %  
 Nilai Prediksi Positif (NPP): 96,6 %

Nilai Prediksi Negatif (NPN): 95 %

**Hubungan antara kejadian diare dengan terjadinya infeksi *Cryptosporidium sp* pada batita.** Berdasarkan tabel 4.7 didapatkan bahwa terdapat 15 anak yang terinfeksi *Cryptosporidium* mengalami gejala diare, sedangkan 43 anak tidak menderita gejala diare. Pada penilaian odds ratio didapatkan nilai 0,79 dengan interval kepercayaan 95% sebesar 0,39-1,60 menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan bermakna.

\* : sumber data dari penelitian Rudina Azimata R (2008)<sup>20</sup>

\*\* : sumber data dari penelitian Sri Wahyuni Dwintasari (2008)<sup>44</sup>

Tabel 4.7. Distribusi Karakteristik Batita *Cryptosporidium* sp. positif pada pemeriksaan IFA

Karakteristik	<i>Cryptosporidium</i> sp. positif	<i>Cryptosporidium</i> sp. negatif	OR*	IK95%**
Umur [bulan; (median, range)]	22 (1-36)			
<b>Umur</b>				
0-11 bulan	11	51		
12-23 bulan	19	51	-	
24-36 bulan	28	76		
<b>Jenis kelamin</b>				
Perempuan	29	81	1,22	0,67-2,21
Laki-laki	29	99		
<b>Gejala</b>				
Diare	14	36	0,79	0,39-1,60
Tidak diare	44	143		
<b>Gizi</b>				
Buruk	10	44	1,55	0,73-3,33
Baik	48	136		

\*OR = Odds Ratio

\*\*IK95% = Interval Kepercayaan 95%

#### 4. PEMBAHASAN

Peneliti mengambil sampel tinja anak-anak berumur di bawah tiga tahun dari populasi umum yang tinggal di pinggiran Kali Ciliwung sebanyak 239 sampel.

Pada penelitian ini, setiap metode pemeriksaan sediaan dilakukan di seluruh lapang pandang, hal ini dikarenakan kecilnya kemungkinan ookista yang akan didapatkan pada tinja anak batita atau individu imunokompeten dan tanpa gejala. Berbeda jika menggunakan sampel dari individu yang imunokompromis, kemungkinan mendapatkan ookista lebih besar karena rentan terinfeksi.

Berdasarkan hasil pemeriksaan dengan metode imunofluoresen menggunakan FITC-C-Mab terlihat ookista *Cryptosporidium* sp. berbentuk bulat seperti donat/cincin berwarna hijau terang sehingga mudah dideteksi pada latar belakang berwarna gelap/ hitam. Hal ini sama seperti yang didapatkan pada penelitian *Stibbs*,<sup>18</sup> ookista *Cryptosporidium* sp. dapat dibedakan dari sel ragi yang juga berwarna kuning kehijauan serta berukuran lebih besar dan tidak berpendar/berfluoresensi. Pemeriksaan akan lebih sulit jika sel ragi, debris dan sisa-sisa sel berjumlah banyak, sedangkan jumlah ookista sangat sedikit dalam tinja. Kotoran yang sangat banyak pada tinja dapat menyebabkan latar belakang terlalu berfluoresensi, sehingga pada saat optimasi menyulitkan pemeriksaan. Oleh karena itu, sebelum dilakukan pemeriksaan imunofluoresen langsung, terlebih dahulu sampel dikonsentrasi. Teknik konsentrasi

yang dilakukan dalam penelitian ini adalah cara sedimentasi, yaitu dengan air-eter. Pemilihan teknik ini didasarkan pada kebutuhan penelitian yang tidak hanya untuk pemeriksaan tinja secara mikroskopis, namun selanjutnya untuk uji tingkat molekuler dengan PCR. Penelitian Bukhari dan Smith (1995)<sup>30</sup> menunjukkan bahwa deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja lebih baik menggunakan konsentrasi air-eter dengan rata-rata ookista yang didapatkan sebanyak 46 – 75%, dibandingkan teknik flotasi densitas sukrosa (24 – 65%) dan flotasi zink sulfat (22 – 41%). Sehingga selain lebih ekonomis dan bermanfaat untuk deteksi di tingkat molekuler, akan mudah didapatkan ookista dalam jumlah banyak. Soetomenggolo dkk<sup>12</sup> sudah melakukan pemeriksaan tinja dengan pewarnaan tahan asam tanpa konsentrasi dan ternyata kurang memuaskan. Diharapkan dengan teknik konsentrasi, penelitian ini akan memberikan hasil lebih baik/akurat.

Pada penelitian ini menggunakan produk antibodi monoklonal terhadap dari Cellabs. Reagen antibodi monoklonal mencent yang telah dilabel fluoresein akan berikatan secara spesifik terhadap protein dinding sel ookista *Cryptosporidium* sp dari spesimen. Kit uji ini tidak memiliki reaksi silang dengan *Eimeria tenella*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas hominis*, *Isospora belli*, *Microsporidium* sp, *Pneumocystis carinii*, *Candida* sp, *Aspergillus* sp, *Listeria* sp, *Legionella* sp, *Erysipelothix* sp, *Escherichia* sp, *Lactobacillus* sp, *Sterptococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Bacillus* sp, *Clostridium* sp, *Brochotrix* sp dan *Carynebacterium* sp.

Pemeriksaan imunofluoresen ini kemudian dibandingkan dengan

pemeriksaan lain yaitu pewarnaan modifikasi tahan asam (Ziehl Neelsen) dan pewarnaan Auramin Fenol. Dengan teknik modifikasi tahan asam ditemukan 9 sampel (3,7%) positif, metode pewarnaan Auramin fenol menjadi 25 (10,5%), dan metode IFA memberikan hasil positif tertinggi 58 (24,3%) karena dapat mendeteksi ookista bahkan jika jumlah ookistanya rendah dalam sampel. Sedangkan dengan pemeriksaan MTA dan IFA, zat pewarna tidak seluruhnya mewarnai seluruh ookista yang ada sehingga sulit untuk dapat mendeteksi ookista pada infeksi ringan kriptosporidiosis dan asimtomatik.<sup>28</sup>

Hal ini juga terkait dengan kualitas apusan sedian yang baik dan alat (mikroskop) yang digunakan untuk memeriksa. Pemeriksaan menggunakan metode IFA adalah salah satu teknik alternatif karena proses pemeriksaan dengan cara ini lebih mudah. Sehingga sangat tepat digunakan untuk skrining cepat pada jumlah sampel yang besar, meskipun untuk melihat morfologi spesies kurang spesifik dibandingkan pewarnaan MTA. Namun, kelemahan ini dapat diantisipasi dengan melakukan studi pendahuluan dan mempelajari kontrol positif *Cryptosporidium* sp. yang dilabel FIT-C. Selain itu dengan prosedur penambahan DAPI pada sedian, dapat dilihat adanya inti sporozoit dalam ookista, sehingga memperkecil kemungkinan adanya positif palsu.

Selain itu, dilakukannya pengembangan metode imunofluoresen langsung dengan menambahkan DAPI juga untuk menilai viabilitas ookista yang terdeteksi berdasarkan ada atau tidaknya sporozoit dan atau isi granular. Le Chevallier et al menyimpulkan bahwa ookista yang terdeteksi pada konsentrasi air berpotensi viabel. Ookista yang viabel mengandung empat sporozoit. Pada pemeriksaan dengan filter DAPI ternyata tidak ada satupun ookista yang memiliki empat sporozoit. Sehingga disimpulkan bahwa ookista pada sampel positif sebagian besar sudah tidak intak lagi ketika dikeringkan pada slide mikroskop. Hal ini mungkin disebabkan karena sampel yang digunakan sudah lama disimpan.

Pada penelitian ini, sebagian besar ookista yang ditemukan tidak dapat terlihat lagi sporozoitnya, sedangkan ookista yang memiliki tiga sporozoit hanya 3,5%. Kelebihan penambahan DAPI lainnya adalah ookista *Cryptosporidium* dapat dengan mudah dideteksi hanya dengan pembesaran 400x dibandingkan dengan pemeriksaan

mikroskopik MTA dan AF yang memerlukan pembesaran 1000x.

Kemudahan mengenali inti sporozoit, memberikan keuntungan tambahan untuk identifikasi ookista sehingga tidak perlu dilakukan pemeriksaan menggunakan mikroskop DIC (*differential interference contrast*) untuk mengetahui struktur yang terdapat di dalam ookista. Terlebih lagi, adanya ookista yang rusak, dengan satu sampai empat inti sporozoit yang berfluoresen dalam berbagai ukuran dalam ookista akan membantu identifikasi.<sup>29</sup> Pada penelitian ini, DAPI sangat berguna untuk membantu determinasi adanya isi ookista pada slide mikroskop dari pada DIC. Bahkan jika ookista telah rusak, ditemukannya sampai empat inti positif dengan DAPI pada sampel dalam ookista dapat membantu identifikasi.

Pada penelitian ini, sejumlah 59,6% ookista dari seluruh ookista sampel positif yang ditemukan kosong (tidak terlihat adanya inti sporozoit). Kelompok ini mungkin menggambarkan ookista yang dalam fase transisi antara ookista yang mengandung satu sporozoit dan ookista kosong. Antibodi monoklonal spesifik terhadap dinding internal ookista dapat menambah nilai dalam membedakan ookista kosong dengan kontaminan yang memiliki ukuran dan bentuk sama dengan ookista *Cryptosporidium*.

Pengembangan metode deteksi fluoregenik menawarkan keakuratan dan ketelitian yang lebih baik bagi teknisi untuk menentukan ookista dengan fluoresen FITC (C-mAb), ookista yang bersporulasi dan otomatis menurunkan hasil yang false positif dan false negatif.

Penelitian Arrowood dkk melaporkan bahwa penggunaan reagen antibodi monoklonal fluoresen dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas dalam mendeteksi ookista *Cryptosporidium* dan akan sangat berguna untuk program skrining dalam studi epidemiologi.<sup>29</sup> Pada penelitian ini juga dibandingkan pemeriksaan IFA dengan pemeriksaan PCR dimana didapatkan hasil bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna di antara keduanya ( $p = 0,065$ , kappa 0,880 (*excellent agreement*)). Hasil ini menandakan bahwa pemeriksaan IFA dapat menjadi alternatif untuk mengatasi *false negative* dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang hampir sama, dimana sensitivitasnya 86,2% dan spesifisitasnya >98%, dengan NPP 96,6% dan NPN 95%. Tingginya NPP dan NPN pada metode pemeriksaan

menunjukkan adanya validitas yang cukup untuk memprediksi ada atau tidaknya penyakit pada sampel yang diteliti.

Ditemukannya perbedaan hasil positif dengan *gold standard* yaitu PCR mungkin karena teknik mikroskopis tidak dapat mendeteksi stadium selain ookista dari siklus hidup *Cryptosporidium* sp. sedangkan PCR memiliki kelebihan dapat mendeteksi berbagai stadium. Selain itu juga dari perbedaan jumlah konsentrasi sampel tinja yang digunakan, untuk teknik mikroskopis sebanyak 5 µl dan PCR 100 µl (1:20). Adanya hasil negatif palsu, umumnya dikarenakan faktor pembuatan sediaan, karena terlalu sedikit bahan yang diapus pada kaca obyek, bisa juga terlalu tipis atau justru terlalu tebal.

Dari total 239 sampel yang diperiksa, proporsi sampel positif *Cryptosporidium* sp. dengan pewarnaan MTA dengan konsentrasi 3,7%, AF dengan konsentrasi 10,5% dan IFA 24,3%. PCR sebagai baku emas dalam penelitian ini memiliki hasil sebanyak 32,3%. Dari keseluruhan teknik mikroskopis yang digunakan pada penelitian ini, hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. terendah didapatkan pada pewarnaan MTA konsentrasi yaitu sebesar 3,7%. Hal ini hampir sama dengan penelitian Morgan *et al.*<sup>24</sup> yang mendapatkan prevalensi 5,6% (29 dari 511 sampel tinja) dengan metode pewarnaan MTA. Sedangkan hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. tertinggi didapatkan pada metode pewarnaan IFA. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Rivera *et al.*<sup>24</sup> yang memeriksa sampel tinja yang dikonsentrasi dan menggunakan imunofluoresen untuk skrining pada pasien kanker tanpa gejala diare. Prevalensi yang didapatkan adalah 28,3% (15 dari 53 pasien).

IFA lebih sensitif untuk mendeteksi ookista pada sediaan tinja yang mengandung sangat sedikit ookista.<sup>27</sup> Jumlah ookista *Cryptosporidium* sp. yang sedikit akan lebih sulit dideteksi dengan pewarnaan MTA dan AF daripada IFA.<sup>22</sup> Hal ini disebabkan karena antibodi monoklonal terhadap protein dinding ookista *Cryptosporidium* sp dengan kekuatan afinitas dan aviditasnya berikatan secara spesifik pada epitopnya membentuk kompleks antigen antibodi sehingga kemungkinan untuk didapatkan hasil positif palsu atau negatif palsu sangat minimal. Oleh karena itu, IFA dapat digunakan sebagai alternatif dari MTA untuk diagnosis infeksi *Cryptosporidium* sp. Metode IFA dapat diterapkan pada laboratorium klinis yang telah memiliki mikroskop fluoresen

sebagai prosedur rutin yang dilakukan sehari-hari dan juga skrining karena lebih mudah dan efektif daripada pewarnaan konvensional.<sup>25</sup>

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa kriptosporidiosis merupakan penyakit parasitik yang umum terjadi pada populasi umum anak-anak di bawah tiga tahun sama dengan penelitian Tumwine JK dkk,<sup>32</sup> bahwa infeksi *Cryptosporidium* paling banyak terjadi pada anak-anak berusia 3-36 bulan. Selain itu pada analisis statistik, anak perempuan memiliki kemungkinan 1,22 kali lebih rentan dari pada anak laki-laki. Hal ini sesuai dengan penelitian Al-Hindi dkk<sup>36</sup> yang mendapatkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak perempuan (28/138 = 20,3%) lebih tinggi dari pada anak laki-laki (34/278 = 12,2%) dengan nilai  $p=0,03$ . Anak-anak yang terinfeksi tersebut ternyata sebagian besar tidak menampilkan gejala diare (75,9%). Hal ini didukung oleh penelitian penelitian Al-Hindi dkk<sup>36</sup> dimana prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak tanpa diare (56/280 = 20,0%) lebih tinggi dibandingkan anak diare (6/136 = 4,4%) dengan nilai  $p = 0,001$  dan Checkley dkk<sup>22</sup> dimana 63% anak-anak yang diskriking *Cryptosporidium* asimtomatik. Palit<sup>23</sup> menyatakan bahwa proporsi yang besar penderita kriptosporidiosis yang asimtomatik mungkin disebabkan karena fenomena "wash out" dimana adanya onset diare akut maka tingkat deteksi orang yang asimtomatik "vis a vis" akan meningkat. Cukup tingginya prevalensi kriptosporidiosis pada penelitian ini mungkin disebabkan karena sampel diambil dari daerah bantaran Kali Ciliwung, dimana sebagian besar status ekonominya rendah. Ditambah lagi dengan kondisi tempat tinggal yang kumuh dan padat, ketersediaan air bersih, dan ketiadaan fasilitas pembuangan sampah yang baik, intake makanan yang sudah terkontaminasi dan lain-lain.<sup>12,33,36</sup>

Anak-anak yang positif kriptosporidiosis pada penelitian ternyata diketahui tidak ada hubungan dengan status gizi dan gejala diare. Hal ini sesuai dengan penelitian Adjei<sup>7</sup> dan Goncalves<sup>35</sup> yang menyatakan bahwa tidak ada hubungan antara gejala klinis diare dengan kejadian kriptosporidiosis. Penelitian Tumwine<sup>32</sup> juga melaporkan bahwa tidak ada hubungan yang signifikan antara malnutrisi dengan kriptosporidiosis.

Hal ini menandakan bahwa sangat sulit mendiagnosis kriptosporidiosis berdasarkan atas gejala klinis dan pemeriksaan fisik saja. Dengan semakin meningkatnya frekuensi

kejadian kriptosporidiosis pada anak batita di daerah perkotaan khususnya di daerah kumuh dan bantaran sungai, oleh karena itu perlu ditunjang oleh pemeriksaan tinja yang cukup sensitif dan spesifik untuk menegakkan diagnosis penyakit parasitik ini. Untuk keperluan epidemiologi dan skrining pemeriksaan IFA cukup menjanjikan untuk menggantikan pemeriksaan konvensional. Terlebih jika laboratorium telah dilengkapi oleh mikroskop fluoresen.

### 5. Kesimpulan

Frekuensi kriptosporidiosis pada anak di bawah tiga tahun di bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu pada sedian tinja konsentrat dengan teknik imunofluoresen menggunakan FITC-CmAb yang didapatkan dari penelitian ini sebesar 24,3%. Metode pemeriksaan imunofluoresen langsung (direct immunofluorescent test) lebih sensitif dan spesifik daripada MTA dan AF dalam deteksi oocista *Cryptosporidium* sp. Pada penelitian ini ternyata ditemukan bahwa tidak terdapat hubungan antara status gizi dan diare dengan kejadian infeksi *Cryptosporidium* sp pada batita yang tinggal di bantaran sungai Ciliwung. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan sampel yang lebih besar dan jangka waktu penelitian yang lebih lama agar didapatkan jumlah kasus yang lebih banyak dan dapat menentukan hubungan faktor-faktor yang mungkin mempengaruhi prevalensi kriptosporidiosis.

### Daftar Acuan

- Campbell DM, Flanagan PA. Laboratory examination for *Cryptosporidium* spp. in Scotland. *J Clin Pathol.* 1992;45:914-6.
- MacPershon DW, McQueen R. Kriptosporidiosis: multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):198-202.
- A. Clinton White Jr. Kriptosporidiosis: In principles and practice of infectious diseases. In G Mandell, J Bennet, R Dolin editors. 6<sup>th</sup> ed. Elsevier, Amsterdam. 2005. p. 3215-8.
- Roy SL, DeLong SM, Stenzel SA. Risk factor for sporadic kriptosporidiosis among immunocompetent persons in the united states from 1999 to 2001. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):2944-51.
- Hlavsa MC, Watson JC, Beach MJ. Kriptosporidiosis surveillance – United States 1999-2002: Diunduh dari: <http://www/cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5401a1.htm>. 24 Desember 2006.
- Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 2002;15(1):145-54.
- Adjei AA, Armah H, Rodrigues O, Renner L, Borketey P, Ayeah-Kumi P, et al. *Cryptosporidium* Spp., a frequent cause of diarrhea among children at the Korle-Bu teaching hospital, Accra, Ghana. *Jpn J Infect Dis.* 2004;57:216-9.
- Perch M, Sodemann M, Jakobsen MS, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Fischer TK, dkk. Seven years experience with *Cryptosporidium parvum* in Guinea-Bissau, West Africa. *Ann Trop Paediatr.* 2001;21:313-8.
- Percira MGC, Atwill ER, Barbosa AP, Silva SAE, Zapata MTAG. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiania, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):787-93.
- Goodgame, R.W. Understanding intestinal spore-forming protozoa: Cryptosporidia, Microsporidia, Isospora, and Cyclospora. 1996; 124(4): 429-41. Diunduh dari: <http://www.annals.org/cgi/content/full/124/4/429>. 23 Desember 2006.
- Katsumata T, Hosea D, Wasito EB, Kohno S, Hara K, Socparto P, dkk. Kriptosporidiosis in Indonesia: a hospital-based study and a community-based survey. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:628-32.
- Soetomenggolo HA, Firmansyah A, Kurniawan A, Pujiastuti P. Kriptosporidiosis pada anak usia dibawah tiga tahun di daerah bantaran sungai Ciliwung kelurahan Kampung Melayu. *Paediatr Indones* 2008;48(2):99-102.
- Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and Clinical Features of *Cryptosporidium* Infection in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002 Jan;15(1):145-54.
- Weber R, Bryan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocyst in fecal specimens. *Apl Environ Microbiol.* 1992;30(11):2869-73.
- OIE (Office International des Epicooties). Kriptosporidiosis in manual of standards for laboratory test and vaccines. 5<sup>th</sup> edition. Paris. 2004.

- Diunduh dari:  
<http://www.oci.int/eng/normes/enrmanual.htm>, 23 Desember 2006.
16. Uga S, Rai SK, Kimura K, Rai G, Kimura D, Wakasugi M. Parasites detected from diarrheal stool samples collected in Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2004;35(1):19-23.
  17. Smith HV. Diagnosis of human and livestock kriptosporidiosis. In Fayer R, Xiao L editors dalam *Cryptosporidium* and kriptosporidiosis. 2<sup>nd</sup> ed. London: CRC press; 2007.p.173-203.
  18. Stibbs HH, Ongerth JE. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *J Clin Microbiol*. 1986;24(4):517-21.
  19. Rosyidah RA Kurniawan A, Endardjo S. Perbandingan deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. pada sampel tinja dengan metode pewarnaan modifikasi tahan asam dan auramin fenol. Jakarta: Universitas Indonesia, 2008. Tesis.
  20. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RC. Comparison of PCR and microscopy for detection to *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol* 1998;36:995-8.
  21. Xiao L, Cama V. *Cryptosporidium* and kriptosporidiosis (Chapter 4) dalam *Cryptosporidium* and kriptosporidiosis. Fayer R, Xiao L editor. 2<sup>nd</sup> ed. London: CRC press; 2007.p.57-108.
  22. Checkley W, Gilman RH, Epstein LD, Suarez M, Diaz JF, Cabrera L, et al. Asymptomatic and symptomatic kriptosporidiosis: their acute effect on weight gain in Peruvian children. *American Journal of Epidemiology*. 1997;145(2):156-63.
  23. Ghani, Lannywati. Faktor-faktor risiko diare persisten pada anak balita.. Badan Litbangkes Depkes RI. *J Kedokter Trisakti*. 2001.
  24. McPhee, S.J., Lingappa, V.R., Ganong, W.F., Lange, J.D. Pathophysiology of disease. An introduction to clinical medicine. Third edition. International edition. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2000.
  25. Rasad R, Adjung SA, Rukmono B, Sunoto, Suharyono. *Cryptosporidium* infection in children with diarrhea. 25 th Annual Scientific Seminar, Research priorities for Trop Med in the 90's. (Makalah ini telah dikemukakan dalam: "25<sup>th</sup> Silver Jubilee Seminar of the Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine 23 rd – 25 th February 1989").
  26. Arrowood, M. J., and Sterling, C. R., 1989, Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection, *J. Clin.Microbiol*. 27:1490–1495.
  27. Johnston, S. P., Ballard, M. M., Beach, M. J., Causser, L., and Wilkins, P. P., 2003, Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens, *J. Clin. Microbiol*. 41:623–626.
  28. Sastroasmoro S, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis edisi 2. Jakarta. CV Sagung Seto. 2006.
  29. Dwintasari SW. Pengembangan metode PCR untuk deteksi gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada feses yang disimpan dalam larutan kalium bikromat. [tesis]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2008.
  30. Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. 1995;33(10):2592-5.
  31. Smith HV, Campbell BM, Paton CA, Nichols AB. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in water concentrates determined by using 4',6'-diamidino-2-phenylindole and immunofluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(10):5198-201.
  32. Tunwine JK, Kekitunwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Rich SM, Widmer G, et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago hospital, Kampala, Uganda. *Am J Med Hyg*. 2003;68(6):710-15.
  33. Palit A, Sur D, MitraDhar K, Saha MR. Asymptomatic Kriptosporidiosis in periurban slum setting in Kolkata, India – a pilot study. *Jpn J Infect*. 2005;58:110-11.
  34. Leach CT, Koo FC, Kuhl TL, Hilsenbeck SG, Jenson HB. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in children along the Texas-Mexico border and associated risk factors. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62(5):656-61.
  35. Goncalves EMN, da Silva AJ, Eduardo MBP, Uemura H, Moura INS, Castilho VLP, Corbett CEP. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a

- day care unit in Sao Paulo. *Clinics*. 2006;61(2):119-26.
36. Al-Hindi AI, Abdelraouf A, Elmanama AA, Elnabris KJA. Cryptosporidiosis among children attending Al-Nasser Pediatric Hospital, Gaza, Palestine. *Turk J Med Sci* 2007; 37 (6): 367-72.

