

**PENGEMBANGAN METODE PCR UNTUK DETEKSI GEN
18S rRNA *Cryptosporidium* sp. PADA FESES YANG DISIMPAN
DALAM LARUTAN KALIUM BIKROMAT**

T E S I S

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

**SRI WAHYUNI DWINTASARI
6105012097**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN BOKIMIA DAN BIOLOGI MOLEKULAR
JAKARTA
DESEMBER 2008**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Sri Wahyuni Dwintasari

NPM : 6105012097

Tanda tangan :



Tanggal : 2 Desember 2008


HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Sri Wahyuni Dwintasari
NPM : 6105012097
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Pengembangan Metode PCR untuk Deteksi Gen 18S
rRNA *Cryptosporidium* sp. pada Feses yang
Disimpan dalam Larutan Kalium Bikromat

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

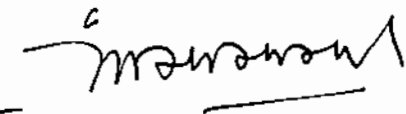
Pembimbing II : dr Agnes Kurniawan, PhD, SpParK ()

Penguji I : dr Ani Retno Prijanti, MS ()

Penguji II : Drs Yurnadi, MKes ()

Penguji III : dr Lisawati Susanto, MS, SpParK ()

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 2 Desember 2008
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



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

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT, karena hanya dengan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan ini. Tesis ini dilaksanakan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Program Magister Ilmu Biomedik dalam Tesis yang berjudul Pengembangan Metode PCR untuk Deteksi Gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada Feses yang Disimpan dalam Larutan Kalium Bikromat.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang setulusnya atas segala bentuk bantuan, baik berupa gagasan, bimbingan maupun koreksi karena berkat bantuan beliau baik berupa materi maupun dukungannya, saya bisa menyelesaikan tesis ini terutama kepada:

1. Dr.dr.Ratna Sitompul, Sp.M (K) sebagai dekan FKUI dan Prof.dr.Menaldi Rasmin,Sp.P (K), FCCP sebagai Dekan periode 2004-2008 yang menerima saya sebagai mahasiswa biomedik .
2. Dr.rer.physiol.dr.Septelia Inawati W sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan pembimbing pertama, yang telah memberikan pengarahan selama penulis menjalankan pendidikan.
3. dr.Sri Widia A Jusman,MS sebagai Kepala Departemen Biokimia dan Biologi Molekular FKUI dan Prof.dr.Saleha Sungkar,MS,DAP&E,SpParK sebagai Kepala Departemen Parasitologi FKUI.
4. dr.Agnes Kurniawan,Ph.D,Sp.ParK sebagai dosen pembimbing dalam tesis. Terima kasih atas semua saran, bimbingan dan dukungan yang diberikan selama penulis mengerjakan tesis.
5. dr Ani Retno Prijanti, MS sebagai ketua kekhususan Biokimia dan Biologi Molekular FKUI
6. British Council, proyek penelitian DelpHE 73.
7. Prof. Huw V. Smith dari SPDL, Glassgow. Terima kasih atas bimbingan teori dan pemberian sampel cetakan DNA *Cryptosporidium*.
8. Dr Herbowo A.Soetomenggolo,SpA. Atas penggunaan sampelnya.
9. Seluruh staf pengajar dan karyawan di Departemen Parasitologi, di Departemen Biokimia dan Biologi Molekular dan karyawan PMIB FKUI

10. Alm papa Syaiful D,SH dan mama Kasmawarti,BA yang kusayangi sebagai orang tua yang begitu besar perannya dalam mendidik dan membimbing semenjak kecil.
11. Kakakku tercinta, Dessi Febriyanti, S.Si.,S.ST,MA yang sangat berperan dalam dukungan moril maupun materiil.
12. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan namanya satu persatu. Dan semua guru yang telah mendidik semenjak kecil hingga sekarang. Serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Semoga semua pihak yang telah memberikan kebaikan kepada penulis akan senantiasa mendapat balasan dari Allah SWT. Dengan rendah hati penulis menyadari bahwa tidak ada karya yang sempurna selain Maha Karya-Nya. Oleh karena itu kepada segenap pembaca karya kecil ini, penulis menghaturkan penghargaan dan ucapan terima kasih serta tidak menutup mata untuk koreksinya.

Jakarta, 2 Desember 2008

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

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

Nama : Sri Wahyuni Dwintasari
NPM : 6105012097
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Biokimia dan Biologi Molekular
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

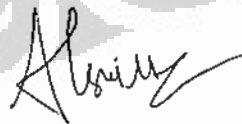
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengembangan Metode PCR untuk Deteksi Gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada Feses yang Disimpan dalam Larutan Kalium Bikromat

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia / format-kan, 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 : 2 Desember 2008
Yang menyatakan



(Sri Wahyuni Dwintasari)

ABSTRAK

Latar Belakang: Metode PCR dapat digunakan untuk mengidentifikasi DNA suatu organisme. Identifikasi gen 18S rRNA sudah banyak dipakai untuk mempelajari sejumlah organisme eukariot seperti tanaman, hewan dan protozoa termasuk *Cryptosporidium* sp. Penelitian terdahulu pada anak batita di daerah kumuh dan rawan banjir di Jakarta yang dideteksi secara mikroskopis dengan pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA), didapatkan prevalensi 2,1% yang rendah dibandingkan negara berkembang lain yang keadaan lingkungan dan populasinya mirip Indonesia. Deteksi *Cryptosporidium* sp. secara molekular di feses dengan PCR memungkinkan diagnosis lebih akurat dan cepat.

Tujuan: mengembangkan metode PCR untuk deteksi gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada feses yang disimpan dalam larutan kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan.

Metode: sejumlah 188 sampel feses yang disimpan dalam larutan kalium bikromat dikonsentrasikan dengan teknik air-eter, selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA terhadap konsentrat dan sebagian lagi dipulas dengan MTA. Amplifikasi DNA *Cryptosporidium* terhadap gen 18S rRNA dilakukan dengan program PCR langsung, siklus 39 kali.

Hasil: pemeriksaan dengan metode MTA konsentrasi didapatkan sembilan sampel positif (4,8%) sedangkan dengan PCR didapatkan 65 sampel positif (34,6%).

Kesimpulan: Larutan kalium bikromat dapat dipakai untuk penyimpanan ookista *Cryptosporidium* sp. tanpa mempengaruhi hasil PCR maupun mikroskopis.

Kata kunci: diagnosis molekular, modifikasi tahan asam, teknik air-eter.

ABSTRACT

Background: PCR method can be used to characterize an organism DNA. Identification of 18S rRNA gene has been widely used to study eukaryotes like plants, animals and protozoa such as *Cryptosporidium* sp. Previous study on *Cryptosporidium* sp. in children under three years old in a slum area in Jakarta, detected by direct modified acid fast (MAF) showed 2.1% prevalence, which was unexpectedly much lower than other developing country with similar environment and study population. Detection of *Cryptosporidium* sp. by molecular technique, PCR will offer more accurate and efficient diagnosis.

Objective: develop PCR method to detect *Cryptosporidium* sp. 18S rRNA gene of stool from stools preserved in potassium dichromate solution for 13 months.

Methods: There were 188 stool samples which have been kept in 2.5% potassium dichromate for 13 months. These samples were concentrated by water-ether technique, extracted the DNA and stained by MAF. Amplification of *Cryptosporidium* sp. 18S rRNA gene was using direct PCR for 39 cycles.

Result: of samples with MAF has found 9 positive (4,8%) and samples with PCR has presented 65 positive (34,6%).

Conclusion: Potassium dichromate solution can be used to preserve oocysts of *Cryptosporidium* sp since it does not interfere the PCR and microscopic examination result.

Keywords: molecular diagnosis, modified acid fast, water-ether technique

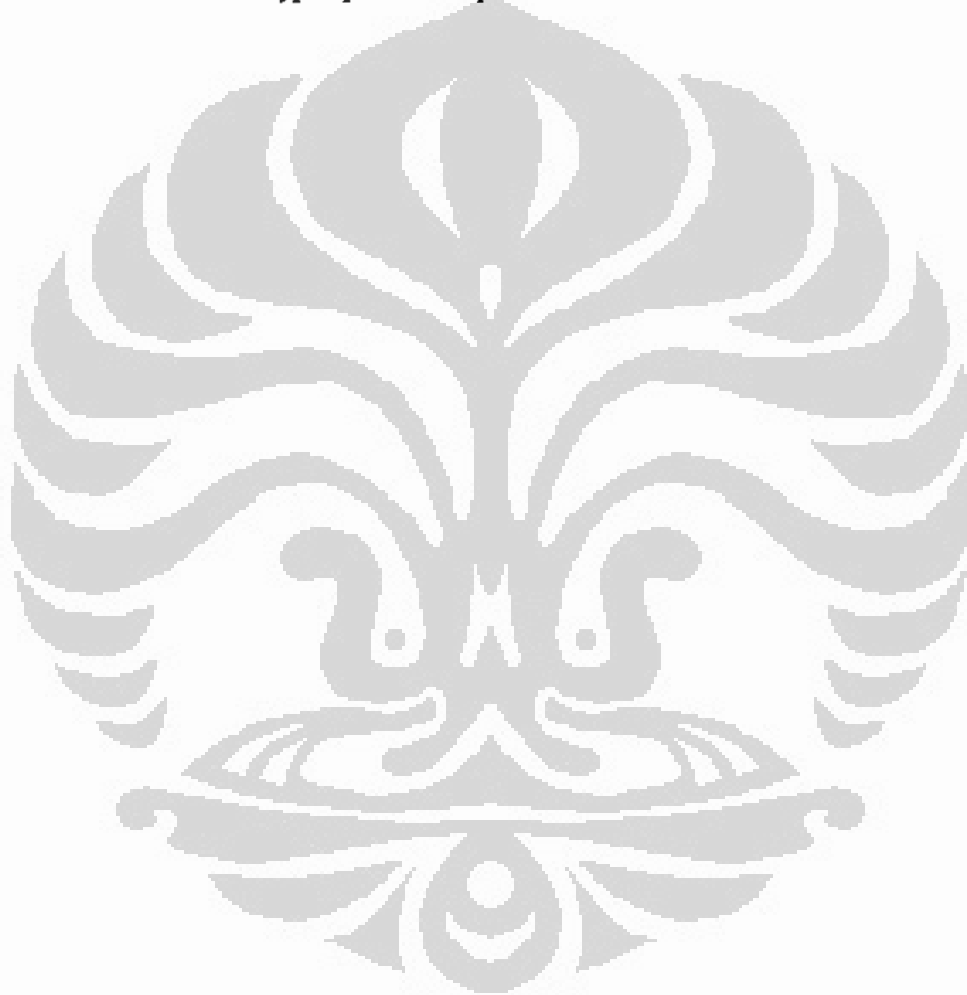
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN 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
DAFTAR LAMBANG.....	xv
1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Pertanyaan Penelitian.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Manfaat.....	4
2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	5
2.1.1 Komponen Reaksi PCR.....	6
2.1.2 Siklus PCR.....	7
2.2 Gen 18S rRNA.....	7
2.3 <i>Cryptosporidium</i> sp.	11
2.3.1 Klasifikasi.....	11
2.3.2 Siklus Hidup.....	13
2.3.3 Gejala Klinis.....	13
2.3.4 Epidemiologi.....	15
2.4 <i>Diagnosis Cryptosporidium</i> sp.	17
2.4.1 Metode Pewarnaan.....	17
2.4.2 Metode Imunologi.....	18
2.4.3 Metode PCR.....	18
METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Desain Penelitian.....	21
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
3.3 Sampel dan Perhitungan Jumlah Sampel.....	21
3.3.1 Sampel.....	21
3.3.2 Perhitungan Jumlah Sampel.....	21
3.4 Alat dan Bahan.....	22
3.4.1 Alat.....	22

3.4.2	Bahan	22
3.5	Cara Kerja.....	23
3.5.1	Konsentrasi Feses	23
3.5.2	Deteksi Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp dari Feses Konsentrat....	23
3.5.3	Ekstraksi DNA.....	23
3.5.4	Elektroforesis Hasil Ekstraksi	24
3.5.5	Pengukuran Serapan DNA	24
3.5.6	PCR Gen 18S rRNA <i>Cryptosporidium</i> sp	24
3.5.7	Elektroforesis Hasil PCR.....	25
3.6	Alur Penelitian.....	26
3.7	Analisis Data	26
4	HASIL PENELITIAN.....	27
4.1	Konsentrasi Feses dan Deteksi Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp.	27
4.2	Ekstraksi DNA	28
4.3	PCR Gen 18S rRNA <i>Cryptosporidium</i> sp.	29
4.3.1	Optimasi Kondisi PCR	29
4.3.2	Deteksi <i>Cryptosporidium</i> sp dengan Metode MTA dan PCR	31
5	PEMBAHASAN.....	32
6	KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
	DAFTAR REFERENSI	38
	LAMPIRAN.....	43
	RIWAYAT HIDUP.....	47
	DRAFT ARTIKEL.....	

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1:	Ukuran Monomer Ribosom pada Eukariot dan Prokariot.....	9
Tabel 2.2:	Perbedaan Ukuran Ookista, Hospes dan Tempat Infeksi <i>Cryptosporidium</i>	12
Tabel 4.1:	Perbandingan Metode PCR dan MTA untuk Deteksi <i>Cryptosporidium</i> sp.	31

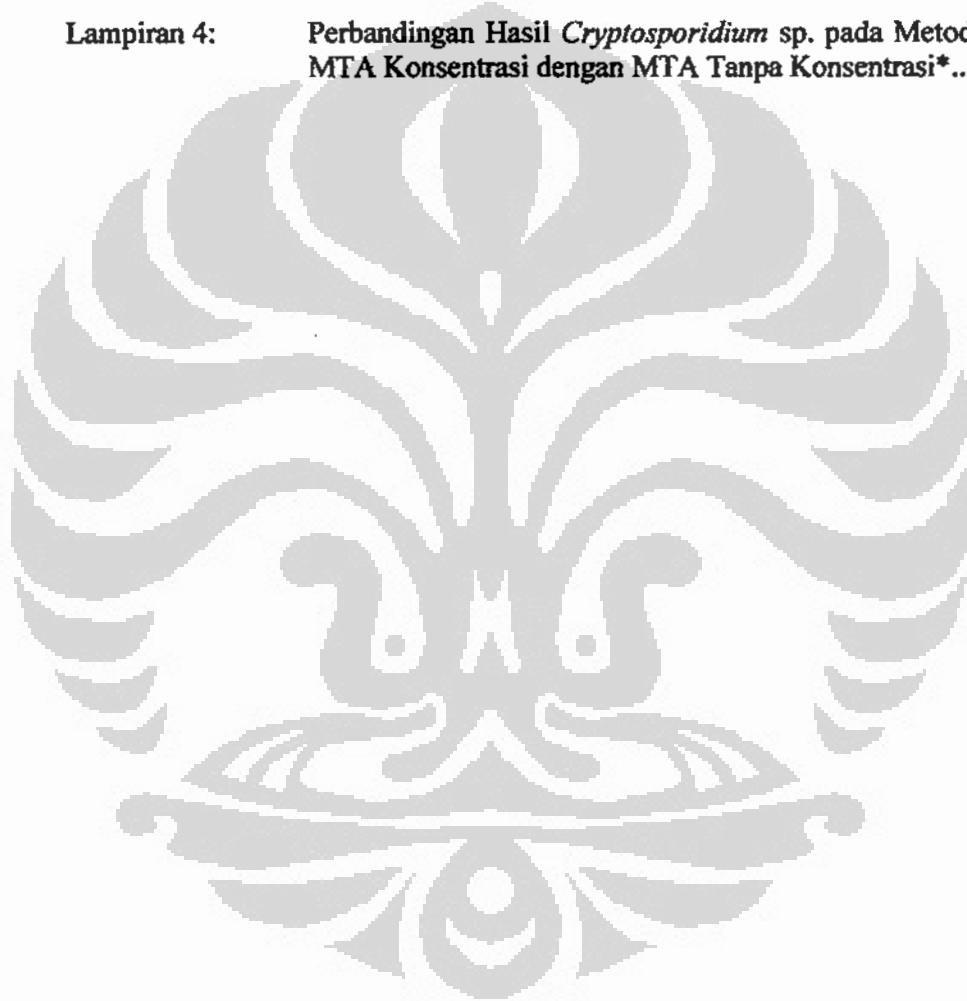


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1:	Reaksi PCR.....	7
Gambar 2.2:	Struktur Ribosom pada Eukariot	8
Gambar 2.3:	Struktur Sekunder gen 18S r RNA.....	11
Gambar 2.4:	Siklus Hidup <i>Cryptosporidium parvum</i>	14
Gambar 4.1:	Ookista <i>Cryptosporidium sp</i> dari Feses Penderita Kriptosporidiosis Dipulas dengan Metode MTA Pembesaran 10×40.....	27
Gambar 4.2:	Hasil Elektroforesis Ekstraksi DNA <i>Cryptosporidium sp.</i> dari Feses Kontrol Positif Penderita Kriptosporidiosis.....	28
Gambar 4.3:	Hasil Elektroforesis PCR DNA <i>Cryptosporidium sp.</i> pada Kontrol Positif 1 dan 2.....	29
Gambar 4.4:	Hasil Elektroforesis PCR DNA <i>Cryptosporidium sp.</i> pada Kontrol Positif 1 dan 2 dengan Perbedaan Konsentrasi Cetakan DNA.....	30
Gambar 4.5:	Hasil Elektroforesis PCR DNA <i>Cryptosporidium sp.</i> pada Kontrol Positif 1 dan 2 dengan Pengenceran Cetakan DNA.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

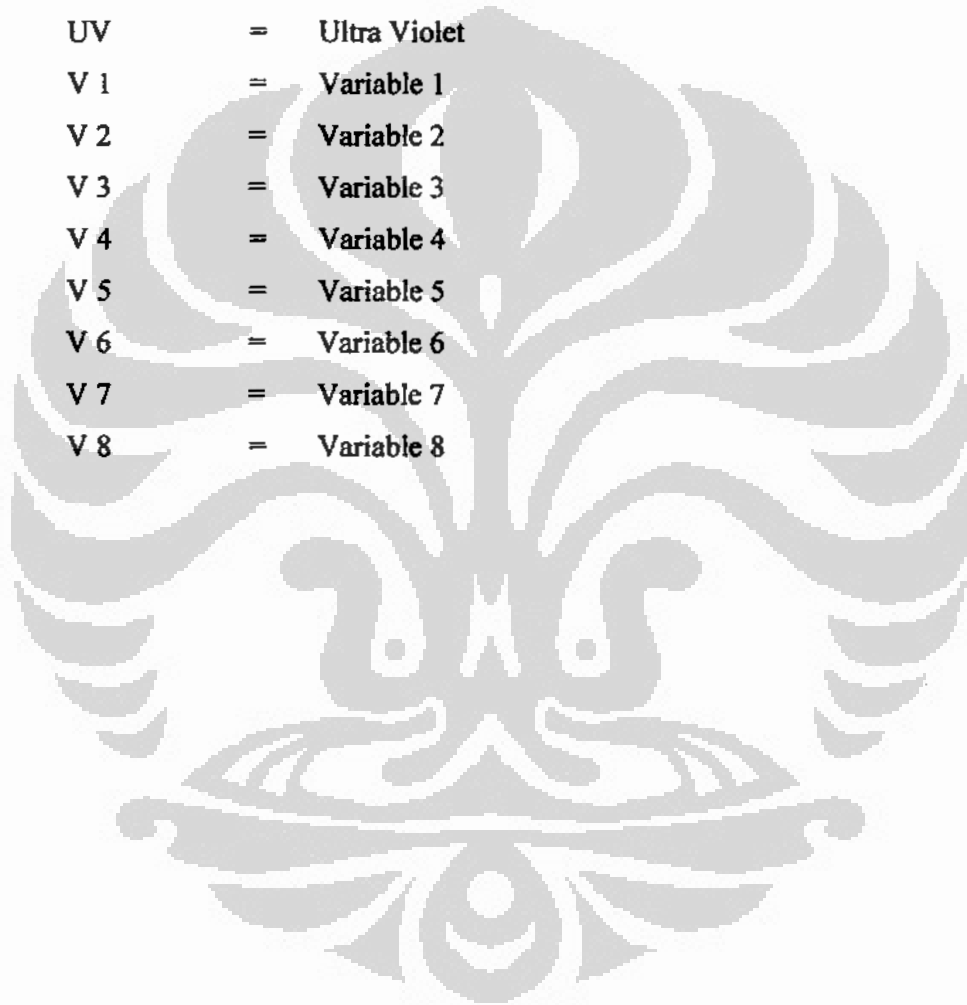
Lampiran 1:	Komposisi Dan Cara Pembuatan Larutan.....	43
Lampiran 2:	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada metode PCR dengan MTA Konsentrasi	44
Lampiran 3:	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada metode PCR dengan MTA Tanpa Konsentrasi *	45
Lampiran 4:	Perbandingan Hasil <i>Cryptosporidium</i> sp. pada Metode MTA Konsentrasi dengan MTA Tanpa Konsentrasi*....	46



DAFTAR SINGKATAN

Batita	=	bawah tiga tahun
BSA	=	Bovine Serum Albumin
CDC	=	Centre for Diseases Control
COWP	=	Cryptosporidium oocyst wall protein
ddH ₂ O	=	double distilled Hydrogen oxide
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
dATP	=	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	Deoxythymidine triphosphate
EDTA	=	Ethylene diamine tetra acetic Acid
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
H ₂ O	=	Hydrogen oxide
HCl	=	Hydro chloric
IFA	=	Immuno Fluorescence Assay
LB	=	Lysis Buffer
Mr	=	Molekul relatif
MTA	=	Modifikasi Tahan Asam
m RNA	=	Messenger Ribonucleic acid
M 1	=	mammalia 1
M 2	=	mammalia 2
NaCl	=	Natrium Chloride
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
rRNA	=	Ribosomal Ribonucleic acid
RNA	=	Ribonucleic acid
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymerase
SDS	=	Sodium dodecyl sulfat

sp	=	species
SPDL UK	=	Scottish Parasite Diagnostic Laboratory United Kingdom
sn RNA	=	Small nuclear Ribonucleic acid
SSU	=	small subunit
Taq	=	Thermus aquaticus
TBE	=	Tris base Boric acid EDTA
Tm	=	temperature melting
t RNA	=	transfer Ribonucleic acid
UV	=	Ultra Violet
V 1	=	Variable 1
V 2	=	Variable 2
V 3	=	Variable 3
V 4	=	Variable 4
V 5	=	Variable 5
V 6	=	Variable 6
V 7	=	Variable 7
V 8	=	Variable 8



DAFTAR LAMBANG

%	≈	persen
μl	=	microliter
°C	=	degree Celcius
G	=	gravitasi
pb	=	pasangan basa
pH	=	power of hydrogen
ml	=	mililiter
mg	=	miligram
mM	=	milimolar
nm	=	nanometer
S	=	Svedberg
U	=	unit
μl	=	microliter
μg	=	microgram
μM	=	micromolar
kb	=	kilobasa
V	=	Voltase

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Deoxyribosa nucleic acid (DNA) dapat diisolasi dari semua bahan biologis / klinik seperti darah, semen, rambut, tulang, feses, sputum dan lain-lain. Bahan yang paling sering digunakan untuk tujuan isolasi DNA adalah darah dan rambut, karena kedua bahan tersebut relatif mudah diperoleh. DNA yang diisolasi dapat digunakan untuk identifikasi DNA suatu organisme dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).¹

Metode PCR pertama kali ditemukan oleh Mullis pada tahun 1985. Metode ini dikembangkan oleh Departemen Genetika Manusia Cetus Corporation California yang mengamplifikasi DNA beta globin manusia untuk diagnosis prenatal kelainan genetik anemia sel sabit.² Tahapan pengerjaan PCR secara umum yaitu isolasi DNA/RNA, pemeriksaan isolat DNA/RNA secara spektrofotometri dan elektroforesis agarosa, pencampuran komponen reaksi PCR, pemrograman mesin PCR, amplifikasi reaksi, dan evaluasi hasil reaksi.³ Pada metode PCR, DNA yang diamplifikasikan tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu, dalam jumlah yang sedikit akan terdegradasi sehingga sebagian DNA akan rusak, namun tetap dapat digunakan sebagai cetakan DNA.⁴

Karakteristik ribosomal RNA (rRNA) sangat penting di dalam dunia kedokteran dan evolusi.⁵ Di dunia kedokteran rRNA merupakan target bagi antibiotik⁶ sedangkan pada evolusi, rRNA dapat digunakan untuk identifikasi taksonomi suatu organisme, menghitung kedekatan hubungan dengan grup lain dan memperkirakan tingkat divergensi suatu spesies.⁷ rRNA terdapat pada semua organisme baik prokariot maupun eukariot. rRNA terdiri atas gen subunit besar dan subunit kecil.⁸ Penamaan subunit besar dan subunit kecil pada ribosom berdasarkan koefisien sedimentasi *Svedberg* dengan lambang S.^{5,6,8}

Gen 18S rRNA berada di dalam ribosom subunit kecil sitosol eukariot.^{5,6,8} Pemilihan gen 18S rRNA adalah untuk tujuan identifikasi karena secara fungsional dan evolusioner memiliki sifat homolog dari berbagai eukariot yang berbeda.⁹ Jumlah gen 18S rRNA sekitar 1900 nukleotida dan mempunyai sekuen

secara mikroskopis yang dipulas dengan pewarnaan¹⁸⁻²² Perwarnaan modifikasi tahan asam (MTA) merupakan metode mikroskopis untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. yang umum dipakai oleh berbagai laboratorium di dunia, termasuk Indonesia.²³

Prevalensi pada penelitian pendahuluan terhadap anak berumur bawah tiga tahun (batita) yang bertempat tinggal di daerah kumuh dan rawan banjir di Jakarta rendah yaitu 2,1% (10/486).²⁴ Hal ini cukup mengherankan karena dibandingkan dengan negara berkembang lainnya yang keadaan lingkungan dan populasi mirip Indonesia, prevalensi yang didapatkan diatas 10%.^{14,16,19,20} Rendahnya prevalensi mungkin saja disebabkan oleh metode pemeriksaan *Cryptosporidium* sp. yang digunakan pada penelitian tersebut yaitu metode MTA dengan feses tidak dikonsentrasi. Metode ini memerlukan tenaga mikroskopis yang handal dan sudah terlatih dalam mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp., karena bentuk dan ukuran ookista *Cryptosporidium* sp. sangat kecil, umumnya 4-6 μm .^{13,14,16} dan apabila masih bercampur dengan feses, akan sulit terdeteksi. Untuk itu dikembangkanlah metode deteksi *Cryptosporidium* sp. yang lebih sensitif dan spesifik yaitu metode PCR. *Cryptosporidium* sp. yang ada dalam feses, mempunyai banyak inhibitor yang mengganggu hasil PCR. Gen target dan larutan penyimpanan merupakan faktor penting untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. dalam metode PCR.

Penelitian mengenai gen target yang digunakan untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. ada bermacam-macam diantaranya yaitu *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) dan *small-subunit* (SSU) rRNA / gen 18S rRNA.²⁵ Sulaiman dkk (1999) mengevaluasi gen target yang paling sensitif dan spesifik untuk *Cryptosporidium* sp. adalah gen target 18S rRNA, karena dapat mendeteksi satu ookista *Cryptosporidium* sp.^{10,25}

Apabila jumlah sampel banyak dan tidak langsung diperiksa, seharusnya disimpan dalam larutan pengawet untuk dilakukan pemeriksaan lebih lanjut. Pada umumnya ookista *Cryptosporidium* sp. dapat disimpan dalam larutan formalin dan kalium bikromat. Lama penyimpanan, jenis larutan pengawet dan viabilitas ookista merupakan faktor penting untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. Johnson dkk (1995), menggunakan larutan kalium bikromat 2,5% sebagai larutan pengawet yang tidak mengganggu hasil PCR.²⁶ Pada penelitian Chan-Gu

dkk (2003) tidak terjadi penurunan viabilitas ookista *Cryptosporidium baileyi* yang disimpan dalam larutan kalium bikromat 2,5% selama 18 bulan.²⁷

1.2 Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan permasalahan yang dikemukakan pada latar belakang timbul pertanyaan: apakah rendahnya prevalensi *Cryptosporidium* sp. memang mewakili keadaan yang sebenarnya atau akibat metode pemeriksaan yang kurang sensitif dan terbatasnya ketrampilan si pemeriksa sehingga memberikan hasil negatif palsu? Untuk itu perlu dilakukan deteksi *Cryptosporidium* sp. dengan metode yang lebih sensitif dan spesifik yaitu metode PCR.

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Mengembangkan metode PCR untuk deteksi gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada feses yang disimpan dalam larutan kalium bikromat.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh penyimpanan *Cryptosporidium* sp. pada feses dalam kalium bikromat 2,5%, selama 13 bulan terhadap keberhasilan metode PCR.
2. Mengaplikasikan metode PCR untuk mengetahui frekwensi *Cryptosporidium* sp. pada anak batita.

1.4 Manfaat

Dengan dikembangkan metode PCR untuk mendiagnosis *Cryptosporidium* sp. secara molekular, diharapkan dapat membantu menentukan besarnya permasalahan *Cryptosporidium* sp. yang sesungguhnya di masyarakat Indonesia.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Polymerase chain reaction (PCR)*

Polymerase chain reaction (PCR) atau reaksi rantai polimer adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*.

2.1.1 Komponen Reaksi PCR

Pada umumnya suatu reaksi PCR membutuhkan lima komponen yaitu cetakan DNA, bahan dNTP, primer, enzim polimerase dan buffer. Cetakan DNA hanya diperlukan sedikit untuk setiap reaksi PCR dan yang terpenting cetakan DNA tidak terkontaminasi. Adanya kontaminasi pada cetakan DNA akan menurunkan efisiensi PCR. Setiap reaksi PCR membutuhkan cetakan DNA sebanyak 0,1 – 1 µg.²⁸

Bahan DNA (dNTP) merupakan sumber energi untuk membuat DNA yang terdiri atas dATP, dGTP, dCTP dan dTTP.²⁸ Penggunaan konsentrasi dNTP yang tinggi, akan memberikan hasil dengan spesifisitas rendah karena terjadi komplementerisasi yang salah. Sebaliknya jika jumlah dNTP sangat rendah, akan memberikan hasil dengan tingkat kesalahan yang tinggi, karena sekuen DNA yang disintesis tidak sesuai yang diharapkan.³ Konsentrasi dNTP untuk suatu reaksi PCR bervariasi antara 50µM sampai 200µM.²⁸

Primer digunakan sebagai pembatas (acuan) yang akan menempel pada ke dua ujung cetakan DNA. Primer merupakan susunan DNA rantai pendek (oligonukleotida) yang terdiri atas 15-20 basa atau 20-30 basa nukleotida yang mengandung pasangan basa sekuen cetakan DNA.^{2,3} Primer yang baik memiliki kandungan basa GC 40-60%. Primer juga menentukan sukses atau tidaknya suatu reaksi PCR. Apabila primer dirancang salah, maka hasil amplifikasi tidak sesuai dengan sekuen cetakan DNA.²⁸

Enzim *Taq* polimerase diisolasi dari *Thermus aquaticus*. Aktivitas enzimatik dari *Taq* polimerase mempunyai waktu paruh sekitar 40 menit pada 95°C. Enzim *Taq* polimerase melakukan sintesa 35-100 nukleotida per menit²⁹ Pemberian enzim polimerase yang banyak akan menyebabkan produk non

spesifik (terlihat sebagai latar belakang yang kotor) sedangkan enzim polimerase yang sedikit akan menghasilkan produk yang sedikit jumlahnya. Pada umumnya, konsentrasi enzim DNA *Taq* polimerase yang digunakan pada metode PCR adalah 1 - 5 unit per 100 μ l reaksi.²

Larutan dapar (*buffer*) digunakan untuk kelangsungan / kontinuitas secara optimal pada reaksi PCR. Perubahan komposisi larutan dapar terutama magnesium dapat mempengaruhi hasil PCR. Ion Mg^{2+} yang banyak akan menyebabkan akumulasi produk non spesifik karena terhambatnya fungsi enzim sebaliknya ion Mg^{2+} yang sedikit akan mengakibatkan produk yang sedikit jumlahnya.^{2,3,28}

2.1.2 Siklus PCR

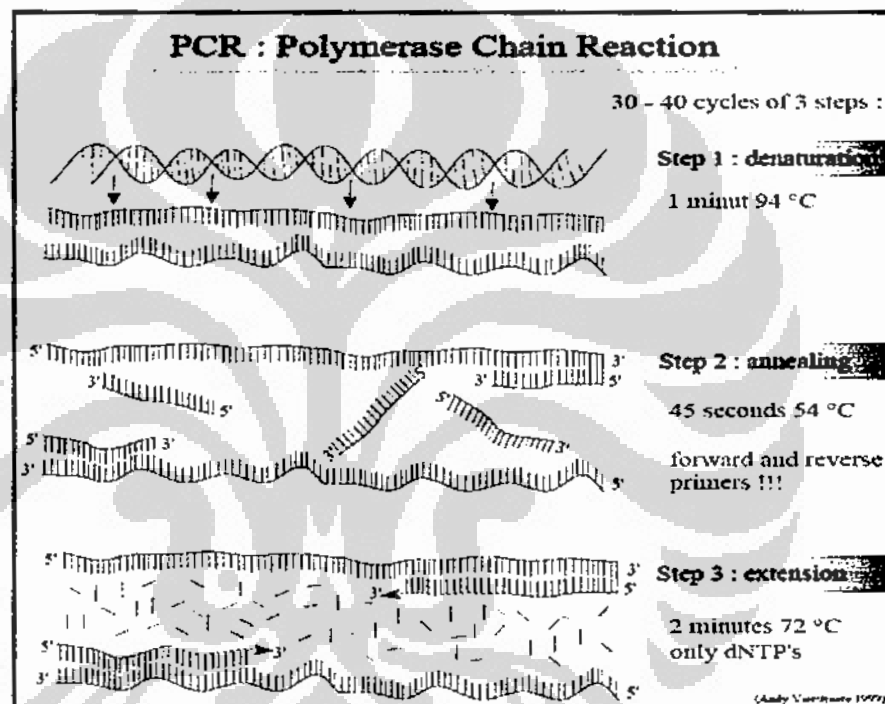
Prinsip terjadinya reaksi PCR akibat adanya sifat komplementasi rantai DNA dengan pasangannya. Satu siklus dalam metode PCR melalui tiga tahapan suhu yaitu tahap denaturasi, tahap penempelan primer dan tahap pemanjangan (gambar 2.1)

Tahap denaturasi adalah suatu tahap pemisahan DNA rantai ganda menjadi DNA tunggal melalui proses inkubasi pada temperatur yang tinggi. Pada tahap denaturasi, suhu yang efektif adalah antara 90-95°C.² Penentuan suhu denaturasi dipengaruhi oleh banyaknya basa G dan C pada sekuen DNA yang diamplifikasi. Suhu denaturasi merupakan tahap kritis dan berperan penting pada kegagalan atau kesuksesan suatu reaksi PCR.^{2,3}

Tahap penempelan primer yaitu suatu tahap penempelan primer DNA (*forward primer* dan *reverse primer*) pada ujung 5' dari masing-masing rantai tunggal cetakan DNA. Suhu penempelan primer tergantung dari titik lebur atau *temperature melting* (T_m) primer. Tahap penempelan primer umumnya menggunakan suhu 3-5°C di bawah nilai T_m , atau 1-2°C di bawah nilai T_m .^{28,2} Pada proses amplifikasi yang efisien dibutuhkan pengaturan ketepatan suhu untuk penempelan primer yang spesifik. Apabila suhu yang digunakan tinggi, cetakan DNA dan primer tetap dalam keadaan denaturasi, mengakibatkan primer tidak dapat menempel.³ Jika suhu rendah, primer dapat menempel pada tempat yang salah dan meningkatkan hasil amplifikasi non-

spesifik. *Temperature melting* dapat dihitung berdasarkan rumus yaitu: $T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$.^{3,30}

Tahap pemanjangan yaitu suatu tahap pemanjangan DNA primer yang telah dihibridisasi dengan cetakan DNA dengan adanya aktivitas DNA polimerase. Proses ini berlangsung dari arah 5' ke 3' setelah penambahan dNTP sesuai dengan urutan basa komplemen dari cetakan DNA. Pada tahap pemanjangan DNA untuk sintesis produk sampai 2kb menggunakan enzim *Taq* polimerase pada suhu 72°C.^{3,28}



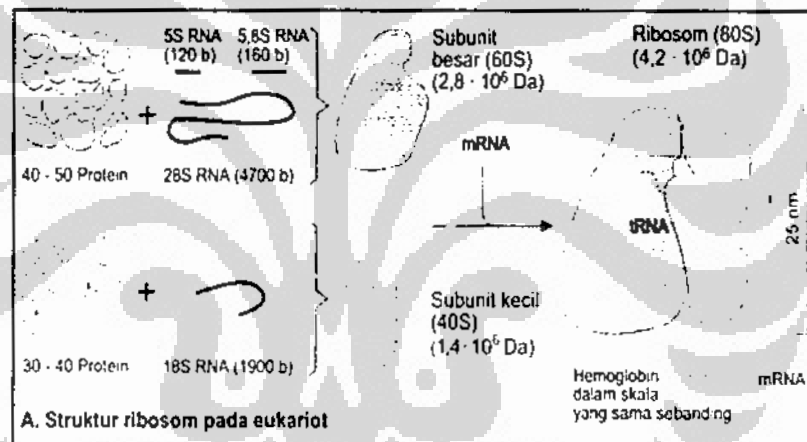
Gambar 2.1 Reaksi PCR³¹

2.2 Gen 18S rRNA

Ribosom merupakan struktur nukleoprotein sitoplasma yang bertindak sebagai mesin pembentukan protein dari cetakan mRNA.⁶ Ribosom tersusun dari ribosomal RNA (rRNA) dan banyak protein dengan berat molekul yang berbeda-beda.^{5,6,8} Ribosom terdiri dari subunit besar dan subunit kecil. Subunit besar mengandung pusat peptidil transferase yang bertanggung jawab atas pembentukan

ikatan peptida. Subunit kecil mengandung *decoding center* dimana tRNA yang bermuatan akan membaca atau “decode” unit kodon pada mRNA. Jadi pada ribosom, molekul mRNA dan tRNA akan saling berinteraksi untuk bertranslasi menjadi suatu informasi molekul protein spesifik yang ditranskripsikan dari gen. Jumlah rRNA eukariot paling banyak dibandingkan mRNA, tRNA dan snRNA sekitar 80% dari semua RNA.⁵

Ribosom eukariot di sitosol terdiri dari subunit besar berukuran 60S dan subunit kecil dengan ukuran 40S (gambar 2.2). Penamaan subunit besar dan subunit kecil pada ribosom berdasarkan koefisien sedimentasi.^{5,6,8} Sifat-sifat sedimentasi suatu partikel kebanyakan dinyatakan sebagai koefisien sedimentasi dalam satuan Svedberg (S) atau 10^{-13} detik. Untuk memisahkan makromolekul satu dari yang lainnya yang mempunyai perbedaan ukuran dan berat jenis yang tidak berarti, digunakan pemisahan gradien berat jenis dengan ultrasentrifugasi.



Gambar 2.2: Struktur Ribosom pada Eukariot⁶

Kecepatan sedimentasi ditentukan terutama dari berat molekulnya, dengan rumus:⁶

$$v = \omega^2 \times r_{\text{eff}} \times S$$

Keterangan:

v : kecepatan sedimentasi (cm/detik)

ω : kecepatan sudut (rad/detik)

r_{eff} : jari-jari yang efektif (cm)

s : koefisien sedimentasi ($S=10^{-13}$ detik)

dengan

$$s = \frac{Mr \times (1 - v \times \rho)}{f}$$

Keterangan:

Mr : berat molekul relatif

v : bagian kecil volume yang spesifik sebagian (cm^3/gram)

ρ : berat jenis larutan (gram/cm^3)

f : koefisien gesekan

Perbedaan ukuran monomer ribosom pada eukariot dan prokariot dapat dilihat pada tabel 2.1⁴

Tabel 2.1 : Ukuran monomer ribosom pada eukariot dan prokariot⁸

Sumber Ribosom	Ukuran Monomer	Sub-unit	
		Kecil	Besar
Eukariot			
Sitosol	80S	40S: 34 protein 18S rRNA	60S: 50 protein 28S, 5.8S, 5S rRNA
Mitokondria Hewan	55-60S	30S-35S: 12S rRNA 70-100 protein	40S-45S: 16S rRNA
Tanaman	77-80S	40S: 19S rRNA 70-75 protein	60S: 25S, 5S rRNA
Kloroplas	70S	30S: 20-24 protein 16S rRNA	50S: 34-38 protein 23S, 5S, 4.5S rRNA
Prokariot			
Sitosol	70S	30S: 21 protein 16S rRNA	50S: 34 protein 23S, 5S rRNA

Perbandingan antar organisme dapat dilihat dari sekuen nukleotida dan struktur sekunder rRNA. Perbandingan antara sekuen gen subunit besar dan gen subunit kecil menunjukkan bahwa gen subunit kecil lebih stabil, walaupun kedua gen tersebut berperan untuk struktur dan fungsi yang sama. Tingkat penyimpangan gen subunit kecil rRNA pada daerah konservatif antara binatang

pengerat dengan manusia tidak kurang dari 1/3 dibandingkan daerah konservatif gen sub-unit besar.⁹

Struktur sekunder rRNA subunit kecil (baik eukariot maupun prokariot) konservatif selama evolusi. Pada tahun 1986, Gonzalez dan Schmickel melaporkan sekuen utama gen 18S rRNA manusia sebanyak 1870 pb dan mengusulkan struktur mammalia berdasarkan pada sekuen ini.⁹

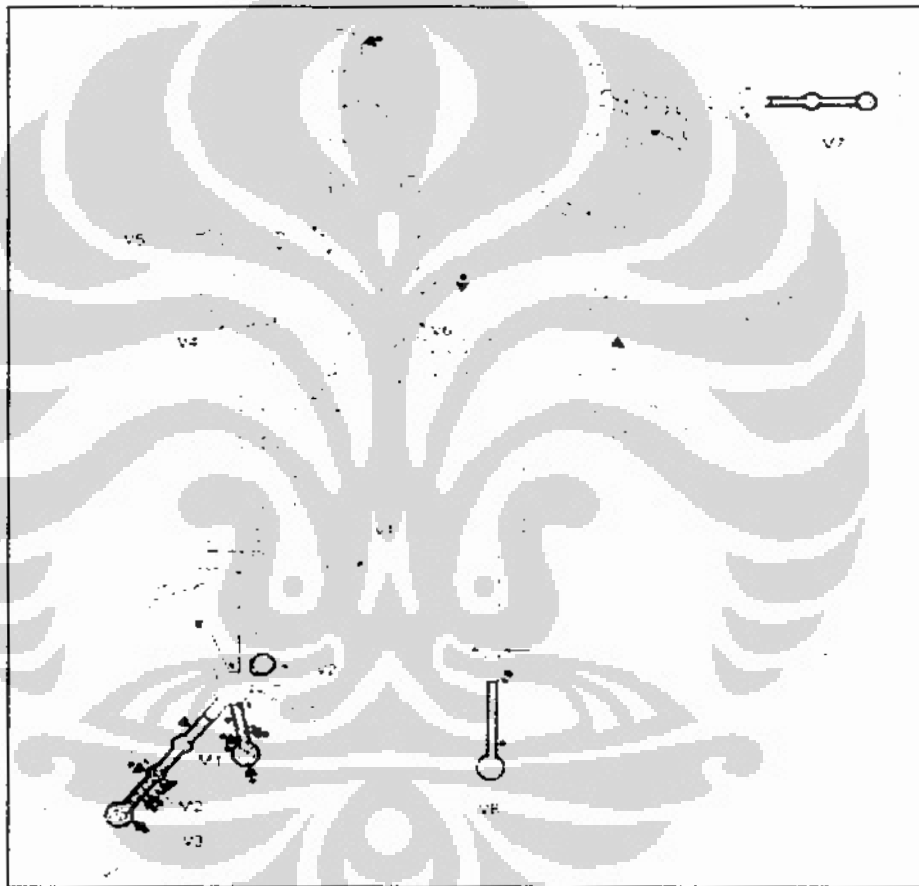
Tingkat penyimpangan antara molekul rRNA dihitung secara terpisah pada daerah konservatif dan daerah bervariasi. Gen 18S rRNA mengandung delapan daerah bervariasi sebesar 432 basa sedangkan struktur daerah konservatif yang telah diuji pada semua spesies, sebesar 1438 basa. Daerah konservatif menunjukkan penyimpangan sekuen 0,1% antara gen tikus dan manusia yang terjadi kira-kira 80 juta tahun yang lalu akibat mamalia diradiasi.⁹

Adapun delapan daerah bervariasi itu adalah (gambar 2.3):⁹

1. Daerah variasi 1 (V1) 65-80pb. Daerah ini ada pada prokariot dan eukariot, tetapi tidak ada pada sebagian besar arkaebakteri. Semua vertebrata memiliki sekuen yang identik. Prokariot memiliki 10 basa atau lebih dibandingkan eukariot.
2. Daerah variasi 2 (V2) 128-142pb. Ditemukan hanya pada eukariot dan tidak ada pada prokariot. Ada variasi antar eukariot, tetapi ada empat sekuen mamalia yang identik dan ada tiga basa yang berlebih pada sekuen *Xenopus laevis*.
3. Daerah variasi 3 (V3) 194-334pb. Daerah ini lebih banyak pada eukariot daripada prokariot. Berisi dua sekuen yang hanya ada pada mamalia yaitu pada mamalia 1 (M1) 195-202 pb dan mamalia 2 (M2) 249-272pb. Pada M1 berisi delapan basa yang struktur untai ganda, sedangkan M2 berisi 24 ekstra basa. Sekuen 320 -334 pb hanya ada pada eukariot dan eubakteri.
4. Daerah variasi 4 (V4) 577-578pb. Hanya ada pada eubakteri dan terdapat 24 ekstra basa.
5. Daerah variasi 5 (V5) 683-910pb. Daerah ini hanya berisi dua bagian yaitu sekuen 683-850 pb yang hanya ada pada eukariot, sedangkan

sekuen 851-910pb berbeda antara eukariot dan prokariot tetapi bentuk struktur sekunder keduanya mirip.

6. Daerah variasi (V6) 1161-1169 pb. Terbanyak pada semua eukariot dan tidak ada pada prokariot.
7. Daerah variasi 7 (V7) 1419-1434pb. Hanya ada pada eukariot dan pada gen *Dictyostelium* mempunyai ekstra sekuen 75 basa.
8. Daerah variasi (V8) 1754-1782pb. Daerah spesifik eukariot yang sedikit bervariasi pada sekuen mamalia.



Gambar 2.3: Struktur Sekunder gen 18S r RNA ⁹

2.3 *Cryptosporidium* sp.

2.3.1 Klasifikasi

Taksonomi klasifikasi protozoa pada genus *Cryptosporidium* yaitu^{14,16}

Filum	: Apicomplexa
Kelas	: Sporozoasida
Subkelas	: Coccidiasina
Ordo	: Eucoccidiorida
Subordo	: Eimeriorina
Famili	: Cryptosporidiidae

Klasifikasi *Cryptosporidium* sp. pada saat ini didasarkan pada berbagai parameter yaitu hospes, penularan silang, perbedaan morfologi dan tempat infeksi.^{13,32} Pada Tabel 2.2 diperlihatkan spesies dari *Cryptosporidium* yang sudah valid dan diberi nama .

Tabel 2.2 Perbedaan ukuran ookista, hospes dan tempat infeksi *Cryptosporidium*.^{13,32}

Spesies <i>Cryptosporidium</i>	Ukuran ookista (μm)	Tempat yang diinfeksi	Hospes
<i>C.parvum</i>	4,5 × 5,5	Usus halus	Mamalia
<i>C.hominis</i>	4,5 × 5,5	Usus halus	Mamalia
<i>C.muris</i>	5,6 × 7,4	Perut	Mamalia
<i>C.andersoni</i>	5,6 × 7,4	Perut	Sapi,unta
<i>C.felis</i>	4,5 × 5,0	Usus halus	Felis,kucing
<i>C.canis</i>	4,95 × 4,71	Usus halus	Canis,anjing
<i>C.suis</i>	5,05 × 4,41	Usus halus	Babi
<i>C.wrairi</i>	(4,0-5,0) × (4,8-5,6)	Usus halus	Marmut
<i>C.baileyi</i>	4,6 × 6,2	Tenggorokan,fabrikius,kloaka	Burung
<i>C.galli</i>	8,0-8,5 × 6,2-6,4	Profentikulus	Ayam
<i>C.meleagridis</i>	4,5 × 4,6	Usus	Kalkun
<i>C.serpentis</i>	4,8-5,6 × 5,6-6,6	Perut	Ular, kadal
<i>C.saurophilum</i>	(4,2-5,2) × (4,4-5,6)	Usus dan mukosa kloaka	Kadal
<i>C.molnari</i>	4,72 × 4,47	Perut	Ikan
<i>C.bovis</i>	(4,7-5,3) × (4,2-4,8)	Usus halus	Lembu
<i>C.scophthalmi</i>	3,7 × 3,0	Usus halus dan perut	Ikan

2.3.2 Siklus Hidup

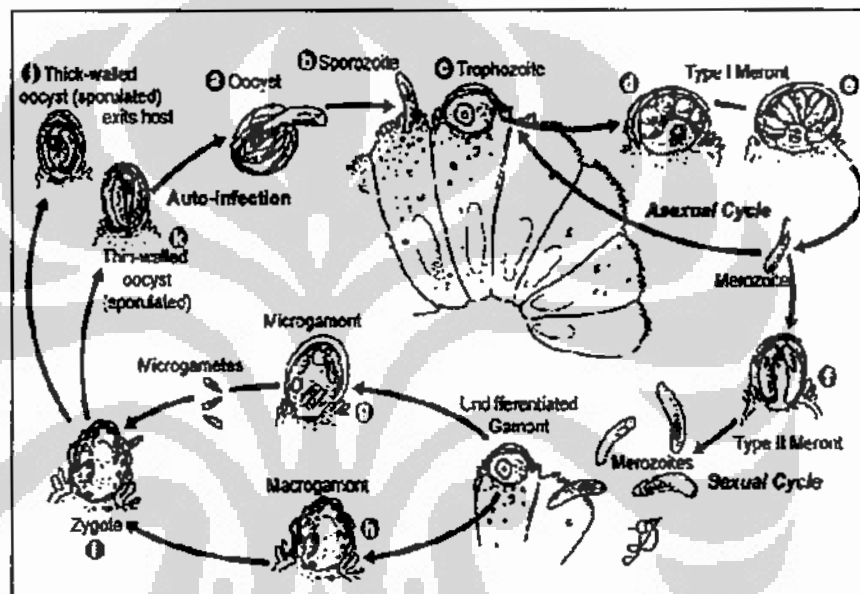
Pada manusia, *Cryptosporidium* sp. ditemukan di faring, esofagus, lambung, duodenum, yeyunum, ileum, apendiks, kolon, rektum, kandung empedu dan saluran pankreas. Infeksi paling berat ditemukan di yeyunum.³³ Manusia akan terinfeksi *Cryptosporidium* sp. apabila tertelan ookista matang. Ookista matang yang berisi empat sporozoit merupakan stadium infeksi.^{13,14,16} Pada waktu ekskistasi (traktus gastrointestinal atas), sporozoit yang berbentuk pisang, keluar menembus dinding ookista. Sporozoit berkembang di dalam vakuol parasitoforus intraseluler.^{13,16}

Pada gambar 2.4, sporozoit menginvasi enterosit untuk memulai siklus aseksual (skizogoni). Sporozoit berkembang menjadi trofozoit (bentuk bola) kemudian berkembang menjadi meron tipe satu yang berisi 6-8 inti matang dan berkembang menjadi 6-8 merozoit. Merozoit dari meron tipe satu akan menghasilkan merozoit baru, kemudian mengalami siklus aseksual lagi dan berkembang menjadi meron tipe dua. Masing-masing merozoit pada meron tipe dua yang matang, berkembang menjadi empat merozoit dan mengalami siklus seksual^{13,16} Pada perkawinan seksual (sporogoni), individu merozoit memproduksi mikrogamet (jantan) dan makrogamet (betina) sehingga menghasilkan zigot yang berkembang menjadi ookista yang berisi empat sporozoit.^{13,16} Ookista ada dua jenis, yang berdinding tipis (20%) mengeluarkan sporozoit di dalam usus dan menyebabkan autoinfeksi, sedangkan yang berdinding tebal (80%) dikeluarkan melalui tinja dan dapat menginfeksi hospes lainnya.^{13,14,16}

2.3.3 Gejala Klinis

Terdapat delapan spesies yang dapat menginfeksi manusia yaitu *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* dan *C. andersoni*. Spesies yang paling sering menginfeksi manusia adalah *C. parvum* dan *C. hominis*.³¹ Pada penularan hewan, *C. parvum* dapat juga menginfeksi sapi dan unta. Pada manusia, waktu inkubasi (waktu dari ookista *Cryptosporidium* sp. di dalam pencernaan sampai terserang penyakit) yaitu

dua hari sampai empat belas hari, tetapi yang paling umum adalah tiga sampai delapan hari. Pada sapi yang diare, dapat mengeluarkan ookista *C. parvum* sekitar 5×10^5 sampai 2×10^6 ookista per gram feses. *Cryptosporidium parvum* dapat menyebabkan diare pada anak-anak dan mamalia.^{13,32} *Cryptosporidium andersoni* yang menginfeksi sapi, menyebabkan sapi itu diare, dan berat badan menurun sehingga air susu yang dihasilkan juga berkurang. Ookista *C. andersoni* yang dikeluarkan adalah sekitar 300 sampai 500 ookista pergram feses, lebih sedikit dibandingkan *Cryptosporidium parvum*.^{13,32}



Gambar 2.4 Siklus Hidup *Cryptosporidium parvum*¹⁶

Risiko terinfeksi cukup bervariasi untuk setiap individu, karena dipengaruhi oleh latar belakang genetik, kebersihan tempat tinggal, malnutrisi, gejala diare dan status imun yang dapat mempengaruhi kerentanan terhadap infeksi.^{12,13,14,16} Anak-anak di negara berkembang lebih rentan terinfeksi *Cryptosporidium* sp.^{20,21} Infeksi *Cryptosporidium* sp. dapat terjadi dengan gejala klinis dan tanpa gejala terhadap individu imunokompeten maupun imunokompromis. Gejala penyakit setiap individu berbeda-beda yang ditentukan oleh status imunnya. Pada individu yang mempunyai kekebalan tubuh normal / imunokompeten, seringkali tidak menunjukkan gejala klinis

dan apabila terjadi diare dapat sembuh dengan sendirinya.^{14,16} Pada individu imunokompromis, gejalanya mulai dari diare akut sampai diare kronis.^{12,13,14,16} Selain diare, gejala klinis pada imunokompromis yang pernah dilaporkan antara lain dehidrasi, malabsorpsi, demam ringan, pusing, nyeri di ulu hati, sakit perut, mual, muntah, anoreksia, nafsu makan berkurang dan pernah dilaporkan pula penderita sukar tidur sehingga terjadi penurunan berat badan.^{13,33,34}

2.3.4 Epidemiologi

Penularan *Cryptosporidium* sp. lebih banyak berkaitan dengan kesehatan dan sanitasi lingkungan.^{13,14,16} Ada beberapa cara penularan *Cryptosporidium* sp. yaitu

1. Dari manusia ke manusia

Jalur penyebaran *Cryptosporidium* sp. yang terbanyak adalah melalui manusia ke manusia. Penyebaran dari manusia ke manusia sudah dilaporkan yaitu antara semua anggota keluarga, hubungan seksual, pekerja kesehatan, orang yang suka berpergian, anak-anak di tempat penitipan anak dan instansi lain.^{13,14}

2. Dari hewan ke manusia (zoonotik)

Sudah dilaporkan lebih dari 150 spesies mamalia termasuk hewan jinak, hewan liar dan hewan ternak dapat menginfeksi manusia.¹³ Data dari beberapa laboratorium, melaporkan bahwa ookista *Cryptosporidium* sp. dari feses anak sapi merupakan sumber infeksi ke manusia.^{13,14,16}

3. Air minum

Dibandingkan dengan protozoa lain, ookista *Cryptosporidium* sp. dapat ditularkan melalui air minum yang diberi klor, karena klorinasi air minum tidak dapat membunuh ookista *Cryptosporidium* sp.^{13,32}

4. Melalui udara

Penularan melalui udara dilakukan dengan cara anak sapi menghirup droplet yang berisi ookista, sehingga terinfeksi *Cryptosporidium* sp.¹³

5. Melalui makanan

Air yang terkontaminasi ookista *Cryptosporidium* sp. dapat menjadi sumber infeksi bagi pabrik makanan dan air laut. Pada ikan yang terinfeksi *Cryptosporidium* sp., bila termakan oleh manusia dapat juga menjadi sumber infeksi.¹³ Pemanasan lebih dari 64,2°C selama dua menit, dapat juga mematikan ookista *Cryptosporidium* sp.¹³

Penyakit yang disebabkan oleh *Cryptosporidium* sp. disebut kriptosporidiosis. Kriptosporidiosis ditemukan di seluruh dunia.³² Delapan belas kasus kriptosporidiosis terjadi pada imunokompeten dilaporkan pada tahun 1983. Prevalensi *Cryptosporidium* sp. di Eropa sekitar 1 - 2%, di Amerika Utara 0,6% - 4,3% sedangkan di Asia, Australia dan Afrika pada umumnya 4 - 20%.^{14,16} Prevalensi pada penderita HIV yang dilaporkan Centre for Diseases Control (CDC) pada tahun 1987 sebesar 3,6%.¹⁶ Banyak penelitian yang mendapatkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak berumur bawah tiga tahun yang disertai diare lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa diare.^{14,16,20}

Pada penelitian Tumwine dkk (2003) di Uganda Afrika, didapatkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak berumur bawah lima tahun yang diare 25,0% (444/1779) lebih tinggi dibandingkan anak yang tanpa diare 8,5% (57/667), sedangkan anak perempuan diare (20,9%) dan anak laki-laki diare (21,2%) tidak berbeda bermakna ($P = 0,90$) tetapi pada anak diare dengan gizi buruk didapatkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. yang berbeda bermakna ($P = 0,0014$) dengan rasio odds sebesar 1,42. Teknik deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. yang dilakukan oleh Tumwine dkk (2003) adalah teknik pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA) dan dianalisis dengan PCR-restriction fragment length polymerase (RFLP) dengan gen COWP.³⁴

Pada penelitian Al-Hindi dkk (2007) didapatkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak tanpa diare (56/280 = 20,0%) lebih tinggi dibandingkan anak diare (6/136 = 4,4%) yang berbeda bermakna dengan nilai $P = 0,001$. Juga didapatkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak

perempuan ($28/138 = 20,3\%$) lebih tinggi dari pada anak laki-laki ($34/278 = 12,2\%$) yang berbeda bermakna dengan nilai $P = 0,03$. Deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. yang dilakukan Al-Hindi dkk (2007) menggunakan dua metode yaitu metode pewarnaan Ziehl-Neelsen tahan asam dan enzyme-linked immunosorbent assay /ELISA. Hasil yang didapatkan hampir sama yaitu secara mikroskopis ($14,9\% = 62/416$) dan metode imunologi sebesar $16,3\% (68/416)$.³⁵

Penelitian Gonçalves dkk (2006) di Sao Paulo, terhadap anak umur 4 bulan - 4 tahun, didapatkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak diare ($22,6\%$) dan tanpa diare ($22,2\%$) tidak berbeda bermakna ($P = 0,965$) sedangkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak perempuan dan anak laki-laki juga tidak berbeda bermakna ($P = 0,140$). Gonçalves dkk (2006) juga mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dengan metode pewarnaan MTA, sedangkan sampel *Cryptosporidium* sp. yang positif disimpan di kalium bikromat $2,5\%$ pada suhu 4°C untuk dianalisis dengan metode PCR dengan gen 18S rRNA dan gen COWP.³⁶

2.4 Diagnosis *Cryptosporidium* sp.

Ada tiga metode untuk mendiagnosis *Cryptosporidium* sp. yaitu metode pewarnaan untuk mendeteksi ukuran ookista *Cryptosporidium* sp. ($4-6 \mu\text{m}$), metode imunologi untuk mendeteksi antigen dan metode deteksi asam nukleat dengan menggunakan PCR. Masing-masing metode mempunyai keuntungan dan kerugian.³²

2.4.1 Metode Pewarnaan

Ookista *Cryptosporidium* sp. dapat dideteksi secara langsung dengan menggunakan mikroskop. *Cryptosporidium* sp. yang berasal dari sampel feses sebaiknya dikonsentrasi untuk mendapatkan ookista yang tidak bertumpuk di dalam debris feses. Ukuran ookista *Cryptosporidium* sp. yang relatif kecil, mengakibatkan diagnosis kurang akurat, sehingga dikembangkan metode pewarnaan. Garcia dkk (1983) melakukan beberapa metode pewarnaan untuk mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp.,

diantaranya yaitu giemsa, trikrom, zieh-neelsen tahan asam dan modifikasi tahan asam (MTA).^{23,37} Metode pewarnaan MTA merupakan metode yang terbaik dan paling umum digunakan, karena kebanyakan instansi / laboratorium mempunyai mikroskop cahaya biasa. Dengan metode ini, ookista akan terlihat berwarna merah dengan latar belakang kehijauan. Apabila jumlah ookista yang ditemukan sedikit, maka akan menyulitkan untuk mendiagnosis *Cryptosporidium* sp. Ukuran ookista *Cryptosporidium* sp. juga harus dibedakan dari ukuran spora jamur (6-8µm). Pada penelitian Soetomenggolo (2006), menggunakan metode MTA tanpa konsentrasi untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp dalam feses anak batita.²⁴ Keuntungan metode ini adalah waktu untuk membuat pulasan tidak lama dan biaya murah, sedangkan kekurangannya adalah tidak sensitif dan spesifik.³²

2.4.2 Metode Imunologi

Pada metode ini, yang dilakukan adalah mendeteksi antigen menggunakan antibodi yang dilabel dengan fluoresen (mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dengan menggunakan mikroskop fluoresen) dan mendeteksi antigen menggunakan antibodi yang dilabel dengan enzim (metode ELISA). Biaya untuk mendiagnosis *Cryptosporidium* sp. dengan metode ini cukup mahal dibandingkan dengan metode pewarnaan dan sensitifitas metode ini masih kurang sempurna walaupun spesifisitas sudah mencapai 98-100%.³²

2.4.3 Metode PCR

Pada metode ini, DNA *Cryptosporidium* sp. dideteksi dengan *Polymerase chain reaction* (PCR). Metode PCR lebih sensitif dan spesifik dalam mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp. Ada tiga tahap untuk mendeteksi DNA *Cryptosporidium* sp. yaitu teknik konsentrasi, ekstraksi dan amplifikasi. Dengan teknik air – eter, Bukhari dan Smith (1995) mendapatkan kembali jumlah ookista sebesar 46 sampai 75% lebih banyak dibandingkan teknik konsentrasi *sucrose density* (24 sampai 65%) dan *zinc sulfate* (22 sampai 41%).³⁸

Penggunaan larutan pengawet yang tepat akan mempermudah dalam mendeteksi DNA *Cryptosporidium* sp. Apabila salah memilih larutan pengawet akan mengakibatkan *Cryptosporidium* sp. cepat mati dan DNA *Cryptosporidium* sp. tidak dapat terdeteksi. Pada waktu ekstraksi, diharapkan dinding ookista *Cryptosporidium* sp. pecah sehingga sporozoit keluar dan DNA dapat terdeteksi. Pada teknik amplifikasi, pemilihan gen target yang tepat, juga mempengaruhi deteksi DNA *Cryptosporidium* sp.

Ada beberapa gen yang dapat mendeteksi *Cryptosporidium* sp., tetapi yang paling tinggi sensitivitas dan spesifisitas ada dua gen yaitu gen 18S rRNA dan gen *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP).^{25,26,39} Beberapa penelitian yang menggunakan gen 18S rRNA dilaporkan lebih sensitif dibandingkan gen COWP karena gen 18S rRNA dapat mendeteksi satu ookista *Cryptosporidium* sp., sedangkan gen COWP hanya dapat mendeteksi minimal 10 ookista.^{10,25,32,39} Kelebihan metode ini dengan menggunakan PCR RFLP, maka spesies dari *Cryptosporidium* dapat ditentukan. Biaya metode ini mahal, tetapi sensitifitas dan spesifisitas sudah 100%, sehingga dapat dijadikan sebagai baku emas (*gold standar*) dalam mendeteksi *Cryptosporidium* sp.³²

Suhu dan waktu penyimpanan mempunyai pengaruh yang sangat penting pada *Cryptosporidium* sp. untuk bertahan hidup. Apabila disimpan pada suhu yang rendah atau tinggi dapat menyebabkan penurunan jumlah *Cryptosporidium* sp. Begitu juga dengan waktu penyimpanan, apabila disimpan dalam jangka waktu yang lama, akan mengakibatkan penurunan jumlah *Cryptosporidium* sp.

Suhu penyimpanan ookista juga mempengaruhi infektifitas *Cryptosporidium* sp. Pada penelitian Inoue dkk (2006), menggunakan suhu 4°C dan 18°C selama 100 hari untuk melihat perubahan *Cryptosporidium* sp. secara fisika dan biokimia. Penyimpanan pada suhu 4°C, tidak mempengaruhi morfologi dan viabilitas ookista *Cryptosporidium* sp. terhadap sinar ultra sonik. Apabila ookista *Cryptosporidium* sp. disimpan pada suhu 18°C, terjadi penurunan viabilitas ookista *Cryptosporidium* sp.⁴⁰ Pada penelitian Chen dkk (2007) didapatkan bahwa ookista yang disimpan di larutan pengawet pada

suhu 4°C lebih lama bertahan hidup (1-16 bulan) daripada di dalam air yang diberi klorin (1-13 bulan).⁴¹ Pada penelitian Chan-Gu S dkk (2003) didapatkan bahwa pada suhu 4°C di dalam larutan pengawet, ookista *C.baileyi* masih dapat bertahan selama 18 bulan.²⁷

Pemilihan larutan pengawet untuk penyimpanan ookista merupakan hal yang harus diperhatikan dalam menegakkan diagnosis *Cryptosporidium* sp. secara molekular. Larutan pengawet yang dapat digunakan untuk menyimpan spesimen dalam jangka panjang adalah formalin 10% dan kalium bikromat 2,5%. Beberapa peneliti menggunakan larutan kalium bikromat 2,5% sebagai larutan pengawet untuk menyimpan ookista *Cryptosporidium* sp.^{26,27,41}

Pada penelitian Johnson dkk (1995), dilihat pengaruh penyimpanan ookista *Cryptosporidium* sp. selama 6 bulan pada suhu 4°C di larutan pengawet yang berbeda yaitu kalium bikromat 2,5%, formalin 10%, PBS dan larutan garam / *saline*. Metode deteksi yang digunakan adalah metode immunofluorescence assay (IFA) dan PCR. Dengan metode IFA, terdeteksi ookista kosong (sporozoit mati) 33% di PBS, 27% di larutan garam / *saline*, 12% di kalium bikromat 2,5% dan 10% pada formalin 10%. Tetapi pada PCR dilakukan deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dari 1 sampai 10 ookista,. Hanya pada larutan kalium bikromat 2,5%, DNA *Cryptosporidium* sp. masih dapat terdeteksi, sedangkan pada formalin 10%, PBS dan larutan garam / *saline*, DNA *Cryptosporidium* sp. tidak terdeteksi lagi.²⁶

Ion bikromat stabil dalam suasana asam.⁴² Kalium bikromat adalah bahan kimia anorganik yang sudah umum digunakan sebagai agen pengoksidasi di berbagai laboratorium dan industri. Kristal kalium bikromat berwarna jingga dengan pH 4,0 serta larut dalam air dan tidak larut dalam alkohol.⁴³

3. METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan desain penelitian *cross sectional* (potong lintang).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Departemen Parasitologi dan Departemen Biokimia dan Biologi Molekular, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI), Jakarta. Waktu penelitian adalah dari Februari 2007 sampai dengan Mei 2008.

3.3 Sampel dan perhitungan jumlah sampel

3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah feses anak batita, diambil pada suatu survei oleh peneliti terdahulu²⁴ (Soetomenggolo, 2006) dari populasi yang bertempat tinggal di Bantaran Sungai Ciliwung kelurahan kampung Melayu. Sampel feses disimpan di dalam larutan kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan pada suhu 4°C.

3.3.2 Perhitungan jumlah sampel

Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini ditentukan dengan perhitungan statistik⁴⁴ dengan sampel uji terhadap 2 proporsi.

$$n_1 = n_2 = \frac{\{Z_{\alpha} \sqrt{2PQ} + Z_{\beta} \sqrt{(P_1Q_1 + P_2Q_2)}\}^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

Keterangan:

n = besar sampel yang akan diperiksa

$$\begin{aligned}
 Z_{\alpha} &= 1,960 ; \text{ pada } \alpha &&= 0,05 \\
 Z_{\beta} &= 1,282 ; \text{ pada } 1-\beta &&= 0,90 \\
 P_1 &= \text{Proporsi dari pustaka (7\%)}^{45} &&= 0,07 \\
 Q_1 &= 1 - P_1 \rightarrow 1-0,07 &&= 0,93 \\
 P_2 &= \text{Proporsi yang diinginkan (15\%)} &&= 0,15 \\
 Q_2 &= 1 - P_2 \rightarrow 1-0,15 &&= 0,85 \\
 P &= \frac{(P_1+P_2)}{2} &&= 0,11 \\
 Q &= 1 - 0,11 &&= 0,89
 \end{aligned}$$

Dari rumus di atas didapatkan hasil sampel sebanyak :

$$\begin{aligned}
 n_1 = n_2 &= \frac{\{1,96\sqrt{0,11 \times 0,89} + 1,282 \sqrt{(0,07 \times 0,93 + 0,15 \times 0,85)}\}^2}{(0,0064)^2} \\
 n_1 = n_2 &= 175
 \end{aligned}$$

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat : Tabung eppendorf 1500 μ l, 500 μ l dan 200 μ l, *Micro pipet*, *Vortex* (Maxi Mix II, Mixer-37600 USA), *Centrifuge* (Sorval Biofuge Pico, D-37520, German), Mikroskop (Olympus), Spektrofotometer (Biorad), penangas air (Kottermann, German), Freezer -20°C, *Microfuge* (Picofuge, PMC-860, USA), DNA *thermal cycler* (MJ Research, PTC DNA Engine, PTC-200 UK), *Electrophoresis Apparatus* (Biorad Richmond USA), Cetakan agar, *UV Transilluminator* 312 nm (Vilber Lourmat TCP-15M France).

3.4.2 Bahan: *Aquabidest*, *lysis buffer*, metanol absolut (Merck, cat.no. 1.06009), HCl (Merck, cat.no. 1.00317), *carbol fuchsin* (Merck, cat.no 1.09215), *malachite green* (Merck cat.no. 1.01398), Kaca objek dan kaca tutup ukuran 22x22mm, Nitrogen cair, *Proteinase K* (New England Biolabs, cat.no P8102S), *Taq* buffer 10x (Qiagen), dNTP (Promega), BSA (New England Biolabs, cat.no. B 9001S), Tween 20 (Sigma, cat.no P2287), MgCl₂ (Qiagen), Primer (Research Biolabs), *Taq* polimerase (Qiagen, Fermentas), Agarosa (Sigma, cat.no A-9539), Etidium bromida, Larutan buffer TBE, DNA *step ladder* 100pb (Promega G 210A, G 695A), Larutan 6x *loading dye* (Promega G 190A).

3.5 Cara Kerja:

3.5.1 Konsentrasi Feses³⁸

Sampel feses sebanyak 200 μ l dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1500 μ l, selanjutnya ditambahkan 700 μ l aquabidest, divorteks selama 30 detik. Ditambahkan 400 μ l dietil eter, di bolak balik sebanyak 10 kali. Sampel kemudian disentrifugasi pada 13000 \times g selama 1 menit. Supernatan dibuang dan disisakan kira-kira 200 μ l, selanjutnya ditambahkan 1 ml *aquabidest* steril, divorteks selama 30 detik. Pencucian diulangi lagi dengan penambahan 1ml *aquabidest*. Pelet disisakan 50 μ l lalu ditambahkan 100 μ l *lysis buffer* (LB). Divorteks selama 10 detik. Konsentrat dapat disimpan di kulkas 4°C untuk dilakukan prosedur selanjutnya.

3.5.2 Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp. dari Feses Konsentrat^{11,32}

Hasil konsentrasi (konsentrat) sebanyak 10 μ l, dioleskan di atas kaca objek, kemudian dikeringkan pada suhu ruang, selanjutnya difiksasi dengan metanol absolut selama 3 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam botol pewarnaan berisi larutan *carbol fuchsin* 2,3% selama 15 menit, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir, lalu dicelupkan ke dalam larutan metanol HCl 1% selama 10 - 15 detik. Kemudian dicuci di bawah air mengalir dan diberi pulasan dengan *malachite green* 0,4% selama 30 detik, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir, dikeringkan pada suhu ruang. Hasil diperiksa di bawah mikroskop pada pembesaran 400 \times dan 1000 \times .

3.5.3 Ekstraksi DNA *Cryptosporidium* sp.⁴⁶

Konsentrat 100 μ l diekstraksi dengan teknik kejut panas beku dan dilakukan berulang kali (suspensi ookista dalam larutan LB). Konsentrat selanjutnya dibekukan dalam nitrogen cair selama 1 menit lalu dipindahkan di penangas air 65°C selama 1 menit. Hal tersebut diulangi sebanyak 15 kali. Apabila di dalam konsentrat berisi partikel besar, maka divorteks setiap 5 kali dan disentrifugasi. Setelah selesai dengan proses di atas, ditambahkan 2 μ l larutan *proteinase K* 10% lalu diinkubasi di penangas air 55°C selama 3 jam.

Selanjutnya dipindahkan ke penangas air 90°C selama 20 menit dan dimasukkan ke dalam es selama 1 menit, lalu disentrifugasi pada 13000×g selama 5 menit. Supernatan diambil sebanyak 80 µl, dipindahkan ke tabung eppendorf 500 µl dan disimpan di freezer -20°C sampai dilakukan PCR.

3.5.4 Elektroforesis Hasil Ekstraksi

Sebanyak 1,2 gram agarosa dilarutkan ke dalam 100 ml 0,5× TBE, lalu dipanaskan sampai mendidih dan ditambahkan 5 µl etidium bromida 10mg/ml. Setelah itu, dituangkan ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir sehingga membentuk lubang cetakan agar, lalu didinginkan sampai mengeras dan dimasukkan ke bak *Electrophoresis Apparatus* yang berisi larutan 0,5× TBE sebagai larutan elektrolit. Sebanyak 15 µl hasil ekstraksi dicampur dengan 3 µl larutan 6× *loading dye* dan dimasukkan ke dalam masing-masing lubang cetakan agar. Dielektroforesis pada tegangan 100V selama 1 jam, dilihat hasilnya di *UV Transilluminator* 312 nm dan didokumentasikan.

3.5.5 Pengukuran Serapan DNA

Ke dalam kuvet 1ml, sebanyak 1 µl hasil ekstraksi dicampur ditambahkan 99 µl *aquabidest* dan dikocok perlahan. Lalu dimasukkan ke spektrofotometer dan diukur serapan/ absorbansi DNA pada panjang gelombang 260nm (A_{260nm}) dan protein pada panjang gelombang 280nm (A_{280nm}).¹ Hasil dicatat untuk mendapatkan konsentrasi DNA dengan perhitungan:

$$\text{Konsentrasi DNA (mg/ml)} = \{A_{260nm} \times 50 \text{ mg/ml}\} : \text{Pengenceran}$$

$$\boxed{\text{Jumlah DNA yang diisolasi } (\mu\text{g})} = \boxed{\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml})} \times \boxed{\text{Vol larutan penghidrasi DNA yang ditambahkan } (\mu\text{l})}$$

$$\text{Indeks kemurnian} = A_{260nm} / A_{280nm}$$

3.5.6 PCR Gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp.

DNA yang telah diisolasi, selanjutnya diamplifikasi. Amplifikasi DNA *Cryptosporidium* sp. (tahap denaturasi, penempelan dan ekstensi) dilakukan terhadap gen target 18S rRNA. Metode *direct* (langsung) PCR menggunakan

primer CPB DIAGF (5'AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG 3') dan CPB DIAGR (5'TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG3')³⁹ Optimasi terhadap kondisi PCR dilakukan dengan menggunakan sampel positif pasien kriptosporidiosis. Reaksi PCR dilakukan pada *thermal cycler* menggunakan tabung eppendorf 200µl, volume total reaksi 25 µl dengan reagensia sebagai berikut:

ddH ₂ O		9,75 µl
Taq buffer 10×, berisi MgCl ₂ 15mM		2,5 µl
dNTP's	2mM	2,5 µl
BSA	4mg/ml	2,5 µl
Tween 20,	20%	2,5 µl
MgCl ₂	25mM	2 µl
Primer CPB DIAG F	10µM	0,5 µl
Primer CPB DIAG R	10µM	0,5 µl
Taq polimerase	(5U/µl)	0,25 µl
Cetakan DNA		2 µl

Selanjutnya tabung PCR dimasukkan ke dalam *thermal cycler* dan diamplifikasi sebanyak 39 siklus dengan program³⁹ sebagai berikut :

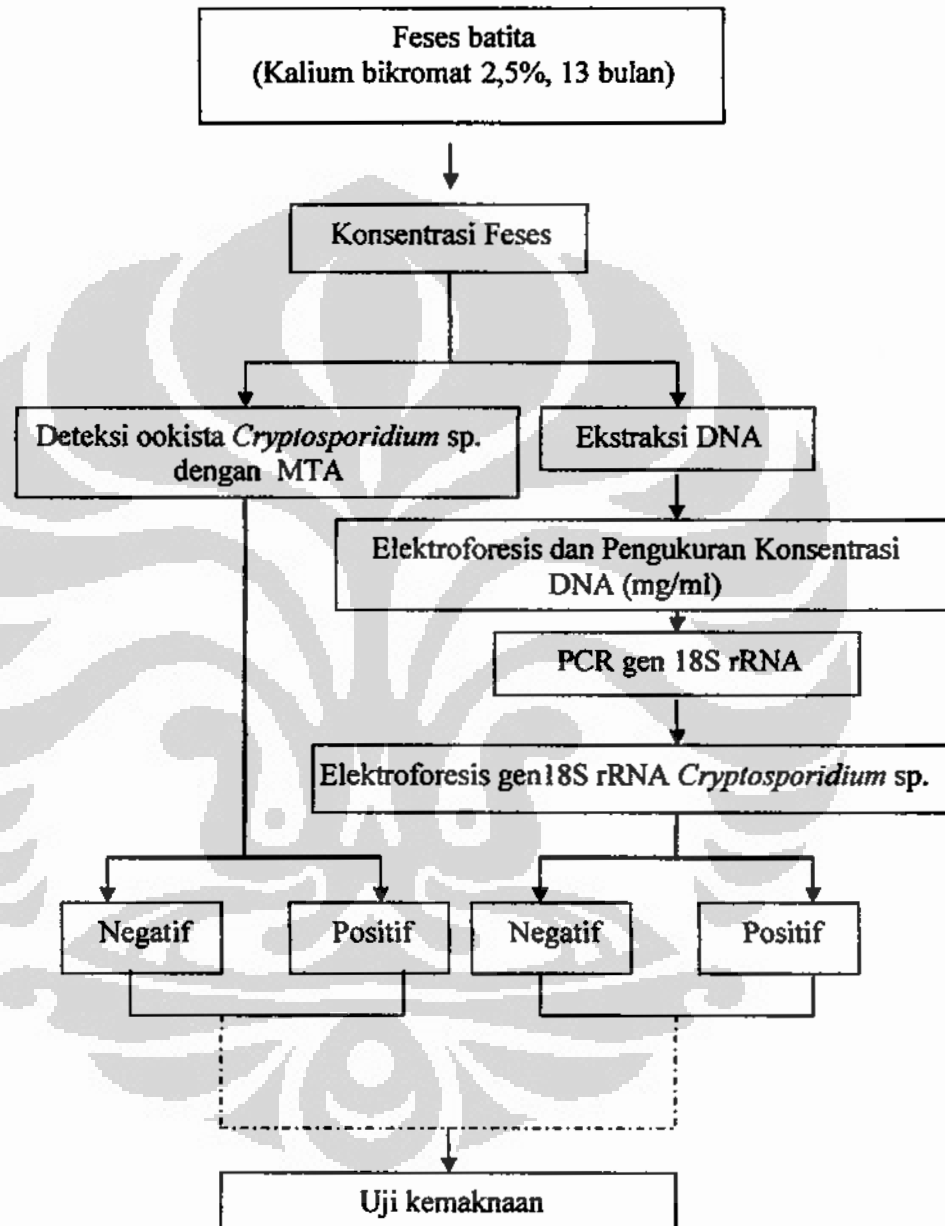
Suhu	Waktu	Jumlah siklus
95 °C	5 menit	1
94 °C	30 detik	} 39
55 °C	30 detik	
72 °C	45 detik	
72 °C	10 menit	1

3.5.7 Elektroforesis Hasil PCR

Sebanyak 10 µl hasil PCR dicampur dengan 3 µl larutan 6× *loading dye* dan dimasukkan ke dalam masing-masing lubang cetakan agar. Dielektroforesis pada tegangan 100V selama 1-2 jam, dilihat hasil di *UV Transilluminator* 312 nm dan didokumentasikan. Produk ampikon yang diharapkan adalah pada panjang 435 pb.^{11,32,39} Dalam setiap PCR selalu digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Sebagai kontrol positif adalah cetakan DNA *Cryptosporidium* sp. pemberian Scottish Parasite Diagnostic Laboratory United Kingdom (SPDL UK) dan DNA *Cryptosporidium* sp. dari pasien kriptosporidiosis pemberian dari Departemen Parasitologi FKUI.

Sebagai kontrol negatif adalah semua reagensia untuk PCR tanpa cetakan DNA.

3.6 Alur Penelitian



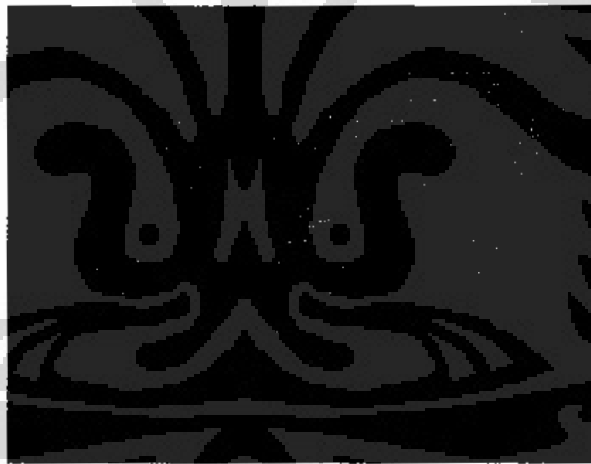
3.7 Analisis Data

Hasil yang diperoleh, dipresentasikan dalam bentuk tabulasi dan dilihat uji kemaknaan dengan uji Mc Nemar.

4. HASIL PENELITIAN

4.1 Konsentrasi Feses dan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp.

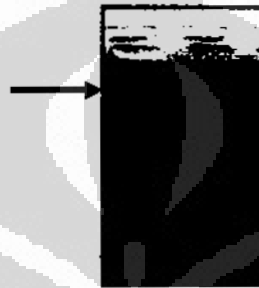
Sampel feses anak batita sebanyak 188 sampel feses dikonsentrasikan sesuai cara kerja Bukhari dan Smith (1995). Hasil konsentrasi (konsentrat) sebanyak 10 μ l dioleskan di kaca objek lalu dipulas dengan metode pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA). Untuk mengetahui keberhasilan teknik konsentrasi, maka digunakan kontrol positif yaitu feses penderita kriptosporidiosis pemberian dari Departemen Parasitologi FKUI. Hasil positif dapat dilihat dengan pembesaran 400 \times dan 1000 \times . Hasil positif ookista *Cryptosporidium* sp. berwarna merah dengan latar belakang kehijauan. (gambar 4.1).



Gambar 4.1: Ookista *Cryptosporidium* dari Feses Penderita Kriptosporidiosis Dipulas dengan Metode MTA Pembesaran 400 \times

4.2 Ekstraksi DNA

Pemeriksaan isolat DNA dapat dilakukan secara spektrofotometri dan elektroforesis agarosa. Sebanyak 100 μ l konsentrat diekstraksi sesuai cara kerja Nichols dan Smith (2004).⁴⁶ Untuk mengetahui keberhasilan teknik ekstraksi, maka digunakan kontrol positif yaitu feses penderita kriptosporidiosis. Sebanyak 15 μ l hasil ekstraksi DNA dielektroforesis pada agarose 1,2%. Pada visualisasi dengan UV transluminator 312 nm, didapatkan pita yang menunjukkan adanya DNA (gambar 4.2). Dengan demikian tahap ekstraksi DNA berhasil dengan baik.



Gambar 4.2 : Hasil Elektroforesis Ekstraksi DNA *Cryptosporidium* pada feses Kontrol Positif penderita kriptosporidiosis

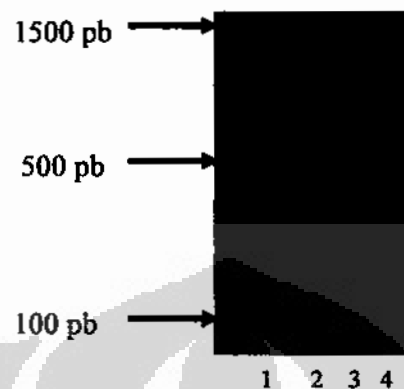
Secara spektrofotometri, serapan DNA pada panjang gelombang 260nm dan protein pada 280nm dilakukan terhadap 188 hasil ekstraksi feses. Didapatkan rata-rata konsentrasi DNA pada sampel feses sebesar 1041,1mg/ml atau rata-rata jumlah DNA pada sampel feses sebesar 83288 μ g dengan indeks kemurnian 1,09.

4.4 PCR Gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp.

4.4.1 Optimasi Kondisi PCR

Standar larutan dan program *direct* (langsung) PCR dilakukan berdasarkan Nichols dkk (2006).³⁹ Untuk mengetahui keberhasilan metode PCR digunakan cetakan DNA *Cryptosporidium* sp. pemberian dari Scottish Parasite Diagnostic Laboratory United Kingdom (SPDL UK) sebagai kontrol positif pertama dan cetakan DNA penderita kriptosporidiosis dari Departemen Parasitologi FKUI sebagai kontrol positif kedua. Pada visualisasi, tidak didapatkan pita produk PCR dari kontrol positif kedua sedangkan kontrol

positif pertama menunjukkan hasil yang sesuai yaitu pada panjang 435pb (gambar 4.3)



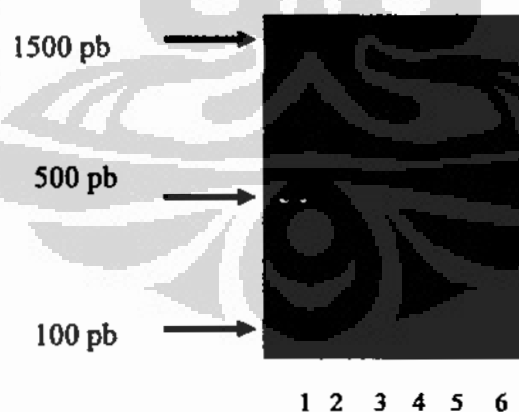
Gambar 4.3 : Hasil Elektroforesis PCR DNA *Cryptosporidium* pada Kontrol Positif 1 dan 2

Kolom 1 = DNA marker 100 pb (Promega)

Kolom 2 = Kontrol positif 1 (SPDL) (2 μ l / 25 μ l)

Kolom 3 = Kontrol positif 2 (Departemen Parasitologi FKUI) (2 μ l / 25 μ l)

Dengan demikian, penggunaan standar larutan dan program *direct* (langsung) PCR berhasil baik pada kontrol positif pertama, sedangkan kontrol positif kedua gagal; sehingga dipikirkan kemungkinan konsentrasi cetakan DNA kurang optimum; untuk itu dilakukan titrasi cetakan DNA dimulai dari 1 μ l, 2 μ l dan 3 μ l per 25 μ l reaksi (gambar 4.4)



Gambar 4.4: Hasil Elektroforesis PCR DNA *Cryptosporidium* pada Kontrol Positif 1 dan 2 dengan Perbedaan Konsentrasi Cetakan DNA

Kolom 1 = DNA marker 100 pb (Promega)

Kolom 2 = Kontrol positif 1 (2 μ l / 25 μ l)

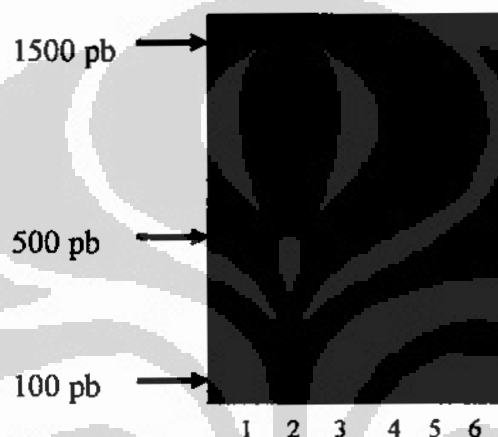
Kolom 3 = Kontrol positif 2 (1 μ l / 25 μ l)

Kolom 4 = Kontrol positif 2 (2 μ l / 25 μ l)

Kolom 5 = Kontrol positif 2 (3 μ l / 25 μ l)

Kolom 6 = Kontrol negatif

Kontrol positif pertama bekerja dengan baik yang diperlihatkan pada gambar 4.4, sedangkan kontrol positif kedua tetap gagal, berarti titrasi cetakan DNA tidak berhasil, sehingga dari hasil tersebut timbul pertanyaan apakah cetakan DNA *Cryptosporidium* sp. mengandung banyak inhibitor? Karena dari hasil indeks kemurnian DNA kurang dari 1,75. Untuk menjawab pertanyaan, kontrol positif kedua diencerkan dengan cara menambahkan ddH₂O dengan pengenceran 1/10, 1/6 dan 1/2



Gambar 4.5 : Hasil Elektroforesis PCR DNA *Cryptosporidium* pada Kontrol Positif 1 dan 2 dengan Pengenceran Cetakan DNA

Kolom 1 = DNA marker 100bp (Promega)
 Kolom 2 = Kontrol positif 1
 Kolom 3 = Kontrol positif 2 (pengenceran 1/10)
 Kolom 4 = Kontrol positif 2 (pengenceran 1/6)
 Kolom 5 = Kontrol positif 2 (pengenceran 1/2)
 Kolom 6 = Kontrol negatif

Pada elektroforesis didapatkan produk ampikon yang sesuai baik pada pengenceran 1/10, 1/6 dan 1/2 sedangkan pemakaian cetakan DNA yang berlebihan memberikan hasil negatif dan menghambat reaksi PCR. Tidak didapatkan perbedaan intensitas pita DNA baik pada pengenceran tinggi maupun rendah sehingga untuk penelitian selanjutnya, digunakan kontrol positif kedua pada pengenceran 1/10.

4.4.2 Deteksi *Cryptosporidium* sp. dengan Metode MTA dan PCR

Pada penelitian ini, dari 188 sampel feses didapatkan 9 yang positif ookista *Cryptosporidium* sp. dengan metode MTA yang dikonsentrasi sedangkan pada metode PCR didapatkan sebesar 65 DNA *Cryptosporidium* sp. Pada Tabel 4.1 diperlihatkan frekwensi *Cryptosporidium* sp. pada metode PCR dengan metode MTA yang dikonsentrasi dan metode MTA tanpa konsentrasi*.

Tabel 4.1 Perbandingan Metode PCR dan MTA untuk Deteksi *Cryptosporidium* sp.

Metode(n=188)	Jumlah	
	positif	negatif
PCR	65 (34,6%)	123(65,4)
MTA yang dikonsentrasi	9 (4,8%)	179 (95,2%)
MTA tanpa konsentrasi*	5 (2,6%)	183(97,3%)

Ket * sumber data dari penelitian H A Soetomenggolo (2006)²⁴

Uji Mac Nemar dilakukan terhadap metode PCR dengan metode MTA tanpa konsentrasi* maupun MTA konsentrasi. Didapatkan nilai $P=0,000$ pada metode PCR dengan MTA tanpa konsentrasi* dan juga nilai $P=0,000$ pada metode PCR dengan metode MTA konsentrasi. Pada metode MTA konsentrasi dengan metode MTA tanpa konsentrasi* didapatkan nilai $P=0,289$.

5. PEMBAHASAN

Cryptosporidium sp. dapat dideteksi dari spesimen feses, sputum dan jaringan biopsi. Pada umumnya *Cryptosporidium* sp. lebih banyak ditemukan di feses, karena tempat hidupnya di saluran cerna sehingga kasus-kasus kriptosporidiosis intestinalis merupakan manifestasi yang umum ditemukan.

Pada penelitian Johnson dkk (1995) lama penyimpanan dan jenis larutan pengawet akan mempengaruhi hasil PCR. DNA *Cryptosporidium* sp. di dalam larutan kalium bikromat 2,5% selama 6 bulan masih dapat terdeteksi, sedangkan penyimpanan di larutan formalin 10% DNA *Cryptosporidium* sp. sudah tidak terdeteksi lagi.²⁶ Ookista *Cryptosporidium* sp. yang disimpan dalam larutan formalin 10%, dapat merusak ookista yang mengakibatkan dinding ookista menjadi keras, dan sporozoit sulit keluar sehingga sulit dideteksi dengan metode PCR. Ion bikromat stabil dalam suasana asam sehingga ookista *Cryptosporidium* sp. di dalam larutan kalium bikromat tidak rusak, dan DNA *Cryptosporidium* sp. dapat dideteksi dengan metode PCR. Pada penelitian Chan-Gu S dkk (2003) didapatkan bahwa di dalam larutan kalium bikromat 2,5%, ookista *C.baileyi* masih dapat bertahan hidup selama 18 bulan.²⁷

Pada penelitian terdahulu²⁴ metode pewarnaan yang digunakan adalah MTA tanpa konsentrasi terhadap 486 sampel feses anak batita yang diperiksa secara mikroskopis. Sedangkan pada penelitian sekarang ini dilakukan metode pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA) konsentrasi terhadap 188 feses anak batita yang disimpan di kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan. Teknik konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah teknik air - eter. Feses dikonsentrasi untuk mendapatkan lebih banyak ookista. Dengan teknik air - eter, Bukhari dan Smith (1995) mendapatkan kembali jumlah ookista sebesar 46 sampai 75% lebih banyak dibandingkan teknik konsentrasi *sucrose density* (24 sampai 65%) dan *zinc sulfat* (22 sampai 41%).³⁸

Pada metode MTA tanpa konsentrasi, sulit mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp. karena masih bercampur dengan feses sedangkan dengan menggunakan metode MTA konsentrasi, diharapkan ookista yang ditemukan lebih banyak dan debris dari feses juga berkurang. Ookista *Cryptosporidium* sp.

tampak berbentuk bulat dan berwarna merah dengan latar belakang kehijauan. Sulitnya mendiagnosis ookista *Cryptosporidium* sp. pada pembesaran 400× karena ukuran ookista (4-6 µm) hampir mirip dengan spora jamur yang juga berwarna merah dengan pewarnaan MTA.

Ada tiga tahap untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. yaitu teknik konsentrasi, ekstraksi dan amplifikasi DNA. Larutan kalium bikromat 2,5% berwarna jingga dan dapat menghambat hasil PCR, untuk itu sangat penting untuk menghilangkan residunya. Pada teknik air-eter, pencucian dengan menambahkan air tanpa ion (deionised water) yang dilakukan berulang kali dapat membuang residu kalium bikromat 2,5% sehingga dapat mengurangi inhibitor pada hasil PCR.^{11,13,32}

Pada tahap kedua, teknik ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah teknik ekstraksi kejut panas-beku.⁴⁶ Teknik ekstraksi ini banyak menggunakan perbedaan suhu. Nitrogen cair digunakan untuk membekukan dan suhu 65°C untuk memanaskan. Masing-masing dilakukan bergantian selama 1 menit dan sebanyak 15 kali. Ookista diharapkan pecah sehingga ketika sporozoit keluar maka DNA *Cryptosporidium* sp. dapat terdeteksi.

Keberhasilan PCR sangat ditentukan oleh beberapa faktor yaitu cetakan DNA, primer (oligonukleotida), enzim polimerase dan kontaminasi DNA yang tidak diinginkan. *Cryptosporidium* sp. pada feses mempunyai inhibitor yang lebih banyak, dibandingkan dengan *Cryptosporidium* sp. yang ada di lingkungan air.

Deoxyribosa nucleic acid (DNA) dapat diisolasi dari feses. Pada pengukuran serapan DNA dan protein, rata-rata indeks kemurnian DNA dari feses yang didapatkan adalah 1,09. Yang berarti bahwa indeks kemurnian DNA di bawah 1,75 dan DNA yang didapatkan tidak murni, tetapi DNA masih dapat terdeteksi dengan metode PCR, karena cetakan DNA yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu.^{3,4} Rata-rata jumlah DNA pada feses yang didapatkan adalah sebesar 83288µg, hal itu berarti jumlah cetakan DNA cukup banyak karena setiap reaksi PCR hanya membutuhkan cetakan DNA sebanyak 0,1 – 1 µg.²⁸

Di dalam feses yang menjadi inhibitor kerja enzim polimerase pada PCR diantaranya adalah bilirubin, garam empedu dan polisakarida. Pada penelitian ini,

reaksi PCR ditambahkan larutan BSA (Bovine Serum Albumin) 4mg/ml untuk menetralkan inhibitor dari feses.⁴⁷ Yang harus diperhatikan juga adalah pada waktu menambahkan cetakan DNA. Apabila cetakan DNA disimpan di freezer, sebelum dicampur dengan reagen untuk PCR lainnya maka cetakan DNA harus divorteks kira-kira 30 detik sampai mencair. Hal itu untuk menghancurkan kristal sodium dodecyl sulfat (SDS) yang ada pada cetakan DNA. Larutan SDS yang terdapat dalam lisis buffer dapat mengganggu kerja enzim polimerase.^{13,32} Pada penelitian ini, penambahan larutan 20% tween 20 pada saat reaksi PCR dapat menetralkan efek inhibitor SDS.^{11,13,32} Penyimpanan tween 20 dapat mempengaruhi tingkat keberhasilan reaksi PCR. Tween 20, harus disimpan di botol gelap dan pada suhu 25°C.⁴⁸

Tahap terakhir untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. adalah pada saat amplifikasi DNA. Yang juga mempengaruhi hasil PCR adalah gen target / primer *Cryptosporidium* sp dan metode PCR yang digunakan. Gen 18S rRNA terdapat di ribosom subunit kecil dan sangat banyak di sitosol semua eukariot yaitu sekitar 1900 nukleotida. Gen 18S rRNA mempunyai sekuen nukleotida yang bervariasi dan konservatif. Gen 18S rRNA pada manusia mengandung delapan daerah bervariasi sebesar 432 basa sedangkan struktur daerah konservatif yang telah diuji pada semua spesies, sebesar 1438 basa. Daerah konservatif menunjukkan penyimpangan sekuen hanya 0,1% antara gen tikus dan manusia yang terjadi kira-kira 80 juta tahun yang lalu akibat mamalia diradiasi.⁹ Jadi, gen 18S rRNA merupakan kontrol internal yang terbaik pada PCR, karena menunjukkan lebih sedikit variasi dalam ekspresi berbagai keadaan / kondisi daripada gen lainnya. Beberapa penelitian yang menggunakan gen 18S rRNA melaporkan lebih sensitif dan spesifik dari gen target lainnya karena dapat mendeteksi satu ookista *Cryptosporidium* sp.^{10,25,32,38} Metode PCR yang dilakukan oleh Nichlos dkk (2003) adalah PCR langsung (*direct*) dan PCR nested. Hasil yang didapatkan dengan PCR langsung dan PCR nested secara statistik tidak berbeda bermakna, hanya intensitas pita DNA *Cryptosporidium* sp. pada PCR langsung lebih tipis dibandingkan dengan hasil PCR nested.⁴⁹

Pada penelitian ini, gen target yang digunakan adalah gen 18S rRNA dengan metode PCR langsung. Tujuannya untuk melihat apakah *Cryptosporidium* sp.

pada feses anak batita yang disimpan di kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan masih dapat terdeteksi dengan gen 18S rRNA dengan metode PCR langsung.

Morgan dkk (1998) melakukan perbandingan metode mikroskopis pewarnaan Zielh Neelsen tahan asam dengan PCR untuk mendeteksi *Cryptosporidium parvum* pada spesimen feses orang dewasa yang diare. Hasil yang didapatkan dengan metode mikroskopis sebesar 5,6% (29/511) dan PCR 7% (36/511). Walaupun hasil deteksi *Cryptosporidium parvum* dengan metode mikroskopis hampir sama dengan metode PCR, tetapi secara statistik ada perbedaan bermakna karena $P < 0,05$.⁴⁵

Pada penelitian terdahulu²⁴ pada 486 sampel feses anak batita yang bertempat tinggal di Bantaran Sungai Ciliwung kelurahan kampung Melayu didapatkan prevalensi rendah dengan metode MTA tanpa konsentrasi.

Berdasarkan pada penelitian sekarang ini, sebanyak 188 sampel feses dikonsentrasikan dan dipulas dengan metode pewarnaan MTA. Hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dengan metode MTA konsentrasi didapatkan 9 sampel yang positif sedangkan hasil deteksi gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. dengan metode PCR didapatkan 65 yang positif. Terjadi peningkatan frekwensi deteksi *Cryptosporidium* sp. dengan metode PCR yaitu sebesar 34,6% dibandingkan dengan metode MTA konsentrasi (4,8%) dan MTA tanpa konsentrasi* (2,6%).

Dengan uji Mac Nemar pada SPSS 12 didapatkan nilai $P = 0,000$ yang berarti ada perbedaan bermakna ($P < 0,05$) antara metode PCR dengan metode MTA tanpa konsentrasi* maupun metode PCR dengan MTA konsentrasi. Sedangkan pada metode MTA konsentrasi dengan metode MTA tanpa konsentrasi* didapatkan perbedaan yang tidak bermakna karena nilai $P = 0,289$.

Hal ini berarti bahwa lebih baik menggunakan metode PCR dibandingkan dengan metode MTA tanpa konsentrasi* maupun MTA konsentrasi dalam mendeteksi *Cryptosporidium* sp. dengan jumlah sampel yang banyak. Tetapi tidak dianjurkan untuk memilih metode MTA konsentrasi daripada MTA tanpa konsentrasi* karena tidak berbeda bermakna. Metode MTA lebih dianjurkan pada sampel yang sedikit, karena *slide* / preparat yang negatif dapat dibuat beberapa kali untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Jumlah sampel yang

banyak akan melelahkan pemeriksa untuk mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp. secara mikroskopis.

Pada umumnya DNA dapat diisolasi dari semua bahan klinik terutama semua bahan yang mengandung sel berinti¹. Prinsip isolasi DNA pada darah dan rambut hampir sama dengan DNA pada feses, yaitu sama-sama ingin memisahkan DNA dari protein. Pengembangan metode PCR yang dilakukan pada penelitian ini adalah dalam hal teknik isolasi DNA karena ookista *Cryptosporidium* sp. dikonsentrasi dengan teknik air-eter dan diekstraksi dengan teknik kejut panas beku, serta menambahkan reagen BSA dan Tween 20, supaya inhibitor dari feses tidak mengganggu kerja enzim polimerase. Terjadinya peningkatan frekwensi *Cryptosporidium* sp. yang didapatkan pada penelitian ini karena gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada feses anak batita masih terdeteksi walaupun feses sudah disimpan dalam larutan kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan.



6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN

- 6.1.1 Gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada feses berhasil dideteksi dengan metode PCR.
- 6.1.2 Penyimpanan *Cryptosporidium* sp. pada feses dalam larutan kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan tidak mempengaruhi hasil deteksi pada metode PCR maupun MTA.
- 6.1.3 Terjadi kenaikan frekwensi *Cryptosporidium* sp. pada anak batita di Jakarta dengan metode PCR sebesar 34,6%.

6.2. SARAN

Diperlukan penelitian lanjutan untuk menyingkirkan positif palsu dengan cara melanjutkan ke teknik PCR-RFLP atau sekuen DNA sehingga spesies dari *Cryptosporidium* dan sumber infeksi dapat diketahui.

DAFTAR REFERENSI

1. Wanandi SI, Kurniati MVV. Biologi molekuler II: Isolasi DNA genom. Bagian Biokimia FKUI. penyusun. Biokimia Eksperimen Laboratorium. 1st ed. Jakarta:Widya Medika; 2001.p.124-8.
2. Saiki RK. The Design and optimization of the PCR. Dalam Erlich H. Editor. PCR technology principles and application for DNA amplification. New York:Stockton Press; 1989.p.7-16.
3. Atmadja DS. Polymerase chain reaction (PCR) dan aplikasinya dalam bidang forensik. Maj Kedok Indon 1992; 43(4):239-43.
4. Yuwono T. Teori dan aplikasi polymerase chain reaction. Yogyakarta:ANDI; 2006.p.1-3.
5. Granner DK. Struktur dan fungsi asam nukleat. Dalam Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Editor. Hartono A alih bahasa. Biokimia harper.25th ed. Jakarta:EGC; 2001.p.389,413,442.
6. Koolman J, Röhm KH. Editor Genetika molekuler. Wanandi SI alih bahasa. Atlas berwarna & teks biokimia. Jakarta:Hipokrates; 1995.p.227-8.
7. Xia X, Xie Z, Kjer KM. 18S ribosomal RNA and tetrapod phylogeny. Syst Biol 2003; 52 (3): 283-95.
8. Glitz D. Protein synthesis: translation and posttranslation modification. Devlin TM. Editor. Textbook of biochemistry with clinical correlations. 5^{ed} New York:Wiley-Lis; 2002.p.243.
9. Gonzalez IL, Schmickel RD. The Human 18S Ribosomal RNA gene: evolution and stability. Alm J Hum Genet 1986;38:419-27.
10. Xiao L, Escalante L, Yang C. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-sub unit r RNA gene locus. Applied and Environ Microbiol 1999;65(4):1578-83.

11. Cryptosporidiosis. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Diunduh dari http://oie.int/eng/normes/mmanual/A_00135.htm. 4 Maret 2007.
12. Clark, DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Reviews* 1999;554-63.
13. Smith HV, Nichols RAB. *Cryptosporidium* dalam Foodborne Diseases. Shabbir Simjee editor. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007.p.233-76.
14. Fayer R, Ungar BLP. *Cryptosporidium spp.* and cryptosporidiosis. *Microbiol. Reviews* 1986;50(4):458-83.
15. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Checkley W, Cabrera L dkk. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima Peru. *J Infect Dis* 2001;183:492-7.
16. Current WL, Garcia LS. Reviews cryptosporidiosis. *Clin Microbiol* 1991;4(3):325-58.
17. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holsvher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 1976;70(4):592-8.
18. Isaacs D, Hunt GH, Phillips AD, Price EH, Raafat F, Walker-Smith JA. Cryptosporidiosis in immunocompetent children. *J Clin Pathol* 1985;38:76-1.
19. Molbak K, Hojlyng N, Gottschau A, Correia Sa JC, Ingholt L, da Silva APJ, dkk. Cryptosporidiosis in infancy and childhood mortality in Guinea Bissau, West Africa. *BMJ* 1993;307:1417-20.
20. Iqbal J, Munir MA, Khan MA. *Cryptosporidium* infection in young children with diarrhea in Rawalpindi, Pakistan. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60(5):868-70.
21. Mirzaei M. Prevalence of *Cryptosporidium sp.* infection in diarrheic and non-diarrheic humans in Iran. *Korean J Parasitol* 2007;45(2):133-7.

22. Kurniawan A, Karyadi T, Yuniastuti E, Djauzi S. Opportunistic parasitic infections in HIV / AIDS patients with diarrhea in Jakarta, Indonesia. Food Borne Parasitic Zoonoses 5th Seminar. November 2006.
23. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens . J Clin Microbiol 1983;18(1):185-90.
24. Soetomenggolo HA. *Cryptosporidiosis* pada anak usia dibawah tiga tahun di daerah bantaran sungai ciliwung kelurahan kampung melayu. [tesis]. Jakarta:FKUI; 2006.
25. Sulaiman IM, Xiao L, Lal AA. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* Genotyping Techniques . Appl Env Microbiol 1999;65(10):4431-5.
26. Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples. Appl Environ Microbiol 1995; 61:3849-55.
27. Surl Chan-Gu, Kim Se-Min, Kim Hyeon-Cheol. Viability of preserved *Cryptosporidium baileyi* oocysts. Korean J Parasitol 2003;41(4):197-201.
28. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning laboratory manual. 3th ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.p.1-25.
29. Abramson RD. Thermostable DNA polymerase. Toronto: Academic Press; 1995.p.39-53.
30. Newton CR, Graham A. Basic principles and methods PCR. 2nd. Oxon London:Bios Scientific Publishers; 1997.p.1- 46.
31. Vanfleteren J. Principle of PCR. Diunduh dari <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. 23 Juli 2008.

32. Smith HV. Diagnosis of human and livestock cryptosporidiosis. (Chapter 6) dalam *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R, Xiao L editor. 2nd ed. London: CRC press; 2007.p.173-203.
33. Gandahasada S. New emerging diseases: *Cryptosporidium*. Parasitologi Kedokteran. Gandahasada S, Ilahude HD, Pribadi W. 3th ed. Jakarta: Balai penerbit FKUI; 2002.p.161-4.
34. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Rich SM, Widmer AG dkk. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in mulago hospital, Kampala, Uganda. J Trop Med Hyg 2003;68(6):710-5.
35. 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.
36. Gonçalves EM do N, da Silva AJ, Eduardo MB de P, Uemura IH, Moura INS, Castilho VLP dkk. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in são paulo. Clinics 2006 Apr;61(2):119-26.
37. *Cryptosporidium* spp. dalam Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis
Diunduh dari
http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/html/PDF_Files/Crypto_benchaid.pdf tanggal 15 Oktober 2008.
38. Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine faeces. J Clin Microbiol 1995;33:2592-5.
39. Nichols RAB, Campbell BM, Smith HV. Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during water monitoring. Appl Env Microbiol 2006;72(8):5428-35.
40. Inoue M, Uga S, Oda T, Rai SK, Vesey G, Hotta H. Changes of physical and biochemical properties of *Cryptosporidium* oocysts with various storage conditions. Water Res 2006;40(5):881-6.

41. Chen F, Huang K, Qin S, Zhao Y, Pan C. Comparison of viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in potassium dichromate solution and chlorinated tap water. *Vet Parasitol* 2007;150(1-2):13-27.
42. Svehla G. Analisis anorganik kualitatif makro dan semimikro. Setiono L, Pudjaatmaka AH alih bahasa. Jakarta:Kalman Media Pusaka; 1990.p.384-5.
43. Surakiti. Kimia Untuk kelas 3 SMA. Klaten:Intan Pariwara; 1989.p.104-5.
44. Sastroasmoro S, Sofyan I. Dasar-dasar metodologi penelitian Klinis. 2nd ed. Jakarta:Sagung Seto; 2002.p.273.
45. Morgan UM, L. Pallant, B. W. Dwyer, D. A. Forbes,G. Rich,R.C. A. Thompson. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):995-8.
46. Nichols RAB, Smith HV. Optimisation of DNA extraction and molecular detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural mineral water sources. *J Food Prot* 2004;67:524-32.
47. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 1975;415:29-79.
48. Sigma. Tween 20. Product information. Diunduh dari <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/p5927pis.pdf>. 15 Mei 2008.
49. Nichols RAB, Campbell B, Smith HV. Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in UK noncarbonated natural mineral waters and drinking waters using a modified nested PCR-RFLP assay. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4183-9.

Lampiran 1:**Komposisi Dan Cara Pembuatan Larutan****Primer yang digunakan :**

CPB DIAG *forward primer*

5' AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG 3'

CPB DIAG *reverse primer*

5'TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG 3'

Lisis Buffer:

Tris -HCl 1M pH 8,5 → 5ml

EDTA 0,5M pH 8 → 0,2ml

SDS 10% → 5ml

Semua bahan dicampur dan ditambahkan ddH₂O sampai volum 100ml

TBE 5x dalam 500 ml

- 27gram Tris base
- 13.65gram Boric Acid
- 2ml 0.5M EDTA pH 8.0

Semua bahan dicampur dan ditambahkan ddH₂O sampai volum 500ml.

TBE 0,5x dalam 1000ml

- Diambil 100ml TBE5x lalu ditambahkan 900ml ddH₂O.

Lampiran 2:

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada metode PCR dengan MTA Konsentrasi

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MTA * PCR	188	100.0%	0	.0%	188	100.0%

MTA * PCR Crosstabulation

			PCR		Total
			negatif	positif	
MTA negatif	Count		123	56	179
	% within MTA		68.7%	31.3%	100.0%
	% within PCR		100.0%	86.2%	95.2%
	% of Total		65.4%	29.8%	95.2%
positif	Count		0	9	9
	% within MTA		.0%	100.0%	100.0%
	% within PCR		.0%	13.8%	4.8%
	% of Total		.0%	4.8%	4.8%
Total	Count		123	65	188
	% within MTA		65.4%	34.6%	100.0%
	% within PCR		100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total		65.4%	34.6%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.000 ^a
N of Valid Cases	188	

a. Binomial distribution used.

Lampiran 3:

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada metode PCR dengan MTA Tanpa Konsentrasi *

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MTA Tanpa Konsentrasi * PCR	188	100.0%	0	.0%	188	100.0%

MTA Tanpa Konsentrasi * PCR Crosstabulation

			PCR		Total
			negatif	positif	
MTA Tanpa Konsentrasi	negatif	Count	123	60	183
		% within MTA Tanpa Konsentrasi	67.2%	32.8%	100.0%
		% within PCR	100.0%	92.3%	97.3%
		% of Total	65.4%	31.9%	97.3%
	positif	Count	0	5	5
		% within MTA Tanpa Konsentrasi	.0%	100.0%	100.0%
		% within PCR	.0%	7.7%	2.7%
		% of Total	.0%	2.7%	2.7%
Total		Count	123	65	188
		% within MTA Tanpa Konsentrasi	65.4%	34.6%	100.0%
		% within PCR	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	65.4%	34.6%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.000 ^a
N of Valid Cases	188	

a. Binomial distribution used.

Lampiran 4:

Perbandingan Hasil *Cryptosporidium* sp. pada Metode MTA Konsentrasi dengan MTA Tanpa Konsentrasi*

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MTA Tanpa Konsentrasi * MTA Konsentrasi	188	100.0%	0	.0%	188	100.0%

MTA Tanpa Konsentrasi * MTA Konsentrasi Crosstabulation

			MTA Konsentrasi		Total
			negatif	positif	
MTA Tanpa Konsentrasi	negatif	Count	177	6	183
		% within MTA Tanpa Konsentrasi	96.7%	3.3%	100.0%
		% within MTA Konsentrasi	98.9%	66.7%	97.3%
		% of Total	94.1%	3.2%	97.3%
	positif	Count	2	3	5
		% within MTA Tanpa Konsentrasi	40.0%	60.0%	100.0%
		% within MTA Konsentrasi	1.1%	33.3%	2.7%
		% of Total	1.1%	1.6%	2.7%
Total		Count	179	9	188
		% within MTA Tanpa Konsentrasi	95.2%	4.8%	100.0%
		% within MTA Konsentrasi	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	95.2%	4.8%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.289 ^a
N of Valid Cases	188	

a. Binomial distribution used.

RIWAYAT HIDUP



1. Nama lengkap : Sri Wahyuni Dwintasari,SSi
2. NPM : 6105012097
3. Tempat dan tanggal lahir : Padang dan 25 Maret 1978
4. Agama : Islam
5. Alamat : Jl Kramat Lontar XIV E379 RT/RW 009/01
Jakarta Pusat
6. Pekerjaan : Staf Laboratorium Departemen Parasitologi FKUI
7. Alamat Instansi : Jl Salemba Raya No 6 Jakarta Pusat
8. Riwayat Pendidikan

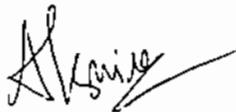
SD	Fransiskus Padang	tahun 1984 -1990
SMP	Frater Padang	tahun 1991 -1993
SMAN	Tambun Bekasi	tahun 1994-1996
D3	Akademi Kimia Analisis Jakarta	tahun 1997-1999
S1	Univesitas Nusa Bangsa Bogor	tahun 2003-2005
9. Riwayat Pekerjaan
 1. April 1999 - Juni 1999 Praktek Kerja Lapangan di Pusat Peneltitian dan Pengembangan Gizi Bogor.
 2. April 2000 - Maret 2006 asisten penelitian pada Dr Agnes Kurniawan, PhD, SpParK di Departemen Parasitologi FKUI.
 3. April 2006 – sekarang Staf Laboratorium Departemen Parasitologi FKUI.
10. Pengalaman Penelitian
 1. April 2002 – Juni 2002 Pelatihan Bidang Teknik Biologi Molekuler di ICAPB,Lab Prof R.M Maizels, University of Edinburgh, Scotland.
 2. April 2003 – Juni 2003 Pelatihan Bidang Teknik Biologi Molekuler di ICAPB,Lab Prof R.M Maizels, University of Edinburgh, Scotland

11. Publikasi/ karya ilmiah/ skripsi

1. Kurniawan Atmadja A, Canister D, **Dwintasari SW**, Charlesworth D, Maizels RM .Genetic Variation in a Human Parasitic Helminth :Highly Polymorphic Microfilarial Sheath Antigens in *Brugia malayi*. Submitted to JID.2004.
2. **Dwintasari SW**. Deteksi DNA *Brugia malayi* dari Sediaan Darah Filter yang tersimpan 15 tahun dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Skripsi 2005.
3. 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.
4. 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, Jakarta, 8 September 2007.
5. **Dwintasari SW**, Kurniawan A. Analisis filogenetik *Cryptosporidium* berdasarkan gen rRNA sub-unit kecil. MK UKI 2008;4(26):160-6.
6. 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 Joint International Tropical Medicine Meeting, Bangkok, 13 Oktober 2008.

12. Sumber dana penelitian Tesis PMIB FKUI adalah dari British Council, penelitian DelpHE 73.

Jakarta, 2 Desember 2008



(Sri Wahyuni Dwintasari)

Pengembangan Metode PCR untuk Deteksi Gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada Feses yang Disimpan dalam Larutan Kalium Bikromat.

Agnes Kurniawan,* Sri Wahyuni Dwintasari ,*[^] Septelia Inawati Wanandi[^]

*Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

[^]Departemen Biokimia dan Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Metode PCR dapat digunakan untuk mengidentifikasi DNA suatu organisme. Identifikasi gen 18S rRNA sudah banyak dipakai untuk mempelajari sejumlah organisme eukariot seperti tanaman, hewan dan protozoa termasuk *Cryptosporidium* sp. Penelitian terdahulu pada anak batita di daerah kumuh dan rawan banjir di Jakarta yang dideteksi secara mikroskopis dengan pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA), didapatkan prevalensi 2,1% yang rendah dibandingkan negara berkembang lain yang keadaan lingkungan dan populasinya mirip Indonesia. Deteksi *Cryptosporidium* sp. secara molekular di feses dengan PCR memungkinkan diagnosis lebih akurat dan cepat. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode PCR untuk deteksi gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada feses yang disimpan dalam larutan kalium bikromat. Sejumlah 188 sampel feses yang disimpan dalam larutan kalium bikromat dikonsentrasikan dengan teknik air-eter, selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA terhadap konsentrat dan sebagian lagi dipulas dengan MTA. Amplifikasi DNA *Cryptosporidium* terhadap gen 18S rRNA dilakukan dengan program PCR langsung, siklus 39 kali. Hasil pemeriksaan dengan metode MTA konsentrasi didapatkan sembilan sampel positif (4,8%) sedangkan dengan PCR didapatkan 65 sampel positif (34,6%). Larutan kalium bikromat dapat dipakai untuk penyimpanan ookista *Cryptosporidium* sp. tanpa mempengaruhi hasil PCR maupun mikroskopis.

Kata kunci: diagnosis molekular, modifikasi tahan asam, teknik air-eter

Development of PCR method to Detect *Cryptosporidium* sp. 18S rRNA Gene from Stools Preserved in Potassium Dichromate Solution

Agnes Kurniawan,* Sri Wahyuni Dwintasari ,*[^] Septelia Inawati Wanandi[^]

*Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

[^]Departemen Biokimia dan Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

PCR method can be used to characterize an organism DNA. Identification of 18S rRNA gene has been widely used to study eukaryotes like plants, animals and protozoa such as *Cryptosporidium* sp. Previous study on *Cryptosporidium* sp. in children under three years old in a slum area in Jakarta, detected by direct modified acid fast (MAF) showed 2.1% prevalence, which was unexpectedly much lower than other developing country with similar environment and study population. Detection of *Cryptosporidium* sp. by molecular technique, PCR will offer more accurate and efficient diagnosis. This aim of study is detecting *Cryptosporidium* sp. 18S rRNA gene of stool sample using PCR. There were 188 stool samples which have been kept in 2.5% potassium dichromate for 13 months. These samples were concentrated by water-ether technique, extracted the DNA and stained by MAF. Amplification of *Cryptosporidium* sp. 18S rRNA Gene was using direct PCR for 39 cycles. The result of samples with MAF has found 9 positive (4,8%) and samples with PCR has presented 65 positive (34,6%). Potassium dichromate solution can be used to preserve oocysts of *Cryptosporidium* sp since it does not interfere the PCR and microscopic examination result.

Keywords: molecular diagnosis, modified acid fast, water-ether technique

Pendahuluan

Deoxyribosa nucleic acid (DNA) genom dapat diisolasi dari semua bahan biologis / klinik seperti darah, semen, rambut, tulang, feses, sputum dan lain-lain. Bahan yang paling sering digunakan untuk tujuan isolasi DNA adalah darah dan rambut, karena kedua bahan tersebut relatif mudah diperoleh. DNA genom yang diisolasi dapat digunakan untuk identifikasi DNA suatu organisme dengan menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR).¹

Metode PCR pertama kali ditemukan oleh Mullis pada tahun 1985. Metode ini dikembangkan oleh Departemen Genetika Manusia Cetus Corporation California yang mengamplifikasi DNA beta globin manusia untuk diagnosis prenatal kelainan genetik anemia sel sabit.² Tahapan pengerjaan PCR secara umum yaitu isolasi DNA/RNA, pengecekan integritas isolat DNA/RNA secara spektrofotometrik dan elektroforesis agarosa, komponen reaksi PCR, pemrograman reaksi PCR, amplifikasi reaksi, dan deteksi/evaluasi hasil reaksi.³ Pada metode PCR, DNA yang diamplifikasikan tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu, dalam jumlah yang sedikit akan terdegradasi sehingga sebagian DNA akan rusak, namun tetap dapat digunakan sebagai cetakan DNA.⁴

Karakteristik ribosomal RNA (rRNA) sangat penting di dalam dunia kedokteran dan evolusi.⁵ Di dunia kedokteran rRNA merupakan target bagi antibiotik⁶ sedangkan pada evolusi, rRNA dapat digunakan untuk identifikasi taksonomi suatu organisme, menghitung kedekatan hubungan dengan grup lain dan

memperkirakan tingkat divergensi suatu spesies.⁷ rRNA terdapat pada semua organisme baik prokariot maupun eukariot. rRNA terdiri atas gen sub-unit besar dan sub-unit kecil.⁸ Penamaan sub-unit besar dan sub-unit kecil pada ribosom berdasarkan koefisien sedimentasi *Svedberg* dengan lambang S.^{5,6,8}

Gen 18S rRNA berada di dalam ribosom sub-unit kecil sitosol eukariot.^{5,6,8} Pemilihan gen 18S rRNA adalah untuk tujuan identifikasi karena secara fungsional dan evolusioner memiliki sifat homolog dari berbagai eukariot yang berbeda.⁹ Jumlah gen 18S rRNA sekitar 1900 nukleotida dan mempunyai sekuen nukleotida konservatif 3 kali lebih banyak daripada sekuen nukleotida bervariasi.^{5,6,8,9} Identifikasi gen 18S rRNA dipakai untuk mempelajari sejumlah organisme eukariot seperti tanaman, hewan dan protozoa termasuk *Cryptosporidium*.¹⁰

Cryptosporidium sp. adalah protozoa usus dari kelompok coccidia yang ditemukan pertama kali oleh Ernest Edward Tyzzer tahun 1907 di mukosa lambung tikus dan dinamakan *Cryptosporidium muris*.¹¹ *Cryptosporidium* sp. dapat menyebabkan diare pada individu yang imunokompeten maupun imunokompromis dengan gejala klinis lebih berat pada imunokompromis.¹²

Penularan *Cryptosporidium* sp. berhubungan dengan kontaminasi feses. Ada beberapa cara penularan *Cryptosporidium* sp. yaitu dari manusia ke manusia, dari hewan ke manusia serta melalui makanan dan air minum.¹³ Hewan yang sering terinfeksi *Cryptosporidium* sp. adalah mamalia, unggas, reptil dan

ikan.¹⁴ Distribusi spesies dari *Cryptosporidium* sp. berbeda-beda tergantung geografis maupun jenis hospes. Ookista *Cryptosporidium* sp. dapat ditemukan lebih dari satu spesies dalam satu individu.¹⁴

Infeksi *Cryptosporidium* sp. bersifat kosmopolitan. Keadaan ekonomi rendah dengan sanitasi dan pengolahan air yang kurang baik akan berdampak pada tingginya angka infeksi dan dapat menyebabkan terjadinya wabah diare.¹⁶ Infeksi *Cryptosporidium* sp. dilaporkan pertama kali tahun 1976 pada anak perempuan berumur tiga tahun.¹⁷ *Cryptosporidium* sp. lebih sering menginfeksi anak-anak dan penderita imunokompromis.^{13,14,16}

Prevalensi *Cryptosporidium* sp. sangat beragam. Beberapa penelitian menyatakan bahwa prevalensi *Cryptosporidium* sp. terbanyak pada anak berumur kurang dari dua tahun.^{14,16} Antara tahun 2005-2006, insiden *Cryptosporidium* sp. pada pemeriksaan feses penderita HIV yang datang ke laboratorium departemen Parasitologi FKUI adalah 2,4%.¹⁸ Prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak dengan diare kronik di London sebesar 3,2%¹⁹, di Afrika Barat 11,4% pada anak diare berumur kurang dari lima bulan.²⁰ Di Rawalpindi Pakistan, didapatkan prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak diare sebesar 10,3% dan 3,3% anak tanpa diare.²¹ Di Iran, prevalensi sp. pada orang dewasa dengan diare sebesar 25,6%, lebih tinggi dari orang dewasa yang tanpa diare yaitu 3,7%.² Semua data prevalensi tersebut didapatkan dengan mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp. secara mikroskopis yang dipulas dengan pewarnaan¹⁸⁻²² Perwarnaannya modifikasi tahan asam (MTA)

merupakan metode mikroskopis untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. yang umum dipakai oleh berbagai laboratorium di dunia termasuk Indonesia.²³

Penelitian pendahuluan pada anak berumur bawah tiga tahun (batita) di daerah kumuh dan rawan banjir di Jakarta didapatkan prevalensi sebesar 2,1% (10/486).²⁴ Metode MTA yang digunakan adalah metode MTA dengan feses tidak dikonsentrasi. Prevalensi *Cryptosporidium* sp. pada anak batita di daerah kumuh dan rawan banjir di Jakarta sangat rendah dibandingkan negara berkembang lainnya yang keadaan lingkungan dan populasinya mirip Indonesia. Penggunaan metode MTA pada survei epidemiologi membutuhkan waktu yang cukup lama. Metode ini memerlukan tenaga mikroskopis yang handal dan sudah terlatih dalam mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp. Bentuk dan ukuran ookista *Cryptosporidium* sp. sangat kecil, umumnya 4-6 μm .^{13,14,16} sehingga sulit terdeteksi. Untuk itu dikembangkanlah metode deteksi *Cryptosporidium* sp yang lebih sensitif dan spesifik yaitu metode PCR. *Cryptosporidium* sp. yang ada dalam feses, banyak terdapat inhibitor yang mengganggu hasil PCR. Gen target dan larutan penyimpanan merupakan faktor penting untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. dalam metode PCR.

Penelitian mengenai gen target yang digunakan untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. ada bermacam-macam diantaranya yaitu *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) dan *small-subunit* (SSU) rRNA / gen 18S rRNA.²⁵ Sulaiman dkk (1999) mengevaluasi gen target

yang paling sensitif dan spesifik untuk *Cryptosporidium* sp. adalah gen target 18S rRNA, karena dapat mendeteksi satu ookista *Cryptosporidium* sp.^{10,25}

Apabila jumlah sampel banyak dan tidak langsung diperiksa, seharusnya disimpan dalam larutan pengawet untuk dilakukan pemeriksaan lebih lanjut. Pada umumnya ookista *Cryptosporidium* sp. dapat disimpan dalam larutan formalin dan kalium bikromat. Lama penyimpanan dan jenis larutan pengawet merupakan faktor penting untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. Johnson dkk (1995), menggunakan larutan kalium bikromat 2,5% sebagai larutan pengawet yang terbaik yang tidak mengganggu hasil PCR.²⁶ Viabilitas ookista *Cryptosporidium baileyi* yang disimpan dalam larutan kalium bikromat 2,5% tidak terjadi penurunan dan masih dapat bertahan selama 18 bulan.²⁷

Prevalensi *Cryptosporidium* sp. yang didapatkan pada penelitian terdahulu, rendah sehingga menimbulkan pertanyaan apakah rendahnya prevalensi *Cryptosporidium* sp. memang mewakili keadaan yang sebenarnya atau akibat metode pemeriksaan yang kurang sensitif dan terbatasnya ketrampilan si pemeriksa sehingga memberikan hasil negatif palsu? Untuk itu dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap sampel tersebut dengan metode PCR.

Bahan dan Cara Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi FKUI sejak Februari 2007 sampai dengan Mei 2008. Sampel yang digunakan sebanyak 188 feses anak batita, diambil pada suatu survai oleh

peneliti terdahulu²⁴ (Soetomenggolo, 2006) dari populasi yang bertempat tinggal di Bantaran Sungai Ciliwung kelurahan kampung Melayu. Sampel feses disimpan di dalam larutan kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan.

Konsentrasi Feses²⁸

Sampel feses sebanyak 200 μ l dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* 1500 μ l, selanjutnya ditambahkan 700 μ l aquabidest, divorteks selama 30 detik. Ditambahkan 400 μ l dietil eter, di bolak balik sebanyak 10 kali. Sampel kemudian disentrifugasi pada 13000xg selama 1 menit. Supernatan dibuang dan disisakan kira-kira 200 μ l, selanjutnya ditambahkan 1 ml aquabidest steril, divorteks selama 30 detik. Pencucian diulangi lagi dengan penambahan 1ml aquabidest. Pelet disisakan 50 μ l lalu ditambahkan 100 μ l *lysis buffer* (LB). Divorteks selama 10 detik. Konsentrat dapat disimpan di kulkas 4°C untuk dilakukan prosedur selanjutnya.

Deteksi Ookista *Cryptosporidium* dari Feses Konsentrat^{11,29}

Hasil konsentrasi (konsentrat) sebanyak 10 μ l, dioleskan di atas kaca objek, kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya difiksasi dengan metanol absolut selama 3 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam botol pewarnaan berisi larutan *carbol fuchsin* selama 15 menit. Selanjutnya dicuci di bawah air mengalir, lalu dicelupkan ke dalam larutan metanol HCl 1% selama 10 - 15 detik. Kemudian dicuci di bawah air mengalir dan diberi pulasan dengan *malachite green* 0,4% selama 30

detik. Selanjutnya dicuci di bawah air mengalir, dikeringkan pada suhu ruang. Hasil diperiksa di bawah mikroskop pada pembesaran 400× dan 1000×

Ekstraksi DNA *Cryptosporidium*³⁰

Konsentrat 100 µl dibekukan dalam nitrogen cair selama 1 menit lalu dipindahkan di penangas air 65°C selama 1 menit. Hal tersebut diulangi sebanyak 15 kali. Apabila di dalam konsentrat berisi partikel besar, maka divorteks setiap 5 kali dan disentrifugasi. Setelah selesai dengan proses di atas, ditambahkan 2 µl larutan *proteinase K* 10% lalu diinkubasi di penangas air 55°C selama 3 jam. Selanjutnya dipindahkan ke penangas air 90°C selama 20 menit dan dimasukkan ke dalam es selama 1 menit, lalu disentrifugasi pada 13000×g selama 5 menit. Supernatan diambil sebanyak 80 µl, dipindahkan ke tabung *ependorf* 500 µl dan disimpan di freezer -20°C sampai dilakukan PCR.

PCR Gen 18S rRNA^{11,31}

Amplifikasi DNA *Cryptosporidium* dilakukan terhadap gen target 18S rRNA. Optimasi terhadap kondisi PCR langsung dilakukan dengan menggunakan sampel positif pasien kriptosporidiosis. Reaksi PCR dilakukan pada *thermal cycler* dan diamplifikasi sebanyak 39 siklus. Volume total reaksi 25 µl dengan reagensia *Taq* buffer 10x, 2mM dNTP, 4mg/ml BSA, 20%Tween 20, 25mM MgCl₂, Primer CPBDIAGF (5'AAGCTCGTAGTTGGATTCTG3') dan CPBDIAGR (5'TAAGGTGCTGAAGGAGTAA GG3'), *Taq* polimerase.

Elektroforesis Hasil PCR

Sebanyak 10 µl hasil PCR produk diambil lalu dicampur dengan 3 µl larutan 6× *loading dye* dan dimasukkan ke dalam masing-masing lubang cetakan agar. Dielektroforesis pada tegangan 100V selama 1-2 jam, dilihat hasilnya di *UV Transilluminator* 312 nm dan didokumentasikan. Produk ampikon yang diharapkan adalah pada panjang 435 pb.^{30,31} Dalam setiap PCR selalu digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Sebagai kontrol positif adalah cetakan DNA *Cryptosporidium* pemberian Scottish Parasite Diagnostic Laboratory United Kingdom (SPDL UK) dan DNA *Cryptosporidium* dari pasien kriptosporidiosis pemberian dari departemen Parasitologi FKUI. Sebagai kontrol negatif adalah semua reagensia untuk PCR tanpa cetakan DNA.

Hasil

1. Konsentrasi Feses dan Deteksi Ookista *Cryptosporidium* sp

Sampel feses anak batita sebanyak 188 sampel feses dikonsentrasikan sesuai cara kerja Bukhari dan Smith (1995)²⁸. Hasil konsentrasi (konsentrat) sebanyak 10 µl dioleskan di kaca objek lalu dipulas dengan metode pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA). Untuk mengetahui keberhasilan teknik konsentrasi, maka digunakan kontrol positif yaitu feses penderita kriptosporidiosis pemberian dari departemen Parasitologi FKUI. Hasil positif dapat dilihat dengan pembesaran 400× dan 1000×. Hasil positif ookista *Cryptosporidium* sp. berwarna merah dengan latar belakang kehijauan. (gambar 4.1).



Gambar 4.1: Ookista *Cryptosporidium sp* dari Feses Penderita Kriptosporidiosis Dipulas dengan Teknik MTA Pembesaran 10×40

2. Optimasi PCR Gen 18S rRNA *Cryptosporidium*

Standar larutan dan program direct (langsung) PCR diadaptasi dari Nichols dkk (2002).³¹ Untuk mengetahui keberhasilan metode PCR digunakan cetakan DNA *Cryptosporidium* pemberian dari SPDL UK sebagai kontrol positif pertama dan cetakan DNA penderita kriptosporidiosis dari departemen Parasitologi FKUI sebagai kontrol positif kedua.



1 2 3 4 5 6

Gambar 4.5 : Hasil Elektroforesis PCR DNA *Cryptosporidium* pada Kontrol Positif 1 dan 2 dengan Pengenceran Cetakan DNA
Kolom 1 = DNA marker 100bp (Promega)
Kolom 2 = Kontrol positif 1
Kolom 3 = Kontrol positif 2 (1:9)
Kolom 4 = Kontrol positif 2 (1:5)
Kolom 5 = Kontrol positif 2 (1:1)
Kolom 6 = Kontrol negatif

Amplikon yang sesuai baik pada pengenceran 1/10, 1/6 dan 1/2 sedangkan pemakaian cetakan DNA yang berlebihan memberikan hasil negatif dan menghambat reaksi PCR.

Tidak didapatkan perbedaan intensitas pita baik pada pengenceran tinggi maupun rendah sehingga untuk penelitian selanjutnya, digunakan kontrol positif kedua pada pengenceran 1/10.

3. Hasil *Cryptosporidium sp.* dengan metode MTA dan PCR.

Pada penelitian ini, dari 188 sampel feses didapatkan 9 yang positif ookista *Cryptosporidium sp.* dengan metode MTA sedangkan pada PCR didapatkan sebesar 65 DNA *Cryptosporidium sp.* ada Tabel 4.1 diperlihatkan frekwensi *Cryptosporidium sp.* pada metode PCR dengan metode MTA yang dikonsentrasi dan metode MTA tanpa konsentrasi*.

Tabel 4.1 Perbandingan Metode PCR dan MTA untuk Deteksi *Cryptosporidium sp.*

Metode(n=188)	Jumlah	
	positif	negatif
	65	
PCR	(34,6%)	123(65,4)
MTA yang dikonsentrasi	9 (4,8%)	179 (95,2%)
MTA tanpa konsentrasi*	5 (2,6%)	183(97,3%)

Ket * sumber data dari penelitian H A Soetomenggolo (2006)²⁴

Uji Mac Nemar dilakukan terhadap metode PCR dengan metode MTA tanpa konsentrasi* maupun MTA konsentrasi. Didapatkan nilai $P=0,000$ pada metode PCR dengan MTA tanpa konsentrasi* dan juga nilai $P=0,000$ pada metode MTA konsentrasi. Sedangkan pada metode MTA konsentrasi dengan metode MTA tanpa konsentrasi* didapatkan nilai $P=0,289$.

Diskusi:

Cryptosporidium sp. dapat dideteksi dari spesimen feses, sputum dan jaringan biopsi. Pada umumnya *Cryptosporidium* sp. lebih banyak ditemukan di feses, karena tempat hidupnya di saluran cerna sehingga kasus-kasus kriptosporidiosis intestinalis merupakan manifestasi yang umum ditemukan.

Pada penelitian Johnson dkk (1995) lama penyimpanan dan jenis larutan pengawet akan mempengaruhi hasil PCR. DNA *Cryptosporidium* sp. di dalam larutan kalium bikromat 2,5% selama 6 bulan masih dapat terdeteksi, sedangkan penyimpanan di larutan formalin 10% DNA *Cryptosporidium* sp. sudah tidak terdeteksi lagi.²⁶ Ookista *Cryptosporidium* sp. yang disimpan dalam larutan formalin

10%, dapat merusak ookista yang mengakibatkan dinding ookista menjadi keras, dan sporozoit sulit keluar sehingga sulit dideteksi dengan metode PCR. Ion bikromat stabil dalam suasana asam sehingga ookista *Cryptosporidium* sp. di dalam larutan kalium bikromat tidak rusak, dan DNA *Cryptosporidium* sp. dapat dideteksi dengan metode PCR. Pada penelitian Chan-Gu S dkk (2003) didapatkan bahwa di dalam larutan kalium bikromat 2,5%, ookista *C.baileyi* masih dapat bertahan hidup selama 18 bulan.²⁷

Pada penelitian terdahulu²⁴ metode pewarnaan yang digunakan adalah MTA tanpa konsentrasi terhadap 486 sampel feses anak batita yang diperiksa secara mikroskopis. Sedangkan pada penelitian sekarang ini dilakukan metode pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA) konsentrasi terhadap 188 feses anak batita yang disimpan di kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan. Teknik konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah teknik air - eter. Feses dikonsentrasi untuk mendapatkan lebih banyak ookista. Dengan teknik air - eter, Bukhari dan Smith (1995) mendapatkan kembali jumlah ookista sebesar 46 sampai 75% lebih banyak dibandingkan teknik konsentrasi *sucrose density* (24 sampai 65%) dan *zinc sulfat* (22 sampai 41%).²⁹

Pada metode MTA tanpa konsentrasi, sulit mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp. karena masih bercampur dengan feses sedangkan metode MTA konsentrasi, diharapkan ookista yang ditemukan lebih banyak dan sudah tidak bercampur dengan feses. Ookista *Cryptosporidium* sp. tampak berbentuk bufat dan berwarna merah

dengan latar belakang kehijauan. Sulitnya mendiagnosis ookista *Cryptosporidium* sp. pada pembesaran 400× karena ukuran ookista (4-6 µm) hampir mirip dengan spora jamur yang juga berwarna merah dengan pewarnaan MTA.

Ada tiga tahap untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. yaitu teknik konsentrasi, ekstraksi dan amplifikasi DNA. Larutan kalium bikromat 2,5% berwarna jingga dan dapat menghambat hasil PCR, untuk itu sangat penting untuk menghilangkan residunya. Pada teknik air-eter, pencucian dengan menambahkan air tanpa ion (deionised water) yang dilakukan berulang kali dapat membuang residu kalium bikromat 2,5% sehingga dapat mengurangi inhibitor pada hasil PCR.^{11,13,32}

Pada tahap kedua, teknik ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah teknik ekstraksi kejut panas-beku.³⁰ Teknik ekstraksi ini banyak menggunakan perbedaan suhu. Nitrogen cair digunakan untuk membekukan dan suhu 65°C untuk memanaskan. Masing-masing dilakukan bergantian selama 1 menit dan sebanyak 15 kali. Ookista diharapkan pecah sehingga ketika sporozoit keluar maka DNA *Cryptosporidium* sp. dapat terdeteksi.

Keberhasilan PCR sangat ditentukan oleh beberapa faktor yaitu cetakan DNA, primer (oligonukleotida), enzim polimerase dan kontaminasi DNA yang tidak diinginkan. *Cryptosporidium* sp. pada feses mempunyai inhibitor yang lebih banyak, dibandingkan dengan *Cryptosporidium* sp. yang ada di lingkungan air.

Deoxyribosa nucleic acid (DNA) dapat diisolasi dari feses. Pada pengukuran serapan DNA dan protein, rata-rata indeks kemurnian DNA dari feses yang didapatkan adalah 1,09. Yang berarti bahwa indeks kemurnian DNA di bawah 1,75 dan DNA yang didapatkan tidak murni, tetapi DNA masih dapat terdeteksi dengan metode PCR, karena cetakan DNA yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu.^{3,4} Rata-rata jumlah DNA pada feses yang didapatkan adalah sebesar 83288µg, hal itu berarti jumlah cetakan DNA cukup banyak karena setiap reaksi PCR hanya membutuhkan cetakan DNA sebanyak 0,1 – 1 µg.³²

Di dalam feses yang menjadi inhibitor kerja enzim polimerase pada PCR diantaranya adalah bilirubin, garam empedu dan polisakarida. Pada penelitian ini, reaksi PCR ditambahkan larutan BSA (Bovine Serum Albumin) 4mg/ml untuk menetralkan inhibitor dari feses.³³ Yang harus diperhatikan juga adalah pada waktu menambahkan cetakan DNA. Apabila cetakan DNA disimpan di freezer, sebelum dicampur dengan reagen untuk PCR lainnya maka cetakan DNA harus divorteks kira-kira 30 detik sampai mencair. Hal itu untuk menghancurkan kristal sodium dodecyl sulfat (SDS) yang ada pada cetakan DNA. Larutan SDS yang terdapat dalam lisis buffer dapat mengganggu kerja enzim polimerase.¹³ Pada penelitian ini, penambahan larutan 20% tween 20 pada saat reaksi PCR dapat menetralkan efek inhibitor SDS.^{11,13,32} Penyimpanan tween 20 dapat mempengaruhi tingkat keberhasilan reaksi PCR. Tween 20, harus disimpan di botol gelap dan pada suhu 25°C.³⁴

Tahap terakhir untuk mendeteksi *Cryptosporidium* sp. adalah pada saat amplifikasi DNA, yang juga mempengaruhi hasil PCR adalah gen target / primer *Cryptosporidium* sp dan metode PCR yang digunakan. Gen 18S rRNA terdapat di ribosom subunit kecil dan sangat banyak di sitosol semua eukariot yaitu sekitar 1900 nukleotida. Gen 18S rRNA mempunyai sekuen nukleotid yang bervariasi dan konservatif. Gen 18S rRNA pada manusia mengandung delapan daerah bervariasi sebesar 432 basa sedangkan struktur daerah konservatif yang telah diuji pada semua spesies, sebesar 1438 basa. Daerah konservatif menunjukkan penyimpangan sekuen hanya 0,1% antara gen tikus dan manusia yang terjadi kira-kira 80 juta tahun yang lalu akibat mamalia diradiasi.⁹ Jadi, gen 18S rRNA merupakan kontrol internal yang terbaik pada PCR, karena menunjukkan lebih sedikit variasi dalam ekspresi berbagai keadaan / kondisi daripada gen lainnya. Beberapa penelitian yang menggunakan gen 18S rRNA melaporkan lebih sensitif dan spesifik dari gen target lainnya karena dapat mendeteksi satu ookista *Cryptosporidium* sp.^{10,25} Metode PCR yang dilakukan oleh Nichlos dkk (2003) adalah PCR langsung (*direct*) dan PCR nested. Hasil yang didapatkan dengan PCR langsung dan PCR nested secara statistik tidak berbeda bermakna, hanya intensitas pita DNA *Cryptosporidium* sp. pada PCR langsung lebih tipis dibandingkan dengan hasil PCR nested.

Pada penelitian ini, gen target yang digunakan adalah gen 18S rRNA dengan metode PCR langsung. Tujuannya hanya untuk melihat

apakah *Cryptosporidium* sp. pada feses anak batita yang disimpan di kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan masih dapat terdeteksi dengan gen 18S rRNA dengan metode PCR langsung.

Morgan dkk (1998) melakukan perbandingan metode mikroskopis pewarnaan Zielh Neelsen tahan asam dengan PCR untuk mendeteksi *Cryptosporidium parvum* pada spesimen feses orang dewasa yang diare. Hasil yang didapatkan dengan metode mikroskopis sebesar 5,6% (29/511) dan PCR 7% (36/511). Walaupun hasil deteksi *Cryptosporidium parvum* dengan metode mikroskopis hampir sama dengan metode PCR, tetapi secara statistik ada perbedaan bermakna karena $P < 0,05$.³⁵

Pada penelitian terdahulu²⁴ pada 486 sampel feses anak batita yang bertempat tinggal di Bantaran Sungai Ciliwung kelurahan kampung Melayu didapatkan prevalensi rendah dengan metode MTA tanpa konsentrasi. Berdasarkan pada penelitian sekarang ini, sebanyak 188 sampel feses dikonsentrasikan dan dipulas dengan metode pewarnaan MTA. Hasil deteksi ookista *Cryptosporidium* sp. dengan metode MTA konsentrasi didapatkan 9 sampel yang positif sedangkan hasil deteksi gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. dengan metode PCR didapatkan 65 yang positif. Terjadi peningkatan frekwensi deteksi *Cryptosporidium* sp. dengan metode PCR yaitu sebesar 34,6% dibandingkan dengan metode MTA konsentrasi (4,8%) dan MTA tanpa konsentrasi* (2,6%)

Dengan uji Mac Nemar pada SPSS 12 didapatkan nilai $P = 0,000$ yang berarti ada perbedaan

bermakna ($P < 0,05$) antara metode PCR dengan metode MTA tanpa konsentrasi* maupun metode PCR dengan MTA konsentrasi. Sedangkan pada metode MTA konsentrasi dengan metode MTA tanpa konsentrasi* didapatkan perbedaan yang tidak bermakna karena nilai $P = 0,289$.

Hal ini berarti bahwa lebih baik menggunakan metode PCR dibandingkan dengan metode MTA tanpa konsentrasi* maupun MTA konsentrasi dalam mendeteksi *Cryptosporidium* sp. dengan jumlah sampel yang banyak. Tetapi tidak dianjurkan untuk memilih metode MTA konsentrasi daripada MTA tanpa konsentrasi* karena tidak berbeda bermakna. Metode MTA lebih dianjurkan pada sampel yang sedikit, karena *slide /* preparat sampel yang negatif dapat dibuat beberapa kali untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Jumlah sampel yang banyak akan melelahkan pemeriksa untuk mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp.

Pada umumnya DNA dapat diisolasi dari semua bahan klinik terutama semua bahan yang mengandung sel berinti¹. Prinsip isolasi DNA pada darah dan rambut hampir sama dengan DNA pada feses, yaitu sama-sama ingin memisahkan DNA dari protein. Pengembangan metode PCR yang dilakukan pada penelitian ini adalah dalam hal teknik isolasi DNA karena ookista *Cryptosporidium* sp. harus dikonsentrasi dengan teknik air-eter dan diekstraksi dengan teknik kejut panas beku, serta menambahkan reagen BSA dan Tween 20, supaya inhibitor dari feses tidak mengganggu kerja enzim polimerase. Terjadinya peningkatan

frekwensi *Cryptosporidium* sp. yang didapatkan pada penelitian ini karena gen 18S rRNA *Cryptosporidium* sp. pada feses anak batita masih terdeteksi walaupun feses sudah disimpan dalam larutan kalium bikromat 2,5% selama 13 bulan.

Daftar Pustaka

1. Wanandi SI, Kurniati MVV. Biologi molekuler II: Isolasi DNA genom. Bagian Biokimia FKUI. penyusun. Biokimia Eksperimen Laboratorium. 1st ed. Jakarta: Widya Medika; 2001.p.124-8
2. Saiki RK. The Design and optimization of the PCR. Dalam Erlich H. Editor. PCR technology principles and application for DNA amplification. New York: Stockton Press; 1989. p. 7-16.
3. Atmadja DS. Polymerase chain reaction (PCR) dan aplikasinya dalam bidang forensik. Maj Kedok Indon 1992; 43(4): 239-43.
4. Yuwono T. Teori dan aplikasi polymerase chain reaction. Yogyakarta: ANDI; 2006.p.1-3
5. Granner DK. Struktur dan fungsi asam nukleat. Dalam Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Editor. Hartono A alih bahasa. Biokimia harper. 25th ed. Jakarta: EGC; 2001. p. 389, 413, 442.
6. Koolman J, Röhms KH. Editor Genetika molekuler. Wanandi SI alih bahasa. Atlas berwarna & teks biokimia. Jakarta: Hipokrates; 1995.p.227-8
7. Xia X, Xie Z, Kjer KM. 18S ribosomal RNA and tetrapod phylogeny. Syst Biol 2003; 52 (3): 283-95

8. Glitz D. Protein synthesis: translation and posttranslation modification. Devlin TM. Editor. Textbook of biochemistry with clinical correlations. 5^{ed} New York: Wiley-Lis; 2002. p. 243.
9. Gonzalez IL, Schmickel RD. The Human 18S Ribosomal RNA gene: evolution and stability. *Alm J Hum Genet* 1986; 38: 419-27.
10. Xiao L, Escalante L, Yang C. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-sub unit r RNA gene locus. *Applied and Environ Micobiol* 1999; 65(4): 1578-83.
11. Cryptosporidiosis. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Diunduh dari http://oie.int/eng/normes/mmanual/A_00135.htm 4 Maret 2007.
12. Clark, DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Reviews.* 1999: 554-63.
13. Smith HV, Nichols RAB. *Cryptosporidium* (Chapter 9) dalam *Foodborne Diseases*. Shabbir Simjee editor. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007. p. 233-76.
14. Fayer R, Ungar BLP. *Cryptosporidium spp.* and cryptosporidiosis. *Microbiol Reviews* 1986; 50(4): 458-83.
15. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Checkley W, Cabrera L, Gilman RH and Lal AA. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima Peru. *J. Infect Dis* 2001;183:492-7.
16. Current WL, Garcia LS. Reviews cryptosporidiosis. *Clin Microbiol* 1991; 4(3): 325-58.
17. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holsvher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 1976; 70(4): 592-8.
18. Kurniawan A, Karyadi T, Yuniastuti E, Djauzi S. Opportunistic parasitic infections in HIV / AIDS patients with diarrhea in Jakarta, Indonesia. *Food Borne Parasitic Zoonoses* 5th Seminar. November 2006.
19. Isaacs D, Hunt GH, Phillips AD, Price EH, Raafat F, Walker-Smith JA. Cryptosporidiosis in imunocompetent children. *J Clin Pathol* 1985;38: 76-81.
20. Molbak K, Hojlyng N, Gottschau A, Correia Sa JC, Ingholt L, da Silva APJ, Aaby P. Cryptosporidiosis in infancy and childhood mortality in Guinea Bissau, West Africa. *BMJ* 1993; 307:1417-20.
21. Iqbal J, Munir MA, Khan MA. *Cryptosporidium* infection in young children with diarrhea in Rawalpindi, Pakistan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60(5):868-70.
22. Mirzaei M. Prevalence of *Cryptosporidium sp.* infection in diarrheic and non-diarrheic humans in Iran. *Korean Journal of Parasitology*, 2007; 45(2):133-7.
23. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of

- Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. J Clin Microbiol 1983;18(1):185-90.
24. Soetomenggolo HA. *Cryptosporidiosis* pada anak usia dibawah tiga tahun di daerah bantaran sungai ciliwung kelurahan kampung melayu. [tesis]. Jakarta: FKUI; 2006.
 25. Sulaiman IM, Xiao L, Lal AA. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* Genotyping Techniques. Appl Environ Microbiol 1999;65(10):4431-5.
 26. Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples. Appl Environ Microbiol 1995;61:3849-55.
 27. Surl Chan-Gu, Kim Se-Min, Kim Hyeon-Cheol. Viability of preserved *Cryptosporidium baileyi* oocysts. The Korean Journal of Parasitology, 2003; 41(4) 197-201.
 28. Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine faeces. J. Clin. Microbiol, 1995; 33: 2592-5.
 29. Smith HV. Diagnosis of human and livestock cryptosporidiosis. (Chapter 6) dalam *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R, Xiao L editor. 2nd ed. London: CRC press; 2007 p.173- 203.
 30. Nichols RAB, Smith HV. Optimisation of DNA extraction and molecular detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural mineral water sources. J. Food Prot, 2004; 67: 524- 32.
 31. Nichols RAB, Campbell B, Smith HV. Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during waters and drinking water monitoring. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72(8): 5428 - 35.
 32. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning laboratory manual. 3rd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p.1-25
 33. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta 1975. 415 : 29-79.
 34. Sigma. Tween 20. Product information. Diunduh dari <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/p5927pis.pdf> 15 Mei 2008.
 35. Morgan UM, L. Pallant, B. W. Dwyer, D. A. Forbes, G. Rich, R.C. A. Thompson. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. Journal Of Clinical Microbiol 1998; 36(4): 995-8