

MULTIPLEX PCR UNTUK MENDETEKSI *Candida Spp*

Anita¹⁾, Asaad Maidin²⁾, Nasrum Massi²

¹⁾Akademi Analis Kesehatan Muhammadiyah Makassar, ²⁾Bagian Imunologi Dan Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Univeritas Hasanuddin, Makassar
Alamat Korespondensi: anitadinar1983@gmail.com

Abstrak

Candida spp merupakan infeksi jamur tersering pada manusia yang dapat menyebabkan infeksi primer dan sekunder pada penderita tuberkulosis paru. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur keakuratan (sensitifitas dan spesifitas) Multiplex PCR untuk mendeteksi *Candida spp*. Desain penelitian adalah observational studi dengan jumlah sampel 55 sputum BTA positif yang dipilih berdasarkan propotional randoms sampling. Pengambilan sputum, data faktor biomedis meliputi: umur, jenis kelamin, riwayat tentang penyakit tuberkulosis, riwayat penyakit lainnya, riwayat pengobatan dikumpulkan oleh petugas laboratorium yang terlatih. Analisis data digunakan untuk mengukur sensitifitas dan spesifitas Multiplex PCR untuk mendeteksi *Candida spp*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok umur 29-33 tahun dan 40-45 tahun memiliki resiko terinfeksi oleh jamur *Candida spp*, sebanyak 7 orang (20%). 6 orang (17.1 %) laki-laki dari kelompok umur 29-33 tahun dan 1 orang (2.8 %) dari kelompok umur 40-45 tahun sedangkan untuk perempuan terdapat 3 orang (8.5 %) dari kelompok umur 46-51 tahun memiliki resiko untuk terinfeksi jamur *Candida spp*. Untuk Multiplex PCR memiliki sensitivitas dan spesifitas yaitu 100%. Multiplex PCR mendeteksi *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, dan *Candida dubliniensis*. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa untuk mendeteksi *Candida spp* dari sputum pasien tuberkulosis dapat menggunakan Multiplex PCR yang merupakan metode identifikasi yang sensitif, akurat, dan cepat. Oleh karena itu kami menyarankan untuk dilakukan penelitian tentang identifikasi *Candida spp* dari berbagai sumber specimen.

Kata kunci: *Candida spp*, Multiplex PCR

PENDAHULUAN

Spesies *Candida* merupakan infeksi jamur tersering penyebab kandidiasis pada manusia, dapat terjadi di seluruh dunia dan menyerang segala usia, baik laki-laki maupun wanita (Maharani S., 2012).

Laporan dari Fridkin, (2003) dalam jurnal Ells R dkk., (2009) menyatakan bahwa meskipun *Candida albicans* masih merupakan penyebab utama infeksi jamur, tetapi terdapat pula beberapa spesies non *Candida albicans* yang dapat menyebabkan manifestasi sistemik dan sejumlah infeksi (Liguori G dkk., 2010). Spesies non *Candida albicans* yang juga merupakan agen oportunistik patogen antara lain *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, dan *Candida tropicalis* (Ells R dkk., 2009).

Sekitar dua dekade terakhir invasi penyakit infeksi jamur terus mengalami peningkatan sebagai akibat penggunaan steroid dan antibiotik spektrum luas,

terjadinya infeksi primer dan sekunder pada penderita tuberkulosis paru, terdapatnya faktor predisposisi yaitu penyakit kronik yang berat termasuk penyakit keganasan atau penyakit kronik lainnya seperti diabetes melitus (Widyasari K dkk., 2012)

Secara fenotip *Candida dubliniensis* dan *Candida albicans* tampak sama, sehingga sering terjadi kesalahan identifikasi (Ells R dkk., 2009). Keduanya memiliki clamidospora, memproduksi germ tube, dan menghasilkan profil asimilasi karbohidrat yang sama (Chowdhry dkk., 2010).

Dalam beberapa dekade ini telah dikembangkan pula sejumlah metode molekular untuk mendeteksi *Candida spp* dalam waktu yang cepat dengan sensitifitas dan spesifitas yang tinggi seperti nested PCR, Taqman PCR, multiplex PCR, light cyler PCR dan fluorescent PCR (Tarini dkk., 2010).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (*Sanyo*), *Bio Safety Cabinet (ESCO class II Type A2)*, lampu Bunsen, inkubator (*Memmert*), kaca objek (*Sail Brand*), kotak kaca objek, lemari asam (*ESCO*), mikropipet (*Bio-Rad*) 20 µl dan 100 µl, mesin PCR (*Bio-rad*), mikroskop (*Nikon*), neraca analitik (*Kern*), ose bulat, pH meter (*Schoft Instrument*), *plate well*, rak tabung, sentrifugasi (*Sorvall Legend*), serological pipet 5 µl, 10 µl, 15 µl (*Falco*), stopwatch (*lingcheng*), tabung eppendorf (*Axygen*), tabung Falcon 50 ml, vortex (*Heidolph*), pinset, gunting, waterbath (*Memmert*), freezer, gelas kimia, erlenmeyer, sendok timbangan, stirer magnetik

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel sputum penderita tb, kapas, alkohol, karbol fuksin, methilen blue, medium NA, medium SDA (*Sabaroud Dextrose Agar*), medium peptone, glukosa, agar, NaCl, air steril, primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), CA3 (5'-GGTTTGCTTGAAAGACGGTAG-3'), CA4 (5'-AGTTTGAAGATATACG TGGTAG-3'), PCR Hot Star (*Qiagen*) (terdiri dari enzim, taq polymerase, dNTP, buffer, MgCl).

Prosedur Penelitian

Pemeriksaan Sputum

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sputum (dahak) dari pasien suspek tuberkulosis yang berasal dari batuk spontan dan dalam, yang bersifat mukopurulen atau kental dan berwarna kuning sampai kehijauan.

Ekstraksi DNA Metode Qiagen

Sebanyak 20 µl *Qiagen Protease* dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang steril. 1,5 ml, lalu tambahkan 200 µl sampel sputum, lalu ditambahkan 200 µl Buffer AL kemudian di vortex 15 detik. Selanjutnya disimpan pada suhu 56°C selama 10 menit. Kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 1 menit pada suhu ruangan.

Tambahkan 200 µl etanol (96-100 %) kemudian di vortex 15 detik. Supernatannya dibuang lalu campuran dipindahkan ke QiAmp spin column (2 ml collection tube) kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit lalu buang supernatan kemudian tambahkan 500 µl Buffer AW1 disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit pada suhu ruangan, lalu supernatannya dibuang kemudian tambahkan 500 µl Buffer AW2 disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama lalu buang supernatan kemudian pindahkan ke eppendorf yang steril. 1,5 ml tambahkan 200 µl Buffer AE diamkan 1 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 3 menit. DNA siap untuk di Multiplex PCR.

Deteksi DNA *Candida spp* dengan Multiplex-Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hasil ekstraksi DNA dimasukkan ke dalam larutan: 1x hotstar buffer (*Qiagen*) antara lain 1 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 28,75 µl H₂O, 20 µM ITS1 dan ITS2, 20 µM CA3 dan CA4, 0,025 U HotStar taq DNA polymerase, 10 µl DNA template, sehingga total volume untuk PCR 50 µl. Program siklus untuk proses PCR: Siklus 1 (1x) 95°C selama 15 menit, siklus 2 (40x) 94°C selama 30 detik, 60°C selama 60 detik, 72°C selama 45 detik. Siklus ke 3 (1x) 72°C selama 10 menit (*Tarini dkk., 2010*). Target Produk PCR dapat dilihat pada Tabel (1).

Pembuatan 2% Gel Agarose (Elektroforesis)

Gel agarose ditimbang sebanyak 2 gram (*Biorad*) dalam 100 ml Tris Borate EDTA (TBE) yang terdiri dari 100 gr Tris Base, 27,5 gr asam borat, 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 dalam 1 liter air. Ditambahkan 135 ml air dan dipanaskan sampai mendidih. Selanjutnya ditambahkan 1 µl (0,2 µg/ml) ethidium bromide dan dimasukkan dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir. Setelah memadat (30 menit), gel kemudian dimasukkan ke dalam mesin elektroforesis yang berisi larutan TBE

0,5x.Selanjutnya 2 µl DNA sampel hasil PCR yang telah dicampur dengan cairan “loading dye (4 gram sukrosa ditambahkan 25 mg bromphenol blue dalam 10 mm air)”. Elektroforesis dijalankan pada 10 mA, 100 volt, selama 60-90 menit .Kemudian diamati menggunakan geldog.Sampel positif *Candida spp* dilaporkan berupa ada tidaknya band yang terbentuk.

Analisa Data

Data yang dilaporkan berupa data biomedik (umur, jenis kelamin, riwayat tentang penyakit tuberkulosis, riwayat penyakit lainnya, riwayat pengobatan), sedangkan data laboratorium hasil Multiplex PCR dilaporkan berupa ada tidaknya band yang terbentuk. Analisa data penelitian ini adalah dalam bentuk analisa deskriptif yang disajikan dalam bentuk tabel.

HASIL PENELITIAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan untuk mendeteksi *Candida Spp* didapatkan hasil, yaitu total sampel dalam penelitian ini yaitu 35 sputum dari penderita tuberkulosis sebanyak 35 orang di Infection Centre Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo.

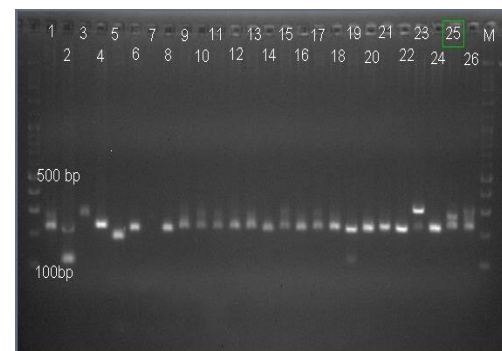
Tabel 1. Karakteristik pasien berdasarkan kelompok umur dan jenis kelamin

Umur	Jenis Kelamin	
	Laki-laki (%)	Perempuan (%)
18-22	1 (2.8)	2 (5.7)
23-28	4 (11.4)	2 (5.7)
29-33	6 (17.1)	1 (2.8)
34-39	1 (2.8)	1 (2.8)
40-45	5 (14.2)	2 (5.7)
46-51	2 (5.7)	3 (8.5)
52-57	1 (2.8)	2 (5.7)
58-63	2 (5.7)	0

Tabel 1 memperlihatkan bahwa 35 sampel sputum ini yang bersumber dari kelompok umur ≤ 28 tahun sebanyak 9 orang, umur 29-45 tahun sebanyak 16 orang dan ≥ 45 tahun sebanyak 10 orang . Terdapat 7 orang (20 %) pasien dari kelompok umur antara 29-33 tahun memiliki resiko terinfeksi oleh jamur *Candida spp* diikuti oleh kelompok umur

40-45 tahun yaitu sebanyak 7 orang (20%). Dari 35 total sampel terdapat 22 orang pasien yang berjenis kelamin laki-laki dan yang berjenis kelamin perempuan adalah 13 orang. Tabel 1 juga memperlihatkan terdapat 6 orang (11 %) laki-laki dari kelompok umur 29-33 tahun memiliki resiko terinfeksi jamur *Candida spp* diikuti dengan kelompok umur antara 40-45 tahun sebanyak 6 orang (17.1 %). Sedangkan untuk perempuan terdapat 3 orang (8.5 %) dari kelompok umur 46-51 tahun memiliki resiko untuk terinfeksi jamur *Candida spp*

Hasil amplifikasi terhadap DNA dari sputum pasien suspek tuberkulosis diperoleh positif *Candida spp* ditandai dengan ada tidaknya band yang terbentuk setelah elektroforesis (**Gambar 1**). Hasil amplifikasi sampel sputum dengan metode Multiplex PCR yang diamati dengan menggunakan gel elektroforesis, dan diperoleh sampel positif *Candida spp*.



Gambar 1. Hasil multiplex PCR (sampel 22, 299 bp adalah *C. parapsilosis*; sampel 24, 218 bp *C. albicans* / *C. tropicalis*; sampel 5, 198 bp *C. dubliniensis*; sampel 19, 110 bp *C. albicans*)

PEMBAHASAN

Primer yang digunakan untuk Multiplex PCR dalam penelitian ini adalah primer yang sama yang digunakan penelitian yang dilakukan oleh Tarini (2010), Indonesia, dan Ligouri (2010), Itali, yaitu universal primer jamur (ITS1 dan ITS2) dan spesifik primer untuk jamur *Candida spp* dan *Candida albicans* (CA3 dan CA4). Fujita dkk, menyatakan dalam jurnal penelitian Tarini (2010)

bahwa ITS1 terletak diantara gen 18S dan gen 28S rRNA. ITS terbagi ITS1 (terletak antara gen 18S dan gen 5.8S rRNA) dan ITS2 (terletak antara gen 5.8S dan gen 28S rRNA). Perbedaan sekuens pada ITS1-5.8S rDNA- ITS2, ITS1 dan ITS2 merupakan penanda utama untuk mendeteksi dan mengidentifikasi jamur.

Untuk uji sensitifitas Multiplex PCR menggunakan primer tersebut telah dilakukan oleh Tarini (2010) dimana Multiplex PCR dibandingkan dengan kultur. Masing-masing 200 µl suspensi koloni *Candida albican* di kultur pada medium Sabaroud Dektrosa Agar 37°C dan 200 µl dilakukan Multiplex PCR. Pada penelitian tersebut disimpulkan bahwa *Candida albican* dapat dideteksi pada serial pengenceran 2×10^2 atau setara dengan 2.6-2.9 unit sel/ml.

Untuk uji spesifitas Multiplex PCR menggunakan primer ini telah pula dilakukan oleh Tarini (2010) dimana jamur lain antara lain *A. niger*, *A. flavus*, dan *A. fumigates* dan bakteri *S. pneumoniae*, *S. alpha haemolyticus*, *S. beta haemolyticus*, *S. gamma haemolyticus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Moraxella*, *Diphtheroid*, *H. influenzae*, dan *N. sica* dideteksi negatif oleh Multiplex PCR.

Hasil Multiplex PCR dari spesimen sputum di deteksi *Candida albican* dengan target band 110 bp dan 218 bp, sedangkan untuk *Candida dubliniensis* target bandnya 198 bp, *Candida parasilopsis* target bandnya 229 bp dan *Candida tropicalis* target bandnya 218 bp (Gambar 1).

Multiplex PCR dapat mendeteksi *Candida spp* dengan waktu yang lebih cepat yaitu 7 jam dengan nilai sensitifitas dan spesifitas sebesar 100 %. Hal ini disebabkan karena Multiplex PCR selain dapat mendeteksi *Candida spp* dapat pula mendeteksi *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis*, dan *Candida dubliniensis* dibandingkan dengan metode kultur yang hanya dapat mendeteksi *Candida dubliniensis* dan *Candida albican*.

Dengan Multiplex PCR konsentrasi DNA yang digunakan pada penelitian ini untuk mendeteksi *Candida spp* dari sputum BTA positif yaitu 10 pg. Hal ini sama yang dilakukan oleh Tarini dkk., (2010) dalam penelitiannya dimana konsentrasi dna yang digunakan untuk mendeteksi *Candida spp* adalah 0,98 - 16 pg. Menurut Jaeger dkk., (2000) menyatakan bahwa limit deteksi DNA jamur menggunakan metode molekular yaitu 10 pg atau setara dengan 100 sel jamur, dimana 1 sel *Candida albican*, dnanya terdiri dari 37 fg. Perbedaan limit dna untuk mendeteksi jamur disebabkan oleh berbagai faktor antara lain desain primer ataupun perbedaan sensitifitas enzim yang digunakan untuk melisiskan sel jamur (Tarini dkk.,2010)

Non *Candida albican* juga merupakan oppurtunistik patogen yang berbahaya dan beberapa diantaranya telah menunjukkan tingkat resistensi yang cukup tinggi terhadap obat antijamur sehingga sangat diperlukan metode identifikasi secara molekular yang dapat membantu manajemen dan epidemiologi infeksi jamur terutama pada kelompok pasien yang beresiko seperti pasien tuberkulosis ataupun pada pasien immunokompromise (Allam dkk., 2012).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Multiplex PCR merupakan metode identifikasi yang sensitif, akurat, dan cepat untuk mendeteksi *Candida spp* dari sputum pasien tuberkulosis.

SARAN

Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan Multiplex PCR untuk mendeteksi keberadaan *Candida spp* dari berbagai sumber specimen.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayman A., Ihab M. Salem. (2012). Evaluation of Rapid Molecular Identification of Clinically Important *Candida Spp* Isolated From Immunocompromised Patients Using RF-PCR. *Journal of American Science*, 8 : 2.

- Chowdhry., dkk., (2010). Application of hypertonic Sabaroud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69:440-442.
- Ells R., (2009). *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*. *Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases* 54: 1-16.
- Liguori G., dkk.,(2010). *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. *J PREV MED HYG*, 51:121-124.
- Ligouri G dkk.,(2010). Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida spp* identification. *Medical Journal Indonesia*, 33:63-67.
- Maharani S.,(2012), Pengaruh Pemberian Larutan Ekstrak Siwak (*Salvadora persica*) Pada Berbagai Konsentrasi Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. Semarang.
- Moran P, dkk., (2011). *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis* :Why Is *C. albicans* More Pathogenic. *International Journal of Microbiology*.7 pages.
- Sandra A., dkk. (2010). Identification of *Candida spp* by Phenotypic Test and PCR.. *Brazilian Journal of Microbiology* .41: 286-294.
- Sukamto, (2004) Pemeriksaan Jamur Bilasan Bronkus Pada Penderita Bekas Tuberkulosa Paru. USU digital library.
- Tarini dkk., (2010), Development of multiplex-PCR assay for rapid detection of *Candida spp*, *Medical Journal Indonesia* . 19: 83-7.
- Widyasari K dkk., (2012). Invitro susceptibility of *Candida spp* isolate from pulmonary tuberculosis suspected patients to antifungal agent in Jakarta. *Journal of Medicine and Medical Sciences*. Vol 3(3),pp 138-140.