

INDONESIAN JOURNAL OF
**Clinical Pathology and
Medical Laboratory**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.)	Vol. 19	No. 3	Hal. 141–219	Surabaya Juli 2013	ISSN 0854-4263
---	---------	-------	--------------	-----------------------	-------------------

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists

Terakreditasi No: 66b/DIKTI/KEP/2011, Tanggal 9 September 2011

INDONESIAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY AND MEDICAL LABORATORY

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

Caspase-3 Aktif di Leukemia Mielositik Akut (LMA) dan Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) (<i>Active Caspase-3 in Acute Myeloid Leukaemia (AML) and Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)</i>) Agus Setiawan, Indarini, Lyana Setiawan, Siti Boedina Kresno, Nugroho Prayogo, Arini Setiawati	141-145
Modifikasi Prinsip Pemeriksaan β -D-glucan untuk Mendeteksi <i>Candida albicans</i> dalam Serum (<i>Principle Modification of β-Glucan Detection from Candida albicans in Serum</i>) Ruben Dharmawan, Darukutni, Sri Haryati, Murkati, Yulia Sari, Afiono Agung Prasetyo	146-149
Apoptosis Index between Females and Males in Regular Hemodialysis (<i>Indeks Apoptosis antara Perempuan dan Laki-Laki pada Hemodialisis Reguler</i>) Djoko Santoso	150-155
Kekurangan Zat Besi di Perempuan Hamil Menggunakan Hemoglobin Retikulosit (RET-HE) (<i>Iron deficiency in pregnant women by haemoglobin reticulocyte (RET-He)</i>) Petrian Primiasanti, Ninik Sukartini	156-160
Kadar CTX Perempuan Osteoporosis Lebih Tinggi daripada Perempuan Normal dan Osteopenia (<i>Higher Level of CTX in Osteoporotic Women Compared to Normal and Osteopenic Women</i>) Ira Puspitawati, Windarwati, Usi Sukorini, Erlina, Pratiwi Herowati, Arlan Prabowo, Riswan Hadi Kusuma	161-166
Cystatin C, HbA1c, dan Rasio Albumin Kreatinin (<i>Cystatin C, HbA1c and Albumin Creatinine Ratio</i>) Juliani Dewi	167-173
Lactate Dehydrogenase (LDH) Selama Penyimpanan (<i>Lactate Dehydrogenase (LDH) During Storage</i>) Teguh Triyono, Umi Solekhah Intansari, Caesar Haryo Bimoseno	174-177
Limfosit T CD4 ⁺ sebagai Peramal Perjalanan Penyakit Pasien yang Mengalami Sepsis (<i>CD4⁺ T Lymphocyte as a Prognosis Predictor in Sepsis Patients</i>) Lestari Ekowati, Aryati, Hardiono	178-184
Angiotensin II di Perbenihan Adiposit yang Dipajan Glukosa Tinggi (<i>Angiotensin II on Adipocytes Culture Exposed With High Glucose</i>) Novi Khila Firani	185-189
Pengukuran Jumlah Limfosit CD4 Metode <i>Panleucogating</i> pada Pasien Terinfeksi <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (HIV) (<i>the Panleucogating Method For Lymphocyte CD4 Counting in HIV Patients</i>) Umi S. Intansari, Budi Mulyono, Usi Sukorini	190-196
Komplemen Serum C3c dan Limfosit T-CD4 ⁺ Darah (<i>C3c Serum Complement and Blood T-CD4⁺ Lymphocyte</i>) I. Komang Parwata, Endang Retnowati, Betty Agustina Tambunan	197-203

TELAAH PUSTAKA

Hemostasis Berlandaskan Sel Hidup (<i>In Vivo</i>) (<i>Cell Based Hemostatis – In Vivo</i>) Liong Boy Kurniawan, Mansyur Arif	204–210
--	---------

LAPORAN KASUS

Neonatal Acute Myeloid Leukaemia (<i>Leukemia Mielosistik Akut pada Neonatus</i>) Luh Putu Rihayani Budi, Ketut Ariawati, Sianny Herawati	211–217
--	---------

INFOMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU	218–219
---	---------

Ucapan terima kasih kepada penyunting Vol. 19 No. 3 Juli 2013

Krisnowati, Maimun Z. Arthamin, Rahayuningsih Dharma, Purwanto AP, Ida Parwati, AAG Sudewa,
Endang Retnowati, Jusak Nugraha, Noormartany, M. Yolanda Probohoesodo

Dewan Redaksi Majalah IJCP

MODIFIKASI PRINSIP PEMERIKSAAN β -D-GLUCAN UNTUK MENDETEKSI *CANDIDA ALBICANS* DALAM SERUM

(Principle Modification of β -Glucan Detection from *Candida albicans* in Serum)

Ruben Dharmawan¹, Darukutni¹, Sri Haryati¹, Murkati¹, Yulia Sari^{1,2,3}, Afiono Agung Prasetyo^{2,3,4}

ABSTRACT

Candida albicans β -D-glucans examination has been used for invasive fungal detection in human blood and was approved by the Food and Drug Administration. However, the method is rarely used in Indonesia and also because the cost is hardly affordable. A modification of the method using enzymatic reaction is hoped will provide a simple and affordable measurement in human blood serum. β -D-glucans as heterogeneous molecules constitute the major carbohydrates fractions of cell wall and readily detected in supernatants of *Candida albicans* cultures are hydrolyzed by β glucanase to form D-glucose. This additional glucose is measured using Megazyme GOPOD-Format Procedure® at 510 nm. *Candida albicans* were identified and cultured was derived from a patient of Dr. Moewardi General Hospital, Surakarta in July, 2012. The results show that β -D-glucans from *Candida albicans* is measureable to the amount of $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ serum using this modification principle.

Key words: *Candida albicans*, β -D-Glucan detection, modification principle, serum

ABSTRAK

Pemeriksaan β -D glucans di *Candida albicans* berdasarkan reaksi antigen-antibodi telah cukup lama digunakan untuk menemukan jamur (fungus) invasif dalam darah manusia dan telah diakui oleh Food and Drug Administration. Walaupun demikian, cara memeriksa ini jarang digunakan di Indonesia, selain itu harganya relatif mahal. Modifikasi cara tersebut menggunakan reaksi enzimatik diharapkan dapat memberikan teknik pengukuran serum yang sederhana dan tidak mahal. *Candida albicans* yang diteliti berasal dari seorang pasien Rumah Sakit Umum Daerah Dr Moewardi Surakarta, pada bulan Juli 2012. Setelah fungus dikenali kemudian dibiakkan. Fraksi karbohidrat utama pembentuk dinding sel adalah molekul heterogen, β -D glucans yang mudah ditemukan di dalam supernatant dari benihan *Candida albicans* yang dihidrolisis oleh β glucanase menjadi D-glukosa. Penambahan glukosa hasil hidrolisis dapat diukur menggunakan tatalangkah GOPOD-Format Megazyme dalam panjang gelombang 510 nm. Hasil telitian menunjukkan bahwa β -D glucans *Candida albicans* dapat ditemukan sampai $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ serum menggunakan modifikasi asas ini.

Kata kunci: *Candida albicans*, deteksi β -D-Glucan, modifikasi prinsip, serum

PENDAHULUAN

Candida albicans merupakan jamur penyebab penyakit yang memiliki sifat dimorfisme secara bergantian dan tidak beraturan, sehingga menimbulkan masalah pada identifikasinya. Bentuk kapang (*hyphae formation*) dapat penetrasi ke dalam sel permukaan tubuh, secara sistemik, sehingga dianggap sebagai bentuk yang lebih menyebabkan penyakit. Karena keadaan ini dapat menyebabkan infeksi permukaan dan berlangsung sistemik, terutama di pasien HIV/AIDS.¹⁻³ Kematian akibat *Candida albicans* di kasus yang sistemik dapat mencapai 60%⁴, sehingga temuan awal kandidiasis dipermukaan tersebut amat penting.

Diagnosis terduga infeksi fungus yang invasif (IFI) melibatkan tiga (3) faktor, yaitu faktor: inang, gejala dan tanda klinis yang menetap serta bukti mikologis yang kuat. Bukti mikologis yang diperlukan adalah pemeriksaan langsung (Ilmu sitologi, mikroskopis dan perbenihan) dan pemeriksaan tidak langsung (ditemukan antigen atau komponen dinding sel). Deteksi asam nukleat belum dapat dijadikan bukti, karena belum terabsahkan dan terbakukan.⁵

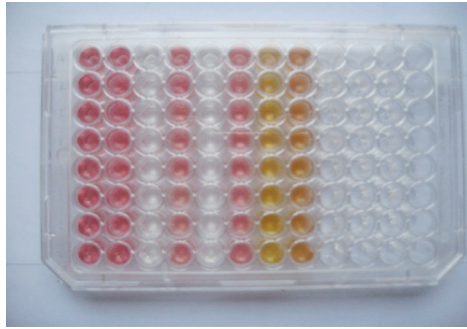
Deteksi β -D-glucan sebagai komponen yang dominan di dinding sel *Candida albicans* secara tidak langsung, yaitu melalui reaksi antigen-antibodi telah berhasil dengan baik, dan telah dibuat perangkatnya dan diakui oleh Food and Drug Administration.⁵⁻⁷

¹ Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Sebelas Maret University, Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126, Indonesia. E-mail: rubendharmawan@yahoo.com

² Biomedical Laboratory, Faculty of Medicine, Sebelas Maret University, Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126, Indonesia.

³ Center of Study of Biotechnology and Biodiversity Research and Development, Sebelas Maret University, Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126, Indonesia.

⁴ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Sebelas Maret University, Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126, Indonesia.



A



B

Gambar 1. **A.** ELISA plate berisi berbagai pekatan *Candida albicans* dan media setelah inkubasi. **B.** ELISA plate dalam ELISA reader tray

Sayang perangkat ini amat jarang digunakan di Indonesia, karena harganya mahal, sehingga penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui dan menemukan metode deteksi β -D-glucan yang lebih sederhana dan murah. Penelitian ini merupakan upaya modifikasi dan perbaikan cara meneliti yang pernah dilakukan oleh Darukutni *et al.* 2008.⁸

Modifikasi yang dilakukan adalah mengubah asas pemeriksaan β -D-glucan untuk menemukan antigen komponen dinding sel dengan ELISA^{6,7,9} menjadi pemeriksaan enzimatik. Modifikasi ini dimaksudkan untuk mendeteksi β -D-glucan yang memiliki bentuk ikatan 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4 dan 1 $\rightarrow$ 6 yang diurai oleh β -glucanase menjadi D-glucose.¹⁰⁻¹² Sedangkan β -D-glucan assay menggunakan ELISA guna mendeteksi β -D-glucan dengan ikatan 1 $\rightarrow$ 3 yang bersifat antigenik.^{3,7,9,13}

METODE

Sampel *C. albicans* diperoleh dari pasien yang terduga kandidiasis di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Moewardi menggunakan identitas dan riwayat penyakit yang tercatat. Sampel diperbenihkan, kemudian 250 mg benihan tersebut disuspensi, dihomogenisasi dan dipusingkan masing-masing dalam 5 mL akuabides, NaCl 0,9% dan serum darah manusia. Supernatan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 2 mL berturut-turut dalam jumlah yang bertambah tiap kali sebanyak 50 μ L mulai dari 0 μ L. Setiap tabung Eppendorf ditambah medium yang sesuai sampai volumenya mencapai 1000 μ L. Ke dalam sebagian tabung dimasukkan 25 μ g β -glucanase (Sigma-Aldrich Cat. No. G4423). Dari setiap aliquot diambil 100 μ L, dimasukkan ke sumur ELISA plate dan ditambah 200 μ L GOPOD Reagent Megazyme®. Kemudian plate diinkubasi pada suhu 40°C selama 20 menit. Setelah inkubasi dan suhu plate mencapai suhu kamar, daya serap diperiksa menggunakan ELISA Reader di 510 nm. Kadar $\rightarrow$ -D-glucan dihitung menurut

tatalangkah Megazyme GOPOD-Format®¹⁰ dan Mixed-Linkage Beta-Glucan Assay Procedure (McCleary Method)®.¹¹

HASIL DAN PEMBAHASAN

Spesimen dahak dari penderita laki-laki dewasa di RSUD Dr. Moewardi dibawa ke Laboratorium Parasitologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta secara aseptik. Di laboratorium, *Candida albicans* diidentifikasi secara mikroskopik langsung maupun tidak langsung melalui pengecatan Giemsa dilanjutkan dengan pembiakan di medium *Candida* terpilih dan pemeriksaan Germ Tube test. Setelah dipastikan terdapat *C. albicans* dalam sampel tersebut, maka dibiakkan di medium Saboraud Agar Dextrose (SDA), kelompok sel yang morfologinya sama diisolasi, diidentifikasi sekali lagi kemudian dikolonisasi lagi. Kolonisasi diulangi sampai diperoleh jumlah yang cukup.

Setelah diperoleh kelompok sel yang cukup, dipanen seberat 250 mg *C. albicans*, masing-masing dimasukkan ke dalam 5 mL akuabides, larutan garam fisiologis dan serum darah. Penanganan selanjutnya mengikuti metode McCleary¹² dengan modifikasi. Hasil proses enzimatis tampak di ELISA plate dan reader-nya (lihat Gambar 1).

Hasil pemeriksaan ELISA reader dan perhitungan rerata setelah lima kali pengulangan ditabulasikan (lihat Tabel 1 dan 2).

Berdasarkan data di Tabel 1 dan 2 dapat dihitung kadar D-glucose menggunakan rumus:

$$D\text{-Glucose } (\mu\text{g}/100 \mu\text{L}) = \text{daya serap sampel/uji} \times 100$$

(Modifikasi dari Megazyme, 2011a).¹⁰ Dengan contoh perhitungan sebagai berikut:

$$D\text{-Glucose} = 0.271/0.261 \times 100 = 103.831 \mu\text{g}/100 \mu\text{L} = 103.831 \text{ mg}/100 \text{ mL}$$

Tabel 1. daya serap pembanding dan sampel uji *Candida albicans* dalam serum darah

No	Sampel pembanding					Sampel uji				
	1*	2*	3*	4*	5*	1*	2*	3*	4*	5*
A**	0.261	0.262	0.260	0.261	0.262	0.271	0.272	0.270	0.271	0.270
B**	0.273	0.273	0.274	0.272	0.274	0.294	0.293	0.292	0.293	0.293
C**	0.283	0.284	0.282	0.283	0.284	0.313	0.312	0.313	0.311	0.312
D**	0.294	0.295	0.295	0.294	0.294	0.335	0.335	0.333	0.334	0.335
E**	0.304	0.304	0.305	0.304	0.303	0.355	0.356	0.355	0.357	0.355
F**	0.316	0.317	0.318	0.318	0.316	0.376	0.377	0.378	0.376	0.376
G**	0.327	0.329	0.328	0.329	0.328	0.398	0.399	0.400	0.398	0.398
H**	0.339	0.339	0.340	0.341	0.338	0.419	0.420	0.418	0.419	0.419

Keterangan:
* Pengulangan;
** Lajur A berisi *C. albicans* seberat 0,000 mg, lajur B 0,250 dan seterusnya sampai lajur H yang berisi 1,750 mg (lihat juga tabel 2).

Tabel 2. Rerata daya serap dan berat *Candida albicans*

No	Rerata pembanding	Rerata uji	Delta rerata	Berat C.a. (mg)
1	0.261±0.001	0.271±0.001	0.010±0.0001	0.000±0.0000
2	0.273±0.001	0.294±0.001	0.021±0.0001	0.250±0.0002
3	0.283±0.001	0.313±0.001	0.030±0.0001	0.500±0.0003
4	0.294±0.001	0.335±0.002	0.041±0.0001	0.750±0.0004
5	0.304±0.001	0.355±0.002	0.051±0.0001	1.000±0.0005
6	0.316±0.002	0.376±0.002	0.060±0.0001	1.250±0.0005
7	0.327±0.002	0.398±0.002	0.071±0.0001	1.500±0.0005
8	0.339±0.002	0.419±0.002	0.080±0.0001	1.750±0.0005

dan terdapat kenaikan kadar *D-Glucose* sebesar:
 $0.010 \text{ (delta rerata)} \times 103.831 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ } \mu\text{L} = 1.038 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ } \mu\text{L}.$

Perhitungan kadar *β-D-glucan* mengikuti perubahan rumus dalam metode McCleary (*Megazyme*, 2011b)¹¹ sebagai berikut:

faktor perubahan sebesar 162/180 dari *D-glucose* bebas menjadi *anhydro-D-glucose* sebagai komponen *β-D-glucan*.

Dengan demikian, bila terdapat kenaikan kadar *D-glucose* sebesar 1,038 $\mu\text{g}/100 \text{ } \mu\text{L}$ dalam sampel, maka hal ini berarti terdapat $162/180 \times 1,038 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ } \mu\text{L} = 0,934 \text{ } \mu\text{g } \beta\text{-D- glucan}/100 \text{ } \mu\text{L}$ serum. Hasil perhitungan tampak di Tabel 3.

Data di Tabel 3 menunjukkan bahwa cara enzimatik dapat mendeteksi *β-D-glucan* sampai sejumlah $0,934 \pm 0,0002 \text{ } \mu\text{g}$. Hasil ini jauh lebih baik dibandingkan dengan hasil telitian Darukutni, dkk.⁸ yang mampu mendeteksi *β-D-glucan* sampai $15 \pm 2 \text{ mg}$, tetapi masih jauh kurang peka dibandingkan dengan *β-D-glucan assay* komersial yang mampu mendeteksi *β-D- glucan* sampai *pictogram*.^{3,7}

Tabel 3. Jumlah *β-D-glucan* terdeteksi secara enzimatik di berbagai kepekatan *Candida albicans* dalam sampel serum darah

No	Kadar <i>C. albicans</i> (mg/mL serum)	Jumlah <i>β-D-glucan</i> yang ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$)
1	0.000±0.0000	0.000±0.0000
2	0.250±0.0002	0.934±0.0002
3	0.500±0.0003	1.868±0.0003
4	0.750±0.0004	2.802±0.0004
5	1.000±0.0005	3.736±0.0005
6	1.250±0.0005	4.670±0.0005
7	1.500±0.0005	5.604±0.0005
8	1.750±0.0005	6.538±0.0005

SIMPULAN

Modifikasi asas pemeriksaan *β-D-glucan* dari reaksi antigen-antibodi menjadi reaksi enzimatik telah berhasil dilakukan. Reaksi enzimatik baru dapat menemukan sampai $\mu\text{g}/100 \text{ } \mu\text{L}$ serum, sedangkan perangkat komersial berdasarkan reaksi antigen-antibodi telah dapat mendeteksi sampai pg/mL serum. Masih terdapat peluang untuk memperbaiki teknik modifikasi enzimatik ini agar dapat mendekati kepekaan yang diharapkan. Namun dari segi ekonomi,

teknik modifikasi enzimatik ini jauh lebih murah yaitu sekitar 5:1.000 dibandingkan dengan teknik yang berdasarkan reaksi antigen-antibodi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Naglik JR, David M, Jagruti M, Priya K, Elina T, Gunther W, Anwar R.T, Catherine A.R, Alexander J.W, Stephen J.C, Martin S, and Bernhard H. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*, 2008; 154: 3266–80.
2. Karkowska-Kuleta J, Maria R-K and Andrzej K. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica* 2009; 56 (2): 211–224.
3. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Rocil Z, Richardson M, and Rogers TR. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother*, 2011; 66 (Suppl 1): 115–24.
4. Big C and Vazquez JA. The diagnosis and management of systemic candidiasis in the intensive care unit. *Anest Ratow*, 2009; 3: 136–143.
5. Pauw BD, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008; 1–9.
6. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S and Sulahian A. Contribution of the (1→3)- β -D-Glucan Assay for diagnosis of Invasive Fungal Infections. *JCM*, 2008; 1009–1013.
7. Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, Torelli R, Pennisi MA, Bello G, Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)- β -D-Glucan Assay, *Candida* score and colonization index. *Critical Care*, 2011; 15: R249.
8. Darukutni, Sri Haryati, Murkati, Ruben Dharmawan. Modifikasi Glucose Analyzer untuk Deteksi β -Glucan *Candida albicans*. Penelitian DIPA BLU Fakultas Kedokteran UNS. Unpublished. 2010.
9. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter Clinical Evaluation of the (1→3) β -D-Glucan Assay as an aid to Diagnosis of Fungal Infections in Humans. *CID* 2005; 41: 654–9.
10. Megazyme International Ireland. 2011a. Mixed-Linkage Beta-Glucan Assay Procedure (McCleary Method). K-BGLU 07/11. AOAC Method 32–23. AOAC Method 995.16. EBC Methods 4.11.1.4.16.1 and 8.11.1.1. ICC Standard Method No. 166. 2011; 1–14.
11. Megazyme International Ireland. 2011b. D-Glucose Assay Procedure (GOPOD-Format). K-Gluc 03/11. 2011; 1–2.
12. Megazyme International Ireland. 2011c. Enzymatic Yeast Beta-Glucan Assay Procedure K-EBHLG 05/11. 2011; 1–7.
13. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL and Woods GL. Evaluation of a (1→3)- β -D-Glucan Assay for diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microb*. P 2005; 5957–62.