

LAPORAN AKHIR PENELITIAN



**JUDUL PENELITIAN:
KORELASI ANTARA ISOLAT *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* DARI SAMPEL
KLINIS DAN LINGKUNGAN BERDASARKAN METODE PCR-FINGERPRINTING**

**Ketua Peneliti:
dr. Machrumnizar, Mbiomed**

**Anggota:
dr. Suriyani, Mbiomed
dr. Yuliana, Mbiomed
dr. Arleen, Sp.MK**

**FAKULTAS KEDOKTERAN TRISAKTI
JULI 2017**

Abstrak

Cryptococcus neoformans adalah jamur patogen yang menyebabkan kriptokokosis meningeal yang mengancam jiwa terutama pada individu immunokompromi, seperti pasien terinfeksi HIV/AIDS. Berdasarkan karakteristik genetik dan sifat serologis polisakarida kapsuler, *Cryptococcus neoformans* mempunyai tiga varietas dan lima serotipe, yaitu: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D), *C. neoformans* var. *grubii* (serotipe A), serotipe hibrida AD, dan *C. gattii* (serotipe B dan C). Dari 21 isolat yang dikumpulkan, 7 isolat berasal dari sampel klinis dan 14 isolat dari sampel lingkungan. Dari isolat klinis, 100% berasal dari laki-laki dengan usia rata-rata 29,71 tahun. Seluruh isolat klinis *C. neoformans* berasal dari pasien HIV-positif (100%) dan ditemukan dari cairan serebrospinal (100%). Isolat klinis dikumpulkan dari wilayah Jakarta dan sekitarnya dengan sebagian besar isolat berasal dari Jakarta (57,14%), Depok (28,57%), Bekasi (14,29%). Dari isolat lingkungan, 35,71% diperoleh dari kotoran burung merpati, 14,29% dari debu rumah, 28,57% dari tanah, dan 21,43% dari lapukan kayu. PCR fingerprinting menggunakan primer M13 membedakan 21 isolat klinis dan lingkungan atas dua kelompok (kelompok A dan B). Tujuh isolat klinis dan 12 isolat lingkungan adalah kelompok A, yang memiliki dua pita spesifik utama diantara 1250 dan 754 base pairs. Dua isolat lingkungan, satu dari kotoran burung merpati dan lainnya dari lapukan kayu adalah kelompok B, yang memiliki dua pita spesifik utama diantara 1180 dan 554 base pairs. Korelasi genetik antara isolat klinis dan lingkungan konsisten dengan hipotesis yang menyatakan bahwa infeksi *Cryptococcus* pada manusia diperoleh dari pajanan spora di alam.

Kata kunci: *Cryptococcus*, isolat klinis, isolat lingkungan, PCR fingerprinting

Abstract

Cryptococcus neoformans is a pathogenic fungus that causes life-threatening meningeal cryptococci, mainly in immunocompromised individuals, such as HIV/AIDS infected patients. From 21 isolates were collected, 7 isolates were from clinical samples and 14 isolates from environmental samples. Of the clinical isolates, 100% were from men with an average age of 29.71 years. All *C. neoformans* clinical isolates were from HIV-positive patients (100%) and found from cerebrospinal fluid (100%). Clinical isolates were collected from Jakarta and surrounding areas with most isolates from Jakarta (57.14%), Depok (28.57%), and Bekasi (14.29%). Environmental isolates, 35.71% were obtained from pigeon droppings, 14.29% from dust house, 28.57% from the soil, and 21.43% from decaying woods. PCR fingerprinting using M13 primer discriminated 21 clinical and environment isolates into two groups (group A and B). Seven clinical and 12 environmental isolates were group A, which had two major specific bands of approximately 1250 and 754 base pairs. Two environmental isolates, one from pigeon excreta and the other one from decaying wood sample were group B, which had two major specific bands of approximately 1180 and 554 base pairs. Genetic correlation between the majority of clinical and environmental isolates is consistent with the hypothesis that human cryptococcosis is acquired from spora exposure in the nature.

Keywords: *Cryptococcus*, clinical isolates, environmental isolates, PCR fingerprinting

BAB I

PENDAHULUAN

Latar belakang

Cryptococcus neoformans dan *Cryptococcus gattii*, merupakan penyebab kriptokokosis, suatu mikosis sistemik pada manusia dan hewan.⁽¹⁻³⁾ *Cryptococcus neoformans* mempunyai dua varietas dan tiga serotipe yang diakui, yakni: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipe A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D) dan serotipe AD hybrid. *Cryptococcus gattii* terdiri atas serotipe B dan C.⁽²⁻⁴⁾

Kedua spesies yang ditemukan terkait dengan pejamu yang berbeda di lingkungan. Inhalasi dari propagul menular (basidiospora atau blastokonidia) dari lingkungan tampaknya menjadi sumber infeksi bagi hewan dan manusia.⁽²⁾ *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* dan *C. neoformans* var. *neoformans* dapat diisolasi di seluruh dunia dari tanah yang mengandung kotoran merpati dan busukan kayu.⁽⁵⁻⁹⁾ Sebaliknya, *C. gattii* memiliki distribusi geografis yang terbatas pada daerah tropis dan subtropis.⁽¹⁰⁻¹²⁾

Dalam kompleks spesies *C. neoformans*, *mating type* isolat *Cryptococcus* ditentukan oleh lokus tunggal dengan dua alel, yakni *mating type* MAT-a dan MAT- α .⁽¹³⁾ Pada serotipe A dan D, *mating type* α adalah yang paling umum, baik pada isolat klinik maupun lingkungan, sedangkan *C. neoformans* var. *grubii* serotipe A *mating type* MAT-a sangat jarang ditemukan.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ Diploidisasi dan meiosis dapat terjadi pada sel serotipe A Mat-a, menunjukkan bahwa reproduksi seksual dapat terjadi pada isolat dari *mating type* yang sama.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾

Kriptokokosis dianggap penyebab penting morbiditas dan mortalitas, terutama pada pasien dengan gangguan sistem kekebalan tubuh, terutama mempengaruhi individu yang terinfeksi human immunodeficiency virus (HIV).⁽²⁾ Kebanyakan infeksi pada individu imunokompromis disebabkan oleh *C. neoformans* var. *grubii*, sedangkan *C. gattii* terutama mempengaruhi individu imunokompeten.^(2,10,19) Di Jakarta, prevalensi kriptokokosis pada pasien terinfeksi HIV dan AIDS dengan gangguan sistem saraf pusat (SSP) berkisar antara 21,9% dan di Bandung terdapat 30% pasien AIDS terbukti menderita meningitis *Cryptococcus*.^(20,21)

Teknik *genotyping* yang berbeda telah digunakan untuk mempelajari epidemiologi molekul kompleks spesies *C. neoformans*, yang memungkinkan untuk membedakan dengan isolat yang sulit dibedakan menggunakan teknik konvensional.⁽²⁾ Teknik tersebut meliputi *karyotyping*, *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD), *amplified fragment length*

polymorphism (AFLP), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dan PCR *fingerprinting*.⁽²²⁻³⁰⁾ PCR *fingerprinting* telah digunakan secara luas untuk mengelompokkan lebih dari 1000 isolat *Cryptococcus* yang diperoleh dari seluruh dunia ke dalam delapan jenis molekul utama: VNI dan VNII = *C. neoformans* var. *grubii*, serotipe A; VNIII = AD hibrida, serotipe AD; VNIV = *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipe D; VGI, VGII, VGIII dan VGIV = *C. gattii*, serotipe B dan *C.*^(26-28,30) Delapan jenis molekul besar telah dikonfirmasi dengan analisis RFLP gen *URA5* dan *PLB1*.⁽²⁹⁾ Berdasarkan analisis tersebut ditemukan bahwa sebagian besar isolat yang diperoleh dari pasien AIDS adalah jenis molekul VNI, sedangkan VGI adalah genotipe milik *C. gattii*.⁽²⁸⁾

Data epidemiologi molekuler yang berkaitan dengan *Cryptococcus* sp di Indonesia sangat terbatas dan tidak lengkap. Sebelumnya, terdapat dua penelitian di Indonesia yang menemukan *Cryptococcus* pada kotoran burung merpati, namun tidak dilakukan identifikasi sampai tingkat spesies. Mengingat peningkatan prevalensi kriptokokosis meningeal di Indonesia, kami menggunakan metode PCR *fingerprinting* untuk menentukan genotipe dan menilai hubungan epidemiologi kriptokokus dari isolat klinis dan lingkungan.

Rumusan Masalah :

Kriptokokosis merupakan penyebab penting morbiditas dan mortalitas, terutama pada pasien dengan gangguan sistem kekebalan tubuh. Data epidemiologi molekuler yang berkaitan dengan *Cryptococcus* sp di Indonesia sangat terbatas dan tidak lengkap. Habitat alamiah *Cryptococcus* sp di lingkungan, yang telah diketahui, yakni kotoran burung merpati, lubang pohon, tanah terkontaminasi kotoran burung atau dedaunan yang membusuk dan debu. Pasien immunokompromis terinfeksi kriptokokosis meningeal karena menghirup basidiospora atau spora kering *Cryptococcus* sp yang tersebar di lingkungan. Profil yang sama antara isolat klinis dan lingkungan menunjukkan bahwa pasien mungkin memperoleh infeksi dari lingkungan tersebut.

Hipotesis

Terdapat hubungan antara Isolat *Cryptococcus neoformans* yang berasal dari sampel klinis dengan sampel yang berasal dari lingkungan tempat tinggal pasien.

Tujuan Umum

Untuk menurunkan angka morbiditas dan mortalitas akibat kriptokokosis meningeal yang disebabkan *Cryptococcus neoformans* pada pasien HIV/AIDS.

Tujuan khusus

1. Mendapatkan gambaran genotipe *Cryptococcus neoformans* dari isolat klinik.
2. Mendapatkan gambaran genotipe *Cryptococcus neoformans* dari isolat lingkungan.
3. Mengetahui korelasi antara isolat *Cryptococcus neoformans* yang berasal dari sampel klinis dengan sampel yang didapat dari lingkungan.

Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini dapat diketahui metode yang efektif dan akurat untuk digunakan sebagai standar pemeriksaan mikologi di laboratorium.
2. Penelitian ini diharapkan dapat mendukung upaya-upaya dalam meningkatkan kualitas dan efektifitas identifikasi spesies jamur di laboratorium untuk kepentingan masyarakat pada umumnya dan secara khusus untuk pengembangan penelitian.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Genus *Cryptococcus* merupakan filum *Basidiomycota* yang untuk pertama kali ditemukan pada tahun 1890-an oleh Busse dan Buschke. Mereka berhasil mengidentifikasi bentuk seperti jamur pada pemeriksaan lesi tibia secara histologi dan mengisolasi jamur dari lesi tersebut, yang awalnya disebut sebagai *Saccharomyces*.⁽³¹⁾ Isolasi pertama *Cryptococcus* dari lingkungan dilaporkan pada tahun 1894 sewaktu Sanfelice mengisolasi jamur dari buah persik dan dinamakan *Saccharomyces neoformans*. Pada tahun 1901 Vuillemin mengganti nama jamur itu menjadi *Cryptococcus hominis* untuk membedakannya dari bentuk *Saccharomyces* spp.⁽³²⁾ Pada tahun 1975, Kwon-Chung menemukan bentuk seksual *C. neoformans* dan dinamakan *Filobasidiella neoformans* sebagai hasil perkawinan dua galur serotipe D.⁽³³⁾ Hasil perkawinan antara dua galur lain (serotipe B dan C) memproduksi teleomorph berbeda dinamakan *Filobasidiella bacillispora*.⁽¹³⁾ Bentuk aseksual *F. bacillispora* dinamakan *Cryptococcus bacillispora*, yang diduga sebagai variasi dari *C. neoformans*. Akhirnya pada tahun 2003 seluruh genom *C. neoformans* dapat ditentukan.⁽¹⁴⁾

Genus *Cryptococcus* terdiri atas ~ 37 spesies dan termasuk ke dalam filum *Basidiomycota*, kelas *Tremellomycetes*, dan ordo *Tremellales*.⁽³⁴⁻³⁶⁾ Dua spesies yang sangat penting sebagai patogen manusia adalah *C. neoformans* dan *C. gattii*. *Cryptococcus neoformans* spesies kompleks pertama kali diklasifikasikan menurut variasi struktur kapsul polisakarida ekstraseluler yang dapat dibedakan oleh tes aglutinasi dengan antibodi-antigen spesifik. Pada 1950-an dan 1960-an, *C. neoformans* diklasifikasikan menjadi empat serotipe, A sampai D.^(37,38) Serotipe AD hibrida sering dianggap sebagai serotipe kelima dari *C. neoformans* spesies kompleks, dan serotipe hibrida langka antara *C. neoformans* dan *C. gattii* seperti BD dan AB juga telah diamati.⁽³⁹⁻⁴³⁾

Cryptococcus gattii awalnya diklasifikasikan sebagai varian *C. neoformans*, dengan nama *C. neoformans* var. *gattii* atau var. *bacillispora*.⁽⁴³⁾ Pada tahun 2002, *C. neoformans* var. *gattii* diusulkan sebagai spesies *Cryptococcus gattii*.⁽³⁾ Klasifikasi *Cryptococcus* spesies kompleks kini menjadi *C. neoformans* (serotipe A, D, dan AD) dan *C. gattii* (serotipe B dan C). Kelima serotipe tersebut memiliki perbedaan pada karakteristik ekologi, molekular, dan morfologi; epidemiologi; patogenisitas; dan distribusi geografik.⁽⁴⁴⁾ Bentuk seksual *C. gattii* disebut *Filobasidiella bacillispora*, sedangkan *C. neoformans* disebut *Filobasidiella neoformans*.⁽⁴⁵⁾

Distribusi *Cryptococcus*, terutama *C. neoformans* tersebar luas di berbagai bagian dunia. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ditemukan lebih banyak di lingkungan dibandingkan *C. neoformans* var. *neoformans*. Habitat utama jamur ini adalah tanah yang mengandung material tanaman yang membusuk, lapukan kayu pada celah/lubang pohon dan kotoran burung.⁽⁴⁶⁾ Jamur dapat ditemukan pada lubang pohon *Syzygium jambolana*, *Cassia grandis*, *Senna multijuga* dan *Ficus microcarpa*.⁽⁴⁷⁾ Jamur juga dapat ditemukan dalam sampel kotoran atau kloaka dari berbagai spesies burung, terutama burung merpati. *Cryptococcus neoformans* dapat bertahan hidup selama dua tahun atau lebih dalam kotoran burung merpati segar atau kering.⁽⁴⁸⁾ Habitat alamiah *C. neoformans* menstimulasi perkembangbiakan jamur secara ekstensif, baik dalam bentuk khamir dan spora, terutama bila terlindung dari pajanan sinar matahari.⁽⁴⁹⁾ Kondisi lingkungan yang lembab juga mendukung perkawinan *C. neoformans* var. *grubii* dan *C. neoformans* var. *neoformans*.⁽⁵⁰⁾ Kotoran dari beberapa burung lainnya (misal: burung beo, burung kenari) dapat mendukung pertumbuhan khamir *Cryptococcus*, namun belum diketahui apakah kotoran burung tersebut juga dapat menstimulasi perkembangbiakan jamur.⁽⁵¹⁾

Distribusi *C. gatii* lebih terbatas di daerah tropis dan subtropis, serta terdapat hubungan ekologi spesifik dengan *Eucalyptus camaldulensis* dan *Eucalyptus tereticornis*.⁽⁵²⁾ Jamur juga dapat tumbuh pada jenis pohon lainnya seperti *Syzygium cumini* (pohon jambu air), almond (*Prunus dulcis*), golden shower (*Cassia fistula*), cemara, cedar dan maple.⁽⁵³⁾ Selain itu, jamur dapat diisolasi dari udara, air tawar, air laut, serta tanah.⁽⁵⁴⁾ *Cryptococcus gatii* juga dapat diisolasi dari sampel kotoran atau kloaka burung dan bentuk aseksual hanya ditemukan terutama pada kotoran burung.⁽⁴⁸⁾

Cryptococcus spp. berproliferasi dan berkembangbiak di permukaan tanaman. Diduga bahwa material yang terkandung dalam tanaman (misal: hormon tanaman, indole-3-acetic acid, myo-inositol) memicu perubahan morfologi dan menstimulasi reproduksi seksual selama siklus hidup *Cryptococcus* di alam, tetapi hal tersebut dapat dihambat oleh cahaya. *Cryptococcus* di alam, bersifat responsif terhadap faktor lingkungan, seperti suhu, tingkat keasaman tanah, sumber nitrogen dan karbondioksida, air serta besi. Contohnya, ukuran dan ketebalan kapsul dipengaruhi faktor genetik dan kondisi lingkungan. Suhu dan tekanan CO₂ tinggi di lingkungan akan menyebabkan kapsul hidrofilik kolaps untuk melindungi jamur dari dehidrasi, sehingga ukuran kapsul yang relatif kecil/tipis mudah terhirup ke saluran napas.^(49,55)

Identifikasi *Cryptococcus* dapat dilakukan secara konvensional dan molekular. Identifikasi secara konvensional yaitu berdasarkan karakter fenotipik. Karakter fenotipik

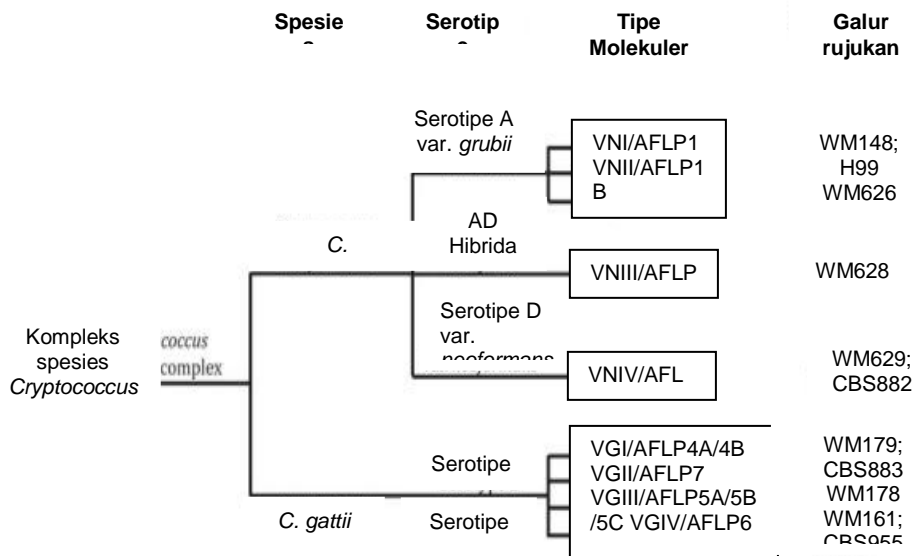
terdiri atas karakter morfologi (makroskopik dan mikroskopik), fase reproduksi seksual dan aseksual, dan karakter fisiologi biokimia. Karakter morfologi secara makroskopik yang diamati antara lain warna koloni, profil koloni, tekstur koloni, tepi dan permukaan koloni (dikutip dari Maulana⁽⁵⁶⁾). Pada medium agar Sabouraud yang diinkubasi pada suhu kamar, koloni *Cryptococcus* yang terbentuk berwarna kekuningan, mengkilat, dan mukoid. Pada agar Nigarseed yang diperam dalam suhu kamar, *Cryptococcus* membentuk koloni khamir yang berwarna coklat kehitaman, mengkilat, dan mukoid.⁽⁵⁷⁾

Karakter morfologi secara mikroskopik yang diamati adalah ukuran dan bentuk sel. Di laboratorium, pemeriksaan secara mikroskopik dilakukan menggunakan pewarnaan *lacto phenol cotton blue* (LPCB) untuk identifikasi morfologi dari semua koloni (filamen, ragi, dan koloni seperti ragi). Pewarnaan tinta india digunakan untuk identifikasi *Cryptococcus*. Jamur akan terlihat sebagai sel ragi yang dikelilingi kapsul berlendir, yang tampak sebagai zona bening yang mengelilingi sel khamir. Sel-sel khamir mungkin bulat, oval atau memanjang. Sel khamir *Cryptococcus* dapat tunggal tanpa tunas atau bertunas tunggal, namun jarang multipel.^(57,58)

Karakter fisiologi biokimia *Cryptococcus* dibedakan berdasarkan kemampuan fermentasi gula tertentu, asimilasi karbon dan nitrogen, tumbuh pada suhu 37°C (dikutip dari Maulana⁽⁵⁶⁾). *Cryptococcus* memiliki kemampuan untuk tumbuh dengan baik pada medium yang mengandung sumber karbon raffinosa, melezitosa, D-xylosa, L-arabinosa. *Cryptococcus* merupakan *cellulolytic yeasts* dan mempunyai kemampuan merombak selulosa menjadi glukosa.⁽⁵⁹⁾ Kemampuan *Cryptococcus* tumbuh pada suhu 37°C merupakan karakter fisiologi yang penting pada proses infeksi dalam tubuh pejamu manusia.⁽⁶⁰⁾ Identifikasi fenotipik memiliki beberapa kekurangan dan seringkali tidak dapat digunakan untuk membedakan spesies dan membutuhkan waktu lebih lama karena pertumbuhan jamur.

Klasifikasi terbaru *Cryptococcus* berdasarkan *genetic typing* menggunakan PCR *fingerprinting*, RFLP, RAPD, AFLP, MLST, MLMT dan analisis MALDI-TOF. Studi molekuler menggunakan metode tersebut menunjukkan bahwa *C. neoformans* dan *C. gattii* juga dapat dikelompokkan paling sedikit delapan spesies *cryptic* yang didefinisikan sebagai tipe molekul, karena itu menggambarkan intraspesies dan keragaman genetik antar spesies. Tipe molekul terutama digunakan dalam studi epidemiologi jika terjadi wabah. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* terdiri dari tipe VNI dan VNII, *C. neoformans* var. *neoformans* ekuivalen dengan tipe VNIV, sedangkan hibrida antara *C. neoformans* var. *grubii* dan *C. neoformans* var. *neoformans* adalah tipe VNIII. *Cryptococcus gattii* terdiri dari tipe molekul

VGI, VGII, VGIII dan VGIV. Dampak patogenik tipe molekuler tersebut masih memerlukan penelitian lebih lanjut, karena distribusi epidemiologi belum sepenuhnya diketahui.⁽²²⁻³⁰⁾



Gambar 2.1. Skema filogenetik kompleks spesies *Cryptococcus*. Diagram terdiri atas spesies, serotipe, tipe molekuler dan referensi strain. Kompleks spesies terdiri dari dua spesies, *C. neoformans* dan *C. gatii*. *Cryptococcus neoformans* selanjutnya dibedakan menjadi serotipe A varietas *grubii* dengan tipe molekuler VNI, VNII, VNB, hybrid AD (VNIII) dan serotipe D varietas *neoformans* tipe molekuler VNIV. *Cryptococcus gatii* dibedakan menjadi serotipe B dan C dengan tipe molekuler VGI, VGII, VGIII, VGIV. (Dimodifikasi dari Bovers *et al.*, 2008, Meyer *et al.*, 2003, Voelz K, 2010)

Kriptokokosis merupakan penyakit infeksi dengan morbiditas dan mortalitas tinggi, yang disebabkan oleh *Cryptococcus* spp. *Cryptococcus* dapat menyebabkan infeksi lokal di setiap organ yang melibatkan kulit, mata, miokardium, tulang, sendi, paru-paru, kelenjar prostat, saluran kemih, dan SSP. Kriptokokosis pada SSP dapat berupa meningitis, meningoencephalitis atau *space-occupying lesion* yang sebagian besar terjadi pada pasien dengan gangguan imunitas selular, termasuk penggunaan immunosupresan (misal: kortikosteroid, inhibitor calcineurin, obat sitotoksik dan antibodi monoklonal) pada pasien transplantasi atau keganasan hematologi dan pasien terinfeksi HIV, tetapi juga dapat terjadi pada individu yang imunokompeten.⁽⁶²⁾

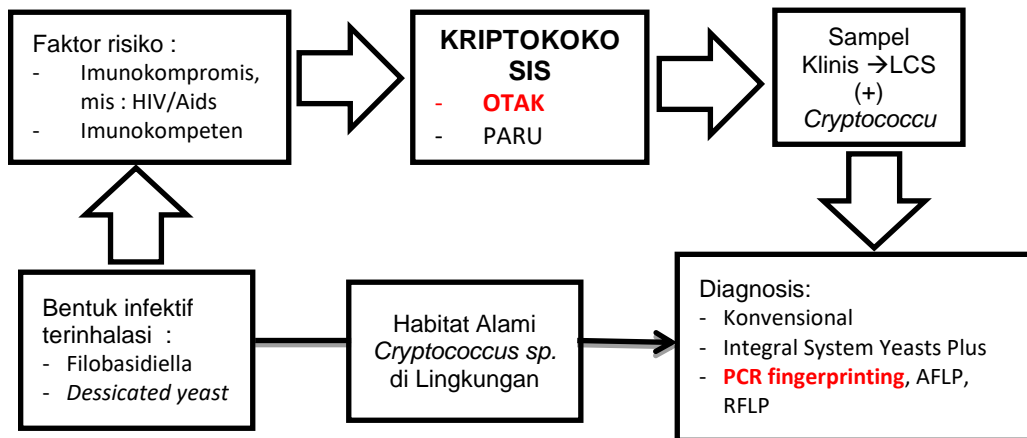
Cryptococcus merupakan jamur saprofit berkapsul, memiliki dua spesies yang patogen pada manusia, yaitu *C. neoformans* dan *C. gatii*. *Cryptococcus neoformans* dibagi menjadi dua subtype berdasarkan komposisi antigen kapsular, yaitu *C. neoformans* var. *grubii* (serotipe D) dan *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype A). Serotipe A adalah yang paling umum dan menyebabkan 80%-95% infeksi kriptokokosis, sedangkan 20%-30% kriptokokosis meningitis terkait HIV disebabkan serotipe D.⁽⁶³⁾

Infeksi *Cryptococcus* menimbulkan morbiditas dan mortalitas yang cukup tinggi pada pasien dengan gangguan sistem imun, yaitu sekitar 10%-30% dan 5%-10% pasien dengan limfopenia CD4+ menderita kriptokokosis. Di Jakarta, prevalensi kriptokokosis pada pasien terinfeksi HIV dan AIDS dengan gangguan SSP berkisar antara 21,9% dan di Bandung terdapat 30% pasien AIDS terbukti menderita meningitis.^(20,21,49)

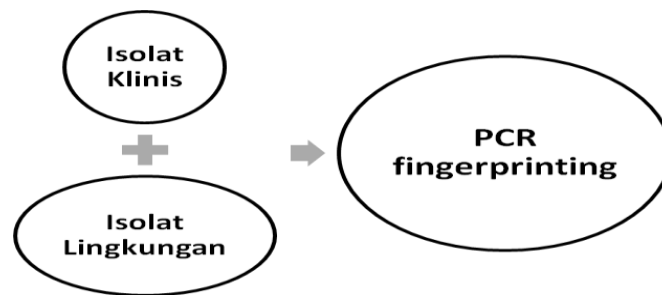
Setelah inhalasi partikel infeksi, sel ragi kering atau basidiospora, akan terbentuk kompleks primer paru-kelenjar getah bening. Manifestasi klinis bervariasi tergantung pada faktor pejamu, inokulum dan virulensi sehingga jamur dapat menyebar secara sistemik. Infeksi *Cryptococcus* dapat asimtomatik, kronik atau akut. Paru merupakan gerbang utama tempat masuknya *Cryptococcus*, namun infeksi primer pada paru sering asimtomatik, terutama pada individu imunokompeten. Gejala pada paru dapat berupa batuk, nyeri dada, demam, sesak napas, berat badan menurun dan malaise. Pada pasien imunokompromi dapat terjadi pneumonia dan *acute respiratory distress syndrome* (ARDS).⁽³¹⁾

Dari infeksi primer, *Cryptococcosis* dapat menyebar secara sistemik dengan predileksi utama adalah SSP. Manifestasi klinis berat yang paling sering adalah meningitis, yaitu peradangan selaput otak yang disertai peradangan parenkim otak, sehingga lebih tepat digunakan istilah meningoensefalitis. Kriptokokosis meningeal harus selalu dimasukkan dalam diagnosis diferensial pada kasus meningoensefalitis kronis atau subakut karena gambaran klinis yang tidak spesifik, seperti sakit kepala, tekanan intrakranial meningkat, demam, *lethargy*, koma, defisit neurologi atau kejang. Infeksi neurologi dapat menimbulkan komplikasi dengan terbentuk massa disebut kriptokokoma, yang lebih sering disebabkan *C. gattii* dibandingkan *C. neoformans*. *Cryptococcus* juga dapat menyebabkan infeksi lokal di berbagai organ, seperti kulit, mata, miokardium, kelenjar prostat, saluran kemih, tulang dan sendi. Resiko kriptokokosis pada pasien terinfeksi HIV meningkat bila jumlah CD4 50-100 sel/ μ L. Kurangnya respons inflamasi terjadi karena jumlah leukosit rendah (<20/ μ L) dengan titer antigen *Cryptococcus* serum yang tinggi.^{62,64}

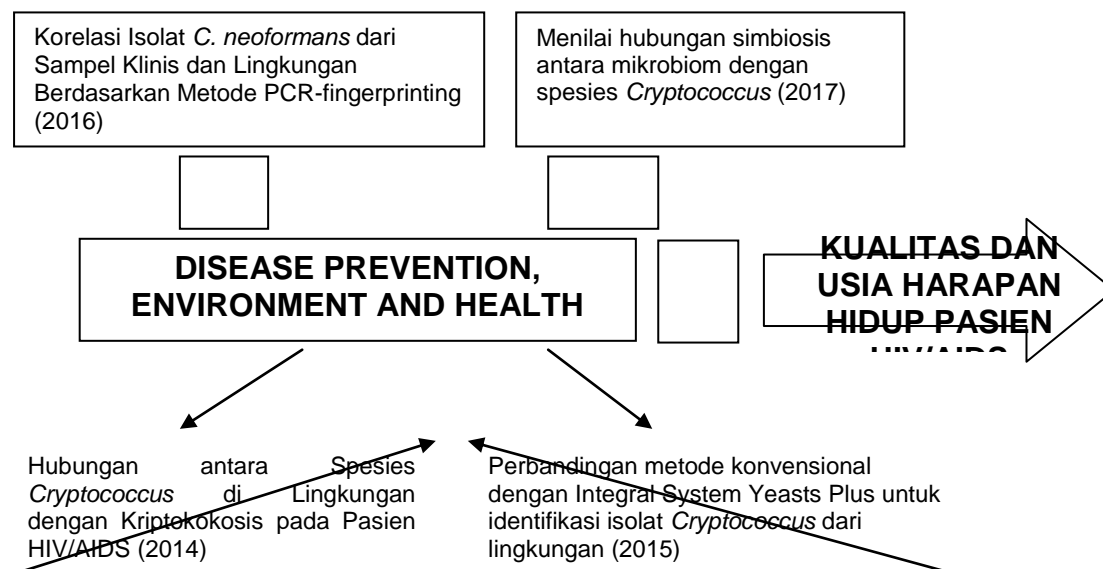
KERANGKA TEORI PENELITIAN



KERANGKA KONSEP PENELITIAN



ROAD MAP PENELITIAN



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain penelitian:

Penelitian ini adalah penelitian analitik dan menggunakan desain *cross-sectional*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian:

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikologi Departemen Parasitologi FKUI dan dilaksanakan pada bulan Desember 2016 - Mei 2017.

3.3 Sampel :

Sampel klinik yang diteliti adalah cairan serebro spinal (LCS) dari pasien terinfeksi HIV dengan hasil pemeriksaan laboratorium *Cryptococcus* (+) selama Januari 2009 hingga Juni 2015. Sampel lingkungan yang diteliti diambil dari lingkungan rumah pasien tersebut berupa lapukan kayu di lubang atau celah pohon, tanah yang terkontaminasi lapukan daun atau ranting, air dan debu dari dalam rumah, serta kotoran burung.

Kriteria Inklusi :

1. Pasien HIV/AIDS dengan kriptokokosis meningeal
2. Data laboratorium dan rekam medis lengkap, dicurigai mengalami kriptokokosis meningeal berdasarkan rekam medis saat dirawat di RSCM dan RSKO.
3. Pasien dan atau anggota keluarga bersedia dilakukan pengambilan sampel di lingkungan rumahnya.

Kriteria Eksklusi :

1. Menderita mikosis yang disebabkan spesies jamur lain
2. Disertai penyakit sistemik lain seperti toksoplasmosis, TBC

3.4 Cara pengambilan sampel :

Sebanyak 7 isolat dipulihkan dari sampel cairan serebrospinal (LCS) dengan meningitis kriptokokus yang didiagnosis dari Januari 2009 hingga Juni 2015 di RSCM dan RSKO, Jakarta, serta 14 isolat dari sampel lingkungan rumah pasien tersebut. Catatan medis pasien ini diperiksa untuk data klinis.

Isolasi, identifikasi dan pemeliharaan isolat.

Identifikasi isolat ragi yang dicurigai termasuk uji morfologi, biokimia dan fisiologis standar, seperti tinta India, produksi pigmen pada media Bird Seed Agar (BSA), tes asimilasi karbon (Integral system yeasts plus, Liofilchem[®], Italia), dan termotolerans pada suhu 37°C. Masing-masing isolat *Cryptococcus* di subkultur pada medium BSA dan satu koloni dipilih untuk analisis molekuler. Isolat diawetkan di medium gliserol pada suhu -20 ° C dan diliofilisasi dengan Susu Skim (DIFCO, Laboratories, Detroit, MI, AS).

Ekstraksi DNA

Prosedur ekstraksi DNA dilakukan menggunakan modifikasi metode dari Meyer, *et al.*,²⁸ isolat *Cryptococcus neoformans* ditanam pada Saboureaud's dextrose agar pada suhu 37°C selama 72 – 96 jam, satu loop penuh sel dari kultur dicampur dengan air deionisasi steril dan disentrifugasi. Supernatan dibuang, dan tabung berisi pelet sel ragi dibekukan dalam nitrogen cair. Pelet itu digiling dengan alu mini. Larutan lisis sel (100 mg triisopropilnkapthalene sulfonic acid, 600 mg asam para-aminosalicylic, air deionisasi 10 mL steril, buffer ekstraksi 2,5 mL (1 M Tris-HCl, 1,25 M NaCl, 0,25 M EDTA, pH 8.0) dan 7,5 mL fenol Jenuh dengan Tris-EDTA dipanaskan sampai 55 ° C, dan 700 µL campuran ini ditambahkan ke sel-sel tanah beku. Tabung diinkubasi selama 2 menit pada 55 ° C, dikocok sesekali, dan kemudian ditambahkan 500 µL kloroform, lalu campuran diinkubasi selama 2 menit pada suhu 55 ° C dan dikocok sesekali, tabung disentrifugasi selama 10 menit pada 14.000 rpm, dan fasa berair dipindahkan ke tabung baru, kemudian ditambahkan 500 µL fenol-kloroform-isoamil alkohol (25: 24: 1), dikocok selama 2 menit pada suhu kamar, dan disentrifugasi seperti di atas. Fasa berair dipindahkan ke tabung baru, ditambahkan 500 µL kloroform, dikocok, dan disentrifugasi seperti di atas. DNA genomik, fasa berair dipindahkan lagi ke tabung baru, dan 0,03 volume 3,0 M natrium ac Eter (pH 5,2) dan ditambahkan 2,5 volume etanol 96% dingin, dan campuran dikocok dengan lembut dan diinkubasi pada suhu -20 ° C paling sedikit 1 jam atau semalaman. Larutannya disentrifugasi selama 30 menit pada 14.000 rpm untuk pelet DNA. Pelet DNA dicuci dengan etanol 70% dan disentrifugasi selama 10 menit pada 14.000 rpm dan dikeringkan dengan udara. DNA disuspensikan kembali dalam air deionisasi 200 µL steril pada suhu 4°C semalaman dan disimpan pada suhu -20°C.

PCR fingerprinting

Sekuens inti spesifik minisatelit dari *wild-type phage* M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3 ') digunakan sebagai primer tunggal dalam cetakan PCR-fingerprinting dengan modifikasi

metode Meyer *et al*,²⁸ Reaksi amplifikasi kation dilakukan dalam volume 50 µL yang mengandung 100 ng DNA, buffer PCR 1 × (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl), masing-masing 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP dan dTTP, 2.0 mM MgCl₂, 60 ng primer (Invitrogen, Brasil) dan 2,5 U DNA polimerase Taq (Invitrogen, Brasil). PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94 ° C selama 10 menit, diikuti oleh 36 kation amplifikasi: 1 menit denaturasi pada 94 ° C, 1 menit anil pada suhu 50 ° C, 1 menit perpanjangan pada 72 ° C. Langkah ekstensi terakhir diterapkan pada suhu 72 ° C selama 10 menit. Produk penguat amplifikasi dipisahkan dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1,5% pada buffer 1 × Tris-Acetate EDTA (TAE) pada suhu 90 V selama 4,5 jam dan diwarnai dengan etidium bromida pada 0,5 µg / mL selama 30 menit dan divisualisasikan di bawah sinar UV. Jenis molekuler (VNI-VNIV dan VGI-VGIV) dibandingkan dengan strain referensi dari delapan jenis molekul utama. Strain referensi digunakan sebagai kontrol internal untuk mengkonfirmasi reproduktifitas. Profil sidik jari PCR dianalisis berdasarkan adanya atau tidak adanya pita yang jelas dan pasti dalam elektroforesis.

Strain Referensi

Strain standar dan strain referensi diperoleh dari koleksi kultur *Cryptococcus neoformans* yang sebelumnya telah diidentifikasi dengan metode biokimia rutin dan sekuensing ITS serta dipelihara di CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands dan mewakili masing-masing dari delapan jenis molekul utama sebagai berikut; CBS 10085 (serotipe A/VNI), CBS 10084 (serotipe A/VNII), WM 628 (serotipe AD/VNIII), CBS 10079 (serotipe D/VNIV), CBS 10078 (serotipe B/VGI), CBS 10082 (serotipe B/VGII), CBS 10081 (serotipe B/VGIII), CBS 10101 (serotipe C/VGIV).

3.5 Etika Penelitian

Protokol penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI/RSCM dan Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti.

3.6 Sifat Penelitian

Penelitian ini merupakan studi *cross-sectional*. Isolat klinik adalah data primer yang didapatkan dari sampel klinik yang dikultur pada medium SDA dan disimpan dalam medium PDA pada suhu 20°C. Sampel klinik berupa cairan cerebro spinal (LCS) pasien HIV dengan kriptokokosis meningeal. Isolat lingkungan adalah data primer yang diambil dari setiap lingkungan rumah pasien HIV dengan kriptokokosis meningeal (pasien yang sama dengan

sampel klinik) yang telah tersimpan dalam medium PDA pada suhu 20°C. Isolat tersebut diambil dari tanah yang terkontaminasi busukan daun/kayu, kerokan batang/kulit pohon, debu rumah, kotoran burung, dan air.

3.7 Analisis Statistik

Analisa statistik dilakukan dengan deskriptif untuk memperoleh nilai frekuensi, *mean*, standar deviasi. Hasil pengukuran disajikan dalam tabel 2x2. Uji hipotesa dilakukan dengan menggunakan *Fisher's Exact Test*. Hubungan antar variabel dilakukan dengan uji sensitivitas dan spesifisitas. Analisis dilakukan dengan tingkat kemaknaan 95% ($\alpha = 0,05$), perbedaan dianggap bermakna apabila nilai $p = 0,05$.

BAB IV HASIL PENELITIAN

Tujuh isolat klinik dan empat belas isolat lingkungan disegarkan kembali dengan cara di subkultur pada medium kultur baru. Isolat-isolat tersebut diperoleh dari koleksi kultur yang disimpan di Laboratorium Mikologi Molekuler, Departemen Parasitologi FKUI, yang telah ditanam pada medium PDA dan disimpan dalam tabung steril tutup ulir 10 cc pada suhu -20°C . Isolat klinik merupakan hasil kultur sampel cairan serebrospinal dari pasien terinfeksi HIV/AIDS dengan kriptokokosis meningeal. Isolat lingkungan didapatkan dari hasil kultur sampel kotoran burung merpati, debu rumah, lapukan kayu, dan tanah yang terdapat di lingkungan sekitar tempat tinggal pasien, yaitu pasien terinfeksi HIV/AIDS dengan kriptokokosis meningeal yang sama dengan subyek isolat klinik.

Identifikasi spesies *Cryptococcus neoformans* dilakukan secara makroskopis dengan mengidentifikasi pertumbuhan koloni berwarna coklat kehitaman yang tumbuh pada medium *Niger Seed Agar* (NSA), dan pemeriksaan mikroskopis menggunakan pewarnaan tinta india, serta tes asimilasi menggunakan kit *Integral System Yeasts Plus* (Ref. 71822) dari Liofilchem[®], Italia. Penyegaran isolat klinis dan isolat lingkungan pada medium *Sabouraud Dextrose Agar* dilakukan dengan cara menambahkan cairan NaCl dengan konsentrasi 0,5% (SDA-NaCl 0,5%) yang bertujuan untuk memudahkan penghancuran dinding sel ragi *Cryptococcus neoformans*. Selanjutnya, koloni *Cryptococcus neoformans* yang tumbuh setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 – 96 jam akan dilakukan ekstraksi DNA. Pada saat itu, jumlah koloni yang tumbuh telah mencapai berat yang diperlukan untuk ekstraksi DNA, yaitu 100 μg .



Gambar 4.1. Koloni *Cryptococcus neoformans* pada Saboureaud's dextrose agar, inkubasi suhu 37°C selama 96 jam.

Isolat Klinis

Sebanyak 7 pasien dengan meningitis kriptokokal didiagnosis kurang lebih selama sepuluh tahun terakhir di rumah sakit. Seluruh pasien (100%) meningitis kriptokokal adalah laki-laki dan merupakan pasien HIV/AIDS, dengan usia rata-rata 34,14 (30 – 40 tahun) tahun.

Tabel 4.1 Distribusi Sosiodemografi Isolat *Cryptococcus neoformans* dari Sampel Klinis

Keterangan	Jumlah (n)	Persentase (%)
<i>Sampel klinis</i>	7	
Jenis kelamin		
- Laki-laki	7	100
- Perempuan	0	0,00
Usia		
- < 20 tahun	0	0,00
- 20 – 30 tahun	4	57,14
- > 30 tahun	3	42,86
Sumber		
- Cairan serebrospinal	7	100
- Darah	0	0,00
Status HIV/AIDS		
- Positif	7	100
- Negatif	0	0,00
Wilayah		
- Jakarta	4	57,14
- Depok	2	28,57
- Bekasi	1	14,29

Seluruh isolat klinis *C. neoformans* berasal dari pasien HIV-positif (100%) dan ditemukan dari cairan serebrospinal (100%). Isolat klinis dikumpulkan dari wilayah Jakarta dan sekitarnya dengan sebagian besar isolat berasal dari Jakarta (57,14%), Depok (28,57%), Bekasi (14,29%).

Isolat Lingkungan

Sebanyak 14 Isolat lingkungan yang didapatkan dari hasil kultur sampel kotoran burung imerpati, debu rumah, lapukan kayu, dan tanah yang terdapat di lingkungan sekitar tempat tinggal pasien, yaitu pasien terinfeksi HIV/AIDS dengan kriptokokosis meningeal yang sama dengan subyek isolat klinik. Isolat-isolat tersebut tersimpan dalam koleksi kultur dan disebarkan pada medium SDA baru pada suhu kamar.

Tabel 4.2 Distribusi Sosiodemografi Isolat *Cryptococcus neoformans* dari Sampel Lingkungan

Keterangan	Jumlah (n)	Persentase (%)
<i>Sampel lingkungan</i>	14	
Sumber		
- Kotoran burung merpati	5	35,71
- Lapukan kayu	3	21,43
- Tanah	4	28,57
- Debu rumah	2	14,29
Wilayah		
- Jakarta	7	50,00
- Depok	4	28,57
- Bekasi	3	21,43
Musim		
- Kemarau	11	78,57
- Hujan	3	21,43

Dari isolat lingkungan, 35,71% diperoleh dari kotoran burung merpati, 14,29% dari debu rumah, 28,57% dari tanah, dan 21,43% dari lapukan kayu dengan wilayah paling banyak di Jakarta (50,00%). Sebagian besar isolat *Cryptococcus neoformans* dari lingkungan yang memberikan hasil positif diambil pada musim kemarau sebanyak 78,57% dan musim hujan 21,43%.

Karakterisasi Molekuler

Sebagian besar pasien (57,14%) didiagnosis di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo dan pasien yang tersisa (42,86%) didiagnosis di Rumah Sakit Ketergantungan Obat. Seluruh pasien memiliki faktor predisposisi yang dapat dikenali untuk kriptokokosis, yaitu seperti HIV/AIDS.

Tabel 4.3. Gambaran Strain Isolat Klinik *Cryptococcus neoformans*

Kode	Wilayah	Serotipe	Tipe VN	Strain
Rb	Depok	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Sp	Jakarta	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Ck	Jakarta	Serotipe A	VNI	CBS 10512
AJ	Depok	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Ay	Bekasi	Serotipe A	VNI	CBS 10512
GH	Jakarta	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Tf	Jakarta	Serotipe A	VNI	CBS 10085

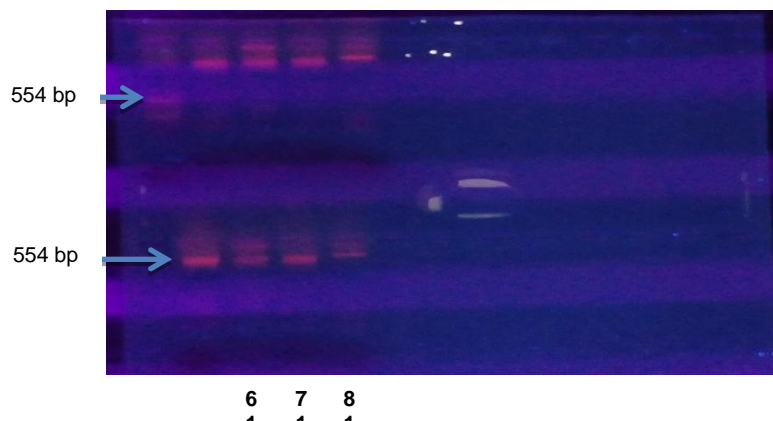
Berdasarkan Tabel 4.3 didapatkan seluruh isolat klinik *Cryptococcus neoformans* adalah *C. neoformans* varian *grubii*, serotipe A / VNI (CBS 10085 dan CBS 10512) dan sebagian besar isolat berasal dari wilayah Jakarta.

Tabel 4.4. Gambaran Strain Isolat Lingkungan *Cryptococcus neoformans*

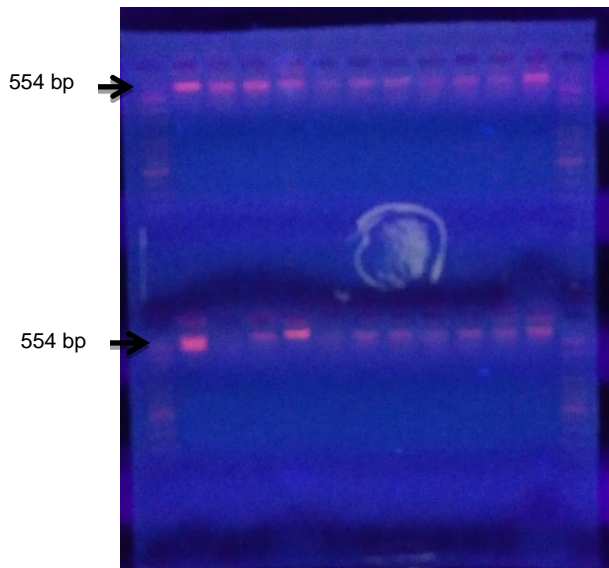
Kode	Sumber	Wilayah	Serotipe	Tipe VN	Strain
Rb-02	Tanah	depok	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Rb-03	Kayu	depok	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Rb-04	Burung	depok	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Sp-03	Burung	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Sp-02	Kayu	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Ck-01	Tanah	Jkt	Serotipe A	VNII	CBS 10084
Ck-03	Burung	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10085

AJ-04	Debu	depok	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Ay-01	Tanah	bekasi	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Ay-02	Kayu	bekasi	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Ay-03	Burung	bekasi	Serotipe A	VNI	CBS 10085
GH-04	Debu	Jkt	Serotipe A	VNII	CBS 10084
Tf-01	Tanah	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Tf-03	Burung	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10085

Tampak pada tabel 4.4 bahwa seluruh isolat *Cryptococcus neoformans* dari lingkungan merupakan *C. neoformans* varian *grubii*, serotipe A. Isolat lingkungan terdeteksi dua tipe genotip, yaitu VNI (CBS 10085 dan CBS 10512) dan VNII (CBS 10084). Sumber isolat paling banyak adalah kotoran burung dan sebagian besar berada di wilayah Jakarta.

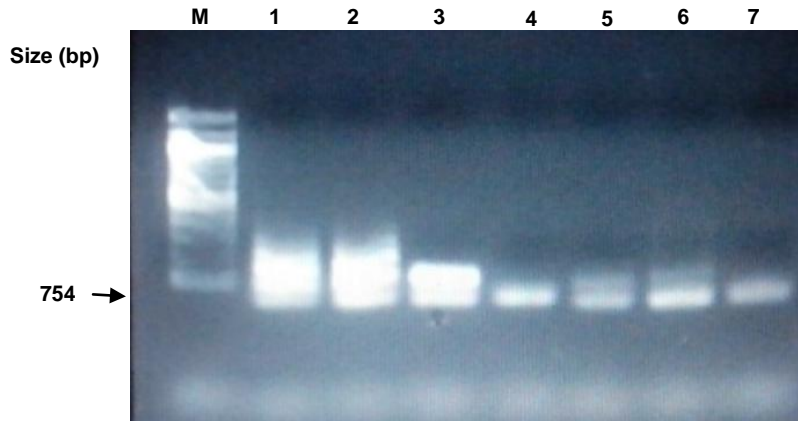


Gambar 4.2. Gel elektroforesis ekstraksi DNA *Cryptococcus neoformans* dari sampel klinis. Baris pertama: 1. Ladder; 2. Sampel RB; 3. Sampel SP; 4. Sampel CK; 5. Sampel AJ. Baris kedua: 6. Sampel AY; 7. Sampel GH; 8. Sampel TF.

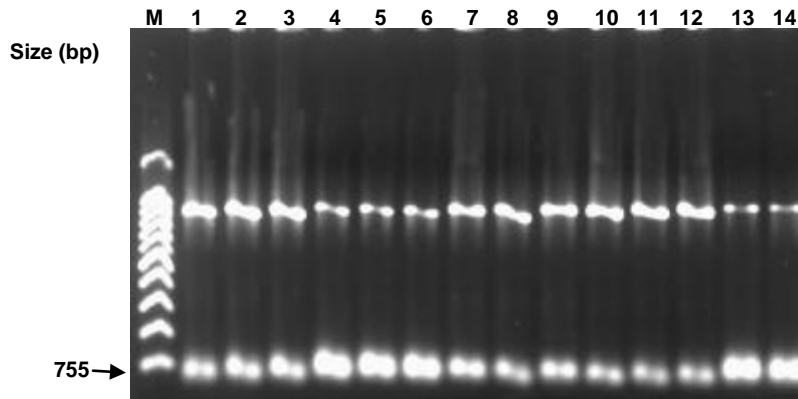


Gambar 4.3. Gel elektroforesis ekstraksi DNA *Cryptococcus neoformans* dari sampel lingkungan.

Sekuens inti spesifik minisatelit dari *wild-type phage* M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') digunakan sebagai primer tunggal dalam cetakan PCR-fingerprinting dengan modifikasi metode Meyer *et al*, Reaksi amplifikasi kation dilakukan dalam volume 50 μ L yang mengandung 100 ng DNA, buffer PCR 1 \times (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl), masing-masing 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP dan DTTP, 2.0 mM MgCl₂, 60 ng primer (Invitrogen, Brasil) dan 2,5 U DNA polimerase Taq (Invitrogen, Brasil). PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94 ° C selama 10 menit, diikuti oleh 36 kation amplifikasi: 1 menit denaturasi pada 94 ° C, 1 menit anil pada suhu 50 ° C, 1 menit perpanjangan pada 72 ° C. Langkah ekstensi terakhir diterapkan pada suhu 72 ° C selama 10 menit. Produk penguat amplifikasi dipisahkan dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1,5% pada buffer 1 \times Tris-Acetate EDTA (TAE) pada suhu 90 V selama 4,5 jam dan diwarnai dengan etidium bromida pada 0,5 μ g / mL selama 30 menit dan divisualisasikan di bawah sinar UV. Jenis molekuler (VNI-VNIV dan VGI-VGIV) dibandingkan dengan strain referensi dari delapan jenis molekul utama. Strain referensi digunakan sebagai kontrol internal untuk mengkonfirmasi reproduktifitas. Profil sidik jari PCR dianalisis berdasarkan adanya atau tidak adanya pita yang jelas dan pasti dalam elektroforesis.



Gambar 4.4. Analisis PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* dari isolat klinis. M: 1Kb DNA marker, Baris 1: CBS 10085 (VNI), Baris 2: CBS 10512 (VNI), Baris 3: WM 628 (VNIII), Baris 4: CBS 10079 (VNIV), Baris 5: CBS 100512 (VNI), Baris 6: CBS 10084 (VNII), Baris 7: WM 628 (VNIII).



Gambar 4.5. Analisis PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* dari isolat lingkungan. M: 1Kb DNA marker, Baris 1: CBS 10085 (VNI), Baris 2: CBS 10512 (VNI), Baris 3: WM 628 (VNIII), Baris 4: CBS 10079 (VNIV), Baris 5: CBS 100512 (VNI), Baris 6: CBS 10084 (VNII), Baris 7: WM 628 (VNIII), Baris 8: CBS 10085 (VNI), Baris 9: CBS 10512 (VNI), Baris 10: WM 628 (VNIII), Baris 11: CBS 10079 (VNIV), Baris 12: CBS 100512 (VNI), Baris 13: CBS 10084 (VNII), Baris 14: WM 628 (VNIII).

BAB V

PEMBAHASAN

Meningitis kriptokokus dianggap sebagai kondisi yang menentukan HIV/AIDS sejak tahun-tahun pertama era HIV/AIDS dan merupakan infeksi jamur SSP yang paling umum dan kejadian neurologis ketiga yang paling sering terjadi pada pasien HIV/AIDS. Hasil penelitian didapatkan seluruh pasien (100%) meningitis kriptokokal adalah laki-laki dan merupakan pasien HIV/AIDS, dengan usia rata-rata 34,14 (30 – 40 tahun) tahun. Seluruh isolat klinis *C. neoformans* berasal dari pasien HIV-positif (100%) dan ditemukan dari cairan serebrospinal (100%). Laporan Ditjen PP&PL Kementerian Kesehatan RI tahun 2012, persentase infeksi HIV pada laki-laki di Indonesia adalah 58%.⁶⁵ Kaocharoen *et al.*,⁵³ melaporkan bahwa 68,9% pasien terinfeksi HIV dengan kriptokokosis di Thailand adalah laki-laki. Sanglard *et al.*,⁶⁶ melaporkan bahwa hormon estrogen menghambat pertumbuhan jamur *Cryptococcus*. Penelitian McClelland *et al.*,⁶⁷ melaporkan bahwa proses fagositosis *Cryptococcus* oleh makrofag pada pasien kriptokokosis perempuan lebih efisien dibandingkan laki-laki. Selain itu, ditemukan *fungus burden* yang lebih tinggi di otak hewan coba jantan daripada betina. Hal tersebut menunjukkan bahwa secara fisiologis *Cryptococcus* lebih mudah menginfeksi laki-laki dan lebih mudah melewati sawar darah otak hewan coba jantan dari pada betina.⁶⁷ Kaocharoen *et al.*,⁵³ melaporkan bahwa pasien terinfeksi HIV dengan kriptokokosis di Thailand memiliki rerata usia 37,97 tahun. Hal tersebut sesuai dengan epidemiologi pasien terinfeksi HIV yang sebagian besar usia produktif.⁶⁸ Di Indonesia, laporan Ditjen PP&PL Kementerian Kesehatan RI tahun 2012 menyatakan persentase pasien terinfeksi HIV kelompok umur 25-49 adalah 72%.⁶⁵

Sebanyak 14 Isolat lingkungan yang didapatkan dari hasil kultur sampel kotoran burung merpati, debu rumah, lapukan kayu, dan tanah yang terdapat di lingkungan sekitar tempat tinggal pasien, yaitu pasien terinfeksi HIV/AIDS dengan kriptokokosis meningeal yang sama dengan subyek isolat klinik. Hasil penelitian terhadap isolat lingkungan didapatkan 35,71% isolat diperoleh dari kotoran burung merpati, 14,29% dari debu rumah, 28,57% dari tanah, dan 21,43% dari lapukan kayu dengan wilayah paling banyak di Jakarta (50,00%). Penelitian Hedayati *et al.*,⁶⁹ Abegg *et al.*,⁷⁰ Nosanchuk *et al.*,⁷¹ dan Cafarchia *et al.*,⁷² melaporkan bahwa *Cryptococcus neoformans* juga terdapat pada kotoran berbagai spesies burung, seperti burung kenari, beo, kakatua, burung layang-layang dan berbagai burung dari ordo Columbiformis. Penelitian Leite-Jr *et al.*,²⁷ berhasil mengidentifikasi tujuh spesies *Cryptococcus* dari debu pada perpustakaan umum. Swinne *et al.*,⁷³ mengisolasi *Cr.*

neoformans pada debu dari dalam rumah pasien AIDS dengan kriptokokosis. Hipotesis Swinne *et al.*,⁷³ yang menyatakan bahwa kayu dapat menjadi habitat alamiah *Cr. neoformans* seperti pada *Cr. gattii* berhasil dibuktikan oleh Lazera *et al.*,²⁵ yang meneliti lubang kayu dari beberapa spesies pohon, diantaranya *Moquilea tomentosa*, *Cassia grandis*, *Ficus* sp. dan *Mangifera indica*.

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi isolat klinik *Cryptococcus neoformans* yang secara keseluruhan adalah *C. neoformans* varian *grubii*, serotipe A / VNI (CBS 10085 dan CBS 10512) dan sebagian besar isolat berasal dari wilayah Jakarta. Sebagian besar infeksi kriptokokus pada pasien HIV/AIDS dari bagian lain dunia disebabkan oleh genotipe VNI (serotipe A). Hasil serupa juga telah diamati pada penelitian lain dengan isolat klinis dari seluruh dunia, misalnya Malaysia 42 (95,5%), Guatemala 15 (93,3%), Peru 13 (93,3%), China 115 (89,5%) dan India 51 (89,5 %). Di Brasil, 95,7%, 82,9% dan 82,9% isolat dari negara bagian São Paulo, Rio Grande do Sul dan Rio de Janeiro, masing-masing adalah genotipe VNI. Penelitian lain, yang termasuk isolat *Cryptococcus* dari beberapa wilayah di Brazil menunjukkan prevalensi 64% genotipe VNI, sedangkan di wilayah Selatan prevalensinya adalah 74,5%.

Dalam beberapa tahun terakhir, wabah terbesar *C. neoformans* yang diketahui disebabkan oleh VGII terjadi di Vancouver, Kanada. Prevalensi genotipe VGII serupa di Kolombia (99,2%), di wilayah Utara dan Barat di Australia (71%), Northwestern Amerika Serikat (80%) dan Kanada (95%). Laporan penelitian sebelumnya dari Brasil Selatan menunjukkan prevalensi VGII 48% di antara 50 isolat klinis, namun sebagian besar ditemukan dari pasien yang telah bermigrasi dari Timur Laut dimana genotipe ini mewakili 89% dari semua infeksi *C. gattii*. Gambaran serupa juga ditemukan di utara di sepanjang lembah Amazon. Namun pada penelitian ini, tidak satupun dari 7 isolat klinis teridentifikasi sebagai *C. gattii*, genotipe VGII.

Seluruh isolat *Cryptococcus neoformans* dari lingkungan pada penelitian ini merupakan *C. neoformans* varian *grubii*, serotipe A. Isolat lingkungan terdeteksi dua tipe genotipe, yaitu VNI (CBS 10085) dan VNII (CBS 10084). Sumber isolat paling banyak adalah kotoran burung dan sebagian besar berada di wilayah Jakarta. Pada penelitian ini diidentifikasi dua genotipe utama dan VNI (*C. neoformans* var. *grubii*/serotipe A) adalah strain yang paling banyak teridentifikasi (85,71%) dari 21 isolat yang diperoleh dari 7 pasien HIV/AIDS dan 14 isolat lingkungan. Hasil penelitian ini didapatkan sebanyak tiga isolat (14,29%) merupakan genotipe VNII dan tidak satupun isolat yang diketahui disebabkan oleh genotipe VG.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Genotipe *Cryptococcus neoformans* dari isolat klinik adalah VNI.
2. Genotipe *Cryptococcus neoformans* dari isolat lingkungan adalah VNI dan VNII.
3. Terdapat korelasi antara isolat *Cryptococcus neoformans* yang berasal dari sampel klinis dengan sampel yang didapat dari lingkungan.

6.2. Saran

Penelitian ini masih banyak memiliki kekurangan, oleh karena itu untuk perbaikan penelitian selanjutnya disarankan:

1. Membuat suatu program pencegahan kriptokokosis secara terpadu pada tempat pelayanan kesehatan.
2. Meningkatkan kesadaran pasien terinfeksi HIV untuk rutin kontrol dan melakukan terapi antiviral agar kadar CD4 tetap > 200 sel/ μ l.
3. Memberikan pengetahuan berupa penyuluhan kepada semua pasien terinfeksi HIV dengan dan tanpa kriptokokosis atau anggota keluarganya untuk lebih menjaga kebersihan, terutama menghilangkan sumber infeksi di lingkungan agar tidak terinfeksi *Cryptococcus* atau tidak terjadi kekambuhan.
4. Penentuan sumber infeksi *Cryptococcus* dilakukan pada semua tempat beraktifitas pasien terinfeksi HIV dan AIDS (tempat bekerja, sekolah, tempat *hang-out*) sehingga diperoleh data yang lebih lengkap mengenai sumber infeksi *Cryptococcus* di lingkungan.
5. Melakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis interaksi biologis yang terjadi antara *Cryptococcus neoformans* dengan mikrobiom di lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Buchanan KL and Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(1): 71–83.
2. Casadevall & Perfect. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, DC. 1998.
3. Kwon-chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to Conserve the Name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*. 2002; 51(4): 804-6. Diunduh tanggal: 23 Maret 2015, dari <http://www.Jstor.org/stable/1555045>.
4. Wilson D, Bennett J & Bailey J. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1968; 127: 820–23.
5. Emmons C. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol*. 1951; 62: 685–90.
6. Emmons C. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg*. 1955; 62: 227–32.
7. Lazera M, Wanke B & Nishikawa M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Vet Mycol*. 1993; 31: 449–54.
8. Lazera M, Pires E, Camilo-Coura L, Nishikawa M, Bezerra C, Trilles L & Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol*. 1996; 34: 127–31.
9. Randahawa H, Mussa A & Khan Z. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. *Mycopathologia*. 2000; 151: 63–69.
10. Kwon-Chung KJ & Bennett J. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zentralbl Bakteriell Hyg*. 1984; 257:213–18.
11. Ellis D & Pfeiffer T. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1642–44.
12. Sorrell T. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol*. 2001;39:155–68.
13. Kwon-Chung KJ. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. 1976; 68: 821–833. Diunduh pada tanggal 23 Maret 2015, dari: www.mycologia.com: http://www.jstor.org/stable/3758813.
14. Kwon-chung KJ, Bennett JE, Theodore TS. *Cryptococcus bacillisporus* sp. Nov: Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. *Int J Syst Bacteriol*. 1978; 28: 616-20.
15. Lengeler K, Wang P, Cox G, Perfect J & Heitman J. Identification of the MATa mating type locus of *Cryptococcus neoformans* reveals a serotype A MATa strain thought to be extinct. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 14455–60.
16. Viviani M, Esposto M, Cogliati M, Montagna M & Wickes B. Isolation of a *Cryptococcus neoformans* serotype A MATa strain from the Italian environment. *Med Mycol*. 2001; 39: 383–86.
17. Wickes B, Mayorga M, Edman U & Edman J. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the a mating type. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 7327–31.
18. Lin X, Hull CM & Heitman J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*. 2005; 434: 1017–21.
19. Mitchell T & Perfect J. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8: 515–48.
20. Wahyuningsih R. *Ancaman Infeksi Jamur pada Era HIV/AIDS*. *Maj Kedokt Indon*. 2009; 59:12.
21. Sjam R, Mulyati, Adawiyah R, Imran D, Wahyuningsih R. Cryptococcal Meningitis among AIDS Patients in Jakarta. *Maj Kedokt FKUKI*. 2012; 28(4): 160-66.
22. Perfect J, Magee B & Magee P. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. *Infect Immun*. 1989; 57: 2624–27.
23. Perfect J, Ketabchi N, Cox G, Ingram C & Beiser C. Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 3305–9.
24. Boekhout T, van Belkum A, Leenders A, Verbrugh H, Mukamurangwa P, Swinne D, *et al*. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *Int J Syst Bacteriol*. 1997; 47: 432–42.
25. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA, Dromer F, Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 2001; 147: 891-907.
26. Sorrell T, Chen S, Ruma P, Meyer W, Pfeiffer T, Ellis D & Brownlee A. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 1253–60.
27. Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, *et al*. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*. 1999; 20: 1790–99.

28. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M & Castañeda E and the Iberoamerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 189–95.
29. Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC & Meyer W. PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 2080–86.
30. Casali A, Goulart L, Rosa e Silva L, Ribeiro A, Amaral A, Alves S, Schrank A, Meyer W & Vainstein M. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res.* 2003; 3: 405–15.
31. Voelz, K. Macrophage-Cryptococcus Interaction during *Cryptococcosis*. Tesis. Birmingham, College of Life and Environmental Sciences, School of Biosciences: University of Birmingham. 2010.
32. Costa MM, Teixeira FM, Schalcher TR, Magalhaes de Brito MTF, Valerio ES, Monteiro MC. Cryptococcosis, A risk for immunocompromised and immunocompetent individuals. *Open Epid J*, 2013; 6: 9-17.
33. Kwon-chung. (1975). *Mycologia*. Diunduh pada tanggal 23 Maret 2015, dari: www.mycologia.org:www.jstor.org/stable/3758842.
34. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Tallman AS. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2000; 50(3): 1351-71.
35. Scorzetti G, Fell JW, Fonseca A, Tallman AS. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeasts Res.* 2002; 2(4): 495-517.
36. Duncan C, Stephen C, Campbell J. Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. *Can Vet J.* 2006; 47(10): 993-98.
37. Gupta G, Fries BC. Variability of phenotypic traits in *Cryptococcus* varieties and species and the resulting implications for pathogenesis. *Future Microbiol.* 2010; 5(5): 775-87.
38. Yauch LE, Lam JS, Levitz SM. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathog.* 2006; 2(11): 1060-68.
39. Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. Serotype AD Strains of *Cryptococcus neoformans* Are Diploid or Aneuploid and Are Heterozygous at the Mating-Type Locus. *Infection and Immunity.* 2001; 69(1): 115-22.
40. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Lodewijk S, Dromer F, Hoogveld HL, Boekhout T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.* 2006; 14(1): 106-7.
41. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Hoogveld HL, Dromer F, St-Germain G, Boekhout T. AIDS Patient Death Caused by Novel *Cryptococcus neoformans* x *Cryptococcus gattii* Hybrid. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(7): 1105-8. Doi: 10.3201/eid1407.080122.
42. Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25(1): S4-S12.
43. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 2009; 47(6): 561-70.
44. Yan Z, Li X, Xu J. Geographic distribution of mating type alleles of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3): 965-72.
45. Jain N, Fries BC. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Mycopathol.* 2008; 166(4): 181-8.
46. Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol.* 2009; 11(3): 370-80.
47. Lazera MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2000; 38: 379-83.
48. Leite-Jr DP, Amadio JVR, Martins ER, Simoes SAA, Yamamoto ACA, Leal-Santos FA, Takahara DT, Hahn RC. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. *J of Occup Med Toxic.* 2012; 7: 11.
49. Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell host & microbe.* 2007; 263-73.
50. Kobayashi C.C.B.A, Souza L.K.H, Fernandez O.F.L, Brito S.C.A, Silva A.C, Sousa E.D, Silva M.R.R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* Isolated from Urban Environmental Sources in Guiana, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005; 47(4): 203-7.
51. Hashemi SJ, Jabbari AG, Bayat M, Rafiei SM. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in domestic birds referred to veterinary clinics in Tehran. *Euro J Exp Bio.* 2014; 4(1): 482-6.

52. Elis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol, 1990; 28(7): 1642-44.
53. [Kaocharoen S¹](#), [Ngamskulrungrroj P](#), [Firacative C](#), [Trilles L](#), [Piyabongkarn D](#), [Banlunara W](#), [Poonwan N](#), [Chaiprasert A](#), [Meyer W](#), [Chindamporn A](#). Molecular epidemiology reveals genetic diversity amongst isolates of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex in Thailand. PloS Negl Trop Dis. 2013;7(7): e2297.
54. Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, *et al.* Characterization of Environment Sources of the Human and Animal Pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(5): 1433-43.
55. Liu TB, Perlin DS, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. Virulence. 2012; 3(2): 173-81.
56. Maulana I. Identifikasi isolat khamir dari saluran pencernaan *Apis cerana* (Fabricus, 1793) di apiari berdasarkan data sequence daerah ITS rDNA. *Skripsi*. Depok, Jawa Barat Indonesia: Departemen Biologi, Fakultas MIPA Universitas Indonesia. 2011.
57. Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kaushal A, Padhye AA. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from Eucalyptus camaldulensis in India. J Clin Microbiol. 1997; 35(12): 3340-42.
58. Zepa R, Huicho L, Guillén A. [Modified India ink preparation for *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid specimens](#). J clin microbial. 1996; 34(9):2290-91.
59. Shashikala, Kanungo R, Srinivasan S, Mathew R, Kannan M. [Unusual morphological forms of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid](#). Indian J med microbial, 2004; 22(3):188-90.
60. Kanti A. Identifikasi Jenis Khamir yang Diisolasi dari Tanah Gambut Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi. BioSMART. 2004; 6(1): 10-14. ISSN: 1411-321X.
61. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica, 2013. Article ID 675213. Diunduh tanggal 20 Maret 2015, dari <http://dx.doi.org/10.1155/2013/675213>.
62. Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated Cryptococcal meningitis. AIDS. 2007; 21: 2119-29.
63. Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Letenneur L, Ronin O and The French Cryptococcosis Study Group. Individual and environment factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. Clin Infect Dis. 1996; 23: 91-96.
64. Pinner RW, Hajjeh RA, Powderly WG. Prospects for preventing Cryptococcosis in person infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 1995; 21(Suppl 1): S103-7.
65. Direktorat Jenderal Penanganan Penyakit & Penyehatan Lingkungan. (2013). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Laporan Situasi Perkembangan HIV & AIDS di Indonesia.
66. Sanglard D. (2003). Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. *Mycologist*, 17, 74-8.
67. Mc Clelland EE, Hobbs LM, Rivera J, Casadevall A, Potts WK, *et al.* (2013). The role of host gender in the pathogenesis of *C. neoformans* infections. PLoS ONE, 8(5), e63632. Doi: 10.1371/journal.pone.0063632.
68. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. (2009). Estimation of the current global burden of Cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23(4), 525-30.
69. Hedayati MT, Mahayu S, Fakhar M, Shokohi T, Majidi M. (2011). *Cryptococcus neoformans* isolation from swallow (*Hirundo rustica*). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 53(3), 125-27.
70. Abegg MA, Cella FC, Faganello J, Valent P, Schrank A, Vainstein MH. (2006). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Braazillian Zoological Garden. *Mycopathologia*, 161(2), 83-91.
71. Nosanchuk JD, Shoham S, Fries BC, Shapiro DS, Levitz SM, Casadevall A. (2000). Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Ann Intern Med*, 132, 205-8.
72. Cafarchia C, Romito D, Latta R, Camarda A, Montagna MT, Otranto D. (2006). Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Med Mycol*, 44, 485-92.
73. Swinne D, Deppner M, Maniratunga S, Laroche R, Floch JJ, Kadense P. (1991). AIDS-Associated Cryptococcosis in Bujunbura, Burundi and Epidemiological Study. *J Med Vet Mycol*, 29, 25-30.

Lampiran 1. Draft artikel

Metode PCR fingerprinting untuk Identifikasi Molekuler *Cryptococcus neoformans*

Machrumnizar¹, Suriyani¹, Yuliana¹, Devita A²

¹Parasitology Department, Faculty of Medicine, Trisakti University, INDONESIA

²Microbiology Department, Faculty of Medicine, Trisakti University, INDONESIA

Correspondence:email: dr.machrumnizar@yahoo.co.id

Abstrak

Cryptococcus neoformans adalah jamur patogen yang menyebabkan kriptokokosis meningeal yang mengancam jiwa terutama pada individu imunokompromi, seperti pasien terinfeksi HIV/AIDS. Berdasarkan karakteristik genetik dan sifat serologis polisakarida kapsuler, *Cryptococcus neoformans* mempunyai tiga varietas dan lima serotipe, yaitu: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D), *C. neoformans* var. *grubii* (serotipe A), serotipe hibrida AD, dan *C. gattii* (serotipe B dan C). Dari 21 isolat yang dikumpulkan, 7 isolat berasal dari sampel klinis dan 14 isolat dari sampel lingkungan. Dari isolat klinis, 100% berasal dari laki-laki dengan usia rata-rata 29,71 tahun. Seluruh isolat klinis *C. neoformans* berasal dari pasien HIV-positif (100%) dan ditemukan dari cairan serebrospinal (100%). Isolat klinis dikumpulkan dari wilayah Jakarta dan sekitarnya dengan sebagian besar isolat berasal dari Jakarta (57,14%), Depok (28,57%), Bekasi (14,29%). Dari isolat lingkungan, 35,71% diperoleh dari kotoran burung merpati, 14,29% dari debu rumah, 28,57% dari tanah, dan 21,43% dari lapukan kayu. PCR fingerprinting menggunakan primer M13 membedakan 21 isolat klinis dan lingkungan atas dua kelompok (kelompok A dan B). Tujuh isolat klinis dan 12 isolat lingkungan adalah kelompok A, yang memiliki dua pita spesifik utama diantara 1250 dan 754 base pairs. Dua isolat lingkungan, satu dari kotoran burung merpati dan lainnya dari lapukan kayu adalah kelompok B, yang memiliki dua pita spesifik utama diantara 1180 dan 554 base pairs. Korelasi genetik antara isolat klinis dan lingkungan konsisten dengan hipotesis yang menyatakan bahwa infeksi *Cryptococcus* pada manusia diperoleh dari paparan spora di alam.

Kata kunci: *Cryptococcus*, isolat klinis, isolat lingkungan, PCR fingerprinting

PENDAHULUAN

Cryptococcus neoformans dan *Cryptococcus gattii*, merupakan penyebab kriptokokosis, suatu mikosis sistemik pada manusia dan hewan.⁽¹⁻³⁾ *Cryptococcus neoformans* mempunyai dua varietas dan tiga serotipe yang diakui, yakni: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipe A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D) dan serotipe AD hybrid. *Cryptococcus gattii* terdiri atas serotipe B dan C.⁽²⁻⁴⁾ Inhalasi dari propagul menular dari lingkungan tampaknya menjadi sumber infeksi bagi hewan dan manusia.⁽²⁾ *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* dan *C. neoformans* var. *neoformans* dapat diisolasi di seluruh dunia dari tanah yang mengandung kotoran merpati dan busukan kayu.⁽⁵⁻⁹⁾ Sebaliknya, *C. gattii* memiliki distribusi geografis yang terbatas pada daerah tropis dan subtropis.⁽¹⁰⁻¹²⁾

Kriptokokosis dianggap penyebab penting morbiditas dan mortalitas, terutama pada pasien dengan gangguan sistem kekebalan tubuh, terutama mempengaruhi individu yang terinfeksi *human immunodeficiency virus* (HIV).⁽²⁾ Kebanyakan infeksi pada individu imunokompromis disebabkan oleh *C. neoformans* var. *grubii*, sedangkan *C. gattii* terutama mempengaruhi individu imunokompeten.^(2,10,19) Di Jakarta, prevalensi kriptokokosis pada pasien terinfeksi HIV dan AIDS dengan gangguan sistem saraf pusat (SSP) berkisar antara 21,9% dan di Bandung terdapat 30% pasien AIDS terbukti menderita meningitis *Cryptococcus*.^(20,21)

Teknik *genotyping* yang berbeda telah digunakan untuk mempelajari epidemiologi molekuler kompleks spesies *C. neoformans*, yang memungkinkan untuk membedakan dengan isolat yang sulit dibedakan menggunakan teknik konvensional.⁽²⁾ Teknik tersebut meliputi *karyotyping*, *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dan PCR *fingerprinting*.⁽²²⁻³⁰⁾ PCR

fingerprinting telah digunakan secara luas untuk mengelompokkan lebih dari 1000 isolat *Cryptococcus* yang diperoleh dari seluruh dunia ke dalam delapan jenis molekul utama: VNI dan VNII = *C. neoformans* var. *grubii*, serotipe A; VNIII = AD hibrida, serotipe AD; VNIV = *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipe D; VGI, VGII, VGIII dan VGIV = *C. gattii*, serotipe B dan C.^(26-28,30) Delapan jenis molekul besar telah dikonfirmasi dengan analisis RFLP gen *URA5* dan *PLB1*.⁽²⁹⁾

Data epidemiologi molekuler yang berkaitan dengan *Cryptococcus* sp di Indonesia sangat terbatas dan tidak lengkap. Mengingat kecenderungan peningkatan prevalensi kriptokokosis meningeal di Indonesia, kami menggunakan metode PCR *fingerprinting* untuk menentukan genotipe dan menilai hubungan epidemiologi kriptokokus dengan sampel yang berasal dari klinis dan lingkungan.

METODOLOGI PENELITIAN

Subjek Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif-analitik menggunakan desain *cross-sectional*. Rumah pasien tempat pengambilan sampel ditetapkan menggunakan cara *non randomized-consecutive sampling*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikologi Departemen Parasitologi FKUI dan dilaksanakan pada bulan Januari 2016 hingga Juni 2016.

Sebanyak 7 isolat dipulihkan dari sampel cairan serebrospinal (LCS) dengan meningitis kriptokokus yang didiagnosis dari Januari 2009 hingga Juni 2015 di RSCM dan RSKO, Jakarta, serta 14 isolat dari sampel lingkungan rumah pasien tersebut. Catatan medis pasien ini diperiksa untuk data klinis.

Isolasi, identifikasi dan pemeliharaan isolat.

Identifikasi isolat ragi yang dicurigai termasuk uji morfologi, biokimia dan fisiologis standar, seperti tinta India, produksi pigmen pada media Bird Seed Agar (BSA), tes asimilasi karbon (Integral system yeasts plus, Liofilchem[®], Italia), dan termotolerans pada suhu 37°C. Masing-masing isolat *Cryptococcus* di subkultur pada medium BSA dan satu koloni dipilih untuk analisis molekuler. Isolat diawetkan di medium gliserol pada suhu -20 ° C dan diliofilisasi dengan Susu Skim (DIFCO, Laboratories, Detroit, MI, AS).

Ekstraksi DNA

Prosedur ekstraksi DNA dilakukan menggunakan modifikasi metode dari Meyer, *et al.*,²⁸ isolat *Cryptococcus neoformans* ditanam pada Sabouraud's dextrose agar pada suhu 37°C selama 72 – 96 jam, satu loop penuh sel dari kultur dicampur dengan air deionisasi steril dan disentrifugasi. Supernatan dibuang, dan tabung berisi pelet sel ragi dibekukan dalam nitrogen cair. Pelet itu digiling dengan alu mini. Larutan lisis sel (100 mg triisopropilnkapthalene sulfonic acid, 600 mg asam para-aminosalicylic, air deionisasi 10 mL steril, buffer ekstraksi 2,5 mL (1 M Tris-HCl, 1,25 M NaCl, 0,25 M EDTA, pH 8.0) dan 7,5 mL fenol Jenuh dengan Tris-EDTA dipanaskan sampai 55 ° C, dan 700 µL campuran ini ditambahkan ke sel-sel tanah beku. Tabung diinkubasi selama 2 menit pada 55 ° C, dikocok sesekali, dan kemudian ditambahkan 500 µL kloroform, lalu campuran diinkubasi selama 2 menit pada suhu 55 ° C dan dikocok sesekali, tabung disentrifugasi selama 10 menit pada 14.000 rpm, dan fasa berair dipindahkan ke tabung baru, kemudian ditambahkan 500 µL fenol-kloroform-isoamil alkohol (25: 24: 1), dikocok selama 2 menit pada suhu kamar, dan disentrifugasi seperti di atas. Fasa berair dipindahkan ke tabung baru, ditambahkan 500 µL kloroform, dikocok, dan disentrifugasi seperti di atas. DNA genomik, fasa berair dipindahkan lagi ke tabung baru, dan 0,03 volume 3,0 M natrium ac Eter (pH 5,2) dan ditambahkan 2,5 volume etanol 96% dingin, dan campuran dikocok dengan lembut dan diinkubasi pada suhu -20 ° C paling sedikit 1 jam atau semalaman. Larutannya disentrifugasi selama 30 menit pada 14.000 rpm untuk pelet DNA. Pelet DNA dicuci dengan etanol 70% dan disentrifugasi selama 10 menit pada 14.000 rpm dan dikeringkan dengan udara. DNA disuspensikan kembali dalam air deionisasi 200 µL steril pada suhu 4°C semalaman dan disimpan pada suhu -20°C.

PCR fingerprinting

Sekuens inti spesifik minisatelit dari *wild-type phage M13* (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3 ') digunakan sebagai primer tunggal dalam cetakan PCR-fingerprinting dengan modifikasi metode Meyer *et al.*,²⁸ Reaksi amplifikasi kation dilakukan dalam volume 50 µL yang mengandung 100 ng DNA, buffer PCR 1 × (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl), masing-masing 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP dan DTTP, 2,0 mM MgCl₂, 60 ng primer (Invitrogen, Brasil) dan 2,5 U DNA polimerase Taq (Invitrogen, Brasil). PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94 ° C selama 10 menit, diikuti oleh 36 kation amplifikasi: 1 menit denaturasi pada 94 ° C, 1 menit anil pada suhu 50 ° C, 1 menit perpanjangan pada 72 ° C. Langkah ekstensi terakhir diterapkan pada suhu 72 ° C

selama 10 menit. Produk penguat amplifikasi dipisahkan dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1,5% pada buffer 1 × Tris-Acetate EDTA (TAE) pada suhu 90 V selama 4,5 jam dan diwarnai dengan etidium bromida pada 0,5 µg / mL selama 30 menit dan divisualisasikan di bawah sinar UV. Jenis molekuler (VNI-VNIV dan VGI-VGIV) dibandingkan dengan strain referensi dari delapan jenis molekuler utama. Strain referensi digunakan sebagai kontrol internal untuk mengkonfirmasi reproduktifitas. Profil sidik jari PCR dianalisis berdasarkan adanya atau tidak adanya pita yang jelas dan pasti dalam elektroforesis.

Strain Referensi

Strain standar dan strain referensi diperoleh dari koleksi kultur *Cryptococcus neoformans* CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands, yaitu; CBS 10085 (serotipe A/VNI), CBS 10084 (serotipe A/VNII), WM 628 (serotipe AD/VNIII), CBS 10079 (serotipe D/VNIV), CBS 10078 (serotipe B/VGI), CBS 10082 (serotipe B/VGII), CBS 10081 (serotipe B/VGIII), CBS 10101 (serotipe C/VGIV).

Kaji Etik

Protokol penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI/RSCM dan Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti.

Analisis Statistik

Analisa statistik dilakukan dengan deskriptif untuk memperoleh nilai frekuensi, *mean*, standar deviasi. Hasil pengukuran disajikan dalam tabel 2x2. Uji hipotesa dilakukan dengan menggunakan *Fisher's Exact Test*. Hubungan antar variabel dilakukan dengan uji sensitivitas dan spesifisitas. Analisis dilakukan dengan tingkat kemaknaan 95% ($\alpha = 0,05$), perbedaan dianggap bermakna apabila nilai $p = 0,05$.

HASIL PENELITIAN

Identifikasi spesies *Cryptococcus neoformans* dilakukan secara makroskopis dengan mengidentifikasi pertumbuhan koloni berwarna coklat kehitaman yang tumbuh pada medium *Niger Seed Agar* (NSA), dan pemeriksaan mikroskopis menggunakan pewarnaan tinta india, serta tes asimilasi menggunakan kit *Integral System Yeasts Plus* (Ref. 71822) dari Liofilchem®, Italia. Penyegaran isolat klinis dan isolat lingkungan pada medium *Sabouraud Dextrose Agar* dilakukan dengan cara menambahkan cairan NaCl dengan konsentrasi 0,5% (SDA-NaCl

0,5%) yang bertujuan untuk memudahkan penghancuran dinding sel ragi *Cryptococcus neoformans*. Selanjutnya, koloni *Cryptococcus neoformans* yang tumbuh setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 – 96 jam akan dilakukan ekstraksi DNA. Pada saat itu, jumlah koloni yang tumbuh telah mencapai berat yang diperlukan untuk ekstraksi DNA, yaitu 100 µg.

Isolat Klinis

Sebanyak 7 pasien dengan meningitis kriptokokal didiagnosis kurang lebih selama sepuluh tahun terakhir di rumah sakit. Seluruh pasien (100%) meningitis kriptokokal adalah laki-laki dan merupakan pasien HIV/AIDS, dengan usia rata-rata 34,14 (30 – 40 tahun) tahun.

Tabel 4.1 Distribusi Sosiodemografi Isolat *Cryptococcus neoformans* dari Sampel Klinis

Keterangan	Jumlah (n)	Persentase (%)
Sampel klinis	7	
Jenis kelamin		
- Laki-laki	7	100
- Perempuan	0	0,00
Usia		
- < 20 tahun	0	0,00
- 20 – 30 tahun	4	57,14
- > 30 tahun	3	42,86
Sumber		
- Cairan serebrospinal	7	100
- Darah	0	0,00
Status HIV/AIDS		
- Positif	7	100
- Negatif	0	0,00
Wilayah		
- Jakarta	4	57,14
- Depok	2	28,57
- Bekasi	1	14,29

Seluruh isolat klinis *C. neoformans* berasal dari pasien HIV-positif (100%) dan ditemukan dari cairan serebrospinal (100%). Isolat klinis dikumpulkan dari wilayah Jakarta dan sekitarnya dengan sebagian besar isolat berasal dari Jakarta

(57,14%), Depok (28,57%), Bekasi (14,29%).

Isolat Lingkungan

Sebanyak 14 Isolat lingkungan yang didapatkan dari hasil kultur sampel kotoran burung merpati, debu rumah, lapukan kayu, dan tanah yang terdapat di lingkungan sekitar tempat tinggal pasien, yaitu pasien terinfeksi HIV/AIDS dengan kriptokokosis meningeal yang sama dengan subyek isolat klinik. Isolat-isolat tersebut tersimpan dalam koleksi kultur dan disegarkan pada medium SDA baru pada suhu kamar.

Tabel 4.2 Distribusi Sosiodemografi Isolat *Cryptococcus neoformans* dari Sampel Lingkungan

Keterangan	Jumlah (n)	Persentase (%)
Sampel lingkungan	14	
Sumber		
- Kotoran burung merpati	5	35,71
- Lapukan kayu	3	21,43
- Tanah	4	28,57
- Debu rumah	2	14,29
Wilayah		
- Jakarta	7	50,00
- Depok	4	28,57
- Bekasi	3	21,43
Musim		
- Kemarau	11	78,57
- Hujan	3	21,43

Berdasarkan tabel 4.2 tampak isolat lingkungan, 35,71% diperoleh dari kotoran burung merpati, 14,29% dari debu rumah, 28,57% dari tanah, dan 21,43% dari lapukan kayu dengan wilayah paling banyak di Jakarta (50,00%). Sebagian besar isolat *Cryptococcus neoformans* dari lingkungan yang memberikan hasil positif diambil pada musim kemarau sebanyak 78,57% dan musim hujan 21,43%.

Karakterisasi Molekuler

Sebagian besar pasien (57,14%) didiagnosis di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo dan pasien yang tersisa (42,86%) didiagnosis di Rumah Sakit Ketergantungan Obat. Seluruh pasien

memiliki faktor predisposisi yang dapat dikenali untuk kriptokokosis, yaitu seperti HIV/AIDS.

Berdasarkan Tabel 4.3 didapatkan seluruh isolat klinik *Cryptococcus neoformans* adalah *C. neoformans* varian *grubii*, serotipe A / VNI (CBS 10085 dan CBS 10512) dan sebagian besar isolat berasal dari wilayah Jakarta.

Tabel 4.3. Gambaran Strain Isolat Klinik *Cryptococcus neoformans*

Kode	Wilayah	Serotipe	Tipe	Strain	
Rb	Depok	Serotipe A	VNI	CBS	10085
Sp	Jakarta	Serotipe A	VNI	CBS	10512
Ck	Jakarta	Serotipe A	VNI	CBS	10512
AJ	Depok	Serotipe A	VNI	CBS	10085
Ay	Bekasi	Serotipe A	VNI	CBS	10512
GH	Jakarta	Serotipe A	VNI	CBS	10085
Tf	Jakarta	Serotipe A	VNI	CBS	10085

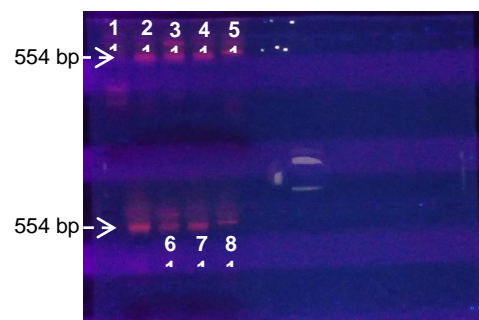
Tampak pada tabel 4.4 bahwa seluruh isolat *Cryptococcus neoformans* dari lingkungan merupakan *C. neoformans* varian *grubii*, serotipe A. Isolat lingkungan terdeteksi dua tipe genotip, yaitu VNI (CBS 10085 dan CBS 10512) dan VNII (CBS 10084). Sumber isolat paling banyak adalah kotoran burung dan sebagian besar berada di wilayah Jakarta.

Tabel 4.4. Gambaran Strain Isolat Lingkungan *Cryptococcus neoformans*

Kode	Sumber	Wilayah	Serotipe	Tipe	Strain
Rb-02	Tanah	depok	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Rb-03	Kayu	depok	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Rb-04	Burung	depok	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Sp-03	Burung	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Sp-02	Kayu	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10512

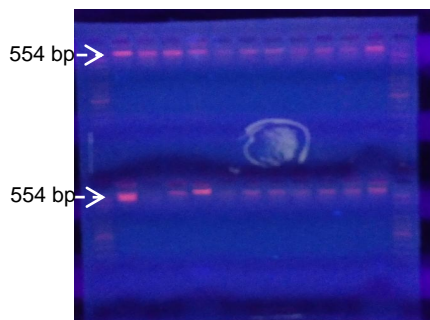
Ck-01	Tanah	Jkt	Serotipe A	VNII	CBS 10084
Ck-03	Burung	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10085
AJ-04	Debu	depok	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Ay-01	Tanah	bekasi	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Ay-02	Kayu	bekasi	Serotipe A	VNI	CBS 10512
Ay-03	Burung	bekasi	Serotipe A	VNI	CBS 10085
GH-04	Debu	Jkt	Serotipe A	VNII	CBS 10084
Tf-01	Tanah	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10085
Tf-03	Burung	Jkt	Serotipe A	VNI	CBS 10085

Sekuens inti spesifik minisatelit dari *wild-type phage* M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') digunakan sebagai primer tunggal dalam cetakan PCR-fingerprinting dengan modifikasi metode Meyer *et al*, Reaksi amplifikasi kation dilakukan dalam volume 50 μ L yang mengandung 100 ng DNA, buffer PCR 1 \times (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl), masing-masing 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP dan DTTP, 2.0 mM MgCl₂, 60 ng primer (Invitrogen, Brasil) dan 2,5 U DNA polimerase Taq (Invitrogen, Brasil). PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94 ° C selama 10 menit, diikuti oleh 36 kation amplifikasi: 1 menit denaturasi pada 94 ° C, 1 menit anil pada suhu 50 ° C, 1 menit perpanjangan pada 72 ° C.



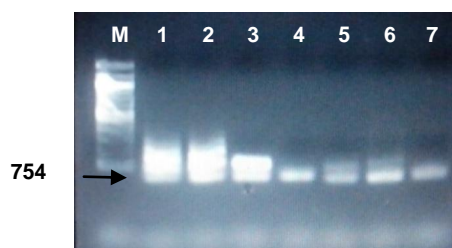
Gambar 4.2. Gel elektroforesis ekstrak DNA *Cryptococcus neoformans* dari sampel klinis. Baris pertama: 1. Ladder; 2.

Sampel RB; 3. Sampel SP; 4. Sampel CK; 5. Sampel AJ. Baris kedua: 6. Sampel AY; 7. Sampel GH; 8. Sampel TF.

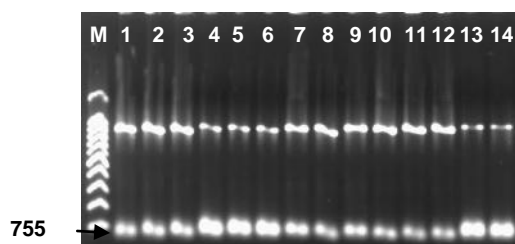


Gambar 4.3. Gel elektroforesis ekstraksi DNA *Cryptococcus neoformans* dari sampel lingkungan.

Langkah ekstensi terakhir diterapkan pada suhu 72 ° C selama 10 menit. Produk penguat amplifikasi dipisahkan dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1,5% pada buffer 1 × Tris-Acetate EDTA (TAE) pada suhu 90 V selama 4,5 jam dan diwarnai dengan etidium bromida pada 0,5 µg / mL selama 30 menit dan divisualisasikan di bawah sinar UV. Jenis molekuler (VNI-VNIV dan VGI-VGIV) dibandingkan dengan strain referensi dari delapan jenis molekul utama. Strain referensi digunakan sebagai kontrol internal untuk mengkonfirmasi reproduktifitas. Profil sidik jari PCR dianalisis berdasarkan adanya atau tidak adanya pita yang jelas dan pasti dalam elektroforesis.



Gambar 4.4. Analisis PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* dari isolat klinis. M: 1Kb DNA marker, Baris 1: CBS 10085 (VNI), Baris 2: CBS 10512 (VNI), Baris 3: WM 628 (VNIII), Baris 4: CBS 10079 (VNIV), Baris 5: CBS 100512 (VNI), Baris 6: CBS 10084 (VNII), Baris 7: WM 628 (VNIII).



Gambar 4.5. Analisis PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* dari isolat lingkungan. M: 1Kb DNA marker, Baris 1: CBS 10085 (VNI), Baris 2: CBS 10512 (VNI), Baris 3: WM 628 (VNIII), Baris 4: CBS 10079 (VNIV), Baris 5: CBS 100512 (VNI), Baris 6: CBS 10084 (VNII), Baris 7: WM 628 (VNIII), Baris 8: CBS 10085 (VNI), Baris 9: CBS 10512 (VNI), Baris 10: WM 628 (VNIII), Baris 11: CBS 10079 (VNIV), Baris 12: CBS 100512 (VNI), Baris 13: CBS 10084 (VNII), Baris 14: WM 628 (VNIII).

DISKUSI

Meningitis kriptokokus dianggap sebagai kondisi yang menentukan HIV/AIDS sejak tahun-tahun pertama era HIV/AIDS dan merupakan infeksi jamur SSP yang paling umum dan kejadian neurologis ketiga yang paling sering terjadi pada pasien HIV/AIDS. Hasil penelitian didapatkan seluruh pasien (100%) meningitis kriptokokal adalah laki-laki dan merupakan pasien HIV/AIDS, dengan usia rata-rata 34,14 (30 – 40 tahun) tahun. Seluruh isolat klinis *C. neoformans* berasal dari pasien HIV-positif (100%) dan ditemukan dari cairan serebrospinal (100%). Laporan Ditjen PP&PL Kementerian Kesehatan RI tahun 2012, persentase infeksi HIV pada laki-laki di Indonesia adalah 58%.⁶⁵ Kaocharoen *et al.*,⁵³ melaporkan bahwa 68,9% pasien terinfeksi HIV dengan kriptokokosis di Thailand adalah laki-laki. Sanglard *et al.*,⁶⁶ melaporkan bahwa hormon estrogen menghambat pertumbuhan jamur *Cryptococcus*. Penelitian McClelland *et al.*,⁶⁷ melaporkan bahwa proses fagositosis *Cryptococcus* oleh makrofag pada pasien kriptokokosis perempuan lebih efisien dibandingkan laki-laki. Selain itu, ditemukan *fungus burden* yang lebih tinggi di otak hewan coba jantan daripada betina. Hal tersebut menunjukkan bahwa secara fisiologis *Cryptococcus* lebih mudah menginfeksi laki-laki dan lebih mudah melewati sawar darah otak hewan coba jantan dari pada betina.⁶⁷ Kaocharoen *et al.*,⁵³ melaporkan bahwa pasien terinfeksi HIV dengan kriptokokosis di Thailand memiliki rerata usia 37,97 tahun. Hal tersebut sesuai dengan epidemiologi pasien terinfeksi HIV yang sebagian besar usia produktif.⁶⁸ Di Indonesia, laporan Ditjen

PP&PL Kementerian Kesehatan RI tahun 2012 menyatakan persentase pasien terinfeksi HIV kelompok umur 25-49 adalah 72%.⁶⁵

Sebanyak 14 Isolat lingkungan yang didapatkan dari hasil kultur sampel kotoran burung merpati, debu rumah, lapukan kayu, dan tanah yang terdapat di lingkungan sekitar tempat tinggal pasien, yaitu pasien terinfeksi HIV/AIDS dengan kriptokokosis meningeal yang sama dengan subyek isolat klinik. Hasil penelitian terhadap isolat lingkungan didapatkan 35,71% isolat diperoleh dari kotoran burung merpati, 14,29% dari debu rumah, 28,57% dari tanah, dan 21,43% dari lapukan kayu dengan wilayah paling banyak di Jakarta (50,00%). Penelitian Hedayati *et al.*,⁶⁹ Abegg *et al.*,⁷⁰ Nosanchuk *et al.*,⁷¹ dan Cafarchia *et al.*,⁷² melaporkan bahwa *Cryptococcus neoformans* juga terdapat pada kotoran berbagai spesies burung, seperti burung kenari, beo, kakatua, burung layang-layang dan berbagai burung dari ordo Columbiformis. Penelitian Leite-Jr *et al.*,²⁷ berhasil mengidentifikasi tujuh spesies *Cryptococcus* dari debu pada perpustakaan umum. Swinne *et al.*,⁷³ mengisolasi *Cr. neoformans* pada debu dari dalam rumah pasien AIDS dengan kriptokokosis. Hipotesis Swinne *et al.*,⁷³ yang menyatakan bahwa kayu dapat menjadi habitat alamiah *Cr. neoformans* seperti pada *Cr. gattii* berhasil dibuktikan oleh Lazera *et al.*,²⁵ yang meneliti lubang kayu dari beberapa spesies pohon, diantaranya *Moquilea tomentosa*, *Cassia grandis*, *Ficus* sp. dan *Mangifera indica*.

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi isolat klinik *Cryptococcus neoformans* yang secara keseluruhan adalah *C. neoformans* varian *grubii*, serotipe A / VNI CBS 10085 dan CBS 10512) dan sebagian besar isolat berasal dari wilayah Jakarta. Sebagian besar infeksi kriptokokus pada pasien HIV/AIDS dari bagian lain dunia disebabkan oleh genotipe VNI (serotipe A). Hasil serupa juga telah diamati pada

penelitian lain dengan isolat klinis dari seluruh dunia, misalnya Malaysia 42 (95,5%), Guatemala 15 (93,3%), Peru 13 (93,3%), China 115 (89,5%) dan India 51 (89,5 %). Di Brasil, 95,7%, 82,9% dan 82,9% isolat dari negara bagian São Paulo, Rio Grande do Sul dan Rio de Janeiro, masing-masing adalah genotipe VNI. Penelitian lain, yang termasuk isolat *Cryptococcus* dari beberapa wilayah di Brazil menunjukkan prevalensi 64% genotipe VNI, sedangkan di wilayah Selatan prevalensinya adalah 74,5%.

Dalam beberapa tahun terakhir, wabah terbesar *C. neoformans* yang diketahui disebabkan oleh VGII terjadi di Vancouver, Kanada. Prevalensi genotipe VGII serupa di Kolombia (99,2%), di wilayah Utara dan Barat di Australia (71%), Northwestern Amerika Serikat (80%) dan Kanada (95%). Laporan penelitian sebelumnya dari Brasil Selatan menunjukkan prevalensi VGII 48% di antara 50 isolat klinis, namun sebagian besar ditemukan dari pasien yang telah bermigrasi dari Timur Laut dimana genotipe ini mewakili 89% dari semua infeksi *C. gattii*. Gambaran serupa juga ditemukan di utara di sepanjang lembah Amazon. Namun pada penelitian ini, tidak satupun dari 7 isolat klinis teridentifikasi sebagai *C. gattii*, genotipe VGII.

Seluruh isolat *Cryptococcus neoformans* dari lingkungan pada penelitian ini merupakan *C. neoformans* varian *grubii*, serotipe A. Isolat lingkungan terdeteksi dua tipe genotipe, yaitu VNI (CBS 10085) dan VNII (CBS 10084). Sumber isolat paling banyak adalah kotoran burung dan sebagian besar berada di wilayah Jakarta. Pada penelitian ini diidentifikasi dua genotipe utama dan VNI (*C. neoformans* var. *grubii*/serotipe A) adalah strain yang paling banyak teridentifikasi (85,71%) dari 21 isolat yang diperoleh dari 7 pasien HIV/AIDS dan 14 isolat lingkungan. Hasil penelitian ini didapatkan sebanyak tiga isolat (14,29%) merupakan genotipe VNII dan tidak

satupun isolat yang diketahui disebabkan oleh genotipe VG.

KESIMPULAN

Profil molekuler yang didapat pada penelitian ini menunjukkan adanya korelasi antara isolat *Cryptococcus neoformans* yang berasal dari klinis dan lingkungan. Hal tersebut dibuktikan dari hasil PCR *fingerprinting* didapatkan genotipe *Cryptococcus neoformans* dari isolat klinik dan lingkungan adalah VNI.

Daftar Pustaka

1. Maurimelia MC, Teixeira FM, Schalcher TR. *Cryptococcosis, A risk for Immunocompromised and Immunocompetent Individuals*. Open J Epidemiol 2013;6,9-17.
2. The Center for Food Security and Public Health. *Cryptococcosis*. Iowa State University 2013, 1-14.
3. Derek J. Sloan, Victoria Parris. *Cryptococcal meningitis : Epidemiology and Therapeutic Options*. Clin Epidemiol 2014;6, 169-182.
4. Li AS, Pan WH, Wu SX. *Ecological surveys of the Cryptococcus Spesies Complex in China*. Chin Med J 2012;125(3):511-516.
5. Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. (2007). The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell host & microbe*, 263-73.
6. Sjam R, Mulyati, Adawiyah R, Imran D, Wahyuningsih R. (2012). Cryptococcal Meningitis among AIDS Patients in Jakarta. *Maj Kedokt FKUKI*, 28(4), 160-66.
7. Wahyuningsih R. (2009). Ancaman Infeksi Jamur pada Era HIV/AIDS. *Maj Kedokt Indon*, 59(12), 569-72.
8. Ashwin Dixit, Scott F. Carrol, Salman T. Qureshi. *Cryptococcus gatii : An Emerging Cause of Fungal Disease in North America*. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009; 2009: 1-13.
9. Direktorat Jenderal Penanganan Penyakit & Penyehatan Lingkungan. (2013). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Laporan Situasi Perkembangan HIV & AIDS di Indonesia.
10. [Kaocharoen S¹, Ngamskulrungraj P, Firacative C, Trilles L, Piyabongkarn D, Banlunara W, Poonwan N, Chaiprasert A, Meyer W, Chindamporn A.](#) (2013). Molecular epidemiology reveals genetic diversity amongst isolates of the *Cryptococcus neoformans/C. gatii* species complex in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(7), e2297.
11. Sanglard D. (2003). Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. *Mycologist*, 17, 74-8.
12. Mc Clelland EE, Hobbs LM, Rivera J, Casadevall A, Potts WK, et al. (2013). The role of host gender in the pathogenesis of *C. neoformans* infections. *PLoS ONE*, 8(5), e63632. Doi: 10.1371/journal.pone.0063632.
13. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. (2009). Estimation of the current global burden of Cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23(4), 525-30.
14. Jumiyati, Bintari SH, Mubarak I. (2012). Isolasi dan Identifikasi Khamir secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosaintifika*, 4(1), 27-35. ISSN 2085-191X.
15. Kanti A. (2006). Marga Candida, Khamir Tanah Pelarut Posfat yang Diisolasi dari Tanah Kebun Biologi Wamena, Papua. *Biodiversitas*, 7(2), 105-8.
16. Somboonna N, Assawamakin A, Wilantho A, Tangphatsomruang S, Tongshima S. (2012). Metagenomic profiles of free-living archaea, bacteria and small eukaryotes in coastal areas of Sichang island. *BMC Genomics*, 13(suppl 7), S29.
17. Buee M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, et al. (2009). 454 pyrosequencing analysis of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol*, 184, 449-56.
18. Orgiazzi A, Bianciotto V, Bonfante P, Daghino S, Ghignone S, et al. (2013). 454 pyrosequencing analysis of fungal assemblages from geographically distant, disparate soils reveals spatial patterning and a core mycobiome. *Diversity*, 5, 73-98.
19. Lazera MS, Cavalcanti MAS, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. (1998). *Cryptococcus neoformans* var. *gatii*: Evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Med Mycol*, 36, 119-22.
20. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. (2009). Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatii*. *Med Mycol*, 47(6), 561-70.
21. Khawcharoenporn T, Apisamthanarak A, Mury LM. (2007). Non-*neoformans* cryptococcal infectious. *Infection*, 35, 51-7.
22. Cheng MF, Chiou CC, Liu YC, Wang HZ, Hsieh KS. (2001). *Cryptococcus laurentii* fungemia in a prematur neonate. *J Clin Microbiol*, 39, 1608-11.
23. Burnick C, Altintas ND, Ozkaya G, Serler T, Selaik ZT, Firat P, et al. (2007). Acute respiratory distress syndrome due to *Cryptococcus albidus* pneumonia: Chase report and review of the literatur. *Med mycol*, 45(5), 469-73.
24. Mattson R, Haemig PD, Olsen B. (1999). Fecal pigeon as carrier of *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces hansenii*. *Med mycol*, 37, 367-69.
25. Mc Curdy LH, Morrow JD. (2001). Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. *South Med J*, 94(1), 65-66.
26. Pfaller MA, Diekema DJ, Colombo AL, Kibbler C, Ng KP, Gibbs DL, et al. (2006). *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*, 44(10), 3578-82.
27. Tak V, Mathur P, Misra M.C. (2014). The epidemiological profil of Candidemia at an Indian Trauma Care Centre. *J Lab Physicians*, 6(2), 96-101.
28. Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* Species. (2009). In: Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM, editors. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 67. Burlington: Academic Press, pp. 131-90. ISBN: 978-0-12-374802-7.
29. Williamson P.R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol*, 176, 656-64.
30. Plonka P.L, Grabacka M. (2006). Melanin Synthesis in Microorganisms-Biotechnological and Medical Aspects. *Acta Biochim Pol*, 53(3), 429-43.

31. Polacheck I, Kwon-chung KJ. (1988). Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Gen Microbiol*, 134, 1037-41.
32. Bicmen C, Doluca M, Gulat S, Gunduz A.T, Tuksavul F. (2012). Species level identification and antifungal susceptibility of yeasts isolated from various clinical specimens and evaluation of Integral System Yeasts Plus. *New Microbiologica*, 35, 327-334.
33. Posteraro B, Romano L, Sanguinetti M, Masucci L, Morace G, Fadda G. (2000). Commercial systems for fluconazole susceptibility testing of yeasts: comparison with the broth microdilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 38, 29-36.
34. Morace G, Amato G, Biston F, Fadda G, Marone P, Montagna M.T, *et al.* (2002). Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of Candida Species. *J Clin Microbiol*, 40, 2953-2958.
35. CAT maker. Uji Statistik Sensitivitas dan Spesifisitas. Diunduh dari www.cebm.net/catmaker-ebm-calculators. Agustus, 2015.

