

**TESIS**

**IDENTIFIKASI CANDIDA SPESIES  
MENGUNAKAN PRIMER CAMPURAN SPESIFIK  
DENGAN TEKNIK PCR MULTIPLEX  
TERHADAP TARGET DNA TOPOISOMERASE II**



**RETNO SASONGKOWATI**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**

**TESIS**

**IDENTIFIKASI CANDIDA SPESIES  
MENGUNAKAN PRIMER CAMPURAN SPESIFIK  
DENGAN TEKNIK PCR MULTIPLEX  
TERHADAP TARGET DNA TOPOISOMERASE II**

**RETNO SASONGKOWATI  
NIM: 090415341 M**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**

IDENTIFIKASI CANDIDA SPESIES  
MENGUNAKAN PRIMER CAMPURAN SPESIFIK  
DENGAN TEKNIK PCR MULTIPLEX  
TERHADAP TARGET DNA TOPOISOMERASE II

TESIS

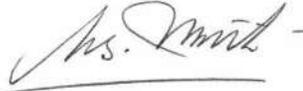
Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh:  
Retno Sasongkowati  
NIM: 090415341 M

PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
TANGGAL 2 AGUSTUS 2007

Lembar Pengesahan  
TESIS TELAH DIUJIKAN  
PADA TANGGAL, 2 AGUSTUS 2007

Oleh  
Pembimbing Ketua



Dr H Eddy Bagus Wasito, dr,MS,SpMK  
NIP. 130676011

Pembimbing



Arthur Pohan K, dr,MKes,SpMK  
NIP. 131760373

Mengetahui  
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar



Prof Retno Handajani, dr,MS,PhD  
NIP. 130541984

## Penetapan Panitia Penguji Tesis

Tesis ini telah diuji dan dinilai  
oleh panitia penguji pada  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Pada tanggal 2 Agustus 2007

Panitia Penguji,

Ketua : Lindawati A dr,MKes,SpMK

Anggota : 1. Dr H Eddy Bagus Wasito, dr,MS,SpMK  
2. Arthur Pohan K, dr,MKes,SpMK  
3. Setio Harsono, dr,MS,SpMK  
4. Bambang Susilo, dr,MKes,SpMK  
5. Sunarso Suyoso, dr,SpKK (K)

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunianya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Dengan selesainya tesis ini perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk menyelesaikan program Magister.
- Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program Magister.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr H Eddy Bagus Wasito, dr,MS,SpMK, pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih sebesar-besar dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Arthur Pohan K, dr,MKes,SpMK, pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih tak terhingga saya ucapkan kepada Lindawati A dr,MKes,SpMK, Bambang Susilo dr,MKes,SpMK dan Setio Harsono, dr,MS,SpMK, yang telah memberikan usulan-usulan demi perbaikan tesis ini.

Terima kasih juga saya ucapkan kepada seluruh dosen Ilmu Kedokteran Dasar, khususnya Minat Mikrobiologi yang telah memberikan motivasi, ilmu dan dorongan kepada saya dalam menempuh pendidikan Program Magister.

Terima kasih juga saya ucapkan kepada Dr Toshio Kanbe dari Division of Molecular Mycology and Medicine, Department of Advanced Medical Science, Center for Neutral Disease and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, yang telah banyak membantu dalam penyelesaian tesis ini.

## RINGKASAN

IDENTIFIKASI CANDIDA SPESIES  
MENGUNAKAN PRIMER CAMPURAN SPESIFIK  
DENGAN TEKNIK PCR MULTIPLEX  
TERHADAP TARGET DNA TOPOISOMERASE II

Masalah dalam dunia kedokteran bertambah dengan meningkatnya berbagai penyakit yang disebabkan oleh jamur terutama *Candida spp.* *Candida spp.* merupakan jamur yang dalam keadaan normal dapat ditemukan di saluran cerna, dan infeksi terjadi secara endogen. Infeksi ini terjadi bila ada faktor predisposisi, karena itu *Candida spp.* dimasukkan dalam golongan jamur oportunistik.

Genus *Candida* terdiri atas spesies-spesies yang dapat menyebabkan infeksi fungal opportunistic pada individu yang immunocompromise. Spesies *Candida* penyebabnya adalah *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*.

Prevalensi kandidiasis di Indonesia berkisar 90% untuk Kandidiasis vulvovaginitis dan 37%-84% untuk Kandidiasis oesofagus.

Untuk menemukan *Candida spp.* dilakukan pemeriksaan laboratorium dengan menggunakan bahan klinis secara langsung ataupun biakan. Pemeriksaan secara langsung terdiri dari preparat basah maupun pulasan. Pemeriksaan tersebut dapat berhasil bila jamur *Candida spp.* berjumlah cukup besar untuk dapat dilihat diantara sel-sel jaringan serta mikroba lain yang terdapat dalam bahan klinis.

Sebagai bahan uji dalam penelitian ini digunakan isolat *Candida* pada media isolasi standar yaitu Sabouraud Dextrose Agar yang diperoleh dari RSUD Dr Soetomo dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya sejumlah 13 bahan uji.

Koloni pada Sabouraud Dextrose Agar ditanam di CHROMAgar *Candida* sebagai uji presumtif, selain itu koloni dibuat ekstraksi DNA untuk kemudian dilakukan uji PCR dengan menggunakan primer campuran spesifik PsVIC.

Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil pada CHROMAgar *Candida* 13 isolat menunjukkan warna koloni sesuai spesies, sedangkan pada PCR, primer campuran spesifik PsVIC mengidentifikasi *Candida* hingga tingkat spesies yaitu *C. albicans* dengan ukuran 489,89 bp pada nomor 1, 2, 6, 10, 11, *C. glabrata* dengan ukuran 672,73 bp pada nomor 3 dan 13 serta *C. tropicalis* dengan ukuran 777,78 bp pada nomor 7,8, 9 dan 12.

Pada penelitian ini didapatkan sensitivitas 84,61% dan nilai ramal positif 100%, nilai ramal negatif 0% dengan tingkat akurasi 84,61% dengan Fisher's exact test didapatkan  $p=1$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa primer campuran spesifik PsVIC dapat digunakan untuk identifikasi *Candida* hingga tingkat spesies.

## SUMMARY

IDENTIFICATION OF CANDIDA SPECIES USING  
SPECIFIC MIXED PRIMERS BY MULTIPLEX PCR TECHNIQUE  
TARGETING DNA TOPOISOMERASE II

Problems in medical world have multiplied with the increase of various diseases which are caused by fungi especially *Candida spp.* *Candida spp.* is a fungus that is detectable under normal circumstances in digestive tract, and infection occurs endogenously. This infection happens if there are predisposition factors, so that *Candida spp.* is classified as opportunistic fungi.

Genus *Candida* consists of species which can cause fungal opportunistic infections to immunocompromised persons. *Candida* species that cause the infections are *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata*.

Prevalence of candidacies in Indonesia are about 90% for candidacies of vulvovaginitis and 37%-84% for candidacies of esophagus.

Laboratory test using direct or culture clinical materials is needed to find *Candida spp.* Direct test comprise wet and smear specimens. The test can be successful if the amount of *Candida spp.* fungi is big enough to be seen among tissue cells and other microbes in the clinical materials.

Samples in this research were *Candida* isolates in standard isolates media namely Sabouraud Dextrose Agar from RSUD Dr Soetomo dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya totaling 13 samples.

Colonies in Sabouraud Dextrose Agar were cultivated in CHROMAgar *Candida* as presumptive tests. The colonies also were formulate into DNA extraction to be tested with PCR using specific mixed primer of PsVIc.

The result of this research revealed that 13 isolates of CHROMAgar *Candida* showed colors of colonies appropriate with the species, while in PCR, specific mixed primer of PsVIc identified *Candida* in species level and the species were *C. albicans* with 489,89 bp in isolates number 1, 2, 6, 10, 11, *C. glabrata* with 672,73 bp in isolates number 3 and 13, and *C. tropicalis* with 777,78 bp in isolates number 7, 8, 9 and 12.

This research found that the sensitivity was 84,61%, positive predictive value 100%, negative predictive value 0% and accuracy was 84,61%, and Fisher's exact test showed the  $p=1$ . Therefore, the conclusion is that specific mixed primer of PsVIc can be used to identify *Candida* until species level.

## ABSTRACT

IDENTIFICATION OF CANDIDA SPECIES USING  
SPECIFIC MIXED PRIMERS BY MULTIPLEX PCR TECHNIQUE  
TARGETING DNA TOPOISOMERASE II

Genus *Candida* consists of species which can cause fungal opportunistic infections. The species are *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata*.

Two enzymatic products of *Candida spp*, namely *aspartyl proteinase* and *phosphorilase*, are virulence factors. The enzymatic products can cause non-specific proteolysis in proteins of the host which involves in the protection against infections and enable yeast to penetrate tissue barrier.

Laboratory test using direct or culture clinical materials is needed to find *Candida spp*. Direct test comprise wet and smear specimens. The test can be successful if the amount of *Candida spp* fungi is big enough to be seen among tissue cells and other microbes in the clinical materials.

This research used *Candida* isolates in standard isolates media namely Sabouraud Dextrose Agar. Then, the isolates were cultivated in CHROMAgar *Candida* and made into DNA extraction. The DNA extraction was tested with multiplex PCR using specific mixed primer of PsVIc with DNA topoisomerase II as a target.

The purposes of this research were to find out if specific mixed primer of PsVIc can be used to identify *Candida* until species level. From the research using multiplex PCR, 11 isolates showed positive band of 489,89 bp in isolates number 1, 2, 6, 10, 11, and 672,73 bp in isolates number 3 and 13, and 777,78 bp in isolates number 7, 8, 9 and 12.

Therefore, it is concluded that specific mixed primer of PsVIc could be used to identify *Candida* species.

Keywords: specific mixed primer of PsVIc, multiplex PCR, DNA topoisomerase II.

## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia Penguji .....	v
Ucapan Terima Kasih .....	vi
Ringkasan .....	vii
Summary .....	viii
Abstract .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>7</b>
2.1 Jamur <i>Candida spp</i> .....	7
2.2 Patogenesis <i>Candida spp</i> .....	8
2.3 Gejala Klinis .....	9
2.4 Diagnosis Infeksi <i>Candida spp</i> .....	10
2.4.1 Metode isolasi <i>Candida spp</i> .....	11
2.4.1.1 Sabouraud Dextrose Agar .....	11
2.4.1.2 CHROMAgar <i>Candida</i> .....	12
2.4.2 Metode identifikasi <i>Candida spp</i> .....	15
2.4.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	18
2.4.2.2 Gel Electrophoresis .....	20
2.5 DNA Topoisomerase .....	21
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL .....</b>	<b>25</b>
<b>BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>28</b>
4.1 Rancangan Penelitian .....	28
4.2 Populasi dan Sampel .....	28
4.3 Definisi Operasional Variabel .....	28
4.4 Bahan Penelitian .....	30
4.4.1 PCR <i>Candida</i> .....	30
4.4.2 Buffer Gel Electrophoresis .....	30
4.4.3 Pembuatan Agarose 1,2% .....	31
4.4.4 Ethidium Bromide .....	31
4.5 Instrumen Penelitian .....	31
4.6 Lokasi dan Waktu penelitian .....	32

4.7	Prosedur Penelitian .....	32
4.7.1	Penanaman koloni <i>Candida spp</i> .....	32
4.7.2	Prosedur ekstraksi DNA dari kultur .....	33
4.7.3	PCR amplification .....	34
4.7.4	Prosedur pengenceran produk PCR .....	34
4.7.5	Prosedur electrophoresis .....	35
<b>BAB 5</b>	<b>ANALISIS HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>38</b>
5.1	Data Penelitian .....	38
5.1.1	Hasil penanaman koloni <i>Candida spp</i> pada CHROMAgar <i>Candida</i> .....	38
5.1.2	Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II dengan teknik PCR Multiplex .....	40
<b>BAB 6</b>	<b>PEMBAHASAN .....</b>	<b>45</b>
<b>BAB 7</b>	<b>PENUTUP .....</b>	<b>51</b>
7.1	Kesimpulan .....	51
7.2	Saran .....	51
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>53</b>
	<b>LAMPIRAN</b>	

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
<b>Tabel 2.1</b> Nama primer, sekuen nukleotida, pasangan primer dan produk DNA yang diamplifikasi oleh masing-masing pasangan primer .....	17
<b>Tabel 5.1</b> Hasil penanaman koloni <i>Candida spp</i> pada CHROMAgar Candida .....	39
<b>Tabel 5.2</b> Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II dengan teknik PCR .....	41

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
<b>Gambar 2.1</b> Klamidospora terminalis dari <i>Candida spp</i> .....	10
<b>Gambar 2.2</b> Koloni <i>Candida spp</i> pada media Sabouraud.....	12
<b>Gambar 2.3</b> CHROMagar Candida dengan koloni berwarna-warni.....	14
<b>Gambar 2.4</b> Bentuk DNA supercoiled, open-circular dan linear duplex .....	22
<b>Gambar 2.5</b> Proses terbentuknya supercoiling oleh enzim DNA topoisomerase.....	23
<b>Gambar 5.1</b> Isolat <i>Candida</i> pada media Sabouraud Dextrose Agar .....	38
<b>Gambar 5.2</b> Hasil penanaman koloni <i>Candida albicans</i> pada CHROMAgar Candida.....	39
<b>Gambar 5.3</b> Hasil penanaman CHROMAgar Candida ...	40
<b>Gambar 5.4</b> Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II lajur 1-6 .....	42
<b>Gambar 5.5</b> Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II lajur 7-8 .....	43
<b>Gambar 5.6</b> Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II lajur 9 .....	43
<b>Gambar 5.7</b> Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II lajur 10-13 .....	44
<b>Gambar 6.1</b> Skema dinding sel <i>Candida spp</i> .....	46

## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1** Perhitungan kesetaraan jarak angka ukuran molekul DNA pada marker dengan besar molekul DNA
- Lampiran 2** Perhitungan sensitivitas
- Lampiran 3** Tes Fisher's Exact



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Masalah dalam dunia kedokteran bertambah dengan meningkatnya berbagai penyakit yang disebabkan oleh jamur terutama *Candida spp.* Jamur *Candida* telah dikenal dan dipelajari sejak abad ke-18 (Suprihatin, 1982).

Berdasarkan bentuk-bentuk jamur, *Candida* dikatakan menyerupai ragi (*yeast-like*). *Yeast* terdiri atas kelompok-kelompok heterogen yang tampak homogen dan serupa dalam bentuk dan tumbuh uniselular serta bereproduksi dengan tunas (Kanbe *et al.*, 2002).

*Candida spp* merupakan jamur yang dalam keadaan normal dapat ditemukan di saluran cerna dan infeksi terjadi secara endogen. Infeksi terjadi bila ada faktor predisposisi, karena itu *Candida spp* dimasukkan dalam golongan jamur oportunistik (Suprihatin, 1982).

Proliferasi *Candida spp* dapat ditemukan pada beberapa keadaan seperti pemakaian antibiotik spektrum luas yang lama, pemakaian steroid, kemoterapi, obat supresi imunitas, tindakan *peritoneal dialysis*, penderita AIDS, luka bakar serta pasca operasi. Penggunaan steroid, *antacid* bersama-sama antibiotik

akan mempercepat proliferasi *Candida spp.* Penggunaan antibiotik yang lama dan berulang terutama pada penderita dengan immunosupresi akan mengeliminasi sebagian mikroorganisme flora normal dan diikuti dengan proliferasi mikroorganisme lain termasuk *Candida spp.* Kolonisasi *Candida spp.* ini diawali dengan menempelnya spora pada mukosa saluran cerna yang diikuti dengan perubahan bentuk menjadi pseudohifa. Kandidiasis terjadi akibat koloni yang meningkat secara berlebihan.

Genus *Candida* terdiri atas spesies-spesies yang dapat menyebabkan infeksi *fungal opportunistic* pada individu yang *immunocompromise* (Kamiya *et al.*, 2005). Insidensi infeksi oportunistik oleh spesies *Candida* selain disebabkan oleh *C. albicans* dan juga *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*. *C. albicans* adalah spesies etiologis utama pada kandidiasis. (Kanbe *et.al.*, 2002)

Produksi enzim oleh *Candida spp* merupakan faktor virulensi penting. Salah satu enzimnya adalah *aspartyl proteinase* yang disekresi oleh *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* dan *C. tropicalis*. *Aspartyl proteinase* yang disekresi ini menghasilkan proteolisis non spesifik dari protein-protein *host* yang terlibat dalam pertahanan terhadap perlawanan infeksi dan memungkinkan masuknya

*yeast* menembus *tissue barrier*. Kelompok enzim lain yang juga dianggap sebagai faktor virulensi adalah fosforilase terutama dihasilkan oleh *C. albicans* (Dignani *et al.*, 2003).

Prevalensi rata-rata *Candida spp* di mulut berkisar antara 25%-50% dengan *C. albicans* sebagai spesies paling dominan yang ditemukan pada 70%-80% kasus pasien HIV, *denture* stomatitis, penderita diabetes melitus, penderita yang menjalani kemoterapi, serta pada anak-anak (Dignani *et al.*, 2003).

Di Indonesia, prevalensi sariawan oral dan oesophagus antara 37%-84%, sedangkan prevalensi kandidiasis vulvovaginal adalah 90% (Patmini, 2004).

Di Amerika Serikat dan Eropa, prevalensi kandidiasis mencapai 75%, dengan agen penyebab tersering adalah *C. albicans* yang mencapai 80%-90% (Egan *et al.*, 2000).

Di Nigeria, prevalensi kandidiasis adalah 51,5% pada wanita pemakai alat kontrasepsi (Enweani *et al.*, 2001).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Yang *et al.* pada tahun 2003, menyebutkan bahwa 20% *C. albicans* yang diteliti resisten terhadap fluconazole dan azole lain, sedangkan untuk *C. glabrata* dan *C. krusei* masih sensitif (Yang *et al.*, 2003).

Untuk menemukan *Candida spp* dilakukan pemeriksaan laboratorium dengan menggunakan bahan klinis secara langsung ataupun biakan. Pemeriksaan secara langsung terdiri dari

preparat basah maupun pulasan. Pemeriksaan tersebut dapat berhasil bila jamur *Candida* berjumlah cukup besar untuk dapat dilihat diantara sel-sel jaringan serta mikroba lain yang terdapat dalam bahan klinis (Suprihatin, 1982).

Tes morfologi dan biokimia biasa digunakan untuk identifikasi spesies-spesies *Candida*. Tes morfologi yang biasa digunakan saat ini adalah dengan menanam bahan klinis pada media Sabouraud *Dextrose* Agar dan dieramkan pada 37°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh, tampak konveks berwarna putih kekuningan, permukaan licin dan berbau ragi. Atau dengan cara menumbuhkan klamidospora dengan menanam bahan klinis pada media *corn meal* agar yang berisi 1% Tween 80. Dapat juga dengan melihat pembentukan kecambah (*germ tube*) dalam medium yang mengandung protein, misalnya serum atau plasma (Suprihatin, 1982).

Metode identifikasi tersebut sering kali tidak intensif dan perlu waktu beberapa hari, serta dianggap terlalu rumit dan sering tidak dikuasai laboratorium klinis non spesialis (Yucesoy and Marol, 2003).

Teknik biologi molekular lebih efisien daripada uji konvensional untuk memberikan diagnosis yang cepat dan spesifik di masa yang akan datang (Dignani *et al.*, 2003). Sebagian penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa

untuk mengidentifikasi *Candida* hingga tingkat spesies digunakan uji PCR menggunakan sepasang primer pada putaran pertama. Pasangan primer ini menghasilkan sebuah produk PCR dari spesies *Candida* patogen yang utama. Selain itu digunakan juga 10 primer untuk nested PCR. Primer-primer itu dirancang sebagai PsVIC dan dianggap sebagai primer campuran. Primer campuran ini terdiri atas lima pasang primer spesifik yang spesifik untuk *C. albicans*, *C. parapsilosis I*, *C. parapsilosis II*, *C. glabrata* dan *C. tropicalis*.

DNA topoisomerase II adalah enzim yang dapat memicu DNA untuk melipat diri hingga tergulung sangat rapat dan dinamakan dengan *supercoiling*. *Supercoiling* ini membuat molekul DNA yang sangat panjang menjadi pilinan sehingga memungkinkan DNA masuk ke dalam sel (Brock and Madigan, 1991).

DNA topoisomerase II terdapat pada organisme eukariotik dan sekuen nukleotidanya terdiri atas *region-region* yang sangat terlindungi dan gen DNA topoisomerase II ini cocok sebagai target identifikasi PCR beberapa spesies *Candida*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah primer campuran spesifik PsVIC terhadap DNA topoisomerase II dengan teknik PCR multiplex dapat digunakan untuk identifikasi *Candida* pada tingkat spesies?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui identifikasi *Candida* pada tingkat spesies menggunakan primer campuran spesifik PsVIC dengan teknik PCR multiplex terhadap target DNA topoisomerase II.

### 1.4 Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini akan memberikan informasi kepada para peneliti lain dan para klinisi tentang cara identifikasi *Candida* menggunakan primer campuran spesifik PsVIC dengan teknik PCR multiplex terhadap target DNA topoisomerase II.
2. Hasil penelitian ini memberikan informasi kepada para klinisi bahwa cara identifikasi *Candida* tingkat spesies menggunakan primer campuran spesifik PsVIC dengan teknik PCR multiplex terhadap target DNA topoisomerase II sangat potensial untuk memberikan diagnosis yang cepat dan spesifik dari *Candida spp* di masa mendatang.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Jamur *Candida spp*

Jamur *Candida* telah dikenal dan dipelajari sejak abad ke-18. Robin (1850) melihat jamur itu pada stomatitis yang disebutnya *oral thrush* pada seorang penderita. Berdasarkan bentuk jamur yang bulat agak lonjong dan berwarna putih, maka diberinya nama *Oidium albicans*. Selanjutnya *Oidium* berubah nama menjadi *Monilia* karena spora-spora jamur yang tampak seperti untaian manik-manik menyerupai kalung (*monile*). Pada tahun 1954, *Monilia* berubah menjadi genus *Candida* (Suprihatin, 1982).

*Candida* merupakan jamur yang dalam keadaan normal ditemukan pada saluran gastrointestinal dan merupakan komensal pada manusia.

*Candida spp* menjadi patogen bila resistensi *host* terhadap infeksi melemah baik secara lokal atau sistemik. Dalam situasi seperti ini, *Candida spp* mampu menyebabkan penyakit di seluruh lokasi pada tubuh manusia.

Terdapat tujuh spesies genus *Candida* yang dikenal sebagai patogen oportunistik pada manusia, yaitu: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C.*

*tropicalis* dan *C. parapsilosis* (Dignani *et al.*, 2003) dan etiologi utama pada kandidiasis adalah spesies *C. albicans* (Kanbe *et al.*, 2002).

## **2.2 Patogenesis *Candida spp***

Kandidiasis dapat terjadi secara endogen karena *Candida spp* sudah ada di dalam tubuh. *Candida spp* merupakan organisme dimorfik, yaitu bentuk yeast (spora) yang merupakan bentuk non-invasif dan bentuk miselium (*pseudohyphae*) yang menghasilkan rizoid dan bersifat invasif serta dapat berpenetrasi ke dalam mukosa saluran cerna. *Candida spp* berproliferasi di dalam saluran cerna dan pada seseorang dengan imunitas rendah dapat menimbulkan penyakit tetapi dapat pula terjadi pada orang dengan imunitas normal. Proliferasi *Candida spp* dapat ditemukan pada beberapa keadaan, seperti pemakaian antibiotik spektrum luas yang lama, pemakaian steroid, kemoterapi, obat supresi imun, dialisis, penderita AIDS, luka bakar serta pasca operasi.

Kandidiasis terjadi akibat koloni *Candida spp* yang meningkat secara berlebihan. Kolonisasi *Candida spp* diawali dengan menempelnya spora pada sel mukosa yang diikuti dengan perubahan bentuk menjadi pseudohifa.

Produksi enzim merupakan faktor virulensi dari *Candida spp.* Enzim tersebut adalah *aspartyl proteinase* yang disekresi oleh *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* dan *C. tropicalis*. *Aspartyl proteinase* yang disekresi ini menghasilkan proteolisis non spesifik dari protein-protein *host* yang terlibat dalam pertahanan terhadap perlawanan infeksi yang memungkinkan masuknya *yeast* menembus *tissue barrier*.

Pelekatan pada *host*, kemampuan germinasi, sekresi enzim hidrolitik proteinase dan fosforilase merupakan faktor virulensi dari *C. albicans* (Harlina, 2000).

### **2.3 Gejala Klinis**

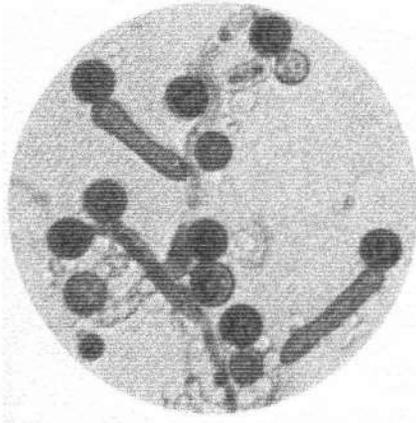
Gejala klinis yang diperlihatkan baik sebagai mukosal ataupun patogen sangat bervariasi. Kandidiasis oral mempunyai gambaran spesifik berupa pseudomembran yang terlihat sebagai lapisan putih kekuningan, menonjol diatas mukosa dan bila diangkat akan memperlihatkan warna kemerahan. Bentuk ini dikenal sebagai *thrush*.

Kandidiasis oesofagus sering memperlihatkan infeksi kronis. Mukosa yang terinfeksi memperlihatkan gambaran erosi dan pseudomembran sehingga sering menimbulkan gejala disfagia, nyeri dada dan perdarahan.

## 2.4 Diagnosis Infeksi *Candida spp*

Pemeriksaan laboratorium untuk menemukan *Candida spp* di dalam bahan klinis dapat dilakukan secara direk maupun biakan.

Yeastlike button and elongated pseudomycelial formations (x 200).



**Gambar 2.1** Klamidospora terminalis dari *Candida spp* (Lasagni *et al.*)

Untuk pemeriksaan mikroskopik direk preparat adalah dengan sediaan basah ataupun pulasan. Pemeriksaan ini dapat berhasil bila jamur *Candida* berjumlah cukup besar untuk dapat dilihat diantara sel-sel jaringan maupun mikroba lain yang juga terdapat dalam bahan klinis (Suprihatin, 1982). Pemeriksaan mikroskopik direk preparat merupakan cara yang sederhana dan ekonomis untuk deteksi *Candida spp* tapi hasil direk preparat ini hanya dapat diketahui adanya jamur berdasarkan morfologi yang tampak, tanpa dapat dilakukan identifikasi spesiesnya. Untuk itu

perlu dikerjakan biakan. Tetapi untuk deteksi *Candida spp* tersebut diperlukan waktu yang relatif cukup lama serta dianggap rumit dan sering tidak dikuasai laboratorium klinis non spesialis (Yucesoy and Marol, 2003).

Deteksi *Candida spp* dengan hibridisasi DNA sangat potensial untuk memberikan diagnosis yang cepat dan spesifik di masa yang akan datang (Dignani *et al.*, 2003).

#### **2.4.1 Metode isolasi *Candida spp***

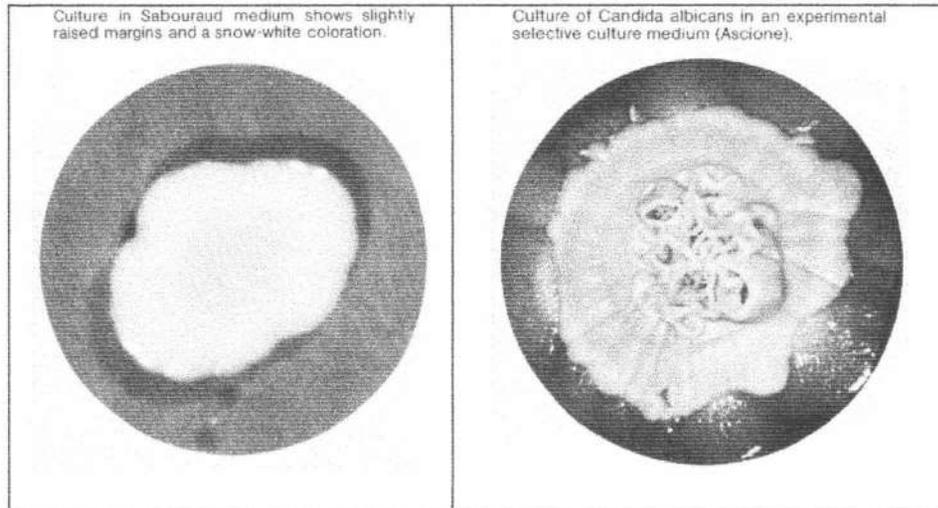
Beberapa spesimen klinis dapat diinokulasikan dalam media kultur yang tepat untuk isolasi *Candida spp* (Dignani *et al.*, 2003).

##### **2.4.1.1 Sabouraud Dexrose Agar**

*Candida spp* yang berhubungan dengan penyakit manusia mampu tumbuh pada media isolasi mikologik standar pada suhu 35°C. Sabouraud Dexrose Agar pH 5,6 dengan *chloramphenicol* dan *gentamicin* ditambahkan untuk meminimalkan kontaminasi bakteri dan banyak dipakai untuk kultur organisme *Candida spp* dari bahan klinis (Dignani *et al.*, 2003).

Sel-sel *yeast* (bentuk pseudohifa) mudah dilihat dengan mikroskop fase kontras pada semua spesimen

basah. Pada media Sabouraud *Dextrose* Agar dapat juga ditambahkan aktidion untuk menekan jamur pencemar yang mungkin ada dalam bahan klinis, yang dapat mengganggu pertumbuhan *Candida spp* (Suprihatin, 1982).



**Gambar 2.2** Koloni *Candida spp* pada media Sabouraud (Lasagni *et al.*)

Koloni *Candida spp* tumbuh 1-2 hari kemudian dan tampak berwarna putih kekuningan, konveks diatas permukaan medium. Bau ragi adalah khas.

#### 2.4.1.2 CHROMAgar *Candida*

Idealnya, laboratorium bisa mendeteksi dan mengidentifikasi sebagian besar spesies *Candida* dalam spesimen klinis. Tetapi kebanyakan laboratorium memulai proses identifikasi *yeast* dengan *germ tube test* dan

melanjutkannya dengan tes yang lebih ekstensif. Prosedur identifikasi referensi yang menggunakan studi-studi biokimia dan morfologis seringkali tidak intensif dan perlu waktu beberapa hari. Metode konvensional identifikasi dianggap rumit dan sering tidak dikuasai laboratorium klinis non spesialis (Yucesoy and Marol, 2003).

Penggunaan CHROMAgar *Candida* adalah metode yang reliabel untuk identifikasi presumtif dari sebagian besar spesies *Candida* yang diisolasi.

CHROMAgar *Candida* adalah media agar yang bisa memberikan diferensiasi beberapa *Candida spp* berdasarkan warna koloni. Media ini biasanya memberi diferensiasi efektif *C. albicans* berdasarkan satu atau lebih aktivitas enzim uniknya, dan CHROMAgar *Candida* ini menghasilkan identifikasi presumtif *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* dan *C. parapsilosis* pada saat isolasi. Juga ada kemungkinan untuk membedakan *C. dubliniensis* dengan koloni *C. albicans* pada saat isolasi melalui warnanya yang lebih hijau tua. CHROMAgar *Candida* adalah media yang ideal untuk isolasi *Candida spp* karena media ini memperlihatkan campuran *Candida spp* dalam banyak jenis sampel klinis. Sensitivitas dan spesifisitas karakteristik warna hijau cukup tinggi untuk

spesifik yaitu PsVIc, yang terdiri atas CABF094/CABR143 spesifik untuk *C. albicans*, CPP1F034/ CPP1R122 spesifik untuk *C. parapsilosis I*, CPP2F038/ CPP2R069 spesifik untuk *C. parapsilosis II*, CGBF035/ CGBR102 spesifik untuk *C. glabrata* dan CTR2F049/ CTR2R126 spesifik untuk *C. tropicalis* (Kamiya *et al.*, 2005).

Satuan panjang molekul DNA untuk masing-masing spesies *Candida* adalah 310bp untuk *C. parapsilosis II*, 490bp untuk *C. albicans*, 672bp untuk *C. glabrata*, 777bp untuk *C. tropicalis* dan 880bp untuk *C. parapsilosis I*.

Sekuen nukleotida genomic dari dua primer degenerasi dan primer-primer spesifik terlihat pada Tabel 2.1.

PCR yang menggunakan primer campuran PsVIc secara eksklusif mengamplifikasi produk PCR yang sesuai dengan *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis I*, *C. parapsilosis II* dari sampel DNA (Kamiya *et al.*, 2005).

Dalam metode PCR tidak dipengaruhi metodologi dan kemampuan biokimia dan dapat mengidentifikasi dengan cepat jika dibandingkan dengan teknik konvensional karena metode PCR tidak memerlukan kultur murni (Kanbe *et al.*, 2002).

**Tabel 2.1** Nama primer, sekuen nukleotida, pasangan primer dan produk DNA yang diamplifikasi oleh masing-masing pasangan primer

Spesies fungi dan primer	Arah	Sekuen (5'-3')	Pasangan primer (F/R)
Common primers			
CDF28	F	GGTGG <b>WMGDAAYGGDTWYGGYG</b>	CDF28/CDR148
CDR148	R	<b>CCRTCNTGATCYTGATCBGYCAT</b>	
Specific primers			
<i>C. albicans:</i>			
CABF094	F	CCTGAACCAACAAGATGGAACCATTA	CABF094/CABR143
CABR143	R	CGCAGTTTTCTACTACCATCG	
<i>C. parapsilosis I:</i>			
CPP1F034	F	CGGCTGATTTGAACACTGGTAAAC	CPP1F034/PP1R122
CPP1R122	R	TGTCAAGATCAACGTACATTTAGT	
<i>C. parapsilosis II:</i>			
CPP2F038	F	GGACAACATGACAAAAGTCGGCA	CPP2F038/PP2R069
CPP2R069	R	TTGTGGTGTAATTCCTGGGAG	
<i>C. glabrata:</i>			
CGBF035	F	CCCAAAAATGGCCGTAAGTATG	CGBF035/CGBR102
CGBR102	R	AGTCGCTACTAATATCACACC	
<i>C. tropicalis:</i>			
CTR2F049	F	GGACAGTTTGGATGAAGATTTA	CTR2F049/CTR2R126
CTR2R126	R	GAGACCAGCCACGGCCAAATTC AAC	

Sumber: Toshio Kanbe et al., 2003.

Keterangan:

F: Forward primer

R: Reverse primer

W: A atau T

D: A, G atau T

M: A atau C

B: C, G atau T

Y: C atau T

N: A, C, G atau T

R: A atau G

#### 2.4.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) adalah suatu cara sederhana dan tepat untuk membuat *multiple copies* atau memperbanyak sekuen DNA spesifik yang diinginkan dengan meniru replikasi DNA *in-vivo* (Kresno, 2001).

PCR merupakan suatu reaksi *in-vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu (Muladno, 2002). Untuk melakukan eksperimen PCR, DNA target dicampur dengan DNA polymerase, sepasang oligo nukleotida primer dan suplai nukleotida. Primer diperlukan untuk menginisiasi reaksi sintesis DNA. Primer harus melekat pada DNA target pada setiap segmen yang akan dikopi (Brown, 2002). Panjang DNA target berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Primer yang berada sebelum daerah target disebut primer *forward* dan yang berada setelah daerah target disebut primer *reverse* (Muladno, 2002). Primer-primer inilah yang menentukan segmen mana yang akan mengalami siklus berulang-ulang agar jumlahnya berlipat ganda. Primer yang terdiri atas untai tunggal DNA (ssDNA) akan bergabung dengan untai tunggal DNA template dan sintesis DNA selanjutnya

dilakukan dengan bantuan enzim polymerase (Kresno, 2001).

Reaksi PCR dimulai dengan memanaskan campuran pada suhu 94°C, pada suhu ini ikatan hidrogen yang mengikat dua polinukleotida dari double helix akan terputus sehingga DNA target berubah sifat menjadi molekul untaian tunggal DNA (ssDNA). Suhu kemudian diturunkan menjadi 50-60°C, yang menyebabkan bersatunya kembali untaian tunggal DNA target, dan sekaligus menyebabkan primer melekat pada posisi *annealing* mereka. Selanjutnya sintesis dimulai, sehingga temperatur dinaikkan lagi menjadi 72°C (Brown, 2002). Pada tahap pertama PCR, serangkaian "*long products*" disintesis dari masing-masing strand dari DNA target. Pada saat siklus *denaturation-annealing-sintesis* terulang *long products* berperan sebagai template bagi sintesis DNA baru.

Hasil-hasil PCR dapat ditentukan dengan berbagai cara, biasanya produk-produk dianalisis dengan agarose gel *electrophoresis* yang akan memperlihatkan satu pita jika PCR bekerja sesuai yang diharapkan dan mengamplifikasi sebuah segmen DNA target (Brown, 2002).

### 2.4.2.2 Gel Elektrophoresis

Hasil berbagai manipulasi DNA dan analisis DNA dapat dimonitor melalui proses *electrophoresis*. Komponen bahan kimia terpenting yang digunakan dalam proses tersebut adalah gel.

Pada dasarnya, DNA dapat bermigrasi di dalam gel dalam bentuk padat yang diletakkan dalam larutan penyanggah yang dialiri arus listrik. Ada dua jenis gel yang sering digunakan untuk proses *electrophoresis*, yaitu gel agarose dan gel polyacrilamida.

- **Gel Agarose**

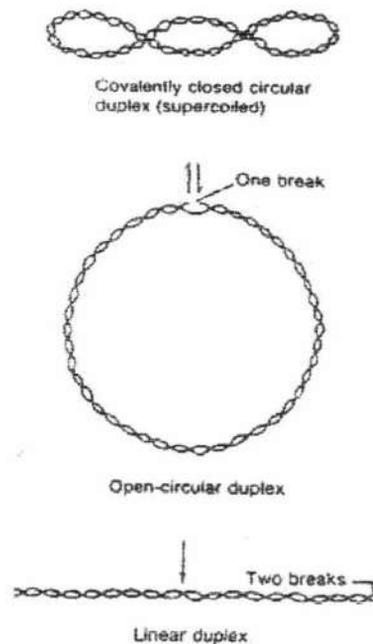
Gel agarose dapat dicetak dengan memanaskan agarose yang dilarutkan dalam larutan buffer sampai didapatkan larutan jernih. Larutan yang masih cair dituang ke dalam pencetak gel. Segera setelah itu sisir ditempatkan di dekat tepian gel dan gel dibiarkan mengeras. Setelah gel mengeras, sisir dicabut sehingga terbentuk sumur-sumur yang digunakan untuk menempatkan larutan DNA. Jika gel ditempatkan ke dalam tangki *electrophoresis* yang mengandung larutan *buffer* dan tangki tersebut dialiri listrik, molekul DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke arah positif.

- **Gel Polyacrylamide**

Gel terbentuk dengan cara mencampurkan larutan acrylamide dengan ammonium persulfat dan TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine). Pencampuran ini mengakibatkan monomer acrylamide mengalami polimerisasi menjadi rantai panjang (Muladno, 2002).

## 2.5 DNA Topoisomerase

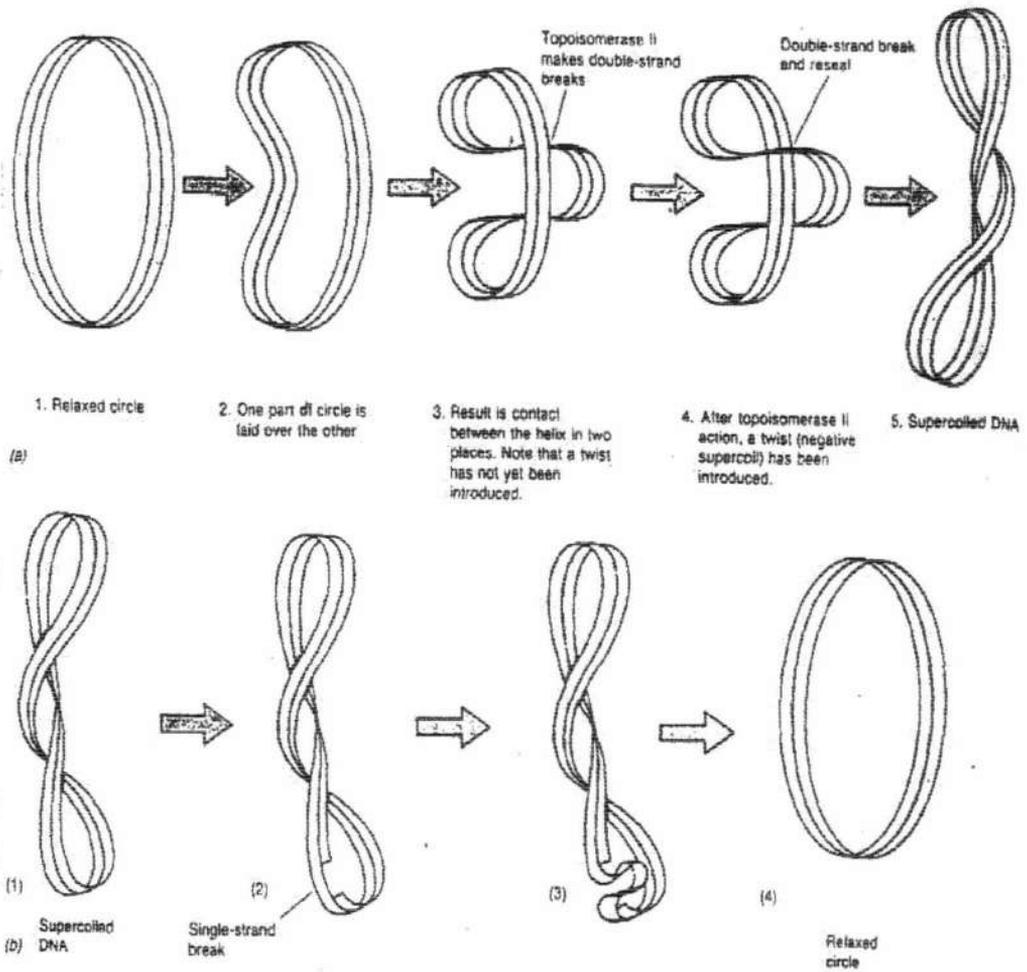
Bentuk konvensional DNA yang diilustrasikan struktur DNA lebih menyerupai *double helix* yang kaku. Dalam bentuk ini tidak mungkin DNA dimasukkan ke dalam sel. Solusinya adalah *supercoiling* (menggulung serapat-rapatnya). *Supercoiling* adalah kondisi dimana DNA melipat diri sehingga tergulung sangat rapat. *Supercoiling* ini membuat molekul DNA menjadi pilinan. Lipatan-lipatan itu akan menghasilkan struktur gulungan yang rapat terpilin. Tetapi pilinan ini tetap terbentuk hanya bila struktur melingkar dipertahankan.



**Gambar 2.4** Bentuk DNA supercoiled, open-circular dan linear duplex (Brock and Madigan, 1991).

Terdapat suatu enzim khusus yang disebut topoisomerase (topoisomerase II, juga disebut DNA gyrase) yang memicu *supercoiling*, sehingga molekul DNA yang sangat panjang dapat masuk ke dalam sel karena tergulung rapat.

Terbentuknya *supercoiling* berlangsung dalam beberapa tahap, pertama, molekul DNA yang melingkar menggulung, lalu patahan terjadi ketika dua rantai bertemu, double helix yang patah disambung kembali pada posisi yang berlawanan (Brock and Madigan, 1991).



**Gambar 2.5** Proses terbentuknya *supercoiling* oleh enzim DNA topoisomerase (Brock and Madigan, 1991)

Ada enzim lain yaitu topoisomerase I yang menyebabkan terbukanya jalan untuk *single strand double helix* saling melewati satu sama lain (Brown, 2002), molekul DNA dapat digulung dan dikendurkan. Penggulungan penting untuk memasukkan DNA ke dalam batas-batas sel dan mengendurkan juga penting sehingga DNA dapat bereplikasi (Brock and Madigan, 1991).

DNA topoisomerase II terdapat pada organisme eukariotik dan sekuen nukleotidanya terdiri atas *region-region* yang sangat terlindungi (Kanbe *et al.*, 2002).

### BAB 3

#### KERANGKA KONSEPTUAL

Masalah dalam dunia kedokteran bertambah dengan meningkatnya berbagai penyakit yang disebabkan oleh jamur, terutama jamur *Candida*.

Jamur *Candida spp* dapat menyebabkan infeksi fungal oportunistik terutama pada individu yang *immunocompromise*. *Candida spp* sering ditemukan pada beberapa keadaan seperti pemakaian antibiotik spektrum luas, pemakaian steroid, kemoterapi, obat supresi imunitas, *dialysis* dan penderita AIDS (Dignani *et al.*, 2003). *Candida spp* ini dapat menyebabkan infeksi jamur di semua lokasi tubuh manusia.

*Candida spp* ini dalam keadaan normal dapat ditemukan di saluran gastrointestinal, saluran urogenital dan rongga mulut manusia. Infeksi oportunistik yang disebabkan oleh *Candida spp* diantaranya adalah spesies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis I*, *C. parapsilosis II*, *C. glabrata* (Kanbe *et al.*, 2002), *C. guilliermondii*, *C. krusei* dan *C. lusitaniae* (Dignani *et al.*, 2003), sedangkan spesies etiologi utamanya adalah *C. albicans* (Kanbe *et al.*, 2002; Dignani *et al.*, 2003).

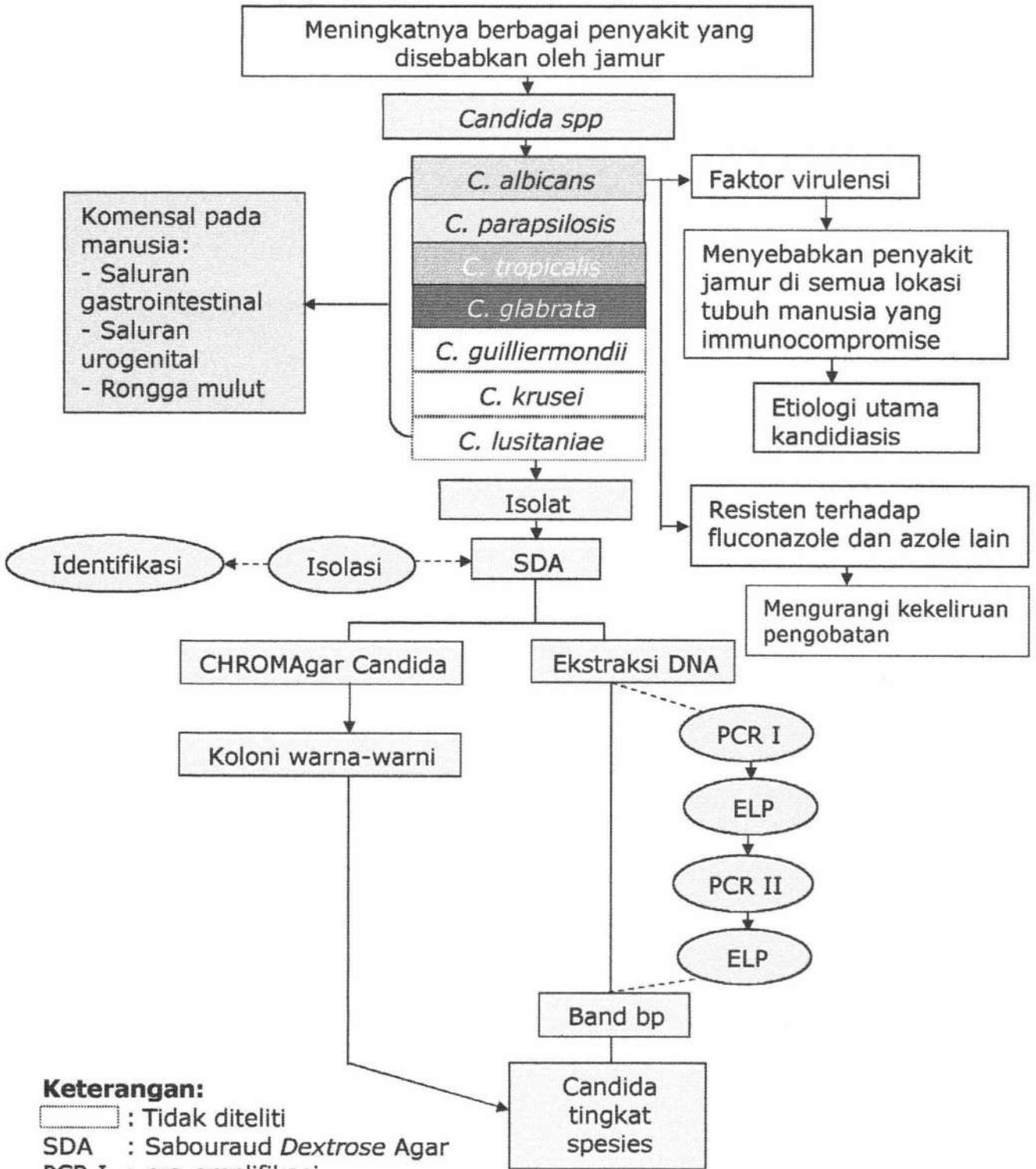
Faktor virulensi dari *C. albicans* adalah perlekatan pada *host*, kemampuan germinasi, sekresi enzim hidrolitik proteinase

dan fosforilase (Harlina, 2000). Pada tahun 2003 Yang *et al.* mengemukakan bahwa *C. albicans* menunjukkan resistensi terhadap fluconazole dan azole lain, sedangkan *Candida* lain masih sensitif. Mengidentifikasi *Candida* hingga tingkat spesies dilakukan dengan isolasi dan identifikasi melalui penanaman bahan klinis pada media Sabouraud Dextrose Agar, CHROMAgar *Candida* dan dilanjutkan dengan melakukan pemeriksaan PCR hingga akhirnya diketahui spesies-spesiesnya.

Pada pemeriksaan PCR ini dilakukan pra-amplifikasi menggunakan sepasang primer degenerasi yaitu CDF28/CDR148 yang akan mengamplifikasi pada tingkat genus *Candida* dan dilanjutkan dengan amplifikasi utama, pada amplifikasi utama ini digunakan primer campuran spesifik yaitu PsVIc, yang terdiri atas CABF094/CABR143 spesifik untuk *C.albicans*, CPP1F034/ CPP1R122 spesifik untuk *C.parapsilosis I*, CPP2F038/ CPP2R069 spesifik untuk *C.parapsilosis II*, CGBF035/CGBR102 spesifik untuk *C.glabrata* dan CTR2F049/CTR2R126 untuk *C.tropicalis*.

Sebagai acuan DNA atau kontrol untuk masing-masing spesies digunakan genomic DNA yang dimurnikan dari *C.albicans* A9, *C.parapsilosis* IFO1068 tipe I, *C.parapsilosis* IFO1396 tipe II, *C. glabrata* ATCC2001 dan *C.tropicalis* NUM5076 tipe II.

**Kerangka Konseptual Penelitian**



**Keterangan:**

- : Tidak diteliti
- SDA : Sabouraud Dextrose Agar
- PCR I : pra-amplifikasi
- PCR II : amplifikasi utama
- ELP : Electrophoresis

## BAB 4

### MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional deskriptif, penelitian ini mendeskripsikan secara sistematis, dan akurat dari spesies-spesies *Candida*.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Sebagai sampel penelitian adalah isolat *Candida spp* yang telah tumbuh pada media Sabouraud *Dextrose* Agar sebanyak 13 isolat, diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya dan RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Kemudian koloni yang teridentifikasi sebagai koloni *Candida* ditanam pada CHROMAgar *Candida*.

Isolat *Candida* berasal dari kerokan kulit, usap vagina, sputum, *oral thrush*, urine, dan kuku.

#### 4.3 Definisi Operasional Variabel

1. *Candida* spesies adalah jamur yang dalam keadaan normal dapat ditemukan di saluran cerna, urogenital, rongga mulut, kulit maupun kuku. Bila ditanam pada CHROMAgar *Candida* menunjukkan koloni berwarna pink

maka disebut *C. parapsilosis*, koloni berwarna hijau *C. albicans*, koloni violet *C. glabrata*, koloni biru *C. tropicalis*. Bila dilakukan uji PCR menghasilkan pita DNA dengan panjang 310 bp disebut sebagai *C. parapsilosis II*, 490 bp *C. albicans*, 672 bp *C. glabrata*, 777 bp *C. tropicalis*, dan 880 bp *C. parapsilosis I*.

2. Primer campuran spesifik PsVIc adalah primer campuran yang terdiri atas lima pasang primer spesifik yaitu CABF094/CABR143 untuk *C. albicans*, CPP1F034/ CPP1R122 untuk *C. parapsilosis I*, CPP2F038/ CPP2R069 untuk *C. parapsilosis II*, CGBF035/CGBR102 untuk *C. glabrata* dan CTR2F049/CTR2R126 untuk *C. tropicalis*. Primer campuran spesifik yang dirancang sebagai PsVIc tersebut secara eksklusif mengamplifikasi produk PCR yang sesuai dengan spesies-spesies jamur *Candida* yaitu 310bp untuk *C. parapsilosis II*, 490bp untuk *C. albicans*, 672bp untuk *C. glabrata*, 777bp untuk *C. tropicalis* dan 880bp untuk *C. parapsilosis I*.

3. PCR multiplex adalah teknik amplifikasi DNA menggunakan beberapa primer dengan target DNA topoisomerase II.
4. DNA topoisomerase II adalah enzim yang dapat memicu DNA untuk melipat diri hingga tergulung sangat rapat. DNA topoisomerase II terdapat pada organisme eukariotik.

#### 4.4 Bahan Penelitian

##### 4.4.1 PCR Candida

1. <i>Distilled water</i>	15,5 $\mu$ l
2. 10x buffer	2,5 $\mu$ l
3. dNTP	2,5 $\mu$ l
4. Primer 1 ( <i>forward primer</i> )	1,5 $\mu$ l
5. Primer 2 ( <i>reverse primer</i> )	1,5 $\mu$ l
6. DNA polymerase (KOD Dash)	0,5 $\mu$ l
7. DNA (template)	1 $\mu$ l

##### 4.4.2 Buffer Gel Electrophoresis

1. Reagen TBE	30 cc
2. <i>Water for irrigation</i>	270 cc

Dicampur hingga homogen diambil 50 cc untuk agarose dan sisanya dimasukkan dalam mesin *electrophoresis*.

#### 4.4.3 Pembuatan Agarose 1,2%

- |                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| 1. Agarose                           | 0,6 gram |
| 2. <i>Buffer gel electrophoresis</i> | 50 cc    |

Dicampur dan dipanaskan hingga agarose larut (bening) kemudian dicetak pada cetakan yang sudah ditaruh sisir.

#### 4.4.4 Pembuatan *Ethidium Bromide*

- |                            |             |
|----------------------------|-------------|
| 1. <i>Aquades</i>          | 200 cc      |
| 2. <i>Ethidium bromide</i> | 100 $\mu$ l |

Dimasukkan dan dicampur pada botol biru yang ditutup aluminium foil.

#### 4.5 Instrumen Penelitian

1. *Thermal cycler*
2. Kulkas
3. Vortex

4. *Microcentrifuge*
5. *Micropipette*
6. *Timer*
7. *Electrophoresis gel*
8. Transilluminator UVP dengan kamera Polaroid
9. Pinset
10. Rak tabung ependorf
11. Foto meter

#### **4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Lokasi penelitian dilaksanakan di Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga Surabaya. Waktu penelitian dilaksanakan lebih kurang selama 1 bulan.

#### **4.7 Prosedur Penelitian**

##### **4.7.1 Penanaman koloni *Candida spp***

Penanaman koloni *Candida spp* pada CHROMAgar *Candida* dilakukan setelah disubkultur dua kali di Sabouraud *Dextrose* Agar. Satu koloni yeast digores di atas *plate* untuk membuat koloni terisolasi. Lalu diinkubasi

pada suhu 37°C tanpa CO<sub>2</sub> di dalam gelap. Hasilnya dibaca sesudah 48 jam dan dilihat warna koloni, morfologi koloni dan keberadaan halo yang jernih di sekitar koloni.

#### **4.7.2 Prosedur ekstraksi DNA dari kultur**

1. Disediakan *tube* 1,5 ml
2. *Glass bead* 0,5 ml dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml tersebut.
3. Ditambahkan 0,5 ml *distilled water* dimasukkan ke dalam *tube*.
4. Ose dipijarkan.
5. Beberapa koloni jamur diambil dan dimasukkan ke dalam *tube* tersebut.
6. Di-vortex selama 1 menit dan dilakukan selama 3-4 kali.
7. Dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm-14.000 rpm selama 10 menit.
8. Supernatan diambil sebanyak 0,2 ml atau 0,3 ml.
9. Kemudian dilakukan proses PCR.

### 4.7.3 PCR amplification

1. Sampel-sampel DNA diamplifikasi dalam campuran reaksi (12,5  $\mu$ l) yang mengandung 0,5  $\mu$ l *genomic DNA*, 12,5  $\mu$ l 10x *buffer*, 1,25 $\mu$ l dNTPs, 0,75  $\mu$ l *forward primer*, 0,75  $\mu$ l *reverse primer* dan 0,5  $\mu$ l *template DNA* serta 0,25  $\mu$ l KOD Dash *polymerase*.

2. Parameter siklus PCR adalah sebagai berikut:

Prapemanasan pada 96°C selama 2 menit; lalu 30 siklus untuk 96°C selama 30 detik, 57°C selama 3 detik dan 74°C selama 60 detik (Kanbe *et al.*, 2002).

### 4.7.4 Prosedur pengenceran produk PCR

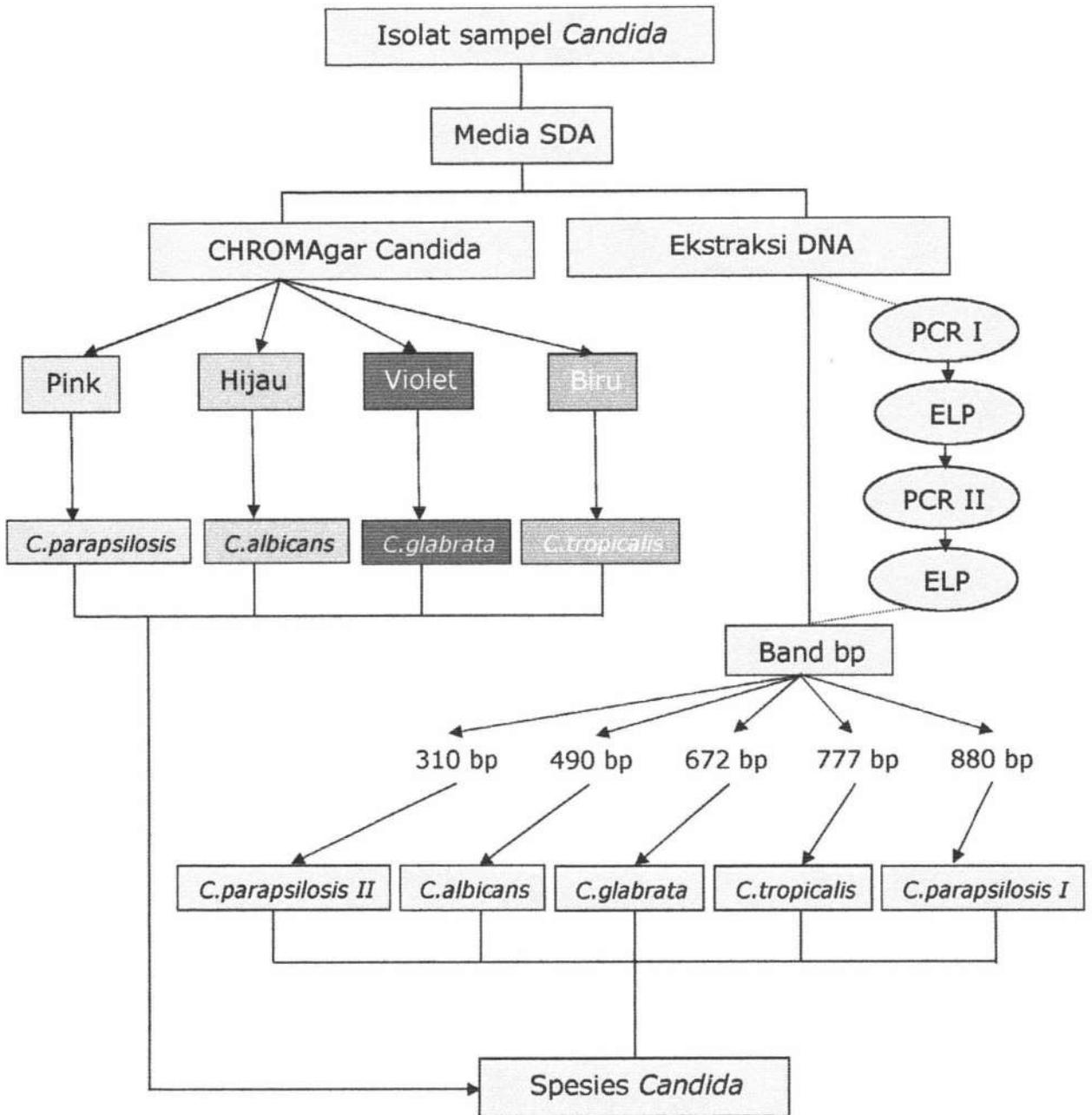
1. Diambil 1  $\mu$ l produk PCR.
2. Ditambahkan 49  $\mu$ l *distilled water*.
3. Dicampur.

#### 4.7.5 Prosedur *electrophoresis*

1. Agar yang sudah dicetak dimasukkan ke dalam mesin *Electrophoresis* yang sudah berisi buffer gel *electrophoresis* sampai garis batas.
2. Disediakan *parafilm*.
3. Diambil 10  $\mu$ l tinta marker dan dimasukkan pada agar, di baris pertama.
4. Pipet 2  $\mu$ l *loading buffer/loading dye* dimasukkan ke dalam *parafilm*.
5. Diambil 8  $\mu$ l produk PCR dan dicampurkan.
6. Diambil 8  $\mu$ l campuran produk dengan *loading dye* dan dimasukkan pada agar pada baris selanjutnya.
7. Bila terlihat ada gelembung berarti mesin tersebut sudah menyala.
8. Ditunggu *band* berjalan sampai 2 garis sebelum garis akhir.
9. Mesin dimatikan.
10. Nampan disiapkan.

11. Larutan *ethidium bromide* dituang ke dalam nampan.
12. Agar diambil dan diletakkan dalam nampan. Digoyang perlahan-lahan selama 20 menit.
13. Kemudian dicuci dengan air kran selama 15 menit sambil digoyang perlahan-lahan.
14. Agar diletakkan di atas transilluminator UVP.
15. Agar siap difoto dengan kamera Polaroid.

**BAGAN ALUR PENELITIAN**



**Keterangan:**

- SDA : Sabouraud Dextrose Agar
- PCR I : pra-amplifikasi
- PCR II : amplifikasi utama
- ELP : *Electrophoresis*

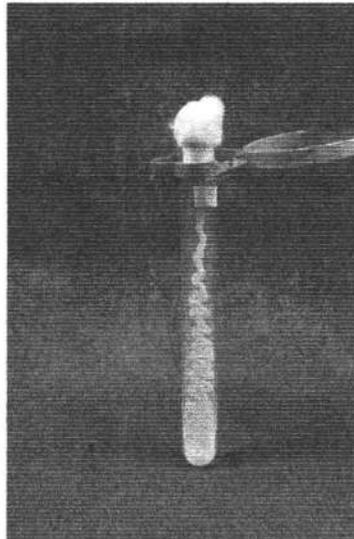
## BAB 5

### ANALISIS HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Data Penelitian

##### 5.1.1 Hasil penanaman koloni *Candida* spp pada CHROMAgar *Candida*

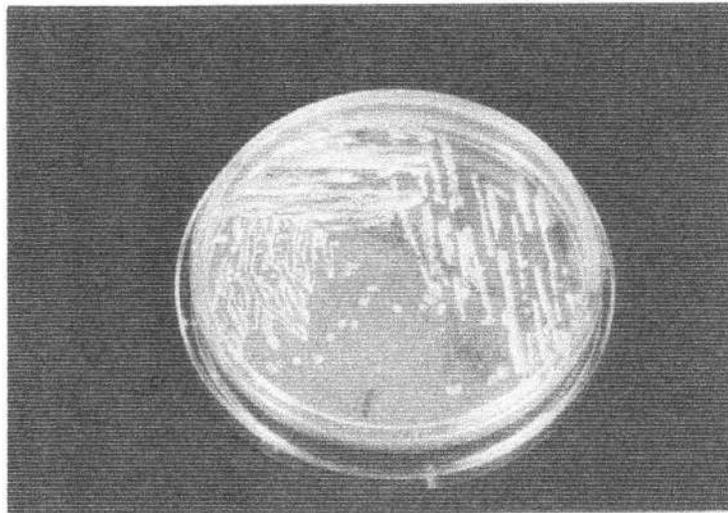
Dari isolate *Candida* spp yang berada dalam media SDA (Gambar 5.1) penanaman dilanjutkan ke media CHROMAgar *Candida* dengan hasil seperti pada Tabel 5.1 dan menunjukkan koloni berwarna-warni sesuai dengan spesies.



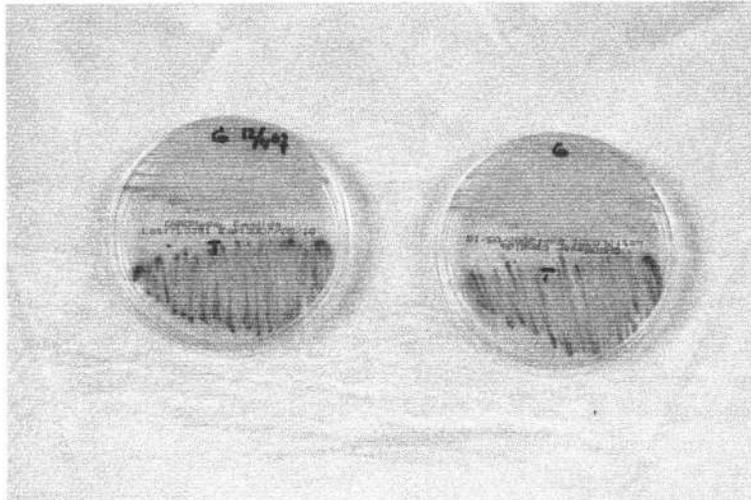
**Gambar 5.1** Isolat *Candida* pada media Sabouraud *Dextrose* Agar

Tabel 5.1 Hasil penanaman koloni *Candida* spp pada CHROMAgar Candida

No	Isolat <i>Candida</i> spp pada SDA	Warna Koloni CHROMAgar <i>Candida</i>	Spesies
1	RSUD3	Hijau	<i>C. albicans</i>
2	RSUD4	Hijau	<i>C. albicans</i>
3	RSUD5	Violet	<i>C. glabrata</i>
4	RSUD6	Hijau	<i>C. albicans</i>
5	BLK1	Hijau	<i>C. albicans</i>
6	BLK2	Hijau	<i>C. albicans</i>
7	BLK3	Biru	<i>C. tropicalis</i>
8	BLK4	Biru	<i>C. tropicalis</i>
9	BLK5	Biru	<i>C. tropicalis</i>
10	RSUD1	Hijau	<i>C. albicans</i>
11	RSUD2	Hijau	<i>C. albicans</i>
12	BLK6	Biru	<i>C. tropicalis</i>
13	BLK7	Violet	<i>C. glabrata</i>



**Gambar 5.2** Hasil penanaman koloni *C. albicans* pada CHROMAgar *Candida* koloni *C. albicans* berwarna hijau.

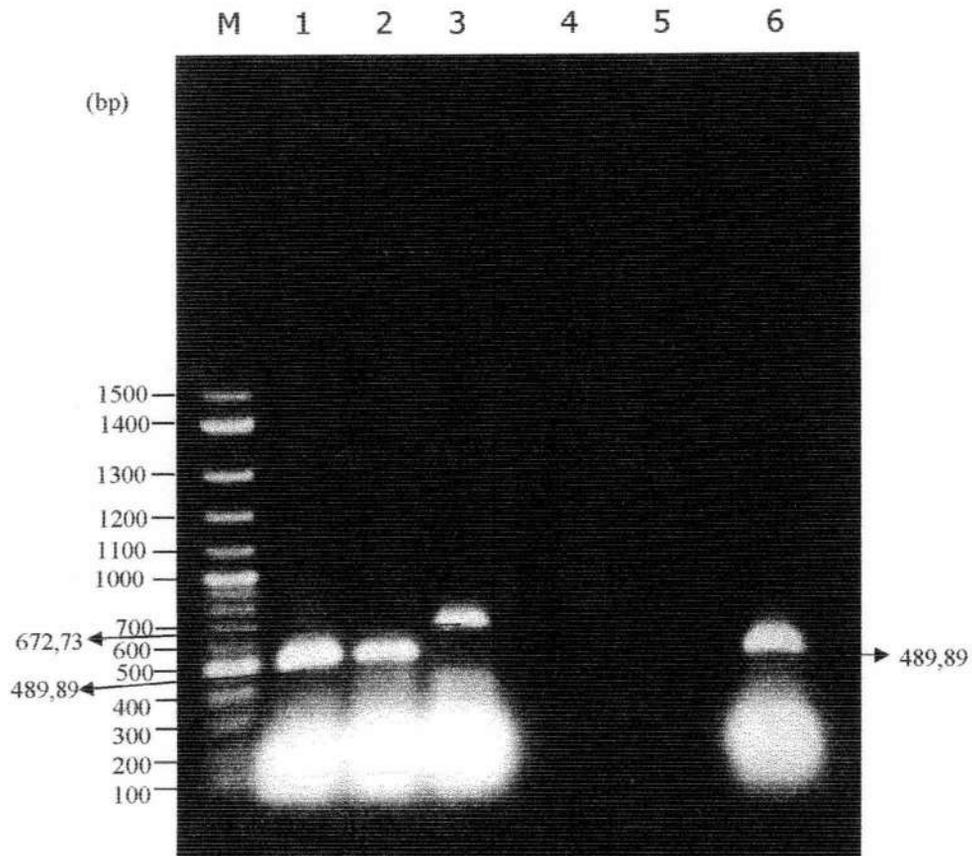


**Gambar 5.3** Hasil penanaman pada CHROMA agar Candida koloni *C. glabrata* berwarna violet, koloni *C. tropicalis* berwarna biru.

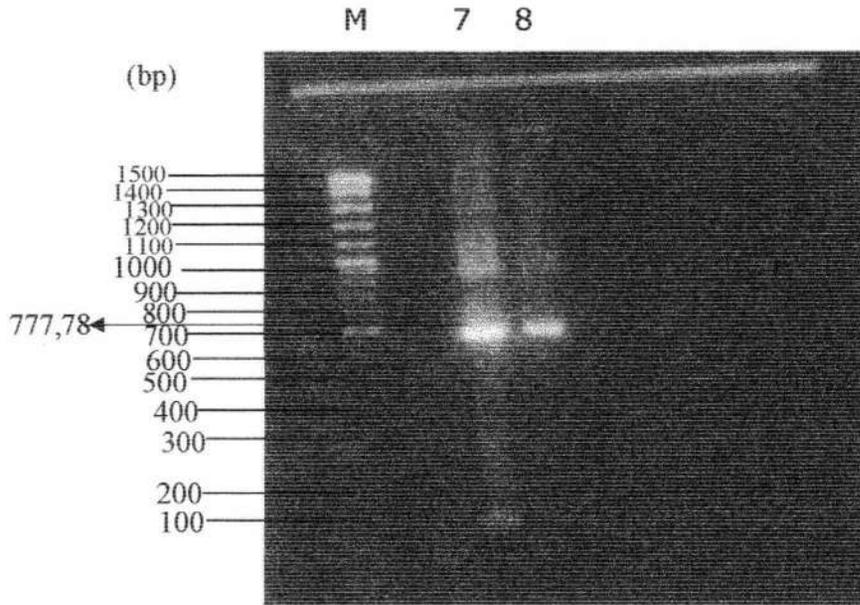
### **5.1.2 Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II dengan teknik PCR Multiplex**

Amplifikasi gen DNA topoisomerase II menggunakan sepasang primer (Forward Primer CDF28 dan Reverse Primer CDR148) dan kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi spesifik untuk gen DNA topoisomerase II menggunakan primer campuran spesifik yang dirancang sebagai PsVIc.

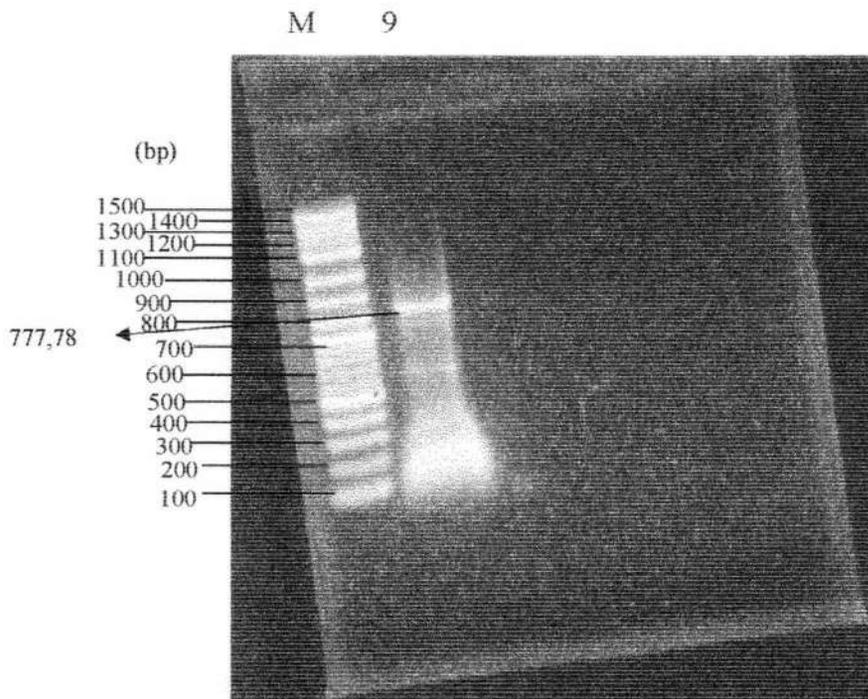
Parameter siklus PCR adalah sebagai berikut pra-pemanasan pada 96°C selama dua menit, denaturasi 96°C selama 30 detik, penempelan primer 57°C selama 3 detik



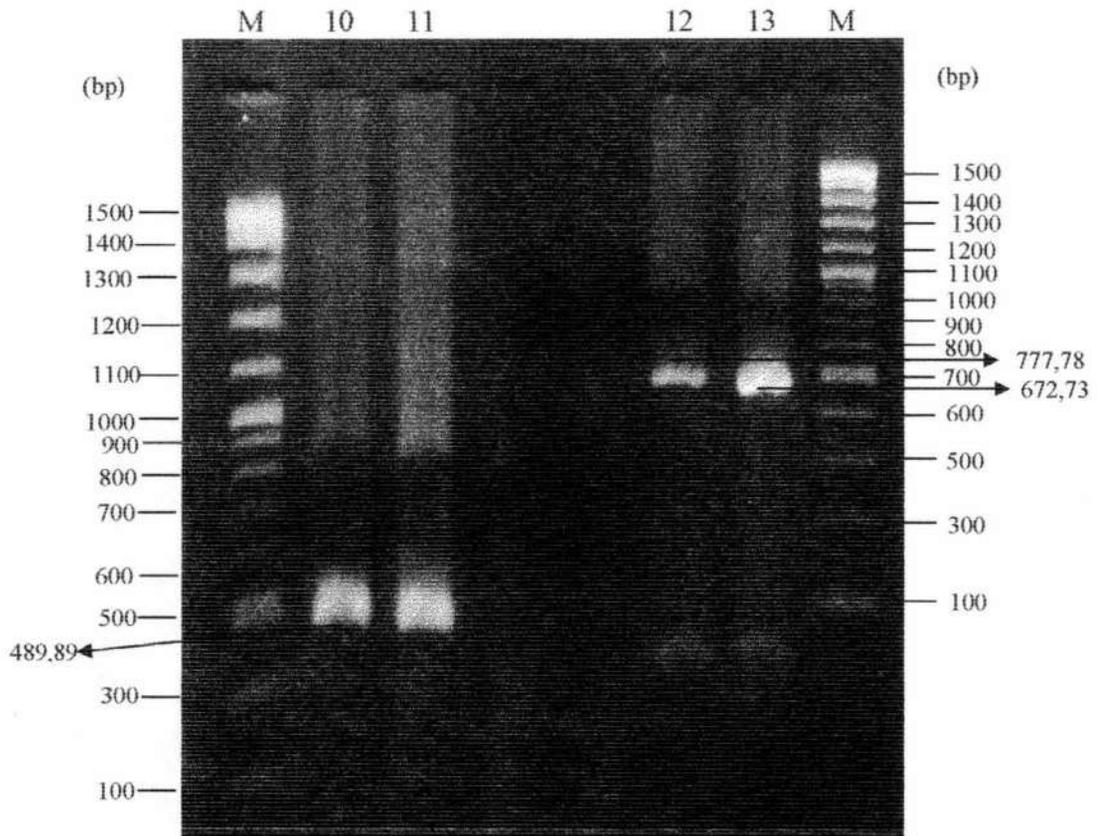
**Gambar 5.4** Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II dengan primer spesifik PsVIc. Lajur 1, 2 dan 6 menunjukkan *C. albicans* ukuran 489,89 bp. Lajur 3 menunjukkan *C. glabrata* dengan ukuran 672,73 bp.



**Gambar 5.5** Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II dengan primer spesifik PsVIc. Lajur 7 dan 8 menunjukkan *C. tropicalis* ukuran 777,78 bp.



**Gambar 5.6** Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II dengan primer spesifik PsVIc. Lajur 9 menunjukkan *C. tropicalis* ukuran 777,78 bp.



**Gambar 5.7** Hasil amplifikasi gen DNA topoisomerase II dengan primer spesifik PsVIc. Lajur 10 dan 11 menunjukkan *C. albicans* ukuran 489,89 bp. Lajur 12 menunjukkan *C. tropicalis* dengan ukuran 777,78 bp. Lajur 13 menunjukkan *C. glabrata* dengan ukuran 672,73 bp.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

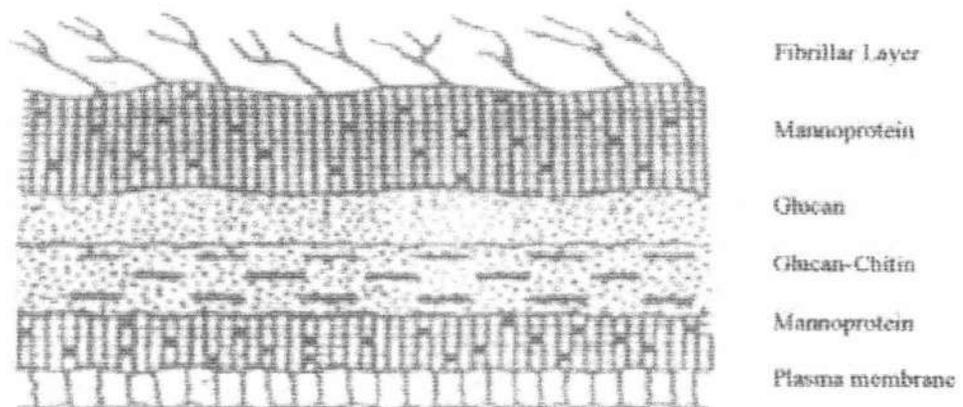
Penggunaan media CHROMAgar Candida didasarkan atas aktivitas enzim uniknya, yaitu  $\beta$ -N-acetylgalactosaminidase (Yucesoy and Marol, 2003) dan proline amino peptidase (Dignani *et al.*, 2003) yang memecah substrat chromogenic CHROMAgar Candida menghasilkan berbagai koloni yang berwarna-warni sesuai spesies masing-masing Candida.

Adanya enzim spesifik spesies tersebut menghasilkan koloni warna hijau untuk *C. albicans*, warna biru untuk *C. tropicalis*, warna violet untuk *C. glabrata* dan warna pink untuk *C. parapsilosis*. Penggunaan CHROMAgar Candida dianggap sebagai metode yang reliabel untuk identifikasi presuntif dari beberapa spesies Candida yang diisolasi.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan terlihat bahwa 13 isolat Candida pada SDA yang kemudian ditanam pada CHROMAgar Candida menunjukkan warna-warna sesuai spesies masing-masing, yaitu pada nomor 1, 2, 4, 5, 6, 10 dan 11 koloni berwarna hijau diidentifikasi sebagai *C. albicans*. Pada nomor 3 dan 13 koloni berwarna violet diidentifikasi sebagai *C. glabrata* dan nomor 7, 8, 9 dan 12 koloni berwarna biru diidentifikasi

sebagai *C. tropicalis*. Semua media CHROMAgar Candida yang ditanami tumbuh koloni yang berwarna-warni sesuai spesies.

Proses ekstraksi DNA menggunakan *glass bead* dimaksudkan untuk memecah sel Candida spesies. Hal ini didasarkan pada karakter dinding sel Candida spesies yang terdiri dari 5 lapisan yang berbeda dimana semua DNA kromosom disimpan dan terkemas dalam serat-serat kromatin (Tjampakasari, 2006).



**Gambar 6.1** Skema dinding sel *Candida spp* (Tjampakasari, 2006)

Beberapa kelebihan dari teknik PCR, antara lain sangat sensitif, komponen yang diperlukan sangat sedikit, tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu (Yuwono, 2006).

Pada reaksi PCR terdapat tiga tahapan program amplifikasi DNA, yaitu tahap denaturasi, tahap penempelan dan tahap

pemanjangan. Pada penelitian ini dilakukan prapemanasan dahulu pada 96°C selama 2 menit baru tahap denaturasi selama 96°C selama 30 detik dengan tujuan membuat ikatan hidrogen DNA *Candida* berubah dari untai ganda menjadi untai tunggal. Denaturasi ini menyebabkan DNA menjadi tidak stabil dan siap menjadi template bagi primer.

Tahap selanjutnya adalah penempelan, primer menempel pada bagian DNA templat yang komplementer urutan basanya. Ini dilakukan pada suhu 57°C selama 3 detik. Penempelan bersifat spesifik. Suhu yang tidak tepat menyebabkan tidak terjadinya penempelan atau primer menempel disembarang tempat.

Tahap ketiga adalah pemanjangan, suhu untuk proses pemanjangan adalah 74°C selama 60 detik. Pada tahap ini satu molekul DNA ganda akan berlipat jumlahnya menjadi dua molekul DNA.

Dengan PCR multiplex 30 siklus amplifikasi ditemukan sebanyak 11 isolat *Candida* diantara 13 isolat *Candida* pada SDA. Ke 11 isolat *Candida* tersebut berasal dari isolat *Candida* nomor: 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 dan 13. Sedangkan dua isolat *Candida*, yaitu nomor 4 dan 5 tidak terdeteksi seperti yang terlihat pada Tabel 5.2.

Ketigabelas isolat *Candida* memperlihatkan koloni warna-warni sesuai spesies saat ditanam di CHROMAgar *Candida*. Untuk identifikasi *Candida* sampai tingkat spesies dilakukan pra-amplifikasi menggunakan sepasang primer degenerasi yaitu CDF28/CDR148 yang akan mengamplifikasi pada tingkat genus *Candida* dan dilanjutkan dengan amplifikasi utama, pada amplifikasi utama ini digunakan primer campuran spesifik yaitu PsVIc, yang terdiri atas CABF094/CABR143 spesifik untuk *C.albicans* yang akan mengamplifikasi produk PCR pada 490 bp, CPP1F034/PPP1R122 spesifik untuk *C.parapsilosis I* mengamplifikasi produk PCR pada 310 bp, CPP2F038/PPP2R069 spesifik untuk *C.parapsilosis II* mengamplifikasi produk PCR pada 880 bp, CGBF035/CGBR102 spesifik untuk *C.glabrata* mengamplifikasi produk PCR pada 672 bp dan CTR2F049/CTR2R126 untuk *C.tropicalis* mengamplifikasi produk PCR pada 777 bp (Kanbe et al., 2002).

Pita DNA yang terdeteksi dalam PCR multiplex letaknya mendekati hasil-hasil amplifikasi pada teori-teori yang ada, yaitu *C.albicans* terdeteksi pada 489,89 bp, *C glabrata* 672,73 bp dan *C.tropicalis* 777,78 bp, sedangkan *C.parapsilosis I* dan *C.parapsilosis II* tidak terdeteksi hal ini sesuai dengan hasil CHROMAgar *Candida* yang tidak memperlihatkan warna pink

untuk *C. parapsilosis*. Hasil-hasil tersebut didasarkan atas jarak angka ukuran DNA pada *marker*. Jarak angka ukuran DNA pada *marker* panjangnya tidak selalu sama sehingga dibuat perhitungan kesetaraan antara panjang angka ukuran *marker* dengan besar molekul DNA. Perhitungan kesetaraan terdapat pada halaman lampiran. Tidak terdeteksinya isolat *Candida* nomor 4 dan 5 kemungkinan disebabkan oleh sumber daya manusia yang kurang terlatih, terdegradasinya DNA oleh enzim DNase sehingga sampel DNA mengalami degradasi cukup parah, penyimpanan sampel DNA harus pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  karena pada suhu tersebut enzim DNase menjadi tidak aktif.

Selain ketiga hal tersebut diatas juga bisa disebabkan tidak menempelnya primer pada tahap penempelan saat proses PCR multiplex. Untuk mengetahui apakah primer benar-benar menempel pada bagian DNA template yang komplementer urutan basanya digunakan metode sekuensing DNA. Dalam sekuensing DNA akan menghasilkan sekuens DNA melalui nukleotida-nukleotida penyusun DNA dari masing-masing spesies DNA *Candida* (Kamiya, 2005).

Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil sensitivitas PCR terhadap CHROMAgar *Candida* adalah sebesar 84,61%. Dengan sensitivitas tersebut berarti proporsi hasil

positif pemeriksaan *Candida spp* dengan primer campuran spesifik PsVIc menggunakan PCR multiplex yang memperlihatkan hasil positif adalah sebesar 84,61%.

Kemudian dilakukan penghitungan Nilai Ramal Positif dengan hasil 100%, yang artinya prediksi proporsi pemeriksaan *Candida spp* dengan primer campuran spesifik PsVIc menggunakan PCR multiplex yang memperlihatkan hasil positif adalah 100%. Nilai Ramal Negatif sebesar 0% berarti prediksi proporsi pemeriksaan *Candida spp* dengan primer campuran spesifik PsVIc adalah sebesar 0%. Sedangkan Nilai Akurasi yang diperoleh adalah 84,61%. Dengan tes Fisher's Exact didapatkan nilai  $p=1$  yang berarti tidak ada perbedaan signifikan antara CHROMAgar *Candida* dengan PCR multiplex dalam mengidentifikasi *Candida spp* hingga tingkat spesies menggunakan primer campuran spesifik PsVIc. Tes Fisher's Exact digunakan untuk jumlah sampel yang sedikit.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan bahwa primer campuran spesifik PsVIC terhadap DNA topoisomerase II dengan teknik PCR multiplex dapat digunakan untuk identifikasi *Candida* tingkat spesies, dengan sensitivitas 84,61%. Spesies *Candida* yang berhasil diidentifikasi dengan primer campuran spesifik PsVIC adalah *C. albicans*, *C. glabrata* dan *C. tropicalis*. Sedangkan *C. parapsilosis I* dan *C. parapsilosis II* belum dapat dipastikan karena pada penelitian ini tidak didapatkan isolat *C. parapsilosis*.

#### 7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian perlu dipertimbangkan saran sebagai berikut:

1. Pengerjaan PCR multiplex harus segera dilaksanakan setelah dilakukan ekstraksi DNA, karena enzim-enzim proteolisis yaitu DNase akan mendegradasi DNA *Candida*.

2. Untuk memastikan primer campuran spesifik PsVIc menempel pada sekuens nukleotida, digunakan metode lanjutan yaitu sekuensing DNA.
3. Tes morfologi dengan menggunakan media CHROMAgar Candida dapat memberikan hasil hingga tingkat spesies Candida.
4. Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan terhadap spesies jamur *C. parapsilosis*.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Brock TD, Madigan MT, 1991. *Biology of Microorganisms*, Six Edition. New Jersey: Prentice-Hall International Inc., p 136.
- Brown TA, 2002. *Genomes Second Edition*. Oxford: BIOS Scientific Publisher Ltd., pp 388-389.
- Dignani MC, Solomkin J, Anaissie EJ, 2003. *Candida. Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp 195-203.
- Egan ME, Lipsky MS, 2003. *Vaginitis. PMS & HIV/AIDS*. <http://situs.mitrinti.org/pmshivaid/okt/2003/pms05.htm>.
- Enweani IB, Gugnani HC, Okobia R, Ojo SB, 2001. Effect of Contraceptives on the Prevalence of Vaginal Colonization with *Candida* Species in Edo State, Nigeria. *Revista Iberoamericana de Micologia* 18: 171-173.
- Harlina, 2000. *Respon Immunopatobiologis Mukosa Mulut untuk Mengungkap Immunopatobiogenesis Infeksi *Candida albicans* pada Penderita Diabetes Mellitus*. Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T, 2005. Epidemiological Study of *Candida* Species in Cutaneous Candidiasis Based on PCR Using a Primer Mix Specific for the DNA

- Topoisomerase II Gene. *Journal of Dermatological Science* 37: 21-28.
- Kanbe T, Arishima T, Horii T, Kikuchi A, 2003. Improvements of PCR-Based Targeting the DNA Topoisomerase Gene to Determine Major Species of the Opportunistic Fungi *Candida* and *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol. Immunol.* 47(9): 631-638.
- Kanbe T, Honi T, Arishima T, Ozeki M, Kikuchi A, 2002. PCR-based Identification of Pathogenic *Candida* Species Using Primer Mixed Specific to *Candida* DNA Topoisomerase II Genes. *Yeast* 19: 973-989.
- Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A, 2002. Identification of the Pathogenic *Aspergillus* Species by Nested PCR Using a Mixture of Specific Primers to DNA Topoisomerase II Gene. *Microbiol. Immunol.* 46(12): 843.
- Kresno SB, 2001. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium Edisi 4*. Jakarta: Balai Penerbit FK UI, hlm 426-428.
- Lasagni A, Carlone N, Rizzi S. *Mycology Ultramicrographs: Dermatophytes-Ascomycetes-Candida*. Milan: Farmitalia Carlo Erba, p 59.

- Muladno, 2002. Teknologi Rekayasa Genetika. Edisi Pertama. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda, hlm 61-62.
- Patmini E, 2004. Apa yang Perlu Kita Ketahui tentang AIDS. Buletin Melsa 41. <http://buletin.melsa.net.id/news/aids.html>.
- Rippon JW, 1977. Pathogenesis and Epidemiology of Opportunistic Micotic Infection: A Review. Amer.J.Med. Technol 43: 226.
- Suprihatin SD, 1982. Candida dan Kandidiasis pada Manusia. Jakarta: FK UI, hlm 1-29.
- Tjampakasari CR, 2006. Karakteristik Candida albicans. Cermin Dunia Kedokteran No. 151.
- Yang CW, Barkham TMS, Chan FY, Wang Y, 2003. Prevalence of Candida Species, Including Candida dubliniensis, in Singapore. Journal of Clinical Microbiology Vol. 41, No. 1: 472-474.
- Yucesoy M, Marol S, 2003. Performance of CHROMAgar Candida and BIGGY agar for Identification of Yeast Species. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials V.2: 8.
- Yuwono T, 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Yogyakarta, Penerbit Andi, hlm: 1-5.

## LAMPIRAN 1

Perhitungan kesetaraan jarak angka ukuran molekul DNA pada marker dengan besar molekul DNA

- ***C. albicans***

18 mm  $\sim$  200 bp

1mm  $\sim$   $1/18 \times 200$  bp = 11,11 bp

500 bp - 11,11 bp = 489,89 bp

→ Panjang dari 300 bp ke 500 bp pada marker = 18 mm.

besar ukuran dari 300 bp ke 500 bp = 200 bp

letak DNA hasil penelitian = 1 mm

besar ukuran DNA *C. albicans* = 489,89 bp

- ***C. glabrata***

11 mm  $\sim$  100 bp

3 mm  $\sim$   $3/11 \times 100$  bp = 27,27 bp

700 bp - 27,27 bp = 672,73 bp

→ Panjang dari 600 bp ke 700 bp pada marker = 11 mm.

besar ukuran dari 600 bp ke 700 bp = 100 bp

letak DNA hasil penelitian = 3 mm

besar ukuran DNA *C. glabrata* = 672,73 bp

- ***C. tropicalis***

9 mm ~ 100 bp

2mm ~  $2/9 \times 100 \text{ bp} = 22,22 \text{ bp}$

800 bp - 22,22 bp = 777,78 bp

→ Panjang dari 700 bp ke 800 bp pada marker = 9 mm.

besar ukuran dari 700 bp ke 800 bp = 100 bp

letak DNA hasil penelitian = 2 mm

besar ukuran DNA *C. tropicalis* = 777,78 bp

## LAMPIRAN 2

## Perhitungan sensitivitas

		Condition As determined by "Gold" standard		
		<i>True</i>	<i>False</i>	
Test outcome	<i>Positive</i>	True Positive	False Positive	→ Positive Predictive Value
	<i>Negative</i>	False Negative	True Negative	→ Negative Predictive Value
		↓ Sensitivity	↓ Specificity	Accuracy

		CHROMAgar Candida		
		<i>True</i>	<i>False</i>	
PCR	<i>Positive</i>	11	0	→ 100%
	<i>Negative</i>	2	0	→ 0%
		↓ 84,61%		84,61%

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{number of True Positives}}{\text{number of True Positives} + \text{number of False Negative}}$$

$$\text{Sensitivitas} = \frac{11}{11 + 2} = 84,61\%$$

$$\text{PPV} = \frac{\text{number of True Positives}}{\text{Number of True Positives} + \text{number of False Positives}}$$

$$\text{Nilai Ramal Positif} = \frac{11}{11+0} = 100\%$$

$$\text{NPV} = \frac{\text{number of True Negatives}}{\text{Number of True Negatives} + \text{number of False Negatives}}$$

$$\text{Nilai Ramal Negatif} = \frac{0}{0+2} = 0\%$$

$$\text{Accuracy} = \frac{\text{number of True Positives} + \text{number of True Negatives}}{\text{number of True Positives} + \text{False Positives} + \text{False Negatives} + \text{True Negatives}}$$

$$\text{Akurasi} = \frac{11+0}{11+0+2+0} = 84,61\%$$

LAMPIRAN 3

Tes Fisher's Exact

		CHROMAgar Candida		Total
		+	-	
PCR	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	n

		CHROMAgar Candida		Total
		+	-	
PCR	+	11	0	11
	-	2	0	2
	Total	13	0	13

$$P = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{n! a! b! c! d!}$$

$$P = \frac{11! 2! 13! 0!}{13! 11! 0! 2! 0!}$$

$$P = \frac{39916800 \times 2 \times 6227020800 \times 1}{6227020800 \times 39916800 \times 1 \times 2 \times 1}$$

$$P = \frac{4,971254877^{17}}{4,971254877^{17}} = 1$$