

PENGUNAAN MULTIPLEKS POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) DALAM MENDETEKSI JAMUR DERMATOFIT

The Use Multipleks Polymerase Chain Reaction (PCR) In Detection Of Dermatophytes

Aan Yulianingsih¹, Rizalinda Sjahril², Firdaus Hamid²

¹ Jurusan Analis Kesehatan, Poltekkes Ternate

² Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin

*) Email Korespondensi : aanyulianingsih@rocketmail.com

ABSTRACT

Dermatophytes are fungi that belong to three genera: Epidermophyton, Trichophyton and Microsporum. This study aims to identify the causative dermatophytosis in patient using Multiplex PCR. This observational laboratory research was performed on 50 sample collected from several clinic and elementary schools in the city of Makassar. The results showed Microsporum spp. (54%) dermatophyte was found. Thus we suggest that this laboratory tehniqe is used to confirm the etiology of patients with dermatohytosis.

Keywords : *Dermatophytes, Fungi, Multipleks PCR*

ABSTRAK

Dermatofitosis adalah salah satu jamur yang terdiri dari tiga genus: *Epidermophyton*, *Trichophyton* dan *Microsporum*. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi jenis jamur dermatofit dengan metode Multipleks PCR yang ditemukan pada penderita dermatofitosis di Kota Makassar. Penelitian observasi laboratorium dengan menguji 50 sampel yang diperoleh dari beberapa klinik dan sekolah dasar di Makassar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Microsporum spp.* terbanyak teridentifikasi (54%). Kami menyarankan teknik Multipleks PCR ini digunakan untuk konfirmasi jenis dermatofit sehingga pengobatan dapat lebih cepat dan tepat.

Kata Kunci : Dermatofit, Jamur, Multipleks PCR

PENDAHULUAN

Dermatofita adalah suatu kelompok taksonomi jamur yang menyerang kulit superfisial. Kemampuannya untuk membentuk ikatan molekuler terhadap keratin dan menggunakannya sebagai sumber makanan menyebabkan mereka mampu berkolonisasi pada jaringan keratin, termasuk juga pada stratum korneum epidermis di inguinal dan rambut pubis (Adiguna, 2011).

Dermatofit penyebab paling umum dari mikosis superfisial pada manusia dan hewan, yang mempengaruhi jutaan orang setiap tahun. Diperkirakan risiko seumur hidup yang tertular infeksi dermatofit adalah 10-20% (Garg *et al.*, 2009).

Pada tahun 2013, terdapat 153 kasus dermatofitosis yang berkunjung ke Poliklinik Kulit dan Kelamin RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado (Sondakh *et al.*, 2016). Sedangkan di Makassar sendiri menurut penelitian yang dilakukan oleh Paramata & Massi (2009) menunjukkan bahwa dari 60 sampel squama yang diperoleh terdapat 50 sampel yang menunjukkan dermatofita.

Klasifikasi dan identifikasi dermatofit yang dilakukan saat ini sesuai dengan manifestasi klinis, pemeriksaan *gross* koloni dari kultur, pemeriksaan mikroskopis dari makro dan mikro-konidia, karakteristik biokimia. Namun, identifikasi ini memakan waktu dan dapat menimbulkan kesulitan bagi yang bukan ahlinya dalam mengidentifikasi morfologi koloni, bahkan mungkin strain yang sama menunjukkan morfologi koloni yang beragam, membuat identifikasi organisme penyebabnya lebih sulit. (Kim *et al.*, 2011).

Untuk menjawab kekurangan dan keterbatasan dari sistem identifikasi ini, maka sejumlah penelitian baru-baru ini dilaporkan untuk mengembangkan sistem yang lebih cepat dan lebih tepat dengan bantuan berbagai teknik biologi molekuler, salah satunya dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang cukup berguna dan dapat dilakukan dengan cepat di laboratorium umum. Namun, antara spesies individu dermatophyta, perbedaan ITS1-2 (*Internal Transcribed Spacer 1-2*), 18S RNA (*ribonucleic acid*) ribosom, dan 28S RNA ribosom tidak signifikan sehingga membuat pengembangan primer spesies yang spesifik sangat sulit. Penggunaan metode sekuensing DNA (*deoxyribonucleic acid*) PCR dapat menghasilkan hasil yang sangat handal. Namun, aplikasi klinis sering

terhambat oleh lamanya waktu yang dibutuhkan dan biaya (Lee, 2010).

Multipleks PCR dalam mengidentifikasi dermatofit dapat mengidentifikasi 11 spesies (Kim *et al.*, 2011).

Berdasarkan hal tersebut diatas maka penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi jenis jamur dermatofit yang ditemukan pada penderita dermatofitosis di Kota Makassar dengan metode Multipleks PCR.

METODE

Desain, tempat dan waktu

Penelitian dilakukan di Makassar dengan sampel diperoleh dari pasien di beberapa klinik dan Beberapa Sekolah Dasar di Makassar meliputi penentuan tipe klinik dermatofitosis dan pemeriksaan kerokan kulit KOH 10-20%. Teknik PCR dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin dan dilakukan pada bulan Maret-Juli 2016. Jenis penelitian yang digunakan adalah metode observasional dilaboratorium.

Bahan dan Alat

Seperangkat alat PCR dan alat elektroforesis gel. Hasil kerokan jamur dari pasien dermatofitosis, KOH 10-20%, primer PCR (ITS 1 dan ITS 4, ITS 1-2, 18s RNA, 28s RNA), *Malt ekstrak Agar*, alcohol, Larutan NaCl, natrium asetat, fenol, etanol 70%, buffer TE, aquades, buffer TBE, zat warna *etidium bromide*, *trifosfat deoxynucleoside* (dATP, dCTP, dTTP), Taq Polymerase, DNA template, buffer Tris-Borat EDTA, TBE, Bromphenol blue, Kappa master mix, nuclease free water.

Langkah-langkah Penelitian

1. Identifikasi dengan metode KOH

Penderita yang secara klinis didiagnosis dermatofitosis dikerok pada bagian lesi kulit dengan menggunakan skapel kemudian ditampung di objek glass yang telah ditetesi KOH 10-20%. Objek glass ditutup dengan deck glass dan dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa objektif 10x untuk mengetahui adanya hifa dan spora

2. Ekstraksi DNA

sampel kerokan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, kemudian dilakukan ekstraksi DNA sesuai dengan petunjuk teknis yang terdapat pada kit ekstraksi DNA.

3. *Multipleks* PCR

Primer yang digunakan yaitu ITS 1-2 (forward: ATCATTAACGCGGCAGGC-reverse: TGGCCACTGCTTTTCGG), 18s RNA (forward: AAG TTG GGT CAA ACT CGGT- reverse: TGA TCC TTC CGC AGG TT) dan 28s RNA (forward: ACA GGG ATT GCC CCA GTA- Reverse: CTT GTT CGC TAT CGG CTC). Campuran reaksi amplifikasi PCR diambil sebanyak 25µl dengan enzim Kappa sebanyak 12,5 µl, MgCl₂ 0,5 µl, primer forward 1 µl, primer reverse 1 µl dan produk DNA 10 µl. Untuk ITS 1 dan 2, kondisi reaksi, sebagai berikut: 5 menit denaturasi pada suhu 94 °C, 30 detik annealing pada 60 °C, dan satu menit ekstension pada 72 °C. Seluruh proses diulang untuk 34 siklus, dengan ekstensi akhir pada 72 °C selama 10 menit. Kondisi PCR untuk 28S RNA adalah, sebagai berikut: 7 menit denaturasi pada 94°C, 30 detik annealing pada 50 °C, dan 1 menit ekstension pada 72 °C. Seluruh proses diulang untuk 34 siklus, dengan ekstensi akhir pada 72 °C selama 10 menit. Kondisi PCR dari 18S ribosom RNA sebagai berikut: 7 menit denaturasi pada 94 °C, 1 menit annealing di 57,5 °C, dan 1 menit ekstension pada 72 °C. Seluruh proses diulang untuk 34 siklus, dengan ekstensi akhir pada 72 °C selama 10 menit. DNA diamplifikasi diamati pada 2% (w / v) gel agarosa di TAE penyangga.

4. Elektroforesis Gel agarosa

Untuk mengetahui hasil amplifikasi DNA dilakukan proses elektroforesis terhadap produk PCR pada gel agarosa 2% dan perangkat elektroforesis dijalankan dengan mengalirkan aliran listrik 100 Volt () 400 mA selama 90 menit.

Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh dikelompokkan berdasarkan tujuan dan jenis data kemudian di analisis dengan menggunakan tabel 2x2. Hasil analisis akan ditampilkan dalam bentuk tabel disertai penjelasan.

HASIL

Pengumpulan sampel dilakukan di Balai Kesehatan Kulit, Kelamin dan Kosmetik, Kartini medical center dan Beberapa Sekolah Dasar yang berada di Kota Makassar hingga jumlah sampel mencukupi 50. Teknik PCR dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin. Pada tabel 1 dilihat bahwa sebanyak 27 penderita (54%) diderita oleh laki-laki sedangkan

perempuan sebanyak 23 penderita (46%). Dari segi umur sebanyak 23 penderita diderita oleh umur 0-18 tahun, sedangkan umur 19-45 tahun sebanyak 19 penderita dan umur >45 tahun sebanyak 8 penderita (Tabel 2). Hasil amplifikasi metode Multipleks PCR didapatkan hasil terbanyak yaitu *Microsporum spp.* yaitu 27 sampel kemudian *dermatofit* jenis lainnya (diluar 11 spesies) sebanyak 10 sampel lalu *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* dan *Microsporum audouinii* masing-masing sebanyak 4 sampel, *Microsporum vulvum* sebanyak 3 sampel dan *Trichophyton tonsurans* dan *Microsporum gypseum* masing-masing sebanyak 1 sampel (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa dermatofitosis lebih banyak diderita oleh laki-laki dibandingkan perempuan. Hal ini mungkin disebabkan karena laki-laki memiliki aktifitas yang lebih banyak dan berat sehingga lebih mudah berkeringat sehingga peluang untuk menderita dermatofit lebih besar dibandingkan perempuan. Hal ini sejalan dengan yang dikatakan oleh Verma & Heffernan (2008), bahwa laki-laki 3x lebih sering menderita dermatofit dibandingkan perempuan, tapi hal tersebut tidak dapat dijadikan gambaran untuk keseluruhan populasi. Hal ini dapat disebabkan tidak seimbang komposisi jenis kelamin sampel.

Dari 50 sampel dapat dilihat distribusi penderita dermatofit lebih banyak diderita pada usia produktif yaitu 17-45 tahun. Data ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Riani (2008), dimana usia produktif lebih beresiko menderita dermatofitosis dibandingkan usia anak-anak dan usia tua. Hal ini mungkin disebabkan karena usia produktif mempunyai faktor predisposisi, misalnya mereka bekerja di pekerjaan basah, trauma, dan banyak berkeringat, sehingga resiko untuk menderita dermatofit lebih besar dibandingkan dengan kelompok umur lainnya. Hal ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Wahdini *et al* (2015) dimana kelompok usia produktif sangat rentan menderita dermatofitosis karena memiliki aktivitas yang paling tinggi sehingga banyak berkeringat.

Dari 50 sampel kerokan kulit yang kami peroleh dari Balai Kesehatan Kulit, Kelamin dan Kosmetik, kartini medical center dan Beberapa Sekolah Dasar yang berada di

Kota Makassar yang selanjutnya di amplifikasi dengan menggunakan metode Multipleks PCR didapatkan hasil terbanyak adalah *Microsporum spp.* (54%) kemudian dermatofit (diluar 11 spesies) sebanyak 20%. Metode Multipleks PCR ini mampu mendeteksi 11 spesies dermatofit yaitu *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum audouinii*, *Trichophyton violeceum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes var. mentagrophyte*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophyte var. interdigitale*, *Trichophyton verrocosum*, *Microsporum gypseum*, dan *Microsporum fulvum* (Kim *et al.*, 2011). Sedangkan spesies dermatofit lainnya diantaranya *T.megninii*, *T.concentricum*, *M.ferrugineum*, *T. schoenleinii* dapat di amplifikasi dengan ukuran pita yang tidak khas untuk spesies tersebut (Kurniati & Rosita, 2008), Keunggulan *multiplex* PCR bila dibandingkan dengan metode PCR lainnya, yaitu adanya kontrol internal dari amplifikasi beberapa fragmen sekaligus. Hal ini berfungsi untuk mengetahui adanya hasil negatif palsu. Reaksi dapat dikatakan negatif atau gagal apabila seluruh produk tidak tampak pada visualisasi. Bila hanya satu atau beberapa produk saja dari seluruh fragmen yang di amplifikasi tidak tampak, dapat dikatakan hasil adalah negatif palsu, *Multiplex* PCR lebih mampu mengindikasikan kualitas *template* DNA dibandingkan pada PCR tunggal. Penurunan kualitas *template* DNA akan menunjukkan pita-pita panjang lebih lemah dibandingkan yang pendek, Efisiensi biaya dan waktu persiapan bila dibandingkan dengan *multiplex* tunggal, *Multiplex* PCR merupakan teknik yang dapat dipilih bila ingin mengeluarkan biaya serta menggunakan sampel yang relatif sedikit.

KESIMPULAN

Dengan metode Multipleks PCR didapatkan hasil terbanyak yaitu *Microsporum spp.* (54%) pada sampel kerokan kulit pasien dermatofitosis (KOH +).

SARAN

Berdasarkan penelitian ini kami menyarankan diperlukan penelitian lebih lanjut pada populasi yang berbeda yaitu selain Kota Makassar, diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap Multipleks PCR dengan menggunakan primer yang berbeda dan Pihak laboratorium dapat menggunakan

amplifikasi PCR untuk konfirmasi jenis dermatofit karena hasilnya dapat lebih cepat dan spesifik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami ucapkan kepada pihak Balai Kesehatan Kulit, Kelamin dan Kosmetik, Kartini medical center serta Beberapa Sekolah Dasar yang berada di Kota Makassar yang telah mengizinkan kami untuk mengambil sampel di instansi mereka serta pihak laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Pendidikan UNHAS yang telah membantu kami dalam melakukan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiguna MS. 2011. *Update Treatment In Inguinal Intertrigo And Its Differential Diagnosis*. Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. 309-333
- Edward M. C. & Gibbs R.A. 1994. *Multiplex PCR: advantages, development, and applications*. *Genome Res.* 3: 65-75.
- Garg J. *et al.* 2009. *Rapid Detection of Dermatophytes From Skin and Hair*. *BMC Res Notes.* 2:60-65
- Kim. *et al.* 2011. *Identification Of Dermatophytes Using Multiplex Polymerase Chain Reaction*. Departement Of Dermatology. Konkuk Univesity School Of Medicine, Seoul, Korea. 23;3
- Kurniati & Rosita C. 2008. *Etiopatogenesis Dermatofitosis*. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit Dan Kelamin FK UNAIR*. Surabaya, 20, 243-50
- Lee YW. 2010. *Molecular analysis for identification and classification of dermatophytes*. *Korean J Dermatol.* 48:82.
- Paramata N.R. & Massi N. 2009. *The Comparasion Of Sensitivity Test Of Itraconazole Agent The Causes Of Dermatophytosis In Glabrous Skin In Makassar*. Makassar: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
- Riani E. 2008. *Hubungan Antara Karakteristik Demografi, Gaya Hidup dan Perilaku Pasien Puskesmas di Jakarta Selatan Dengan Dermatofitosis*. Vol.2:2
- Sondakh, Cyndhi. *et al.* 2016. *Profil Dermatofitosis di Poliklinik Kulit dan Kelamin RSUP Prof. Dr. R.D.*

- Kandou Manado priode Januari-Desember 2013. Jurnal e-Clinic (eCI), Volume 4 nomor 1*
- Sopiyudin D.H. 2013. *Besar Sampel dan Cara Pengambilan Sampel.* Jakarta:Salemba Medika
- Verma S. & Heffernan M.P. 2008. *Superfisial Fungal Infection: Dermatophytosis, Onychomycosis, Tinea Nigra, Piedra.* Dalam: Wolff, K. (eds). Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. Vol.II. Ed.7. United States: Mcgraw-Hill, 1807-1821
- Wahdini, M. et al. 2015. *Karakteristik Pasien dan Spesies Dermatofita Penyebab Tinea Kruris di Rumah Sakit Umum Daerah Gunung Jati Cirebon Jawa Barat.* Global Medical and Health Communication. Vol 3;2.

Tabel 1. Data Demografi berdasarkan Jenis Kelamin

Jenis Kelamin	Jumlah	%
Laki-laki	27	54 %
Perempuan	23	46 %
Total	50	100 %

Tabel 2. Data Demografi berdasarkan Umur

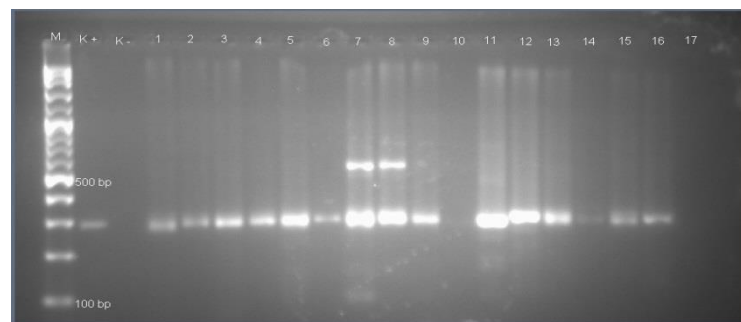
Umur	Jumlah	%
<17 tahun	23	46 %
17-45 tahun	24	38 %
>40 tahun	2	16 %
Total	50	100 %

Tabel 3. Hasil PCR dengan menggunakan metode Multipleks PCR

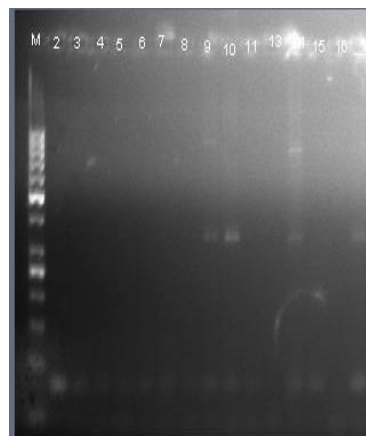
Spesies	Jumlah	%
<i>Microsporum spp.</i>	27	54 %
<i>Microsporum audouinii</i>	4	8 %
<i>Microsporum vulvum</i>	3	6 %
<i>Microsporum gypseum</i>	1	2 %
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	4	8 %
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1	2 %
Dermatofit spesies lain (diluar 11 spesies)	10	20 %
Total	50	100 %



a. Primer ITS 1-2



b. Primer 28s



c. Primer 18s

Gambar 1. a. Primer ITS1-2, b. Primer 28s RNA, c. Primer 18s RNA, M=marker