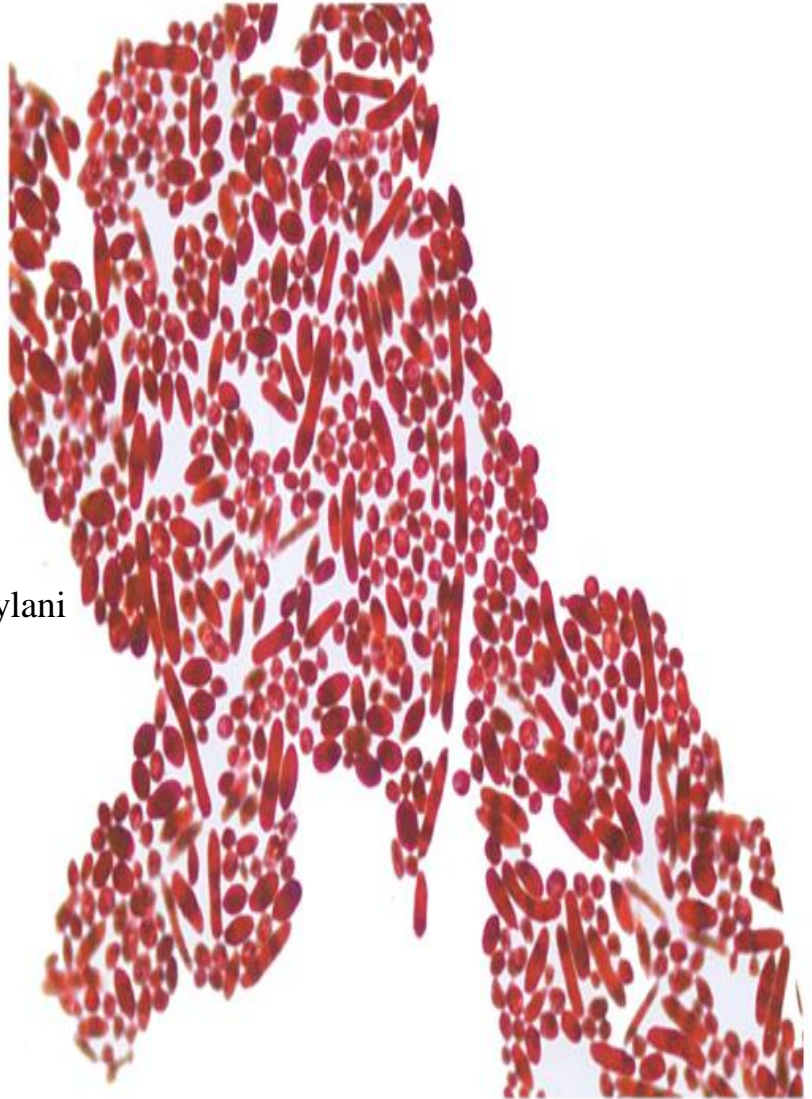


MENELISIK CANDIDA ALBICAN : MOLEKULAR DAN MORFOLOGI

Vita Meylani



MEDIA SARANA SEJAHTERA

MENELISIK CANDIDA ALBICAN : MOLEKULAR DAN MORFOLOGI

Penulis :

Vita Meylani

ISBN : 9-786239-646691

Editor : HAFID ZAKARIYA

Desain sampul dan Tata Letak : Muhammad Yusuf

Penerbit :

CV. Media Sarana Sejahtera

Redaksi :

Jl. Krakatau No. 21 A Banaran

Grogol Sukoharjo - Jawa Tengah

Cetakan I ,No.207/JTE/ 2021

Hak cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun tanpa ijin tertulis dari penulis.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirrobbilalamiien...Puja dan puji senantiasa tercurah kepada pemilik segala sumber ilmu dan kehidupan. Karena tidak ada keluhuran ilmu yang dimiliki manusia yang bukan atas kehendak-Nya. Segala syukur tak lupa penulis panjatkan untuk selesainya Buku Menelisik *Candida albicans*: Molekular dan Morfologi. Buku ini merupakan buah lain dari proses penulis menyelesaikan studi di Kampus Biru Universitas Gadjah Mada. Haru biru meyelesaikan studi menjadi *moment* yang tidak akan pernah penulis lupakan. Dengan terbitnya buku ini, penulis juga ingin menyampaikan rasa syukur dan terimakasih kepada orang-orang hebat yang mendampingi tersusunnya buku ini. Salam cinta kasih dan terimakasih yang dalam untuk kedua Orang tua tercinta (Alm. Ibu Ani Sumarni dan Bapak Abdul Kodir). Salam hormat dan terimakasih yang dalam untuk Prof. Langkah Sembiring., Ph.D dan Prof. dr. Tri Wibawa., Ph.D. bertemu anda berdua merupakan salah satu pengalaman terbaik bagi penulis. Tak lupa penulis sampaikan terimakasih untuk guru-guru dan sahabat terbaik, Dr. Diana Hernawati., M.Pd., Dr. H. Endang Surahman., M.Pd., Dr. Purwati Kuswarini., M.Pd, Rinaldi Rizal Putra., M.Sc, Diki Muhammad Chaidir., M.Pd, Dr. Romy Faisal Mustofa., M.Pd, Suharsono., M.Pd serta semua guru dan sahabat di Jurusan Pendidikan Biologi FKIP Universitas Siliwangi yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu. Dan tentu saja rasa syukur dan

terimakasih yang dalam untuk segala pengalaman terbaik bagi penulis dari Mainaka Addakhil El Mubarak dan Cecep Sya'ban Mubarak.

Biologi molekular merupakan salah satu cabang ilmu yang menarik sekaligus menantang untuk dipelajari dan diteliti. Materi genetik baik DNA maupun RNA merupakan objek utama dalam kajian ini. Dengan berbagai metode dan cara yang dapat digunakan untuk menjawab fenomena yang terjadi pada makhluk hidup baik Prokaryot maupun Eukaryot. *Candida albicans* sebagai mikrobiota normal di dalam tubuh dapat menjadi oportunist saat sistem imun tubuh menurun. Salah satu penyakit yang ditimbulkannya adalah *candidiasis oral* dengan ditandai munculnya plak putih sekitar *mucus* yang tak lain adalah hifa yang terbentuk dari koloni *C. albicans*. Mempelajari ini semakin menarik karena ternyata kemunculan hifa ini juga merupakan ekspresi dari gen *Secreted Aspartyl Proteinase* (SAP) 4-6 dari *C. albicans*. Analisis ekspresi gen SAP 4-6 dan mengetahui korelasinya dengan penampakan morfologi berupa hifa adalah kombinasi menarik untuk dianalisis. Terlebih, menelisik lebih lanjut apakah sumber isolat *C. albicans* yang berasal dari orang sehat dan penderita *Candidiasis Oral* HIV menunjukkan perbedaan yang signifikan atau tidak? Sehingga buku ini cocok untuk dijadikan bahan bacaan bagi akademisi terutama yang tertarik untuk mempelajari *C. albicans* dan biologi molekular juga dibaca khalayak lainnya .

Nobody is perfect kiranya dapat menggambarkan keseluruhan buku ini yang tentunya masih sangat jauh dari kata sempurna. Akan tetapi penulis berdoa dengan terbitnya buku ini, mampu memberikan sumbangan bagi khazanah keilmuan. Aamiin

Tasikmalaya, April 2021

Vita Meylani

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
BAB I	
PENDAHULUAN	2
A. Latar belakang	2
B. Permasalahan	6
C. Tujuan penelitian	7
D. Manfaat penelitian	8
BAB II	
TINJAUAN PUSTAKA	10
A. <i>C. albicans</i> sebagai mikrobiota normal	10
B. <i>C. albicans</i> sebagai mikrobiota oportunistik pada manusia	14
C. <i>C. albicans</i> sebagai mikrobiota oportunistik pada manusia	17
D. Pembentukan hifa pada <i>C. albicans</i>	21
E. <i>Candidiasis oral</i> pada manusia	24
F. <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (HIV)	26
G. Analisis ekspresi gen	30

BAB III

LANDASAN TEORI DAN HIPOTESIS	36
A. Landasan teori	36
B. Hipotesis	38

BAB IV

METODE PENELITIAN	42
A. Waktu dan tempat penelitian	42
B. Pengajuan <i>ethical approval</i>	42
C. Pengambilan sampel	42
D. Isolasi selektif strain anggota genus <i>C. albicans</i>	43
E. Deteksi dan identifikasi <i>C. albicans</i> di antara isolat yang diduga anggota genus <i>Candida</i>	44
F. Pengamatan pembentukan hifa ⁴⁵	
G. Isolasi Mrna	47
H. Amplifikasi gen SAP 4-6 dan <i>housekeeping gene</i> 18S rRNA dengan menggunakan <i>RT-PCR</i>	50
I. Elektroforesis untuk visualisasi hasil deteksi ekspresi gen SAP 4-6 dan <i>housekeeping gene</i> 18S Rrna	52
J. Analisis statistik	53

K. Analisis data	53
BAB V	
HASIL DAN PEMBAHASAN	56
A. Isolasi selektif khamir <i>C. albicans</i>	56
B. Deteksi dan identifikasi isolat <i>C. albicans</i>	57
C. Frekuensi <i>C. albicans</i> pada populasi Sampel	60
D. Analisis Ekspresi Gen <i>Secreted</i> <i>Aspartyl Proteinase 4-6</i> dan <i>housekeeping gene 18S Rrna</i>	65
BAB VI	
SIMPULAN DAN SARAN	80
A. Simpulan	80
B. Saran	81
DAFTAR PUSTAKA	84

BAB I

PENGANTAR



BAB I

PENGANTAR

A. Latar belakang

Human Immunodeficiency Virus Positive/Aquired Immunodeficiency Syndrome (HIV/AIDS) merupakan penyakit mematikan nomor satu di dunia karena merupakan penyebab kematian paling tinggi (Ahira, 2013). Data statistik Ditjen PP dan PL Kemenkes RI (Anonim, 2014) menyebutkan bahwa kasus HIV di Indonesia sampai bulan Juni 2014 mencapai 15.334 penderita sedangkan penderita AIDS mencapai 1.700 orang. Masih menurut sumber yang sama, berdasarkan jenis kelaminnya jumlah penderita paling banyak sampai pertengahan tahun 2014 adalah laki-laki (29.882 orang) sedangkan berdasarkan golongan umur, maka umur produktif (20-29 tahun) merupakan golongan terbanyak yang mengidap HIV/AIDS (18.287 orang). Kasus prevalensi infeksi HIV terbesar di Indonesia terjadi di Papua yaitu 157 orang per 100.000 penduduk dan sekitar 217 orang meninggal dunia akibat AIDS per tahun (Anonim, 2011). Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa kasus HIV/AIDS di Indonesia masih cukup tinggi terutama pada umur produktif dan banyak

menyerang laki-laki dengan prevalensi infeksi terbesar terjadi di Papua.

Infeksi HIV ditandai dengan penurunan imunitas selular yang disebabkan oleh penurunan secara progresif sel limfosit T (CD4⁺) (Luque *et al.*, 2008) yang stadium akhirnya disebut AIDS (Mariam, 2010). Penurunan jumlah sel CD4⁺ sampai di bawah angka kritis 200 sel/mm³ merupakan tanda fase AIDS (Luque *et al.*, 2008). Pada fase tersebut penderita rentan terhadap berbagai infeksi oportunistik termasuk infeksi khamir seperti *candidiasis* (Lyons *et al.*, 2000). Oleh sebab itu, penurunan sel limfosit T (CD4⁺) sampai 200 sel/mm³ dapat menyebabkan munculnya infeksi oportunistik di antaranya *candidiasis* dan ketika itu pula pasien dikategorikan menderita AIDS.

Candidiasis oral dilaporkan menyerang penderita gangguan sistem imun terutama HIV (Sudbery *et al.*, 2004, Rao, 2012) meskipun beberapa kasus juga menunjukkan penderita infeksi HIV tidak terserang *candidiasis oral* (Brawner & Cutler, 1989). Menurut Detmy *cit.* Anonim (2013) dalam penelitiannya di Yaonde, Kamerun menemukan bahwa prevalensi angka kejadian *candidiasis oral* mencapai 77%. Selain itu, penelitian Pohan *cit.* Anonim (2013) menemukan bahwa prevalensi *candidiasis oral* di Brazil mencapai 50,7%. Di Indonesia sendiri angka prevalensi *candidiasis oral* pada penderita HIV mencapai 25-30% (Anonim, 2014). Meskipun demikian, kasus *candidiasis oral* juga terjadi

pada orang sehat dengan penurunan respon imun yang disebabkan oleh beberapa faktor antara lain *endocrinopathies*, malnutrisi, prostesis gigi, gangguan epitel, diet tinggi karbohidrat, bayi dan lansia, kebersihan mulut yang jelek, dan perokok berat (Rao, 2012). Jadi, *candidiasis oral* lebih sering terjadi pada penderita infeksi HIV, meskipun terdapat juga penderita *candidiasis oral* pada orang sehat yang tidak terjangkit HIV.

Candidiasis oral merupakan infeksi yang disebabkan oleh strain khamir anggota genus *Candida* (Rahma, 2011) terutama strain anggota spesies *Candida albicans* (Tyasrini *et al.*, 2006). Strain khamir anggota spesies *C. albicans* merupakan mikrobiota normal pada tubuh manusia dan tidak berbahaya (Riskillah, 2010) namun bersifat oportunistik sehingga dapat menyebabkan infeksi pada orang yang dalam kondisi *immunocompromised* (Tyasrini *et al.*, 2006; Riskillah, 2010). Sifat oportunistik tersebut tidak terlepas dari bantuan faktor virulensi yang dimilikinya yaitu (i) protein enzim *Secreted Aspartyl Proteinase* (SAP) (Naglik *et al.*, 2003), (ii) perubahan morfologis (*dimorphism*) berupa pembentukan hifa, dan (iii) *adhesi* (Tavanti *et al.*, 2004). Jadi, *candidiasis oral* disebabkan oleh infeksi strain anggota spesies *C. albicans* pada kondisi *immunocompromised* yang dibantu oleh beberapa faktor virulensi.

Faktor virulensi pada *C. albicans* di antaranya protein enzim *Secreted Aspartyl Proteinase* (SAP) (Naglik *et al.*, 2003) yang dikode oleh *multigene family*

secara berurutan yaitu dari 1 sampai 10 (*SAP 1-10*) dan memiliki tingkat ekspresi yang berbeda (Tavanti *et al.*, 2004). Protein SAP 1-10 dapat dikelompokkan ke dalam beberapa subfamili berdasarkan homologi urutan asam amino yaitu SAP 1-3, SAP 4-6, SAP 9-10 sedangkan SAP 7 dan SAP 8 memiliki urutan asam amino yang spesifik (Naglik *et al.*, 2008). Gen SAP 4-6 diketahui berperan penting dalam *candidiasis oral* dan pembentukan hifa pada saat infeksi (Naglik *et al.*, 2003) karena gen ini diekspresikan selama pembentukan hifa pada *candidiasis oral* (Hube *et al.*, 1994). Di samping itu, berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan teknik *recombination-based in vivo expression technology* (RIVET), diketahui bahwa selama infeksi, ekspresi gen SAP 4-6 lebih tinggi dari pada ekspresi gen SAP 1-3 (Naglik *et al.*, 2003). Penelitian lain mengenai ekspresi gen ini dengan menggunakan sampel penderita *candidiasis oral* dan *Candida carrier* dengan uji RT-PCR menunjukkan bahwa gen SAP 2, dan SAP 4-6 lebih dominan terekspresi dibandingkan dengan gen SAP yang lain (Naglik *et al.*, 1999). Oleh karena itu, pembentukan hifa pada saat infeksi oleh *C. albicans* diduga berkaitan erat dengan ekspresi gen SAP 4-6.

Berdasarkan uraian tersebut dapat disimpulkan bahwa khamir strain anggota spesies *C. albicans* merupakan mikrobiota normal tubuh yang tidak berbahaya dalam keadaan kesehatan baik, akan tetapi karena sifat oportunistiknya dapat berubah menjadi khamir patogenik. Patogenitasnya dapat terlihat

dalam infeksi *candidiasis oral* pada penderita infeksi HIV maupun pada orang non HIV. Infeksi *C. albicans* pada *candidiasis oral* dikendalikan oleh enzim SAP yang dikode oleh gen SAP 4-6. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai perbedaan ekspresi gen SAP 4-6 serta karakteristik yang meliputi morfologi hifa, kemampuan pembentukan hifa *C. albicans* yang menginfeksi penderita *candidiasis oral* HIV positif dan pada *C. albicans* yang terdapat sebagai komensal pada orang sehat.

B. Permasalahan

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana frekuensi kolonisasi strain anggota spesies *C. albicans* pada orang sehat?.
2. Apakah strain *C. albicans* yang diisolasi dari rongga mulut penderita infeksi HIV dan orang sehat dapat mengekspresikan gen SAP 4-6 pada medium artifisial yang ditentukan berdasarkan deteksi molekular (mRNA) dan secara morfogenesis (pembentukan hifa)?.
3. Apakah terdapat perbedaan ekspresi gen SAP 4-6 di antara *C. albicans* yang diisolasi dari rongga mulut penderita infeksi HIV dan orang sehat yang ditentukan berdasarkan deteksi molekular (mRNA) dan morfogenesis (pembentukan hifa)?.
4. Bagaimana morfologi, ukuran dan kecepatan pembentukan hifa isolat *C. albicans* yang terbentuk

oleh *C. albicans* yang berasal dari individu penderita HIV dan dari individu sehat?.

C. Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui frekuensi kolonisasi strain anggota spesies *C. albicans* pada orang sehat.
2. Mengetahui ekspresi gen SAP 4-6 isolat *C. albicans* yang berasal dari rongga mulut penderita infeksi HIV dan orang sehat secara *in vitro* yang ditemukan berdasarkan deteksi molekular (mRNA) dan morfogenesis (pembentukan hifa).
3. Mengetahui perbedaan ekspresi gen SAP 4-6 di antara isolat *C. albicans* yang berasal dari rongga mulut penderita infeksi HIV dan orang sehat.
4. Mengetahui morfologi, ukuran dan kecepatan pembentukan hifa yang terbentuk pada isolat *C. albicans* yang berasal dari individu penderita infeksi HIV dan pada isolat *C. albicans* yang berasal dari orang sehat.

D. Manfaat penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Diharapkan dapat memberikan sumbangan pengetahuan dan pemikiran yang bermakna bagi ilmu pengetahuan terutama bidang molekular mengenai deteksi gen baik secara morfologis maupun secara molekular.
2. Diharapkan hasil penelitian ini dapat menambah informasi pengetahuan mengenai ekspresi gen SAP 4-6 secara molekular dan secara morfologis untuk mengetahui keterkaitan antara data molekular dengan data morfologis.

BAB II

KAJIAN TEORI



BAB II

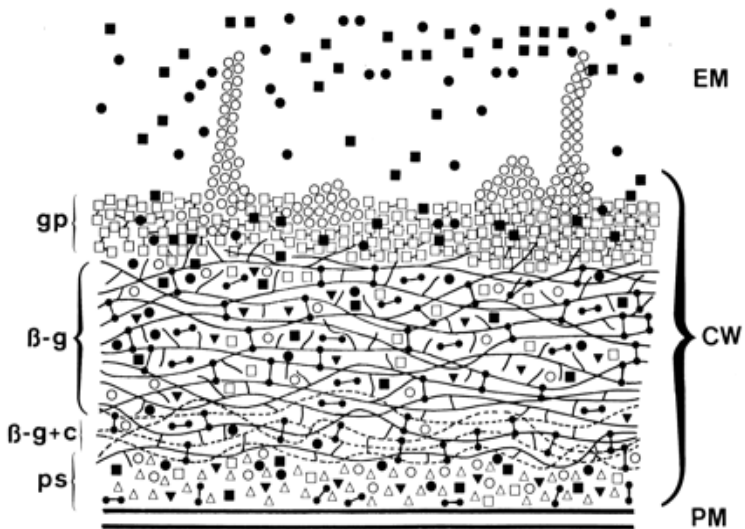
KAJIAN TEORI

A. *C. albicans* sebagai mikrobiota normal

Strain anggota spesies *C. albicans* merupakan mikrobiota normal yang hidup sebagai komensal pada saluran pencernaan, saluran pernapasan bagian atas dan mukosa genital manusia (Brown *et al.*, 2005). Sekitar 13% terdapat pada daerah vagina dan 30-60% pada bagian oral (Riskillah, 2010). Akan tetapi, ketika daya tahan tubuh menurun, baik secara lokal maupun sistemik, populasi strain *C. albicans* akan meningkat dan menyebabkan keadaan patologik (Simatupang, 2009). Oleh karena itu, pada saat kondisi tubuh menurun *C. albicans* dapat bersifat patogenik.

Strain anggota spesies *C. albicans* mempunyai struktur dinding sel yang kompleks terdiri dari *glucan*, mannan dan kitin (Tyasrini *et al.*, 2006). Mannan dan protein yang berupa manoprotein berjumlah sekitar 15,2-30% dari berat kering dinding sel, β -1,3-D-*glucan* dan β -1,6-D-*glucan* sekitar 47-60%, kitin sekitar 0,6-9%, protein 6-25% dan lipid 1-7% (Ine *et al.*, 2010). β -*glucan* merupakan komponen utama pembentuk dinding sel

C. albicans sedangkan polisakarida mannan merupakan komponen antigen yang utama (Suyoso, 2012). Penyusun lain dinding sel *C. albicans* adalah protein-protein spesifik seperti *chitinase*, *enolase*, *helicase*, dan HSP70, yang menempel pada lapisan *glucan* dan kitin (Tyasrini *et al.*, 2006). Jadi, komponen utama penyusun dinding sel *C. albicans* adalah *glucan*, mannan dan kitin (Gambar 1).

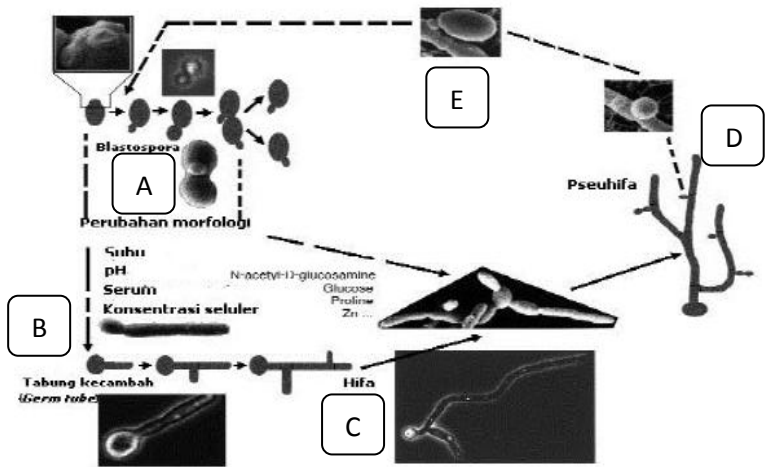


Gambar 1. Struktur Dinding Sel *C. albicans* (Suyoso, 2012) PM : Plasma membrane; CW: Cell wall; PS: Peri plasmic space; β -g+c : β -glucans+chitin; β -g : β -glucans; gp : glyco(manno) protein; EM : Extracellular medium; F : Fimbriae

β -glucan berperan penting sebagai fungsi struktural (Suyoso, 2012). Kitin berperan penting dalam menjaga integritas struktur dinding sel termasuk bagian dalam (Kusumaningtyas, 2008). Manoprotein merupakan pencetus respon imun pada hospes selama *candidiasis* dan sehingga diduga terlibat dalam menentukan morfologi hifa (Ine *et al.*, 2010). Manoprotein mempunyai aktivitas imunomodulasi terhadap respon tubuh hospes sehingga dapat mengatur seluruh sistem imun termasuk *natural killer*, makrofag, respon imun selular dan respon imun humoral (Tyasrini *et al.*, 2006). Oleh karena itu, masing-masing komponen penyusun dinding sel *C. albicans* memiliki peranan penting dalam infeksi.

Strain anggota spesies *C. albicans* dapat tumbuh pada suhu 37°C dalam kondisi aerobik maupun anaerobik (Kusumaningtyas, 2008), pada pH antara 4,5-6,5 (Ine *et al.*, 2010). Pada kondisi anaerobik, *C. albicans* memiliki waktu generasi yang lebih panjang (248 menit) dibandingkan dengan kondisi aerobik (98 menit) (Biswas & Chaffin, 2005). Kemampuan *C. albicans* untuk tumbuh baik pada suhu 37°C memungkinkannya untuk tumbuh pada sel hewan dan manusia (Kusumaningtyas, 2008). Oleh karena itu, *C. albicans* dapat tumbuh pada sel hewan dan manusia sebagai mikrobiota normal tubuh.

C. albicans dapat tumbuh dalam tiga bentuk yang berbeda yaitu, sel khamir, *pseudohifa*, dan hifa (Sudbery *et al.*, 2004). Khamir merupakan mikrobia bersel satu, berbentuk bulat dan berdinding halus sedangkan *pseudohifa* dan hifa merupakan satu kesatuan yang berbentuk filamen (Hamdanah, 2012). Oleh karena itu, menurut Ali (2008) *C. albicans* merupakan khamir dimorfik karena kemampuannya untuk tumbuh dalam dua bentuk yang berbeda yaitu khamir dan hifa (Gambar 2).



Gambar 2. Pertumbuhan dimorfik *C. albicans* (Molero *et al.*, 1998) A: Blastopora bentuk uniselular fungi yang membelah melalui tunas; B: Faktor lingkungan seperti suhu, pH, serum, dan konsentrasi sel mendorong blastopora berkembang menjadi *germ tube*; C: *Germ tube* tumbuh dan septa yang berkebalikan arah tumbuhnya memperluas ujung apikal membentuk hifa; D: Cabang hifa

dan atau cabang sekunder yang dihasilkan pada sisi-sisinya terbentuk septa baru (miselium); E: blastopora sekunder kemudian terpisah dari filamen.

Selain dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, pH, dan konsentrasi sel (Molero *et al.*, 1998) kemampuan morfogenesis *C. albicans* terjadi pada saat invasi jaringan sel hospes dipengaruhi oleh gen *Secreted Aspartyl Proteinase* (SAP) 4-6 yang terekspresi *C. albicans* (Richard *et al.*, 2002; Naglik *et al.*, 2003). Jadi, morfogenesis *C. albicans* dapat terjadi karena dipengaruhi oleh faktor internal (gen SAP) dan faktor eksternal (lingkungan).

B. *C. albicans* sebagai mikrobiota oportunistik pada manusia

Infeksi *C. albicans* merupakan infeksi oportunistik yang tidak menyebabkan penyakit pada individu imunokompeten tetapi hanya dapat terjadi pada individu yang mengalami gangguan pertahanan tubuh (de Repentigny *et al.*, 1992). Selama sistem kekebalan tubuh berfungsi dengan baik, mikrobiota normal dan kondisi jaringan dijaga dengan baik maka invasi jaringan oleh *C. albicans* tidak akan terjadi (Tregan, 2011). Oleh karena itu, dapat diartikan bahwa infeksi *C. albicans* lebih sering terjadi pada penderita HIV (*immunocompromised*) dibandingkan dengan individu sehat (imunokompeten).

Sifat oportunistik *C. albicans* diketahui dapat menyebabkan (i) sariawan (Kumamoto & Vinces, 2004), (ii) lesi pada kulit (Bae *et al.*, 2005), (iii) *vulvovaginitis* (Wilson, 2005), (iv) *candiduria* (Kobayasi *et al.*, 2004), (v) *candidiasis* saluran cerna yang dapat menyebabkan tukak lambung (Brozozowski *et al.*, 2005), bahkan (vi) dapat menjadi komplikasi kanker (Dinubile *et al.*, 2005). Oleh karena itu, meskipun *C. albicans* dikenal sebagai mikrobiota normal tubuh akan tetapi karena sifat oportunistiknya juga dikenal sebagai penyebab infeksi.

Perubahan sifat komensal menjadi patogenik disebabkan oleh beberapa faktor yaitu (i) trauma yang menyebabkan kerusakan kulit dan atau kerusakan mukosa mulut, (ii) malnutrisi, (iii) penggunaan antibiotik, (iv) kortikosteroid, (v) sitostatik, (vi) immunosupresan serta (vii) keadaan defisiensi imun (Simatupang, 2009; Riskillah, 2010). Pada pasien penderita *immunocompromised*, seperti (i) bayi yang lahir prematur, (ii) penderita luka bakar, (iii) leukemia, dan (iv) penderita penyakit imunodefisiensi seperti AIDS, infeksi *C. albicans* dapat bersifat menyeluruh dan berakibat fatal, yaitu lebih dari 50% pasien *immunocompromised* dan imunodefisiensi meninggal akibat infeksi yang disebabkan oleh *C. albicans* (Brooks *et al.*, 2004; Schmid, 2006). Oleh karena itu, meskipun *C. albicans* merupakan mikrobiota normal tubuh tetapi juga penyebab utama infeksi

terutama pada penderita *immunocompromised* seperti HIV.

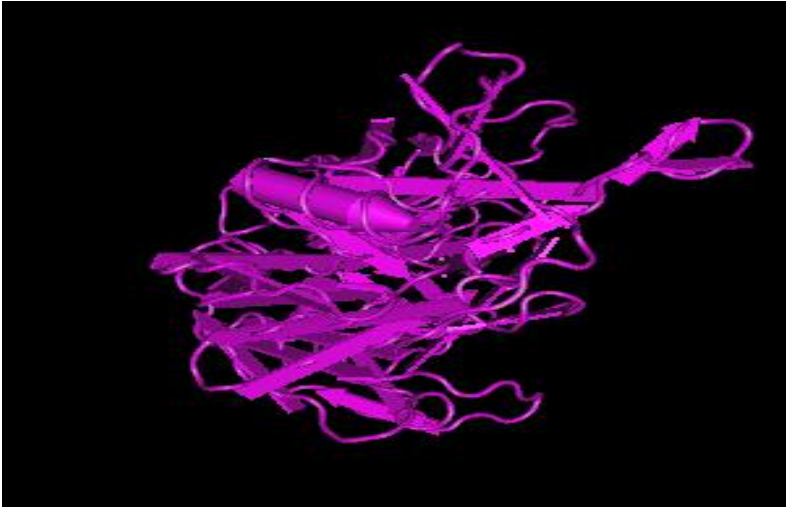
Frekuensi *C. albicans* yang bersifat oportunistik pada rongga mulut orang sehat lebih kecil dibandingkan dengan pada penderita HIV (Rao, 2012). Hal ini, didukung oleh Sobel *et al.* (2001) yang melaporkan adanya pergeseran proporsi prevalensi *C. albicans* sejalan dengan perkembangan penyakit HIV. Selanjutnya Schmidt-Wethausen *et al.* (2003) juga melaporkan adanya dominansi *C. albicans* pada penderita HIV dibandingkan dengan kontrol sehat. Kedua pernyataan tersebut mendukung fakta bahwa penderita HIV rentan terkena penyakit infeksi yang disebabkan oleh strain mikrobia seperti anggota spesies *C. albicans* (Lupetti *et al.*, 1995; Madigan *et al.*, 2012) dibandingkan orang sehat. Pada orang sehat, sifat oportunistik *C. albicans* muncul akibat penurunan sistem imun (Simatupang, 2009) dan faktor lain seperti (i) malnutrisi, (ii) kebersihan mulut yang jelek, dan (iii) perokok berat (Rao, 2012), sedangkan pada penderita HIV sifat oportunistik *C. albicans* muncul dengan sendirinya sebagai akibat menurunnya sistem imun penderita (Simatupang, 2009). Oleh karena itu, frekuensi keberadaan *C. albicans* sebagai mikrobiota oportunistik pada rongga mulut orang sehat lebih kecil dibandingkan pada penderita HIV.

C. *Gen Secretory Aspartyl Proteinase (SAP) 4-6* dan perannya sebagai faktor oportunistik bagi *C. albicans*

Semua mikrobia patogenik memiliki mekanisme perkembangan berupa kolonisasi atau infeksi terhadap hospes. Strain anggota spesies *C. albicans* dibantu oleh sejumlah faktor virulensi dan strategi khusus dalam membuat koloni pada jaringan hospes menyebabkan penyakit, dan menghancurkan pertahanan hospes (Naglik *et al.*, 2003). Salah satu faktor penting dalam proses virulensinya adalah produksi enzim hidrolitik yang dapat terekspresikan karena adanya infeksi mukosal dan sistemik (Hube *et al.*, 1997). Oleh karena itu, faktor virulensi seperti enzim hidrolitik membantu invasi dan kolonisasi strain anggota spesies *C. albicans* pada hospes.

Strain anggota spesies *C. albicans* memproduksi tiga enzim *hydrolytic extracellular* paling signifikan yaitu *secreted aspartyl proteinase (SAP)*, *phospholipase B enzyme*, dan *lipase* (Naglik *et al.*, 2003). Proteinase (SAP) merupakan enzim *hydrolytic extracellular* yang berperan dalam virulensi *C. albicans* (Tyasrini *et al.*, 2006). Proteinase ini dikelompokkan berdasarkan mekanisme katalitiknya (Naglik *et al.*, 2003) sehingga dapat dibedakan menjadi (i) *serine proteinase*, (ii) *cysteine proteinase*, (iii) *aspartyl proteinase* dan (iv) *metallo proteinase* (Barrett, 1980). Hal ini dikarenakan enzim tersebut yang bertanggungjawab terhadap virulensi *C. albicans*.

Protein *Secretory Aspartyl Proteinase* (SAP) merupakan enzim yang paling kompeten dalam menentukan virulensi *C. albicans* (Naglik *et al.*, 2003) memiliki bentuk tiga dimensi (Gambar 3). Meskipun demikian, gen SAP tidak hanya diproduksi oleh strain anggota spesies *C. albicans* tetapi juga oleh strain anggota spesies *C. tropicalis* yang memiliki 4 gen SAP (Zaugg *et al.*, 2001), strain anggota spesies *C. parapsilosis* yang memiliki 2 gen SAP (de Viragh *et al.*, 1993), strain anggota spesies *C. dubliniensis* yang memiliki 9 gen SAP (Gillfillan *et al.*, 1998). Akan tetapi, kemampuan memproduksi gen SAP tidak menentukan patogenik atau tidaknya suatu strain anggota spesies dalam genus *Candida* tergantung hospesnya dan kelompok gen SAP yang dihasilkan (Naglik *et al.*, 2003). Gen SAP (1-10) pada strain anggota spesies *C. albicans* mengkode *preproenzyme* kira-kira 60 asam amino lebih panjang dari pada *enzyme mature* (Naglik *et al.*, 2003). Sebagian besar protein SAP mengandung *putative N-glycosylation site* (Naglik *et al.*, 2003). Selain itu, pada gen SAP 9 dan 10 memiliki *sequence C terminal* yang identik (*consensus*) dengan protein *glycocyl phosphatidylinositol* (GPI) (Monod *et al.*, 1998; Felk *et al.*, 2000). Jadi, tidak semua gen SAP 1-10 dimiliki oleh semua strain anggota spesies dalam genus *Candida* dan keberadaannya tidak mempengaruhi patogenitas strain anggota spesies dalam genus *Candida*.



Gambar 3. Struktur tiga dimensi protein SAP 4-6 (Borelli *et al.*, 2008)

Enzim SAP dapat meningkatkan kemampuan strain anggota spesies *C. albicans* untuk melakukan kolonisasi, melakukan penetrasi ke jaringan tubuh hospes dan menghindari dari sistem imun hospes (Tyasrini *et al.*, 2006). *Secretory Aspartyl Proteinase* (SAP) diduga berperan dalam merangsang pelepasan mannan dari dinding sel yang akan menghambat dan memodulasi sistem imun selular hospes dengan menghancurkan beberapa protein seperti imunoglobulin dan komplemen, menyerap protein hospes untuk sumber nutrisi, *adherence*, dan degradasi pelindung hospes selama invasi (Chaffin *et al.*, 1998; Staib *et al.*, 2000; Naglik *et al.*, 2003; Tyasrini *et al.*, 2006). Enzim ini juga disekresikan oleh strain anggota spesies *C. albicans* saat berada dalam makrofag setelah difagositosis sehingga mencegah penghancuran sel

khamir (Zepelin *et al.*, 1998). Oleh karena itu, SAP memiliki peran penting dalam patogenesis *C. albicans*.

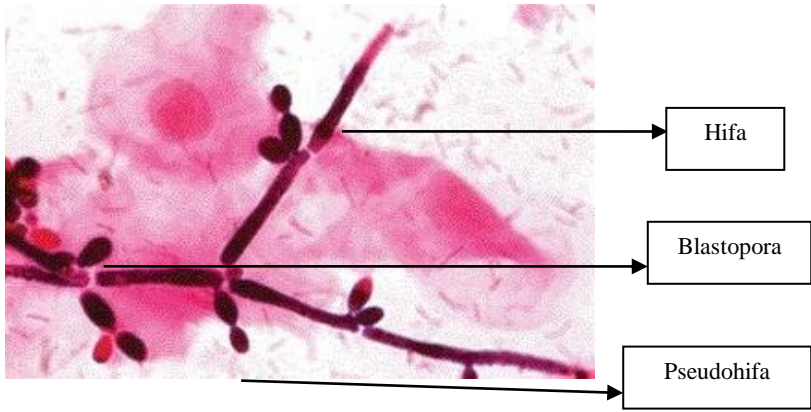
Invasi dan patogenesis strain anggota spesies *C. albicans* ditandai dengan sekresi SAP (Albrecht *et al.*, 2006). Ekspresi gen SAP diyakini berhubungan dengan kerusakan pada kulit yang terinfeksi (Ollert *et al.*, 1995). Studi *in vitro* sebagai model *candidiasis* pada epidermis manusia menunjukkan bahwa SAP 5 diinduksi sesaat setelah terjadinya invasi sementara SAP 4 diekspresikan setelah SAP 5 (Taylor *et al.*, 2005). Induksi sel hospes terhadap ekspresi gen SAP 4 dan SAP 5 menyebabkan perubahan morfologi *C. albicans* dari bentuk khamir ke bentuk hifa waktu infeksi vagina pada tikus model merupakan bukti adanya hubungan perubahan morfologi dan infeksi (Taylor *et al.*, 2005) dan secara bersama-sama SAP 4, SAP 5, dan SAP 6 bertanggungjawab pada virulensi (Kusumaningtyas, 2008). Percobaan pada babi dan mencit yang diinfeksi *C. albicans* yang telah mengalami mutasi pada tiga gen SAP 4, SAP 5 dan SAP 6 ternyata dapat bertahan hidup lebih lama daripada yang diinfeksi dengan *C. albicans wild-type* (Sanglard *et al.*, 1997). Hal ini menunjukkan bahwa SAP 4-6 berperan penting dalam virulensi, patogenesis, infeksi dan morfogenesis *C. albicans*.

D. Pembentukan hifa pada *C. albicans*

Perubahan bentuk morfologi dari khamir ke hifa (Gambar 4) merupakan salah satu penanda invasi *C. albicans* (Kusumaningtyas, 2008). Perubahan bentuk tersebut sangat dipengaruhi oleh lingkungan sel hospes yang terdeteksi oleh *C. albicans* selama proses invasi (Brown & Gow, 1999). Kemampuan mengubah morfologi merupakan faktor penting dalam menentukan infeksi dan penyebaran *C. albicans* pada jaringan hospes (Jong *et al.*, 2001). Bentuk khamir membuat *C. albicans* lebih mudah melakukan penyebaran daripada bentuk hifa, sedangkan bentuk hifa memudahkan *C. albicans* melakukan penetrasi ke tubuh hospes (Sherwood *et al.*, 1992; Lo *et al.*, 1997). Oleh karena itu, bentuk hifa lebih sering terdeteksi saat *C. albicans* melakukan invasi jaringan.

Hifa *C. albicans* merupakan filamen yang menyusun bagian vegetatif khamir dan dipisahkan oleh septa serta membentuk *mycelium* (Yatim, 1999; Kusumaningtyas, 2008). Hifa *C. albicans* bersifat aerotropik dan dapat membentuk *helix* apabila mengenai permukaan yang keras (Ha & White, 1999). Kemampuan pembentukan hifa juga berhubungan dengan resistensi terhadap anti khamir (Kusumaningtyas, 2008). Isolat yang resisten tetap dapat membentuk hifa dalam lingkungan yang mengandung anti khamir sedangkan isolat yang rentan tidak mampu membentuk hifa (Ha & White, 1999). Hifa *C. albicans* mempunyai sifat *thigmotropisme*

yang membantu dalam proses infiltrasi pada permukaan epitel selama invasi jaringan (Ha & White, 1999; Kusumaningtyas, 2008). Oleh karena itu, hifa *C. albicans* berperan penting dalam invasi jaringan dan resistensi.



Gambar 4. Morfogenesis *C. albicans* (Arianaga *et al.*, 2012)

Perkembangan hifa ditentukan oleh beberapa gen sebagai hasil ekspresi (Kusumaningtyas, 2008). Terdapat dua pengaturan perkembangan hifa pada *C. albicans* yaitu pengaturan positif dan negatif (Brown & Gow, 1999; Ernst, 2000; Munir *et al.*, 2001). Pengaturan positif diperantarai oleh *multiple signaling pathway* termasuk *signaling pathway* dari *mitogen-activated protein (Mapkinase)*, *cyclic AMP*, dan *pH* (Brown & Gow, 1999; Ernst, 2000) sedangkan pengaturan negatif dilakukan oleh gen *CaNrg 1* yang berisizinc-finger (Munir *et al.*, 2001). Gen *CaNrg 1* merupakan pengatur transkripsi yang *conserved* pada khamir sampai

manusia (Munir *et al.*, 2001). Jadi, perkembangan hifa pada *C. albicans* diatur secara positif dan negatif.

Pengaturan perubahan morfologis *C. albicans* dari bentuk *khamir* ke hifa oleh *CaNrg1* berupa pengaturan langsung maupun tak langsung (Brown & Gow, 1999). Pengaturan langsung terjadi melalui penekanan fungsi gen spesifik hifa (*hyphae-specific genes*) sehingga pertumbuhan hifa terhambat (Ernst, 2000) sedangkan pengaturan tidak langsung dengan *down regulating Map-kinase signaling pathway* (Brown & Gow, 1999). Gen *CaNrg1* berikatan dengan *Nrg response element* (NRE) dan *Tup1p* sehingga mampu mengaktifkan gen CEK1 yang mengkode *Mapkinase* dan kemudian mengaktifkan pertumbuhan hifa (Brown & Gow, 1999; Ernst, 2000). Jadi, perubahan morfologis *C. albicans* diatur oleh gen *CaNrg1* baik secara langsung maupun tidak langsung.

Morfogenesis juga dipengaruhi oleh *glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored protein* yang juga terlibat dalam mempertahankan integritas dinding sel dan interaksi sel *GPI-anchor* terutama diperlukan dalam pembentukan hifa penuh dan sebagai penentu sensitivitas terhadap sel pertahanan tubuh hospes (Richard *et al.*, 2002). Pembentukan hifa oleh strain anggota spesies *C. albicans* juga terkait dengan ekspresi gen SAP 4, SAP 5, dan SAP 6 karena gen ini terekspresi pada saat pembentukan hifa (Naglik *et al.*, 2008). Ekspresi gen SAP 4, SAP 5, dan SAP 6 diinduksi oleh sel hospes sehingga menyebabkan perubahan

morfologis *C. albicans* dari bentuk khamir ke bentuk hifa. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Taylor *et al.* (2005) pada tikus model yang mengalami infeksi vagina. Oleh karena itu, gen SAP 4, SAP 5, dan SAP 6 diduga memiliki peranan penting dalam pembentukan hifa khususnya pada saat infeksi.

E. *Candidiasis oral* pada manusia

Candidiasis merupakan infeksi yang disebabkan oleh khamir anggota genus *Candida* (Rahma, 2011). *Candidiasis* dapat terjadi pada jaringan mukosa, misalnya daerah mulut dan faring (*oropharyngeal candidiasis/OPC*) (Lyons *et al.*, 2000; Marr *et al.*, 2001), darah dan genital (Rogers & Barker, 2002; Tavanti *et al.*, 2005), serta daerah *cutaneus* tubuh yang lembab (Rahma, 2011). *Candidiasis* sering dihubungkan dengan kasus HIV sebagai dampak menurunnya sistem imun (Lyons *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 2012). Oleh karena itu, penderita HIV lebih berpotensi terkena *candidiasis* yang dapat memperburuk keadaan secara sistemik.

Candidiasis dapat dikelompokkan menjadi *candidiasis profunda* dan *candidiasis superfisial*. *Candidiasis profunda* adalah bentuk infeksi *Candida* yang terjadi pada organ bagian dalam sedangkan *candidiasis superfisial* adalah bentuk infeksi *Candida* yang terjadi pada daerah permukaan luar (Rahma, 2011). *Candidiasis superfisial* ditandai dengan infeksi terbatas yang terjadi di permukaan kulit atau mukosa

(Smith, 1985). Permukaan lesi tampak seperti beludru (*velvety appearance*) karena dilapisi oleh lapisan *plaque* berwarna putih, biasanya tidak nyeri kecuali kalau lapisan *plaque* dirobek atau berusaha diangkat (Smith, 1985; Ryan, 1994). Daerah kulit atau mukosa yang berdekatan dengan lesi ini tampak berwarna merah gelap dan agak membengkak (Smith, 1985). *Candidiasis superficial* biasanya terjadi di daerah kulit yang sering basah dan lembab seperti daerah kulit genital (*genital candidiasis*), daerah kulit bayi yang tertutup popok (*diaper dermatitis*), aksila (*candidiasis intertrigo*) dan kuku (*onychia, paronychia*) (Smith, 1985; Ryan, 1994). Hal tersebut menandakan bahwa *candidiasis* bersifat spesifik dan dapat disebabkan oleh beberapa faktor tergantung lokasi infeksi.

Candidiasis oral merupakan salah satu penyakit infeksi pada rongga mulut berupa lesi merah dan lesi putih yang disebabkan oleh *C. albicans* (Budiyanto, 2011). Kombinasi bentuk klinis sering terjadi pada penderita HIV dan infeksi biasanya muncul di berbagai lokasi di rongga mulut (Egusa *et al.*, 2008). Pada penderita HIV terdapat 4 varian klinis *candidiasis oral* yaitu (i) *candidiasis pseudomembran*, (ii) *candidiasis erimatosus*, (iii) *candidiasis cheilitis angular* dan (iv) *candidiasis hiperplastik* (Budiyanto, 2011). Hal ini menunjukkan *candidiasis oral* pada penderita HIV bersifat kompleks.

Candidiasis oral sering dikaitkan dengan penderita HIV sebagai efek menurunnya sistem imun (Naglik *et al.*, 1999). Faktanya di lapangan *candidiasis oral* tidak hanya diderita oleh penderita HIV atau yang mengalami *immunosupressed* tetapi juga oleh orang yang tidak memiliki latar belakang mengalami gangguan sistem imun (Ollert *et al.*, 1995). Hal ini diterangkan oleh beberapa faktor lain selain menurunnya sistem imun seperti *endocrinopathies*, malnutrisi, keganasan, prostesis gigi, gangguan epitel, diet tinggi karbohidrat, bayi dan orang tua, kebersihan mulut yang jelek, dan perokok berat (Rao, 2012) ataupun faktor lain yang belum diidentifikasi seperti faktor virulensi *C. albicans* (Naglik *et al.*, 2003). Sehingga penyebab munculnya *candidiasis oral* pada penderita HIV berbeda dengan yang imunokompeten (sehat).

F. *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*

Human Immunodeficiency Virus (HIV) adalah virus yang menyerang sistem imun sehingga sistem kekebalan tubuh jadi lemah bahkan sampai hilang (Yatim, 1999). Akibat serangan HIV berujung pada AIDS, namun kadang-kadang HIV dan AIDS tidak dapat dipisahkan secara jelas sehingga banyak yang menyebutkan HIV/AIDS (Suyoso, 2012). Padahal, pengertian mengenai HIV dan AIDS berbeda meskipun sangat berkaitan satu sama lain. Menurut Madigan *et al.*, (2012) seseorang dapat dikategorikan

positif terkena HIV apabila memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. Tes *screening antibody* menunjukkan positif HIV (EIA atau tes *screening* cepat) untuk yang lebih sensitif dan spesifik dengan menggunakan tes konfirmasi (*western blot* atau *immunofluorescence*) atau tes virologis berupa tes asam amino HIV, plasma RNA HIV, HIV PCR, tes antigen P₂₄ HIV atau isolasi HIV.
2. Jika laboratorium tidak memungkinkan dapat menggunakan kriteria AIDS seperti jumlah limfosit T (CD4⁺) kurang dari 200/ μ l darah dan terkena penyakit infeksi yang disebabkan oleh berbagai mikrobia akibat penurunan jumlah limfosit T (CD4⁺).

Sementara itu, masih menurut Madigan *et al.* (2012) seseorang dikatakan positif AIDS apabila memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. Jumlah sel limfosit T (CD4⁺) kurang dari 200/ μ l darah yang normalnya 600/ μ l-1000/ μ l atau sel limfosit T (CD4⁺)/total limfosit kurang dari 14%.
2. Terkena penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikrobia penyebab *candidiasis; coccidioidomycosis; cryptococcosis; histoplasmosis; isosporiasis; pneumocystis jiroveci pneumonia, cryptosporidiosis, atau toxoplasmosis* otak, TB *pulmonary* atau infeksi *Mycobacterium spp.* lain atau *Salmonella septicemia* berulang, infeksi *cytomegalovirus, HIV-related encephalopathy, HIV wasting syndrome, chronic*

ulcers, atau *bronchitis* serta *herpes simplex* ataupun *progressive multifocal leukoencephalopathy*, ataupun penyakit *malignant* seperti *invasive cervical cancer*, *Kaposi's sarcoma*, *Burkitt's lymphoma*, *primary lymphoma* di otak atau *immunoblastic lymphoma*; atau *pneumonia* berulang dengan banyak agen.

Berdasarkan uraian tersebut dapat disimpulkan bahwa HIV dan AIDS dapat dideteksi melalui berbagai kriteria yaitu (i) tes *screening antibody*, (ii) pengukuran jumlah limfosit T (CD4⁺), dan (iii) diagnosis penyakit yang disebabkan oleh mikrobia secara berulang.

Madigan *et al.* (2012) juga melaporkan bahwa lebih dari 80 juta orang di dunia telah terinfeksi HIV dan paling sedikit terdapat 27 juta terinfeksi AIDS serta lebih dari 2 juta orang meninggal dunia setiap tahun. Sementara itu, di Indonesia kasus prevalensi HIV secara kumulatif sebanyak 76.879 kasus semenjak tahun 1987-2011 sedangkan kasus AIDS rerata 12 orang per 100.000 penduduk yang tersebar di 33 provinsi dengan prevalensi terbesar di Papua yaitu 157 orang per 100.000 penduduk dan setiap tahun sekitar 217 orang meninggal dunia akibat AIDS (Anonim, 2011). Data tersebut menunjukkan bahwa kasus HIV dan AIDS merupakan salah satu penyakit yang mematikan di dunia dan menjadi permasalahan serius di beberapa negara termasuk Indonesia.

HIV dikelompokkan menjadi dua tipe yaitu HIV-1 dan HIV-2 yang secara genetik sama tetapi memiliki perbedaan dalam hal penyebarannya (HIV-1 lebih mudah disebarkan dibandingkan HIV-2) (Anonim, 2008). Selain itu, HIV-2 juga kurang virulen dibandingkan HIV-1 dan menyebabkan *milder AIDS-like disease* sedangkan lebih dari 99% kasus HIV di dunia disebabkan oleh HIV-1 (Madigan *et al.*, 2012). Penyakit HIV ditandai dengan penurunan imunitas selular yang disebabkan penurunan progresif sel limfosit T (CD4⁺) di bawah angka kritis 200 sel/mm³ dan menyebabkan munculnya infeksi oportunistik multipel (Lyons *et al.*, 2000; Luque *et al.*, 2008). Pada fase tersebut penderita rentan terhadap berbagai infeksi oportunistik termasuk infeksi khamir seperti *candidiasis* yang sering kali menyebabkan kematian (Lyons *et al.*, 2000). Oleh karena itu, *candidiasis* sering dihubungkan dengan penyakit HIV sebagai dampak tambahan menurunnya sistem kekebalan tubuh.

Mayoritas individu yang mengalami gangguan sistem imun dengan infeksi HIV terkena *candidiasis oral*. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian Lupetti *et al.* (1995) yang menyebutkan bahwa *candidiasis oral* lebih banyak diderita oleh pasien HIV dibandingkan dengan orang yang sehat. Sementara, Sudbery *et al.* (2004) menyimpulkan bahwa *C. albicans* banyak menyebabkan infeksi superfisial seperti vaginitis pada kebanyakan wanita sehat, sedangkan infeksi mulut dan *esophagus* pada

pasien HIV serta pasien kemoterapi. *Candidiasis* tidak terlepas dari faktor virulensi berupa *Secreted Aspartyl Proteinase* (SAP) yang berperan dalam morfogenesis dan patogenitas *C. albicans*. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian de Bernardis *et al.* (1992) yang menyebutkan bahwa adanya peningkatan aktivitas protein yang diproduksi oleh *C. albicans* pada penderita HIV dibandingkan dengan *C. albicans* pada orang sehat. Hal tersebut menunjukkan bahwa penderita gangguan sistem imun terutama HIV lebih sering menderita *candidiasis* dan memiliki resiko lebih besar dibandingkan dengan orang sehat.

G. Analisis ekspresi gen

Analisis ekspresi gen merupakan suatu cara untuk mengetahui apakah suatu gen pada suatu organisme terekspresi atau tidak dengan menggunakan teknik molekular. Analisis ekspresi gen yang umum dilakukan ada tiga macam, yaitu analisis (i) *microarray* (Rogers & Barker, 2002), (ii) *real time* PCR (qPCR) (Naglik, 2008) dan (iii) RT-PCR densitometri (Kartasasmita, 2010). Jadi, analisis ekspresi gen secara molekular di antaranya dapat dilakukan melalui tiga metode yaitu (i) *microarray*, (ii) *real time* PCR, dan (iii) RT-PCR densitometri.

Microarray merupakan suatu analisis hibridisasi gen dalam skala mikro dengan melibatkan banyak gen dalam 1 kali percobaan (Ueno, 2011). Salah satu aplikasi *microarray* ialah mendeteksi adanya

kanker (Rogers & Barker, 2002) Terdapat 3 tahapan uji *microarray* dalam mendeteksi kanker yaitu (i) preparasi (penyiapan) *microarray*, (ii) preparasi probe DNA yang dilabel dan hibridisasi, serta yang terakhir ialah (iii) menganalisis datanya (Ueno, 2011). Untuk mendeteksi kanker dengan menggunakan *microarray* digunakan fluorokrom Cyanin3 (hijau) untuk mewarnai cDNA kontrol dan Cyanin5 (merah) untuk sampel yang diuji (Ueno, 2011). Oleh karena itu, *microarray* sering digunakan dalam bidang molekular kesehatan untuk mendeteksi kanker.

Real-Time PCR merupakan suatu perangkat *platform* instrumentasi, yang terdiri atas satu buah *thermal cycler*, satu buah komputer, lensa untuk eksitasi fluoresen dan pengumpul emisi, sertaperangkat lunak untuk akuisisi dan analisis data (Anonim, 2010). Prinsip kerja *Real-Time* PCR adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi reporter fluoresen (Naglik, 2008). Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR dalam reaksi (Madigan *et al.*, 2012). Dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus, reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau (Naglik, 2008). Peningkatan produk PCR yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Madigan *et al.*, 2012). Oleh karena itu, kualitas qPCR ditentukan juga oleh kualitas dan kuantitas hasil isolasi DNA.

RT-PCR densitometri merupakan metode mengukur ekspresi gen secara kualitatif berdasarkan tingkat pancaran fluoresens yaitu tebal atau tipisnya *band* hasil elektroforesis dalam bentuk densitas optik (Kartasasmita, 2010). Densitas optik merupakan besarnya akumulasi area gelap pada bidang yang dikaji dan biasa disajikan dalam bentuk angka menggunakan alat densitometer (Davies, 2005). Oleh karena itu, pengukuran ekspresi gen dapat disajikan secara kuantitatif sehingga dapat dikatakan sebagai metode semikuantitatif.

Ketiga metode analisis ekspresi gen memiliki kelebihan dan kekurangan yang dapat diuraikan sebagai berikut: (i) kelebihan *microarray* di antaranya informasi yang dihasilkan sangat detail dan menyeluruh sehingga proses Biologi yang melibatkan regulasi gen bisa dianalisis dengan lebih baik (Anonim, 2014). Akan tetapi juga memiliki kekurangan di antaranya *microarray* terdiri dari ribuan nukleotida sehingga memungkinkan terjadinya kesalahan penempelan pada saat di hibridisasi dan data yang diperoleh cukup banyak sehingga perlu analisis yang teliti (Ueno, 2011). (ii) *Real time PCR* memiliki kelebihan hasil amplifikasi DNA dapat diamati secara langsung (secara *real time*) sehingga konsentrasi DNA yang terdapat pada sampel dapat ditentukan (Rustam, 2012). Di sisi lain, penggunaan *dye fluorescent* seperti *SYBR green* membuat *real time PCR* memiliki sensitifitas yang tinggi sehingga rentan

terhadap bias (Rustam, 2012). (iii) RT-PCR densitometri memiliki kelebihan di antaranya adalah meskipun hasilnya dapat di analisis secara kualitatif dan kuantitatif (semikuantitatif) (Kartasasmita, 2010). Meskipun demikian, RT-PCR densitometri memiliki kekurangan di antaranya pengerjaannya cukup panjang dan perlu ketelitian serta kehati-hatian yang tinggi (Kartasasmita, 2010).

Berdasarkan uraian tersebut dapat disimpulkan bahwa analisis ekspresi gen secara molekular dapat dilakukan melalui berbagai metode yang memiliki kelebihan dan kekurangan yang dapat disesuaikan dengan kebutuhan

BAB III
LANDASAN TEORI
DAN HIPOTESIS



BAB III

LANDASAN TEORI DAN HIPOTESIS

A. Landasan teori

Frekuensi *C. albicans* pada penderita *candidiasis oral* HIV positif lebih tinggi dibandingkan dengan yang komensal pada orang sehat (Rao, 2012). Hal tersebut disebabkan kemampuan perlekatan *C. albicans* ke sel epitel bukal penderita HIV lebih baik dibandingkan dengan individu sehat (Lupetti *et al.*, 1995). Dengan demikian HIV memiliki kemampuan untuk langsung berikatan dengan *C. albicans* dan selanjutnya memacu peningkatan sekresi faktor virulensi *Secreted Aspartyl Proteinase* (SAP) yang dapat memicu pembentukan hifa.

Protein *secreted aspartyl proteinase* (SAP) dikode oleh *multigene family* secara berurutan dari 1-10 (*SAP 1-10*) (Tavanti *et al.*, 2004). Gen *SAP 1-10* dapat dikelompokkan menjadi beberapa subfamili yaitu (i) subfamili *SAP 1-3*, (ii) *SAP 4-6*, (iii) *SAP 9-10*, sedangkan *SAP 7* dan *SAP 8* memiliki urutan asam amino yang spesifik sehingga tidak dapat dikelompokkan (Naglik *et al.*, 2008). Subfamili gen

SAP 4-6 diketahui berperan dalam *candidiasis oral*, infeksi sistemik, dan *vaginitis* (Naglik *et al.*, 2003; Tavanti *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005). Subfamili gen SAP 4-6 terkspresi ketika terjadi invasi dan patogenesis *C. albicans* sehingga menyebabkan perubahan morfologis *C. albicans* dari bentuk khamir ke hifa (Naglik *et al.*, 2008; Taylor, 2005). Oleh karena itu, analisis ekspresi gen SAP 4-6 dapat dilakukan melalui mekanisme molekular dan pengamatan morfologis.

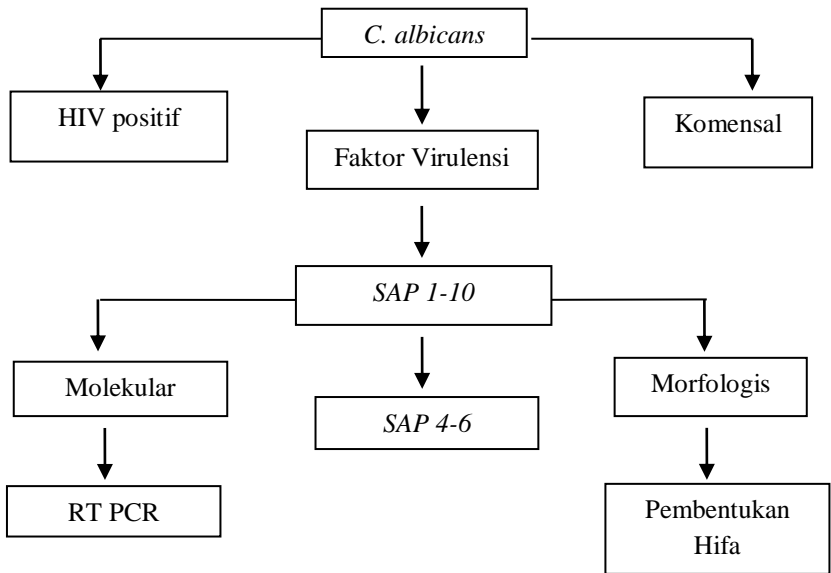
Analisis ekspresi gen SAP 4-6 secara molekular dapat dilakukan dengan cara mengisolasi mRNA dan dideteksi dengan menggunakan metode RT-PCR, sedangkan secara morfologis dapat dianalisis dengan mengamati pembentukan hifa yang terjadi pada masing-masing isolat kemudian diukur ukuran panjang hifa dan kecepatan pembentukan hifanya. Penelitian terdahulu (de Bernardis *et al.*, 1992; Hube *et al.*, 1994; Naglik *et al.*, 2003) menyebutkan bahwa secara molekular gen SAP 4-6 lebih cepat terekspresi pada penderita *candidiasis oral* HIV dibandingkan dengan orang sehat. Begitu juga, secara morfologis hifa yang terbentuk pada isolat yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV lebih cepat dibandingkan dengan yang berasal dari orang sehat (Taylor *et al.*, 2005).

B. Hipotesis

Berdasarkan informasi yang diperoleh dari kajian teori yang telah diuraikan sebelumnya dan landasan teori yang disusun maka dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

1. Frekuensi *C. albicans* pada sampel rongga mulut orang sehat lebih kecil dibandingkan frekuensi *C. albicans* pada sampel rongga mulut penderita infeksi HIV positif.
2. Gen SAP 4-6 isolat *C. albicans* dari penderita infeksi HIV dan orang sehat dapat terekspresi dengan metode *in vitro*.
3. Ekspresi gen SAP 4-6 di antara *C. albicans* yang diisolasi dari rongga mulut penderita infeksi HIV positif dan pada orang sehat memiliki perbedaan.
4. Ukuran dan kecepatan pembentukan hifa isolat *C. albicans* yang terbentuk dari penderita infeksi HIV positif dan pada orang sehat memiliki perbedaan.

Untuk menguji hipotesis yang dirumuskan maka dapat dibuat kerangka pemikiran yang disajikan pada Gambar 4.



Gambar 5. Kerangka pemikiran penelitian.

BAB IV

METODE PENELITIAN



BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2012-Oktober 2013 yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Anatomi Hewan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

B. Pengajuan *ethical approval*

Pengajuan *ethical approval* kepada komisi etik dilakukan karena subjek penelitian ini adalah manusia. *Ethical approval* dari komisi etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran UGM/RSUP Dr Sardjito sudah diperoleh pada tanggal 11 Desember 2012.

C. Pengambilan sampel

Jumlah sampel untuk isolasi *C. albicans* yang komensal pada orang sehat diperoleh berdasarkan rumus Lemeshow (1997) *cit.* Murwaningsih (2010) (Lampiran 1) sehingga jumlah sampel yang digunakan pada penelitian adalah sebanyak 15 orang.

Pengambilan isolat *C. albicans* dilakukan dengan menggunakan *cotton swab* yang diusapkan pada rongga mulut orang sehat (tidak ada tanda-tanda peradangan dan penyakit pada mulut, misalnya: stomatitis). Kemudian sampel dibiakkan pada media *Sabouroud Dextrose Agar*, selanjutnya disubkultur pada media *CHROMagar* (Oxoid). Isolat yang disubkulturkan pada media *CHROMagar* kemudian disubkulturkan lagi pada media penginduksi SAP (media induksi proteinase). Hal serupa dilakukan juga pada isolat *C. albicans* dari rongga mulut pasien dengan HIV (koleksi laboratorium Mikrobiologi FK) yang sudah merupakan *archive sample* hasil penelitian Murwaningsih (2010) sebanyak 15 isolat sehingga total sampel pada penelitian yang akan dilakukan sebanyak 30 isolat yang berasal dari dua sumber isolat.

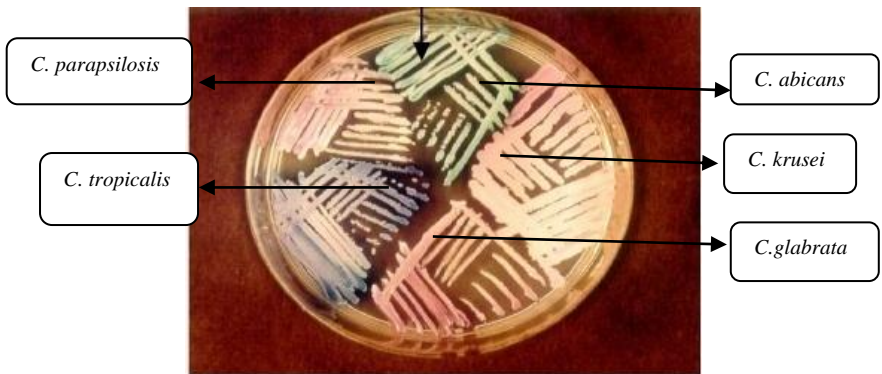
D. Isolasi selektif strain anggota genus *C. albicans*

Sampel yang telah diambil dengan cara *swab* dari rongga mulut orang sehat kemudian diinokulasikan pada media (SDA). Kemudian diinkubasikan pada suhu 35-37°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh kemudian diidentifikasi berdasarkan morfologi selnya dengan menggunakan metode pewarnaan gram. Koloni yang diduga sebagai anggota genus *Candida* kemudian diisolasi dengan cara disubkulturkan pada media *CHROMagar* dengan

cara goresan dengan menggunakan ose yang sebelumnya telah dipijarkan di atas lampu bunsen dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C.

E. Deteksi dan identifikasi *C. albicans* di antara isolat yang diduga anggota genus *Candida*

Deteksi dan identifikasi *C. albicans* pada media *CHROMagar* dilakukan dengan cara mengamati warna koloni yang terbentuk pada media *CHROMagar*. Koloni yang terbentuk oleh masing-masing strain anggota spesies dalam genus *Candida* berbeda satu sama lain. Warna yang ditimbulkan oleh strain anggota spesies *C. albicans* adalah hijau, strain anggota spesies *C. krusei* menimbulkan warna kemerahan, dan strain anggota spesies *C. tropicalis* menimbulkan warna ungu atau biru tua. Perbedaan warna yang muncul disebabkan oleh perbedaan enzim yang terdapat pada masing-masing strain anggota spesies yang mengikat zat kromogenik pada media *CHROMagar* (Gambar 5).



Gambar 6. Deteksi dan identifikasi *C. albicans* pada media *CHROMagar* (Marol *et al.*,2003 cit. Kadrianto, 2008)

F. Pengamatan pembentukan hifa

Isolat *C. albicans* (dari orang sehat dan penderita infeksi HIV) kemudian disubkulturkan lagi pada media penginduksi SAP (media induksi proteinase). Cara yang dilakukan adalah menggunakan metode Gruber *et al.* (1999) dengan sedikit modifikasi yaitu waktu inkubasinya dilakukan selama 7 hari. *C. albicans* konsentrasi 1×10^7 sel/ml, diinokulasikan pada media induksi proteinase yang terdiri dari 0,2% (w/v) BSA, 2% (w/v) glukosa, 0,1% (w/v) KH_2PO_4 , 0,05% (w/v) MgSO_4 dan 1% (v/v) 100x *minimum essential medium vitamins* pH 4.0 selama 7 hari pada suhu 25°C .

1. Morfologi hifa

Morfologi hifa isolat *C. albicans* dapat diamati dengan cara mengambil 100 μl *fetal bovine serum* pH 5,5 ditambahkan dengan 20 μl kultur RPMI 1640 yang telah ada kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian isolat diteteskan pada *slide microscope* dan ditutup dengan menggunakan *decklass*. Setelah itu, diamati morfologi hifa yang terbentuk di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 400x agar terlihat jelas yang sebelumnya diberi perlakuan pewarnaan gram. Hasil pengamatan di ambil dalam bentuk gambar melalui kamera yang terhubung dengan mikroskop untuk dapat di analisis apakah morfogenesis isolat selama 1 jam berbentuk blastopora, pseudohifa, atau sudah berbentuk hifa. Hal ini dilakukan karena isolat *C. albicans* dapat mengalami morfogenesis dari bentuk uniselular (blastopora) ke bentuk hifa.

2. Ukuran panjang hifa

Pengukuran elongasi hifa pada masing-masing isolat menggunakan metode yang dikemukakan Gruber *at al.* (1999) dengan sedikit modifikasi yaitu pengukuran sampel dilakukan sebanyak 3 ulangan. Sebanyak 2×10^5 sel/ml pada media RPMI 1640 akan diinokulasikan ke dalam *microwell plate* dan diinkubasikan pada suhu 37°C. Morfologi *C. albicans* ditentukan secara

mikroskopis setelah 6 jam menggunakan mikrometer untuk mengukur panjangnya. Masing-masing sampel diukur sebanyak 3 ulangan per sampel lalu di rerata.

3. Kecepatan pembentukan hifa

Uji kemampuan pembentukan hifa dilakukan dengan menggunakan metode Kusumawardani (2010) dengan sedikit modifikasi yaitu perhitungan jumlah sel dilakukan pada waktu inkubasi yang berbeda. Cara yang dilakukan adalah menyiapkan *fetal bovine serum* pH 5,5. 100µl *fetal bovine serum* pH 5,5 ditambahkan dengan 20µl kultur RPMI 1640 yang telah ada kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

Jumlah hifa yang terbentuk dan jumlah total sel yang terbentuk dengan *haemocytometer* diamati di bawah mikroskop perbesaran 400x (Lampiran 2). Penghitungan jumlah hifa dilakukan secara serial, dilakukan pada waktu inkubasi 1, 3 dan 6 jam.

G. Isolasi mRNA

Materi genetik yang diisolasi dari sel *C. albicans* adalah RNA yang kemudian dibuat dalam bentuk cDNA untuk digunakan dalam amplifikasi gen SAP 4-6. Sebelum diisolasi sel *C. albicans* dihitung dengan menggunakan metode perhitungan langsung dengan alat *haemocytometer*. Cara perhitungan sel dengan

metode ini adalah dengan meneteskan suspensi yang berisi sel *C. albicans* ke dalam alat tersebut ditutup dengan gelas penutup kemudian diamati dengan mikroskop (pembesaran 100-400X). Dengan menentukan jumlah sel rata-rata tiap petak (n) yang telah diketahui volumenya maka dapat ditentukan konsentrasi sel *C. albicans* tiap ml (Lampiran 2).

Apabila jumlah sel yang terhitung kurang dari 10^5 sel/ml dilakukan kultur dan perhitungan ulang dengan cara membuat kultur baru dan kemudian membuat suspensi untuk menghitung selnya secara langsung menggunakan *haemocytometer*. Hal ini dilakukan karena penambahan waktu inkubasi akan mempengaruhi kurva pertumbuhan dan mengakibatkan perbedaan ekspresi gen. Sedangkan, apabila konsentrasi sel *C. albicans* di atas 10^5 sel/ml diteruskan ke tahap isolasi mRNA. Pada penelitian yang dilakukan jumlah sel yang dipergunakan untuk semua sampel adalah sama (10^5 sel/ml).

Pada penelitian ini RNA diisolasi dengan menggunakan reagen *TRIzol* (invitrogen) karena reagen ini mampu menjaga integritas RNA pada saat melisiskan sel dan melarutkan komponen-komponen sel. Isolasi RNA yang dilakukan terdiri dari beberapa tahap yaitu :

1. Tahap homogenisasi (*homogenization*)

Kultur sel sebanyak 250 μ l dengan konsentrasi 10^5 sel/ml disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu

4°C untuk memisahkan materi tidak larut dari sel. Reagen *Trizol* sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung mikro yang mengandung sel untuk melisiskan sel lalu disentrifugasi selama 10 menit dan disimpan pada suhu 4°C sampai proses berikutnya.

2. Tahap pemisahan (*separation phase*)

Ekstrak *C. albicans* yang telah homogen diinkubasikan selama 5 menit pada suhu 30 °C lalu ditambahkan 200 µl kloroform. Tabung mikro dikocok dengan menggunakan tangan selama 15 detik dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C sehingga terbentuk 4 lapisan dari yang paling atas sampai paling bawah yaitu lapisan bening (supernatan) yang mengandung ± 60% RNA, *interphase*, lapisan fenol-kloroform, dan lapisan endapan merah muda yang mengandung ± 40% DNA. Kemudian lapisan bening dipindahkan ke dalam tabung mikro baru untuk dilanjutkan ke tahapan berikutnya.

3. Tahap pengendapan RNA (*RNA precipitation*)

Lapisan bening (paling atas) dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru, sementara sisa tiga lapisan di bawahnya dibuang. Lalu, ke dalam tabung tersebut dimasukkan 0,5 ml isopropanol, diinkubasikan pada suhu 30°C selama 10 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10

menit pada suhu 4°C. Endapan RNA akan terlihat di sisi dan dasar tabung mikro berupa *pellet* putih-transparan.

4. Tahap pencucian (*RNA wash*)

Cairan supernatan yang terbentuk dibuang dan endapan RNA dicuci dengan 1 ml etanol 75%, divorteks dan disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

5. Tahap pelarutan RNA (*redissolving the RNA*)

RNA yang diperoleh dari hasil pencucian dikering anginkan selama 10 menit dengan cara membuka tutup tabung mikro sehingga isopropanol menguap. RNA dilarutkan dengan penambahan 25µl DEPC *water*. Setelah itu, RNA diinkubasikan selama 10 menit pada suhu 60°C lalu disimpan pada refrigator bersuhu -20°C sampai digunakan.

H. Amplifikasi gen SAP 4-6 dan *housekeeping gene* 18S rRNA dengan menggunakan RT-PCR

Amplifikasi gen SAP 4-6 dilakukan dengan menggunakan metode *two-step* dengan langkah-langkah seperti yang diuraikan berikut ini: Gen diamplifikasi dengan menggunakan mesin PCR *mastercycler* personal 5332 dan kit RobusT™ II RT-PCR (Thermo). Komposisi campuran cDNA yang digunakan adalah 10x *buffer* 5 µl, MgCl₂ 1,5 µl, oligodT 1 µM 1 µl, dNTP 1µl, MmLV 2 µl, isolat RNA 1 µl, dan

H₂O 38,5 µl, sehingga total volume larutan campuran pada tiap tabung mikro adalah 50 µl.

Amplifikasi gen untuk mengubah RNA menjadi cDNA dilakukan dengan program sebagai berikut : satu siklus sintesis DNA pada suhu 60°C selama 30 menit, satu siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, kemudian program selanjutnya 35 siklus masing-masing dengan tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, tahap *annealing* pada suhu 50°C selama 1 menit dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Satu siklus elongasi akhir pada suhu 72°C selama 2 menit.

Tahapan selanjutnya adalah proses amplifikasi kedua menggunakan mesin PCR *mastercycler* personal 5332 dan kit Fermentas (Cat. No. # K1081). Komposisi larutan campuran PCR kedua adalah 2x *reaction mix* 12,5 µl, primer *forward* 1 µl, primer *reverse* 1 µl, hasil amplifikasi RT PCR 5 µl, dan *aquabidest* steril 5,5 µl sehingga total volume campuran pada tiap tabung mikro adalah 25 µl.

Amplifikasi gen tahap kedua dilakukan dengan program sebagai berikut : satu siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama 4 menit, kemudian program selanjutnya 30 siklus masing-masing dengan tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, tahap *annealing* pada suhu 51°C selama 30 detik dan elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik. Satu siklus elongasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Produknya disimpan pada suhu -20°C kemudian hasil

PCR ini siap untuk dilanjutkan ke tahapan selanjutnya yaitu elektroforesis.

I. Elektroforesis untuk visualisasi hasil deteksi ekspresi gen *SAP 4-6* dan *housekeeping gene 18S rRNA*

Metode elektroforesis dilakukan untuk memvisualisasikan hasil deteksi gen *SAP 4-6* dan *housekeeping gene* pada gel agarosa dengan voltase 100 V. Metode ini diawali dengan membuat 250 ml larutan buffer TAE 1x dengan cara mencampurkan 50 ml TAE 50x kedalam 245 ml akuades. Kemudian membuat gel agarose 1% dengan cara menimbang 0,2 gr agarose untuk dilarutkan ke dalam buffer TAE 1x sampai volume 20 ml dan selanjutnya dilarutkan sampai sempurna.

Larutan agarose kemudian dimasukkan kedalam baki gel agarose kemudian sisir elektroforesis dipasangkan pada salah satu ujung baki dengan posisi menyentuh dasar baki. Ketika suhunya sudah turun sampai ± 50 °C, tambahkan 1 μ l larutan etidium bromid. Larutan agarose kemudian dihomogenkan sebentar dan dibiarkan memadat. Setelah terbentuk gel yang padat sisir elektroforesis di angkat dan gel agarosa ditempatkan kedalam tangki yang berisi larutan buffer TAE 1x.

Tahapan selanjutnya disiapkan 5 cm kertas parafilm dan tempatkan di dekat tangki elektroforesis. Kemudian dimasukkan 10 μ l sampel cDNA dan 2 μ l *loading dye* 6x ke dalam sumuran gel agarose dengan

cara mencampurkan kedua bahan tersebut terlebih dahulu secara merata pada kertas parafilm menggunakan mikropipet. Selanjutnya, dinyalakan sumber arus dan atur voltase serta waktu *running* pada angka 100 V dan 45 menit. Ketika *running* sudah selesai gel agarosa dikeluarkan dan diletakkan di atas UV transluminator. Selanjutnya, nyalakan UV transluminator dan amati pita DNA yang tervisualisasi. Pita DNA yang tervisualisasi pada gel agarose kemudian hasilnya dianalisis.

J. Analisis statistik

Analisis statistik yang digunakan pada penelitian ini menggunakan uji Mann-Whitney dan Kruskal-Wallis (Hernawan, 2012).

K. Analisis data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah secara deskriptif dan kuantitatif yaitu dengan cara menguraikan hasil penelitian berdasarkan data yang diperoleh secara menyeluruh dan analisis statistik.

BAB V

HASIL DAN

PEMBAHASAN

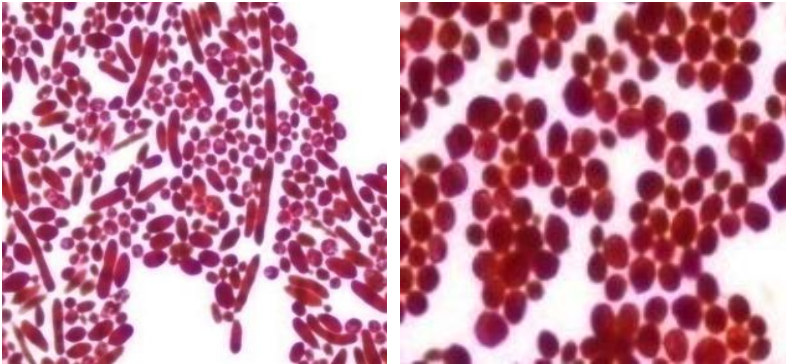


BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi selektif khamir *C. albicans*

Sebanyak 98 sampel bersedia terlibat dalam penelitian untuk *screening C. albicans* pada rongga mulut. Sampel untuk isolasi *C. albicans* yang berasal dari orang sehat diambil dari rongga mulut dan seluruh sampel penelitian kemudian ditumbuhkan pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA). Isolat yang berasal dari sampel orang sehat selanjutnya diseleksi secara morfologis dengan menggunakan teknik isolasi selektif sehingga diperoleh 23 isolat yang merupakan anggota genus *Candida* dengan morfologi sel seperti pada Gambar 7.



(a)

(b)

Gambar 7. Morfologi sel anggota genus *Candida* yang berasal dari orang sehat (a) *C. albicans* bentuk selnya ada yang bulat, lonjong, bulat lonjong (b) *C. tropicalis* bentuk selnya bulat.

Gambar 7. menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bentuk sel antara strain anggota spesies *C. albicans* dengan anggota genus *Candida* yang lain di antaranya *C. tropicalis*. Sel strain *C. albicans* memiliki karakter khusus antara lain bentuknya berupa bulat, lonjong, dan bulat lonjong dengan ukuran $2-5 \mu\text{m} \times 3-6 \mu\text{m}$ sampai $2-5,5 \mu\text{m} \times 5-28 \mu\text{m}$ (Tyasrini, 2006). Hal ini disebabkan karena *C. albicans* merupakan jamur dimorfik yang dipengaruhi oleh faktor eksternal sehingga bentuk selnya dapat berubah-ubah yaitu sel khamir, *pseudohifa*, dan hifa (Sudbery *et al.*, 2004). Meskipun demikian, kadang-kadang antara strain anggota genus *Candida* secara morfologi tidak dapat dibedakan. Oleh karena itu, diperlukan deteksi dan identifikasi strain *C. albicans* lebih lanjut.

B. Deteksi dan identifikasi isolat *C. albicans*

Isolat yang teridentifikasi sebagai anggota genus *Candida* dideteksi pada media *CHROMagar* sehingga dapat diperoleh isolat yang merupakan *C. albicans* berdasarkan warna koloni yaitu permukaan koloninya tampak halus, berwarna hijau dikelilingi halo yang kehijauan (Gambar 8). Isolat yang teridentifikasi sebagai *C. albicans* dari orang sehat (Tabel 1).



Gambar 8. Deteksi dan identifikasi *C. albicans* pada media *CHROMagar*

Gambar 8. merupakan hasil deteksi dan identifikasi *C. albicans* pada media *CHROMagar* yang menunjukkan bahwa isoat *C. albicans* warna koloninya tampak kehijauan pada media *CHROMagar* sedangkan yang warna koloninya tampak biru gelap adalah *C. tropicalis* (Odds & Bernaerts, 1994).

Tabel 1. Isolat *C. albicans* komensal yang ditemukan pada orang sehat.

No.	Sumber Isolat	Kode Isolat
1.	Sampel Perempuan	CK 29
2.	Sampel Perempuan	CK 32
3.	Sampel Perempuan	CK 34
4.	Sampel Perempuan	CK 37
5.	Sampel Laki-laki	CK 49
6.	Sampel Laki-laki	CK 55
7.	Sampel Perempuan	CK 68
8.	Sampel Perempuan	CK 69
9.	Sampel Laki	CK 71
10.	Sampel Laki	CK 74
11.	Sampel Laki	CK 77
12.	Sampel Perempuan	CK 89
13.	Sampel Perempuan	CK 95
14.	Sampel Perempuan	CK 96
15.	Sampel Perempuan	CK 97
Total		15 Isolat

Tabel 1. menunjukkan bahwa dari 23 isolat yang berasal dari orang sehat yang teridentifikasi

sebagai anggota genus *Candida* terdapat 15 isolat yang merupakan *C. albicans*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa *C. albicans* dapat ditemukan sebanyak $\pm 60\%$ pada sebuah populasi sampel yang mendukung keberadaanya sebagai mikrobiota normal (Simatupang, 2009; Riskillah, 2010).

C. Frekuensi *C. albicans* pada populasi sampel

Persentase hasil identifikasi anggota genus *Candida* pada orang sehat dari 23 sampel yang teridentifikasi sebagai anggota genus *Candida* menunjukkan lebih dari 60% merupakan *C. albicans* dan sisanya adalah *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, dan *C. krusei* (Tabel 2).

Tabel 2. Distribusi isolat anggota genus *Candida* pada rongga mulut orang sehat

No.	Nama Spesies	Jumlah (n)	Persentase
1.	<i>C. albicans</i>	15 orang	64,29 %
2.	<i>C. tropicalis</i>	4 orang	17,86 %
3.	<i>C. glabrata</i>	2 orang	10,71 %
4.	<i>C. parapsilosis</i>	1 orang	3,57 %
5.	<i>C. krusei</i>	1 orang	3,57 %
Total		23 orang	100 %

Tabel 2. menunjukkan bahwa anggota genus *Candida* merupakan mikrobiota normal tubuh yang banyak ditemukan terutama di daerah mukosa (Riskillah, 2010) antara lain rongga mulut (Brown *et al.*, 2005). Menurut hasil penelitian Odds & Bernaerts,

(1994) anggota genus *Candida* yang banyak ditemukan di rongga mulut adalah *C. albicans* (64,29%), *C. tropicalis* (17,86%), *C. glabrata* (10,71%), serta *C. parapsilosis* dan *C. krusei* (3,57%). Hal tersebut senada dengan pernyataan Molero *et al.* (1998) *C. albicans* adalah jamur dimorfik yang banyak ditemukan pada rongga mulut, vagina, dan saluran pencernaan.

Strain anggota spesies *C. albicans* yang teridentifikasi berasal dari populasi sampel yang dapat dikelompokkan berdasarkan jenis kelaminnya (Tabel 3), jenis pekerjaannya (Tabel 4), dan umurnya (Tabel 5).

Tabel 3. Persentase sampel yang membawa *C. albicans* komensal pada orang sehat

Jenis Kelamin	Total Sampel	Membawa <i>C. albicans</i>	Persentase (%) <i>C. albicans</i>
Laki-laki	40 orang	5	12,50
Perempuan	58 orang	10	17,24

Pengelompokkan sampel berdasarkan sumber jenis kelaminnya menunjukkan perbandingan yang tidak terlalu jauh antara laki-laki dengan perempuan. Akan tetapi, hasil isolasi dari keseluruhan sampel yang membawa *C. albicans* menunjukkan bahwa 67% isolat yang tumbuh berasal dari sampel perempuan

dan sisanya 33% berasal dari sampel laki-laki (Tabel 4).

Tabel 4. Distribusi *C. albicans* komensal pada orang sehat berdasarkan jenis kelamin

Jenis Kelamin	Membawa <i>C. albicans</i> pada Rongga Mulut	Persentase (%)
Laki-laki	5 orang	33,00
Perempuan	10 orang	67,00

Tabel 4 menunjukkan bahwa *C. albicans* komensal lebih banyak terdapat pada perempuan. Akan tetapi, meskipun demikian secara statistik tidak ada perbedaan yang signifikan yang menunjukkan ditemukannya isolat *C. albicans* di antara kedua sampel tersebut (Lampiran 3). Karakteristik lain yang dapat dilihat adalah berdasarkan jenis pekerjaan yang dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Persentase sampel yang membawa *C. albicans* berdasarkan jenis pekerjaan

Jenis Pekerjaan	Jumlah	Persentase (%)	Positif <i>C. albicans</i> pada Rongga Mulut
Buruh	23 orang	23,47	2 orang
Petani	5 orang	5,10	2 orang
Ibu Rumah Tangga	21 orang	21,43	4 orang
Mahasiswa/Pelajar	44	44,90	7 orang

PNS/Guru	5 orang	5,10	-
----------	---------	------	---

Pengelompokkan isolat yang diperoleh pada sampel menurut jenis pekerjaannya menunjukkan bahwa 46,67% isolat yang tumbuh berasal dari sampel yang memiliki latar belakang pekerjaan sebagai mahasiswa/pelajar. Tabel 5. menunjukkan tidak ada keterkaitan antara tingkat pendidikan dengan kecenderungan budaya hidup bersih dalam kehidupan sehari-hari sehingga masyarakat yang memiliki latar belakang pekerjaan lebih baik tidak berarti memiliki tingkat kebersihan lebih baik. Hal ini sejalan dengan penelitian Sariningrum dan Irdawati (2009) yang menyatakan bahwa tidak ada hubungan yang signifikan antara tingkat pendidikan orang tua dengan kejadian karies pada anak balita di PAUD Jatipurno. Padahal, menurut Rini (2002) tingkat pendidikan merepresentasikan tingkat kemampuan seseorang dalam memperoleh dan memahami informasi kesehatan, sehingga semakin tinggi tingkat pendidikan diasumsikan semakin baik tingkat pemahamannya terhadap informasi kesehatan yang diperolehnya. Sementara itu, apabila dilihat berdasarkan usia sampel maka diperoleh data sebagai berikut (Tabel 6).

Tabel 6. Persentase sampel yang membawa *C. albicans* berdasarkan umur

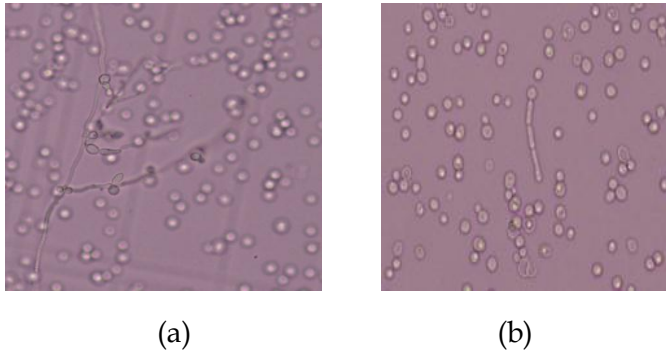
Umur	Jumlah	Membawa <i>C. albicans</i> pada Rongga Mulut	Persentase (%)
20-29	49 orang	8 orang	50,00
30-39	24 orang	2 orang	24,49
40-49	14 orang	3 orang	14,29
50-59	9 orang	-	9,18
60-69	2 orang	2 orang	2,04

Tabel 6. menunjukkan bahwa isolat *C. albicans* yang tumbuh 53% berasal dari sampel yang berumur 20-29, 13,33% berasal dari sampel yang berumur 30-39, 20% berasal dari sampel yang berumur 40-49, dan 13,33% berasal dari sampel yang berumur 60-69. Hal tersebut menunjukkan bahwa kebersihan rongga mulut tidak berkaitan dengan umur seseorang. Padahal, dapat diasumsikan semakin tinggi umur seseorang kondisi rongga mulut semakin rusak dengan berkurangnya gigi sehingga kebersihan mulut semakin kurang terjaga. Hal tersebut didukung oleh pendapat Anonim (2013) yang menyatakan bahwa pada usia lanjut seseorang tidak lagi memperhatikan dan menjaga kesehatan giginya secara baik diakrenakan kesehatan fisiknya yang terganggu. Oleh karena itu, dapat dinyatakan orang yang semakin tua semakin rentan terkena segala penyakit di antaranya penyakit pada rongga mulut.

D. Analisis Ekspresi Gen *Secreted Aspartyl Proteinase 4-6* dan *housekeeping gene 18S rRNA*

1. Deteksi ekspresi gen dengan pengamatan pembentukan hifa
 - a. Morfologi hifa

Deteksi ekspresi gen SAP 4-6 secara morfologi menunjukkan isolat yang berasal dari kedua sumber (penderita HIV dan orang sehat) dapat terekspresi. Meskipun demikian, isolat dari kedua sumber memiliki bentuk morfologi yang sedikit berbeda (Gambar 9).

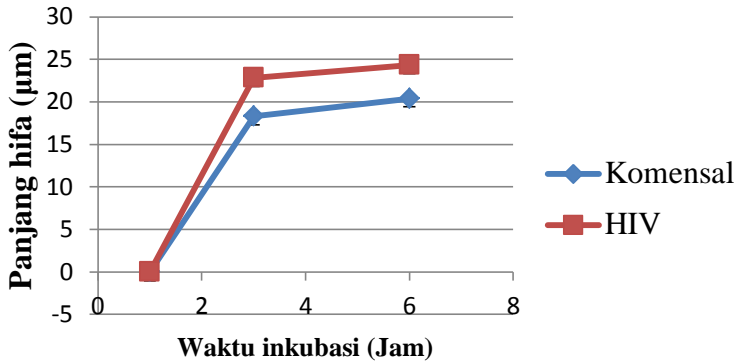


Gambar 9. Pengamatan Morfologi *C. albicans* selama 1 jam. (a) isolat yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif (CH3) (b) isolat yang berasal dari komensal pada orang sehat (CK68).

Gambar 9. menunjukkan bahwa hifa yang terbentuk pada isolat yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif memiliki bentuk yang cukup kompleks karena hifa yang terbentuk pada isolat yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif hifa yang terbentuk cukup tidak hanya satu dan sudah ada yang berbentuk pseudohifa, sedangkan pada isolat yang berasal dari orang sehat memiliki bentuk yang cukup sederhana karena pada waktu inkubasi yang bersamaan baru terbentuk satu hifa pendek. Hal tersebut berkaitan erat dengan kecepatan morfogenesis hifa pada kedua sumber isolat.

b. Ukuran hifa

Ukuran hifa *C. albicans* diamati dengan cara menumbuhkannya pada media RPMI. 1640 Hasil penelitian menunjukkan ukuran hifa *C. albicans* yang berasal dari orang sehat lebih pendek dibandingkan dengan yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif (Gambar 10)



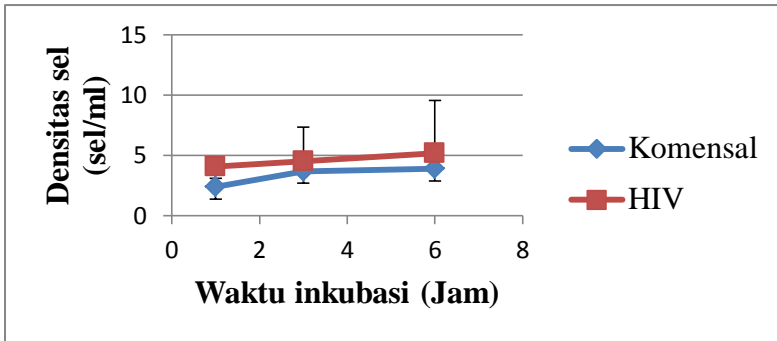
Gambar 10. Rerata panjang hifa isolat *C. albicans* yang berasal dari penderita HIV positif dan komensal pada orang sehat dengan waktu inkubasi 1 jam, 3 jam, dan 6 jam.

Gambar 10. yang menunjukkan bahwa panjang hifa isolat *C. albicans* yang berasal dari penderita HIV positif lebih panjang dibandingkan dengan yang komensal pada orang sehat. Hasil tersebut didukung oleh hasil uji analisis statistik yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara panjang hifa pada isolat *C. albicans* yang berasal dari penderita *Candidiasis Oral* HIV positif dengan komensal pada orang sehat (Lampiran 5). Selain itu, hasil tersebut didukung pula oleh penelitian Gruber *et al.* (1999) yang menyatakan bahwa ukuran hifa isolat *C. albicans* yang berasal dari penderita HIV-1 lebih panjang dibandingkan dengan yang komensal pada orang normal. Jadi, ukuran panjang hifa yang

berasal dari penderita HIV berbeda secara signifikan dibandingkan dengan yang berasal dari orang sehat.

c. Kecepatan pembentukan hifa

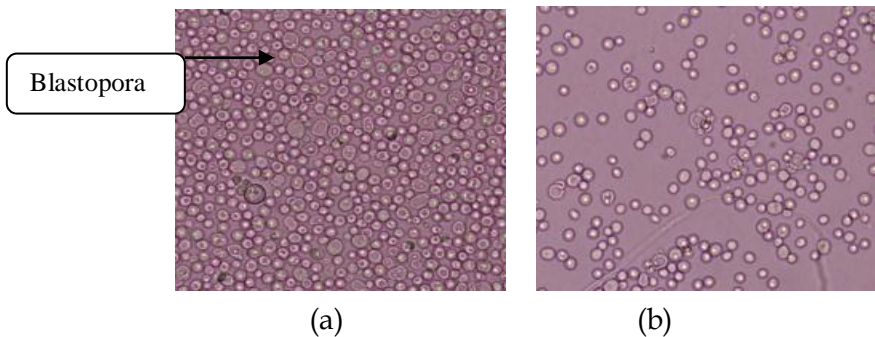
Pembentukan hifa merupakan perubahan bentuk morfologi *C. albicans* sebagai penanda invasi (Kusumaningtyas, 2008). Perubahan bentuk tersebut sangat dipengaruhi oleh lingkungan selinang yang terdeteksi oleh *C. albicans* selama proses invasi (Brown & Gow, 1999). Akan tetapi, perubahan bentuk morfologi tersebut dapat diamati secara *in vitro* dengan menggunakan penambahan serum pada media (Uwamahoro & Traven, 2010). Hasil pengamatan yang dilakukan pada kedua isolat yang berbeda (*candidiasis oral* HIV positif dan komensal pada orang sehat) dengan periode inkubasi yang berbeda (1 jam, 3 jam dan 6 jam) menunjukkan bahwa perbedaan jumlah sel (Gambar 9), bentuk dan perubahan morfologi (Gambar 12; Gambar 13; Gambar 14).



Gambar 11. Rerata densitas sel *C. albicans* yang berasal dari penderita HIV positif dan komensal pada orang sehat dengan waktu inkubasi 1 jam, 3 jam, dan 6 jam.

Gambar 11. menunjukkan bahwa densitas sel *C. albicans* yang berasal dari isolat *candidiasis oral* HIV positif memiliki rerata yang lebih banyak dibandingkan dengan isolat yang komensal pada orang sehat pada waktu inkubasi 1 jam, 3 jam, dan 6 jam. Hasil ini didukung oleh uji analisis statistik yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara keduanya (Lampiran 3). Selain itu, hasil di atas juga didukung oleh hasil penelitian Gruber *et al.* (1999) pada sumber HIV-1 dan orang normal yang menunjukkan bahwa densitas sel pada isolat yang berasal dari pasien HIV-1 lebih banyak dibandingkan yang normal.

Merujuk hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 12. sampai 14. selain densitas sel yang berbeda, kedua sumber isolat juga menunjukkan perbedaan bentuk dan kecepatan perubahan morfologis sel *C. albicans* dari bentuk satu sel menjadi pseudohifa kemudian hifa pada waktu inkubasi yang berbeda.

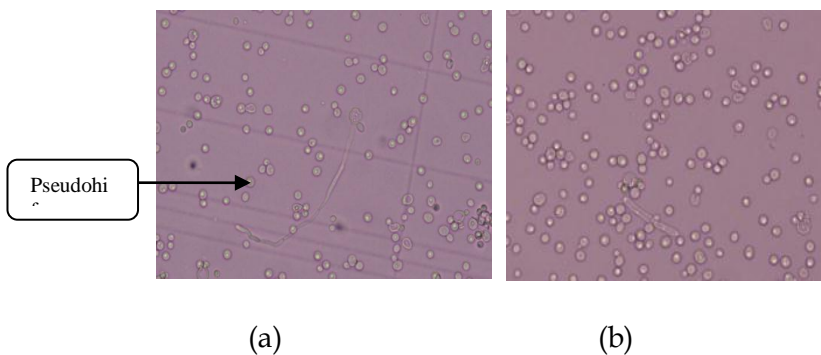


Gambar 12. Sel *C. albicans* pada waktu inkubasi 1 jam. (a) isolat CH3 yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif membentuk blastopora (tanda \longrightarrow) lebih banyak (b) isolat CK68 yang berasal dari komensal pada orang sehat membentuk blastopora lebih sedikit.

Hasil pengamatan pada kedua isolat selama inkubasi 1 jam pertama menunjukkan bahwa sel atau *germ tube* yang terbentuk pada isolat yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV-Positif (CH3) bentuknya bulat dengan

jarak antar sel sangat dekat dan terdapat beberapa sel yang lonjong. Akan tetapi, ciri khas pada isolat CH3 bagian tengah sel tampak seperti noktah atau lingkaran yang menunjukkan bahwa selnya akan segera membelah membentuk sel baru. Sementara, pada isolat yang komensal pada orang sehat (CK68) bentuk selnya bulat, memiliki jarak antar sel yang terbentuk tidak terlalu dekat, serta jarang terdapat sel yang lonjong. Pada isolat CK68 hanya sedikit sel yang tampak seperti akan membelah.

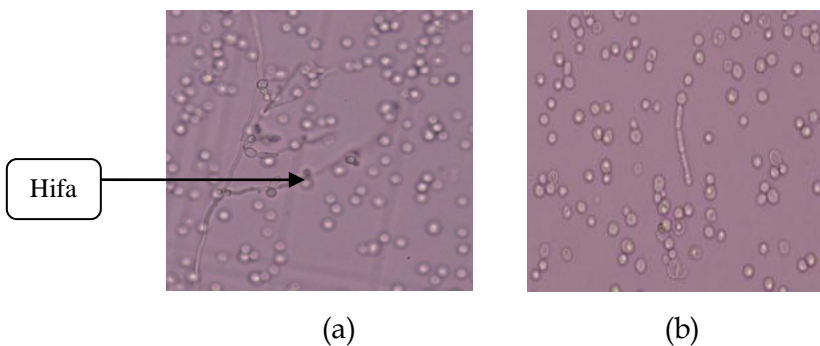
Pengamatan selanjutnya dilakukan setelah sel diinkubasikan selama 3 jam kemudian. Hasilnya menunjukkan isolat CH3 sudah banyak yang membelah menjadi dua sel bahkan ada yang tiga sel, sementara pada isolat CK68 hanya sebagian kecil yang sudah membelah (Gambar 13).



Gambar 13. Bentuk hifa *C. albicans* pada waktu inkubasi 3 jam. (a) isolat CH3 yang berasal dari penderita *candidiasis oral*

HIV positif telah membentuk pseudohifa (tanda →) (b) isolat CK68 yang berasal dari komensal pada orang sehat yang belum membentuk pseudohifa .

Hasil pada gambar 13 menunjukkan isolat yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif (CH3) lebih cepat membelah dibandingkan (sudah membentuk pseudohifa) isolat komensal pada orang sehat (CK68). Hal tersebut dimungkinkan karena isolat yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif (CH3) telah mengalami perubahan genetik (karena telah bercampur dengan materi genetik virus) yang menyebabkan isolat tersebut lebih agresif dalam membelah (Uwamahoro & Traven, 2010).



Gambar 14. Hifa *C. albicans* pada waktu inkubasi 6 jam. (a) isolat CH3 yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif

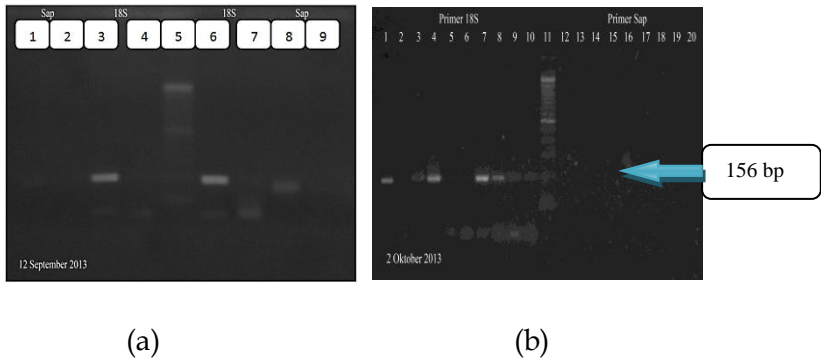
membentuk hifa dengan ukuran lebih panjang dan bercabang (tanda →) (b) isolat CK68 yang berasal dari komensal pada orang sehat membentuk hifa dengan ukuran lebih pendek dan tidak bercabang (tanda →).

Hasil pengamatan hifa setelah diinkubasikan selama 6 jam menunjukkan isolat yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif (CH3) sudah membentuk hifa sementara isolat komensal pada orang sehat (CK68) masih dalam bentuk pseudohifa (Gambar 14). Hal tersebut dapat diasumsikan bahwa isolat yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif lebih cepat mengalami morfogenesis dibandingkan dengan isolat komensal pada orang sehat. Berkenaan dengan hal tersebut Gruber *et al.* (1999) menyatakan bahwa morfogenesis yang terjadi pada isolat yang berasal dari pasien penderita HIV-1 lebih cepat dibandingkan isolat pada orang normal sehingga ukuran hifa yang dibentuk juga lebih panjang dibandingkan yang normal. Hal ini disebabkan oleh adanya materi genetik lain dari virus penyebab HIV yang memungkinkan dapat meningkatkan agresifitas *C. albicans* (Sobel *et al.*, 2001).

2. Deteksi ekspresi gen secara molekular dengan RT-PCR

Hasil RT-PCR pada isolat *C. albicans* dari 30 isolat yang diteliti, hanya satu isolat yang mengekspresikan SAP 4-6, yaitu isolat CH3 (Gambar 8). Hasil ini menunjukkan bahwa secara molekular hanya ada satu isolat (CH3) yang berasal dari penderita *candidiasis oral* HIV positif yang dapat mengekspresikan gen SAP 4-6. Hal ini berkebalikan dengan hasil analisis morfologi yang menunjukkan semua gen terekspresi (Gambar 9). Oleh karena itu, hasil ini (Gambar 15) tidak sesuai dengan pernyataan Taylor *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa induksi sel hospes terhadap ekspresi gen SAP 4 dan SAP 5 menyebabkan perubahan morfologi *C. albicans* dari bentuk khamir ke bentuk hifa dan secara bersama-sama SAP 4, SAP 5, dan SAP 6 bertanggungjawab pada virulensi (Kusumaningtyas, 2008). Selain itu, hal ini justru mengindikasikan bahwa *Secreted Aspartyl Proteinase* (SAP) tidak dimiliki oleh semua strain anggota spesies padahal menurut Naglik *et al.* (2003) SAP dimiliki oleh semua strain anggota spesies *C. albicans* yang berperan sebagai faktor virulensi (Tyasrini *et al.*, 2006). Ada beberapa faktor yang dianggap mempengaruhi hasil akhir RT-PCR antara lain: (i) komposisi media penginduksi kurang tepat untuk dapat menginduksi gen SAP 4-6 pada isolat *C. albicans* yang dijadikan sampel (MacDonald & Odds, 1980; Gruber *et al.*, 1999; Staib *et al.*, 2000), dan (ii) ada

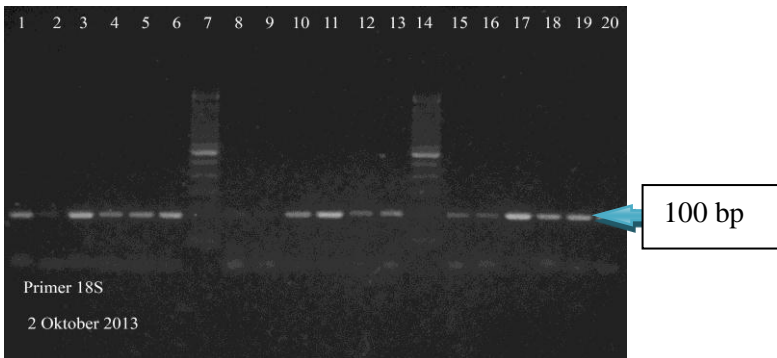
kemungkinan tidak semua gen SAP 4-6 dapat terekspresi (Felk *et al.*, 2002; Staib *et al.*, 2000).



Gambar 15. Visualisasi elektroforegram gen SAP 4-6 isolat *C. albicans* menggunakan metode RT-PCR. (a) Isolat CH3 dan CK80 yang menunjukkan bahwa pada isolat CH3 SAP 4-6 terekspresi (b) Isolat *C. albicans* yang tidak mengekspresikan SAP 4-6. Ket : Gambar (a) lajur 1 isolat CK80; lajur 2 isolat CH3 yang diamplifikasi 35 kali menggunakan primer SAP 4-6; lajur 3 isolat CK80; lajur 4 isolat CH3 yang diamplifikasi 35 kali menggunakan primer 18S rRNA; lajur 5 *loading control*; lajur 6 isolat CH3; lajur 7 isolat CK80 yang diamplifikasi 40 kali menggunakan primer 18S rRNA; lajur 8 isolat CH3; lajur 9 isolat CK80 yang diamplifikasi 40 kali menggunakan primer SAP 4-6. Gambar (b) lajur 1 isolat CK29; lajur 2 isolat CK32; lajur 3 isolat CK37; lajur 4 isolat CK49; lajur 5 isolat CK55; lajur 6 isolat CK68; lajur 7 isolat CK69; lajur 8 isolat CK 71; lajur 9 isolat CK74; lajur 10

isolat CK77 yang diamplifikasi menggunakan primer 18S rRNA menunjukkan gen 18S rRNA terekspresi; lajur 11 *loading control*; lajur 12 isolat CK29; lajur 13 isolat CK32; lajur 14 isolat CK37; lajur 15 isolat CK49; lajur 16 isolat CK55; lajur 17 isolat CK68; lajur 18 isolat CK69; lajur 19 isolat CK 71; lajur 20 isolat CK74; lajur 21 isolat CK77 yang diamplifikasi menggunakan primer SAP 4-6 menunjukkan gen SAP 4-6 tidak terekspresi.

Untuk memastikan bahwa RNA yang diisolasi memiliki jumlah dan kualitas yang baik serta prosedur RT-PCR yang dilakukan tepat maka dilakukan PCR gen 18 S rRNA sebagai *loading control*. Hasil PCR gen 18 S rRNA dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Visualisasi gen 18S rRNA isolat *C. albicans* menggunakan metode PCR. Ket: lajur 1 isolat CH1; lajur 2 isolat CH2; lajur 3 isolat CH4; lajur 4 isolat CH5; lajur 5 *loading contro*; lajur 6

isolat CH6; lajur 7 isolat CH7; lajur 8 isolat CH8; lajur 9 isolat CH9; lajur 10 isolat CH10; lajur 11 isolat CH11; lajur 12 isolat CH12; lajur 13 isolat CH13; lajur 14 *loading control*; lajur 15 isolat CH14; lajur 16 isolat CH15; lajur 17 isolat CK89; lajur 18 isolat CK95; lajur 19 isolat CK 96; lajur 20 isolat CK97; yang diamplifikasi menggunakan primer 18S rRNA menunjukkan gen 18S rRNA terekspresi.

Berdasarkan hasil PCR semua isolat mengekspresikan gen 18S rRNA. Hal tersebut berarti bahwa metode yang digunakan sudah dapat diandalkan (Madigan *et al.*, 2013). Jadi, dapat disimpulkan bahwa deteksi ekspresi gen SAP 4-6 secara molekular hanya satu isolat yang berasal dari sampel penderita HIV (CH3) yang terekspresi, sedangkan isolat yang berasal dari orang sehat tidak ada yang terekspresi.

BAB VI
SIMPULAN DAN
SARAN



BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Frekuensi kolonisasi *C. albicans* pada orang sehat diperoleh sebanyak $\pm 15\%$ dari total sampel sebanyak 98 orang.
2. Gen SAP 4-6 *C. albicans* yang diisolasi dari rongga mulut penderita infeksi HIV hanya terekspresi satu isolat dengan pita tipis yang tampak (CH3) sedangkan gen SAP 4-6 *C. albicans* yang diisolasi dari rongga mulut orang sehat tidak terekspresi secara *in vitro*.
3. Terdapat perbedaan ekspresi gen SAP 4-6 di antara *C. albicans* yang diisolasi dari rongga mulut penderita infeksi HIV dan orang sehat.
4. Ukuran dan kecepatan pembentukan hifa isolat *C. albicans* yang terbentuk dari penderita infeksi HIV memiliki perbedaan yang signifikan berdasarkan analisis statistik.

B. Saran

Saran yang dapat diberikan setelah melakukan penelitian ini antara lain adalah :

1. Untuk melakukan penelitian yang menggunakan sampel manusia disarankan untuk mengajukan *ethical approval* sesegera mungkin sehingga penelitian dapat segera dimulai.
2. Untuk menganalisis ekspresi gen yang dilakukan secara *in vitro* upayakan kondisi media sesuai dengan kondisi secara *in vivo* karena kondisi lingkungan sangat berpengaruh pada kondisi protein dan enzim.
3. Agar penelitian berlangsung lancar, apabila menggunakan teknik RT-PCR disarankan untuk lebih hati-hati dan teliti pada saat isolasi RNA karena RNA lebih cepat dibandingkan DNA. Sehingga tidak membutuhkan waktu lama untuk berulang mengisolasi sampel (RNA).
4. Hasil penelitian ekspresi gen SAP 4-6 secara molekular menunjukkan hanya satu isolat yang berasal dari penderita HIV positif yang dapat mengekspresikan gen SAP 4-6, sementara secara morfologi baik isolate yang berasal dari penderita HIV positif maupun orang sehat dapat membentuk hifa. Dalam hal ini pembentukan hifa menunjukkan bahwa gen SAP 4-6 dapat terekspresi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk dapat menjawab permasalahan tersebut.

DAFTAR PUSTAKA



DAFTAR PUSTAKA

- Ahira, A. 2013. *10 Penyakit Mematikan*.
<http://www.anneahira.com/penyakit-penyakit.htm> [diakses 22 April 2013].
- Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J.R., Schaller, M., Piet de Groot., MacCallum, D., Odds, F.C., Schäfer, W., Klis, F., Monod, M., & Hube, B. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteases of *Candida albicans* Target Proteins Necessary for Both Cellular Processes and Host-Pathogen Interactions. *J. Biol. Chem.* **281** (2): 688-694.
- Ali, A.S. 2008. *Oral Immune Defense Against Chronic Hyperplastic Candidosis*. Dissertation. Finland: University of Helsinki.
- Anonim. 2008. *Subtipe, Tipe, Golongan dan Jenis HIV*. [diakses 9 Desember 2014].
- Anonim. 2010. *Deteksi Gen Menggunakan Real Time PCR (qPCR)*. Bogor: Uninformation.

Anonim. 2011. *Statistik Kasus HIV/AIDS di Indonesia*.
[diakses12Desember 2013].

Anonim. 2013a. *Hubungan Usia dengan Tingkat Kesehatan Rongga Mulut*.
<http://wordpress.com/artikel/gigidan>
kebersihannya [diakses 12 Desember 2013].

Anonim. 2013b. *Efektifitas Flukonazol dalam Pengobatan Kandidiasis Oral dihubungkan dengan Spesies Penyebab*. USU. Medan

Anonim. 2014. *Statistik Kasus HIV/AIDS di Indonesia*.
[diakses14September 2014].

Arianaga, E., Hayu, P.F., Wulandani, I., Tyas, D. U., Nurul,P. A. 2012.*Candidiasis : Patogenesis dan Patogenesitas*. Fakultas Kedokteran Hewan.

Bae, G. V., Lee, H. W., Chang, S. E., Moon, K. C., Lee, M. W., Choi, J. H., & Koh, J. K. 2005. Clinicopathologic Review of 19 Patients with Systemic Candidiasis with Skin Lesions. *Int. J. Dermathol.* **44**(7): 550-555.

Barrett, A. J. 1980. *Introduction: the Classification of Proteinases*. In Symposium on Protein Degradation in Health and Disease. *Excepta Medica: Amsterdam.The Netherlands*. p.1-13.

- Biswas, S.K & Chaffin, W.L. 2005. Anaerobic Growth of *Candida albicans* does not Support Biofilm Formation under Similar Condition used for Aerobic Biofilm. *Curr. Microbiol.* **51** (2) : 100-4
- Borelli, C., Ruge, E., Lee, J. H., Schaller, M., Vogelsang, A., Monod, M., Korting, H. C, Huber, R., & Maskos, K. (2008). *Proteins.* **72**: 1308. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=103682> [diakses 22 April 2013].
- Brawner, D. L. & Cutler, J. E. 1989. Oral *Candida albicans* Isolates from Nonhospitalized Normal Carriers, Immunocompetent Hospitalized Patient, and Immunocompromised Patient with or without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **27**(6): 1335-1341.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse S. A. 2004. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 23rd Edition. Singapore : McGraw-Hill. p. 39-40, 58-9, 431-4.
- Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. 1999. Regulatory Networks Controlling *Candida albicans* Morphogenesis. *Trends Microbiol.* **7**: 333-38.
- Brown, M. R., Thompson, C. A., & Mohamed, F. M. 2005. Systemic Candidiasis in an Apparently

- Immunocompetent Dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**(3): 272-6.
- Brzozowski, T., Zwolinska-Weislo, M., Konturek, P. C., Kwiecien, S., Drozdowicz, D., Konturek, S. J., Stachura, J., Budak, A., Bogdal, J., Pawlik, W. W., and Habn, E. G. 2005. Influence of Gastric Colonization with *Candida albicans* on Ulcer Healing in Rats: Effect of Ranitidine, Aspirin and Probiotic Therapy. *Scand. J. Gastroenterol.* **40**(3): 286-96.
- Budiyanto, C. 2011. *Kasus Log Book Gigi dan Mulut*. Surakarta : Kepaniteraan Klinik Ilmu Gigi dan Mulut, FK UNS.
- Chaffin W. L., Lopez-Ribout, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martinez, J. P. 1998. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression. *ASM*.
- Davies, A. 2002. *The Focal Digital Imaging A-Z*. In <http://books.google.com>.
- de Bernardis, F., Boccanera, M., Rainaldi, L., Guerra, C. E., Quinti, I., & Casson, A. 1992. The Secretion of Aspartyl Proteinase, a Virulence Enzyme, by Isolates of *Candida albicans* from the Oral Cavity of HIV-Infected Subjects. *Eur. J. Epidemiol.* **8**: 362-367.

- de Repentigny, L., Phaneuf, M., Mathieu, L.G. 1992. Gastrointestinal Colonization and Systemic Dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in Intact and Immunocompromised Mice. *Infect. Immun.* **60**:4907-4914.
- de Viragh, P. A., Sanglard, D., Togni, G., Falchetto, R., & Monod, M. 1993. Cloning and Sequencing of two *Candida parapsilosis* Genes Encoding Acid Proteases. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 335-342.
- Dinubile, M. J., Bille, D., Sable, C. A., & Kartsonis, N. A. 2005. Invasive Candidiasis in Cancer Patients: Observations from a Randomized Clinical Trial. *J. Infect.* **50**(5): 443-9.
- Egusa, H., Soysa, N. S., Ellepola, A. N., Yatani, H., & Samarayanke, L. P. 2008. Oral Candidosis in HIV-Infected Patients. *Curr. HIV Res.* **6**: 485-499.
- Ernst, J. F. 2000. Transcription Factors in *Candida albicans*-Environmental Control of Morphogenesis. *Microbiology.* **146**: 1763-1774.
- Felk, A., W. Schafer, & Hube, B. 2000. *Candida albicans* Secretory Aspartic Proteinase (SAP10) Gene. Accession number AF146440.

- Gilfillan, G. D., Sullivan, D. J., Haynes, K., Parkinson, T., Coleman, D. C. & Gow, N. A. R. 1998. *Candida dubliniensis*: Phylogeny and Putative Virulence Factors. *Microbiology*. **144**: 829–838.
- Gruber, A., Speth, C., Lukasser-Vogl, E., Zangerle, R., Borg-von, Z. M., Dierich, M. P., Würzner, R. 1999. Human Immunodeficiency Virus Type-1 Protease Inhibitor Attenuates *Candida albicans* Virulence Properties In Vitro. *Immunopharmacology*. **41** : 227-234.
- Ha, K. C & White, T. C. 1999. Effect of Azole Antifungal Drugs on The Transition From Yeast Cells to Hyphae in Susceptible and Resistant Isolates of The Pathogenic Yeast *C. albicans* .*Antimicrob Agents Chemoter*. **43**(4): 763-738.
- Hamdanah. 2012. *Keragaman Kepekaan Candida albicans yang Diisolasi dari Lokasi Peternakan Sapi Perah terhadap Beberapa Anticendawan*. [Skripsi] Bogor : Institut Pertanian.
- Hernawan, E. 2010. *Pengantar Statistika untuk Pendidikan*. Tasikmalaya : Universitas Siliwangi.
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. 1994. Expression of Seven Members of the Gene Family Encoding Secretory Aspartyl

Proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **14**: 87-99.

Hube, B., Sanglard, D., Odds, F. C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. 1997. Disruption of Each of the Secreted Aspartyl Proteinase Genes SAP 1, SAP 2, and SAP 3 of *Candida albicans* Attenuates Virulence. *Infect. Immun.* **65** (9) : 3529-3538.

Ine, Yuni, & Siti. 2010. *Si Putih oh Si Putih*. Blog : *Candida albicans*.

Jong, A. Y., Siti, N. S., Huang, M. F., Chen, S. H., & Kim, K. S. 2001. Transversal of *Candida albicans* Across Human Blood-Brain Barrier In-Vitro. *Infect Immun.* **69**(7): 4536-44.

Kadrianto, T. H. 2008. *Efek Xylitol terhadap Resistensi Candida albicans dalam Serum (Uji In Vitro)*. Jakarta : Universitas Indonesia.

Kartasmita, G. 2010. *Pengaruh Perlakuan Cyclosporine A terhadap Ekspresi Gen CDR 1, ERG 2, dan RTA 3 pada Candida albicans Strain Sensitif dan Resisten Fluconazole*. [Tesis Master]. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.

- Kobayashi, C. C., De Fernandes, O. F., Miranda, K. C., De Sousa, E. D., & Silva, M. D. O. R. 2004. Candiduria in Hospital Patients: A Study Prospective. *Mycopathologia*. **158(1)**: 49-52.
- Kumamoto, C. A., & Vences M. D. 2004. Alternative *C. albicans* Lifestyles: Growth on Surfaces. *Annu. Rev Microbiol.* (Epub Ahead of Print).
- Kusumaningtyas, E. 2008. *Mekanisme Infeksi Candida albicans pada Permukaan Sel*. Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis. Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
- Kusumawardani, R. A. 2010. *Analisis Isolat Klinik Candida albicans yang Resisten dan Sensitif Fluconazole dalam Menyusun Hyphae*. [Skripsi] Yogyakarta: Fakultas Kedokteran UGM.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., Didomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* Mutants are Avirulent. *Cell*. **90**: 939-49.
- Lupetti, A., Guzzi, G., Paladini, A., Swart, K., Campa, M., & Senesi, S. 1995. Molecular Typing of *Candida albicans* in Oral Candidiasis: Karyotype, Epidemiology with Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Patients in Comparison with

that with Healthy Carriers. *Journal of Clin. Microbiol.* **33** (5): 1238-1242.

Luque, A. G., Biasoli, M. S., Tosell M. E., Binolfi, A., Lupo, S., & Magaro, M. 2008. Oral Yeast Carriage in HIV-Infected and Non Infected Population in Rosario, Argentina. *Mycoses.* **52**:53-59

Lyons, C. N. & White, T. C. 2000. Transcriptional Analysis of Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans*. *Anti Microb. Agent Chemother.* **44**: 2296-2303.

MacDonald, F., & Odds, F. C. 1980. Inducible Proteinase of *Candida albicans* in Diagnostic Serology and in the Pathogenesis of Systemic Candidosis. *J. Med. Microbiol.* **13**: 423-435.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. 2012. *Brock Biology of Microorganisms* Thirteenth Ed. Pearson : USA.

Mariam, S. 2010. *Perbandingan Respon Penderita Candidiasis HIV terhadap Antiretroviral*. FMIPA. UI.

Marr, K. A., Lyons, C. N., Ha, K., Rustad, T. R., & White, T. C. 2001. Inducible Azole Resistance Associated with a Heterogenous Phenotype in *Candida albicans*. *J. C. Microbiol.* **45**: 52-59.

- Molero G., Díez, O. R., Navarro, G. F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sanches, P. M., & Nombela, C. 1998. *Candida albicans*: Genetics, Dimorphism and Pathogenicity. *Int. Microbiol.* **1** (2) : 95-106.
- Monod, M., Hube, B., Hess, D., & Sanglard, D. 1998. Differential Regulation of SAP8 and SAP9, which Encode Two New Members of the Secreted Aspartic Proteinase Family in *Candida albicans*. *Microbiology*.**144**: 2731-2737.
- Munir, A., Murad, A., Ping, L., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., Maccallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaiia, F., D'enfert, C., Gaillardin, C., Odds, F. C., & Brown, A. J. P. 2001. Nrg1 Repress Yeast-Hypha Morphogenesis and Hypha-Specific Gene Expression in *Candida albicans*. *The EMBO. J.* **20(17)**: 4742-52.
- Murwaningsih, A. 2010. *Resistensi terhadap Flukonazol pada Kultur Candida albicans dan Candida non albicans dari Isolat Rongga Mulut Studi pada Penderita Infeksi Human Immunodeficiency Virus di RSUP Dr. Sardjito*. [Tesis Master] Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Naglik, J. R., Newport, G., White, T. C., Fernandez, L. L., Greenspan, J. S., Greenspan, D., Sweet, S. P., Challacombe, S. J., & Agabian, N. 1999. *In vivo*

Analysis of Secreted Aspartyl Proteinase Expression in Human Oral Candidiasis. *Infect. Immun.* **67**: 2482-2490.

Naglik, J. R., Challacombe, S. J. & Hube, B. 2003. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67** (3) : 400-428.

Naglik, J. R., Moyes, D., Malewana, J., Kanzaria, P., Tsihlaki, E., Weindl, G., Tappuni, A. R., Rodgers, C. A., Woodman, A. J., Challacombe, S. J., Schaller, M., & Hube, B. 2008. Quantitative Expression of the *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase Gene Family in Human Oral and Vaginal Candidiasis. *Microbiol.* **154**: 3066-3280.

Odds, F. C. & Bernaerts, R. 1994. CHROMagar *Candida*, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. *J. Clin. Microbiol.* **32**(8): 1923.

Ollert, M. W., Wende, C., Gorlich, M., McMullan, C., Vogel, G., Borg-von, Z. M., & Vogel, C. W. 1995. Increased Expression of *Candida albicans* Secretory Proteinase, a Putative Virulence Factor, in Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**(10): 2543-2549.

- Rahma, R. N. 2011. *Jamur Candida albicans*. Blog. Rosita Noor Rahma.
- Rao, P.M. 2012. Oral Candidiasis-A Review. *Biological and Biomedical Reports*. **2** (2): 110-114.
- Richard, M., Ibata, O. S., Dromer, F., Bordon, P. F., Jonault, T., & Gaillardin, C. 2002. Complete Glycosylphosphatidylinositol Anchors are Required in *Candida albicans* for Full Morphogenesis, Virulence and Resistance to Macrophage. *Mol. Microbiol.* **44**(3): 841-853.
- Riskillah, A. G. 2010. *Candida albicans*. Riau : Fakultas Kedokteran Universitas Riau.
- Rogers, P. D. & Barker, K. S. 2002. Evaluation of Differential Gene Expression in Fluconazole Susceptible and Resistant Isolates of *Candida albicans* by cDNA Microarray Analysis. *Antimicrob. Agent Chemoter.* **46**: 3412-3417.
- Ryan, K. J. 1994. *Sherris Medical Microbiology an Introduction to Infectious Disease*, 3rd Ed. Connecticut : Appleton & Lange. pp.591-597.
- Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F.C., & Gow, N. A. R. 1997. A Triple Deletion of the Secreted Aspartyl Proteinase Genes SAP 4, SAP 5, and SAP 6

of *Candida albicans* Causes Attenuated Virulence. *Infect. And Immun.* **65**(9): 3539-3546.

Sariningrum, E. & Irdawati. 2009. Hubungan. Tingkat Pendidikan, Sikap dan Pengetahuan Orangtua kebersihan Gigi dan Mulut pada Anak Balita 3-5 Tahun dengan Kejadian Karies di PAUD Jatipurno. *Berita Ilmu Keperawatan* ISSN. **2**(3): 119-124.

Schmid J. 2006. *Molecular Microbiology of Candida albicans*. <http://www.imbs.massey.ac.nz>. [diakses 12 Oktober 2012].

Schmidt-Westhausen, A. M., Benedct, C., Rwichart, P. A., Samaranayake. 2003. Oral Candidosis and Associated *Candida* Species in HIV-Infected Cambodians Exposed to Antimycotics. *Mycoses*. **47**: 435-441

Sherwood, J., Gow, N. A. R., Gooday, G. W. G., Gregory, G. W., & Marshall, D., 1992. Contact Sensing in *Candida albicans*: a Possible Aid to Epithelial Penetration. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 461-469.

Simatupang, M. M. 2009. *Candida albicans*. Dep. Mikro. FK. USU.

Sobel, J. D., Ohmit, S. E., Schuman, P., Klein, R. S., Mayer, K., Duerr, A., 2001. The Evolution of *Candida* Species and Fluconazole Susceptibility among Oral

and Vaginal Isolates Recovered from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-seropositive and at Risk HIV-seronegative. *J. Infect. Dis.* **183**: 286-93.

Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., & Morschäuser, J. 2000. Differential Activation of a *Candida albicans* Virulence Gene Family during Infection. *PNAS.* **97**(11): 6102-6107.

Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. 2004. The Distinct Morphogenic States of *C. albicans*. *Trend Microbiol.* **12**(7): 317-24.

Suyoso, S. 2012. *Kandidiosis Vulvovaginalis pada HIV/AIDS dari Biologi Molekular sampai Terapi*. Universitas Airlangga.

Tavanti, A., Pardini, A., Campa, D., Davini, P., Lupetti, A., & Senesi, S. 2004. Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (SAP 1-10) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes. *J. C. Microbiol.* **42**(10): 4726-4734.

Tavanti, A., Davidson, A. D., Fordyce, M. J., Gow, N. A. R., Maiden, M. C. J., & Odds, F. C. 2005. Population Structure and Properties of *Candida albicans* as Determined by Multilocus Sequence Typing. *J. C. Microbiol.* **43** : 5601-5613.

Taylor, B.N., Staib, P., Binder, A., Biesecker, A., Sehgal, M., Rölinghoff, M., Morschhäuser, J., & Schröppel, K. 2005. Profile of *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Elicited During Vaginal Infection. *Infect. Immun.* **73** (3) : 1828-35

Tregan L. 2011. *Candida* and its Role in Opportunistic Mycoses. *California Association for Medical Laboratory Technology : Distance Learning Program*. [Terhubung berkala]. www.caml.t.org/.../986_can_opp_mycoses.pdf, [12Oktober 2012].

Tyaserini, E., Winata, T., Susantina. 2006. Hubungan antara Sifat dan Metabolit *Candida* spp. dengan Patogenesis Kandidiasis. *JKM.* **1**: 6.

Ueno, S. 2011. *Beberapa Aplikasi DNA Microarrays*. [Terhubung berkala]. www.caml.t.org/.../986_can_opp_mycoses.pdf, [19April 2013].

Uwamahoro, N., & Traven, A. 2010. Yeast, Filaments and Biofilms in Pathogenesis of *Candida albicans*. *Australian Biochemist.* **4**: 1.

Wilson, C. 2005. Recurrent Vulvovaginitis Candidiasis; an Overview of Traditional and Alternative Therapies. *Adv. Nurse. Pract.* **13(5)**: 24-9.

Yatim, W. 1999. *Kamus Biologi*. Jakarta : Yayasan Obor Indonesia.

Zaugg, C., Borg-von, Z. M., Reichard, D., Sanglard, D. & Monod, M. 2001. Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. *Infect. Immun.* **69**: 405-412.

Zepelin, M. B., Beggah, S., Boggian, K., Sanglard, D., & Monod, M. 1998. The Expression of the Secreted aspartyl Proteinase SAP 4 to SAP 6 from *Candida albicans* in Murine Macrophage. http://www.dmip.ecb.epm.br/arquivos/rosana/zepelin98sap_macrophage.pdf, 20 September 2012.