



## Modifikasi metode pemeriksaan $\beta$ -D-glucan *Candida albicans* secara *in vitro*

RUBEN DHARMAWAN<sup>\*</sup>, DARUKUTNI,  
SRI HARYATI, MURKATI

*Dharmawan R, Darukutni, Haryati S, Murkati. 2013. Modified method of examination  $\beta$ -D-glucan of Candida albicans in vitro. Bioteknologi 10: 1-5. Visualization of invasive fungi in blood or other body tissues histopathologically or by examination of cultures is still the main method for fungal infection diagnosis. However, it is very difficult to find and detect the specimen and need several days of confirmation. Improvement has been done and approved by the Food and Drug Administration, but the method is rarely used in Indonesia and the cost is hardly affordable. Modification of the method using enzymatic reaction is hoped to provide simple and affordable measurement.  $\beta$ -D-glucans as heterogenous molecules that constitute the major carbohydrates fractions of cell wall and readily detected in supernatans of *Candida albicans* cultures are hydrolyzed by  $\beta$  glucanase to form D-glucose. This additional glucose is measured using a glucose analyzer, e.g. GlucoDr<sup>®</sup>. The study used pretest and posttest control design. *C. albicans* were identified and cultured from a patient of Dr. Moewardi General Hospital, Surakarta in July, 2010. Results show that  $\beta$ -D-glucans from *C. albicans* is measureable to the amount of 10  $\mu$ g/1 mL serum using this modification principle. The examination fee is estimated at 1: 300 cheaper. The glucanase can be used to parse  $\beta$ -D-glucan as a component of the wall fungus *C. albicans* to glucose in amounts enough to have the potential to examine  $\beta$ -D-glucan present in patient serum of candidiasis albicans.*

♥ **Alamat korespondensi:**

Fakultas Kedokteran,  
Universitas Sebelas Maret  
Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126  
Tel.: +62-271-664178,  
Fax.: +62-271-637400  
e-mail:  
rubendharmawan@yahoo.com

Manuskrip diterima: 12 April 2013.  
Revisi disetujui: 20 Mei 2013.

**Keywords:** Glucose analyzer, antigen-antibody reaction, enzymatic reaction

*Dharmawan R, Darukutni, Haryati S, Murkati. 2013. Modified method of examination  $\beta$ -D-glucan of Candida albicans in vitro. Bioteknologi 10: 1-5. Visualisasi fungus yang menginvasi organ maupun cairan tubuh secara histopatologi atau penumbuhan fungus pada media kultur masih merupakan metode rujukan utama diagnosis infeksi fungus, tetapi memperoleh spesimen tsb sulit dan identifikasinya memerlukan waktu lama. Usaha perbaikan metode tersebut telah dilakukan dengan cara mendeteksi  $\beta$ -D-glucan yang terdapat pada dinding fungus, sebagai antigen. Metode ini berhasil dan telah diakui oleh FDA, tetapi biayanya tinggi. Oleh karena itu dilakukan modifikasi metode dari reaksi antigen-antibodi menjadi metode enzimatik yang lebih murah. Metode modifikasi ini mengurai  $\beta$ -D-glucan (homopolimer glukosa), yang merupakan komponen dinding hifa fungus dan sel ragi menjadi glukosa menggunakan enzim *glucanase*. Penambahan jumlah glukosa dapat dideteksi dengan *glucose analyzer* misalnya GlucoDr<sup>®</sup>. Penelitian dilaksanakan secara *in vitro* dengan *pretest-posttest control design*. Sampel berupa koloni *Candida albicans* yang berasal dari penderita kandidiasis di RSUD Dr. Moewardi Surakarta. Koloni *C. albicans* diperiksa kadar glukosanya sebelum dan sesudah diberi enzim glucanase dan didapatkan peningkatan kadar glukosa sebesar  $15 \pm 2$  mg/dL. Biaya pemeriksaan ini diperkirakan 1: 300 lebih murah. Glucanase dapat dipergunakan untuk mengurai  $\beta$ -D-glucan sebagai komponen dinding fungus *C. albicans* menjadi glukosa dalam jumlah yang cukup banyak sehingga mempunyai potensi untuk memeriksa  $\beta$ -D-glucan yang terdapat dalam serum penderita kandidiasis albicans.*

**Kata kunci:** *Glucose analyzer*, reaksi antigen-antibodi, reaksi enzimatik

## PENDAHULUAN

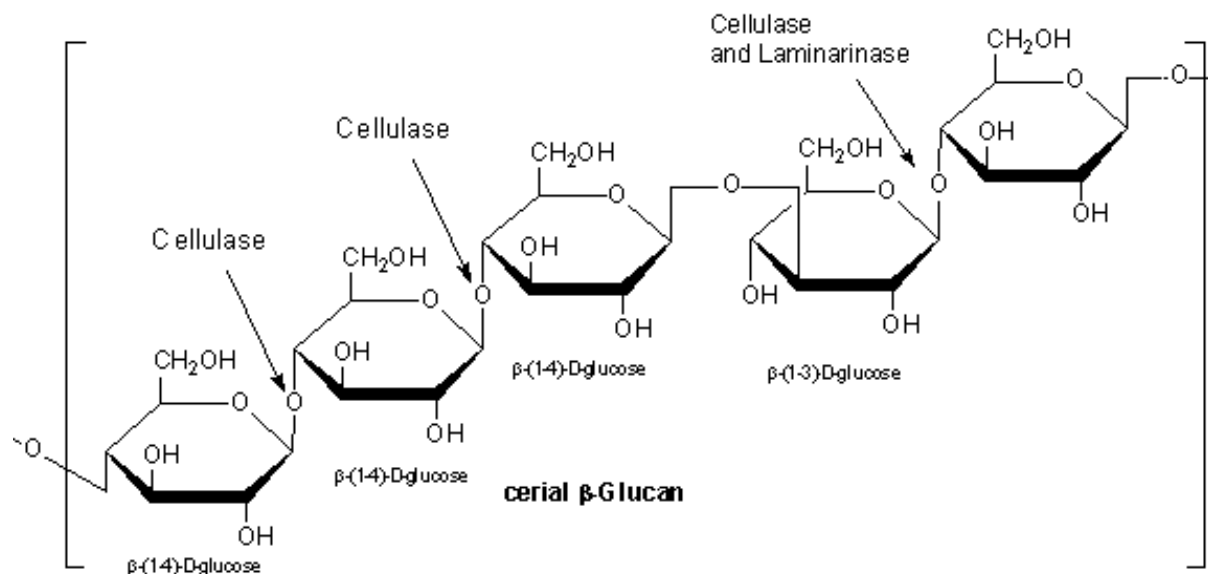
*Candida albicans* merupakan fungus patogen yang memiliki sifat dimorfisme secara bergantian tidak beraturan sehingga menimbulkan masalah identifikasi. Bentuk kapang dapat melakukan penetrasi ke dalam sel permukaan tubuh, jaringan maupun darah sehingga dianggap sebagai bentuk yang lebih patogen karena dapat menyebabkan infeksi, terutama pada pasien HIV/AIDS (Naglik et al. 2008; Karkowska-Kuleta et al. 2009; Cuenca-Estrella et al. 2011). Kematian akibat *Candida albicans* pada kasus-kasus infeksi sistemik bisa mencapai 60% dan disertai sepsis (Big dan Vazquez 2009), sehingga deteksi awal kandidiasis amat penting.

Diagnosis tersangka infeksi fungus invasif (IFI) melibatkan 3 faktor yaitu faktor hospes, gejala dan tanda klinis yang konsisten serta bukti mikologis. Bukti mikologis yang diperlukan adalah pemeriksaan langsung (sitologi, mikroskopis dan kultur) dan pemeriksaan tidak langsung yaitu ditemukan antigen atau komponen dinding sel (Pickering et al. 2005; Odabasi et al. 2004; Budhavari 2009). Deteksi asam nukleat belum dapat dijadikan bukti karena belum tervalidasi dan terstandarisasi (Pauw et al. 2008).

Deteksi  $\beta$ -D-glucan sebagai komponen dominan dinding sel *Candida albicans* secara tidak langsung yaitu melalui reaksi antigen-antibodi telah berhasil dengan baik, telah dibuat *kit*-nya dan diakui oleh *Food and Drug Administration* (Persat et al. 2008; Pauw et al. 2008, Posteraro et al. 2011). Sayangnya perangkat ini amat jarang dipergunakan di Indonesia dan mahal, sehingga penelitian ini bertujuan menemukan metode deteksi  $\beta$ -D-glucan yang lebih sederhana dan murah.

Modifikasi yang dilakukan adalah mengubah prinsip pemeriksaan  $\beta$ -D-glucan dari deteksi antigen komponen dinding sel dengan ELISA (Ostrosky-Zeichner et al. 2005; Persat et al. 2008; Posteraro et al. 2011) menjadi pemeriksaan enzimatik. Modifikasi ini mendeteksi  $\beta$ -D-glucan yang memiliki bentuk ikatan 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4 dan 1 $\rightarrow$ 6 (Gambar 1) yang diurai oleh  $\beta$ -glucanase menjadi *D*-glucose (Megazyme 2011a; Megazyme 2011b; Megazyme 2011c).

Mengingat banyaknya kasus sepsis pada infeksi sistemik fungus (Posteraro et al. 2011), maka prinsip modifikasi ini dicobakan pada bakteri *Lactobacillus casei* yang juga mengandung peptidoglikan pada dinding selnya (Brooks et al. 2005).



Gambar 1. Struktur molekul  $\beta$ -D-glucan.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Spesimen sputum dari pasien laki-laki dewasa di RSUD Dr. Moewardi dengan identitas dan riwayat penyakit yang tercatat, dibawa ke Laboratorium Parasitologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta secara aseptik. Di laboratorium, dilakukan identifikasi *Candida albicans* secara mikroskopi langsung maupun pengecatan Giemsa dilanjutkan dengan pembiakan pada medium *Candida* selektif dan pemeriksaan *Germ Tube test*. Setelah dipastikan terdapat *C. albicans* dalam sampel tsb. maka dilakukan pembiakan pada medium *Saboraud Agar Dextrose* (SDA), diisolasi koloni yang morfologinya sama, diidentifikasi sekali lagi kemudian dikolonisasi lagi. Kolonisasi diulang-ulang sampai diperoleh jumlah yang cukup.

Diambil 100 mg kultur, masing-masing disuspensi dalam tabung Eppendorf yang telah diisi 50  $\mu$ L akuabides, 50  $\mu$ L NaCl 0,9% dan 50  $\mu$ L serum darah. Duapuluh lima  $\mu$ L dari masing-masing suspensi diperiksa kadar glukosanya dengan *glucose analyzer GlucoDr®* (Gambar 2) dan hasilnya merupakan nilai *pretest*. Selanjutnya ke dalam masing-masing Eppendorf dimasukkan 10 mg  $\beta$ -glucanase (Sigma-Aldrich Cat. No. G4423), diinkubasikan pada 37°C dan disuspensi. Masing-masing suspensi ini diperiksa lagi kadar glukosanya menggunakan *GlucoDr®* yang sama. hasilnya merupakan nilai *post-test* Kadar  $\beta$ -D-glucan diperhitungkan sebagai selisih kadar glukosa *post-test* dengan *pretest*. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali.

Metode yang sama dilakukan juga terhadap suspensi *L. casei* Shirota strain dalam NaCl 0,9%.



Gambar 2. Alat pendeteksi kadar glukosa GlucoDr®.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai *pre-test* dan *post-test* hasil proses enzimatik tampak pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai *pre-test* dan *post-test* glukosa dalam suspensi *Candida albicans* dan *L. casei* menggunakan GlucoDr® dengan 5 kali pengulangan.

Suspensi akuabides pretest posttest selisih (mg glukosa/dL)	Suspensi NaCl 0,9%pretest posttest selisih (mg glukosa/dL)	Suspensi serum pretest posttest selisih (mg glukosa/dL)	Suspensi <i>L. casei</i> pretest posttest selisih (mg glukosa/dL)
36 52 16	33 47 14	82 97 15	120 159 39
35 51 16	34 49 15	83 99 16	122 162 40
35 50 15	35 51 16	81 97 16	119 158 39
36 50 14	37 54 17	84 101 17	123 162 39
35 50 15	34 49 15	84 98 14	124 162 38

Tabel 2. Rerata selisih kadar glukosa pretest dan posttest (mg/dL).

Suspensi akuabides (mg/dL)	Suspensi NaCl 0,9% (mg/dL)	Suspensi serum (mg/dL)	Suspensi <i>Lactobacillus casei</i> (mg/dL)
15 ± 1	15 ± 2	15 ± 2	39 ± 1

Hasil reaksi enzimatis yang mengurai  $\beta$ -D-glucan dari *C. albicans* menggunakan glucanase telah dapat dideteksi oleh sebuah alat *glucose analyzer* (GlucoDr®) sebagai glukosa. Modifikasi prinsip pemeriksaan ini dari reaksi antigen antibodi menjadi reaksi enzimatis mempunyai beberapa hal yang perlu dibahas. Pertama adalah hasil pemeriksaan memberikan nilai rerata  $15 \pm 2$  mg/dL. Jika 1 molekul  $\beta$ -D-glucan terurai menjadi 15 molekul glukosa (Megazyme 2011a) maka metode ini berhasil mendeteksi sekitar 1 mg  $\beta$ -D-glucan/dL serum atau 0,01 mg  $\beta$ -D-glucan/mL serum. Nilai ini kurang sensitif dibandingkan pemeriksaan berdasarkan reaksi antigen antibodi yang telah berhasil mendeteksi sampai 1 pg/mL. Dengan demikian metode modifikasi ini masih memerlukan perbaikan sensitifitas. Kedua adalah masalah spesifitas. Glucanase yang dipergunakan tidak bersifat spesifik mengurai  $\beta$ -D-glucan tetapi juga mengurai mannan, arabinose maupun cellulose yang merupakan komponen dinding fungus. Ketidakspezifisitas ini bisa menguntungkan karena meningkatkan sensitifitas deteksi dan memperluas jangkauan deteksi yaitu dapat mendeteksi *C. albicans* dan fungus lain, sehingga merupakan metode *panfungal detection*.

Hal berikutnya adalah prosedur, peralatan dan biaya operasional. Metode modifikasi ini mempunyai prosedur yang amat sederhana yaitu suspensi sampel dalam akuabides, atau larutan NaCl 0,9% ataupun serum kemudian diteteskan 25  $\mu$ L pada *gluco analyzer stick* dan dalam 10 detik diperoleh hasilnya. Biaya operasional sekitar Rp. 15.000,-/ pemeriksaan. Sebaliknya, prosedur memerlukan sekitar 2 jam, peralatan yang amat mahal (menggunakan ELISA dan ELISA Reader) dengan biaya operasional sekitar Rp 3.000.000,-/ pemeriksaan.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan di atas maka dapat disimpulkan bahwa : (i) Glucanase (Sigma-Aldrich Cat. No. G4423) dapat mengurai  $\beta$ -D-glucan *C. albicans* yang berasal dari penderita kandidiasis dan menghasilkan glukosa yang tampak dari kenaikan kadar glukosa yang dideteksi menggunakan *glucose analyzer* (GlucoDr®) sebesar  $15 \pm 2$  mg/dL serum (0,01 mg  $\beta$ -D-glucan/mL). (ii) Peningkatan kadar glukosa hasil penguraian oleh glucanase (Sigma-Aldrich Cat. No. G4423) cukup tinggi sehingga mendukung asumsi bahwa glucanase juga

menguraikan mannan, arabinose maupun cellulose yang merupakan komponen dinding sel fungus. (iii) Biaya pokok dan operasional metode berdasarkan reaksi enzimatis ini lebih rendah dibandingkan metode berdasarkan reaksi antigen antibodi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Big C, Vazquez JA. 2009. The diagnosis and management of systemic candidiasis in the intensive care unit. *Anest Ratow* 3: 136-143.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2005. Mikologi Kedokteran. Dalam: Jawetz, Melnick & Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology). Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Budhavari S. 2009. What's new in diagnostics? *Fungitell*®: 1,3 beta-D Glucan assay. *South Afr J Epidemiol Infect* 24 (1): 37-38.
- Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Rocil Z, Richardson M, Rogers TR. 2011. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother* 66 [Suppl 1]: 115-124.
- Karkowska-Kuleta J, Maria R-K, Andrzej K. 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica* 56 (2): 211-224.
- Megazyme [Megazyme International Ireland]. 2011a. Mixed-linkage Beta-Glucan assay procedure (McCleary method). K-BGLU 07/11. AOAC Method 32-23. AOAC Method 995.16. EBC Methods 4.11.1.4.16.1 and 8.11.1. ICC Standard Method No. 166. 2011.
- Megazyme [Megazyme International Ireland]. 2011b. D-Glucose assay procedure (GOPOD-format). K-Gluc 07/11. 2011.
- Megazyme [Megazyme International Ireland]. 2011c. Enzymatic yeast Beta-Glucan assay procedure K-EBHLG 05/11.
- Naglik JR, David M, Jagruti M, Priya K, Elina T, Gunther W, Anwar R.T, Catherine A.R, Alexander J.W, Stephen J.C, Martin S, Bernhard H. 2008. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiol* 154: 3266-3280.
- Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. 2004. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 39: 199-205.
- Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F et al. 2005. Multicenter clinical evaluation of the (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 41: 654-659.
- Pauw BD, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46: 1813-821.
- Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A Picot S and Sulhian A. 2008. Contribution of the (1 $\rightarrow$ 3)-  $\beta$ -D-glucan

- assay for diagnosis of Invasive fungal infections. J Clin Microbiol 46: 1009-1013.
- Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. 2005. Evaluation of a (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. J Clin Microb 43: 5957-5962.
- Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, Torelli R, Pennisi MA, Bello G. 2011. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan assay, *Candida* score and colonization index. Critical Care 15: R249.