PENGUNAAN METODE PCR – RFLP (POLYMERASE CHAIN REACTION –
RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORFISM) DALAM
MENDETEKSI JAMUR DERMATOFIT

Awaluddin¹⁾, Rizalinda Sjahrir²⁾, Farida Ilyas²⁾

¹⁾Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Megarezky, Makassar, 90234

²⁾Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Makassar, 90245

Email : firstudin@gmail.com

ABSTRACT

Problems: Dermatophytes is a caused by dermatophytes fungi that attack the stratum corneum, hair and nails. **The aims of the research:** was to identify the types of dermatophytes with PCR-RFLP methods. **Research Method:** This research was an observational laboratory study was performed on 23 samples collected from several clinic and primary schools in Makassar. **Result:** The result indicate that with PCR-RFLP all samples were positive dermatophytosis. Comprising *Microsporum canis* 26.1%, *Trichophyton rubrum* 13.1%, *T. mentagrophytes* 21.6%, *T. tonsurans* 8.7%, *T. verrucosum* 4. 2% and *unclassified species* 26.1%. **Conclusion:** Thus we suggest that this laboratory technique is used to confirm the etiology of patients with dermatophytosis.

Keywords: *Dermatophyte, Dermatophytosis, PCR – RFLP*

ABSTRAK

Latar belakang: Dermatofitosis adalah penyakit akibat infeksi jamur dermatofita yang menyerang lapisan *stratum korneum* kulit, rambut dan kuku. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi jenis jamur dermatofit dengan metode PCR-RFLP. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian observasional laboratorium dengan dengan menguji 23 sampel yang diperoleh dari beberapa klinik dan sekolah dasar di Makassar. **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua sampel teridentifikasi yakni *M. canis* 26,1%, *Trichophyton rubrum* 13,1%, *T. mentagrophytes* 21,6%, *T. tonsurans* 8,7%, *T. verrucosum* 4,2% dan spesies *unclassified* 26,1%. Kami menyarankan Teknik PCR-RFLP dapat digunakan untuk konfirmasi jenis jamur dermatofit.

Kata Kunci : *Dermatofitosis, Jamur Dermatofit, PCR – RFLP*

PENDAHULUAN

Dermatofitosis adalah infeksi jamur yang disebabkan oleh kelompok kapang dermatofita, meliputi genus *Microsporum*, *Trichophyton* dan *Epidermophyton*. Kelompok kapang ini bersifat keratinofilik, menyerang lapisan superfisial tubuh, seperti : Kulit, rambut dan kuku. *Microsporum* dan *Trichophyton* biasa menyerang hewan dan manusia, sedangkan *Epidermophyton* hanya menyerang manusia (Sunartatie, 2010).

Prevalensi dermatofitosis zoofilik di Indonesia rendah yakni 5% jika dibandingkan di Negara-negara barat (Setianingsih, 2015). Sedangkan di Makassar sendiri menurut penelitian yang dilakukan oleh Paramata dkk (2009), menunjukkan bahwa dermatofitosis mengenali lebih dari 20% hingga 25% populasi sehingga menjadi bentuk infeksi yang tersering.

Secara umum, dua metode yang paling penting dalam menegakkan diagnosis infeksi jamur adalah metode pemeriksaan KOH 20% dan kultur jamur, khusus metode kultur membutuhkan waktu yang cukup lama yaitu hampir sekitar 4 minggu untuk dapat mengidentifikasi jamur. Namun metode ini kurang akurat dan memakan waktu yang lama, oleh karena itu dibutuhkan metode yang lebih cepat dan akurat dalam mendeteksi jamur dermatofit ini. Garg *et al* (2009), mengatakan bahwa metode PCR-RFLP merupakan teknik yang digunakan untuk merestriksi untaian DNA dengan enzim restriksi sehingga memungkinkan hasil yang lebih spesifik. Metode PCR-RFLP adalah metode yang berguna untuk identifikasi dermatofit dengan cepat dan akurat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi jenis jamur dermatofit pada penderita dermatofitosis di kota Makassar dengan metode PCR-RFLP.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dengan metode observasional laboratorium dengan desain penelitian deskriptif kategorik. Populasi pada penelitian ini pasien dermatofitosis di beberapa klinik dan beberapa Sekolah Dasar di Kota Makassar dan sampel penelitian adalah kerokan kulit yang diperoleh dari pasien di beberapa klinik dan beberapa Sekolah Dasar di Kota Makassar. Data dikumpulkan berdasarkan penentuan tipe klinis dermatofitosis dan hasil pemeriksaan kerokan kulit KOH 10-20% dan Teknik PCR yang

dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin dan dilakukan pada bulan Maret - Juli 2016. Data yang diperoleh dikelompokkan berdasarkan tujuan dan jenis data kemudian dianalisis deskriptif. Hasil analisis akan ditampilkan dalam bentuk tabel disertai penjelasan.

Spesies *unclassified* dalam penelitian ini adalah spesies dermatofit yang teridentifikasi tetapi tidak menunjukkan potongan band yang sesuai dengan 6 spesies (*T.mentagrophytes*, *T.rubrum*, *T.tonsurans*, *T.verrucosum*, *E.floccosum* dan *M.canis*) menurut Mirzhahoseini *et al* (2009).

Cara Kerja

Metode PCR-RFLP digunakan primer ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') dan ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Sampel dengan volume 25 µL mengandung 10-µl 10×buffer reaksi, 100µmol/L dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP, 14,5-µL enzim kapa26, 20 µM setiap primer; dan 7-µl DNA template, MgCl₂ 0,5- µL, DMSO 1-µL. Kemudian dilakukan amplifikasi PCR. Setiap campuran reaksi dipanaskan pada suhu 94°C selama 5 menit. Amplifikasi PCR dilakukan dengan 39 siklus dengan kondisi berikut: 95°C selama 5 menit; 94°C selama 1 menit; 52,8 °C selama 30 detik; 72°C selama 1 menit dan 72°C selama 7 menit. Kemudian dipisahkan dengan Elektroforesis gel menggunakan 2% gel agarose kemudian dideteksi dengan menggunakan sinar UV. Kemudian, 5 µL hasil ekstraksi ditambahkan 1,5 µL x 10 buffer, 0,5 µL (5U) dari enzim restriksi *MvaI*, ditambahkan *nuclease free water* 9 µL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, dilanjutkan pada proses elektroforesis gel agarosa 2% selama 90 menit dengan voltase 80V.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengamatan

Tabel 1. Hasil Identifikasi Jamur Dermatofit dengan Metode PCR-RFLP

No.	Kode Sampel	ITS 1-4	Enzim <i>Mva</i> I
1.	120	+	<i>Microsporum canis</i>
2.	128	+	<i>Unclassified</i>
3.	137	+	<i>Microsporum canis</i>
4.	138	+	<i>Unclassified</i>
5.	140	+	<i>Microsporum canis</i>
6.	148	+	<i>Unclassified</i>
7.	162	+	<i>Microsporum canis</i>
8.	164	+	<i>Unclassified</i>
9.	167	+	<i>Trichophyton rubrum</i>
10.	168	+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
11.	174	+	<i>Trichophyton rubrum</i>
12.	178	+	<i>Trichophyton rubrum</i>
13.	179	+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
14.	182	+	<i>Microsporum canis</i>
15.	183	+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
16.	185	+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
17.	187	+	<i>Trichophyton verocosum</i>
18.	190	+	<i>Unclassified</i>
19.	195	+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
20.	198	+	<i>Microsporum canis</i>
21.	199	+	<i>Unclassified</i>
22.	200	+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
23.	203	+	<i>Trichophyton tonsurans</i>

Sumber : Data Primer 2016

Berdasarkan table 1, dari total 23 sampel dermatofit dengan menggunakan metode PCR-RFLP semuanya berhasil diidentifikasi. Semua DNA sampel di amplifikasi PCR dengan menggunakan primer ITS 1 – 4, kemudian di restriksi dengan enzim *Mva* I dan di lanjutkan dengan elektroforesis gel agarose 2% untuk melihat band yang terbentuk. Adapun jenis jamur yang berhasil diidentifikasi adalah *M. canis* 26,1%, *T. rubrum* 13,1%, *T. mentagrophytes* 21,6%, *T. tonsurans* 8,7%, *T. verrucosum* 4,3% dan spesies *unclassified* 26,1%. Hasil pemotongan enzim restriksi *Mva* I mengikuti standar identifikasi dari Mirzhahoseini *et al*, 2009.

1. Hasil amplifikasi PCR-RFLP

Gambar 1. A. Sebelum dipotong enzim restriksi ; B. setelah dipotong enzim restriksi

Pembahasan

Secara umum, dua metode yang paling penting dalam menegakkan diagnosis infeksi jamur adalah metode pemeriksaan KOH 20% dan kultur jamur, khusus metode kultur membutuhkan waktu yang cukup lama yaitu hampir sekitar 4 minggu untuk dapat mengidentifikasi jamur penyebab dermatofitosis (Mohammadi *et al*, 2015).

Berdasarkan jenis kelamin pada penelitian ini laki-laki lebih rentan terinfeksi jamur dermatofit di banding dengan perempuan, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Mirzhahoseini *et al* (2015), yang mengatakan laki-laki lebih sering terinfeksi di banding perempuan, hal ini dikarenakan faktor pekerjaan dimana laki-laki sebagian besar bekerja di luar ruangan dan selalu menggunakan sepatu dalam beraktifitas yang mengakibatkan kaki menjadi lembab sehingga memudahkan jamur untuk berkembang.

Metode PCR-RFLP ini mampu mendeteksi 5 spesies dermatofit yaitu *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* dan *Trichophyton verrucosum*. Hasil identifikasi metode PCR-RFLP, Primer yang digunakan adalah ITS 1 dan ITS 4. Hasil amplifikasi terhadap DNA dengan menggunakan primer ITS 1 – 4 ditandai dengan terbentuknya band yang terbentuk setelah proses elektroforesis gel, kemudian dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *Mva* I. Pada table 1 ada beberapa sampel yang tidak dapat diidentifikasi (*unclassified*) sampai pada tingkat spesies seperti

pada kode sampel 128 dimana potongan bandnya berada di 250/450, kode sampel 138 dengan potongan band 160/250/450, kode sampel 148 terdapat potongan 400, kode sampel 190 dengan potongan band 250, dan kode sampel 199 pada potongan band 160/250/360, dengan demikian kode sampel tersebut dianggap sampel *unclassified*. Potongan band yang terbentuk pada sampel tersebut bukan merupakan potongan band target.

KESIMPULAN

Dengan PCR-RFLP teridentifikasi *Microsporum canis* 26,1%, *Trichophyton rubrum* 13,1%, *Trichophyton mentagrophytes* 21,6%, *Trichophyton tonsurans* 8,7%, *Trichophyton verrucosum* 4,3% Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi jenis jamur dermatofit dengan metode molekuler yang lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Staf Laboratorium Mikrobiologi Balai Kesehatan Kulit dan Kelamin dan Laboratorium Mikrobiologi RSP Universitas Hasanuddin yang telah banyak membantu selama berlangsungnya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Frey, D dan Oldfield,. 1979. *Atlas of Pathogenic Fungi*. Holland. Wolfe Medical Publications.
- Khosravi, Kordbacheh, dan Bokae. 2014. *An Epidemiological Approach To The Zoophilic Dermatophytoses in Iran*. Medical Journal I.R. Iran. Vol.7 No. 4.
- Mirzhahoseini, H,. Omidinia,E,. Ghahfarokhi, MS,. Sadeghi, G,. Abyaneh, MR,. 2009. *Application of PCR-RFLP to Rapid Identification of the Main Pathogenic Demartophytes from Clinical Specimens*. Iranian J Publ Health, Vol. 38.
- Mohammadi, R,. Abastabar, M,. Mirhendi, H,. Badali, H,. Shadzi, S,. Chadeganipour, M,. *Use of RFLP to Rapidly Identify Dermatophyte Species Realted to Dermatophytosis*. Jundishapur J Microbiol. 2015 Juni 8 (6).
- Oyeka, C. A. 2000. *Trichophyton mentagrophytes a Keratinophilic fungus*. In : Biology of Dermatophytes and other keratinofilik fungi.

- Paramata, N., Maidin, A., Massi, N., (2009). *Perbandingan Uji Kepekaan Itrakonazol Terhadap Agen Penyebab Dermatofitosis Pada Kulit Glabrous di Makassar*. Tesis tidak diterbitkan. Makassar : Universitas Hasanuddin.
- Qomariah L., Susetiati, D., Prakosewa, R., Siswati A., Nirwati H., (2008), *Uji Sensitivitas Beberapa Obat Antifungal Golongan Azole Terhadap Dermatofita di Poliklinik RS Dr. Sardjito Yogyakarta*. 20, 229-34.
- Setianingsih, I., Arianti, D., Fadlily, A. 2015. *Prevalence and Risk Factor Analysis of Tinea unguium infection on Pig Farmer in the Tanah Siang Sub-district, Central Kalimantan*. Epidemiology and Zoonosis Journal. Vol. 5, No. 3, Juni 2015.
- Sunartatie, Titiek. 2010. *Trichophyton mentagrophytes Sebagai Agen Penyebab Dermatofitosis Pada Kambing*. Jurnal Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan. Bogor : IPB Press.