

***Cryptococcus neoformans*: Ekologi, Faktor Virulensi, Patogenesis dan Identifikasi**

Machrumnizar,^{1,4*} Wellyzar Sjamsuridzal,² Retno Wahyuningsih^{3,4}

¹Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Trisakti, Jakarta

²Departemen Biologi, Fakultas MIPA-UI, Jakarta

³Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran UKI, Jakarta

⁴Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran UI, Jakarta

Abstrak

Cryptococcus spp. merupakan khamir berkapsul tebal yang tersebar di seluruh dunia dan bertanggung jawab sebagai etiologi kriptokokosis pada manusia dengan predileksi utama di SSP. Jamur Basidiomycota ini menjadi patogen oportunistik pada manusia adalah *C. neoformans* dan *C. gattii*. *Cryptococcus neoformans* lebih banyak menginfeksi individu imunokompromi, sedangkan *C. gattii* menginfeksi individu imunokompeten. Habitat utama *Cryptococcus* spp. di lingkungan terutama pada kotoran burung merpati dan lapukan kayu di lubang pohon. Infeksi pada manusia terjadi melalui inhalasi basidiospora atau sel khamir kering yang tersebar di lingkungan. Penentuan spesies *Cryptococcus* dari lingkungan dapat dilakukan melalui pemeriksaan laboratorium secara konvensional dan molekular.

Kata kunci: *Cryptococcus* spp., lingkungan

***Cryptococcus neoformans*: Ecology, Virulence Factors, Pathogenesis and Identification**

Abstract

Cryptococcus spp. is an encapsulated yeasts of world wide distribution and responsible as the etiology of cryptococcosis in humans which CNS is a primary predilection. Basidiomycota which is opportunistic pathogens in humans are *C. neoformans* and *C. gattii*. *Cryptococcus neoformans* commonly infects immunocompromised individual, whereas *C. gattii* usually infects immunocompetent persons. Natural habitat of *Cryptococcus* spp. in the environment, especially is pigeon droppings and decayed wood in the tree hollow. Humans infection occurs through inhalation of basidiospores or deccicated yeasts fram the environment. *Cryptococcus* spp. identificatian from the environment can be done through conventional and molecular laboratory tests.

Keyword: *Cryptococcus* spp, environment

*RW: Penulis Koresponden; E-mail: retnet@hotmail.com

Pendahuluan

Genus *Cryptococcus* terdiri atas ~ 37 spesies dan termasuk ke dalam filum *Basidiomycota* yang pada manusia untuk pertama kali ditemukan pada tahun 1890-an oleh Busse dan Buschke. Keduanya berhasil mengidentifikasi bentuk seperti jamur pada pemeriksaan lesi tibia dan mengisolasi jamur dari lesi tersebut, yang awalnya disebut sebagai *Saccharomyces*.¹ Isolasi pertama *Cryptococcus* dari lingkungan dilaporkan pada tahun 1894 oleh Sanfelice yang mengisolasinya dari buah persik dan dinamakan *Saccharomyces neoformans*. Pada tahun 1901 Vuillemin mengganti nama jamur itu menjadi *Cryptococcus hominis* untuk membedakannya dari bentuk *Saccharomyces* spp.^{2,3}

Dua spesies yang sangat penting sebagai patogen manusia adalah *Cryptococcus neoformans* dan *Cryptococcus gatii*.⁴ *Cryptococcus neoformans* spesies kompleks pada awalnya diklasifikasikan berdasarkan variasi struktur kapsul polisakarida ekstraselular yang dapat dibedakan menggunakan uji aglutinasi berdasarkan reaksi antigen-antibodi. Pada 1950-an dan 1960-an, *C. neoformans* diklasifikasikan menjadi empat serotipe, yakni serotipe A sampai D.^{5,6} Pada tahun 1975, Kwon-Chung⁷ menemukan bentuk seksual *C. neoformans* yang dinamakan *Filobasidiella neoformans* sebagai hasil perkawinan dua galur serotipe D.⁸ Hasil perkawinan antara dua galur lain (serotipe B dan C) memproduksi teleomorf berbeda yang dinamakan *Filobasidiella bacillispora*. Bentuk aseksual *F. bacillispora* dinamakan *Cryptococcus bacillispora*, yang diduga sebagai variasi dari *C. neoformans*.⁹

Cryptococcus gatii awalnya diklasifikasikan sebagai varian *C. neoformans*, dengan nama *C. neoformans* var. *gatii* atau var. *bacillispora*.¹⁰ Pada tahun 2002, *C. neoformans* var. *gatii* diusulkan sebagai spesies yang berdiri sendiri

yakni *Cryptococcus gatii*.¹¹ Klasifikasi *Cryptococcus* spesies kompleks kini menjadi *C. neoformans* (serotipe A, D, dan hibrid AD) dan *C. gatii* (serotipe B dan C). Kelima serotipe tersebut memiliki perbedaan karakteristik ekologi, molekular, morfologi; epidemiologi, patogenisitas, dan distribusi geografik.¹² Akhirnya pada tahun 2003 seluruh genom *Cryptococcus* dapat ditentukan.

Ekologi dan Epidemiologi *Cryptococcus*

Cryptococcus, terutama *C. neoformans* tersebar luas di berbagai bagian dunia. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ditemukan lebih banyak di lingkungan dibandingkan *C. neoformans* var. *neoformans*. Habitat utama jamur ini adalah tanah yang mengandung material tanaman yang membusuk, lapukan kayu pada celah/lubang pohon dan kotoran burung.¹³ Jamur dapat ditemukan pada lubang pohon *Syzygium jambolana*, *Cassia grandis*, *Senna multijuga* dan *Ficus microcarpa*.¹⁴ Jamur juga dapat ditemukan dalam sampel kotoran atau kloaka dari berbagai spesies burung, terutama burung merpati.¹⁵ *Cryptococcus neoformans* dapat bertahan hidup selama dua tahun atau lebih dalam kotoran burung merpati segar atau kering.^{15,16} Habitat alamiah *C. neoformans* merangsang perkembangbiakan jamur secara ekstensif, baik dalam bentuk khamir atau spora, terutama bila terlindung dari pajanan sinar matahari.¹⁷ Kondisi lingkungan yang lembab juga mendukung perkawinan *C. neoformans* var. *grubii* dan *C. neoformans* var. *neoformans*.¹⁸ Kotoran beberapa burung lainnya (misal: burung beo, burung kenari) dapat mendukung pertumbuhan khamir.¹⁹

Distribusi *C. gatii* lebih terbatas di daerah tropis dan subtropis, serta terdapat hubungan ekologi spesifik dengan *Eucalyptus camaldulensis* dan *Eucalyptus tereticornis*.²⁰ Jamur juga dapat tumbuh

pada jenis pohon lainnya seperti *Syzygium cumini* (pohon jambu air), almond (*Prunus dulcis*), golden shower (*Cassia fistula*), cemara, cedar dan maple.²¹ Selain itu, jamur dapat diisolasi dari udara, air tawar, air laut, serta tanah.²² *Cryptococcus gattii* juga dapat diisolasi dari sampel kotoran atau kloaka burung dan bentuk aseksual hanya ditemukan pada kotoran burung.¹⁵

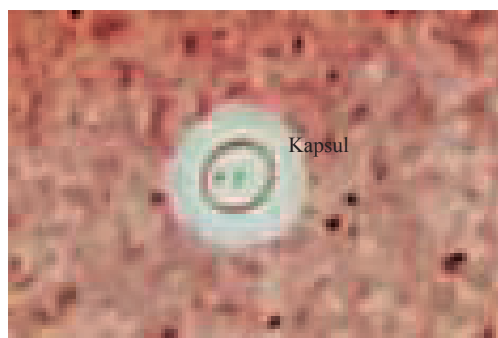
Cryptococcus spp. berproliferasi dan berkembangbiak di permukaan tanaman. Diduga bahwa material yang terkandung dalam tanaman (misal: hormon tanaman, indole-3-acetic acid, myo-inositol) memicu perubahan morfologi dan menstimulasi reproduksi seksual selama siklus hidup *Cryptococcus* di alam, tetapi hal tersebut dapat dihambat oleh pajanan sinar matahari. *Cryptococcus* di alam, bersifat responsif terhadap faktor lingkungan, seperti suhu, tingkat keasaman tanah, sumber nitrogen dan karbondioksida, air serta besi. Contohnya, ukuran dan ketebalan kapsul dipengaruhi faktor genetik dan kondisi lingkungan. Suhu dan tekanan CO₂ tinggi di lingkungan akan menyebabkan kapsul hidrofilik kolaps untuk melindungi jamur dari dehidrasi, sehingga ukuran kapsul yang relatif kecil/tipis mudah terhirup ke saluran napas.^{17,23}

Faktor virulensi

Cryptococcus neoformans adalah organisme dimorfik, bersifat saprofit di

dalam tubuh manusia namun dapat menjadi patogen bila suasana menguntungkan.²⁴ Berdasarkan variasi kapsul, diameternya bervariasi dari 2 µm sampai 80 µm.¹ Basidiospora yang dihasilkan fase seksual berukuran lebih kecil yaitu 1,8 µm sampai 3,0 µm dan dapat membentuk sel khamir pada suhu 37°C atau hifa dikariotik pada suhu 24°C. Secara mikroskopis *C. neoformans* di dalam jaringan atau cairan spinal berbentuk bulat sampai oval dengan diameter 3 µm-10 µm, sering bertunas dan dikelilingi oleh kapsul yang tebal.^{24,25}

Penyebab kriptokokosis diklasifikasikan kedalam dua spesies, *C. neoformans*, yang mempunyai dua varietas: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipe A) dan *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipe D), serta hibrida (AD), dan *C. gattii* (serotipe B dan C).^{26,27} Pembagian kelima serotipe *Cryptococcus* spp. tersebut didasarkan pada reaksi imunologi antara antibodi dengan komponen kapsular utama, yakni *glucuronoxylomannan* (GXM). Identifikasi konvensional hanya dapat membedakan antara *C. gattii* dengan *C. neoformans* var. *grubii* dan *C. neoformans* var. *neoformans*. Perbedaan tersebut berdasarkan kemampuan *C. gattii* yang memiliki resistensi alamiah terhadap L-canavanine, sehingga mampu hidup dan menggunakan glisin sebagai sumber karbon satu-satunya sedangkan *C. neoformans* var. *grubii/neoformans* tidak mampu karena sensitif terhadap L-canavanine.^{15,28,29}



Gambar 1. Pewarnaan tinta india: sel khamir *Cryptococcus neoformans* dengan kapsul.

Banyak faktor yang berperan pada virulensi *C. neoformans* antara lain ukuran spora, kapsul polisakarida, sifat termotoleran, *mating type* dan produksi melanin. Sifat lain yang berkontribusi terhadap patogenesis adalah produksi mannitol, mampu terlarut dalam cairan ekstraselular, *phenotypic switching*, toleransi terhadap pH rendah dan kadar garam tinggi. Kapsul polisakarida merupakan faktor virulensi utama dan berperan dalam kemampuan untuk bertahan dalam tubuh pejamu maupun lingkungan. Hal itu merupakan kunci utama virulensi, yang mungkin terkait dengan interaksi antara *Cryptococcus*, lingkungan dan organisme lainnya (misal: amoeba, nematoda, serangga, tanaman dan jamur lain).³⁰

a. Ukuran spora

Ukuran spora yang diproduksi oleh bentuk seksual lebih mudah terhirup ke dalam saluran napas karena ukurannya yang kecil yakni sekitar 1,8 μm -3,0 μm , sehingga lebih efisien memasuki saluran bronkus dan ruang alveolar. Selain itu, dibandingkan sel khamir, spora tidak memerlukan opsonisasi untuk fagositosis oleh makrofag.^{30,31} Khamir dalam makrofag dapat mati karena proses pembunuhan oleh makrofag atau tetap hidup dan justru berkembang biak.

b. Kapsul Polisakarida

Kapsul *Cryptococcus* di alam sangat tipis.²⁴ Setelah invasi paru, *Cryptococcus* mengalami rehidrasi dan membentuk kapsul tebal yang kaya karbohidrat, yang tersusun dari 90%-95% polisakarida GXM, 9% GalXM, dan 1% mannoprotein.^{28,32} Kapsul polisakarida berperan sebagai barier kimia dan fisik terhadap pengenalan jamur oleh makrofag, menghindari perlekatan makrofag dan mengganggu fungsi makrofag setelah fagositosis.²⁹

Sebanyak 20% dari populasi sel *C. neoformans* memiliki kemampuan untuk menjadi sel titan dengan diameter yang bervariasi dari 50 – 100 μm , yang terlalu besar untuk difagositosis.³³⁻³⁵

Kapsul juga menyebabkan supresi respons imun pejamu melalui berbagai mekanisme. Supresi sistem imun dilakukan dengan cara mengganggu proses fagositosis, menghambat migrasi sel inflamasi (neutrofil, sel dendritik, makrofag) dari sirkulasi ke tempat inflamasi sehingga memudahkan invasi jamur dan berkembangnya infeksi. Kapsul juga berperan dalam deplesi komplemen, menurunkan respons antibodi, disregulasi sekresi sitokin oleh monosit dan makrofag.^{24,28} Di alam, kapsul diduga dapat melindungi sel jamur dari penghancuran oleh amoeba dan melindungi jamur terhadap kondisi stres, seperti dehidrasi.²⁴

c. Melanin

Melanin pada dinding sel membuat jamur mampu beradaptasi terhadap perubahan lingkungan misalnya terhadap radiasi ultraviolet dan temperatur yang ekstrim.^{28,36} Melanin berperan sebagai antioksidan yang melindungi jamur dari pengaruh *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) dalam tubuh manusia.³ Melanin juga berperan dalam integritas dinding sel, yang penting dalam proteksi terhadap agen antijamur yang bekerja pada permukaan sel dan menggagalkan fagositosis. *Cryptococcus* mempunyai jalur sederhana untuk melanogenesis. *Cryptococcus* membutuhkan substrat difenolik dari lingkungan sekitar karena jamur kekurangan enzim *tyrosinase*.³⁷ Fenoloksidase atau *laccase* adalah enzim yang mengandung tembaga dan berperan pada konversi difenolik menjadi melanin.³⁸

d. Faktor lain

Kemampuan tumbuh pada suhu fisiologis (37°C) dalam atmosfer dengan konsentrasi CO₂ sekitar 5% dan pH > 7,0 akan berkontribusi terhadap kelangsungan hidup jamur dalam tubuh pejamu. Pada suhu 37°C, jamur mampu bertahan dari imunitas pejamu.²⁸ Infeksi SSP yang disebabkan *C. neoformans* berkaitan dengan produksi *hexitol D-mannitol* dalam jumlah besar.³⁹ Manitol mampu melindungi jamur dari kerusakan oksidatif oleh PMN atau *cell-free oxidants* dan membantu jamur untuk bertahan dari stress lingkungan, seperti panas dan stress osmotik. Manitol meningkatkan osmolaritas cairan LCS, sehingga menyebabkan edema otak dan meningoensefalitis.^{40,41}

Peningkatan faktor transkripsi STE12 α , hanya terdapat pada *alpha mating type*, menyebabkan sintesis *diphenol oxidase* yang berperan pada pembentukan melanin.⁴² *Cryptococcus* memproduksi dan mensekresi enzim hidrolitik (misal: protease, fosfolipase) yang mampu merusak jaringan untuk mendapatkan nutrisi. Enzim *phospholipase B* (PLB), *lysophospholipase* (LPL), dan *lysophospholipase-transacylase* (LPTA) menyebabkan destabilisasi dan destruksi membran dan surfaktan paru, lisis sel dan pelepasan *lipid second messenger*. Fosfolipase juga meningkatkan perlekatan adesi sel *C. neoformans* pada epitel paru.^{43,44} Hal lain yang membantu proses infeksi adalah *phenotypic switching*, yaitu perubahan komposisi dan ukuran kapsul.⁴⁵

Patogenesis

Pada sampel klinik, *Cryptococcus* sebagian besar ditemukan dalam bentuk sel khamir bertunas, sedangkan di lingkungan dapat terlihat sebagai filamen saat *mating* dan *monokaryotic fruiting*.

Selama reproduksi seksual, sel khamir haploid dari dua *mating type* berbeda, α dan a , akan berfusi dan menghasilkan filamen dikariotik. Perkembangan basidium terjadi setelah migrasi inti dari induk ke sel hifa utama. Inti mengalami fusi dan meiosis dilanjutkan dengan mitosis dan produksi basidiospora haploid dengan cara membentuk tunas. *Cryptococcus* juga dapat mengatasi keterbatasan nutrisi dengan cara *monokaryotic fruiting*. Hifa monokariotik diploid dihasilkan dari endoduplikasi dan fusi inti sel khamir dengan sel yang mempunyai *mating type* yang sama. Meiosis terjadi selama perkembangan basidium dan tak lama kemudian memproduksi basidiospora. Basidiospora matang tersebar ke lingkungan dan bertunas menghasilkan sel khamir haploid.^{46,47} Sel tersebut dianggap sebagai salah satu bentuk infeksi.

Infeksi *Cryptococcus* spp. hampir selalu diperoleh dari lingkungan, terutama melalui inhalasi. Jamur akan bereplikasi di paru-paru setelah inhalasi basidiospora atau sel khamir kering, yang infeksi dan cukup kecil untuk masuk ke dalam alveoli paru. Jamur kemudian berinteraksi dengan makrofag alveolar, sel yang bertanggungjawab melindungi pejamu dari patogen potensial dengan fagositosis dan menghancurkan benda asing. Interaksi awal antara basidiospora dan sistem imun bawaan dalam hal ini makrofag alveolar penting karena menentukan perkembangan penyakit selanjutnya.

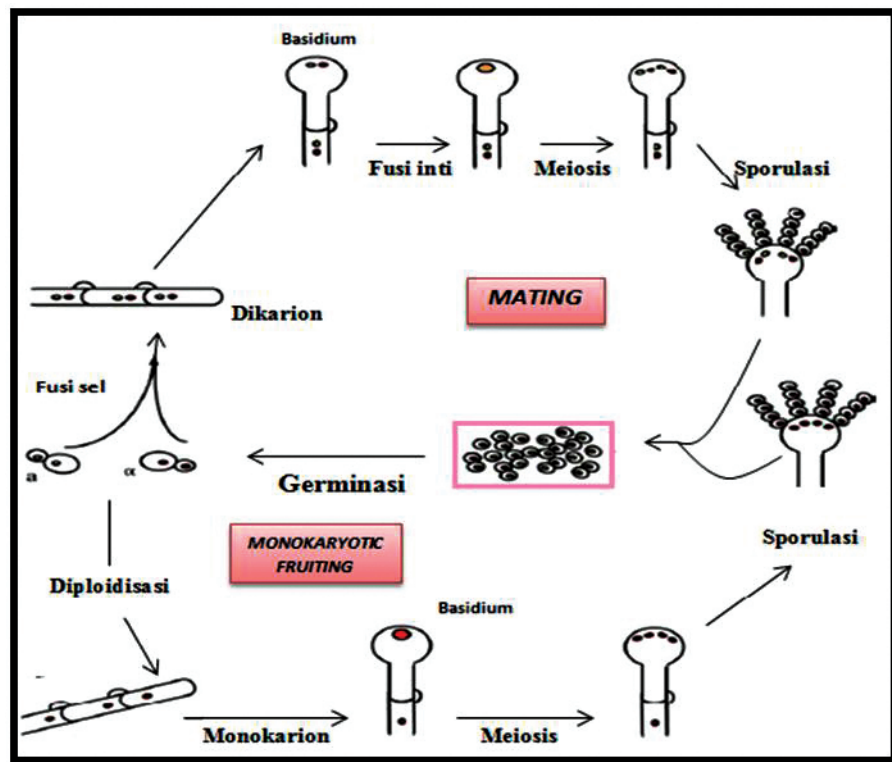
Cryptococcus neoformans dan *C. gattii* mengembangkan mekanisme untuk “mengelabui” makrofag, sehingga makrofag tetap utuh dan jamur dapat keluar (ekspulsi) atau dorman dalam makrofag. Infeksi laten atau dorman dilaporkan terjadi pada manusia dan hewan, yaitu sejumlah kecil sel khamir yang *viable* difagositosis oleh makrofag yang berada pada granuloma di paru atau kelenjar getah bening, selanjutnya dapat menjadi fokus infeksi pada pejamu

imunokompromi. Bentuk dorman tersebut dapat mengalami reaktivasi dan menyebar melalui darah ke organ lain, terutama SSP.⁴⁸⁻⁵⁰

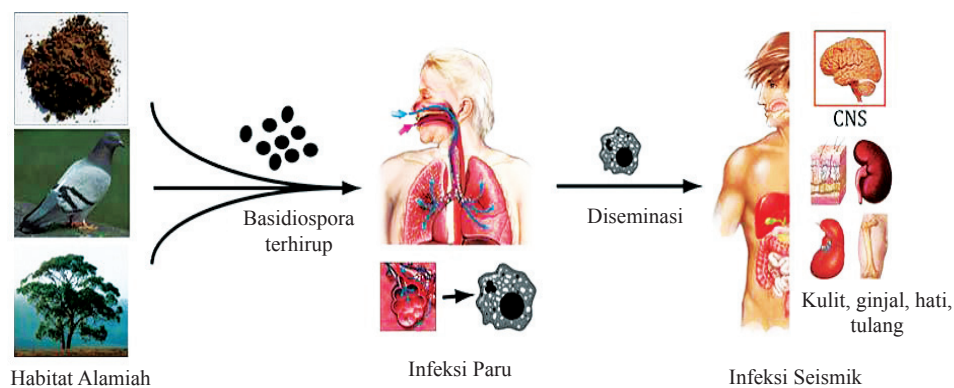
Infeksi kriptokokus di SSP didahului dengan adesi jamur pada *human brain microvascular endothelial cells* (HBMEC), diikuti *transcellular crossing* pada sawar darah otak tanpa mengganggu integritas membran. Produksi urease oleh sel *C. neoformans* memfasilitasi perlekatan mikrokapiler dan gangguan sel endotel, menyebabkan sel *C. neoformans* dapat melintasi sawar darah otak melalui mekanisme paraselular. Sel *C. neoformans* juga dapat menginvasi SSP melalui infeksi sel imun yang dapat membawa sel jamur melalui sawar darah otak, disebut mekanisme *trojan horse*. Fagositosis sel *C. neoformans* setelah

masuk ke dalam jaringan otak menyebabkan sel jamur mampu menghindari fagosit, melanjutkan invasi dan terjadi kerusakan jaringan akibat pengasaman lingkungan dan aktivasi fosfolipase ekstraseluler.^{51,52}

Cryptococcus memiliki kemampuan untuk menghindari makrofag dengan menginduksi lisis makrofag dan melalui proses non litik yang dikenal sebagai *vomocytosis*, yaitu proses ekspulsi jamur dari makrofag tanpa menyebabkan lisis sel inang.⁵³ Di otak kelangsungan hidup jamur meningkat, diduga selain akibat kemampuannya memodulasi aktivitas makrofag juga karena neurotransmitter dapat digunakan sebagai prekursor untuk sintesis melanin, yang merupakan salah satu faktor virulensi penting.



Gambar 2. Skema Siklus Hidup *Cryptococcus*. Keterbatasan nutrisi menyebabkan *mating* dan *monokaryotic fruiting*. Saat reproduksi seksual, pasangan *mating* yang berbeda akan berfusi membentuk filamen dikariotik. Setelah membentuk basidium akan terjadi fusi inti dan meiosis/mitosis selanjutnya memproduksi basidiospora secara bertunas. Pada *monokaryotic fruiting*, sel khamir dari salah satu *mating type* membentuk hifa monokariotik diploid, yang akan berkembang menjadi basidium dan bersporulasi setelah proses meiosis/mitosis selesai. (dimodifikasi dari Voelz¹)



Gambar 3. Skema patogenesis infeksi *Cryptococcus*. (dimodifikasi dari Voelz¹)

Selain otak yang merupakan organ predileksi utama, kadang-kadang, *Cryptococcus* dapat menginfeksi organ lain termasuk kulit. Kelainan kulit dapat merupakan proses diseminasi dari infeksi sistemik, namun juga dapat terjadi akibat inokulasi jamur melalui luka di kulit, dan menyebabkan infeksi lokal.³⁸

Identifikasi *Cryptococcus* spp.

Identifikasi adalah proses membandingkan organisme yang belum diketahui identitasnya dengan organisme yang telah diketahui identitasnya. Identifikasi *Cryptococcus* dapat dilakukan secara konvensional dan molekular.

a. Identifikasi konvensional

Identifikasi secara konvensional dilakukan berdasarkan karakter fenotipik. Karakter fenotipik terdiri atas karakter morfologi (makroskopik dan mikroskopik), fase reproduksi seksual dan aseksual, dan karakter fisiologi biokimia. Morfologi makroskopik yang diamati antara lain warna koloni, profil koloni, tekstur koloni, tepi dan permukaan koloni (dikutip dari Maulana⁵⁴). Pada medium agar Sabouraud yang diinkubasi

pada suhu kamar, koloni *Cryptococcus* yang terbentuk berwarna kekuningan, mengkilat, dan mukoid. Pada agar *niger seed* yang diperam dalam suhu kamar, *Cryptococcus* membentuk koloni khamir yang berwarna coklat kehitaman, mengkilat, dan mukoid.⁵⁵

Karakter morfologi mikroskopik yang diamati adalah ukuran dan bentuk sel. Di laboratorium, pemeriksaan secara mikroskopik dilakukan menggunakan pewarnaan *lacto phenol cotton blue* (LPCB) untuk identifikasi morfologi semua jenis koloni (filamen, ragi, dan koloni seperti ragi). Sementara itu, pewarnaan tinta india digunakan untuk identifikasi *Cryptococcus* dengan melihat bentuk kapsul yang terlihat jelas pada latar belakang tinta yang berwarna gelap. Jamur akan terlihat sebagai sel ragi yang dikelilingi kapsul, yang tampak sebagai zona terang yang mengelilingi sel khamir. Sel khamir mungkin berbentuk bulat atau oval. Sel khamir *Cryptococcus* dapat tunggal tanpa tunas atau bertunas tunggal, namun jarang multipel.^{56,57}

Karakter fisiologi / biokimia *Cryptococcus* dibedakan berdasarkan kemampuan fermentasi gula tertentu, asimilasi karbon dan nitrogen, dan pertumbuhan pada suhu 37°C (dikutip

dari Maulana⁵⁴). *Cryptococcus* memiliki kemampuan untuk tumbuh dengan baik pada medium yang mengandung sumber karbon raffinosa, melezitosa, D-xylosa, L-arabinosa. *Cryptococcus* merupakan *cellulolytic yeasts* dan mempunyai kemampuan merombak selulosa menjadi glukosa.⁵⁸ Kemampuan *Cryptococcus* tumbuh pada suhu 37°C merupakan karakter fisiologi yang penting pada proses infeksi dalam tubuh manusia.²⁸

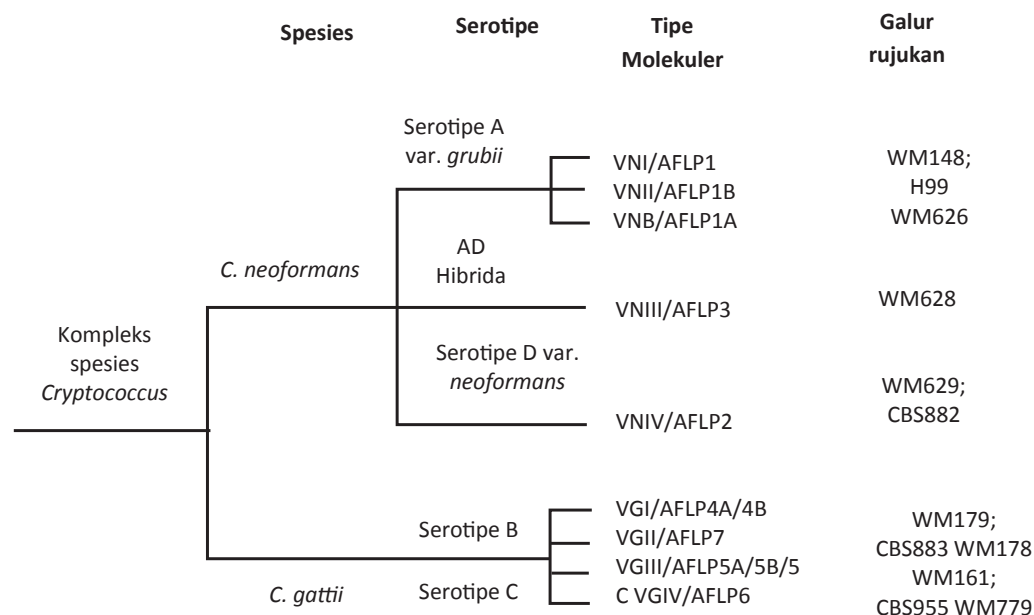
Identifikasi fenotipik memiliki beberapa kekurangan dan seringkali tidak dapat digunakan untuk membedakan spesies dan membutuhkan waktu lebih lama karena tergantung pada pertumbuhan jamur.

b. Identifikasi molekular

Identifikasi molekular dilakukan berdasarkan karakter genotipik. Genotipe

kedua spesies *Cryptococcus* pada tingkat subspecies menyediakan informasi yang relevan untuk memahami bagaimana jamur ini menyebar di seluruh dunia, sifat struktur populasi, dan bagaimana jamur berkembang menjadi patogen. Berdasarkan senotipe saat ini, terdapat sembilan jenis jenis galur yakni: VNI, VNII, VNB, VNIII, dan VNIV untuk *C. neoformans*, dan VGI, VGII, VGIII, dan VGIV untuk *C. gattii*.⁵⁹

Klasifikasi terbaru *Cryptococcus* berdasarkan *genetic typing* menggunakan PCR *fingerprinting*, RFLP, RAPD, AFLP, MLST, MLMT dan analisis MALDI-TOF.^{59,60} Dari semua metode tersebut hanya tiga metode yang telah terbukti memberikan hasil yang dapat dibandingkan: PCR *fingerprinting*, AFLP, dan MLST. PCR *fingerprinting* didasarkan pada amplifikasi sekuens DNA yang diapit oleh pengulangan



Gambar 4. Skema filogenetik kompleks spesies *Cryptococcus*. Diagram terdiri atas spesies, serotipe, tipe molekular dan referensi strain. Kompleks spesies terdiri dari dua spesies, *C. neoformans* dan *C. gattii*. *Cryptococcus neoformans* selanjutnya dibedakan menjadi serotipe A varietas *grubii* dengan tipe molekular VNI, VNII, VNB, hybrid AD (VNIII) dan serotipe D varietas *neoformans* tipe molekular VNIV. *Cryptococcus gattii* dibedakan menjadi serotipe B dan C dengan tipe molekular VGI, VGII, VGIII, VGIV.^{1, 61}

DNA sederhana yang digunakan sebagai primer tunggal pada PCR. Amplifikasi menghasilkan profil pita yang mampu membedakan jauh pada tingkat subspecies. Primer yang digunakan dalam PCR *fingerprinting* termasuk sekuens inti spesifik minisatelit M13 *wild-type* dan primer spesifik mikrosatelit GACA₄.⁵⁹

Prinsip dasar teknik AFLP adalah digesti/pemotongan sampel DNA oleh enzim endonuklease yang dikombinasikan dengan amplifikasi menggunakan adaptor yang menghasilkan spesifisitas di situs restriksi. Tahap PCR selanjutnya mampu memilih profil khusus tergantung pada jumlah nukleotida yang ditambahkan ke primer. Fragmen berlabel fluoresen dipisahkan oleh *sequencer* kapiler otomatis dan divisualisasikan sebagai profil pita.⁶² Selanjutnya, MLST adalah teknik identifikasi berdasarkan analisis sekuens dari serangkaian lokus yang polimorfik. Kombinasi dari jenis alel yang berbeda dari lokus yang dipilih menentukan genotipe.⁶³

Genotipe nomenklatur antara tiga metode utama (PCR *fingerprinting*, AFLP, dan MLST) dibandingkan dan distandarisasi seperti yang terlihat pada gambar 4.

Penutup

Cryptococcus spp. sebagai penyebab kriptokokosis adalah khamir berkapsul yang tersebar luas di dunia. Habitat utama *Cryptococcus* adalah lingkungan baik di tanah yang mengandung busukan material tanaman, kotoran burung merpati ataupun pepohonan. Di alam dapat terjadi sehingga dihasilkan bentuk seksual. Kriptokokosis pada manusia terjadi melalui inhalasi basidiospora atau sel khamir kering yang tersebar di lingkungan. Identifikasi spesies *Cryptococcus* spp. dapat dilakukan melalui pemeriksaan laboratorium secara konvensional dan

molekular. Identifikasi konvensional dilakukan berdasarkan karakter fenotipik, dan fisiologi jamur. Identifikasi molekuler dilakukan berdasarkan karakter genotipik. Tiga metode utama *genetic typing* yaitu PCR *fingerprinting*, AFLP, dan MLST. Saat ini, *Cryptococcus* spp terdapat sembilan jenis molekuler utama: VNI, VNII, VNB, VNIII, dan VNIV untuk isolat *C. neoformans*, dan VGI, VGII, VGIII, dan VGIV untuk isolat *C. gattii*.

Daftar pustaka

1. Voelz, K. Macrophage-Cryptococcus interaction during Cryptococcosis. Thesis. Birmingham, College of Life and Environmental Sciences, School of Biosciences: University of Birmingham. 2010.
2. Zhang T, Victor TR, Rajkumar SS, Li X, Okoniewski JC, Hicks AC, et al. Mycobiome of the bat white nose syndrome affected caves and mines reveals diversity of fungi and local adaptation by the fungal pathogen *Pseudogymnoascus destructans*. Plos One, 2014; 9 (9), e108714.
3. Mesquita da Costa M, Teixeira FM, Schalcher TR, Magalhaes de Brito MTF, Valerio ES, Monteiro MC. Cryptococcosis, A risk for immunocompromised and immunocompetent individuals. Open Epid J. 2013; 6: 9-17.
4. Sjam R, Mulyati, Adawiyah R, Imran D, Wahyuningsih R. Cryptococcal Meningitis among AIDS Patients in Jakarta. Maj Kedokt FKUKI. 2012; 28(4), 160-6.
5. Gupta G, Fries BC. Variability of phenotypic traits in *Cryptococcus* varieties and species and the resulting implications for pathogenesis. Future Microbiol. 2010; 5(5): 775-87.
6. Yauch LE, Lam JS, Levitz SM. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. PLoS Pathog. 2006; 2(11): 1060-68.
7. Kwon-Chung KJ. A New species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Mycologia. 1976; 68 (4): 942-6
8. Kwon-Chung KJ. A new genus, *filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia. 1975; 67(6):1197-200
9. Kwon-chung KJ, Bennett JE, Theodore TS. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov: Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. Int J Syst

- Bacteriol. 1978; 28: 616-20.
10. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 2009; 47(6): 561-70.
 11. Kwon-chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to Conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon.* 2002; 51(4): 804-6.
 12. Yan Z, Li X, Xu J. Geographic distribution of mating type alleles of *Cryptococcus neoformans* in four area of the United States. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3): 965-72.
 13. Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol.* 2009; 11(3): 370-80.
 14. Lazera MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2000; 38: 379-83.
 15. Leite-Jr DP, Amadio JVRS, Martins ER, Simoes SAA, Yamamoto ACA, Leal-Santos FA, Takahara DT, Hahn RC. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazillian libraries. *J of Occup Med Toxic.* 2012; 7: 11.
 16. Takahara DT, Lazera MS, Wanke B, Trilles L, Dutra V, Paula DAJ, *et al.* First Report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013; 55(6): 371-6.
 17. Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe.* 2007; 1(14): 263-73.
 18. Kobayashi CCBA, Souza LKH, Fernandez OFL, Brito SCA, Silva AC, Sousa ED, Silva MRR. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated form urban environmental sources in Guiania, Goias State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005; 47(4): 203-7.
 19. Hashemi SJ, Jabbari AG, Bayat M, Rafiei SM. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in domestic birds reffered to veterinary clinics in Tehran. *Euro J Exp Biol.* 2014; 4(1):482-6.
 20. Elis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(7): 1642-44.
 21. Kaocharoen S, Ngamskulrungrroj P, Firacative C, Trilles L, Piyabongkarn D, Banlunara W, Poonwan N, Chaiprasert A, Meyer W, Chindamporn A. Molecular epidemiology reveals genetic diversity amongst isolates of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(7): e2297.
 22. Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, *et al.* Characterization of environment sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(5): 1433-43.
 23. Liu TB, Perlin DS, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence.* 2012; 3(2), 173-81.
 24. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigates*. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56(2):211-24.
 25. Prince Y. Improving laboratory diagnostic techniques to detect *M. tuberculosis* complex and *C neoformans* as the causative agents of chronic meningitis in the cerebrospinal fluid of adult patients [Tesis]. Stellenbosch University; 2010.
 26. Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* Species. In: Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM, editors. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 67. Burlington: Academic Press; 2009; pp. 131-90. ISBN: 978-0-12-374802-7.
 27. Wozniak KL, Levitz SM. Isolation and purification of antigenic components of *Cryptococcus*. *Methods Mol Biol.* 2009; 470: 71-83.
 28. Buchanan KL and Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis.* 1998; 4(1): 71-83.
 29. Bose I, Reese A, Ory J, Janbon G, Doering T. A Yeast Under Cover: The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2003; 2: 655-63.
 30. Springer DJ, Phadke S, Billmyre B, Heitman J. *Cryptococcus gattii*, no longer an accidental pathogen?. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012; 6(4): 245-56.
 31. Lin X, Heitman J. Chlamydospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(10): 1746-54.
 32. Gilbert AS, Wheeler RT, May RC. Fungal pathogens: Survival and Replication within Macrophages. 11 November 2014. Diunduh dari: www.perspectivesinmedicine.org. 23 Maret 2015.
 33. Okagaki LH, Strain A, Nielsen J, Charlier C, Baltés N, Chretien F, Heitman J, Dromer F, Nielsen K. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1000953.

34. Okagaki L, Nielsen K. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infection. *Eukaryot Cell*. 2012; 11: 820-26.
35. Zaragoza O, Nielsen K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: Cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol*. 2013; 16: 409-13.
36. Plonka PL, Grabacka M. Melanin Synthesis in Microorganisms-Biotechnological and Medical Aspects. *Acta Biochim Pol*. 2006; 53(3): 429-43.
37. Polacheck I, Kwon-chung KJ. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Gen Microbiol*. 1988; 134: 1037-41.
38. Williamson PR. Laccase and Melanin in the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Frontier in Bioscience*. 1997; 2: e99-107.
39. Liappis AP, Kan VL, Richman NC, Yoon B, Wong B, Simon GL. Mannitol and inflammatory markers in the cerebral spinal fluid of HIV-infected patients with Cryptococcal meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 27: 477-79.
40. Wong B, Perfect JR, Beggs S, Wright KA. Production of the Hexitol D-Mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with experimental meningitis. *Infect Immun*. 1990; 58(6): 1664-70.
41. Chaturvedi V, Flynn T, Niehaus WG, Wong B. Stress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 1996; 142: 937-43.
42. Dixit A, Carroll SF, Qureshi ST. *Cryptococcus gattii*: An emerging cause of fungal disease in North America. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. Canada: Hindawi Publishing Corporation. 2009.
43. Chen SCA, Wright LC, Golding JC, Sorrell TC. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochem J*. 2000; 347: 431-39.
44. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol*. 2000; 13: 122-43.
45. Jain N, Fries BC. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Mycopathol*. 2008; 166(4): 181-8.
46. Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3: 753-764.
47. Hull C and Heitman J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet*. 2002; 36: 557-615.
48. Voelz K, Lammas DA, May RC. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009; 77: 3450-57.
49. Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009; 77: 4345-55.
50. Johnston SA, May RC. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerization. *PLoS Pathog*. 2010; 6(8): e1001041.
51. Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009; 77(1): 120-27.
52. Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, *et al*. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood brain barrier. *Infect Immun*. 2004; 72(9): 4985-95.
53. Johnston SA, May RC. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cell Microbiol*. 2013; 15: 403-11.
54. Maulana I. Identifikasi isolat khamir dari saluran pencernaan *Apis cerana* (Fabricus, 1793) di apiari berdasarkan data sequence daerah ITS rDNA. Skripsi. Depok, Jawa Barat Indonesia: Departemen Biologi, Fakultas MIPA Universitas Indonesia. 2011.
55. Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kaushal A, Padhye AA. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from Eucalyptus camaldulensis in India. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(12): 3340-42.
56. Zerpa R, Huicho L, Guillén A. Modified India ink preparation for *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(9): 2290-91.
57. Shashikala, Kanungo R, Srinivasan S, Mathew R, Kannan M. Unusual morphological forms of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. *Indian J Med Microbiol*. 2004; 22(3): 188-90.
58. Kanti A. Identifikasi jenis khamir yang diisolasi dari tanah gambut Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi. *BioSMART*. 2004; 6(1): 10-14. ISSN: 1411-321X.
59. Cogliati M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus*

- gattii*: An atlas of the molecular types. Scientifica. 2013, Article ID 675213. Diunduh dari <http://dx.doi.org/10.1155/2013/675213>. 20 Maret 2015
60. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA, Dromer F, Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 2001; 147: 891-907.
61. Meyer M, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(2): 189 – 195.
62. Vos P, Hogers R, Bleekeretal M. “AFLP: a new technique for DNA fingerprinting” *Nucleic Acids Res*. 1995; 23(21): 4407–14.
63. Taylor JW and Fisher MC. “Fungal multilocus sequence typing—it’s not just for bacteria”. *Curr Op Microbiol*. 2003; 4(6): 351–56.