

Pembentukan *Germ Tube Candida albicans* dan *Candida tropicalis* pada Media Putih Telur

Mulyati,^{1*}Syarifah E. Jannah,² Retno Wahyuningsih^{1,3}

¹Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

²Poltekes Jakarta IV Kemenkes

³Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia

Abstrak

Spesimen penelitian adalah 340 isolat *Candida* yang diisolasi dari biakan bahan klinik penderita kandidosis (darah, sputum, tinja, urin, kerokan kulit, sekret vagina, usap mulut dan fistula). Isolat *Candida* dimurnikan dan diidentifikasi dengan metode fermentasi karbohidrat (gold standar) dan didapatkan Spesies *Candida* yang akan diuji terdiri dari 58 isolat *C. albicans*, 90 isolat *C. tropicalis* dan 192 isolat *Candida* lainnya. Selanjutnya dilakukan uji pembentukan *germ tube* pada media cair yang mengandung protein yaitu putih telur ayam buras. Pada setiap tabung perbenihan dimasukkan ± 1 ml putih telur dan dimasukkan inokulum dengan konsentrasi $\pm 10^5$ - 10^6 sel/ml, kemudian sedikit dikocok agar tercampur. Tabung biakan ditutup dengan kapas dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Hasil dinyatakan positif bila terbentuk kecambah (*germ tube*). Hasil uji pembentukan *germ tube* menunjukkan seluruh spesies yang diidentifikasi sebagai *C. albicans* (n=58) yang membentuk *germ tube* hanya 2 (3,4%) isolat tidak membentuk *germ tube*. Sebaliknya, pada *C. tropicalis* (n=90) hanya ditemukan 4 isolat (4,4%) yang membentuk *germ tube* dan secara morfologis tidak berbeda dengan *germ tube* yang dibentuk oleh *C. albicans* tetapi jumlahnya sedikit.

Kata kunci: *C.albicans*, *C.tropicalis*, uji *Germ tube*, putih telur

The Formation of Germ Tube *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Using White Egg as Medium

Abstract

As of 340 *Candida* isolates were isolated from the culture material of patients with candidosis (blood, sputum, feces, urine, skin scrapings, vaginal secretions, mouth swabs and fistulas). *Candida* isolates were purified and identified by carbohydrate fermentation method (gold standard). The *Candida* species to be tested consisted of 58 *C. albicans* isolates, 90 *C. tropicalis* isolates and 192 other *Candida* isolates. Subsequently, the germ tube formation test was carried out on liquid media containing protein, such as chicken egg white. In each seedling tube, ± 1 ml of egg white was inserted and an inoculum was inserted with a concentration of $\pm 10^5$ - 10^6 cells / ml, then shaken slightly to mix. The culture was covered with cotton and incubated at 37°C for 2 hours. The results were positive if germ tube was formed. The results of germ tube formation test showed that of 58 species identified as *C. albicans*, only 2 (3.4%) isolates did not form germ tubes. In contrast, of 90 *C. tropicalis* isolates, only 4 (4.4%) formed the germ tube and morphologically did not differ from the germ tube formed by *C. albicans* but the amount was small.

KeyWord: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *germ tube*, egg white

*M: Penulis Koresponden; E-mail: dramulyati59@gmail.com

Pendahuluan

Candida adalah jamur golongan khamir yang terdiri atas banyak spesies dan beberapa spesies yang sering dijumpai pada bahan klinik yaitu *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis* dll. *Candida* diketahui dapat hidup sebagai komensal dalam tubuh manusia namun dapat berubah menjadi patogen pada keadaan yang menguntungkan, misalnya pada penderita dengan faktor risiko. Diantara semua spesies di atas yang paling sering menimbulkan penyakit pada manusia baik infeksi superfisial maupun sistemik adalah *Candida albicans* yakni sekitar 70-80%, kemudian diikuti oleh *C. tropicalis* sekitar 30-40%.¹⁻⁴ Selain *C. albicans*, *C. dubliniensis* juga sering ditemukan sebagai penyebab kandidosis orofaring (KOF) pada penderita HIV/AIDS.⁵ Akhir-akhir ini terjadi peningkatan tajam morbiditas yang disebabkan *Candida*, hal itu terjadi karena bertambahnya jumlah pasien imunokompromis karena berbagai sebab.

Identifikasi spesies *Candida* penting dilakukan karena selain digunakan untuk menegaskan diagnosis juga dapat dipakai sebagai acuan dalam menentukan jenis antifungal yang akan dipakai, dan memprediksi sensitifitas jamur terhadap obat antifungal. Untuk mengisolasi *Candida* dari bahan klinik biasanya spesimen ditanam pada medium agar sabouraud dekstrosa (ASD). Pada medium tersebut semua spesies *Candida* akan tumbuh sebagai koloni ragi atau koloni seperti ragi yang tidak dapat dibedakan satu sama lainnya baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Untuk membedakan spesies diperlukan beberapa uji identifikasi berdasarkan fisiologi jamur seperti uji fermentasi, uji asimilasi dan secara morfologi (*slide culture*, uji *germ tube*, biakan dalam media kromogenik)

yang selama ini dikenal sebagai identifikasi cara konvensional. Identifikasi secara konvensional memakan waktu cukup lama, dapat mencapai 2–21 hari sehingga diagnosis dini sukar untuk ditegakkan, kecuali uji *germ tube* hanya membutuhkan waktu 2-3 jam.^{5,6}

Dengan metode uji *germ tube* dapat dibedakan *C. albicans*, dengan *Candida non C. albicans*.^{7,8} Uji *germ tube* biasanya dilakukan menggunakan medium yang mengandung faktor protein seperti serum, dan plasma. Putih telur merupakan medium murah dan mudah didapat dan yang terpenting mengandung cukup protein untuk pertumbuhan organisme seperti *Candida*. Dalam penelitian akan dilakukan uji pertumbuhan *germ tube* dengan media putih telur. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan uji *germ tube* memakai media putih telur.

Bahan dan Cara

Spesimen penelitian adalah 340 isolat *Candida* yang diisolasi dari bahan klinik yang berasal dari penderita kandidosis. Bahan klinik yang digunakan berupa darah, sputum, tinja, urin, kerokan kulit, sekret vagina, usap mulut dan fistula. Semua bahan klinik dibiak terlebih dahulu pada media agar ASD yang mengandung kloramfenikol 0,5 mg/ml (ASD+) dan tanpa kloramfenikol ASD (-). Selanjutnya koloni *Candida* yang tumbuh dimurnikan sehingga didapat isolat tunggal.

Pemurnian Isolat *Candida* spp.

Koloni yang tumbuh pada ASD (+) dan ASD (-) dari biakan bahan klinik umumnya tumbuh bercampur atau berdekatan satu sama lain. Untuk mendapatkan koloni tunggal maka dipilih koloni yang letaknya terpisah dari koloni lainnya. Koloni tersebut diambil sedikit dengan sengkeli dan ditanam di permukaan medium ASD (+) dalam cawan

petri (SDA *plate*) atau dalam tabung reaksi (SDA *slant*). Bila tidak didapatkan koloni yang terpisah maka koloni diambil sedikit dan diencerkan dengan 1 ml akuades steril, kemudian 0,5 ml suspensi *Candida* diencerkan kembali dengan akuades steril sampai didapatkan konsentrasi 10^5 sel/ml. Dengan ose suspensi tersebut diambil dan digoreskan pada ASD (+) dalam cawan petri. Biakan disimpan pada suhu kamar (25-30°C) selama 2-3 hari. Dari setiap cawan petri diambil empat koloni dari empat tempat yang berbeda. Semua isolat yang digunakan telah diidentifikasi dengan metode asimilasi-fermentasi sampai ke tingkat spesies.

Identifikasi Morfologis dengan Uji *Germ Tube*

Uji pembentukan *germ tube* dilakukan pada media cair putih telur terhadap 340 isolat yang sebelumnya telah diidentifikasi dengan uji fermentasi karbohidrat (baku emas) dan didapatkan 58 isolat *C. albicans*, 90 isolat *C. tropicalis* dan 192 isolat *Candida* lainnya. Terhadap isolat tersebut dilakukan uji pembentukan *germ tube* dengan menggunakan putih telur sebagai media.

Koloni *Candida* yang diteliti dengan konsentrasi inokulum $\pm 10^5$ - 10^6 sel/ml dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 1 ml putih telur yang masih hangat. Suspensi

tersebut dikocok perlahan agar koloni *Candida* tercampur. Tabung biakan ditutup dengan kapas lemak dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 jam.⁹⁻¹¹ Setelah inkubasi suspensi putih telur yang mengandung *Candida* tersebut diambil dengan ose bulat atau pipet pasteur dan diletakkan di atas kaca objek kemudian ditutup dengan kaca tutup. Sediaan mula-mula diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100× dan selanjutnya dengan pembesaran 400×. Hasil dinyatakan positif bila ditemukan pertumbuhan hifa seperti kecambah yang berbentuk raket.

Hasil

Pemeriksaan suspensi *Candida* – putih telur memperlihatkan kemampuan *Candida* untuk membentuk *germ tube* dalam waktu 2-3 jam pada suhu 37°C (Gambar.1).



Gambar1. Pembentukan *germ tube* oleh *Candida albicans*

Pada Tabel 1, diperlihatkan hasil uji *pembentukan germ tube* oleh berbagai spesies *Candida* pada medium putih telur.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan *Germ Tube* pada 340 Isolat *Candida* Spp.

Hasil	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida</i>	Jumlah
GT	lain			
Positif	56 (96,6%)	4(4,4%)	0 (0%)	60(17,6%)
Negatif	2 (3,4%)	86(95,6%)	192(100%)	280(82,4%)
Jumlah	58	90	192	340

Keterangan: GT, Germ Tube

Pada uji pembentukan *germ tube* 56 (96,6%) dari 58 isolat *C. albicans* membentuk *germ tube* hanya dua isolat tidak membentuk *germ tube*. Isolat *C. tropicalis* (n=90) ditemukan ada empat isolat (4,4%) dapat membentuk *germ tube* yang secara morfologis tidak berbeda dengan *germ tube* yang dibentuk oleh *C. albicans* tetapi jumlah *germ tube* yang terbentuk hanya sedikit. Pada *Candida non-Candida albicans* lainnya (n=192) sama sekali tidak terjadi pembentukan *germ tube*.

Diskusi

Uji pembentukan *germ tube* dilakukan pada medium yang mengandung protein. Transisi dari bentuk blastospora menjadi hifa dimulai dengan pembentukan *germ tube* (hifa yang keluar dari sisi sel ragi memanjang seperti tabung) yang akan menjadi miselium. Bentuk *germ tube* berhubungan dengan virulensi *Candida* dan meningkatkan kemampuan *Candida* untuk melekat dan menginvasi epitel mukosa dan kulit. Kemampuan membentuk *germ tube* terutama ditemukan pada *C. albicans*, sehingga uji *germ tube* digunakan sebagai pembeda antara *C. albicans* dan *C. non C. albicans*. Menurut Kim, *et al.*⁶ pembentukan *germ tube* sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu (1) perbenihan yang tepat, (2) adanya *inducer*, misalnya serum, atau bahan kimia yang memiliki sifat biokimia sama dengan serum, (3) temperatur yang tepat (>33°C, optimum pada 37°C), (4) pH mendekati netral.

Hasil positif palsu dapat terjadi bila waktu inkubasi terlalu lama (> 3 jam) atau terjadi negatif palsu bila inokulum yang dimasukkan kedalam serum/putih telur terlalu banyak. Konsentrasi optimal inokulum sebaiknya sebesar 10⁶ sel/ml. Selain itu, isolat *Candida* yang diinkubasikan harus berumur 48-72 jam agar pembentukan *germ tube* optimal. Isolat *Candida* yang berumur tua biasanya

sudah membentuk hifa semu yang kadang memiliki gambaran mirip dengan *germ tube*. Kesalahan bisa terjadi, karena ada struktur yang mirip *germ tube* yang sesungguhnya adalah proses perkembangan blastospora yang memanjang membentuk hifa semu. *Germ tube* dinyatakan positif bila terdapat celah yang menghubungkan antara sel induk (sel ragi) dengan hifa yang terbentuk di permukaan sel induk tersebut dan dikenal sebagai kecambah. Apabila tidak terdapat celah (konstriksi di bagian basal sel) maka hasil dinyatakan negatif karena *germ tube* yang terbentuk sebenarnya adalah hifa semu yang dibentuk dari perpanjangan blastospora. Hal ini sering terjadi pada koloni tua (> 3 hari). Oleh karena itu setiap melakukan uji *germ tube* isolat harus diremajakan dengan menanam ulang pada media ASD yang baru.⁷

Pada penelitian ini, empat (4,4%) dari 90 isolat *C. tropicalis* membentuk *germ tube* dalam jumlah sedikit. Martin,¹² melakukan uji pembentukan *germ tube* menggunakan serum pada 26 isolat *C. tropicalis* dari bahan klinik rongga mulut orang sehat dan penderita stomatitis. Hasil pengujian isolat primer menunjukkan seluruh isolat yang diuji positif membentuk *germ tube*, tetapi setelah dilakukan sub-kultur beberapa kali ternyata *C. tropicalis* kehilangan kemampuan untuk membentuk *germ tube* dan hasil uji dari seluruh isolat *C. tropicalis* dinyatakan negatif. Kemampuan *C. tropicalis* dalam membentuk *germ tube* rendah, mungkin berkaitan dengan sifat sporulasinya, yakni kemampuan *C. tropicalis* untuk membentuk klamidospora terminal. Berbeda dengan *C. albicans* pembentukan klamidospora terminal pada *C. tropicalis* sangat sedikit, biasanya hanya ada satu klamidospora pada ujung hifa semu bahkan seringkali tidak terbentuk klamidospora. Bila dilihat secara morfologi pada biakan tipis agar tajin/jagung-Tween 80, *C. albicans* membentuk klamidospora terminal dan lateral dalam jumlah berlimpah.¹⁰ Klamidospora terminal

dan klamidospora lateral merupakan ciri khas jamur *C. albicans* dan *C. dubliniensis* pada biakan tipis agar tajin-Tween 80. Klamidospora terbentuk bila kondisi media sangat miskin karena spora tersebut berguna untuk bertahan hidup. Pada *C. tropicalis* pembentukan klamidospora bukan menjadi ciri utamanya. Tampaknya terdapat korelasi antara pembentukan *germ tube* pada media cair yang mengandung faktor protein. Dengan pembentukan klamidospora *C. albicans* dapat membentuk *germ tube* dalam jumlah yang banyak sedangkan *C. tropicalis* membentuk *germ tube* dalam jumlah sedikit (1-2 dalam lapangan pandang). Kemampuan *C. tropicalis* dalam membentuk *germ tube* sama seperti pada *C. albicans* dan morfologinya pun sama seperti *germ tube C. albicans* bahkan tidak dapat dibedakan. Perbedaannya terletak pada jumlah *germ tube* yang terbentuk. *Candida albicans* dapat membentuk *germ tube* banyak bahkan berlimpah, sedangkan *C. tropicalis* hanya dalam jumlah sedikit bahkan seringkali negatif. Kemiripan genetik antara *C. tropicalis* dengan *C. albicans* lebih besar dibandingkan dengan spesies *Candida* lainnya.¹² Apakah hal tersebut juga berhubungan dengan kemampuan *C. tropicalis* dalam membentuk *germ tube* dan klamidospora terminalis, belum jelas diketahui.

Kesimpulan

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *C. albicans* dan *C. tropicalis* keduanya dapat membentuk *germ tube*, sedangkan spesies *Candida* lainnya tidak membentuk *germ tube*. Uji pembentukan *germ tube* tidak bisa lagi dipakai untuk membedakan *C. albicans* dari *Candida*-non *C. albicans*.

Daftar Pustaka

1. Odds F.C. *Candida and candidosis*. Edisi ke-2, London; Bailliere Tindall, 1988.
2. Mulyati R, Wahyuningsih R, Widiastuti S, Syarifuddin PK. Isolasi spesies *Candida* dari tinja penderita HIV/AIDS. *Makara Kesehatan*. 2002; 6(2): 50-5.
3. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *C. albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2000; 3016-21.
4. Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. *Clinical Mycology*. Oxford University Press America. 2003
5. Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patient in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:3007-12.
6. Kim D, Shin WS, Lee KH, Kim K, Park JY, Koh CM. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique *germ tube* formation at 39°C. *Yeast* 2002; 19:957-62.
7. Mettei AS, Alves SH, Severo CB, Guanzzelli LS, Oliveira FM and Severo LC. Use of Mueller-Hinton broth and agar in the *germ tube* test. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo* 2014; 56:483-5.
8. Larone DH. *Medically important fungi a guide to identification*. 2nd Eds. Elsevier Science Publisher, Amsterdam. 1987
9. Jan A, Bashir G, Qadir R, Fomda BA, Safir, Hakak AY. Modified *germ tube* test: A rapid test for differentiation of *Candida albicans* from *C. dubliniensis*. *Internat J Contemporary Med Res*. 2018; (3): C15-17.
10. Haley LD, Callaway CS. *Laboratory methods in medical mycology*. US Department of Health Education and Welfare, Atlanta. 1978.
11. Lodder J. *The Yeast a Taxonomy Study*. North Holland Publishing Company, Second Revised and Enlarged Edition. 1970.
12. Martin MV. *Germ tube* formation by oral strains of *Candida tropicalis*, *J Med Microbiol*. 1979;12:187-93.