

## PENDAHULUAN

Protozoa usus merupakan protozoa pada usus manusia yang dapat atau tidak menyebabkan infeksi. Di Indonesia, infeksi usus masih menyebabkan masalah kesehatan seperti diare. Berdasarkan Riskesdas 2013, prevalensi diare di Indonesia sekitar 6,8%, paling sering didapati pada kelompok umur 0 hingga 4 tahun sebanyak 20,5%.<sup>1</sup> Insidensi infeksi protozoa usus bervariasi antara 10-18%.<sup>2</sup> Infeksi akibat *Entamoeba histolytica* penyebab entamebiasis paling banyak dijumpai dengan angka insidens 10-18%, pada beberapa survei yang dilakukan kepada anak sekolah menunjukkan frekuensi antara 0,2-50%.<sup>3</sup> Angka kejadian akibat *Giardia lamblia* memiliki bervariasi, salah satu penelitian di Pulau Samosir, Sumatera Utara didapatkan infeksi akibat *G. lamblia* sebanyak 12%.<sup>4</sup> Kriptosporidiosis akibat *Cryptosporidium* sp. memiliki angka insidens sebanyak 77.7% dari semua diare kronik di Jakarta.<sup>5</sup> Siklosporiasis akibat *Cyclospora cayetanensis* telah menyebabkan kejadian luar biasa pada pertemuan ilmiah di Bogor pada 50 peserta pertemuan yang berasal dari Belanda.<sup>6</sup>

Saat ini penegakkan diagnosis laboratorium infeksi protozoa usus masih dilakukan melalui pemeriksaan mikroskopik konvensional dari feses penderita. Pemeriksaan lain seperti deteksi antigen,

deteksi antibodi, histologi dan molekular juga sudah sering dilakukan. Pada tulisan ini dibahas perbandingan metode-metode pemeriksaan laboratorium untuk diagnosis yang berfokus pada spesies *E. histolytica*, *G. lamblia*, *Cryptosporidium* sp. dan *C. cayetanensis*.

### ***Entamoeba histolytica***

Protozoa penyebab penyakit amebiasis, gejala dapat simptomatik maupun asimtomatik. Gejala yang muncul dapat berupa nyeri perut hingga feses yang berdarah. Penyakit ini lebih sering menyerang individu berusia muda, ibu dalam kehamilan serta pasien yang sedang dalam terapi kortikosteroid. Sumber penularannya melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi kista *E. histolytica*,

Amebiasis terjadi saat trofozoit menginvasi epitel usus sehingga terjadi ulkus bergaung di dinding usus. Darah yang muncul berasal dari sel-sel epitel usus yang nekrosis sehingga pembuluh darah perifer menjadi rapuh dan hancur. Trofozoit membelah diri dan berkoloni di lapisan muskularis mukosa dan dapat menyebar ke sistem peredaran darah dan organ lain melalui pembuluh darah terutama ke hepar.

Pada jaringan hidup, *E. histolytica* hanya ditemukan sebagai stadium trofozoit. Stadium kista dapat ditemukan di lumen kolon dan feses yang terbentuk saat lingkungan tidak kurang menguntungkan.

Diagnosis dapat ditegakan dari pemeriksaan seperti pemeriksaan mikroskop, serologi, deteksi antigen, pemeriksaan molecular dan biopsy jaringan dari tindakan kolonoskopi.<sup>7</sup>

Pemeriksaan mikroskop dari bahan klinis feses tidak akurat karena kista dan trofozoit *E. histolytica* sulit dibedakan dengan *Entamoeba dispar* dan *Entamoeba moshkovskii* yang dianggap sebagai spesies non-patogen.<sup>7</sup>

Pemeriksaan mikroskopik langsung menggunakan NaCl 0,9% memungkinkan melihat pergerakan trofozoid.<sup>3</sup> Teknik pewarnaan yang biasa dipakai adalah *trichome*, angka sensitivitas dapat sebesar 22,3% bila dilakukan pemeriksaan tiga kali pemeriksaan berturut-turut.<sup>8</sup>

Pemeriksaan mikroskop flouresesnsi juga sering dipakai dan dengan penambahan formalin etil asetat dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas mendeteksi protozoa ini.<sup>3</sup>

Namun penelitian Sri-Hidajati et al.,<sup>9</sup> melaporkan bahwa pemeriksaan mikroskop tetap menjadi yang utama, dikarenakan dapat mengidentifikasi spesies *Entamoeba* yang mengandung eritrosit yang hanya didapatkan pada *E. histolytica* dan dapat mengetahui stadium penyakit. Sementara pada pemeriksaan PCR, tidak dapat membedakan stadium pathogen *Entamoeba* dan tergantung jumlah *Entamoeba* sp. untuk

mendeteksi asam nukleat spesies *Entamoeba* sp.

Secara umum, teknik molekuler memiliki sensitivitas dan spesifitas yang lebih baik ketimbang pemeriksaaan dengan menggunakan mikroskop, tetapi metode ini masih jarang digunakan karena membutuhkan persiapan yang baik dengan tenaga laboran yang berpengalaman.<sup>3</sup>

Metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) merupakan jenis salah satau jenis pemeriksaan secara molekular yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang baik, masing-masing 95.0% dan 94.0% serta dapat dijadikan uji saring pada pasien yang dicurigai pengidap amoebiasis.<sup>8</sup>

Standar rujukan pada penelitian uji diagnosis dengan menggunakan mikroskop dan serum yang dilakukan oleh Uslu et al.,<sup>10</sup> pemeriksaan *E. histolytica* memiliki sensitivitas 53,85% dan spesifisitas 100% dengan menggunakan pewarnaan *trichrome*, dengan metode aglutinasi latex nilai sensitivitas/spesifisitas sebesar 75.00/98.11% dan 78.57/96.77% dengan menggunakan metode hemaglutinasi indirek jika dibandingkan dengan uji antigen adhesin spesifik sebesar (*Wampole antigen test*) dan deteksi antigen membran sel spesifik kaya akan serin 30 kD (*Serazym antigen test*).<sup>10</sup>

### ***Giardia lamblia***

Infeksi protozoa ini banyak ditemukan di negara dengan iklim tropis dan sub-tropis.

Gejala yang muncul pada simptomatik biasanya bervariasi mulai dari diare ringan hingga berat, nyeri abdomen, steatorea dan sindroma malabsorpsi.

*Giardia lamblia* merupakan protozoa berflagel yang hanya memiliki dua stadium yaitu trofozoit dan kista. Protozoa ini paling sering ditemukan pada kriptosporidiosis di duodenum.

Secara umum, diagnosis dilakukan dengan mengidentifikasi trofozoit atau kista pada feses melalui tetapi pemeriksaan imunologi dan amplifikasi asam nukleat dapat meningkatkan hasil yang lebih baik.<sup>11</sup>

Pemeriksaan feses dapat dilakukan dari feses segar atau yang sudah diberikan alkohol polivinil (PVA) atau formalin 10% yang kemudian dilakukan pewarnaan. Karena pengeluaran kista dari feses bervariasi, feses sebaiknya diperiksa sebanyak tiga kali dalam waktu yang berbeda. Pemeriksaan tiga hari berturut-turut dapat meningkatkan identifikasi kista sebanyak 90% dibandingkan hanya satu kali pemeriksaan yang hanya mengidentifikasi sekitar 50-70% pada pasien yang positif giardiasis.

Jika hasil pemeriksaan mikroskop tiga kali berturut-turut tetap negatif namun giardiasis tetap dicurigai, maka pemeriksaan ELISA dapat dilakukan. Sensitivitas dan spesifisitas tes dengan menggunakan ELISA masing-masing sebesar 88-98% dan 87-100%. Pemeriksaan ini berguna untuk

mengidentifikasi pada tempat-tempat dengan insidensi giardiasis yang tinggi seperti penitipan anak atau saat terjadi wabah.<sup>12</sup> Pemeriksaan kadar immunoglobulin M (IgM) lebih menguntungkan karena dapat membedakan infeksi akut atau kronis dibandingkan dengan immunoglobulin G (IgG).

Metode molekular dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dapat mendeteksi jumlah *G. lamblia* yang rendah hingga 10 parasit/100µL di dalam feses dan berguna untuk tes saring pada pemeriksaan sumber air bersih serta mendeteksi infeksi yang asimtomatik atau ringan.<sup>13,14</sup>

*Entero-test* atau *string test* merupakan pemeriksaan yang lebih invasif dengan cara menelan kapsul gelatin yang diikat oleh benang nilon yang kemudian ditelan pasien hingga ke duodenum dan ditunggu empat hingga enam jam. Gelatin akan larut dalam saluran cerna kemudian benang ditarik dan diperiksa melalui mikroskop dengan menggunakan pewarnaan untuk mendapatkan trofozoit yang sudah melekat pada benang nilon. Sensitivitas pemeriksaan *string test* ini sekitar 44-73% namun spesifisitasnya tinggi, antara 97-100%.<sup>15</sup>

### ***Cryptosporidium* spp.**

Merupakan protozoa usus yang tersebar luas di dunia. Pada negara maju, angka kejadian rendah, hanya sekitar 1-3% dari

total populasi, sedangkan pada negara berkembang antara 10-1%.<sup>16</sup> Di Indonesia, prevalensi kriptosporidiasis sekitar 4-11% dari semua kasus diare.<sup>17</sup> Sementara pada penderita HIV di negara berkembang, kejadian kriptosporidiasis antara 12-48%.<sup>18</sup>

Penegakan diagnosis ditegakkan melalui pemeriksaan mikroskopis untuk mendeteksi ookista dalam feses dengan pewarnaan tahan asam. Pewarnaan dengan modifikasi Kinyoun dan antibodi monoklonal fluoresen (AF) merupakan cara terbaik.<sup>19,20</sup> Pewarnaan lainnya dengan modifikasi Ziehl-Neelsen (mZN).<sup>18</sup>

Sensitivitas dengan menggunakan pewarnaan tahan asam mencapai 70% dibandingkan dengan pewarnaan antibodi.<sup>21</sup> Sementara spesifisitas dengan menggunakan pewarnaan FA mencapai 100%.<sup>20</sup>

Metode deteksi antigen ookista pada feses sering digunakan sebagai tes saring. Saat ini tersedia pemeriksaan serologi yang menggunakan beberapa antibodi monoklonal untuk mendeteksi kriptosporidium dengan satu kali pemeriksaan.

Pemeriksaan serologi menggunakan peralatan *Enzyme immunoassay* (EIA) dilaporkan oleh Agnamey *et al.*<sup>16</sup> memiliki sensitivitas sebesar 70-100%. Sementara sensitivitas tes imunokromatografik bervariasi antara 47.2% hingga 70.6%.<sup>22</sup>

Permasalahan yang terjadi pada tes imunokromatografi adalah hasil positif palsu, terutama saat menggunakan bahan klinik feses yang mengandung darah. Tetapi jika menggunakan EIA, spesifisitasnya masih tetap tinggi, yaitu antara 98.1% to 100%.<sup>23</sup>

Sementara pemeriksaan PCR sudah mulai banyak dipergunakan. Metode ini meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas jika dibandingkan dengan metode lain hingga 100%.<sup>24</sup>

### ***Cyclospora cayetanensis***

Spesies protozoa penyebab siklosporiasis merupakan satu-satunya penyebab penyakit pada manusia. Banyak terdapat di daerah tropis dan negara berkembang seperti Indonesia. Angka kejadian paling tinggi terjadi pada anak-anak dan penderita HIV/AIDS. *Cyclospora cayetanensis* merupakan parasit yang penularannya melalui makanan terutama sayur-sayuran dan buah-buahan.<sup>17</sup> Angka kejadian di Indonesia bervariasi dan sering menyerang individu dengan imunokompromis dan wisatawan manca negara.<sup>17</sup>

Sama dengan *Cryptosporidium* sp., *C. cayetanensis* merupakan protozoa tahan asam, sehingga untuk mempermudah identifikasi dengan mikroskop, *C. cayetanensis* dilakukan pewarnaan lebih dahulu dengan modifikasi Kinyoun atau mZN. Penggunaan pewarnaan safranin yang

dipanaskan dapat meningkatkan sensitivitas karena ookista akan terwarnai secara seragam.<sup>25,26</sup>

Seperti metode mikroskopik lainnya untuk pemeriksaan kista atau trofozoit protozoa, pemeriksaan yang dianjurkan adalah tiga hari berturut-turut untuk memperbesar kemungkinan didapatkannya ookista pada feses.

Teknik molekular seperti PCR berfokus pada gen RNA 18s sebagai target gen, beberapa studi terakhir, beberapa peneliti lebih menargetkan gen *internal transcriber spaces* (ITS) 1. Tetapi hasil penelitian Qvarnstrom *et al.*,<sup>27</sup> dikatakan sensitivitas menggunakan gen ITS1 lebih rendah dibandingkan gen RNA 18s.

Perbandingan antara pemeriksaan mikroskop dan PCR salah satunya di laporkan oleh Mundaca *et al.*,<sup>28</sup> di Lima, Peru tahun 2005 saat terjadi wabah. Hanya 18,9% dari 37 pasien siklosporiasis yang terdeteksi *C. cayetanensis* pada fesesnya, sementara dengan menggunakan PCR, didapatkan 57.1% pasien teridentifikasi.

*Flow cytometry* merupakan metode pemeriksaan yang relatif baru. Pada penelitian Dixon *et al.*,<sup>29</sup> memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode mikroskop konvensional atau imunofluoresen. Salah satu alasan pemeriksaan ini lebih sensitif dikarenakan bahan klinik yang digunakan saat

pemeriksaan lebih banyak dibandingkan dengan metode mikroskopik.

## Kesimpulan

Diagnosis akibat protozoa usus beragam mulai dari pemeriksaan mikroskopis baik langsung atau melalui pewarnaan, serologi hingga pemeriksaan molekular. Saat ini pemeriksaan rutin adalah mengidentifikasi organisme penyebab pada feses dengan mikroskop. Namun tidak setiap saat trofozoit atau kista dikeluarkan melalui feses, maka diperlukan pemeriksaan berseri tiga hari berturut-turut. Hal ini sulit karena pasien membutuhkan diagnosis yang hemat waktu untuk terapi. Cara lain yang lebih cepat adalah dengan pemeriksaan serologi dan PCR, tetapi tidak semua laboratorium memiliki alat atau kemampuan laboran untuk melakukan pemeriksaan ini serta biaya yang lebih mahal dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskop konvensional. Diperlukan pengembangan metode yang sederhana untuk mendiagnosis tetapi memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi seperti penggunaan alat tes seperti *point of care testing* (POCT).

## Daftar pustaka

1. kementerian kesehatan RI. Laporan nasional RISKESDAS 2018. 2018. 90–5 p.
2. Anorital, Dewi RM, Ompusunggu S. Distribusi parasit usus protozoa di kabupaten hulu sungai utara kalimantan selatan. *Suplemen Media Penelit dan Kesehat.* 2010;XX:S8-18.
3. Anorital, Andayasari L. Kajian epidemi penyakit infeksi saluran pencernaan yang disebabkan oleh amuba di Indonesia. *Media Penelit dan Pengemb Kesehat.* 2011;21(1):1–8.
4. Yulfi H, Darlan DM, Wandra T, Purba IE, Purba Y, Saragih JM, et al. Intestinal Protozoa Infections and Associated Risk Factors in Rural Community of Samosir Island Indonesia. In: 1st Public Health International Conference. Medan; 2016. p. 102–7.
5. Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yuniastuti E, Djauzi S, et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(9):892–8.
6. Blans MCA, Ridwan BU, Verweij JJ, Study T. Cyclosporiasis outbreak, Indonesia. 2005;11(9):1453–5.
7. Kantor M, Abrantes A, Estevez A, Schiller A, Torrent J, Gascon J, et al. *Entamoeba Histolytica*: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;2018:1–5.
8. Beyls N, Cognet O, Stahl JP, Rogeaux O, Pelloux H. Serodiagnosis of extraintestinal amebiasis: Retrospective evaluation of the bordier® ELISA kit. *Korean J Parasitol.* 2018;56(1):71–4.
9. Sri-Hidajati BS, Basuki S, Pusarawati S, Kusmartisnawati, Rosyanti L, Sulistyowati SW, et al. Comparison of multiplex single round PCR and microscopy in diagnosis of amoebiasis. *African J Infect Dis.* 2018;12(Special Issue 1):120–6.
10. Uslu H, Aktas O, Uyanik MH. Comparison of various methods in the diagnosis of *Entamoeba histolytica* in stool and serum specimens. *Eurasian J Med.* 2016;48(2):124–9.
11. Heyworth MF. Diagnostic testing for *Giardia* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014;108(3):123–5.
12. Nagaty I, Hegazi M. Dot-ELISA copro-antigen and direct stool examination in diagnosis of giardiasis patients. *J Egypt Soc Parasitol.* 2007;37(2):641–8.
13. Prasertbun R, Sukthana Y, Popruk S. Real-time PCR: Benefits for detection of mild and asymptomatic giardia infections. *Trop Med Health.* 2012;40(2):31–5.
14. Gotfred-Rasmussen H, Lund M, Enemark HL, Erlandsen M, Petersen E. Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: Immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;84(3):187–90.
15. Hooshyar H, Rostamkhani P, Arbabi M, Delavari M. *Giardia lamblia* infection: Review of current diagnostic strategies. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench.* 2019;12(1):3–12.
16. Checkley W, White Jr AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Xian MC, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(1):85–94.
17. Wijayanti T, Litbang B, Penyakit P, Binatang B. Kriptosporidiosis di Indonesia Cryptosporidiosis in Indonesia. *J Litbang Pengendali Penyakit Bersumber Binatang Banjarnegara.* 2017;13(1):73–82.
18. White AJ. Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* species). Bennett JE, Dolin R, Blaser MK. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2015. p. 3173–83.
19. Garcia LS, Shum AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts

- and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 1992;30(12):3255–7.
20. Public Health Laboratory Network. Cryptosporidiosis laboratory case definition (LCD) [Internet]. Australia Government Department of Health. 2017 [cited 2019 Oct 13]. Available from: <https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-phlncd-cryptosporidiosis.htm>
  21. Chalmers RM, Campbell BM, Crouch N, Charlett A, Davies AP. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *J Med Microbiol.* 2011;60(11):1598–604.
  22. Agnamey P, Sarfati C, Pinel C, Rabodonirina M, Kapel N, Dutoit E, et al. Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of *Cryptosporidium* antigens in stool samples: A blind multicenter trial. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1605–7.
  23. Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric protozoa in the developed world: A public health perspective. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(3):420–49.
  24. Le Govic Y, Guyot K, Certad G, Deschildre A, Novo R, Mary C, et al. Assessment of microscopic and molecular tools for the diagnosis and follow-up of cryptosporidiosis in patients at risk. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(1):137–48.
  25. Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):218–34.
  26. Almeria S, Cinar HN, Dubey JP. *Cyclospora cayetanensis* and Cyclosporiasis: An Update. *Microorganisms.* 2019;7(9):317.
  27. Ahn H, Weaver M, Lyon D, Choi E, Fillingim RB. Molecular Detection of *Cyclospora cayetanensis* in Human Stool Specimens using UNEX-based DNA extraction and real-time PCR. *Physiol Behav.* 2017;176(10):139–48.
  28. Mundaca CC, Torres-Slimming PA, Araujo-Castillo R V., Morán M, Bacon DJ, Ortega Y, et al. Use of PCR to improve diagnostic yield in an outbreak of cyclosporiasis in Lima, Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(7):712–7.
  29. Dixon BR, Bussey JM, Parrington LJ, Parenteau M. Detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts in human fecal specimens by flow cytometry. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2375–9.