



**IDENTIFIKASI KEBERADAAN JAMUR *Candida* PADA FESES ANAK
Autism Spectrum Disorder (ASD) YANG MENJALANI DIET
KARBOHIDRAT**

SKRIPSI

Oleh
ULFATUL MUNAWAROH
NIM 142210101030

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**IDENTIFIKASI KEBERADAAN JAMUR *Candida* PADA FESES ANAK
Autism Spectrum Disorder (ASD) YANG MENJALANI DIET
KARBOHIDRAT**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

ULFATUL MUNAWAROH

NIM 142210101030

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang selalu memberi petunjuk, rahmat, hidayah, tuntunan, serta kemudahan;
2. Abi H. Ahmad Nur Hasan dan Umi Hj. Nur Sofia yang telah memberikan semangat, motivasi, dan dukungan yang tiada henti serta Kakak Edy dan Debby yang selalu menjadi penyemangat dan selalu mendoakan adiknya;
3. Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Anggota yang senantiasa sabar membimbing menulis;
4. Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt dan Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt selaku Dosen Penguji yang dengan penuh kesabaran memberikan masukan kepada penulis;
5. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

الْوَقْتُ كَالسَّيْفِ إِنْ لَمْ تَقْطَعْهَا قَطَعَكَ

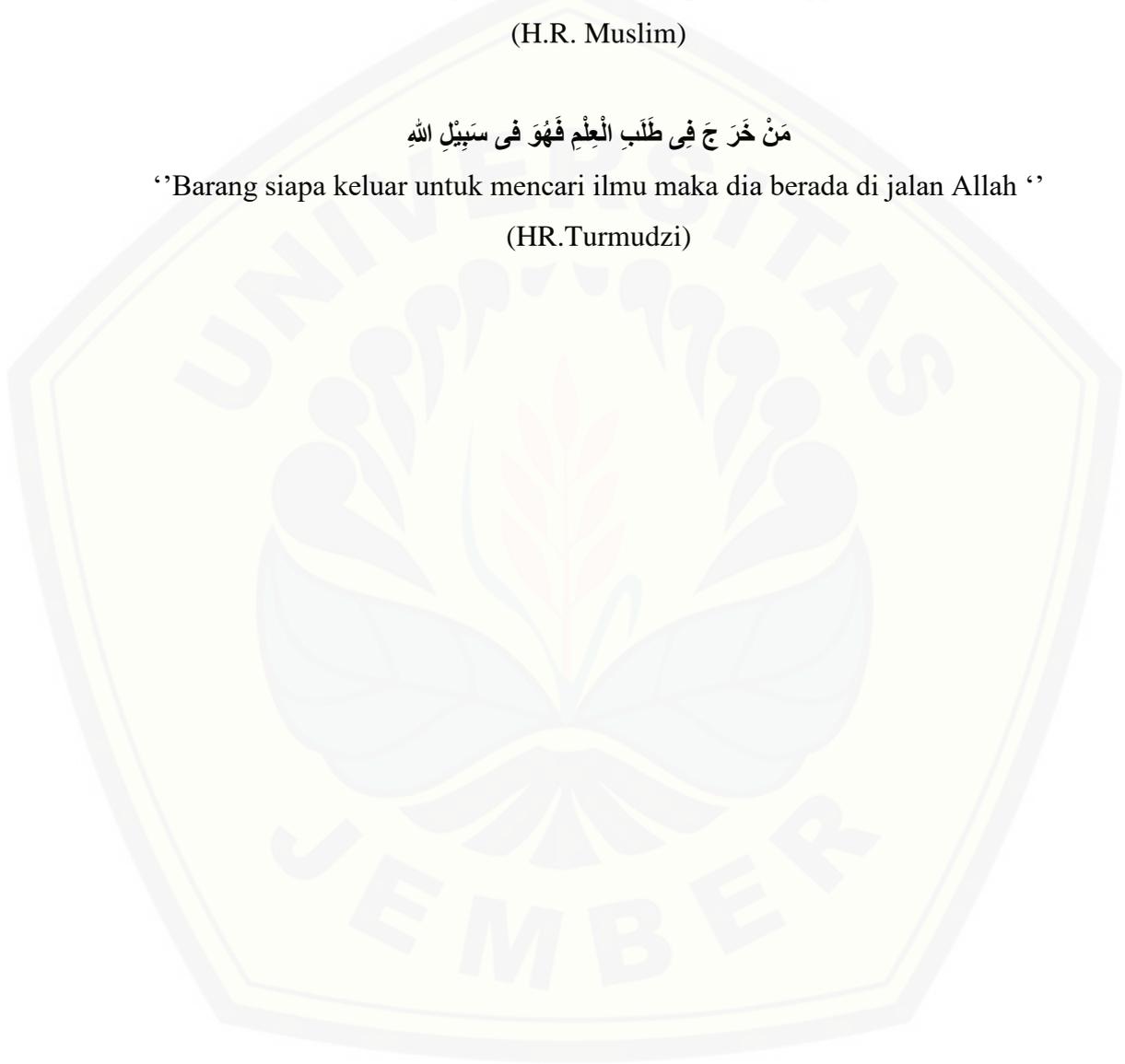
“Waktu itu bagaikan pedang, jika kamu tidak memanfaatkannya menggunakan untuk memotong, ia akan memotongmu (menggilasmu)”

(H.R. Muslim)

مَنْ خَرَجَ فِي طَلَبِ الْعِلْمِ فَهُوَ فِي سَبِيلِ اللَّهِ

“Barang siapa keluar untuk mencari ilmu maka dia berada di jalan Allah “

(HR.Turmudzi)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ulfatul Munawaroh

NIM : 142210101030

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Identifikasi Keberadaan Jamur *Candida* Pada Feses Anak *Autism Spectrum Disorder* (ASD) Yang Menjalani Diet Karbohidrat” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juli 2018
Yang menyatakan,

Ulfatul Munawaroh
142210101030

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI KEBERADAAN JAMUR *Candida* PADA FESES ANAK
Autism Spectrum Disorder (ASD) YANG MENJALANI DIET
KARBOHIDRAT**

Oleh
Ulfatul Munawaroh
142210101030

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt.
Dosen Pembimbing Anggota : Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Identifikasi Keberadaan Jamur *Candida* pada Feses Anak *Autism Spectrum Disorder* (ASD) yang Menjalani Diet Karbohidrat” karya Ulfatul Munawaroh telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 18 Juli 2018

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Tim penguji:

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP 198201292009121004

Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt
NIP 198107232006042002

Penguji I

Penguji II

Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP 198712082014042002

Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP 198407122008122002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Identifikasi Keberadaan Jamur *Candida* Pada Feses Anak *Autism Spectrum Disorder* (ASD) Yang Menjalani Diet Karbohidrat; Ulfatul Munawaroh, 142210101030; 2018; 79 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Autism spectrum disorder (ASD) adalah gangguan saraf otak yang heterogen yang secara klinis bermanifestasi sebagai gangguan persisten yang mengakibatkan masalah dalam komunikasi dan interaksi sosial dengan perilaku yang berulang, dari kisaran ringan hingga berat. Masalah tersebut mengakibatkan ketidaknormalan perkembangan komunikasi dan sosialisasi anak. Prevalensi ASD di Indonesia berkisar 400.000 anak, dan lebih banyak diderita oleh laki-laki daripada perempuan dengan perbandingan 4:1.

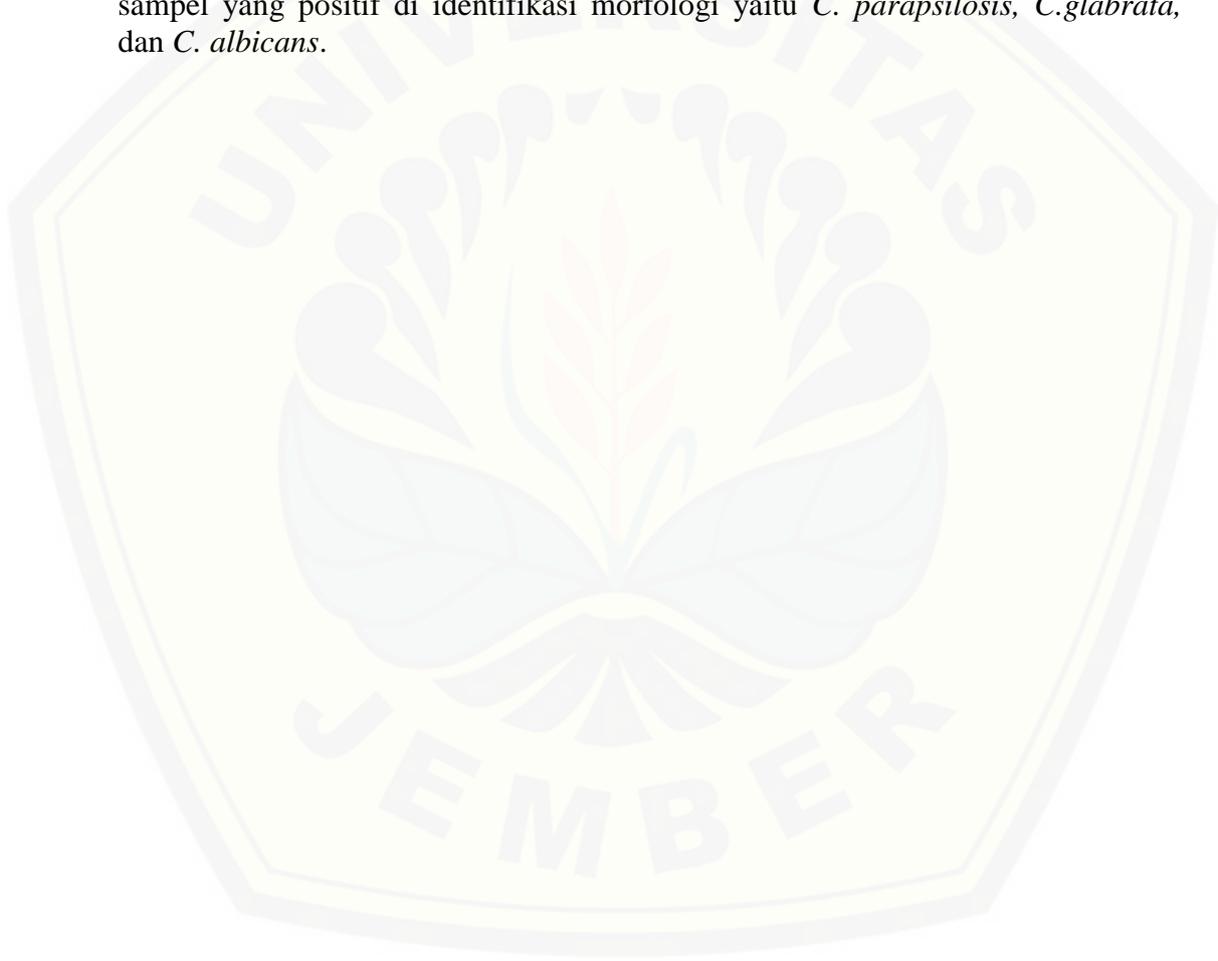
Salah satu gangguan pada anak ASD yaitu defek pada sistem imun. Defek pada sistem imun dapat menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme tertentu seperti jamur mengalami peningkatan di dalam saluran pencernaan. Defek inilah yang menyebabkan penderita ASD seringkali terjangkit penyakit infeksi dan mendapat antibiotik. Penggunaan antibiotik yang sering pada anak ASD dapat menyebabkan perlambatan regenerasi bahkan terbunuhnya *Lactobacillus* di usus sehingga flora normal *Candida* tidak mendapat nutrisi dari *Lactobacillus*. Spesies *Candida* yang diketahui ada 150, tetapi hanya 15 spesies yang merupakan penyebab infeksi jamur pada manusia. Sembilan puluh lima persen infeksi jamur *Candida* disebabkan oleh 5 spesies *Candida* yaitu *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*. Enam puluh hingga tujuh puluh persen penyandang ASD dilaporkan mengalami gangguan kekebalan (imun) dan diduga *C. albicans* dapat memperberat gejala klinis kelainan tersebut.

Salah satu faktor yang diduga dapat memperparah infeksi *Candida* pada anak ASD selain penggunaan antibiotik yaitu asupan karbohidrat. Sisa karbohidrat yang tidak tercerna diyakini dapat mendorong terbentuknya senyawa asam dan racun yang dapat merusak usus dan mengganggu sistem pencernaan. Masalah tersebut dapat diminimalkan dengan pemberian terapi diet karbohidrat. Terapi diet karbohidrat ini merupakan diet yang membatasi jenis karbohidrat yang memberi makanan pada *Candida* dalam keadaan patogen, sehingga dapat memulihkan ekologi bagian dalam tubuh. Namun belum diketahui hubungan antara tingkat infeksi *Candida* dengan terapi diet karbohidrat pada anak ASD.

Tahapan penelitian yang pertama yaitu dilakukan pengumpulan sampel feses anak penderita ASD yang menjalani diet maupun anak normal. Lalu sampel yang diambil kemudian dipreparasi yang dilanjutkan dengan tahapan pembenihan spesimen feses pada media SDA dengan antibiotik yang diinkubasi selama 7-10 hari pada suhu kamar. Sampel yang positif tumbuh jamur sesuai koloni *Candida* dilanjutkan dengan tahapan pembiakan ulang dan kemudian diremajakan. Metode identifikasi spesies *Candida* yang digunakan ada 3 yaitu *germ tube* dengan melihat bentuk hifa dimana sampel ditumbuhkan pada media putih telur dengan suhu 37 °C selama 2-3 jam, *slide culture* untuk melihat klamidospora dimana sampel ditumbuhkan pada media RCT selama 48-72 jam, dan BCG agar untuk

identifikasi spesies yang lebih spesifik yang memerlukan waktu inkubasi selama 24 jam pada suhu kamar.

Hasil penelitian menunjukkan, pada identifikasi morfologi spesies *Candida* didapatkan 4 sampel positif jamur *Candida* pada sampel ASD diet karbohidrat dan 4 sampel pula positif pada sampel anak normal. Pada identifikasi *germ tube* hasil menunjukkan negatif untuk semua sampel anak ASD diet karbohidrat maupun sampel anak normal. Kemudian pada identifikasi dengan *slide culture* diketahui 1 sampel positif terdapat klamidospora pada sampel ASD diet karbohidrat, sedangkan pada sampel anak normal juga hanya 1 sampel yang positif. Analisis spesies dengan BCG agar didapatkan spesies *C. parapsilosis* dan *C. albicans* untuk sampel anak ASD diet karbohidrat yang positif saat identifikasi morfologi dan pada sampel anak normal didapatkan 3 spesies *Candida* dari sampel yang positif diidentifikasi morfologi yaitu *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, dan *C. albicans*.



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Identifikasi Keberadaan Jamur *Candida* pada Feses Anak Autism Spectrum Disorder (ASD) yang Menjalani Diet Karbohidrat”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan dan penyelesaian skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan karunia-Nya sehingga saya dapat menyusun dan menyelesaikan tulisan ini;
2. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt, selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Dosen Pembimbing Anggota skripsi saya yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa dan meluangkan perhatian dalam penulisan skripsi;
3. Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama yang senantiasa meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt dan Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt selaku Dosen Penguji yang memberikan masukan kritik, saran kepada penulis dalam penulisan skripsi ini;
5. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi banyak ilmu pengetahuan, berbagai pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan; staff dan karyawan atas segala bantuan yang telah diberikan penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Ibu Endang selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi MIPA yang telah membantu dan membimbing penulis selama penelitian;
7. Orang tua tercinta abi H. Ahmad Nur Hasan dan Umi Hj. Nur Sofia yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat dan motivasi untuk mengiringi perjalanan hidup penulis; kakak Edy Rudianto dan Debby Riana

Yuanita; keponakan Nirbita Saarah Mumtaz dan seluruh keluarga besar penulis yang selalu menjadi penyemangat penulis;

8. Muhammad Fadli Febrian Wahjudi yang senantiasa menemani dan memberi dukungan, semangat, serta motivasi untuk penulis;
9. Sahabat “CPD” Luna, Desy, Nina, Devi, Catur, Cahyanti, Tika, dan Inasa yang senantiasa selalu menemani dan memberikan semangat selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
10. Keluarga “MJEI” Fadli, Husni, Auda, Ryan, Faris, Farid, Agus, Alfia, Nina, Devi, Desy, dan Cahyanti untuk semua dukungan, semangat, motivasi dan kebersamaan disaat bahagia ataupun susah;
11. Rekan kerja sekaligus sahabatku Luna Ivanka, terimakasih atas kerjasamanya saat penelitian dan kebersamaannya selama masa perkuliahan;
12. Keluarga Besar Pharmagen FF UNEJ 2014 yang berjuang bersama untuk mewujudkan cita-cita;
13. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.

Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan <i>Autism Spectrum Disorder</i> (ASD)	5
2.1.1 Tinjauan Umum <i>Autism Spectrum Disorder</i> (ASD)	5
2.1.2 Kondisi Imun	6
2.1.3 Kondisi Pencernaan.....	8
2.2 Tinjauan <i>Candida</i>	9
2.2.1 Klasifikasi <i>Candida</i>	9
2.2.2 Morfologi <i>Candida</i>	10
2.2.3 Patogenisitas dan virulensi <i>Candida</i>	12
2.3 Diet Karbohidrat Spesifik	15
2.4 Metode Penetapan Morfologi Koloni <i>Candida</i>	17
2.5 Metode <i>Germ Tube</i>	17
2.6 Metode <i>Slide Culture</i>	19
2.7 Metode <i>Bromocresol green agar</i> (BCG)	21
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	25
3.1 Jenis penelitian.....	25
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	25

3.3	Sampel Penelitian	25
3.4	Variabel Penelitian	26
3.4.1	Variabel Bebas	26
3.4.2	Variabel Terikat	26
3.4.3	Variabel terkontrol	26
3.5	Definisi Operasional	26
3.6	Rancangan Penelitian	27
3.7	Bahan dan Alat	27
3.7.1	Bahan	27
3.7.2	Alat.....	29
3.8	Prosedur Kerja	29
3.8.1	Pengumpulan Sampel.....	29
3.8.2	Preparasi Sampel.....	29
3.8.3	Pembenihan spesimen feses	29
3.8.4	Identifikasi Morfologi Jamur	30
3.8.5	Pembiakan ulang Koloni <i>Candida</i>	30
3.8.6	Peremajaan isolat <i>Candida</i>	30
3.8.7	Identifikasi spesies <i>Candida</i>	31
3.9	Analisis data	35
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		38
4.1	Identifikasi Morfologi, Germ Tube , Klamidospora dan BCG	38
4.1.1	Identifikasi Morfologi <i>Candida</i>	38
4.1.2	Pembentukan <i>Germ Tube</i>	39
4.1.3	Pembentukan Klamidospora dengan <i>Slide Culture</i>	40
4.1.4	Identifikasi spesies <i>Candida</i> dengan Metode BCG agar.....	42
4.2	Spesies <i>Candida</i>	44
BAB 5. PENUTUP		46
5.1	Kesimpulan	46
5.2	Saran	46
DAFTAR PUSTAKA		47
LAMPIRAN		50

DAFTAR GAMBAR

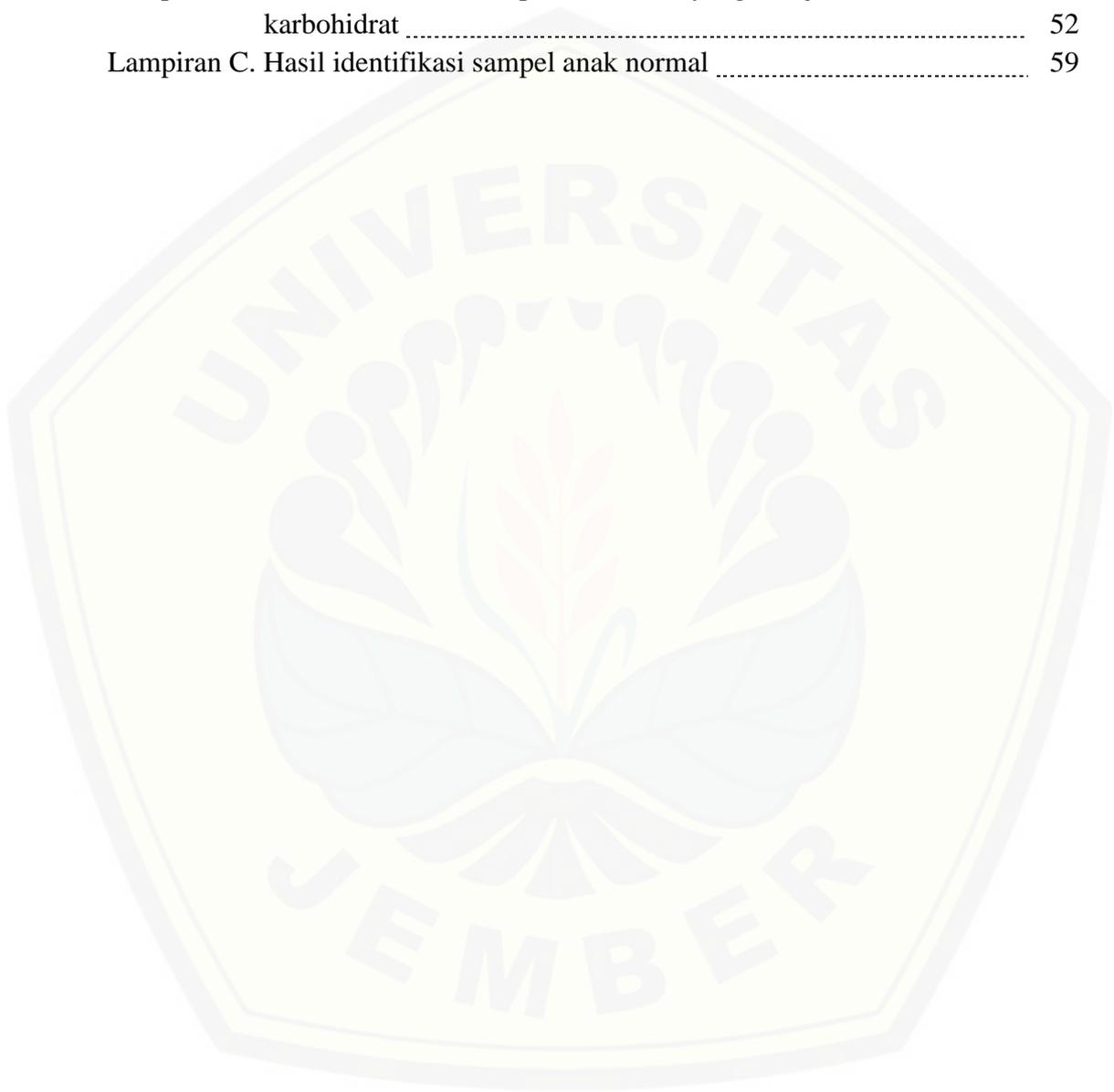
	Halaman
Gambar 2.1 <i>Candida albicans</i>	10
Gambar 2.2 Pembentukan koloni <i>Candida</i> pada media SDA	11
Gambar 2.3 Perbedaan pertumbuhan morfologi <i>C. albicans</i> sel ragi, pseudohifa, hifa, dan klamidospora	13
Gambar 2.4 <i>Germ tube test</i>	18
Gambar 2.5 <i>Germ tube test</i> positif <i>C. albicans</i>	18
Gambar 2.6 <i>Germ tube C. dubliniensis</i>	19
Gambar 2.7 Pertumbuhan <i>Germ tube C. tropicalis</i> setelah 2 jam inkubasi, setelah 3 jam inkubasi, dua <i>germ tube</i> yang berasal dari satu blastospora setelah inkubasi 4 jam	19
Gambar 2.8 Analisis mikroskopis <i>C. albicans</i> tunggal dan <i>C. dubliniensis</i> setelah 4 hari pertumbuhan pada 25 °C pada <i>rice Tween-80</i> <i>agar</i>	21
Gambar 2.9 BCG agar <i>C. albicans</i> dan <i>C. tropicalis</i>	22
Gambar 2.10 Macam bentuk, elevasi dan tepi pada mikroorganisme	24
Gambar 3.1 Skema penelitian	28
Gambar 4.1 Hasil identifikasi morfologi koloni jamur <i>Candida</i> pada sampel anak ASD yang menjalani diet karbohidrat yang dibiakkan pada media SDA dan diinkubasi selama 7-10 hari pada suhu kamar	38
Gambar 4.2 Hasil identifikasi <i>germ tube</i> pada sampel ASD diet karbohidrat pada media putih telur yang diinkubasi selama 2-3 jam pada suhu 37 °C dengan perbesaran 10x10	40
Gambar 4.3 Hasil identifikasi klamidospora jamur <i>Candida</i> pada media RCT dengan metode <i>slide culture</i> yang diinkubasi selama 48- 72 jam pada suhu kamar dengan perbesaran 10x10	42
Gambar 4.4 Hasil identifikasi spesies (A) <i>C. parapsilosis</i> , (B) <i>C.</i> <i>parapsilosis</i> , (C) <i>C. parapsilosis</i> , (D) <i>C. albicans</i> , (E) <i>C.</i> <i>parapsilosis</i> , (F) <i>C. glabrata</i> , (G) <i>C. albicans</i> , dan (H) <i>C.</i> <i>albicans</i> dengan media BCG agar yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar.....	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Frekuensi infeksi spesies <i>Candida</i> terhadap kesehatan	12
Tabel 3.1 Analisis data dan identifikasi spesies <i>Candida</i>	36
Tabel 4.1 Hasil identifikasi morfologi <i>Candida</i> sampel ASD diet karbohidrat dan kontrol	39
Tabel 4.2 Hasil identifikasi klamidospora jamur <i>Candida</i> dengan metode <i>slide culture</i>	42
Tabel 4.3 Hasil identifikasi spesies <i>Candida</i> dengan metode BCG agar	45
Tabel 4.4 Hasil identifikasi spesies <i>Candida</i> pada 13 sampel kelompok subyek normal dan ASD diet karbohidrat	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. <i>Informed consent</i>	51
Lampiran B. Hasil identifikasi sampel anak ASD yang menjalani diet karbohidrat	52
Lampiran C. Hasil identifikasi sampel anak normal	59



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Autism spectrum disorder (ASD) adalah gangguan saraf otak yang heterogen yang secara klinis bermanifestasi sebagai gangguan persisten yang mengakibatkan masalah dalam komunikasi dan interaksi sosial dengan perilaku yang berulang, dari kisaran ringan hingga berat. Masalah tersebut mengakibatkan ketidaknormalan perkembangan komunikasi dan sosialisasi anak. Kelainan ini dapat terlihat pada anak sebelum usia 3 tahun (*American Psychiatric Association, 2013*).

Sebelum tahun 1990-an dari 10.000 anak-anak usia di bawah 12 tahun, prevalensi ASD pada anak berkisar 2-5 penderita, dan jumlahnya meningkat menjadi empat kali lipat pada tahun-tahun setelahnya. Sementara itu di Indonesia, prevalensi ASD berkisar 400.000 anak, dan lebih banyak diderita oleh laki-laki daripada perempuan dengan perbandingan 4:1 (YPAC, 2012).

Salah satu gangguan pada anak ASD yaitu defek pada sistem imun. Defek pada sistem imun dapat menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme tertentu seperti jamur mengalami peningkatan di dalam saluran pencernaan. Defek inilah yang menyebabkan penderita ASD seringkali terjangkit penyakit infeksi dan mendapat antibiotik (Jasaputra, 2006). Penggunaan antibiotik yang sering pada anak ASD dapat menyebabkan perlambatan regenerasi bahkan terbunuhnya *Lactobacillus* di usus sehingga flora normal *Candida* tidak mendapat nutrisi dari *Lactobacillus*. *Candida* yang awalnya berada di usus akan mencari nutrisi ke lambung dan terjadilah *yeast overgrowth* di saluran pencernaan. Gangguan pencernaan tersebut dapat menyebabkan kekurangan nutrisi pada individu tersebut. Kekurangan nutrisi juga berdampak pada konsentrasi dan transmisi ke otak berkurang, serta ada perubahan perilaku (Adams & Conn, 1997).

Candida merupakan flora normal tubuh. Selain terdapat di saluran pencernaan, *Candida* juga dapat ditemukan di mukosa mulut, vagina dan kadang-kadang pada kulit (Samaranayake, 2012). Spesies *Candida* yang diketahui ada 150, tetapi hanya 15 spesies yang merupakan penyebab infeksi jamur pada

manusia. Spesies *Candida* yang bersifat patogen antara lain *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, dan *C. norvegensis*. Sembilan puluh lima persen infeksi jamur *Candida* disebabkan oleh 5 spesies candida yaitu *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*. Secara historis, *C. albicans* sendiri telah bertanggung jawab atas 50% dari semua kandidiasis invasif dan candidemia (Prasad, 2017).

Herawati dkk. (2006) melaporkan bahwa 60–70% penyandang ASD mengalami gangguan kekebalan (imun) dan diduga *C. albicans* dapat memperberat gejala klinis kelainan tersebut. Dalam penelitian ini juga ditemukan hubungan antara pembentukan koloni *C. albicans* dengan ASD. *C. albicans* dapat memproduksi enzim *aspartyl proteinase*, *phospholipase*, dan *lypophospholipase* yang berperan dalam proses adhesi ke epitel mukosa, sehingga dapat meningkatkan permeabilitas mukosa usus. Pada keadaan ini peptida abnormal (*caseomorphin* dan *gluteomorphin*) akan masuk ke dalam sel epitel mukosa usus melalui *tight junctions*, yang kemudian terserap dalam aliran darah dan masuk ke susunan saraf pusat. Di dalam susunan saraf pusat molekul ini akan bertindak sebagai pembawa saraf (neurotransmitter) palsu dan mengganggu perkembangan otak. Keadaan ini menjadi penyebab adanya gangguan daya tangkap (persepsi), daya paham (kognisi), perasaan (emosi), dan perilaku anak penyandang ASD. Oleh sebab itu meskipun anak ASD diberi terapi perilaku, tetapi hasil terapi perilaku tidak akan optimal bila masih terdapat gangguan metabolisme. *C. albicans* ini berperan dalam menimbulkan gangguan metabolisme tersebut.

Salah satu faktor yang diduga dapat memperparah infeksi *Candida* pada anak ASD selain penggunaan antibiotik yaitu asupan karbohidrat. Banyaknya konsumsi makanan yang mengandung karbohidrat dapat membuat *Candida* tumbuh subur dan dapat memperparah kondisi penderita ASD. Sisa karbohidrat yang tidak tercerna diyakini dapat mendorong terbentuknya senyawa asam dan racun yang dapat merusak usus dan mengganggu sistem pencernaan. Masalah tersebut dapat diminimalkan dengan pemberian terapi diet karbohidrat. Terapi diet karbohidrat ini merupakan diet yang membatasi jenis karbohidrat yang memberi

makanan pada *Candida* dalam keadaan patogen, sehingga dapat memulihkan ekologi bagian dalam tubuh (Gottschall, 2004). Namun belum diketahui hubungan antara tingkat infeksi *Candida* dengan terapi diet karbohidrat pada anak ASD.

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai keberadaan *Candida* pada anak ASD yang menjalani diet karbohidrat. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi spesies *Candida* apa saja yang ada pada anak ASD, dan pembentukan *germ tube* serta klamidospora pada sampel feses anak normal dibandingkan dengan sampel feses anak ASD yang menjalani diet karbohidrat dengan beberapa metode pengujian seperti pemeriksaan morfologi, *germ tube*, *slide culture*, dan *Bromcresol green agar* (BCG). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel feses karena sampel feses lebih mudah cara samplingnya jika dibandingkan penggunaan dengan sampel darah. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan terapi yang lebih tepat yang dapat diberikan kepada anak penderita ASD yang menjalani diet karbohidrat.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

- a. Bagaimanakah hasil morfologi, *germ tube*, dan klamidospora *Candida* pada sampel feses anak penderita ASD yang menjalani diet karbohidrat dan pada sampel feses anak normal?
- b. Spesies *Candida* apa saja yang ditemukan pada sampel feses anak penderita ASD yang menjalani diet karbohidrat dan pada sampel feses anak normal?

1.3 Tujuan

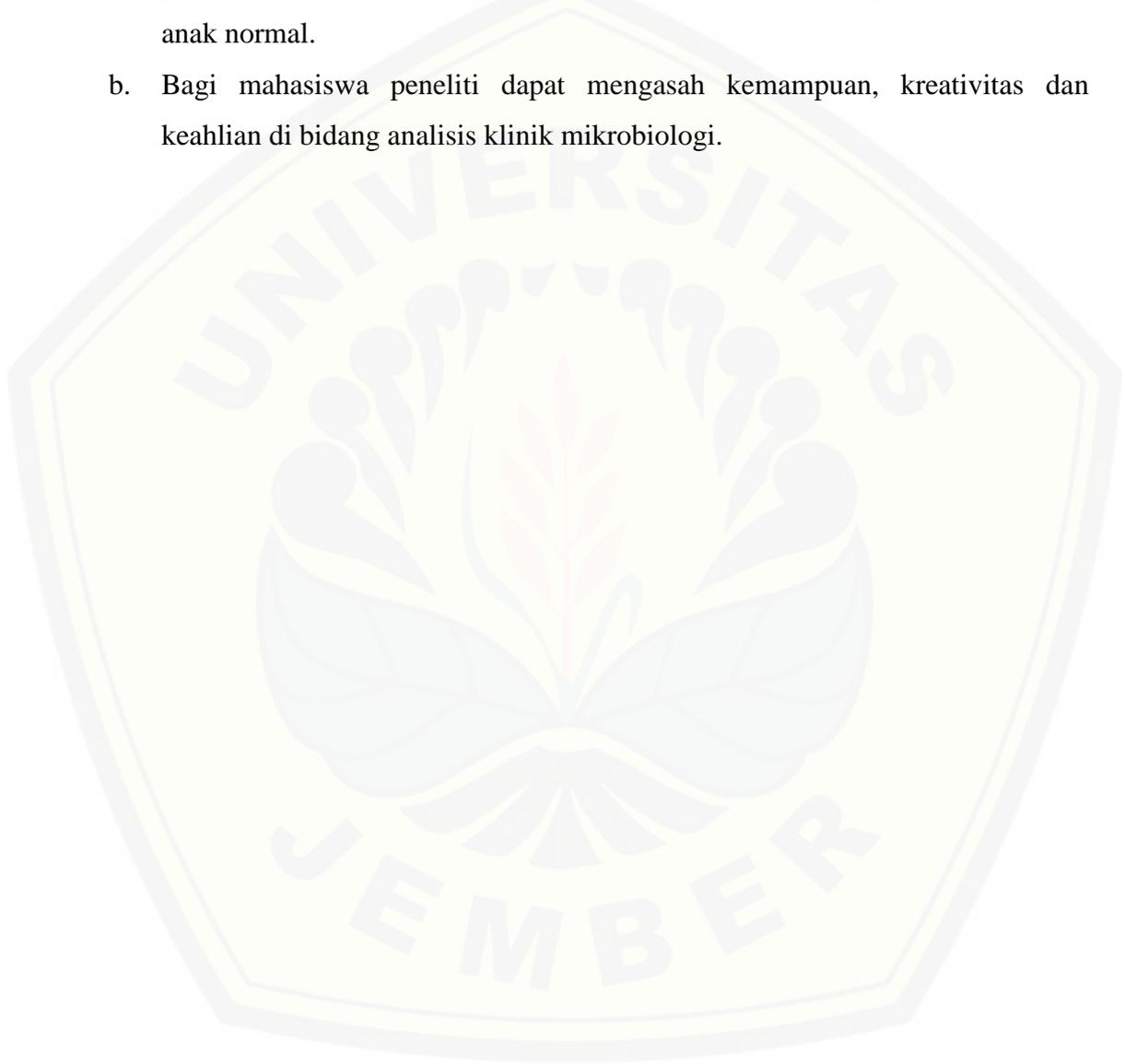
Tujuan dari penelitian ini yaitu:

- a. Untuk mengetahui hasil morfologi, *germ tube*, dan klamidospora *Candida* pada sampel feses anak penderita ASD yang menjalani diet karbohidrat dan pada sampel feses anak normal.
- b. Untuk menentukan spesies *Candida* apa saja yang ditemukan pada sampel feses anak penderita ASD yang menjalani diet karbohidrat dan pada sampel feses anak normal.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini antara lain:

- a. Memberikan informasi tentang hubungan diet karbohidrat dengan ASD terkait dengan spesies *Candida* yang ditemukan pada sampel feses anak penderita ASD yang menjalani diet karbohidrat yang dan pada sampel feses anak normal.
- b. Bagi mahasiswa peneliti dapat mengasah kemampuan, kreativitas dan keahlian di bidang analisis klinik mikrobiologi.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan *Autism Spectrum Disorder* (ASD)

2.1.1 Tinjauan Umum *Autism Spectrum Disorder* (ASD)

Autisme, atau *Autism Spectrum Disorder* (ASD) adalah gangguan syaraf otak yang heterogen yang secara klinis bermanifestasi sebagai gangguan persisten yang mengakibatkan masalah dalam komunikasi dan interaksi sosial dengan perilaku yang berulang, dari kisaran ringan hingga berat (*American Psychiatric Association*, 2013).

Autisme adalah sekelompok kelainan perkembangan otak, yang secara kolektif disebut *Autism Spectrum Disorder* (ASD). Istilah "spektrum" mengacu pada berbagai gejala, keterampilan, dan tingkat kerusakan, atau kecacatan, yang dapat dimiliki anak-anak dengan ASD. Autisme secara klinis ditandai dengan adanya tiga gejala utama berupa kurangnya kualitas: (1) dalam kemampuan interaksi sosial dan emosional, (2) kemampuan komunikasi timbal balik dan minat yang terbatas, serta (3) perilaku yang disertai gerakan berulang tanpa tujuan (sterotip), dan adanya respon yang tidak wajar terhadap pengalaman sensorisnya. Ketiga gejala utama ini yang membedakan antara anak ASD dengan anak-anak yang lainnya, sekaligus yang mengakibatkan mereka mengalami hambatan dalam perilaku adaptifnya (*National Institute of Mental Health*, 2011).

Kasus autisme mengalami peningkatan setiap tahunnya di seluruh dunia. Pada awal tahun 1990-an kasus autisme masih berkisar pada perbandingan 1:2.000 kelahiran. Data terakhir dari CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) Amerika Serikat pada tahun 2002 juga menunjukkan prevalensi autisme yang semakin membesar, sedikitnya 60 penderita dalam 10.000 kelahiran. Berdasarkan data *International Congress on Autism* tahun 2006 tercatat 1 dari 150 anak punya kecenderungan autisme. Pencegahan dan Pengendalian Penyakit (*Centers for Disease Control and Prevention*) Amerika Serikat menyebut, prevalensi penyandang autisme di beberapa negara bagian adalah 1 dari 88 anak usia 8 tahun. Prevalensi ASD pada anak berkisar 2-5 penderita dari 10.000 anak-anak usia dibawah 12 tahun dan di Indonesia berkisar 400.000 anak, laki-laki

lebih banyak daripada perempuan dengan perbandingan 4:1. Meningkatnya jumlah kasus autisme ini kemungkinan karena semakin berkembangnya metode diagnosis, sehingga semakin banyak ditemukan anak penderita *Autism Spectrum Disorder* (ASD) (YPAC, 2012).

Pemeriksaan anak yang baik harus mencakup tes skrining perkembangan, dengan skrining ASD yang spesifik pada usia 18 dan 24 bulan seperti yang direkomendasikan oleh *American Academy of Pediatrics*. Skrining untuk ASD tidak sama dengan diagnosis ASD (*National Institute of Mental Health*, 2011). Autisme biasanya terdeteksi sebelum usia 3 tahun. Namun, ada juga gejala sejak usia bayi dengan keterlambatan interaksi sosial dan bahasa (progresi) atau pernah mencapai normal tapi sebelum usia 3 tahun perkembangannya berhenti dan mundur, serta muncul ciri-ciri autisme (YPAC, 2012).

Kondisi anak ASD dapat dikontrol dalam berbagai aspek dengan batasan-batasan. Batasan yang diberikan tidak hanya dalam hal bermain, beraktivitas, namun juga dalam hal makanan. Aspek pengaturan pola makanan sedemikian penting bagi anak ASD karena suplai makanan merupakan bahan dasar pembentuk neurotransmitter. Efeknya, zat-zat makanan yang seharusnya membentuk neurotransmitter yang membantu kerja saraf, diubah menjadi zat yang dapat meracuni saraf atau neurotoksin. Jika saraf mengalami kerusakan maka akan membuat gangguan tingkah laku yang tidak normal yang disebabkan *disfungsi neurologis* dengan gejala utama tidak mampu memusatkan perhatian atau hiperaktif. Berdasarkan tes yang dilakukan dengan instrumen *Diagnostic and Statistic Manual IV Task Force* (DSM IV TR), menurut gejala-gejala yang timbul anak ASD dibagi menjadi tiga. Gejala-gejala tersebut, antara lain kurang pemusatan perhatian (*innattention*), selalu gelisah dan tidak mau diam atau selalu bergerak secara terus menerus (*hiperactivity/combination*), serta suka menurutkan kata hati (*impulsivity*) (Hapsari dkk., 2014).

2.1.2 Kondisi Imun

Sistem imun berfungsi dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi dan merupakan suatu sistem yang kompleks karena sistem imun harus dapat

memberikan respon terhadap invasi berbagai agen infeksi termasuk bakteri, virus, jamur, dan lain-lain. Secara umum, sistem imunitas terdiri dari dua bagian, yaitu sistem imunitas bawaan dan sistem imunitas yang didapat. Sistem imunitas bawaan merupakan sistem imunitas non spesifik yang terdiri dari berbagai sistem sawar (barier) tubuh yang mempertahankan tubuh melalui sistem mekanik, fisik, kimia, sistem seluler, dan enzimatis. Sedangkan, sistem imunitas spesifik adalah sistem pertahanan tubuh yang melibatkan sel imunokompeten seperti limfosit T dan limfosit B. Pada keadaan sesungguhnya kedua sistem ini bukan merupakan sistem terpisah, namun merupakan sistem yang terintegrasi secara sempurna (Jasaputra, 2006).

Defek pada sistem imun dapat menyebabkan peningkatan pertumbuhan mikroorganisme tertentu seperti jamur di dalam saluran pencernaan. Defek sistem imun ini juga menyebabkan meningkatnya insidensi penyakit infeksi pada individu tersebut. Menurut penelitian, defek yang terjadi pada anak autistik meliputi semua bagian dalam sistem imun. Hal inilah yang menjelaskan seringnya berbagai penyakit infeksi menyerang anak ASD. Penyakit infeksi yang sering timbul ini menyebabkan penggunaan antibiotik yang sering pula. Antibiotik yang digunakan membunuh sejumlah besar mikroorganisme normal di dalam saluran pencernaan, sehingga mikroorganisme patogen seperti jamur dan bakteri patogen (seperti *Clostridia*) berproliferasi di dalam saluran pencernaan (Jasaputra, 2006).

Selain itu, salah satu keadaan yang mengakibatkan sering terjangkitnya infeksi disebut sebagai imunodefisiensi, yang berarti adanya kelemahan atau defisiensi sistem imun. Imunodefisiensi dapat disebabkan oleh defisiensi antibodi seperti IgG, IgA, dan IgM. Frekuensi kelainan berbagai macam antibodi cukup tinggi pada anak ASD. Limfosit T, yang berperan dalam imunitas seluler, berfungsi membunuh benda asing atau jaringan yang terinfeksi oleh virus dengan memproduksi interleukin (IL) guna peningkatan respon imun. Konsentrasi IL-12 dan interferon gamma dalam darah anak autistik jauh lebih tinggi dibandingkan anak normal. Hal ini mengindikasikan adanya aktivasi sistem imun, dan kemungkinan merupakan reaksi simpang akibat pemberian vaksin. Selain itu, salah satu tipe limfosit yang juga berperan dalam imunitas seluler adalah *Natural*

Killer cells (NK). Sekitar 38% - 45 % anak autis mempunyai jumlah sel NK yang rendah dan sel-sel T yang tidak normal. Penurunan sel-sel CD 4, suatu subtype sel T, pada anak autis mungkin merupakan penyebab lain terjadinya kolonisasi *C. albicans*. Selain itu, ketidaknormalan sistem imun pada anak ASD mungkin diakibatkan pula oleh adanya defisiensi *dipeptidyl peptidase IV* (Jasaputra, 2006).

2.1.3 Kondisi Pencernaan

Sistem gastrointestinal adalah salah satu organ dimana tubuh berinteraksi dengan lingkungannya. Saluran pencernaan merupakan permukaan yang paling luas pada tubuh manusia dan bagian yang paling besar dalam sistem imunitas tubuh. Fungsi utama saluran pencernaan adalah menyediakan suplai yang terus menerus bagi tubuh akan air, elektrolit dan zat gizi. Proses pencernaan melibatkan enzim-enzim sekretorik yang spesifik untuk berbagai makanan, yaitu untuk menguraikan karbohidrat menjadi gula sederhana/monosakarida terutama glukosa, galaktosa dan fruktosa, lemak menjadi asam lemak bebas dan monogliserida, serta protein menjadi asam amino. Hanya dalam bentuk-bentuk sederhana inilah zat-zat gizi dapat diserap oleh sel-sel di usus dan digunakan oleh tubuh (Ratnawati, 2012).

Saluran pencernaan dalam keadaan normal memiliki barier yang berfungsi untuk mempertahankan diri terhadap berbagai antigen seperti bakteri, virus, parasit, dan protein makanan/alergen makanan. Barier ini berupa: (1) barier imunologik, seperti Ig A spesifik, Ig G spesifik, dan sistem retikulo endotelial. (2) barier fisiologik yang memecah antigen dalam lumen saluran pencernaan, yaitu asam lambung, pepsin, enzim pankreas, enzim-enzim usus, dan aktivitas lisozim sel-sel epitelial usus, cairan mukus usus, komposisi membran usus dengan mikrovilinya, dan adanya gerakan peristaltik usus yang dapat mengurangi kontak mukosa dengan substansi antigenik dalam lumen usus (Jasaputra, 2006).

Pada proses absorpsi makanan di intestin, diharapkan agar mikroorganisme asing (bakteri, virus dan *yeast*) tidak ikut masuk ke dalam peredaran darah ketika usus menyerap air dan nutrien. Tubuh juga membutuhkan pertumbuhan bakteri komensal dalam usus untuk memproduksi vitamin K dan untuk mengontrol

pertumbuhan berlebihan dari mikroorganisme patogen. Sehingga intestin dalam tubuh memiliki dua fungsi penting dalam sistem pencernaan, yaitu mengabsorpsi makanan dan sebagai barrier pertahanan terhadap antigen, bakteri, toxin dan molekul-molekul besar yang belum sempurna dicerna (Ratnawati, 2012).

Meningkatnya permeabilitas mukosa intestin akan menyebabkan sejumlah toxin dan antigen masuk ke peredaran darah dan hal ini dapat memicu sensitisasi sistem imun dalam tubuh (meningkatnya kepekaan sistem imun) pada individu-individu tertentu. Sebaliknya, bila terjadi penurunan permeabilitas akan timbul malnutrisi, malabsorpsi dan berbagai penyakit yang diakibatkannya. Banyak kelainan klinis diakibatkan meningkatnya atau menurunnya permeabilitas dinding usus (Ratnawati, 2012).

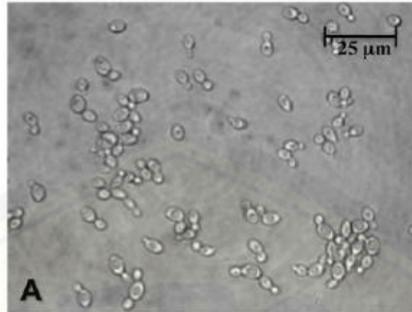
Sistem imun yang merupakan bagian dari barrier usus pada anak autistik mengalami berbagai gangguan, sehingga individu tersebut menjadi rentan terhadap invasi bakteri, virus, dan jamur, seperti *Candida albicans*. Saluran pencernaan anak-anak autistik umumnya mengalami peradangan kronik, dan hal ini menyebabkan masuknya benda-benda asing termasuk alergen makanan dalam bentuk makromolekul ke dalam berbagai bagian tubuh yang lain. Alergen makanan dalam bentuk makromolekul ini dikenali oleh sistem imun sebagai benda asing yang harus dimusnahkan, sehingga terjadilah aktivasi sistem imun yang umumnya dikenal sebagai reaksi hipersensitifitas tipe I. Gangguan perilaku akibat reaksi alergi dapat berupa hiperaktif (akibat pewarna kimia dan bahan alam yang menghasilkan salisilat serta mungkin gula, dengan gejala *irritable, lethargic*). Hiperaktif, impulsif, perilaku yang merusak mungkin akibat bahan pelengkap makanan (Jasaputra, 2006).

2.2 Tinjauan *Candida*

2.2.1 Klasifikasi *Candida*

Sepanjang kuartal terakhir abad ke-20, spesies *Candida* diasumsikan sebagai jamur patogen manusia yang paling umum. Genus *Candida* terdiri dari sekitar 150 spesies yang berbeda yang tumbuh terutama sebagai ragi uniseluler, dengan beberapa spesies memiliki kemampuan untuk tumbuh dalam bentuk lain,

seperti pseudohifa dan hifa (misalnya *C. albicans*), seperti yang tampak pada Gambar 2.1 (Calderone & Clancy, 2012).



Gambar 2. 1 *C. albicans* (Calderone & Clancy, 2012)

Candida merupakan flora normal tubuh. Spesies *Candida* yang diketahui ada 150, tetapi hanya 15 spesies yang merupakan penyebab infeksi jamur pada manusia. Spesies *Candida* yang bersifat patogen antara lain *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, dan *C. norvegensis*. Sembilan puluh lima persen infeksi jamur *Candida* disebabkan oleh 5 spesies *Candida* yaitu *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, dan *C. Krusei*. Secara historis, *C. albicans* sendiri telah bertanggung jawab atas 50% dari semua kandidiasis invasif dan candidemia (Prasad, 2017).

Taksonomi *Candida* menurut C. P. Robin Berkhout 1923 dalam penelitian (Komariah dan Sjam, 2012) sebagai berikut:

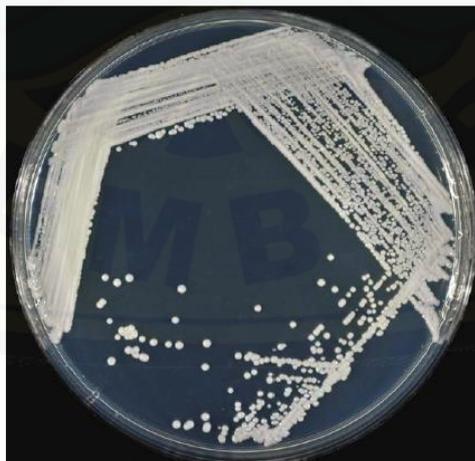
Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Subphylum	: Saccharomycotina
Class	: Saccharomycetes
Ordo	: Saccharomycetales
Family	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Candida</i>

2.2.2 Morfologi *Candida*

Candida secara morfologi mempunyai beberapa bentuk elemen jamur yaitu sel ragi (blastospora/yeast), hifa dan bentuk intermedia/pseudohifa. Sel ragi

berbentuk bulat, lonjong atau bulat lonjong dengan ukuran $2-5\mu\text{m} \times 3-6\mu\text{m}$ hingga $2-5,5\mu\text{m} \times 5-28\mu\text{m}$. *Candida* memperbanyak diri dengan membentuk tunas yang akan terus memanjang membentuk hifa semu. Pertumbuhan optimum terjadi pada pH antara 2,5 – 7,5 dan temperatur berkisar $20\text{ }^{\circ}\text{C} - 38\text{ }^{\circ}\text{C}$. *Candida* merupakan jamur yang pertumbuhannya cepat yaitu sekitar 48–72 jam. Kemampuan *Candida* tumbuh pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ merupakan karakteristik penting untuk identifikasi. Spesies yang patogen akan tumbuh secara mudah pada suhu $25\text{ }^{\circ}\text{C} - 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, sedangkan spesies yang cenderung saprofit kemampuan tumbuhnya menurun pada temperatur yang semakin tinggi. *Candida* dapat tumbuh pada suhu 37°C dalam kondisi aerob dan anaerob. *Candida* tumbuh baik pada media padat, tetapi kecepatan pertumbuhannya lebih tinggi pada media cair. Pertumbuhan juga lebih cepat pada kondisi asam dibandingkan dengan pH normal atau alkali (Kurtzman dkk., 2011).

Morfologi koloni *Candida* pada medium padat *Sabouraud Dektrosa Agar* atau *glucose-yeast extract-peptone water* umumnya berbentuk bulat dengan ukuran $(3,5-6) \times (6-10)\mu\text{m}$ dengan permukaan sedikit cembung, halus, licin, kadang sedikit berlipat terutama pada koloni yang telah tua. Besar kecilnya koloni dipengaruhi oleh umur biakan. Warna koloni *Candida* putih kekuningan (krem lembut) dan berbau khas (Gambar 2.2) (Kurtzman dkk., 2011).



Gambar 2.2 Pembentukan koloni *Candida* pada media SDA (Cihlar dan Calderone, 2009)

2.2.3 Patogenisitas dan virulensi *Candida*

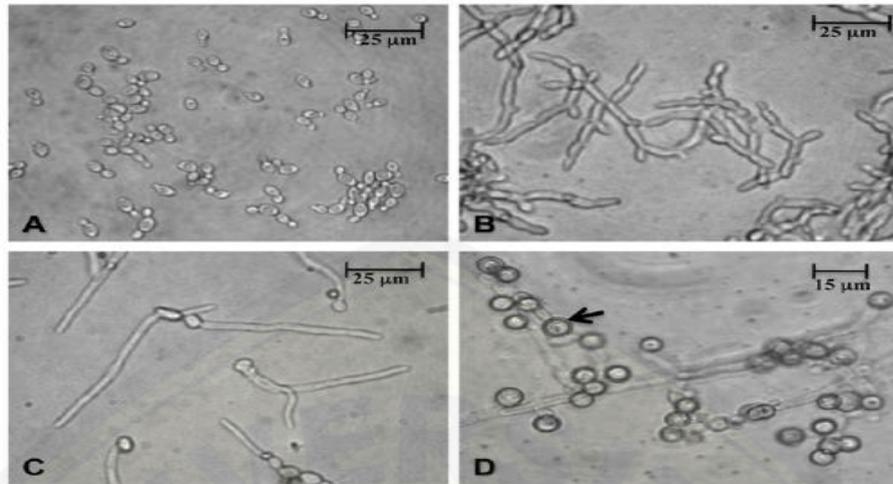
Dalam buku yang ditulis oleh Calderone dan Clancy (2012), mengkategorikan spesies *Candida* berdasarkan frekuensi infeksi yang berpengaruh terhadap kesehatan, seperti dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Frekuensi infeksi spesies *Candida* terhadap kesehatan

Frekuensi	Sering	Jarang	Sangat Jarang
Organisme	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. famata</i>
	<i>C. glabrata</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. inconspicua</i>
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. kefyr</i>
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lipolytica</i>
		<i>C. rugosa</i>	<i>C. norvegensis</i>
		<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. sake</i>
		<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. zeylanoides</i>

a. *C. albicans*

C. albicans merupakan jamur dimorfik yaitu jamur yang mempunyai dua bentuk atau lebih, yaitu bentuk *yeast* (ragi) yang dapat tumbuh optimal pada suhu 37 °C, dan bentuk hifa (*mold*) yang tumbuh optimal pada suhu kamar. Tingginya prevalensi *C. albicans* pada populasi manusia relatif terhadap *Candida spp* lainnya. Hal tersebut dikaitkan dengan berbagai karakteristik yang tidak ada atau sebagian tidak ada pada spesies ragi lainnya. Bentuk pertumbuhan alternatif lain dari *C. albicans* yaitu klamidospora yang terbentuk saat organisme ditanam secara *in vitro* pada media tertentu dengan nutrisi yang kurang (Gambar 2.3). Morfologi ragi dan hifa *C. albicans* dilaporkan menunjukkan kepatuhan yang lebih besar daripada non *C. albicans* spesies *Candida*, kecuali *C. dubliniensis*, yang beberapa laporan mengklaim paling tidak sama dengan *C. albicans*. Enzim hidrolitik ekstraselular seperti proteinase dan fosfolipase dapat memainkan peran beragam dalam penghancuran jaringan, perolehan nutrisi, kepatuhan, dan perlindungan dari pertahanan inang. Kemampuan untuk mentolerir berbagai kondisi lingkungan yang penuh tekanan sering dianggap sebagai kontribusi terhadap virulensi, terutama kemampuan untuk mentolerir rentang pH, oksidatif, dan tekanan osmotik yang luas.



Gambar 2.3 Perbedaan pertumbuhan morfologi *C. albicans* sel ragi (A), pseudohifa (B), hifa (C), dan klamidospora (D)

b. *C. glabrata*

C. glabrata, yang sebelumnya dikenal sebagai *Torulopsis glabrata*, tumbuh sebagai sel ragi oval dan tidak seperti spesies *Candida* lainnya, serta tidak menunjukkan dimorfisme. *C. glabrata* adalah ragi haploid dan secara filogenetik lebih dekat dengan *Saccharomyces cerevisiae* daripada spesies *Candida* lainnya. *C. glabrata* telah semakin terlibat dalam infeksi manusia selama dua dekade terakhir setelah munculnya infeksi HIV dan AIDS dan penggunaan terapi immunosupresif secara luas. *C. glabrata* menunjukkan virulensi rendah pada model infeksi hewan. *C. glabrata* telah muncul sebagai penyebab infeksi jamur sistemik.

c. *C. parapsilosis*

C. parapsilosis tumbuh sebagai sel ragi bulat, oval, atau memanjang dan sebagai pseudohifa. Tidak seperti *C. albicans* dan *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* tidak bisa membentuk hifa sejati. *C. parapsilosis* adalah organisme diploid alami. *C. parapsilosis* dianggap sebagai patogen ragi yang muncul dan semakin dikaitkan dengan berbagai macam infeksi. *C. parapsilosis* menunjukkan virulensi lebih rendah daripada *C. albicans*, kemungkinan besar karena ketidakmampuan untuk membentuk hifa sejati. Produksi lendir dan pembentukan biofilm berpotensi menjadi faktor virulensi signifikan dari *C. parapsilosis* yang memungkinkan adhesi pada peralatan medis plastik seperti kateter intravaskular. *C. parapsilosis*

mudah membentuk biofilm saat ditanam di media yang mengandung konsentrasi lipid dan glukosa tinggi, yang mencerminkan peningkatan prevalensi infeksi aliran darah yang disebabkan oleh organisme ini yang mendapatkan nutrisi parenteral.

d. *C. tropicalis*

C. tropicalis tumbuh sebagai sel ragi oval dan sebagai pseudohifa. *C. tropicalis* adalah organisme diploid dan termasuk dalam cabang yang sama di pohon filogenetik sebagai klausa CTG hemiascomycetes bersama dengan ragi patogen lainnya yang penting secara klinis, termasuk *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, dan *C. metapsilosis*. *C. tropicalis* dapat ditemukan sebagai bagian dari flora komensal normal pada manusia dan dapat menyebabkan kandidiasis invasif pada pasien dengan penyakit mendasar, terutama pada pasien kanker. *C. tropicalis* jarang dikaitkan dengan infeksi orofaringeal dan nampak lebih ganas dibanding *C. albicans* pada pasien dengan keganasan hematologis, dan infeksi yang disebarluaskan dikaitkan dengan tingkat kematian yang tinggi.

e. *C. krusei*

C. krusei tumbuh seperti ragi dan pseudohifa, dan merupakan bentuk anamorfik dari *Issatchenkia orientalis*. Dibandingkan dengan spesies yang telah dijelaskan sebelumnya, *C. krusei* relatif jarang dikaitkan dengan infeksi dan bertanggung jawab kira-kira 3% atas kasus IC (*invasive candidiasis*). Hal tersebut sering dikaitkan dengan pasien yang menderita keganasan hematologis, karena *C. krusei* adalah anggota mikroflora gastrointestinal yang sebagian besar infeksiya diyakini berasal dari endogen.

f. *C. dubliniensis*

C. dubliniensis pertama kali dijelaskan pada kasus OPC pada pasien terinfeksi HIV dan AIDS pada tahun 1995. *C. dubliniensis* sangat erat kaitannya dengan *C. albicans* dan memiliki kemampuan tumbuh seperti ragi, pseudohifa, hifa, dan klamidospora. Karena kemiripan kedua spesies tersebut, *C. albicans* dan *C. dubliniensis* secara fenotip sangat mirip dan seringkali sulit untuk dibedakan di antaranya dalam sampel klinis. Tes berbasis PCR merupakan cara yang paling

akurat untuk mengidentifikasi *C. dubliniensis*. Meskipun terdapat kemiripan antara *C. albicans* dan *C. dubliniensis*, *C. dubliniensis* adalah penyebab langka IC (sekitar 2 sampai 5% kasus). Faktor predisposisi dan mortalitas kasar yang terkait dengan infeksi telah terbukti serupa untuk kedua spesies. *C. dubliniensis* adalah penyusun minor dari flora oral normal individu sehat dan terutama terkait dengan OPC (*oropharyngeal candidiasis*), terutama pada orang yang terinfeksi HIV.

g. *C. guilliermondii*

C. guilliermondii tumbuh sebagai ragi dan sebagai pseudohifa, juga merupakan keadaan anamorphic dari *Pichia guilliermondii*. *C. guilliermondii* sering dikaitkan dengan infeksi kuku, namun jarang menjadi penyebab infeksi invasif (biasanya <1% kasus).

h. *C. lusitaniae*

C. lusitaniae tumbuh dalam bentuk ragi dan pseudohifa, juga merupakan keadaan anamorphic dari *Clavispora lusitaniae*. *C. lusitaniae* jarang dikaitkan dengan penyakit. Kejadian infeksi *C. lusitaniae* sangat rendah sebelum diperkenalkannya pengobatan kemoterapi agresif. Namun, hal tersebut meningkat secara signifikan, terutama pada pasien kanker, setelah tahun 1990.

i. *C. rugosa*

C. rugosa tumbuh dengan tunas vegetatif dan menghasilkan pseudohifa, namun tidak diketahui bentuk teleomorfik. *C. rugosa* dikenal sebagai penyebab mastitis sapi dan jarang dikaitkan dengan penyakit manusia.

2.3 Diet Karbohidrat Spesifik

Ada berbagai diet yang dianjurkan untuk anak ASD, antara lain diet bebas kasein dan gluten (CFGF), diet karbohidrat spesifik, *Feingold Diet* dan *Failsafe Diet*. Tetapi diet yang digunakan oleh penderita ASD dalam penelitian ini adalah diet karbohidrat spesifik. Diet karbohidrat spesifik yaitu terapi diet anak ASD yang dikembangkan oleh Elaine Gottschall. Dalam saluran pencernaan yang sehat, mikroba usus hidup dalam keadaan seimbang, kelimpahan satu jenis akan menghambat aktivitas jenis lainnya. Karbohidrat adalah sumber makanan utama untuk mikroba usus yang dapat menyebabkan gangguan pencernaan. Selain itu,

sisia karbohidrat yang tidak tercerna diyakini dapat mendorong terbentuknya senyawa asam dan racun yang dapat merusak usus dan mengganggu sistem pencernaan. Diet ini kemudian diperkenalkan untuk penderita ASD dengan tujuan mengurangi gangguan sistem pencernaan (Gottschall, 2004).

Namun, pertumbuhan berlebih bakteri di perut dan usus halus bisa dan memang terjadi peningkatan pada usus anak-anak karena berbagai alasan di antaranya adalah sebagai berikut:

- a. Malnutrisi atau diet dengan kualitas rendah (olahan tinggi gula dan makanan pati yang diproses dan terkonsentrasi seperti kebanyakan makanan mentah, kentang, dan roti/gandum)
- b. Terapi antibiotik yang bisa menyebabkan berbagai macam perubahan mikroba. Mikroba yang biasanya berada di usus tanpa efek berbahaya dapat mengalami berbagai perubahan sebagai terapi antibiotik ulang.
- c. Cedera pada permukaan usus (enzim mikrovili) mencegah pencernaan hampir semua karbohidrat dan beberapa protein meninggalkan karbohidrat yang belum tercerna di usus kecil. Karbohidrat adalah sumber makanan utama untuk mikroba usus yang dapat menyebabkan gangguan pencernaan. Selain itu, sisa karbohidrat yang tidak tercerna diyakini memiliki pengaruh terbesar pada pertumbuhan mikroba usus dan dapat mendorong terbentuknya senyawa asam dan racun yang dapat merusak usus dan mengganggu sistem pencernaan. Ketika mikroba ini berkembang biak sebagai akibat dari kelebihan energi yang biasanya akan masuk ke sel tubuh, mereka menghasilkan produk limbah yang telah terbukti mempengaruhi otak dan perilaku (Gottschall, 2004).

Penelitian telah menunjukkan bahwa pada anak-anak yang didiagnosis dengan diare nonspesifik kronis, enteropati peka-gluten, enteropati protein-sensitif susu, enteropati peka protein kedelai, diare yang berlarut-larut pada masa bayi, Giardiasis, cystic fibrosis, dan penyakit Crohn ada kerusakan yang ditandai pada permukaan mukosa usus halus yang mengandung enzim disakaridase. Hal ini menunjukkan bahwa pencernaan karbohidrat tidak dapat berlangsung secara normal pada bayi dan anak-anak dengan diagnosis ini dan, sangat mungkin, gangguan autisme/pencernaan (Gottschall, 2004).

2.4 Metode Penetapan Morfologi Koloni *Candida*

Sebagai ragi, *Candida spp.* umumnya kecil, ovoid, jamur berdinding tipis yang reproduksi utamanya oleh tunas. Morfologi koloni *Candida* pada medium padat *Sabouraud Dekstroza Agar* (SDA) atau *glucose-yeast extract-peptone water* umumnya berbentuk bulat dengan ukuran (3,5-6) x (6-10) μm dengan permukaan sedikit cembung, halus, licin, kadang sedikit berlipat terutama pada koloni yang telah tua. Besar kecilnya koloni dipengaruhi oleh umur biakan. Warna koloni *Candida* putih kekuningan (krem lembut) dan berbau khas (lihat Gambar 2.2) (Kurtzman dkk., 2011).

Apabila pada biakan tumbuh koloni jamur yang berwarna putih sampai krem dengan permukaan menimbul, dianggap positif *Candida*. Sedangkan hasil yang dinyatakan negatif bila pada biakan tidak tumbuh koloni jamur sampai umur biakan 10 hari atau lebih (Mulyati dkk., 2002).

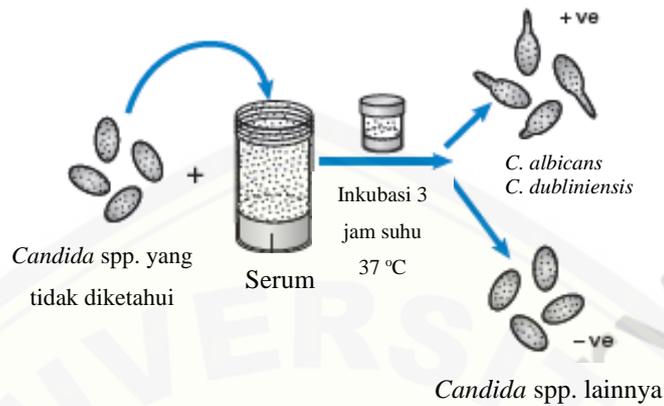
2.5 Metode *Germ Tube*

Metode ini dilakukan dengan cara menambahkan sebagian kecil koloni ke tabung yang mengandung serum protein 0,5 ml - 2 ml dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 jam. Kemudian teteskan sebanyak 1 tetes media yang bercampur isolat tersebut ke obyek glass lalu tutup dengan kaca penutup. Kemudian amati di bawah mikroskop (Gambar 2.4) (Collins dkk., 1989).

Medium yang dapat digunakan untuk metode ini yaitu medium yang mengandung protein, misalnya putih telur, serum atau plasma darah, pada suhu 37 °C selama 1-2 jam terjadi pembentukan kecambah (*germ tube*) dari blastospora. Karakteristik pembentukan klamidospora dan *germ tube* dapat digunakan untuk membantu identifikasi (Kurtzman dan Fell, 1998). Hasil dinyatakan positif bila pada pemeriksaan mikroskopis ditemukan bentuk sel yang berkecambah seperti raket (*germ tube*) (Mulyati dkk., 2002).

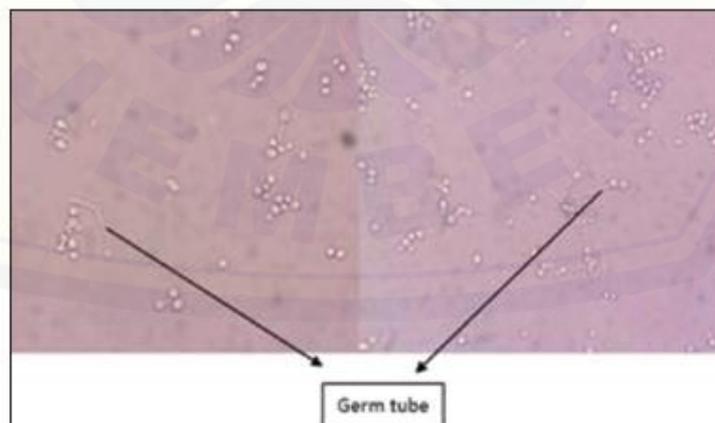
Germ tube banyak digunakan karena prosesnya yang sederhana dan cepat, hanya membutuhkan waktu 2-6 jam untuk dapat mengidentifikasi *Candida albicans*. Pada *germ tube*, akan terjadi pembentukan filamen tipis. Pembentukan

germ tube dipengaruhi oleh suhu, *inoculum*, media, dan *strain* (Kurtzman dan Fell, 1998).



Gambar 2. 4 *Germ tube test* (Samaranayake, 2012)

Uji *germ tube* hanya dapat mengidentifikasi beberapa spesies *Candida*, karena hanya beberapa spesies yang dapat memproduksi *germ tube* atau klamidospora (Kurtzman dan Fell, 1998). Strain *C. albicans* dan *C. dubliniensis* memiliki kemampuan untuk menghasilkan *germ tube* dan klamidospora. Hal itulah yang membedakannya dengan spesies *Candida* lainnya, yang tidak menunjukkan karakteristik ini (Samaranayake, 2012). Isolat dinyatakan positif bila tumbuh *germ tube* dalam 1-3 jam pada suhu 37 °C (Berardinelli dan Opheim, 1985). Hasil uji *germ tube* *C. albicans* dan *C. dubliniensis* dapat dilihat pada Gambar 2.5 dan 2.6.

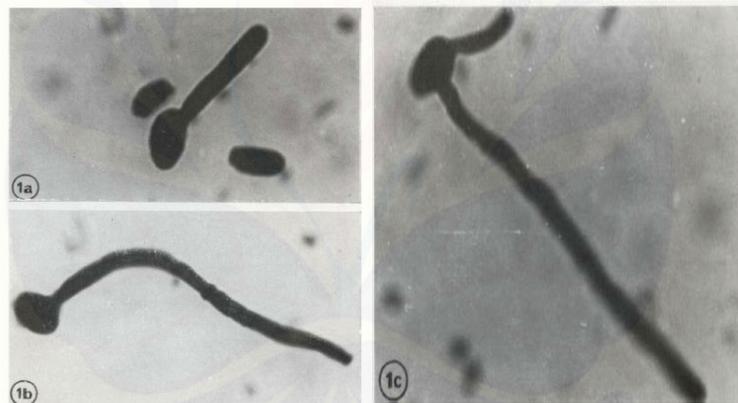


Gambar 2. 5 *Germ tube test* positif *C. albicans* (Shah dkk., 2016)



Gambar 2. 6 *Germ tube C. dubliniensis* (Gauch dkk., 2013)

Selain *C. albicans* dan *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* juga diketahui dapat memproduksi *germ tube*. *C. tropicalis* memproduksi hifa lebih awal yang dapat rancu dengan *germ tube*. *Germ tube* pada *C. tropicalis* berupa hifa yang terjadi perpanjangan lateral pada ragi tanpa adanya penyempitan dari bentuk awalnya (Murray dkk., 2007). *Germ tube C. tropicalis* dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Pertumbuhan *germ tube C. tropicalis* setelah 2 jam inkubasi (a), setelah 3 jam inkubasi (b), dua *germ tube* yang berasal dari satu blastospora setelah inkubasi 4 jam (c) (Martin, 1979)

2.6 Metode *Slide Culture*

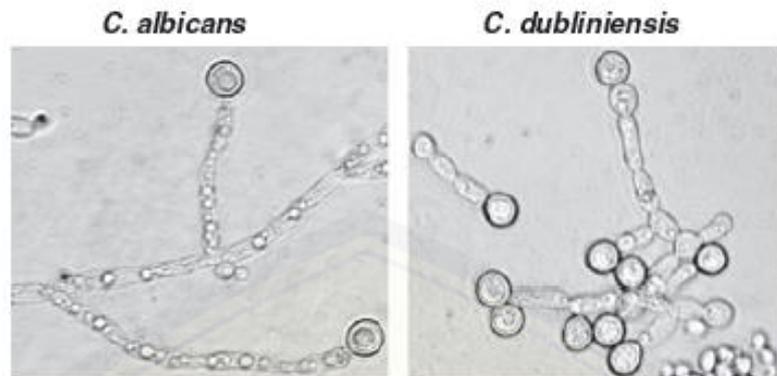
Metode *slide culture* digunakan untuk melihat struktur jamur yang lebih jelas dan kemungkinan pemeriksaannya lebih kritis (Collins dkk., 1989). Identifikasi spesies secara mikroskopik morfologik dapat dilakukan dengan menanam jamur pada medium tertentu, seperti agar tepung jagung (*corn-meal agar*), agar tajin (*rice-cream agar*)+tween 80. Pada medium itu *C. albicans* membentuk klamidospora terminal yaitu sel ragi berukuran besar berdinding tebal (Komariah dan Sjam, 2012).

Klamidospora dapat diamati secara konsisten dan ditemukan melimpah pada media agar tajin (*rice-cream agar*) 17-24 jam setelah inokulasi dengan *Candida albicans*. Sedangkan *Candida* non patogen tumbuh pada media agar tepung jagung (*corn-meal agar*). Media tersebut adalah media yang sering digunakan tetapi pembuatannya membutuhkan waktu yang lama dan susah untuk disiapkan. Pada penelitian selanjutnya para peneliti menemukan bahwa penambahan *tween 80* (*polysorbate 80*) ke *rice extract agar* meningkatkan pembentukan klamidospora oleh *C. albicans*. Penambahan produksi pigmen dekstrosa 2% yang ditingkatkan oleh *Trichophyton rubrum* memungkinkan diferensiasi antara dermatofit dan *Trichophyton mentagrophytes* ini (Zimbro dan Jo, 1988).

Ekstrak beras merupakan satu-satunya sumber nutrisi dalam medium. Kurangnya nutrisi tersebut bersamaan dengan kondisi kultur kekurangan oksigen (disebabkan inokulum dengan kaca penutup) menciptakan lingkungan yang kurang baik sehingga menginduksi pembentukan bentuk morfologi yang spesifik (terutama klamidospora dan *pseudomycelia*) pada beberapa ragi. Penambahan *tween 80* merangsang pembentukan klamidospora karena kandungan asam oleatnya. Agar dimasukkan ke dalam medium sebagai zat pematatan (Zimbro dan Jo, 1988).

Metode *slide culture* dengan media RCT ini digunakan untuk membedakan yaitu *C. albicans* dari spesies *Candida* lainnya berdasarkan pembentukan klamidospora (Atlas, 2010). Tetapi pada penelitian lainnya menyatakan spesies *C. dubliniensis* juga dapat diidentifikasi dengan media RCT ini (Staib dan Morschha, 2006).

Pada analisis mikroskopis, pembentukan klamidospora *C. dubliniensis* selain lebih banyak daripada *C. albicans*, namun *C. dubliniensis* sering menghasilkan lebih dari satu terminal klamidospora. Selain itu, filamen klamidospora umumnya lebih pendek pada *C. dubliniensis* daripada di *C. albicans* (Staib dan Morschha, 2006), seperti yang tampak pada Gambar 2.8.



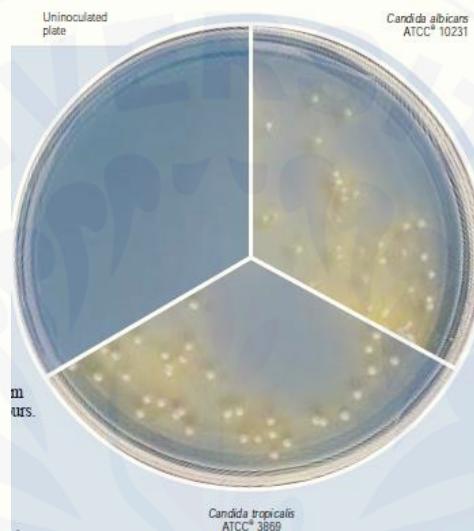
Gambar 2. 8 Analisis mikroskopis *C. albicans* tunggal dan *C. dubliniensis* setelah 4 hari pertumbuhan pada 25 °C pada *rice Tween-80 agar* (Staib dan Morschha, 2006).

2.7 Metode *Bromocresol green agar* (BCG)

Bromocresol green agar (BCG) digunakan untuk mengisolasi dan membedakan antara spesies *Candida*. Komposisi media *bromocresol green agar* yaitu terdiri dari glukosa 40 g; agar 15 g; pepton 10 g; *yeast extract* 1g, *bromocresol green* 0,02g; dan larutan *neomycin* 10 mL; dengan pH $6.1 \pm 0,1$ pada 25°C. Larutan *neomycin* sendiri mengandung 0,5 g *neomycin* dalam 10 mL air distilasi atau air deionisasi (Atlas, 2010).

Pepton sebagai penyedia asam nitrogen dan amino pada media *Candida* BCG *Agar Base*. Ekstrak Ragi sebagai sumber vitamin. Glukosa berfungsi sebagai sumber energi dengan menjadi karbohidrat yang dapat difermentasi. *Neomycin* ditambahkan sebagai agen seleksi untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif dan beberapa bakteri gram positif. *Neomycin* adalah antibiotik aminoglikosida yang aktif melawan bakteri gram-negatif aerob dan fakultatif anaerob, juga bakteri gram positif tertentu. Agar sebagai zat pematatan. *Bromocresol green* adalah indikator pH yang berubah dari biru-hijau menjadi kuning dengan adanya asam yang dihasilkan saat ragi menggunakan glukosa (reaksi fermentasi). Produksi asam karena fermentasi akan menurunkan pH medium dan merubah warnanya menjadi kuning, ditandai dengan zona kuning di sekitar koloni fermentasi glukosa (Atlas, 2010).

Setiap spesies *Candida* memiliki pola warna permukaan dan koloni dasar tertentu yang dapat digunakan secara presumptif untuk mengidentifikasi spesies tersebut. Sebagai contoh, *C. albicans* memiliki warna koloni dasar dan permukaan yang berwarna kuning sampai hijau kebiruan, sedangkan *C. tropicalis* memiliki warna hijau yang kuat dari pertumbuhan terendam, warna dasar yang lebih ringan, dengan warna permukaan hijau kekuningan yang pucat, seperti tampak pada Gambar 2.9 (Mahon dkk., 2011).



Gambar 2. 9 BCG agar *C. albicans* dan *C. tropicalis* (Zimbro dan Jo, 1988)

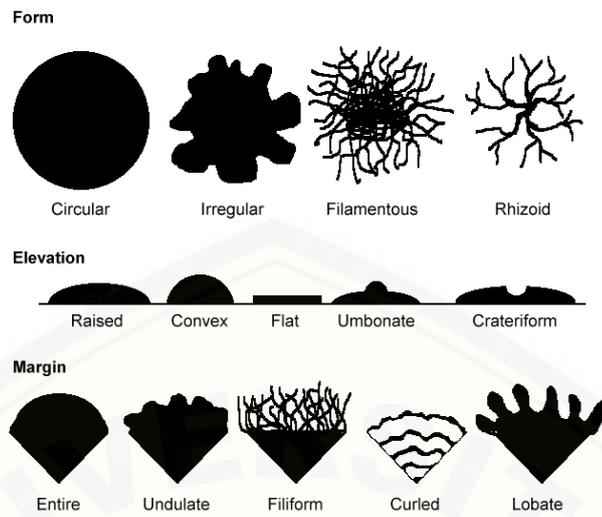
Media ini adalah media digunakan untuk menunjukkan reaksi morfologi dan biokimia yang mencirikan spesies *Candida* yang berbeda (Atlas, 2010). Identifikasi spesies *Candida* berdasarkan morfologi koloni pada *Candida BCG agar* yang dijelaskan dalam Zimbro dan Jo (1988) yaitu:

- a. *C. albicans*: koloni kerucut berdiameter 4,5-5,5 mm, tepi dan permukaan halus, terdapat pertumbuhan bulu kasar yang timbul dari pusat koloni menembus medium. Warna dasar dan permukaan koloni berwarna kekuningan sampai hijau kebiruan dengan intensitas berkurang dari titik pusat hijau abu-abu sampai pucat di tepi, meskipun beberapa strain mungkin menunjukkan cincin luar hijau yang berbeda.
- b. *C. tropicalis*: koloni berbentuk cembung atau kerucut rendah berdiameter 4.5-5,0 mm, tepi halus tidak berombak, permukaan granular atau bergerigi, pertumbuhan bulu muncul dari beberapa titik di dasar koloni. Warna dasar

biasanya hijau biru yang intens dibandingkan dengan basis, permukaannya pucat dan berwarna kehijauan.

- c. *C. pseudotropicalis*: koloni cembung, berdiameter 4,5-5,5 mm bergerigi halus, permukaannya halus, kadang permukaannya selaput tapi semua koloni tampak berkilau, dan ada pertumbuhan bulu yang muncul dari beberapa titik di dasar koloni. Warna area pusat yang besar di dasar koloni adalah hijau, yang mengurangi intensitas ke arah tepi, distribusi warna yang sama terjadi di permukaan, hijaunya lebih cerah daripada *C. tropicalis*.
- d. *C. krusei*: koloni kerucut rendah berdiameter 4,5-5,0 mm dengan ujung pseudohifa, permukaan kusam. Warna koloni pada dasar media hijau biru yang semakin berkurang dalam intensitas pucat di tepi, permukaan berwarna hijau muda sampai hijau kuning.
- e. *C. parapsilosis*: koloni cembung sampai kerucut rendah berdiameter 3,5-4,5 mm, tepi yang halus atau sedikit menyebar, permukaan granular atau kasar, pertumbuhan hanya di permukaan. Warna dasar dan permukaan koloni berwarna biru hijau, lebih kuat di dasar daripada permukaan yang terdapat film tipis keabu-abuan.
- f. *C. guilliermondii*: koloni kerucut rendah berdiameter 4,0-5,0 mm, tepi sangat halus, permukaan sangat *glossy*, kadang terdapat pertumbuhan bulu halus. Dasar dan permukaan koloni cenderung memiliki pusat biru dengan intensitas sedang yang memudar menjadi tepi yang pucat, namun permukaannya mungkin berwarna biru hijau dengan bagian tengahnya yang keabu-abuan.
- g. *C. glabrata*: koloni halus dan cembung, diameter 4,6-5,0 mm. Permukaannya berwarna hijau pucat di bagian tengahnya yang menjadi hijau muda di tepinya, dan dasarnya memiliki pola warna yang sama namun kurang intensitasnya.

Identifikasi morfologi pada media BCG dapat di bantu dengan menggunakan acuan gambar pada literatur. Gambar acuan tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.10.



Gambar 2. 10 Macam bentuk, elevasi dan tepi pada mikroorganisme (Wignyanto dan Hidayat, 2017)

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Identifikasi jamur *Candida* pada feses anak *Autism Spectrum Disorder* (ASD) yang menjalani diet karbohidrat ini merupakan penelitian *experimental laboratories*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Jember. Waktu pelaksanaannya mulai Februari 2017 sampai dengan Mei 2018.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari sampel feses anak normal dan sampel feses anak penderita *Autism Specturm Disoreder* (ASD) yang menjalani diet karbohidrat dengan usia 2 hingga 12 tahun yang tidak dibedakan jenis kelaminnya, serta telah ditetapkan diagnosisnya berdasarkan *Diagnostic and Statistic Manual IV Task Force* (DSM IV TR). Perhitungan jumlah sampel yang dibutuhkan terkait dengan populasi penderita ASD yang menjalani diet karbohidrat yaitu sekitar 30 sampel dan dihitung menggunakan rumus *Krejcie and Morgan*, namun karena terdapat beberapa kendala terkait persetujuan orang tua sehingga sampel yang digunakan yaitu 13 sampel untuk sampel ASD yang menjalani diet karbohidrat dan untuk sampel anak normal jumlahnya disamakan. Persamaan *Krejcie and Morgan* dapat dilihat dalam persamaan berikut:

$$n = \frac{X^2 N P (1-P)}{d^2 (N-1) + X^2 P (1-P)}$$

dimana,

n = ukuran sampel

N = ukuran populasi

P = proporsi populasi (0,5)

d = derajat ketelitian (0,05)

X² = nilai tabel X²

Sampel feses anak normal didapat dari sukarelawan dan sampel feses anak *Autism Spectrum Disorder* yang menjalani diet karbohidrat didapatkan dari lembaga pendidikan anak berkebutuhan khusus di Surabaya yang telah mendapatkan persetujuan dari pihak keluarga dan sekolah yang bersangkutan seperti yang tercantum pada *informed consent* (Lampiran).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sampel feses anak normal dan sampel feses ASD yang menjalani diet karbohidrat.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jamur *Candida* yang diidentifikasi dari sampel feses anak normal dan sampel feses anak ASD yang menjalani diet karbohidrat.

3.4.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah lama diet yang dijalani penderita, preparasi sampel dan penyimpanan, serta cara identifikasi jamur *Candida* pada sampel feses anak normal dan pada anak ASD yang menjalani diet karbohidrat.

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Sampel feses anak *Autism Spectrum Disorder* (ASD) yang menjalani diet karbohidrat yaitu anak ASD dengan usia 2 hingga 12 tahun tanpa dibedakan jenis kelaminnya, serta telah ditetapkan diagnosisnya berdasarkan *Diagnostic and Statistic Manual IV Task Force* (DSM IV TR). Sampel feses anak ASD yang menjalani diet karbohidrat tidak mendapatkan antibiotik maupun antijamur. Sampel ini didapatkan dari lembaga pendidikan anak berkebutuhan khusus di Surabaya. Umur sampel feses yang digunakan tidak lebih dari 24 jam setelah pengambilan.

- b. Sampel feses anak normal yaitu sampel feses anak sehat yang didapat dari sukarelawan dan tidak mendapatkan antibiotik maupun antijamur dengan usia 2 hingga 12 tahun tanpa dibedakan jenis kelaminnya. Umur sampel feses yang digunakan tidak lebih dari 24 jam setelah pengambilan.
- c. Spesies candida yang diidentifikasi pada penelitian ini adalah *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis*, dan *C. dubliniensis*.

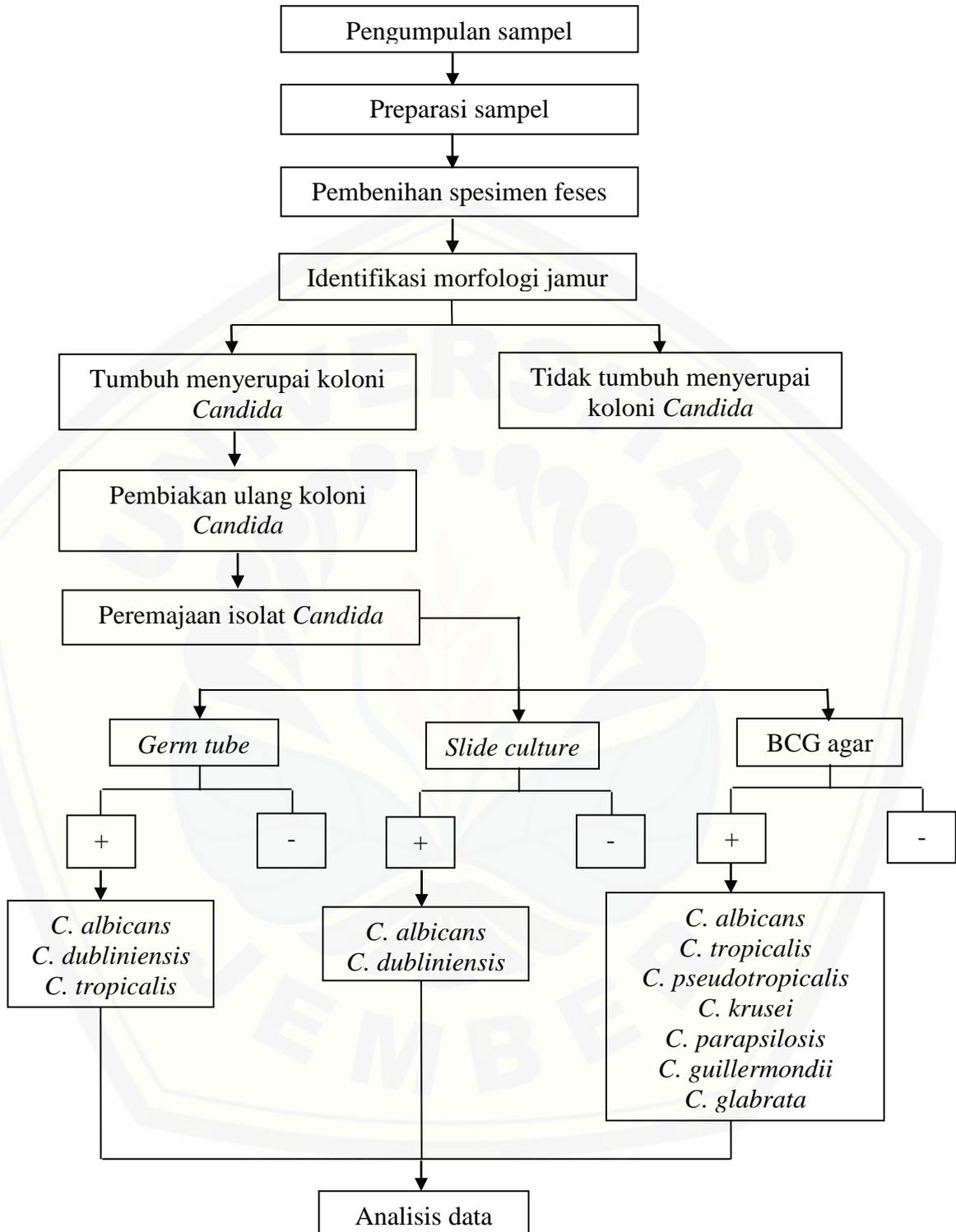
3.6 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi keberadaan jamur *Candida* pada anak normal dan pada anak *Autism Spectrum Disorder* (ASD) yang menjalani diet karbohidrat. Tahap pertama dilakukan pengumpulan sampel lalu sampel dipreparasi dan kemudian dilakukan pembedahan spesimen feses. Lalu dilakukan identifikasi morfologi koloni jamur *Candida*. Tahap selanjutnya yaitu pembiakan ulang koloni jamur *Candida* dan kemudian dilakukan peremajaan isolat *Candida*. Selanjutnya, dilakukan identifikasi spesies *Candida* yang meliputi uji pembentukan *germ tube* (kecambah), pembentukan klamidospora dengan media *Rice-cream Tween 80* (RCT), dan ciri spesifik lainnya pada media *Bromocresol green* (BCG) *agar base*. Rancangan ini dapat dilihat seperti Gambar 3.1.

3.7 Bahan dan Alat

3.7.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel penelitian dan reagen serta media. Sampel penelitian yang digunakan yaitu sampel feses anak normal dan sampel feses anak ASD yang menjalani diet karbohidrat dengan usia 2 hingga 12 tahun yang tidak dibedakan jenis kelaminnya. Jumlah sampel yang digunakan 13 sampel feses anak ASD yang menjalani diet karbohidrat dan 13 sampel feses anak normal. Media yang digunakan dalam penelitian adalah medium *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA), *Rice-cream Tween 80* (RCT) *Agar*, medium *Bromocresol Green Agar* (BCG) dan putih telur untuk *germ tube*.



Gambar 3.1 Skema penelitian

3.7.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, pot plastik steril, tabung serologi untuk tes *germ tube*, kaca objek dan kaca tutup untuk identifikasi *germ tube*, ose bulat, plastik wrap untuk menutup petri agar terhindar dari kontaminan dan mikroskop cahaya untuk pemeriksaan langsung hasil biakan.

3.8 Prosedur Kerja

3.8.1 Pengumpulan Sampel

Pengambilan sampel feses masing-masing kategori (anak sehat dan anak ASD yang menjalani diet karbohidrat) diambil pada saat buang air besar pertama di hari tersebut, kemudian sampel disimpan di dalam pot plastik. Pot plastik tersebut disimpan dalam *ice bag* dan suhu dijaga ± 4 °C dengan menggunakan *ice pack*. Umur sampel feses yang dipreparasi tidak boleh lebih dari 24 jam terhitung dari waktu pengambilan.

3.8.2 Preparasi Sampel

Sampel feses yang didapat dilarutkan dalam larutan garam fisiologis. Tiap sampel dibutuhkan 4 tabung larutan garam fisiologis yang berisi 9 ml garam fisiologis. Tahap pertama sampel feses diambil sedikit kemudian dilarutkan dalam tabung pertama dan dihomogenkan dengan menggunakan *stirrer*. Kemudian sampel yang telah homogen tersebut diambil sebanyak 1000,00 μ l menggunakan mikropipet dan dimasukkan pada tabung kedua dan seterusnya hingga tabung keempat. Sampel yang dibiakkan pada media SDA hanya sampel pada tabung 4 (faktor pengenceran 10^{-4}).

3.8.3 Pembenihan spesimen feses

Masing-masing sampel feses dibiakkan di dalam medium agar *Sabouraud Dekstrosa* (SDA) dengan antibiotik kloramfenikol 0,5 mg/ml. Sampel yang dibiakkan yaitu sampel dengan faktor pengenceran 10^{-4} . Penanaman dilakukan dengan cara mengambil sampel yang telah diencerkan sebanyak 100 μ l dan

dipindahkan ke dalam cawan petri steril yang berisi medium SDA dengan antibiotik, lalu disebar ke seluruh permukaan medium tersebut. Biakan diinkubasi pada suhu kamar selama 7-10 hari.

3.8.4 Identifikasi Morfologi Jamur

Setelah biakan diinkubasi selama 7 hari, sampel diidentifikasi. Hasil dianggap positif *Candida* bila pada biakan tumbuh koloni jamur yang berwarna putih sampai krem dengan permukaan menimbul. Hasil dinyatakan negatif bila pada biakan tidak tumbuh koloni jamur sampai umur biakan 10 hari atau lebih. Setelah biakan dinyatakan positif *Candida*, pemeriksaan dilanjutkan dengan melakukan serangkaian pemeriksaan untuk identifikasi spesiesnya (Mulyati, 2002). Sedangkan biakan yang tidak tumbuh (negatif) atau tumbuh dengan ciri yang berbeda dipisahkan dan tidak dilanjutkan ke tahap identifikasi selanjutnya.

3.8.5 Pembrokian ulang Koloni *Candida*

Koloni *Candida* yang sebelumnya dinyatakan positif, selanjutnya dibiakkan ulang di media *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA) dengan 4 kuadran. Pembrokian ulang ini dilakukan dengan cara mengambil sedikit koloni *Candida* dengan ose bulat yang telah dibakar hingga kawatnya berpijar selama \pm 8-10 detik sebelum digunakan. Koloni *Candida* diambil dari media awal dan digoreskan secara zigzag ke dalam media SDA dengan 4 kuadran. Media tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama beberapa hari hingga tumbuh koloni *Candida*.

3.8.6 Peremajaan isolat *Candida*

Isolat *Candida* yang akan diidentifikasi dilakukan peremajaan dengan cara membrokian ulang ke dalam medium perbenihan *Sabouraud Dextrosa Agar* di dalam tabung reaksi yang dimiringkan (media miring) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 – 72 jam. Isolat siap untuk diidentifikasi.

3.8.7 Identifikasi spesies *Candida*

Isolat *Candida* yang telah diremajakan pada media miring siap diidentifikasi menggunakan metode *germ tube*, *slide culture* dengan media RCT, dan *Candida Bromcresol Green (BCG) Agar Base*.

a. Uji pembentukan *germ tube* (kecambah)

Pengujian dengan metode *germ tube* menggunakan media dengan bahan yang mengandung faktor protein, seperti putih telur, serum dan plasma. Pada penelitian ini media yang digunakan yaitu putih telur ayam ras yang sebelum digunakan terlebih dahulu diletakkan di dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 30 menit. Kemudian putih telur tersebut dimasukkan kedalam tabung serologi sebanyak ± 2 ml dengan menggunakan gelas ukur steril. Lalu isolat *Candida* yang berumur 48-72 jam diinokulasikan ke dalam putih telur dalam tabung serologi tersebut. Bila dalam inokulasi jamurnya menggumpal, maka jamur harus dihancurkan atau diurai terlebih dahulu untuk mempermudah terbentuknya kecambah. Biakan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 – 3 jam. Hasil dinyatakan positif bila pada pemeriksaan mikroskopis ditemukan bentuk sel yang berkecambah seperti raket (*germ tube*) (Mulyati dkk., 2002).

b. *Slide culture* dengan media *Rice-cream Tween 80 (RCT)*

Identifikasi dengan metode *slide culture* dilakukan untuk mengamati struktur *Candida* secara jelas. *Rice agar* dibuat dengan cara merebus 20 g beras dalam 1 liter aquades sekitar 45 menit, lalu disaring. Kemudian tambahkan aquades sampai kembali 1 liter. Kemudian media disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit. Produk *rice agar* pabrikan tersedia, namun umumnya hasil yang diperoleh lebih rendah daripada medium yang didapatkan dari infus beras (Kurtzman dkk., 2011).

Masing-masing isolat dibuat dalam *slide culture* untuk mengamati struktur jamur secara jelas. Cara pembuatan *slide culture* yaitu dengan menyiapkan cawan petri beralaskan kertas isap (tisu), gelas objek, dan batang penahan gelas objek. Setelah tertata kemudian disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf (Sanjaya dkk., 2010).

Setelah steril, kemudian dilakukan pembuatan *slide culture*. Media RCT yang telah dibuat dan membeku, diambil dengan menggunakan ose dan dipanaskan sedikit agar lebih mencair lalu diletakkan di atas kaca objek yang terletak di dalam cawan petri steril. Kemudian medium dibiarkan membeku dan dingin. Isolat *Candida* yang berumur 48-72 jam diinokulasikan pada media tersebut dengan cara menggoreskannya pada permukaan media. Bagian atas dari medium yang telah diinokulasi ditutup dengan kaca tutup steril. Untuk menjaga kelembaban dalam ruang biakan tersebut, kertas isap diberi aquades steril secukupnya (± 3 ml). Biakan diinkubasi pada suhu kamar selama 2-3 hari. Setelah 2-3 hari kemudian biakan yang berada di atas kaca objek tadi diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10x10 untuk melihat adanya pertumbuhan sel ragi dan hifa semu yang khas. Lalu dilakukan pengambilan gambar untuk masing-masing isolat hasil pengamatan (Mulyati dkk., 2002).

Metode *slide culture* dengan media RCT ini digunakan untuk membedakan yaitu *C. albicans* dan *C. stellatoidea* dari spesies *Candida* lainnya berdasarkan pembentukan klamidospora (Atlas, 2010). Tetapi pada penelitian lainnya menyatakan spesies *C. dubliniensis* juga dapat diidentifikasi dengan media RCT ini (Staib dan Morschha, 2006).

Pada analisis mikroskopis, pembentukan klamidospora *C. dubliniensis* selain lebih banyak daripada *C. albicans*, namun *C. dubliniensis* sering menghasilkan lebih dari satu terminal klamidospora. Selain itu, filamen klamidospora umumnya lebih pendek pada *C. dubliniensis* daripada di *C. albicans* (Staib dan Morschha, 2006).

c. *Bromocresol green agar* (BCG)

Bromocresol green agar (BCG) digunakan untuk mengisolasi dan membedakan antara spesies *Candida*. Nutrisi diberikan dengan memasukkan glukosa, ekstrak ragi, dan pepton. *Neomycin* ditambahkan sebagai agen seleksi untuk menghambat pertumbuhan bakteri. *Bromocresol green* adalah indikator pH yang berubah dari biru-hijau menjadi kuning dengan adanya asam yang dihasilkan saat ragi menggunakan glukosa. Setiap spesies *Candida* memiliki pola warna permukaan dan koloni dasar tertentu yang dapat digunakan secara presumptif

untuk mengidentifikasi spesies tersebut. Sebagai contoh, *C. albicans* memiliki warna koloni dasar dan permukaan yang berwarna kuning sampai hijau kebiruan, sedangkan *C. tropicalis* memiliki warna hijau yang kuat dari pertumbuhan terendam, warna dasar yang lebih ringan, dengan warna permukaan hijau kekuningan yang pucat (Mahon dkk., 2011).

Komposisi media *bromocresol green agar* yaitu terdiri dari glukosa 40g, agar 15g, pepton 10g, *yeast extract* 1g, *bromocresol green* 0.02g, dan larutan neomycin 10 mL. Larutan *neomycin* dibuat dengan cara menambahkan 0,5 g *neomycin* dalam 10 mL air terdistilasi atau air deionisasi. Campur hingga homogen dan filter disterilkan (Atlas, 2010).

Pembuatan media *bromocresol green (BCG) agar* yaitu dengan menambahkan komponen, kecuali larutan *neomycin*, ke air distilasi/deionisasi dengan volume 1L. Campur secara menyeluruh dan panaskan perlahan sampai mendidih. Campuran diautoklaf selama 15 menit dengan tekanan 15 psi dan suhu 121 °C. Kemudian didinginkan sampai 50 °-55 °C. Lalu tambahkan secara aseptik 10 mL larutan *neomycin* steril dengan konsentrasi 500 µg/ml ke dalam media, campur hingga homogen. Media yang telah jadi dituang ke dalam cawan petri steril atau biarkan di dalam tabung (Atlas, 2010).

Penanaman dilakukan dengan cara menghapuskan isolat *Candida* dengan ose di atas permukaan medium BCG. Kemudian media yang berisi hapusan isolat *Candida* diinkubasi pada suhu 25 °-30 °C selama 24-48 jam. Selanjutnya respon kultur isolat dalam media BCG dapat diidentifikasi. Identifikasi spesies ditentukan berdasarkan perbedaan warna koloni yang terjadi (Atlas, 2010).

Media BCG ini merupakan media yang digunakan dalam identifikasi spesifik spesies *Candida* secara morfologi akibat dari reaksi biokimia yang berbeda dari masing-masing spesies *Candida*. Identifikasi spesies *Candida* berdasarkan morfologi koloni *Candida* BCG agar dijelaskan dalam Zimbro dan Jo (1988) yaitu:

- a. Koloni *C. albicans* muncul dengan ciri berbentuk kerucut 4,5-5,5 mm dengan tepi dan permukaan halus, terdapat pertumbuhan bulu kasar yang timbul dari pusat koloni menembus medium. Warna dasar dan permukaan koloni berwarna

kekuningan sampai hijau kebiruan dengan intensitas berkurang dari titik pusat hijau abu-abu sampai pucat di tepi, meskipun beberapa strain mungkin menunjukkan cincin luar hijau yang berbeda.

- b. Koloni *C. tropicalis* berbentuk cembung atau kerucut rendah berdiameter 4,5-5,0 mm dengan tepi halus tidak berombak, permukaan granular atau bergerigi, pertumbuhan bulu muncul dari beberapa titik di dasar koloni. Warna dasar biasanya hijau biru yang intens dibandingkan dengan basis, permukaannya pucat dan berwarna kehijauan, mencerminkan pH yang lebih rendah daripada yang diamati pada dasarnya.
- c. Koloni *C. pseudotropicalis* cembung, berdiameter 4,5-5,5 mm bergerigi halus, permukaannya halus, kadang permukaannya selaput tapi semua koloni tampak berkilau, dan ada pertumbuhan bulu yang muncul dari beberapa titik di dasar koloni. Warna area pusat yang besar di dasar koloni adalah hijau, yang mengurangi intensitas ke arah tepi, distribusi warna yang sama terjadi di permukaan, hijaunya lebih cerah daripada *C. tropicalis*.
- d. Koloni *C. krusei* muncul sebagai kerucut rendah berdiameter 4,5-5,0 mm dengan ujung *pseudohyphal*, memiliki permukaan yang kusam. Warna koloni pada dasar media adalah hijau biru di tengahnya yang semakin berkurang dalam intensitas pucat di tepi, permukaan berwarna hijau muda sampai hijau kuning.
- e. Koloni *C. parapsilosis* tampak seperti cembung sampai kerucut rendah berdiameter 3,5-4,5 mm dengan tepi yang halus atau sedikit menyebar, namun bervariasi dari permukaan halus ke permukaan granular atau kasar, pertumbuhan hanya di permukaan. Warna dasar dan permukaan koloni berwarna biru hijau, lebih kuat di dasar daripada permukaan yang terdapat film tipis keabu-abuan.
- f. Koloni *C. guilliermondii* muncul sebagai kerucut rendah berdiameter 4,0-5,0 mm dengan tepi yang sangat halus dan permukaan yang sangat *glossy*, kadang terdapat pertumbuhan bulu halus. Dasar dan permukaan koloni cenderung memiliki pusat biru dengan intensitas sedang yang memudar menjadi tepi yang

pucat, namun permukaannya mungkin berwarna biru hijau dengan bagian tengahnya yang keabu-abuan.

- g. Koloni *C. glabrata* halus dan cembung, diameter 4,6-5,0 mm, permukaannya berwarna hijau pucat di bagian tengahnya yang menjadi hijau muda di tepinya, dan dasarnya memiliki pola warna yang sama namun kurang intensitasnya.

3.9 Analisis data

Dari hasil identifikasi diperoleh data identifikasi morfologi koloni jamur, *germ tube*, klamidospora pada *slide culture*, serta ciri spesifik masing-masing spesies pada *Bromcresol green (BCG) agar base* yang dikumpulkan untuk mengetahui spesies *Candida* apa saja yang terdapat dalam masing-masing sampel ASD yang menjalani diet karbohidrat maupun sampel anak normal. Identifikasi spesies dilakukan seperti pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Analisis Data dan Identifikasi Spesies *Candida*

No.	Nama Spesies	Morfologi Koloni		<i>Germ Tube</i>	<i>Slide Culture</i>	<i>Bromcresol green agar (BCG)</i>
		Bentuk (oval-bulat, cembung)	Warna (putih kekuningan/krem, mengkilap)			
1.	<i>C. albicans</i>	+ (positif)	+ (positif)	+ (positif)	+ (positif)	Koloni kerucut tumpul dengan tepi halus dan berwarna kuning sampai biru
2.	<i>C. tropicalis</i>	+ (positif)	+ (positif)	+ (positif)		Koloni konveks dengan tepi bergelombang dan hijau kuning sampai hijau dengan dasar biru-hijau gelap
3.	<i>C. pseudotropicalis</i>	+ (positif)	+ (positif)			Bentuk cembung, koloni mengkilat dengan tepi halus dan warna hijau dengan tepi hijau muda
4.	<i>C. krusei</i>	+ (positif)	+ (positif)			Koloni berwarna merah muda dengan koloni kasar dan puncak merah muda sampai putih pucat
5.	<i>C. dubliniensis</i>	+ (positif)	+ (positif)	+ (positif)	+ (positif)	
6.	<i>C. parapsilosis</i>	+ (positif)	+ (positif)			Tepi halus atau sedikit menyebar, bervariasi dari permukaan halus ke permukaan granular atau kasar, pertumbuhan hanya di permukaan. Warna dasar dan permukaan koloni berwarna biru hijau di atas koloni banyak, lebih kuat didasar daripada permukaan yang dimofikasi oleh film tipis keabu-abuan
7.	<i>C. guilliermondii</i>	+ (positif)	+ (positif)			Tepi halus dengan permukaan <i>glossy</i> ,

						kadang terdapat pertumbuhan bulu halus. Dasar dan permukaan koloni cenderung memiliki pusat biru dengan intensitas sedang yang semakin ke tepi memudar, namun permukaannya mungkin berwarna biru hijau dengan bagian tengahnya keabu-abuan
8.	<i>C. glabrata</i>	+ (positif)	+ (positif)			Permukaannya hijau pucat dibagian tengah dan menjadi hijau muda di tepinya, dasarnya memiliki pola warna yang sama namun dengan intensitas yang rendah.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan berikut:

1. Pada kelompok subyek ASD diet karbohidrat terdapat 4 (30,77%) sampel yang positif dalam pemeriksaan morfologi koloni jamur, negatif *germ tube*, dan 1 (7,69%) sampel positif terdapat klamidospora. Sedangkan pada kelompok subyek normal terdapat 4 (30,77%) sampel yang positif dalam pemeriksaan morfologi koloni jamur, negatif *germ tube*, dan 1 (7,69%) sampel positif terdapat klamidospora.
2. Spesies yang didapatkan dari hasil identifikasi kedua kelompok subyek, baik kelompok ASD diet karbohidrat maupun kelompok normal yaitu 3 spesies. Spesies tersebut antara lain *C. glabrata*, *C. parapsilosis* dan *C. albicans*.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian adalah sebagai berikut:

1. Perlu adanya penambahan sampel untuk mendukung penelitian agar lebih representatif.
2. Perlu adanya penelitian kuantitatif lainnya terkait dengan jumlah koloni *Candida* yang ditemukan untuk menegaskan bahwa diet karbohidrat berpengaruh atau tidak pada penderita ASD.
3. Perlu percobaan lainnya untuk menegaskan perbedaan klamidospora *C. albicans* dan *C. dubliniensis* dengan waktu inkubasi yang lebih pendek.
4. Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang kepekaan tiap antijamur pada tiap spesies *Candida* sehingga terapi dengan antijamur pada penderita ASD akan lebih efektif.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, L., & Conn, S. 1997. Nutrition and Its Relationship to Autism. *Focus on Autism and Other Development Disabilities* 1. 12(1): 53-58.
- American Psychiatric Association. 2013. *Diagnostic-and-Statistical-Manual-of-Mental-Disorders-5th-Edition-DSM-5*. USA: American Psychiatric Publishing.
- Atlas, R. 2010. *Handbook of Microbiological Media*, Fourth Edition. Florida: CRC Press.
- Berardinelli, S. dan D. J. Opheim. 1985. New *Germ Tube* Induction Medium for the Identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 22(5): 861–862.
- Calderone, Richard A (editor)., & Clancy, Cornelius J (editor). 2002. *Candida and Candidiasis*, 2nd ed. United States of America.
- Cihlar, R. L., & Calderone, R. A. 2009. *Candida albicans Methods and Protocols*. New York, USA: Humana Press.
- Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. and Falkinham III, J. O. 1989. *Collins & Lyne's Microbiological Methods*. United States of America: Oxford University Press Inc.
- Gauch, L. M. R., S. S. Pedrosa, R. A. Esteves, F. Silveira-Gomes, E. S. C. Gurgel, A. C. Arruda, dan S. H. Marques-da-Silva. 2013. The Effect of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil on *Germ Tube* Formation in *Candida dubliniensis* Recovered from Denture Users. *Rev Pan-Amaz Saude*. 4(4): 43–47.
- Gottschall, E. 2004. Digestion-Gut-Autism Connection: The Specific Carbohydrate Diet. *Medical Veritas: The Journal of Medical Truth*. 1:261–271.
- Hapsari, F. D. P., & Kurniawan, A. 2014. Hubungan Antara Diet Bebas Gluten dan Kasein dengan Perilaku Hiperaktif Anak Autis. *Jurnal Ortopedagogia*. 1 (2), Juli 2014 :101-105.
- Herawati, R., Parwati, I., Sjahid, I., dan Rita, C. 2006. Hitung Koloni *Candida albicans* di Tinja Anak Gangguan Autism Spectrum. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*. 13(1), Nov. 2006: 4-8
- Jasaputra, D. K. 2006. Gangguan Sistem Imun pada Anak Autistik. *Jkm*. 2(2).
- Komariah & Sjam, R. 2012. Kolonisasi *Candida* dalam Rongga Mulut. *Majalah Kedokteran FK UKI*. 28(1).

- Kreger-van Rij, N. J. W. 1984. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Third Edition. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Kurtzman, C. P. dan J. W. Fell. 1998. *The Yeast a Taxonomic Study*, Fourth Edition. Amsterdam: Elsevier Science.
- Kurtzman, C., J. Fell, dan T. Boekhout. 2011. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Edisi kelima. San Diego: Elsevier Science.
- Mahon, C. R., Lehman, D. C., dan Manuselis, G. 2011. *Textbook of Diagnostic Microbiology Fourth Edition*. USA: W.B. Saunders Company.
- Martin, M. V. 1979. Germ-tube Formation by Oral Strains of *Candida Tropicalis*. *Jurnal Medical Microbiology*, 12.
- Mulyati, Wahyuningsih, R., Widiastuti dan Sjarifuddin, P. K. 2002. Isolasi Spesies *Candida* dari Tinja Penderita HIV/AIDS. *Makara, Kesehatan*. 6(2).
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., and Pfaller, M.A. 2007. *Manual of Clinical Microbiology*. Edisi Sembilan. Washington DC: ASM Press.
- National Institute of Mental Health. 2011. *A Parent's Guide to Autism Spectrum Disorder*. USA: NIMH.
- Prasad, R (editor). 2017. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed. Springer International Publishing AG.
- Ratnawati, H. 2012. Leaky Gut sebagai Penyebab Gangguan Gastrointestinal pada ASD. *JKM*. 2(2).
- Samaranayake, Lakshman. 2012. *Essential Microbiology for Dentistry fourth edition*. China: Elsevier Ltd.
- Sanjaya Y., Nurhaeni H. dan Halima, M. 2010. Isolasi, Identifikasi, dan Karakterisasi Jamur Entomopatogen dari Larva *Spodoptera litura* (Fabricius). *Bionatura-Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*. 12(3): 136 - 141
- Shah, N., Madhu, M. Sreenivasa, B. Hemanth, S. Mathew, dan N. Shruthi. 2016. Identification of Presence of *Candida albicans* in Primary Root Canal Infections : An In Vitro Study. *Endodontology*. 28(2):1 09–113.
- Staib, P. dan J. Morschha. 2006. Chlamyospore Formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* – An Enigmatic Developmental Programme. *Journal Compilation, Mycoses*. 50: 1–12.
- Tyasrini, E., Winata, T., dan Susantina. 2006. Hubungan antara Sifat dan Metabolit *Candida* spp dengan Patogenesis Kandidiasis. *JKM*. 6(1): 52 - 67.

Wignyanto dan Hidayat, N. 2017. *Bioindustri*. Malang: UB Press.

Yayasan Pembinaan Anak Cacat. 2012. *Buku Pedoman Penanganan dan Pendidikan Autisme*. Karang Anyar: YPAC.

Zimbro, D. A. P. dan M. Jo. 1998. *Difco Manual: Manual of Microbiological Culture Media*, Eleven Edition. USA: Difco Laboratories, Division of Becton Dickinson and Company. *Difco Laboratories, Division*.



LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Persetujuan (Informed Consent)

PERNYATAAN KESEDIAAN MENJADI RESPONDEN

(Informed Consent)

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama :

Usia :

Jenis kelamin :

Alamat :

Menyatakan telah mendengar penjelasan mengenai maksud dan tujuan penelitian yang berjudul **“Identifikasi Keberadaan Jamur *Candida* Pada Feses Anak *Autism Spectrum Disorder* (ASD) Yang menjalani Diet Karbohidrat”** yang dilakukan oleh :

Nama : Ulfatul Munawaroh

NIM : 142210101030

Fakultas : Farmasi

No. Hp : 082234123273

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2017. Dan untuk itu bersedia ikut serta dalam penelitian ini sesuai waktu yang ditentukan. Apabila ada hal-hal yang tidak berkenan selama penelitian saya dapat mengundurkan diri dan atau melaporkan hal tersebut pada yang bertanggung jawab dalam penelitian ini.

Surat kesediaan ini kami tandatangani tanpa paksaan dari pihak manapun atau dengan sukarela. Demikian pernyataan ini saya sampaikan untuk dapat dipergunakan sebaik mungkin.

Jember, Maret 2017

Mengetahui,

Penanggung jawab Penelitian

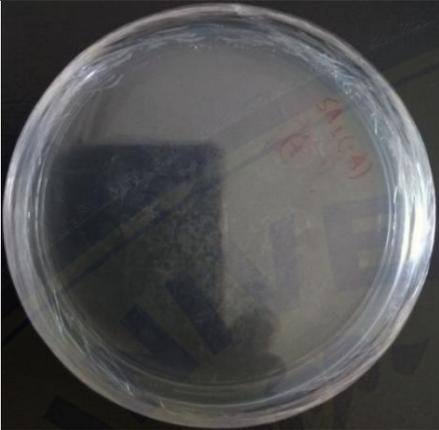
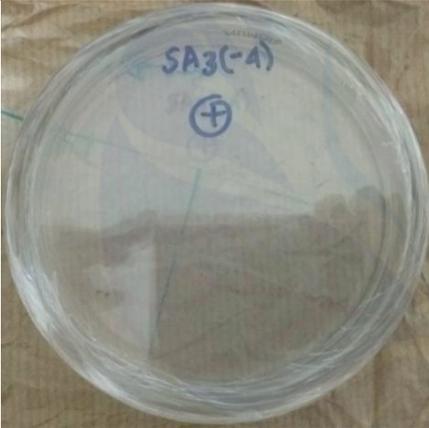
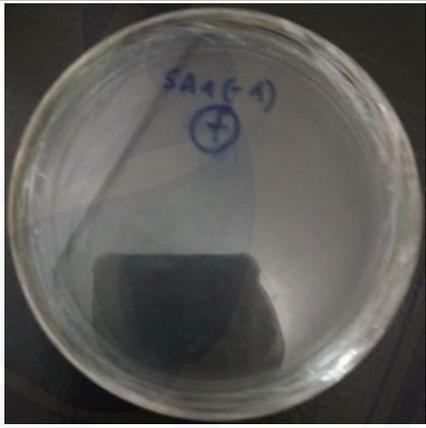
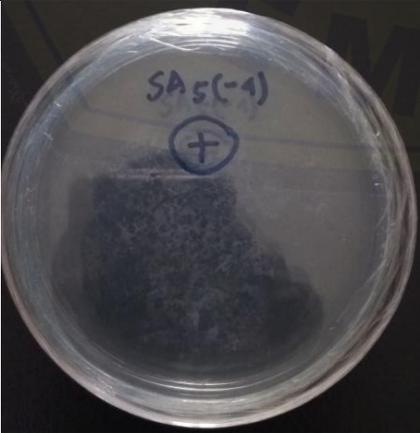
Peserta Penelitian

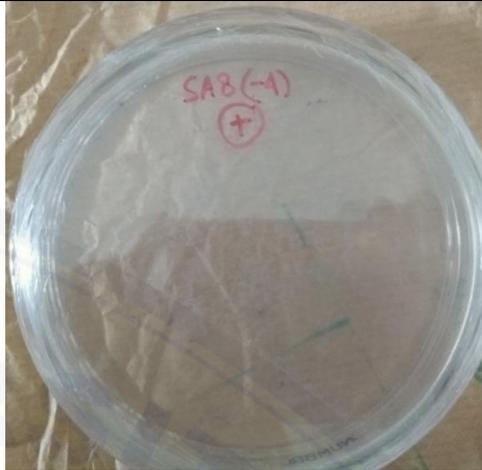
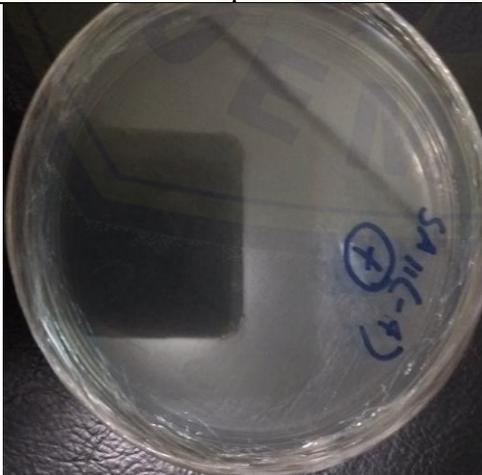
Ulfatul Munawaroh

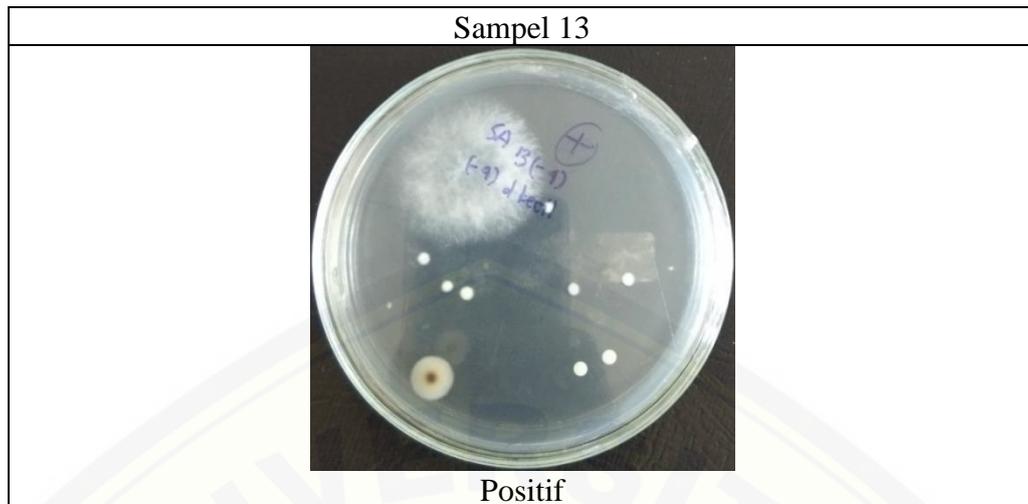
(.....)

Lampiran B. Hasil Identifikasi Sampel Anak ASD yang Menjalani Diet Karbohidrat

B1. Morfologi Koloni Jamur

<p>Sampel 1</p>  <p>Negatif</p>	<p>Sampel 2</p>  <p>Negatif</p>
<p>Sampel 3</p>  <p>Negatif</p>	<p>Sampel 4</p>  <p>Negatif</p>
<p>Sampel 5</p>  <p>Negatif</p>	<p>Sampel 6</p>  <p>Negatif</p>

<p>Sampel 7</p>  <p>Positif</p>	<p>Sampel 8</p>  <p>Negatif</p>
<p>Sampel 9</p>  <p>Positif</p>	<p>Sampel 10</p>  <p>Negatif</p>
<p>Sampel 11</p>  <p>Negatif</p>	<p>Sampel 12</p>  <p>Positif</p>



Keterangan :

Dinyatakan positif apabila tumbuh jamur dengan cirimorfologi berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung, halus, licin. Koloni *Candida* berwarna putih kekuningan (krim lembut) dan berbau khas (Kurtzman dkk., 2011).

Dinyatakan negatif apabila tumbuh jamur non *Candida* atau tidak terdapat pertumbuhan jamur.

B2. Germ Tube

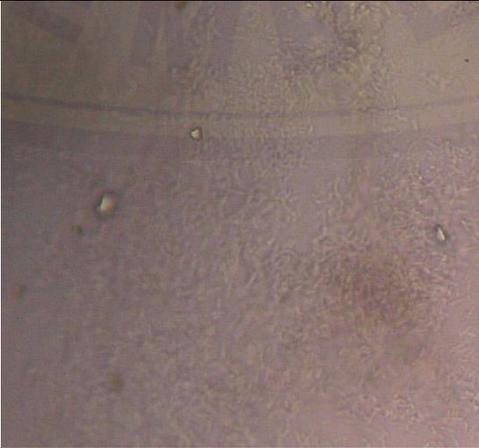
No. sampel	Germ tube	Hasil
1	Tidak dilakukan identifikasi	-
2	Tidak dilakukan identifikasi	-
3	Tidak dilakukan identifikasi	-
4	Tidak dilakukan identifikasi	-
5	Tidak dilakukan identifikasi	-
6	Tidak dilakukan identifikasi	-
7		Negatif
8	Tidak dilakukan identifikasi	-

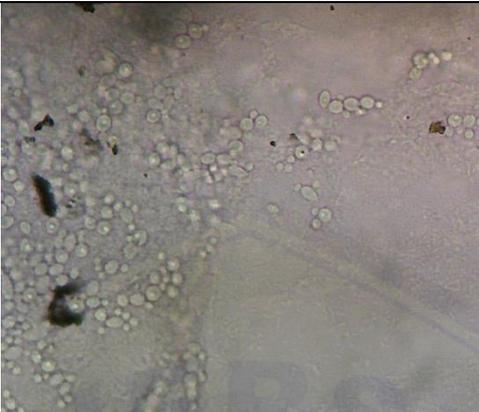
9		Negatif
10	Tidak dilakukan identifikasi	-
11	Tidak dilakukan identifikasi	-
12		Negatif
13		Negatif

Keterangan :

Dinyatakan positif apabila terdapat hifa pendek (filamen), terjadi perpanjangan lateral pada sel ragi tanpa adanya penyempitan dari bentuk awalnya. Sedangkan hasil dianggap negatif bila tidak terbentuk hifa (filamen). Isolat dinyatakan positif bila tumbuh *germ tube* dalam 1-3 jam pada suhu 37°C (Berardinelli dan Opheim, 1985).

B3. Slide Culture

No. sampel	Slide culture	Hasil
1	Tidak dilakukan identifikasi	-
2	Tidak dilakukan identifikasi	-
3	Tidak dilakukan identifikasi	-
4	Tidak dilakukan identifikasi	-
5	Tidak dilakukan identifikasi	-
6	Tidak dilakukan identifikasi	-
7		Negatif
8	Tidak dilakukan identifikasi	-
9		Negatif
10	Tidak dilakukan identifikasi	-
11	Tidak dilakukan identifikasi	-
12		Negatif

No.sampel	Slide culture	Hasil
13		Positif

Keterangan :

Dinyatakan positif apabila terjadi pembentukan klamidospora. Klamidospora *C. dubliniensis* lebih banyak daripada *C. albicans*, namun *C. dubliniensis* sering menghasilkan lebih dari satu terminal klamidospora dan filamennya lebih pendek daripada *C. albicans* (Staib dan Morschha, 2006).

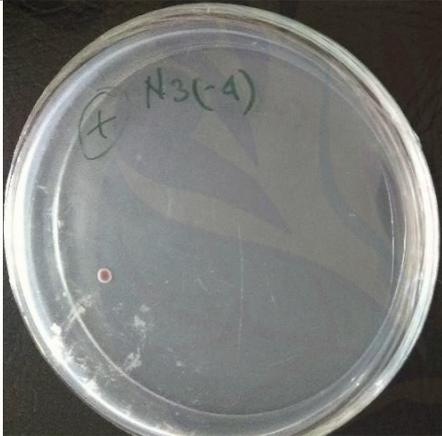
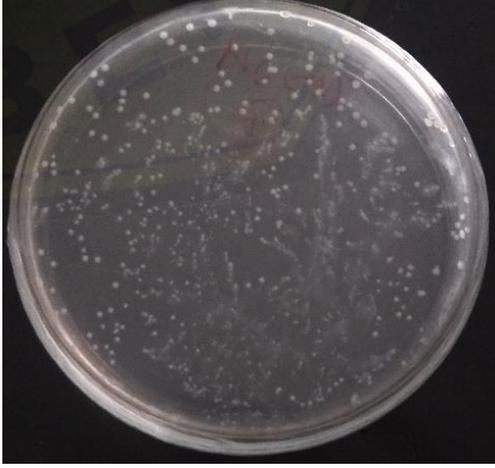
B4. BCG (*Bromcresol Green Agar Base*)

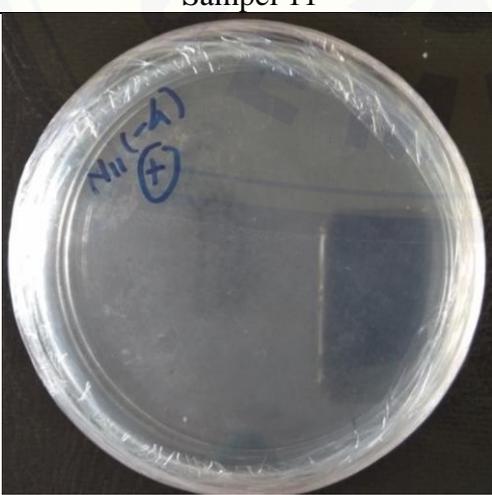
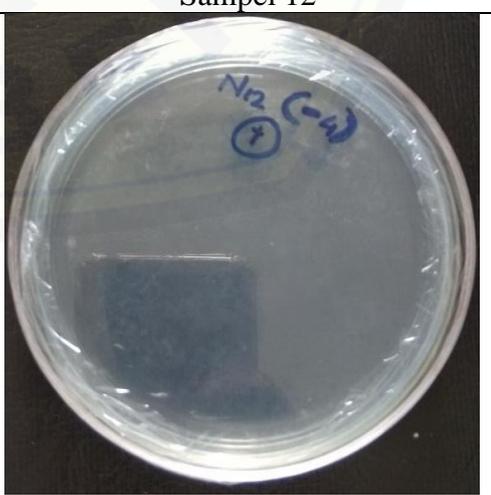
No. sampel	BCG (<i>Bromcresol Green Agar Base</i>)	Hasil
1	Tidak dilakukan identifikasi	-
2	Tidak dilakukan identifikasi	-
3	Tidak dilakukan identifikasi	-
4	Tidak dilakukan identifikasi	-
5	Tidak dilakukan identifikasi	-
6	Tidak dilakukan identifikasi	-
7		Koloni berwarna biru kehijauan, lebih dominan biru. Berbentuk kerucut rendah dengan tepi halus dan sedikit menyebar, permukaan halus (<i>C. parapsilosis</i>)
8	Tidak dilakukan identifikasi	

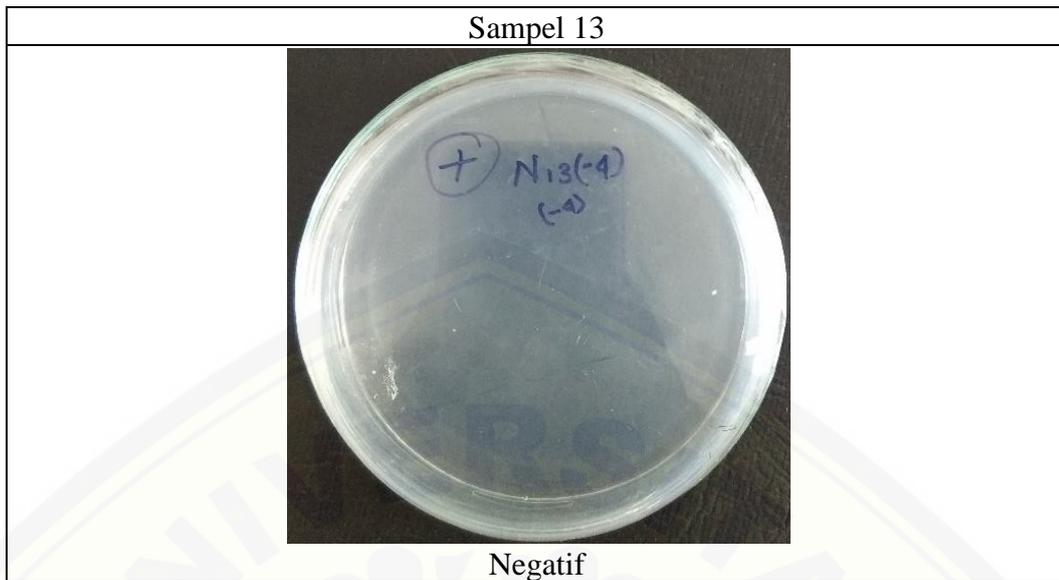
9		<p>Koloni berwarna biru kehijauan, lebih dominan biru. Berbentuk kerucut rendah dengan tepi halus dan sedikit menyebar, permukaan halus (<i>C. parapsilosis</i>)</p>
10	Tidak dilakukan identifikasi	-
11	Tidak dilakukan identifikasi	-
12		<p>Koloni berwarna biru kehijauan, lebih dominan biru. Berbentuk kerucut rendah dengan tepi halus dan sedikit menyebar, permukaan halus (<i>C. parapsilosis</i>)</p>
13		<p>Koloni berwarna kuning-hijau kebiruan. Berbentuk cembung dengan tepi dan permukaan halus (<i>C. albicans</i>)</p>

Lampiran C. Hasil Identifikasi Sampel Anak Normal

C1. Morfologi Koloni Jamur

<p style="text-align: center;">Sampel 1</p>  <p style="text-align: center;">Positif</p>	<p style="text-align: center;">Sampel 2</p>  <p style="text-align: center;">Negatif</p>
<p style="text-align: center;">Sampel 3</p>  <p style="text-align: center;">Negatif</p>	<p style="text-align: center;">Sampel 4</p>  <p style="text-align: center;">Positif</p>
<p style="text-align: center;">Sampel 5</p>  <p style="text-align: center;">Positif</p>	<p style="text-align: center;">Sampel 6</p>  <p style="text-align: center;">Negatif</p>

<p>Sampel 7</p>  <p>Negatif</p>	<p>Sampel 8</p>  <p>Negatif</p>
<p>Sampel 9</p>  <p>Negatif</p>	<p>Sampel 10</p>  <p>Positif</p>
<p>Sampel 11</p>  <p>Negatif</p>	<p>Sampel 12</p>  <p>Negatif</p>



Keterangan :

Dinyatakan positif apabila tumbuh jamur dengan cirimorfologi berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung, halus, licin. Koloni *Candida* berwarna putih kekuningan (krim lembut) dan berbau khas (Kurtzman dkk., 2011).

Dinyatakan negatif apabila tumbuh jamur non *Candida* atau tidak terdapat pertumbuhan jamur.

C2. Germ Tube

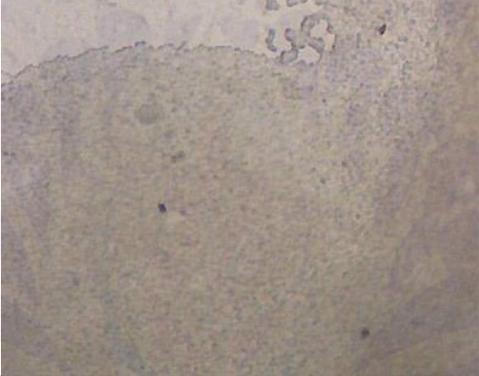
No. sampel	Germ tube	Hasil
1		Negatif
2	Tidak dilakukan identifikasi	-
3	Tidak dilakukan identifikasi	-

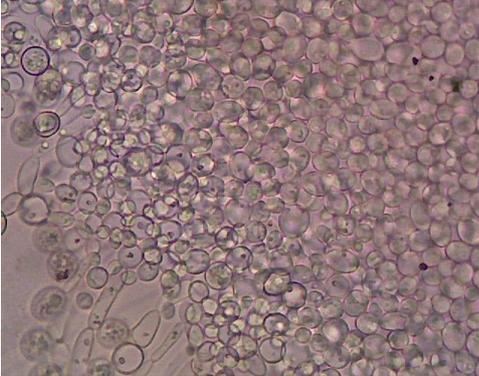
4		Negatif
5		Negatif
6	Tidak dilakukan identifikasi	-
7	Tidak dilakukan identifikasi	-
8	Tidak dilakukan identifikasi	-
9	Tidak dilakukan identifikasi	-
10		Negatif
11	Tidak dilakukan identifikasi	-
12	Tidak dilakukan identifikasi	-
13	Tidak dilakukan identifikasi	-

Keterangan :

Dinyatakan positif apabila terdapat hifa pendek (filamen), terjadi perpanjangan lateral pada sel ragi tanpa adanya penyempitan dari bentuk awalnya. Sedangkan hasil dianggap negatif bila tidak terbentuk hifa (filamen). Isolat dinyatakan positif bila tumbuh *germ tube* dalam 1-3 jam pada suhu 37°C (Berardinelli dan Opheim, 1985).

C3. Slide Culture

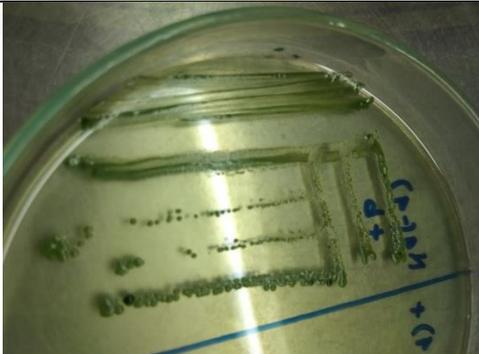
No. sampel	Slide culture	Hasil
1		Negatif
2	Tidak dilakukan identifikasi	-
3	Tidak dilakukan identifikasi	-
4		Negatif
5		Negatif
6	Tidak dilakukan identifikasi	-
7	Tidak dilakukan identifikasi	-
8	Tidak dilakukan identifikasi	-
9	Tidak dilakukan identifikasi	-

10		Positif
11	Tidak dilakukan identifikasi	-
12	Tidak dilakukan identifikasi	-
13	Tidak dilakukan identifikasi	-

Keterangan :

Dinyatakan positif apabila terjadi pembentukan klamidospora. Klamidospora *C. dubliniensis* lebih banyak daripada *C. albicans*, namun *C. dubliniensis* sering menghasilkan lebih dari satu terminal klamidospora dan filamennya lebih pendek daripada *C. albicans* (Staib dan Morschha, 2006).

C4. BCG (Bromcresol Green Agar Base)

No. sampel	BCG (Bromcresol Green Agar Base)	Hasil
1		Koloni berwarna biru kehijauan, lebih dominan biru. Tepi halus sedikit menyebar dengan permukaan halus (<i>C. parapsilosis</i>)
2	Tidak dilakukan identifikasi	-
3	Tidak dilakukan identifikasi	-
4		Koloni berwarna hijau muda, berbentuk cembung dengan tepi halus (<i>C. glabrata</i>)

5		Koloni berwarna kuning, berbentuk cembung dengan tepi dan permukaan halus (<i>C. albicans</i>)
6	Tidak dilakukan identifikasi	-
7	Tidak dilakukan identifikasi	-
8	Tidak dilakukan identifikasi	-
9	Tidak dilakukan identifikasi	-
10		Koloni berwarna kuning-hijau biru, berbentuk cembung dengan tepi dan permukaan halus (<i>C. albicans</i>)
11	Tidak dilakukan identifikasi	-
12	Tidak dilakukan identifikasi	-
13	Tidak dilakukan identifikasi	-