

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Kajian Teori

##### 1. Leukemia

###### a. Definisi Leukemia

Leukemia merupakan keganasan yang ditandai dengan infiltrasi sel proliferasi/sel-sel klonal yang tidak berdiferensiasi ke dalam darah, sumsum tulang dan jaringan lain (Longo, 2017; Larson, 2018). Proliferasi sel klonal mengakibatkan penumpukan sel di dalam sumsum tulang sehingga terjadi gangguan hematopoiesis dan trombopoiesis. Proliferasi sel imatur biasanya disertai dengan penurunan apoptosis (Wong *et al.*, 2010).

###### b. Definisi Leukemia Akut

Leukemia akut adalah proliferasi sel-sel imatur yang berasal dari sumsum tulang (sel *blast*) yang melibatkan darah perifer atau organ padat. Persentase sel-sel blast di sumsum tulang untuk mendiagnosis leukemia akut apabila didapatkan jumlah sel *blast* sebesar 20% atau lebih (Hamid, 2011).

###### c. Jenis Leukemia Akut

Penyebab perubahan proses pengaturan sel normal pada leukemia karena malfungsi genetik pada *hematopoietic stem cells* belum bisa dijelaskan secara pasti. Beberapa faktor risiko yang dapat menyebabkan leukemia antara lain; 1) paparan dari lingkungan seperti

radiasi, *benzene* dan pestisida; 2) sindrom genetik seperti sindrom *Down*, neurofibromatosis, anemia *Fanconi*, *ataxia telangiectasia*; 3) obat-obatan seperti inhibitor topoisomerase, *melphalan*, *nitrogen mustard*, *alkylating agents*; 4) gaya hidup; 5) obesitas; 6) autoimun; 7) infeksi HTLV-1 dan EBV; 8) riwayat keganasan hematologi (Prabhas, 2001; Davis *et al.*, 2014; Fiegl, 2016; Nayak *et al.*, 2017).

Berdasarkan kriteria WHO (2016), subklasifikasi leukemia akut didasarkan pada (1) morfologi; (2) sitokimia; (3) *immunophenotyping*; (4) sitogenetika; dan (5) genetika molekuler (Thomphon, 2014; Larson, 2018). *Acute lymphoblastic leukemia* (ALL) adalah kanker dengan insiden tinggi pada anak usia 1-4 tahun sebanyak 7,8 per 100.000 kasus per tahun dan 2,2 kasus per 100.000 pada anak usia 10-14 tahun (Coutre, 2014). *Acute myelogenous leukemia* (AML) lebih sering terjadi pada usia dewasa sekitar 80% (Larson, 2018; Marcucci and Bloomfield, 2017).

#### d. Terapi Leukemia Akut

Pemberian terapi pada leukemia meliputi kemoterapi, radiasi, antibodi monoklonal dan transplantasi sumsum tulang. Penekanan sistem imun oleh karena kemoterapi, transplantasi sumsum tulang atau kondisi leukemia itu sendiri merupakan risiko untuk terjadinya infeksi (Davis *et al.*, 2014). Efek sitotoksik kemoterapi pada pasien leukemia akut menyebabkan supresi sistem hemotopoeitik dan mengganggu mekanisme sistem pertahanan *host*. Supresi produksi netrofil

menyebabkan kondisi netropenia pada pasien leukemia akut setelah kemoterapi yang dapat meningkatkan risiko infeksi (Crawford *et al.*, 2004).

## 2. Kemoterapi pada Leukemia Akut

Pemberian kemoterapi pada pasien leukemia akut seri limfoid dibagi menjadi 3 fase pengobatan:

### a. Fase induksi

Pengobatan dimulai sejak minggu ke-0 sampai minggu ke-6. Sitostatika yang digunakan selama fase induksi yaitu prednison, *vincristine* (VCR), *L-Asparaginase* (L-Asp), Daunorubicin (DNR), *methotrexate* (MTX).

### b. Fase konsolidasi

Pengobatan dimulai sejak minggu ke-7 sampai minggu ke-12. Sitostatika yang digunakan MTX, leukovorin dan *mercaptopurine* (MP).

### Fase intensif/reinduksi

Pasien leukemia akut dengan tanda risiko tinggi, ditambahkan fase intensif selama 6 minggu. Sitostatika yang digunakan prednison, MTX, VCR, DNR, *cytarabine*.

### c. Fase rumatan (*maintenance*)

Pengobatan dimulai pada minggu ke-13 sampai minggu ke-110. Sitostatika yang digunakan MTX, VCR dan MP.

Pemberian kemoterapi pada pasien leukemia akut seri mieloid dibagi menjadi 2 fase pengobatan:

a. Induksi

Regimen 7+3 yaitu kombinasi daunorubicin secara intravena selama 3 hari dan dilanjutkan dengan *cytarabine* selama 7 hari. Pasien yang belum mencapai remisi komplit siklus kemoterapi diulang, setelah mencapai remisi komplit dilanjutkan dengan pemberian kemoterapi konsolidasi.

b. Konsolidasi

Setelah mencapai remisi komplit dilanjutkan dengan terapi konsolidasi. Sitostatika yang digunakan *cytarabine* selama 7 hari dengan DNR dilanjutkan midostaurin pada hari ke 8-21.

Pemberian kemoterapi bertujuan untuk menghambat pertumbuhan sel-sel kanker atau membunuh sel-sel kanker. Mekanisme kerja masing-masing obat kemoterapi berbeda-beda *vincristine* merupakan golongan *mitotic spindle* yang akan berikatan dengan protein mikrotubuler sehingga menyebabkan disolusi struktur *mitotic spindle* pada fase mitosis. *L-Asparaginase*, daunorubicin merupakan golongan anti tumor antibiotik yang menghambat sintesis DNA dan RNA. *Methotrexate*, leukovorin, *cytarabine* bekerja menghambat sintesis asam nukleat (Crawford *et al.*, 2004).

Pengobatan dengan rejimen induksi standar menyebabkan netropenia berkepanjangan hingga berminggu-minggu yang membuat *host* sangat

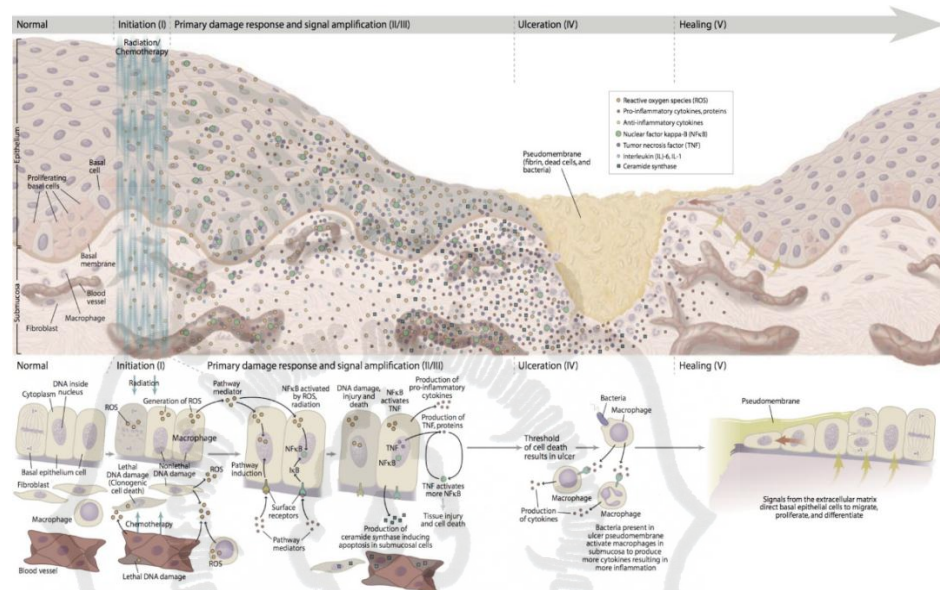
rentan terhadap infeksi bakteri dan jamur. Kondisi ini lebih sering timbul selama perjalanan pertama kemoterapi induksi dan berbanding lurus dengan durasi dan tingkat keparahan netropenia. Risiko infeksi berat berhubungan dengan derajat dan durasi netropenia, penggunaan kemoterapi dan paparan antibiotik sebelumnya. Risiko infeksi pasien leukemia akut tidak sepenuhnya berkurang setelah mencapai remisi karena pasien dapat memiliki cacat berkepanjangan dalam kekebalan humoral. Risiko ini meningkat lebih lanjut dengan kekambuhan penyakit (Chandran *et al.*, 2012).

### 3. Infeksi pada Leukemia Akut

Beberapa dekade terakhir, munculnya obat kemoterapi baru dan rejimen kemoterapi intens sebagai terapi lini pertama meningkatkan penyembuhan klinis leukemia. Tetapi kemoterapi yang bersifat sitotoksik memberikan efek samping kerusakan mukosa gastrointestinal, mielosupresi dan risiko tinggi untuk terjadinya netropenia. Netropenia merupakan kondisi yang memiliki efek merugikan pada integritas kulit dan mukosa manusia normal (Biswal *and* Godnaik, 2013).

Presentasi klinis infeksi ditentukan oleh interaksi yang kompleks antara patogen dan virulensi serta mekanisme pertahanan *host*. Hematopoiesis normal pada leukemia akut digantikan oleh maturasi abnormal dan proliferasi leukosit yang tidak teratur. Patogenesis kerusakan mukosa gastrointestinal tidak hanya melibatkan epitel, tetapi sel dan jaringan di dalam submukosa ikut terlibat. Sinyal kerusakan endotelium,

fibroblas, dan infiltrasi sel leukosit berkontribusi terhadap apoptosis, *loss of renewal*, atrofi, dan ulserasi (Chandran *et al.*, 2012).



Gambar 1. Patogenesis kerusakan mukosa gastrointestinal karena kemoterapi atau radioterapi (Cinausero *et al.*, 2017)

Terdapat 5 fase untuk menggambarkan kerusakan mukosa yaitu : inisiasi, pengaturan dan aktivasi yang mengarah pembentukan *massengers*, penguatan sinyal, ulserasi dengan peradangan, dan penyembuhan. Fase inisiasi dipicu oleh stres oksidatif dan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), kerusakan DNA langsung dan *non-DNA*, dan aktivasi respon imun bawaan. Setelah inisiasi, ROS dan respon imun bawaan semakin merusak membran sel, merangsang makrofag dan mengaktifkan beberapa faktor transkripsi. Faktor *Nuclear factor-kappa B* (NF-κB) memainkan peran penting. Ekspresi gen yang dimediasi NF-κB menghasilkan sitokin pro-inflamasi seperti *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), interleukin (IL) -6 dan IL-1b dan *cyclooxygenase-2* (COX- 2).



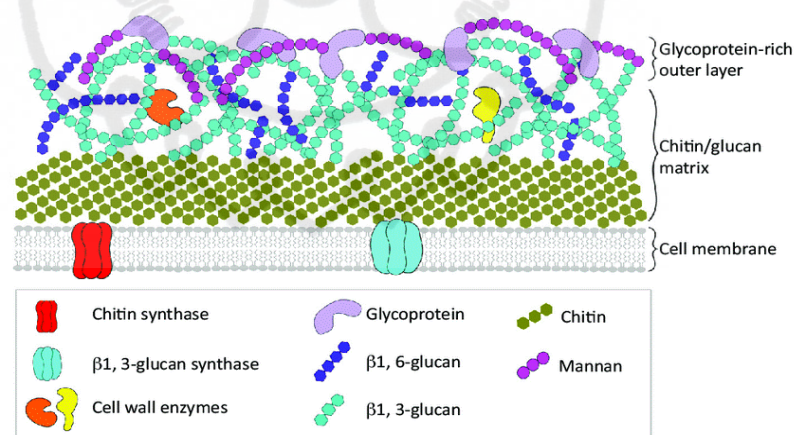
Regulasi gen-gen lain menyebabkan ekspresi molekul adhesi dan angiogenesis. Regulasi TNF menghasilkan umpan balik pada NF- $\kappa$ B dan memulai *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang menyebabkan aktivasi makrofag. Jalur independen NF- $\kappa$ B seperti jalur *ceramide* berperan dalam apoptosis sel submukosa dan epitel basal yang menyebabkan ulserasi mukosa (fase ulseratif) dan perubahan atrofi. Fase penyembuhan umumnya terjadi secara spontan dan ditandai oleh proliferasi, migrasi, dan diferensiasi epitel yang dirangsang oleh matriks ekstraseluler. Setelah fase penyembuhan, mukosa oral kembali normal, meskipun pasien memiliki risiko peningkatan episode peradangan mukosa karena sisa angiogenesis (Cinausero *et al.*, 2017).

Cedera pada kulit dan mukosa saluran pencernaan membuat pasien lebih rentan terhadap infeksi, yang disebabkan oleh flora endogen pasien sendiri. Selain itu, kondisi ini berisiko tinggi terhadap infeksi invasif karena bakteri, virus, dan jamur yang berkoloni ketika kondisi netropenia akan merusak aktivitas fagositik dari netrofil. Pasien *immunocompromised* seperti pasien keganasan yang menerima kemoterapi berisiko lebih tinggi untuk netropenia dan infeksi (Biswal and Godnaik, 2013). Komplikasi seperti itu memerlukan inisiasi terapi antimikroba dini. Netropenia mengubah respon peradangan *host*, sehingga membuat infeksi yang terjadi sulit dideteksi, konfirmasi bakteriologis infeksi biasanya sulit diperoleh, sementara kultur negatif tidak mengecualikan adanya infeksi (Biswal and Godnaik, 2013).

#### 4. Infeksi Jamur pada pasien Leukemia Akut

##### a. Definisi Jamur

Fungi atau jamur merupakan organisme eukariotik heterotrof, tumbuhan *thallophytic* yang tidak mengandung klorofil. Berdasarkan kemampuannya mendapatkan nutrisi, fungi dapat bersifat parasit, saprofit atau simbiosis. Dinding jamur terbungkus dalam dinding sel yang kaku, terutama terdiri dari polisakarida (glukan, *mannan*), *chitin* dan berbagai kombinasi glikoprotein yang penting yang menentukan bentuknya dan melindungi dari tekanan osmotik dan lingkungan (Richardson and Warnock, 2012; Geoghegan *et al.*, 2017).



Gambar 2. Dinding sel jamur (Geoghegan *et al.*, 2017)

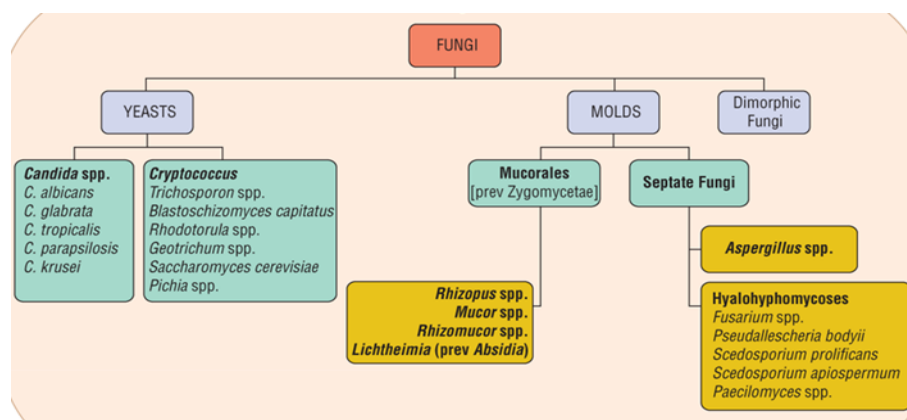
Jamur bersifat obligat aerob, beberapa fakultatif anaerob, semua jamur merupakan Gram positif. Jamur bersifat *chemotrophic* dengan menghasilkan enzim yang mensekresi dan degradasi berbagai macam substrat organik menjadi nutrisi yang dapat larut, kemudian secara pasif diserap atau dimasukkan ke dalam sel dengan transportasi aktif



(Berkowitz *and* Jerris, 2016). Jamur dapat bersifat uniseluler atau multiseluler *filamentous*, struktur filamennya berbentuk tabung, memanjang dan mirip benang disebut *hypha*. *Hypha* bisa tidak bersepta dan bersepta, dan septa diantara sel mempunyai pori yang berbeda; *micropore*, *simple pore* atau *dolipore*.

#### b. Patogenesis Infeksi Jamur pada Leukemia

Infeksi jamur disebut juga mikosis. Jamur penyebab mikosis dengan insiden tertinggi yaitu kandidiasis dan dermatofitosis yang merupakan bagian dari mikrobiota manusia normal dan mampu beradaptasi untuk bertahan hidup pada inang manusia. Mikosis dapat diklasifikasikan sebagai superfisial, subkutan, atau sistemik. Infeksi jamur superfisial terbatas pada lapisan paling luar dari kulit, kuku, rambut dan membran mukosa. Infeksi jamur subkutan mengenai lapisan kulit dermis, jaringan subkutan dan tulang yang penyebarannya berjalan lambat. Infeksi jamur sistemik dapat menyebar ke organ lain (Richardson *and* Warnock, 2012; Berkowitz *and* Jerris, 2016).



Gambar 3. Klasifikasi jamur (DiPiro *et al.*, 2012)

Mikosis sistemik dapat disebabkan oleh jamur endemik, yang biasanya merupakan patogen primer atau seringkali patogen oportunistik sekunder. Sebagian besar pasien dengan infeksi oportunistik memiliki penyakit yang mendasari. Infeksi jamur sering terjadi pada pasien dengan *immunocompromised* seperti pada pasien yang dipasang *central line*, pemberian terapi imunosupresi pada pasien transplan, pemberian terapi imunomodulator dan kemoterapi pada pasien-pasien kanker, artritis reumatik, penggunaan antifungi *azole* (Berkowitz and Jerris, 2016).

Sistem pertahanan awal tubuh terhadap jamur yaitu mukosa epitel sebagai *barrier* terhadap jamur. Jamur yang terdeteksi akan dihancurkan oleh mekanisme pertahanan *innate* yang dimediasi oleh sel-sel fagosit (netrofil, monosit, makrofag dan sel dendrit) dan opsonin melalui *pattern recognition receptors* (PRRs). Respon *innate* terhadap jamur melalui dua aktivitas utama yaitu aktivitas langsung efektor anti jamur melalui penghancuran patogen baik melalui proses fagositik atau sekresi senyawa mikrobisidal terhadap jamur yang tidak terfagosit dan peran menginstruksi sel-sel sistem imun adaptif, melalui produksi mediator proinflamasi, menginduksi aktivitas *co-stimulator* dan penangkapan antigen. Organisme infeksius yang dapat menembus pertahanan awal akan menstimulasi respons imun adaptif dengan menghasilkan sel T<sub>H</sub> spesifik antigen, sel T<sub>reg</sub>, dan sel B spesifik dan menginduksi sel-sel memori. Sel T akan melepaskan sitokin dan

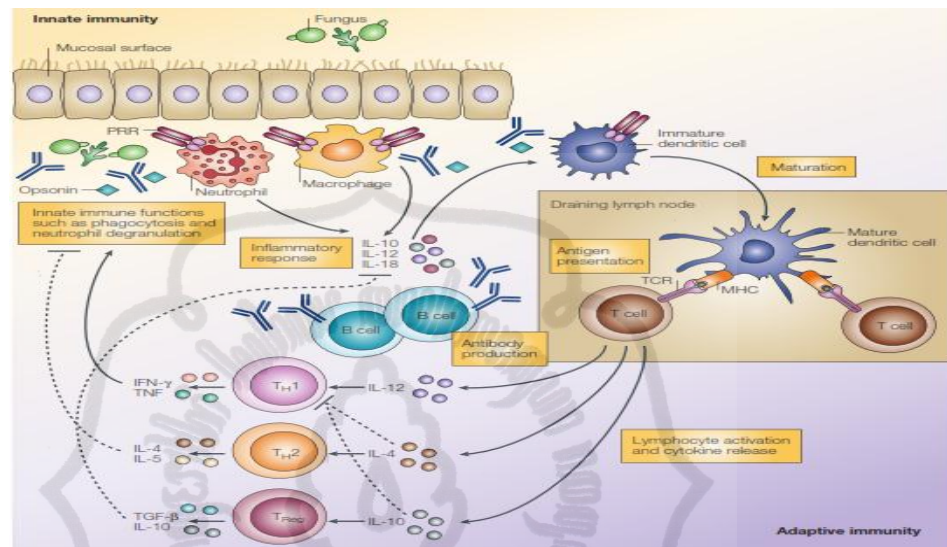
memberikan sinyal umpan balik yang aktif dan menghambat ke fagosit efektor (Romani, 2004).

Tabel 2. Klasifikasi mikosis dan jamur penyebabnya (Berkowitz *and* Jerris, 2016).

Category	Mycosis	Causative Fungal Agents
Superficial	<i>Pityriasis versicolor</i>	<i>Malassezia species</i>
	<i>Tinea nigra</i>	<i>Hortaea werneckii</i>
	<i>White piedra</i>	<i>Trichosporan species</i>
	<i>Black piedra</i>	<i>Piedraia hortae</i>
Cutaneous	<i>Dermatophytosis</i>	<i>Microsporum species, Trichophyton species, and Epidermophyton floccosum</i>
	<i>Candidiasis of skin, mucosa or nails</i>	<i>Candida albicans and other species</i>
Subcutaneous	<i>Sporotrichosis</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>
	<i>Chromoblastomycosis</i>	<i>Phialophora verrucosa, Fonsecaea pedrosoi and others</i>
	<i>Mycetoma</i>	<i>Pseudo boydii, Madurella mycetomatis and others</i>
	<i>Phaeohyphomycosis</i>	<i>Exophiala, Bipolaris, Exserohilum and other dermatiaceous molds</i>
Endemic (primary, systemic)	<i>Coccidioidomycosis</i>	<i>Coccidioides posadasii and Coccidioides immitis</i>
	<i>Histoplasmosis</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	<i>Blastomycosis</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
	<i>Paracoccidioidomycosis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Opportunistic	<i>Systemic candidiasis</i>	<i>Candida albicans and many other Candida species</i>
	<i>Cryptococcosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gatii</i>
	<i>Aspergillosis</i>	<i>Aspergillus fumigatus and other Aspergillus species</i>
	<i>Hyalohyphomycosis</i>	<i>Species of fusarium, Paecilomyces, Trichosporon and other hyaline molds</i>
		<i>Exserohilum and numerous other dermatiaceous molds</i>
	<i>Mucormycosis (zygomycosis)</i>	<i>Species of Rhizopus, Lichtheimia, Cunninghamella and other zygomycetes</i>
	<i>Pneumocystitis pneumonia</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
	<i>Penicilliosis</i>	<i>Penicillium marneffei</i>

Kemajuan dan perkembangan di bidang onkologi dan perawatan suportif menyebabkan meningkatnya angka *survival* pasien-pasien *immunocompromised* dengan keganasan hematologi. Pemberian antibiotik spektrum luas untuk infeksi bakteri menyebabkan infeksi

jamur menjadi penyebab utama peningkatan morbiditas dan mortalitas (Leventakos *et al.*, 2010).



Gambar 4. Immunopatologi pada infeksi jamur: sistem imun *innate* dan *adaptive* (Romani, 2004).

Pasien leukemia akut dalam kemoterapi terjadi pengurangan dalam jumlah netrofil absolut oleh karena kemoterapi pada awal pengobatan/ fase induksi (Prentice *et al.*, 2000) dan efek kemoterapi terjadi defek pada netrofil yang menyebabkan netrofil tidak berfungsi sebagai sel fagosit dalam sistem imun *innate*. Kondisi ini yang menyebabkan pasien leukemia akut setelah kemoterapi mengalami gangguan sistem imun (Romani, 2004). Netropenia yang lama dan berat (jumlah sel netrofil  $< 500$  sel/ $\mu$ L selama  $> 10$  hari berturut-turut) selama siklus induksi pertama, interval pendek antara episode netropenik, penggunaan immunosupresan (antibiotik dan kortikosteroid), penyakit *graft-versus-host*, infeksi sitomegalovirus, hiperglikemia, transplantasi

sumsum tulang, dosis tinggi *cytarabine* dan simpanan besi sumsum tulang tinggi merupakan faktor risiko IFI (Bhatt *et al.*, 2011; Teranishi *and* Ouchi, 2014).

Netropenia setelah pemberian kemoterapi pada pasien leukemia akut merupakan risiko terjadinya infeksi dan untuk pencegahan infeksi akan dilakukan pemberian antibiotik. Antibiotik yang tidak sesuai dan digunakan dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan perubahan stabilitas atau ketidakseimbangan mikrobiota (*dysbiosis*). Hal ini menyebabkan terjadi *overgrowth* dan kolonisasi mukosa saluran pencernaan oleh mikroba patogen (jamur). Akibat kolonisasi mukosa oleh jamur patogen terjadi kerusakan *barrier* mukosa saluran pencernaan dan hal ini memudahkan jamur berinvansi ke dalam sel dan pembuluh darah yang akan menyebabkan kondisi *disseminated diseases*. Pada kondisi ini dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas pasien leukemia akut paska kemoterapi (Biswal *and* Godnaik, 2013).

Infeksi jamur invasif telah terlibat sebagai komplikasi pada leukemia sejak 1940-an dan menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada pasien leukemia. Studi otopsi mengidentifikasi IFI sebagai penyebab demam persisten dan kematian pasien netropenia yang tidak responsif terhadap terapi antibiotik spektrum luas. Penggunaan terapi anti jamur empiris menyebabkan peningkatan kelangsungan hidup. Namun, seringkali sulit untuk mengkonfirmasi

diagnosis IFI. Pasien dengan demam persisten meski telah diberikan antibiotik spektrum luas perlu dicurigai IFI (Vidal *et al.*, 2013).

Tabel 3. Karakteristik kelompok berisiko terhadap IFI (Bhatt *et al.*, 2011)

---

**Low risk groups**

Autologous HSCT  
Childhood acute lymphoid leukemia (except for *Pneumocystis carii* pneumonia)  
Lymphoma

**Intermediate risk groups**

Low intermediate

Moderate neutropenia (ANC  $0.1-0.5 \times 10^9/L$ ) for < 3weeks  
Lymphocyte count  $< 0.5 \times 10^9/l$   
Antibiotics( e.g. trimethoprim- sulfamethoxazole)  
Older age  
Central catheter

High intermediate

Colonization at> 1 site or heavy colonization at 1 site  
Acute myeloid leukemia  
Total body irradiation  
Allogeneic matched sibling HSCT

**High risk groups**

Severe neutropenia (ANC)  $< 0.1 \times 10^9/l$  for > 3 weeks  
Colonization by *Candida tropicalis*  
Allogeneic unrelated HSCT or mismatched donor HSCT  
Graft versus host disease  
Moderate neutropenia( ANC  $< 0.5 \times 10^9/l$  for > 5 weeks  
Cortikosteroid  $> 1 \text{ mg/Kg}$  and mild neutropenia (ANC  $< 1 \times 10^9/l$ ) for >1weeks  
Cortikosteroid  $> 2 \text{ mg/Kg}$  for > 2 weeks  
High dose Cytarabine or fludarabine

---

Keterangan: HSCT, *hematopoietic stem cell transplantation*; ANC, *absolute neutrophil count*; L, liter ; mg, milligram; kg, kilogram

Penelitian di Italia, melihat kejadian IFI pada pasien leukemia dan menemukan bahwa IFI disebabkan oleh jamur dan ragi. Jamur spesies *Aspergillus* (90%) merupakan penyebab terbanyak sedangkan ragi disebabkan oleh spesies *Candida* (91%) (Pagano *et al.*, 2006). *Aspergillus* dan *candida* merupakan jamur terbanyak penyebab IFI. Saat ini, spektrum jamur penyebab IFI berubah dengan peningkatan frekuensi spesies jamur yang resisten. Perubahan tersebut karena



peningkatan penggunaan profilaksis antimikroba atau anti jamur *azole*, transplantasi sel induk darah perifer dan imunosupresan baru (Singh, 2001).

*Invasive candidiasis* (IC) paling sering mempengaruhi aliran darah. Penelitian Betts *et al.* (2006), dua puluh tujuh pasien netropenia yang mengalami IC, 93% menginfeksi aliran darah. Salah satu faktor risiko utama dalam patogenesis IC adalah kolonisasi di mukosa gastrointestinal dengan kerusakan mukosa akut yang disebabkan oleh obat sitotoksik. Faktor risiko lain seperti: netropenia, penggunaan terapi antibakteri spektrum luas, bakteremia, insufisiensi ginjal, lama tinggal di unit perawatan intensif, penerimaan nutrisi parenteral total dan prosedur bedah gastrointestinal (Bhatt *et al.*, 2011).

Patogenisitas *candida* dimediasi oleh sejumlah faktor virulensi yang memfasilitasi untuk berikatan dengan mukosa, kemampuan untuk menghindari pertahanan inang dan memproduksi enzim hidrolitik yang merusak jaringan. Kemampuan *candida* untuk berikatan dengan mukosa dan pembentukan *biofilm* merupakan faktor virulensi yang penting. Pembentukan *biofilm* dapat menyebabkan jamur resisten terhadap terapi anti jamur dengan membatasi penetrasi zat melalui matriks dan melindungi *candida* dari respon imun inang. Penghancuran jaringan oleh *candida* difasilitasi oleh pelepasan enzim hidrolitik seperti *secreted aspartil proteinases* (Saps), fosfolipase, lipase dan hemolisin (Murray *et al.*, 2009). *Candida* juga mempunyai kemampuan

untuk beralih bentuk. Transisi morfologis *candida albicans* terkait dengan *adhesi* pada sel epitel dan endotel, invasi oleh endositosis dan penetrasi mukosa, akuisisi zat besi, lepas dari fagositosis dan sistem kekebalan tubuh. Efek oksigen terhadap interaksi *host* dengan *candida* beragam seperti, perubahan transkripsi gen, biosintesis *heme* dan *ergosterol* dan perubahan dinding sel dan struktur membran (Murray *et al.*, 2009).

Tabel 4. Faktor-faktor risiko yang berhubungan dengan kejadian *invasive candidiasis* (Eggiman *et al.*, 2011)

Faktor-faktor risiko yang berhubungan dengan <i>invasive candidiasis</i>	
Kolonisasi pada beberapa tempat	Skor APACHE II > 20
Antibiotik spektrum luas	Central venous catheter
Imunosupresan	Candiduria > 10 <sup>5</sup> cfu/ml
Netropenia	Anak-anak dan lanjut usia
Luka bakar (> 50%)	Diabetes
Gangguan saluran pencernaan	Gagal ginjal
Operasi besar abdomen	Operasi berulang
Operasi saluran kemih	Kateter urin
Trauma berat (ISS>20)	Kateter vaskuler
Nutrisi parenteral	Rawat ICU yang lama(>7 hari)
Hemodialisa	Multiple transfusion

Keterangan: ISS, *Injury Severity Score*; APACHE, *acute physiology, age and chronic health evaluation*; CFU, *colony-forming unit*; ml, milliliter; ICU, *intensive care unit*.

#### c. Diagnosis infeksi jamur invasif

Keberhasilan diagnosis dan terapi terhadap infeksi jamur berdasarkan keberhasilan pemeriksaan laboratorium dalam mendeteksi jamur. Menurunkan kejadian IFI sangat penting, bergantung penegakkan diagnosis yang cepat dan spesifik, obat anti jamur yang efektif, kontrol infeksi dan sterilitas (Jarvis *et al.*, 2012). Kriteria diagnosis jamur invasif berdasarkan *European Organization for*

*Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) 2008, yaitu : (Pauw et al., 2008).*

#### *1. Proven*

- a) Adanya jamur pada pemeriksaan histopatologi, sitopatologi atau pemeriksaan mikroskop langsung pada spesimen yang diambil dari bagian tubuh yang normalnya steril melalui prosedur aspirasi jarum halus atau biopsi.
- b) Ditemukan pertumbuhan jamur pada kultur jaringan yang diambil melalui prosedur yang steril pada bagian tubuh yang normalnya steril dan pemeriksaan kultur jaringan ini diambil pada bagian tubuh yang secara klinis atau radiologis dicurigai terdapat infeksi jamur.
- c) Pemeriksaan kultur darah ditemukan pertumbuhan jamur.
- d) Pemeriksaan cairan otak didapatkan antigen kriptokokus.

#### *2. Probable*

Ditemukan adanya faktor pejamu, kriteria klinis dan kriteria mikologis.

#### *3. Possible*

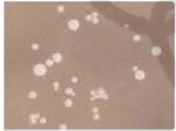
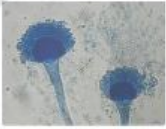

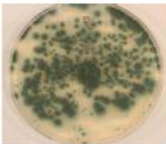
Hanya didapatkan adanya faktor pejamu dan kriteria klinis tanpa adanya kriteria mikologis.

Faktor pejamu meliputi: 1) adanya neutropenia ( $< 500$  neutrofil/mm<sup>3</sup>) selama  $> 10$  hari; 2) menerima transplantasi sel punca allogenik; 3) pemakaian steroid lama (minimal 0,3 mg/kg/hari prednison) selama  $> 3$  minggu; 4) pemakaian obat imunosupresan sel T selama 90 hari; 5) penyakit imunodefisiensi. Kriteria klinis meliputi: 1) infeksi jamur di saluran napas bawah, adanya 1 dari 3 tanda berikut pada pemeriksaan CT-Scan, yaitu kavitas, tanda *aircrescent* atau konsolidasi dengan atau tanpa tanda halo; 2) trakeobronkitis adanya ulserasi, nodul, pseudomembran, plak pada pemeriksaan bronkoskopik; 3) infeksi sinonasal, pada pemeriksaan pencitraan didapatkan tanda sinusitis, ditambah dengan adanya 1 dari 3 gejala berikut, yaitu nyeri akut yang terlokalisir, ulkus nasal dengan skar hitam atau adanya perluasan sinus paranasal menembus tulang; 4) infeksi sistem saraf pusat, adanya 1 dari 2 tanda berikut, yaitu terdapat lesi fokal pada pemeriksaan pencitraan atau adanya kelainan meningen pada MRI atau CT-Scan; 5) kandidiasis diseminata, adanya 1 dari 2 yaitu *bull's-eye lesion* pada hati atau limpa atau adanya eksudat progresif pada retina, yang ditemukan maksimal 2 minggu setelah episode kandidemia.

Kriteria mikologis meliputi: 1) pemeriksaan langsung (sitologi, mikroskopik langsung atau kultur); 2) pemeriksaan tidak langsung (deteksi antigen atau komponen dinding sel jamur).

#### d. Pemeriksaan Laboratorium Jamur

Pemeriksaan jamur dapat dilakukan dengan pemeriksaan 1) Mikrobiologi dengan mikroskopik langsung (pewarnaan Gram, Giemsa dan *calcofluor*), kultur dan identifikasi; 2) imunologi; 3) histopatologi dengan *hematoxylin and eosin* (H&E), *Gomori methenamine silver* (GMS), PAS, imunofluoresen, *in situ hybridization*; 4) molekuler dengan identifikasi, *strain typing*, *direct detection* (*nucleic acid amplification*); dan 5) biokimiawi dengan enzim, metabolit, komponen dinding sel (Murray *et al.*, 2009; Kozel and Wickes, 2014 ).

Yeasts	Dimorphic fungi	Molds
Unicellular organisms, which usually reproduce by budding	Exist as either yeast or mold forms and the change in form is usually related to temperature	Multicellular organisms, with hyphae, and they often produce specific spore-producing structures
Microscopic appearance (x 400 magnification)	Microscopic and cultural appearance depends on temperature: usually mold at 27°C and yeast or yeast-like at 37°C	Microscopic appearance (x 400 magnification)
		
Culture appearance		Culture appearance
		
Examples <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Malassezia</i> <i>Trichosporon</i>	Examples <i>Histoplasma</i> <i>Coccidioides</i> <i>Blastomyces</i> <i>Paracoccidioides</i>	Examples <i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> <i>Scedosporium</i> Mucoraceous molds Dermatophytes

Gambar 5. Gambaran mikroskopik dan makroskopik kultur jamur (Ashbee and Gilleece, 2014)

Pengecatan Gram dan Giemsa dapat mendeteksi jamur yang kemudian dilanjutkan dengan kultur jamur untuk mengetahui spesies jamur. Metode pengecatan potasium hidroksida (KOH) 10-20% merupakan metode pemeriksaan jamur yang paling lama. Pemeriksaan

imunologi jamur dengan mendeteksi antigen atau antibodi jamur. Mendeteksi antibodi dengan metode *immunodiffusion*, dan *complement fixation*. Galaktomannan (GM), 1-3- $\beta$ -D-glucan (BDG), *histoplasma antigen* dan *cryptococcal antigen* merupakan pemeriksaan non kultur untuk mendeteksi antigen (Ramanan *et al.*, 2017). Pemeriksaan molekuler mulai banyak dikembangkan dalam mendeteksi jamur (Ramanan *et al.*, 2017).

Infeksi jamur invasif jarang terdiagnosis pada awal infeksi, banyak ditemukan setelah kondisi pasien memburuk bahkan beberapa kasus terdeteksi pada saat otopsi. Gejala klinis pasien yang tidak khas, dibutuhkan waktu yang lama dalam pemeriksaan kultur jamur, terdapat beberapa jenis jamur tidak mudah tumbuh dan jarang berada di aliran darah, metode diagnostik lain seperti pencitraan atau histopatologi tidak sensitif dan tidak spesifik merupakan kendala teknis dalam penegakan diagnosis infeksi jamur (Wickes *and* Wiederhold, 2018).

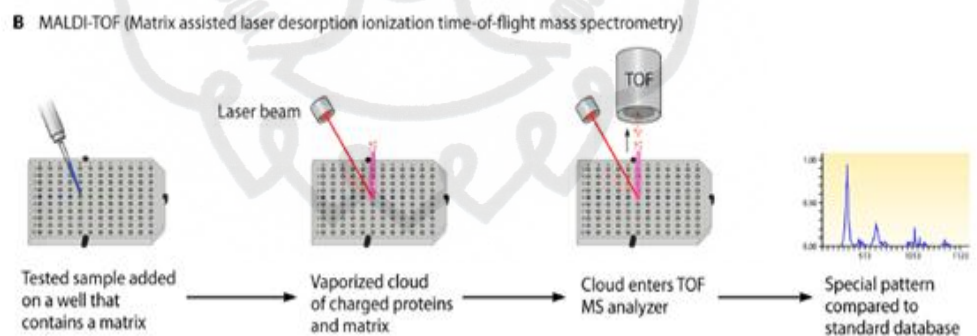
## 5. Pemeriksaan Kultur Jamur

Kultur merupakan *gold standard* untuk diagnosis infeksi jamur. Kelebihan kultur adalah dapat menemukan jamur penyebab jika hasil kultur positif dan bisa dilakukan uji sensitivitas anti jamur. Keterbatasan kultur antara lain membutuhkan waktu 24-72 jam untuk identifikasi jamur dalam sampel (Kozel *and* Wickes, 2014).

*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry assay* (MALDI TOF-MS) adalah metode identifikasi yang



*culture based*. Pemeriksaan ini menggunakan *mass spectrometry* untuk mengidentifikasi protein *fingerprint* berbagai mikroorganisme sampai ke genus, spesies bahkan strain (Hettick *et al.*, 2008). Metode ini dapat mendiagnosis *Candida* spp dan *Aspergillus* spp secara akurat dari hasil kultur positif dengan kesesuaian 90% dibandingkan metode konvensional (de Carolis *et al.*, 2012; Lacroix *et al.*, 2014). Penelitian Huang *et al.* (2013) pada 501 pasien bakteriemia dan candidemia memperlihatkan bahwa MALDI TOF bersama dengan *antimicrobial stewardship team* mampu menurunkan waktu identifikasi organisme, sehingga memperbaiki pemilihan antibiotika dan luaran (*outcome*) pasien (Huang *et al.*, 2013).



Gambar 6. Metode MALDITOF-MS (Hettick *et al.*, 2008)

Hasil kultur negatif jika tidak terdapat pertumbuhan koloni pada media *Sabouraud dextrose agar* setelah diinkubasi selama 5 hari. Hasil kultur positif jika terdapat pertumbuhan koloni yang kemudian dilanjutkan dengan identifikasi jamur menggunakan MALDI TOF MS yang akan menghasilkan pola grafik tertentu dan grafik tersebut akan dicocokkan dengan *database* sesuai dengan spesies tertentu.

## 6. *Polymerase Chain Reaction*

Tidak semua jamur patogen dapat tumbuh pada kultur dan tidak terdeteksi pada pemeriksaan serologi. Pemeriksaan PCR menggunakan primer sesuai organisme yang ingin dideteksi sehingga PCR dapat mendeteksi sebagian besar jamur patogen (Khot and Fredrick, 2009). *Polymerase chain reaction* merupakan suatu teknik sintesis amplifikasi nukleotida DNA secara *in vitro*. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya sehingga dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula (Yusuf, 2010).

Proses PCR meliputi 3 tahapan yaitu denaturasi DNA *template* (cetakan), penempelan (*annealing*) primer, dan polimerisasi (*elongation*) rantai DNA. Denaturasi merupakan proses pemisahan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal DNA. Proses denaturasi memerlukan pemanasan singkat pada suhu 90-95°C selama beberapa menit. Masing-masing untai tunggal DNA akan menjadi *template*, sebagai tempat penempelan primer dan tempat kerja DNA polimerase (Yusuf, 2010; Kubista *et al.*, 2006).

Tahap penempelan primer (*annealing*), setiap untai tunggal DNA *template* akan ditemplei pasangan primer. Setiap primer akan menuju ke daerah yang spesifik dan sesuai dengan urutan primernya. Masing-masing primer akan menempati ujung yang berbeda pada untai DNA. Pasangan primer akan membentuk ikatan hidrogen antara primer dengan urutan

yang sesuai pada *template*-nya. Selanjutnya adalah reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai, yang dilakukan pada suhu 72°C. Primer yang telah menempel akan mengalami perpanjangan pada sisi-sisinya dengan penambahan *deoksiribonukleotida trifosfat* (dNTP) yang sesuai dengan *template* oleh DNA *polimerase*. Siklus akan terjadi berulang-ulang dan daerah yang dibatasi oleh dua primer akan diamplifikasi secara eksponensial (Vasicek *et al.*, 2014; Yusuf, 2010).

Tabel 5. Skala referensi hasil pemeriksaan *real time* PCR dalam mengidentifikasi jamur (Anonim, 2016)

Sampel	Kontrol internal	Interpretasi
+	+	Positif
-	+	Negatif
-	-	Invalid

*Real-time* PCR menggunakan metode dasar PCR yang dapat mendeteksi dan mengukur hasil amplifikasi selama tiap siklus proses PCR (Kubista *et al.*, 2006). Metode deteksi jamur *real-time* PCR penelitian ini dengan primer ITS1 dan *real-time* PCR dengan *Sybr Green* dengan penambahan fluoresensi. Satu fragmen primer ITS F yaitu 5'-ATC GAT GAA GAA CGY AGC-3' dan ITS R yaitu 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3' (Valero *et al.*, 2016).

Hasil pemeriksaan didapatkan dalam bentuk kualitatif, yaitu positif atau negatif dan kontrol positif atau invalid (Anonim, 2016). Positif palsu dapat terjadi karena kontaminasi lingkungan seperti saat pengambilan, pemisahan dan penyimpanan sampel, saat ekstraksi DNA dan adanya *cross reactivity*/reaksi silang dari mikroorganisme lain. Negatif palsu

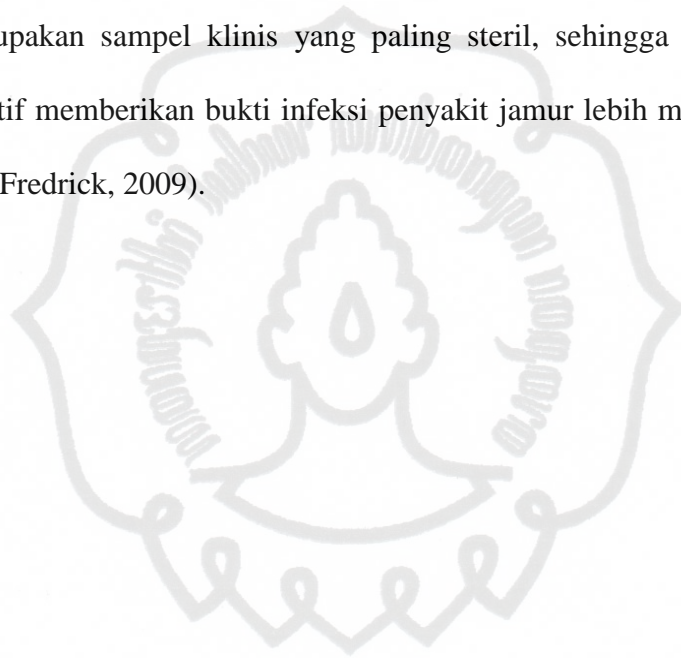
dapat terjadi karena sampel DNA sedikit, adanya inhibitor (immunoglobulin G, heme, DNA leukosit), proses ekstraksi yang tidak sesuai prosedur dan sensitivitas analitik yang tidak optimal (Khot and Fredricks, 2009).

Tabel 6. Kelebihan dan kekurangan beberapa metode pemeriksaan jamur (Beirao and Araujo, 2012)

Kultur	Galaktomannan	1-3- $\beta$ -D-glucan	<i>real time</i> PCR	Lain-lain
Kelebihan				
Sederhana dan murah	Metode non-invasif Berguna untuk diagnosis dini	Metode non-invasif Berguna untuk diagnosis dini	Metode non-invasif Berguna untuk diagnosis dini	CT <i>scan</i> dapat membantu diagnosis awal
Identifikasi jamur dan uji sensitivitas anti jamur	Sensitivitas dan spesifisitas tinggi untuk <i>mold</i> , khususnya <i>non Aspergillus fumigatus</i> spp	Cakupan luas untuk beberapa jenis jamur, dapat digunakan untuk skrining pasien	Cakupan luas untuk beberapa jenis jamur, dapat digunakan untuk skrining pasien	Histologi berguna untuk diagnosa
Tingkat isolasi yang tinggi terutama untuk <i>Fusarium</i> spp.		Berguna pada pasien dengan terapi anti jamur	Berguna pada pasien dengan terapi anti jamur	
			Mengidentifikasi spesies <i>mold</i> dan mengevaluasi sensitivitas molekuler	
Kekurangan				
Waktu yang di perlukan lebih lama		<i>Cross reaction</i> dengan bakteri strain tertentu	Mahal	CT <i>scan</i> bukan sebagai bukti penyakit jamur Histologi bersifat Invasif

Keterangan: PCR, *polymerase chain reaction*; CT, *computer tomography*.

Delapan penelitian melaporkan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik untuk diagnosis IFI menggunakan PCR pada sampel klinis manusia. Pemeriksaan PCR mendeteksi patogen baru yang sebelumnya tidak dilaporkan dan mengidentifikasi penyebab pada infeksi campuran, terutama ketika digunakan dengan tes genus spesifik lainnya. Darah merupakan sampel klinis yang paling steril, sehingga hasil PCR yang positif memberikan bukti infeksi penyakit jamur lebih meyakinkan (Khot and Fredrick, 2009).



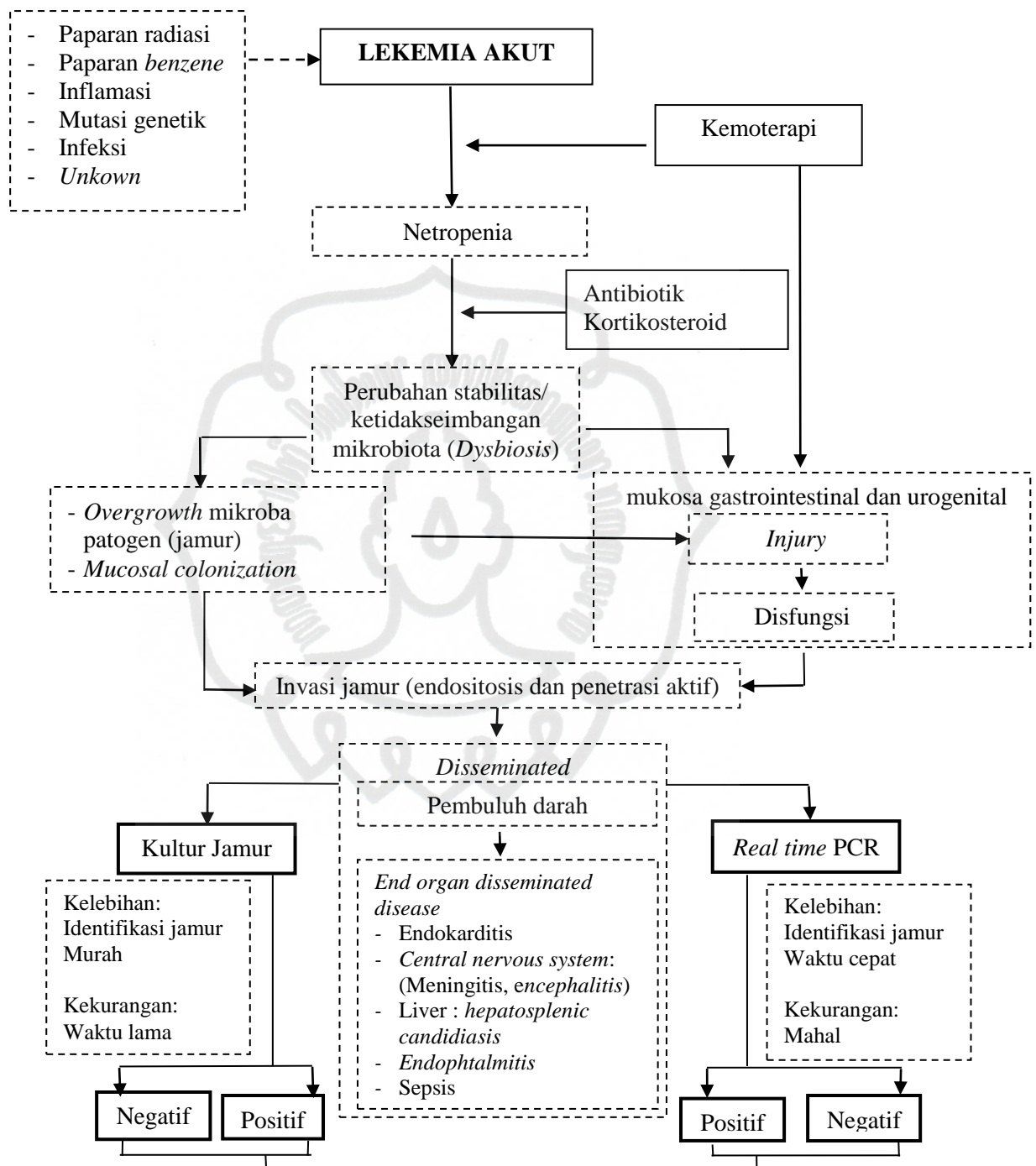
Tabel 7. Sensitivitas dan spesifisitas diagnostik PCR dalam mendiagnosis IFI (Khot *and* Fredrick, 2009).

Study(year), Ref	Clinical specimen	Study design	Extraction (Kit or fungal cell wall lysis)	Extraction (DNA purification)	PCR format	PCR target gene	Etiological pathogens	Patient (n)	Prv (%)	Sensitivitas	Specificity	PPV	NPV
Einsele (1997) [11]	Blood/ whole	Retrospective/ blinded	Heat-alkaline- enzymatic, anionic surfactant, proteinase K	Protein precipitation, alcohol precipitation	End point	18S rRNA	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i>	121	24.7	100	98	X	X
Loeffler (2000) [87]	Blood	Prospective/ blinded	Enzymatic, QIAmp (Qiagen, Germany)	tissue kit	Real time quantitative	18S rRNA	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i>	59	15.3	proven) 50/50 - (healthy controls)	9/9 + (histologically)	X	X
Hebart (2000) [78]	Blood	Prospective/ blinded	Enzymatic, anionic surfactant, proteinase K	Protein precipitation, alcohol precipitation Protein precipitation, alcohol precipitation or QIamp Tissue kit (Qiagen)	End point	18S rRNA	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i>	92	9.8	100	73	36.9	100
Jordanides (2005) [77]	Blood	Prospective/ blinded	Heat-alkaline- enzymatic, anionic surfactant	Protein precipitation, alcohol precipitation or QIamp Tissue kit (Qiagen)	Real time quantitative	18S rRNA	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i>	125	6.4	75	70	15	98
El-Mahallawy (2006) [88]	Blood/ serum	Prospective	Enzymatic, proteinase K, QIAmp minikit (Qiagen)		End point	18S rRNA	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>	91	7.8	75 (55–87)	92 (80–97)	84 (63– 95)	87 (74–94)
Ribeiro (2006) [89]	Blood/ whole	X	Anionic surfactant, proteinase K, enzymatic, DNAzol BD reagent (Gibco, Renfrewshire, UK)		End point	18S rRNA	<i>Aspergillus</i>	193	7.8	75	91.1	X	X
Lau (2007) [76]	Tissue samples	X	Paraffin wax removal, proteinase K, MagNAPure LC DNA isolation kit II Tissue (Roche Diagnostics)		End point	ITS1	<i>Broad range</i>	74	X	93.6 (culture) and 64.3 (histology)	18/18 – (no IFD controls)	X	X
Badiee (2009) [90]	Blood	Prospective	Enzymatic, proteinase K, QIAmp minikit (Qiagen)		End point	ITS	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i>	310	10.6	84.6	92.7	75.3	95.8

Keterangan: DNA, *deoxyribonucleic acid*; rRNA, *ribosome ribonucleic acid*; PCR, *polymerase chain reaction*; Prv, *prevalence of rule violations*; PPV, *positive predictive value*; NPV, *negative predictive value*; ITS, *internal transcribed spacer*.



## B. Kerangka Teori



Gambar 7. Kerangka teori

Keterangan:   
 —————> Hubungan secara langsung  
 - - - - -> Hubungan dengan faktor lain yang mempengaruhi  
 [ ] Tidak diteliti  
 [ ] Diteliti

### C. Hipotesis

*Real time* PCR mempunyai sensitivitas dan spesifisitas minimal 85 % untuk mendeteksi infeksi jamur pada pasien leukemia akut dengan kemoterapi dengan kultur jamur sebagai *gold standard*.

