

HITUNG KOLONI *Candida Albicans* DI TINJA ANAK GANGGUAN AUTISM SPECTRUM

(Colony Count *Candida Albicans* of Stool in Autism Spectrum Disorders)

R. Herawati, I. Parwati, I. Sjahid, C. Rita

ABSTRACT

Candida albicans is part of the normal flora of the digestive tract, however in immunocompromised host can cause opportunistic infection. According to Shaw's case series study in North Carolina USA, colonization of *C. albicans* is increased in autism spectrum disorders (ASD) patients. *C. albicans* is a dimorphism fungus, the yeast phase is grown at 37 °C and the mould phase is grown at room temperature. The aim of this study was to compare *C. albicans* colony count in stools of ASD patients and normal children, and to find correlation between *C. albicans* colony count and state of ASD. A cross sectional study was conducted from December 2004 to March 2005 on 50 ASD patients and 50 normal children as controls. Diagnosis of ASD was based on the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) IV criteria. The range of age in both groups was 2 to 6 years old. Stool specimens were collected in Sachs transport media. All specimens were examined in the Division of Infectious and Tropical Medicine, Department of Clinical Pathology RSHS/FKUP Bandung. The specimens were examined microscopically and cultured on Sabouraud dextrose agar incubated at room temperature and 37 °C. The colonies were interpreted in colony forming unit (CFU). The *C. albicans* was identified by colony microscopic examination and germ tube test. The differences of *C. albicans* colony count between ASD and normal subject were analyzed by t-test. Correlation between colony count *C. albicans* and ASD state was analyzed using point biserial correlation. Of 50 subjects, 14 (28%) were diagnosed as pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDD-NOS) and 36 (72%) were diagnosed as autistic disorders. There were no significant statistical differences between ASD and normal subjects in age, sex, and nutritional status ($p > 0.05$). A significant correlation between direct microscopy and the result of *Candida* colony count was found ($p = 0.0000$). We did not find a significant difference between the two temperature of incubations ($p = 0.390$). Mean of *C. albicans* colony count in normal subjects was 4 CFU. In contrast, the mean of *C. albicans* colony count in ASD subjects was 39 CFU. The mean *C. albicans* colony count in ASD subjects was significantly higher than normal subject ($p = 0.012$). There was a significant correlation between *C. albicans* colony count and the state of ASD (Rpb0.253372; $p = 0.0106$) : *C. albicans* colony count from stool of ASD subjects was significantly higher than normal subjects. We also found a significant correlation between *C. albicans* colony count and the state of ASD.

Key words: *Candida albicans*, ASD, colony count

PENDAHULUAN

Candida albicans pertama kali ditemukan oleh Robin pada tahun 1853 yang disebut *Oidium albicans*, sedangkan nama *Candida albicans* baru diperkenalkan pada tahun 1923 oleh Berkhout. Pada tahun 1982 Preuseer menemukan bahwa *C. albicans* merupakan jamur dimorfik yaitu jamur yang mempunyai dua bentuk atau lebih. Yaitu bentuk *yeast* dapat tumbuh optimal pada suhu 37 °C, sedangkan bentuk *mold* tumbuh optimal pada suhu kamar. Temuan ini mengawali penelitian selanjutnya tentang sifat, virulensi, dan identifikasi *C. albicans*.¹⁻³

C. albicans pada dasarnya merupakan mikroorganisme yang bersifat komensal untuk binatang dan manusia. Koloni *C. albicans* dapat ditemukan sebagai flora normal di mukosa saluran pencernaan, mukosa mulut, dan vagina. Tetapi *C. albicans* dikelompokkan ke dalam fungi yang berpeluang (oportunistik) dan nosokomial, karena

dapat menyebabkan infeksi terutama defisiensi imun pada pasien.^{1,4,5}

Kasus infeksi yang disebabkan oleh *Candida* meningkat dalam dua dekade terakhir dan 70–80% disebabkan oleh *C. albicans*. Kasus infeksi yang meningkat berhubungan dengan penggunaan antibiotik spektrum luas dan peningkatan kasus defisiensi imun. Pada perseorangan normal dengan keadaan gizi baik, umumnya infeksi *C. albicans* dapat diatasi oleh rintangan epitel dan sel fagosit. Namun, pada perseorangan dengan kekurangan kekebalan (defisiensi imun) dapat mengalami peningkatan pengkolonian *C. albicans* di traktus gastrointestinal dengan atau tanpa gejala klinis, selanjutnya dapat berkembang menjadi infeksi invasif.^{1,3,6}

Pengkolonian *C. albicans* dapat terjadi di lambung, membran mukosa duodenum, dan kolon. Pengkolonian dan penyerbuan (invasi) di lambung dan membran mukosa intestinum dapat dikenali dengan pemeriksaan tinja. Akhir-akhir ini diketahui, terdapat peningkatan pengkolonian *C. albicans* di traktus gastrointestinal penyandang *autism spectrum disorders* (ASD). Gupta melaporkan bahwa 60–70% penyandang ASD, mengalami gangguan kekebalan

* Bagian Patologi Klinik FK UNPAD/RS. Hasan Sadikin Bandung, Dr. Ida Parwati dr,SpPK email: pung@bdg.centrin.net

(imun) dan diduga *C. albicans* dapat memperberat gejala klinis kelainan tersebut.⁷⁻¹⁰

Autisme telah dipublikasikan oleh Dr. Leo Kanner pada tahun 1943,¹¹ walaupun demikian pengetahuan dan penelitian kelainan ini masih sangat terbatas. Autisme adalah gangguan perkembangan neurobiologis yang berat, dapat terjadi pada anak kurang dari tiga tahun. Kelainan ini ditandai oleh gangguan: interaksi sosial, komunikasi, disertai aktivitas dan minat yang terbatas dan perilaku yang diulang-ulang. Gangguan yang terjadi dapat beragam, mulai dari yang ringan sampai berat sehingga gangguan ini dikenal sebagai *autism spectrum disorders*.¹¹⁻¹⁵ Penelitian pada 3 kasus yang dilakukan oleh Shaw⁸ melaporkan bahwa peningkatan pengkolonian *C. albicans* dapat terjadi pada ASD.^{7,8}

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas penulis tertarik untuk meneliti perbedaan hitung koloni *C. albicans* pada bahan pemeriksaan tinja anak penyandang ASD dibandingkan dengan anak normal dan juga untuk mengetahui hubungan antara hitung koloni *C. albicans* dan keadaan ASD.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan Desember 2004 sampai bulan Maret 2005. Penelitian ini merupakan penelitian kerat lintang (*cross sectional*).

Populasi penelitian ialah 50 orang anak penyandang ASD yang didiagnosis berdasarkan kriteria DSM IV, sebagai pembandingan ialah 50 orang anak normal.

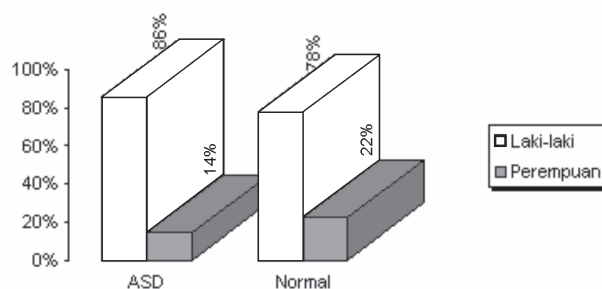
Kedua kelompok subjek penelitian berumur antara 2-6 tahun. Bahan pemeriksaan (BP) adalah tinja dengan media transport *Sach*. BP diperiksa di Subbagian Infeksi dan Penyakit Tropik Bagian Patologi Klinik RSHS/FKUP Bandung.

Tinja diperiksa dengan dua cara yaitu melalui pemeriksaan mikroskopik langsung pewarnaan *methylene blue* dan pemeriksaan biakan jamur pada agar *Sabouraud* yang di inkubasi pada suhu kamar dan 37 °C. Pemeriksaan pertumbuhan jamur dilakukan dengan cara menghitung koloni dengan satuan *coloni forming unit* (CFU). Identifikasi *C. albicans* digunakan pemeriksaan mikroskopis koloni dan uji *germ tube*. Analisis statistik untuk

menguji perbedaan antara kasus dan pembandingan menggunakan uji t. Uji korelasi antara hitung koloni *C. albicans* dan keadaan ASD, dianalisis menggunakan rumus *point biserial correlation*.^{16,17}

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 50 orang subjek penelitian kelompok anak ASD, 14 orang anak (28%) didiagnosis PDD-NOS dan 36 orang (72%) *autistic disorders*. Karakteristik umur, jenis kelamin, dan status gizi pada kedua subjek penelitian tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Perbandingan jenis kelamin subjek penelitian kelompok anak ASD, antara laki-laki dan perempuan pada penelitian ini adalah 6:1. Terdapat hubungan (korelasi) yang bermakna antara pemeriksaan mikroskopik langsung dan hasil hitung koloni biakan jamur. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara hitung koloni *C. albicans* dibiakan suhu kamar dan 37 °C, uji t pada subjek penelitian kelompok ASD ($p = 0,390$) dan pada kelompok anak normal ($p = 0,126$). Rerata hitung koloni jamur *C. albicans* dari bahan pemeriksaan tinja subjek penelitian kelompok anak normal adalah 4 CFU. Rerata hitung koloni biakan *C. albicans* kelompok anak ASD adalah 39 CFU. Rerata hitung koloni biakan *C. albicans* pada subjek penelitian kelompok anak ASD lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok anak normal, $p = 0,012$. Terdapat korelasi yang bermakna antara hitung koloni jamur *C. albicans* dan keadaan ASD ($R_{pb} = 0,253372$; $p = 0,0106$).



Gambar 1. Persentase jenis kelamin subjek penelitian kelompok anak ASD dan anak normal

Tabel 1. Karakteristik umur subjek penelitian (dalam bulan)

Kelompok	n	Rentang	Rerata	Median	SB
ASD	50	26-72	55,10	58,50	14,90
Normal	50	24-72	55,88	62	14,59
<i>p-value</i>			$P = 0,792$	$P = 0,317$	$P = 0,744$

Keterangan: ASD : *autism spectrum disorders* SB : simpangan baku

Tabel 2. Karakteristik status gizi subjek penelitian

Status Gizi	Anak ASD	Anak Normal	p-value
Tinggi badan			
Rentang	86–125	85–115,5	0,558
Rerata	105,16	104,13	
SB	9,8842	7,462	
Median	105,25	106,25	0,689
Berat badan			
Rentang	11–35	11–25	0,878
Rerata	16,92	17,03	
SB	3,8655	3,2363	
Median	17	17	0,542
Status gizi normal			
Persentasi	88%	90%	0,118
Rentang	90,2–143,4	90,3–133,6	
Rerata	97,8227	101,3511	
SB	9,0431	11,8479	0,167
Median	94,75	96,9	
Status gizi KEP I			
Persentasi	12%	10%	0,807
Rentang	82,8–88,8	83,8–88,2	
Rerata	86,3833	86,7	
SB	2,248	1,8547	0,376
Median	86,4	87,3	

Keterangan :

ASD : *autism spectrum disorders*

KEP I : kurang energi protein I (80–90% NCHS)

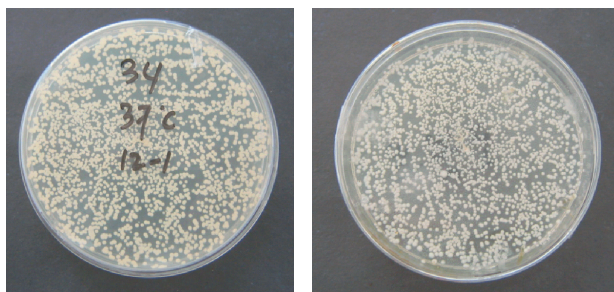
SB : simpangan baku

Tabel 3. Pemeriksaan mikroskopik langsung genus *Candida* pada subjek penelitian kelompok anak ASD dan anak normal

Σ budding <i>Candida</i> / lp	Normal Anak		ASD Anak		p-value
	n	%	n	%	
0	21	42	0	0	0,0000
< 5	13	26	23	46	0,0372
≥ 5	16	32	27	54	0,0263
Σ	50	100	50	100	

Keterangan:

lp : lapang pandang pemunculan minyak (emersi)



A

B

Gambar 2. Morfologi *C. Albicans*

Keterangan : A = biakan diinkubasi pada suhu 37 °C

B = biakan diinkubasi pada suhu kamar

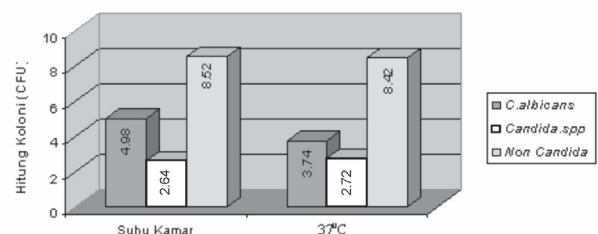
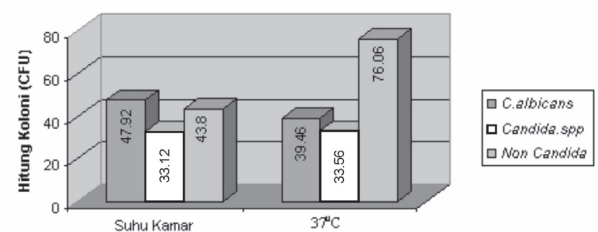
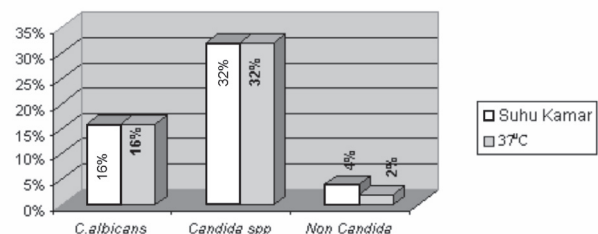
Tabel 4. Hitungan koloni jamur subjek penelitian dalam satuan *Colony Forming Unit* (CFU)

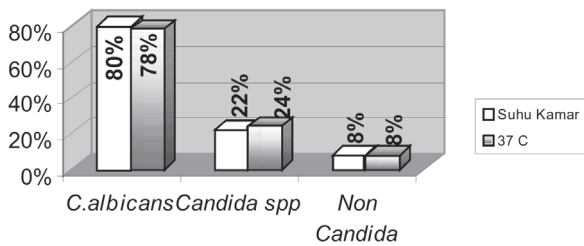
Subjek	Jamur	Suhu inkubasi	n	Rentang	Rerata
Normal	<i>C. albicans</i>	Suhu kamar 37 °C	50	0–163	4,98
			50	0–130	3,74
	<i>Candida spp</i>	Suhu kamar 37 °C	50	0–41	2,64
			50	0–29	2,72
	<i>Non Candida</i>	Suhu kamar 37 °C	50	0–422	8,52
			50	0–421	8,42
ASD	<i>C. albicans</i>	Suhu kamar 37 °C	50	0–775	47,92
			50	0–531	39,46
	<i>Candida spp</i>	Suhu kamar 37 °C	50	0–1371	33,12
			50	0–1434	33,56
	<i>Non Candida</i>	Suhu kamar 37 °C	50	0–1730	43,8
			50	0–2166	76,06

Keterangan:

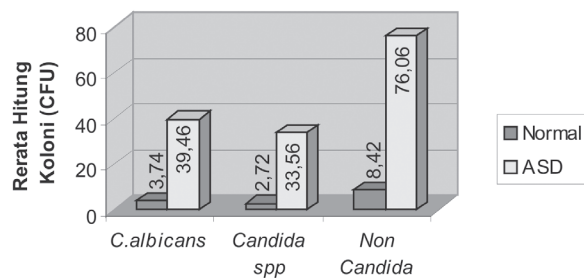
ASD : *autism spectrum disorders*

n : jumlah subjek penelitian

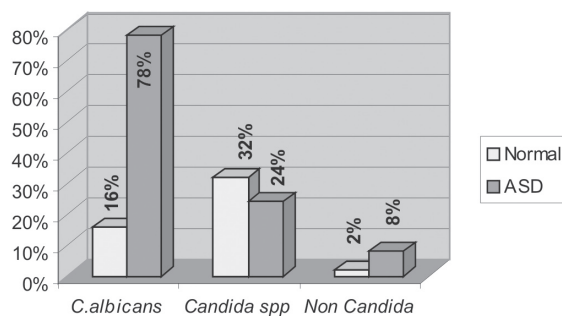
**Gambar 3.** Perbandingan rerata hitungan koloni biakan jamur pada subjek penelitian kelompok anak normal antara suhu kamar dan suhu 37 °C**Gambar 4.** Perbandingan rerata hitungan koloni biakan jamur pada subjek penelitian kelompok anak ASD antara suhu kamar dan suhu 37 °C, dalam satuan CFU**Gambar 5.** Perbandingan hitungan koloni jamur antara biakan suhu kamar dan suhu 37 °C pada subjek penelitian kelompok normal



Gambar 6. Perbandingan hitungan koloni jamur antara biakan suhu kamar dan suhu 37 °C pada subjek penelitian kelompok anak ASD



Gambar 7. Perbandingan rerata hitungan koloni jamur antara subjek penelitian kelompok anak ASD dan anak normal, dalam satuan CFU



Gambar 8. Perbandingan proporsi hitung koloni jamur antara subjek penelitian kelompok anak ASD dan anak normal

Hipotesis I penelitian ini teruji dan diterima. Hasil penelitian ini sesuai dengan kepustakaan yang mengatakan bahwa *C. albicans* merupakan flora normal dalam saluran pencernaan, juga terdapat di individu yang mengalami kekurangan kekebalan (defisiensi imun), selain itu jamur yang bersifat komensal akan berubah menjadi parasit.^{1,4} Penelitian Gupta⁹ melaporkan bahwa 60–70% anak penyandang ASD mengalami gangguan kekebalan (imun). Oleh karena itu pada penelitian ini hitungan koloni *C. albicans* meningkat jumlahnya di subjek penelitian kelompok anak ASD. Hitungan koloni jamur *C. albicans* yang tinggi pada anak ASD juga

disebabkan oleh sifat virulensi *C. albicans* yang lebih kuat dibandingkan dengan virulensi spesies *Candida* yang lain.^{8,18,19}

Hipotesis II penelitian ini teruji dan diterima. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Shaw⁸ yang menyimpulkan ada hubungan antara pengkolonian *C. albicans* dan ASD. Namun, pada penelitian Shaw⁸ yang diteliti adalah metabolit yang dihasilkan oleh *C. albicans* pada 3 kasus anak ASD, sedangkan penelitian ini langsung memeriksa hitung koloni *C. albicans* dari tinja anak penyandang ASD dengan jumlah subjek yang lebih banyak. Walaupun metode pemeriksaan yang digunakan berbeda, tetapi simpulan yang didapat sama yaitu terdapat hubungan (korelasi) antara hitung koloni *C. albicans* dan kejadian ASD.

Didasari pembahasan hubungan (korelasi) ini dapat lebih dimengerti bahwa semakin banyak hitungan koloni *C. albicans* yang ditemukan pada anak penyandang ASD, akan semakin memperkecil harapan perbaikan anak ASD tersebut. *Candida albicans* dapat menghasilkan (memproduksi) enzim *aspartyl proteinase*, *phospholipase*, dan *lypophospholipase* yang berperan dalam proses merekatkan (adhesi) ke epitel mukosa, sehingga dapat meningkatkan ketelusan (permeabilitas) mukosa usus. Pada keadaan ini peptida abnormal (*caseomorphin* dan *gluteomorphin*) akan masuk ke dalam sel epitel mukosa usus melalui sambungan ketat (*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 inilah yang menyebabkan gangguan daya tangkap (persepsi), daya pahaman (kognisi), perasaan (emosi) dan perilaku anak penyandang ASD. Oleh karena itu walaupun anak ASD diberi terapi perilaku, tetapi hasil terapi perilaku tidak akan optimal bila masih terdapat gangguan metabolisme, dan *C. albicans* ini berperan dalam menimbulkan gangguan metabolisme tersebut.^{20–24}

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan (korelasi) yang bermakna antara peningkatan hitung koloni *C. albicans* dengan kejadian ASD. Walaupun demikian, berdasarkan batasan empirik Guilford,²⁵ korelasi hasil penelitian ini bersifat longgar, karena nilai *Rpb* penelitian ini ialah 0,253372. Batasan empirik Guilford²⁵ ialah bila *Rpb* < 0,20: sangat longgar; *Rpb* ≥ 0,20 – < 0,40: longgar; *Rpb* ≥ 0,40 – < 0,70: moderat; *Rpb* ≥ 0,70 – < 0,90: erat dan *Rpb* ≥ 0,90: sangat erat.^{17,25} korelasi yang bersifat longgar antara peningkatan hitung koloni *C. albicans* dan kejadian ASD, menunjukkan bahwa masih banyak faktor lain yang dapat memperberat atau menyebabkan kejadian ASD. Hal ini sesuai dengan kepustakaan yang menerangkan bahwa

ASD disebabkan oleh berbagai faktor. Yaitu awalnya disebabkan oleh kerentanan genetik, kemudian dipicu oleh faktor lingkungan sehingga terjadi gangguan biomedis pada anak ASD tersebut.^{11,12,15}

SIMPULAN

Hitungan koloni *C. albicans* tinja anak ASD lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan anak normal dan terdapat hubungan (korelasi) yang bermakna antara hitung koloni *C. albicans* dan keadaan ASD.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jawetz E. Opportunistic mycoses, Medical Microbiology. Toronto: Prentice Hall International inc; 2001; 645–51.
2. Guarro J, Gene J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev, 1999; 12: 454–90.
3. Mendling W. Vulvovaginal candidosis, Theory and Practice. Berlin: Springer-Verlag, 1988; 26–33.
4. Levinson W, Jawetz E. Medical microbiology and immunology. Toronto: Prentice Hall International inc, 1998; 315–52.
5. Martinez JP, Gil Luisa M. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. Clin Microbiol Rev, 1998; 11: 121–41.
6. Rex JH, Meunier F. Serious *Candida* infections: risk factor, treatment, and prevention. Belgi: Central Office-Data Center Brussels, 2001; 78–85.
7. Jepson B. Understanding autism, the physiological basis and biomedical intervention options of autism spectrum disorders. Utah USA: Southwood Medical Plaza Sandy, 2003; 4–12.
8. Shaw W. Biological treatments for autism and PDD. United States of America. The Great Plains Laboratory Inc, 2002; 47–59.
9. Gupta S. Immunology and immunologic treatment of autism. Proceeding of the National Autism Assn, 1996; 2: 455–60.
10. Dieterich C, Schandar M. In vitro reconstructed human epithel reveal contribution of *Candida albicans* and CPH 1 to adhesion and invasion. Microbiol, 2002; 148: 497–506.
11. Filipek PA. Autism spectrum disorders. Dalam KE Swaiman (penyunting): Pediatric neurology principles & practice. Toronto: Mosby, Inc; 1999: 606–28.
12. Volkmar FR, Klin A. Persuasive developmental disorders. In: BJ. Sadock, VA. Sadock (penyunting): Comprehensive text book of psychiatry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000; 721–53.
13. Deuel RK. Autism: A Cognitif Developmental Riddle. Ped Neurol. 2002; 26: 67–78.
14. Prater C, Zylstra R. Autism: A medical primer. Am Fam Physic. 2002; 66: 214–28.
15. Vanderweele JV, Cook EH. Genetics of childhood disorders: Genetics of autism. J Am Ac of Child and Adol Psych. 2003; 42: 145–51.
16. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Basic and Clinical Biostatistics. London: Prentice-Hall International Inc. 1990; 248–62.
17. Jean Dickinson Gibbons. Non Parametrik Methods for Quantitative analysis. Ohio. American Sciences Press Inc, 1985; 82–7.
18. Chaffin WL, Lopez-Rebot JL. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida Albicans*: Identification Function and Expression. Microbiol and Mol Biol Rev. 1998; 62: 130–71.
19. Rimland B. *Candida*-Caused Autism. Autism Research Institute. 2000.
20. White JF. Intestinal Pathophysiology in Autism. Soc Exp Biol and Med. 2003; 17: 639–49.
21. Courchesne E, Townsend. The Brain in Infantile Autism: Posterior fossa structures are abnormal. Neurol. 1994; 44: 214–23.
22. Blatt GJ. Neurotransmitter Receptor Density in The Hippocampal Formation in Human Autistic and Normal Brains. Paper presented at: Autism and Disorders of Relating and Communicating. Washington DC, 1999; 351–7.
23. Horvath K, Papadimitriou JC. Gastrointestinal Abnormalities in Children with Autistic Disorders. J of Ped. 1999; 135: 559–63.
24. Committee on Children With Disabilities. Technical report: The Pediatricians Role in The Diagnosis and Management of Autistic Spectrum Disorder in Children. Pediatrics. 2001; 107: 1–18.
25. Guilford JP. Fundamental statistics in psychology and education. New York: McGraw-Hill Book Company Inc, 1956; 174–82.