

FORUM DIAGNOSTICUM

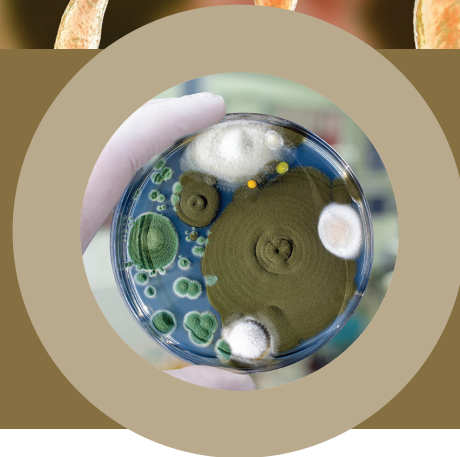
PRODIA DIAGNOSTICS EDUCATIONAL SERVICES

ISSN 0854-7173 | No. 5/2023



KEUNGGULAN PENERAPAN METODE MALDI-TOF MS UNTUK IDENTIFIKASI JAMUR DI LABORATORIUM MIKROBIOLOGI

Amadea Risanggita Kinanthi



PENDAHULUAN

Fungi atau jamur merupakan salah satu patogen yang penting secara global bagi kesehatan. Pada manusia, terdapat beberapa patogen dari golongan fungi yang menyebabkan permasalahan serius, seperti *Cryptococcus gattii* yang terbukti menjadi patogen infeksius berbahaya bagi individu imunokompeten dengan faktor risiko yang tidak diketahui dengan jelas, *Aspergillus fumigatus*, hingga *Candida auris* yang dikenal memiliki angka resistensi antifungi yang tinggi. Diperkirakan infeksi jamur yang invasif akibat genus *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, dan *Pneumocystis* menyebabkan kematian pada 1,5 juta orang setiap tahunnya (1).

Secara natural, manusia resisten terhadap sebagian besar jenis infeksi jamur yang invasif, karena makhluk hidup berdarah panas memiliki sistem imun yang rumit. Namun, terdapat faktor krusial yang menjadi salah satu penyebab meningkatnya angka infeksi jamur, yaitu semakin meningkatnya angka populasi berisiko, seperti pasien imunokompromais, meningkatnya angka kanker, AIDS, serta pasien yang melakukan transplantasi. Selain itu, meningkatnya penggunaan beberapa peralatan kesehatan seperti kateter juga menjadi salah satu faktor risiko terbentuknya biofilm. Terdapat beberapa kriteria yang harus dipenuhi oleh fungi untuk dapat menyebabkan infeksi yang invasif pada manusia, antara lain (i) kemampuan untuk

tumbuh pada atau di atas temperatur tubuh mammalia, (ii) kemampuan untuk mencapai bagian dalam jaringan dengan cara menembus ataupun menghindari *host barrier*, (iii) Kemampuan untuk melisis jaringan dan mengabsorpsi komponennya, dan (iv) kemampuan untuk menghindari sistem pertahanan tubuh host (2,3).

Infeksi jamur yang invasif maupun sistemik dikatakan terjadi apabila memenuhi kriteria standar, yakni terbukti menyebabkan kerusakan akibat elemen dari jamur yang terlihat melalui pemeriksaan histopatologi, maupun adanya agen etiologi penyebab penyakit yang terisolasi melalui kultur dari sampel-sampel yang steril, seperti darah dan cairan cerebrospinal. Infeksi jamur invasif dapat terjadi karena invasi mikrobiota pada mukosa maupun karena menghirup spora jamur. Gejala dari infeksi jamur tidaklah spesifik, pun tingkat keparahan penyakitnya sangat tergantung pada kemampuan sistem imun host. Maka dari itu, sangat diperlukan derajat kecurigaan yang tinggi untuk mendapatkan diagnosis lebih dini serta pengelolaan penyakit yang optimal (3).

JENIS-JENIS PATOGEN JAMUR

Diestimasikan bahwa Kingdom Fungi memiliki sekitar enam juta spesies yang tersebar di seluruh dunia. Ratusan spesies di antaranya merupakan kelompok jamur dan ragi (*yeast*) yang dapat menyebabkan kerugian pada manusia melalui beberapa cara, seperti mengontaminasi makanan dan menyebabkan keracunan apabila tertelan (*micotoxycosis*) dan juga menyebabkan infeksi. Infeksi akibat fungi dapat terjadi pada area permukaan seperti infeksi pada kulit, kuku, rambut, dan permukaan mukosa, maupun infeksi invasif pada organ-organ internal yang dapat menjadi penyakit mematikan apabila tidak mendapatkan diagnosis dan penanganan yang tepat (3).

Pada akhir tahun 2022, *World Health Organization* (WHO) pertama kalinya mempublikasikan daftar patogen Jamur yang mengancam nyawa, yaitu spesies-spesies fungi prioritas yang harus diperhatikan. Daftar ini dibuat oleh WHO sebagai respon global untuk memusatkan fokus dalam penelitian maupun pembuatan kebijakan terkait infeksi jamur dan resistensi antifungi. Infeksi jamur yang invasif biasanya menyerang kelompok dengan kondisi terkait sistem kekebalan tubuh yang melemah seperti kanker, HIV, transplantasi organ, penyakit pernapasan kronis, dan post-tuberculosis primer. Pandemi COVID-19 pun memiliki asosiasi dengan meningkatnya angka kejadian infeksi jamur invasif komorbid. Terdapat tiga kelompok pada kejadian infeksi jamur yang berasosiasi dengan COVID-19, antara lain aspergillosis, mucormycosis, dan candidaemia. Saat ini, akses terhadap pengobatan maupun diagnosis yang berkualitas terkait infeksi jamur masih sangat terbatas, sehingga masih banyak infeksi jamur yang tidak terdiagnosis dan tidak tertangani. Di samping itu, data surveilans yang tersedia sangat minim, atau bahkan tidak ada. Oleh karena itu, daftar patogen jamur prioritas dibuat untuk memfokuskan upaya penelitian maupun penanganannya pada patogen yang menjadi ancaman terbesar. Dalam daftar tersebut, WHO mengelompokkan ke dalam tiga kategori kelompok prioritas yang meliputi *Critical Group*, *High Group*, dan

Critical Group	High Group	Medium Group
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffei</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Gambar 1. Daftar Patogen Jamur Priotitas World Health Organization (WHO) (4).



Medium Group seperti pada gambar 1. Ke-sembilan belas patogen tersebut tidak hanya dikelompokkan, namun juga diberi ranking berdasarkan bobot skoring masing-masing serta hasil diskusi konsensus WHO *Advisory Group on the fungal priority pathogens list* (WHO AG FPPL) (4).

Bobot kepentingan relatif dari setiap kriteria untuk menentukan prioritas penelitian dan pengembangan sangat bervariasi. Prioritas tersebut ditetapkan berdasarkan bobot masing-masing kriteria, antara lain angka resistensi antijamur (38.5%), diikuti angka kematian (13.9%), evidence-based treatment (11.9%), akses diagnostik (10.4%), angka kejadian tahunan (8.5%), serta komplikasinya (8.4%). Sementara itu, kriteria lain di luar yang telah disebutkan memiliki bobot kepentingan relatif di bawah 5% (4).

AKSESIBILITAS DIAGNOSTIK LABORATORIUM UNTUK MANAJEMEN PASIEEN DENGAN INFEKSI JAMUR DI ASIA

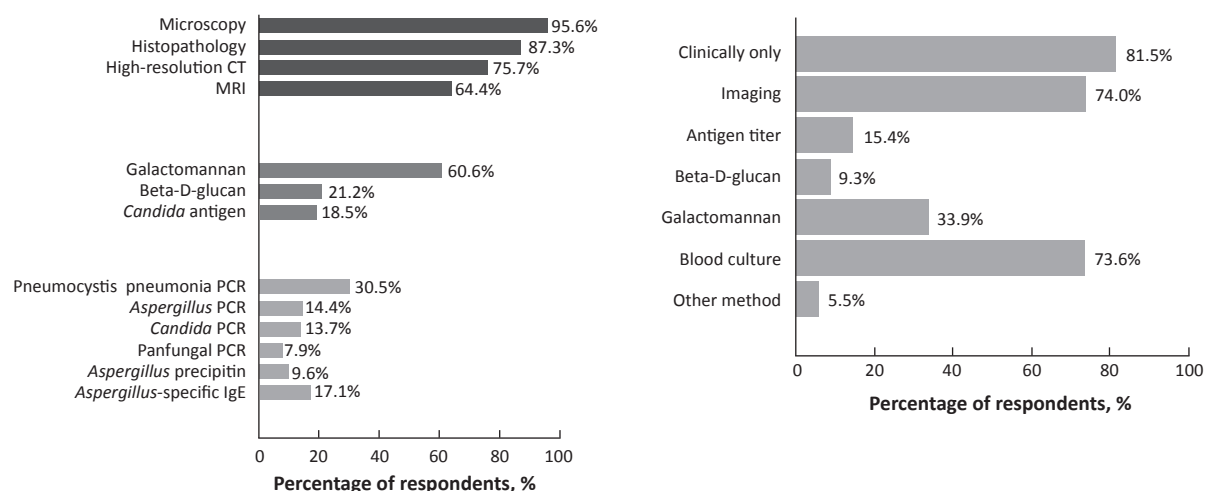
Di Asia, patogen jamur belum mendapatkan perhatian yang cukup besar, meskipun ancaman yang diakibatkan oleh kelompok patogen ini signifikan, salah satunya terhadap kesehatan manusia. Padahal, Asia kemungkinan memiliki beban penyakit akibat jamur terbesar di dunia, dikarenakan jumlah populasinya yang besar serta karakteristik dari jamur yang cenderung tumbuh subur pada lingkungan tropis/subtropis. Suatu studi di Asia menunjukkan bahwa angka kejadian candidemia di Asia lebih tinggi dibandingkan data internasional. Meski demikian, banyak kasus infeksi jamur yang tidak tercatat, sehingga angka yang dilaporkan saat ini masih lebih rendah dibandingkan angka kejadian yang sesungguhnya akibat masih terbatasnya pemeriksaan rutin. Sebagai contoh, investigator di Taiwan menemukan bahwa angka kejadian salah satu infeksi jamur, yakni *Invasive aspergillosis* (IA) menjadi semakin tinggi seiring

dengan semakin meningkatnya penggunaan pemeriksaan Galaktomanan (GM) (5).

Asian Fungal Working Group membuat suatu survey untuk memahami mengenai praktik klinis dalam diagnosis dan manajemen infeksi jamur. Dalam survey tersebut, salah satu poin yang dilihat adalah mengenai akses terhadap pemeriksaan laboratorium untuk mendiagnosis infeksi jamur. Dari hasil survey, mayoritas responden memiliki akses terhadap pemeriksaan mikroskopis dan juga histopatologis (97.5% dan 87.3%, berturut-turut), namun apabila berkaitan dengan jenis pemeriksaan dengan biomarker yang lebih maju, pemeriksaan yang cenderung mudah diakses antara lain Galaktomanan sebesar 60,7%, beta-D-glucan sebesar 21.2%, dan *Candida* antigen sebesar 18.5%. Sementara itu, pemeriksaan diagnostik berbasis molekular, seperti PCR, saat ini memang belum tersedia secara luas seperti halnya pemeriksaan mikroskopis dan histopatologis, namun beberapa jenis yang umum digunakan adalah *Pneumocystis jirovecii* PCR (30.5%), *Aspergillus* PCR (14.4%), *Candida* PCR (13.7%), dan Panfungal PCR (7.9%). Dalam melakukan monitoring respon pasien terhadap pengobatan, pendekatan yang paling banyak dilakukan adalah melalui klinis, kemudian diikuti dengan pencitraan dan kultur darah (gambar 2) (5).

TANTANGAN DIAGNOSTIK PATOGEN JAMUR

- Tantangan pertama, gejala infeksi jamur sering kali mirip dengan infeksi bakteri atau virus lainnya, sehingga sulit untuk membedakan secara klinis. Demam, batuk, dan sesak napas, misalnya, dapat terjadi baik pada infeksi jamur maupun infeksi bakteri ataupun virus. Oleh karena itu, diperlukan tes laboratorium yang akurat dan cepat untuk mengidentifikasi agen penyebab infeksi jamur.
- Tantangan kedua, terletak pada ketersediaan sumber daya dan infrastruktur di beberapa wilayah, terutama di negara-negara berkembang. Pemeriksaan laboratorium



Gambar 2. Aksesibilitas diagnostik laboratorium dan pendekatan untuk monitoring respon pasien dengan infeksi jamur (5).

yang diperlukan untuk diagnosis infeksi jamur sering memerlukan fasilitas khusus, teknologi yang canggih, dan ahli yang terlatih. Sayangnya, di banyak daerah, sumber daya ini tidak selalu tersedia secara memadai. Hal ini menghambat kemampuan untuk mendiagnosis infeksi jamur dengan cepat dan akurat, yang pada akhirnya dapat memengaruhi pengobatan yang tepat waktu dan efektif. Hal lain yang berkontribusi terhadap keterlambatan diagnosis pada infeksi fungi adalah akibat beragam serta bertambah banyaknya jenis fungi yang dapat menyebabkan penyakit. Banyak dari penyakit akibat fungi tersebut yang jumlah kasusnya belum cukup banyak sehingga sulit untuk dijadikan pertimbangan sejak awal terjadinya infeksi. Bahkan, ketika fungi dianggap sebagai agen penyebab etiologi penyakit, sulit untuk melakukan identifikasi patogen jamur tersebut hingga pada tahap spesies (6,7).

Dalam kaitannya dengan diagnosis infeksi fungi, identifikasi patogen ini memiliki kerumitan tersendiri. Kelompok fungi memiliki variasi morfologi yang sangat luas apabila dibandingkan dengan jenis mikroba yang lain. Patogen-patogen jamur tersebut mengalami perubahan morfologi sesuai dengan respon terhadap inang. Pada suatu jaringan, fungi dapat tumbuh sebagai yeast yang secara morfologi

menyerupai sel bakteri dalam hal konsistensi, ataupun sebagai mold yang berfilamen dan berhifa di alam. Selain itu, terdapat pula *dimorphic fungi* yang memiliki kedua jenis morfologi tersebut, yang kebanyakan ditemukan hanya pada kondisi *in vivo*. Morfologi *in vitro* cenderung lebih bervariasi, terutama karena sporulasi pada *mold* lebih umum terjadi pada kondisi *in vitro*. Dalam hal identifikasi jenis patogen jamur penyebab penyakit, morfologi jamur tidak menjadi masalah hanya jika pemeriksaan yang digunakan mengandalkan sel lisat untuk melepaskan target (8).

Tantangan yang kedua adalah preparasi sampel fungi. Preparasi sampel fungi memiliki permasalahan signifikan, sebab tidak seperti virus atau bakteri yang dapat ditemukan dalam jumlah yang besar pada cairan tubuh, fungi lebih jarang ditemukan pada sampel cairan tubuh meski menggunakan volume yang cukup. Contohnya adalah pada kasus Aspergillosis invasif. Karena pada cairan tubuh seperti darah jarang ditemukan fungi, maka hasil kultur darah positif tidak dijadikan pertimbangan untuk diagnosis Aspergillosis invasif. Patogen jamur seringkali membutuhkan waktu lebih lama untuk tumbuh dalam media kultur dibandingkan dengan patogen lain seperti bakteri. Proses kultur jamur yang lambat ini dapat memperlambat waktu diagnosis, karena hasil yang akurat sering memerlukan



waktu beberapa hari atau bahkan minggu. Keterlambatan ini dapat berdampak pada pengobatan dan pengelolaan infeksi fungi yang tepat waktu. Selain itu, alasan mengapa kelompok fungi dianggap sebagai target diagnostik yang sulit adalah karena organisme ini, baik berupa ragi atau kapang, memiliki struktur selular yang mencakup dinding sel keras sehingga kemungkinan sulit lisis. Konsekuensinya, apabila harus memanfaatkan pemeriksaan yang memerlukan akses kepada asam nukleat, protein, maupun molekul lain yang tidak disekresikan dan tidak terdapat di luar sel, maka akan diperlukan suatu tahapan ekstraksi untuk menghancurkan dinding sel, baik melalui metode fisika, kimia, maupun enzimatis. Untuk mengatasi hal tersebut, diperlukan suatu platform diagnostik baru yang dapat mengakomodir kondisi tersebut (9).

METODE DIAGNOSTIK DALAM PEMERIKSAAN INFEKSI FUNGI

Ada beberapa metode diagnostik yang digunakan untuk mengidentifikasi patogen jamur. Berikut adalah beberapa contoh metode diagnostik yang umum digunakan:

1. Metode Diagnostik Berbasis Serologis

Metode serologis merepresentasikan metode pemeriksaan yang cepat dalam mengonfirmasi penyebab infeksi dari kelompok fungi. Pemeriksaan ini mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen di dalam serum ataupun cairan tubuh yang menunjukkan adanya infeksi fungi. Pemeriksaan ini memiliki keuntungan karena kecepatan pemeriksaannya. Pemeriksaan serologis dapat memberikan hasil positif ketika pemeriksaan kultur memberikan hasil negatif akibat organisme yang sulit dikultur. Namun pemeriksaan dengan prinsip deteksi antibodi memiliki keterbatasan jika digunakan pada pasien imunokompromais maupun imunosupresi, sebab pasien tersebut memiliki keterbatasan juga dalam produksi antibodi yang adekuat sehingga berpotensi

memberikan hasil negatif palsu. Pemeriksaan antigen fungi memberikan solusi dalam hal pemeriksaan infeksi fungi pada pasien-pasien tersebut. Polisakarida atau protein, yaitu antigen fungi yang disekresikan oleh fungi selama pertumbuhan dapat berakhir dan ditemukan di cairan tubuh yang lain. Oleh karenanya, antigen fungi dapat menjadi penanda ideal yang digunakan untuk deteksi infeksi fungi pada pasien imunokompromais dan imunosupresi. Beberapa contoh pemeriksaan berbasis serologi untuk deteksi infeksi fungi adalah pemeriksaan β -d-glucan (BDG) dan Galactomannan (GM) (7,18).

2. Metode berbasis molekular

Metode molekular merepresentasikan metode deteksi dengan variasi minimum dan output yang baik. Pemeriksaan ini lebih disukai terutama untuk mendeteksi spesies-spesies fungi yang sulit dikultur, salah satunya yaitu PCR. PCR adalah metode yang digunakan untuk mengamplifikasi dan mendeteksi asam nukleat patogen jamur dalam sampel klinis. Teknik ini memungkinkan deteksi yang lebih sensitif dan spesifik dari materi genetik fungi, sehingga dapat membantu mengidentifikasi patogen dengan lebih akurat. Pemeriksaan berbasis PCR tidak membutuhkan jumlah sampel yang besar. Misalnya saja untuk sampel darah, hanya diperlukan sekitar 2-4 mL sehingga pemeriksaan ini juga dapat digunakan untuk pediatri. Namun, terdapat beberapa kelemahan dalam metode ini, antara lain, sensitifitas pemeriksaan ini tergantung pada jenis, kompleksitas, serta pemrosesan sampel. Untuk melakukan pemeriksaan ini juga diperlukan *template* yang telah dipurifikasi. Selain itu, pemilihan *primer* untuk melakukan PCR juga sangat mempengaruhi hasil reaksinya. Apabila *primer* memiliki spesifisitas target yang kurang baik, maka akan meningkatkan kemungkinan mengalami positif palsu. Sebaliknya, apabila *primer* dan target berikatan secara lemah, maka hal ini dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya negatif palsu. Selain itu, saat ini diperkirakan

hingga 20% dari sekuens yang belum diedit di GenBank menunjukkan garis keturunan yang salah sehingga akan mempengaruhi identifikasi spesies fungi yang bergantung pada sekuensing DNA dari DNA dan desain *primer* sehingga mempengaruhi efisiensi amplifikasi PCR. Hasil Pemeriksaan PCR pun juga dapat dipengaruhi oleh kontaminasi sampel. Pemeriksaan menggunakan PCR juga saat ini masih tergolong memiliki biaya yang tinggi sehingga penggunaannya sebagai pemeriksaan rutin menjadi terbatas (10,19).

3. Next Generation Sequencing

Prinsip dari *Next Generation Sequencing* (NGS) adalah dengan mengidentifikasi nukleotida pada sampel kemudian dibandingkan dengan katalog di *library*. NGS memiliki kemampuan untuk memeriksa secara cepat dan akurat banyak target gen sekaligus yang terkait erat dengan patogen, sehingga metode ini merupakan suatu metode yang menghantarkan kita pada era *precision medicine*. Pemeriksaan dengan metode NSG memiliki kelebihan, antara lain mampu mengidentifikasi patogen jamur yang sulit ditumbuhkan dalam kultur dan dapat langsung dilakukan menggunakan sampel darah, sehingga lebih bermanfaat bagi pasien yang tidak dapat mentolerir prosedur invasif seperti bronkoskopi. Meski demikian, saat ini terdapat beberapa keterbatasan yang menyebabkan teknologi NGS belum dapat diimplementasikan secara luas dalam penanganan infeksi fungi invasif. Salah satu penyebab utamanya adalah karena biaya yang tinggi. Selain itu, analisis data NGS untuk identifikasi beberapa patogen menggunakan database urutan nukleotida sebagai data referensi memerlukan sistem komputer dengan ukuran memori yang besar, dan analisis NGS secara rutin di laboratorium klinis juga memerlukan perbaikan besar dalam kemampuan pemrosesan data. Saat ini, NGS dapat digunakan sebagai alat diagnostik tambahan, dan hasilnya perlu dibandingkan dengan hasil tes diagnostik tradisional dan kondisi klinis pasien (7,20).

4. MALDI-TOF MS

Prinsip kerja dari *Mass Spectrometry* (MS) adalah mengidentifikasi dan menguantifikasi molekul melalui analisis rasio massa terhadap muatan (m/z) dari ion molekular. MALDI TOF MS memiliki kelebihan dalam identifikasi mikroorganisme, antara lain pemeriksaannya cepat, *high throughput*, biaya rendah, dan sistem yang efektif. Di antara kelebihan tersebut, kelebihan yang paling utama adalah mengenai kecepatan identifikasi. Kecepatan identifikasi, misalnya pada bakteri, yang jika menggunakan metode konvensional membutuhkan 24-48 jam, dengan MALDI-TOF MS dapat dicapai dalam waktu kurang dari satu jam. Pada ranah mikologi pun, MALDI-TOF telah banyak diteliti dan diterapkan sebagai suatu *tools* yang dapat dipercaya dalam hal identifikasi patogen jamur dari sampel klinis. Hasil identifikasi patogen menggunakan MALDI-TOF memang sangat tergantung pada *database* patogen yang ada pada sistem, namun sebagian besar manufaktur menyediakan kemungkinan bagi pengguna untuk terus memperbarui *database*, baik secara mandiri, maupun mengikuti pembaharuan dari manufaktur. Selain itu, apabila kita membicarakan mengenai identifikasi patogen penyebab infeksi, maka pada umumnya hal tersebut tidak dapat dipisahkan dari profil kepekaan patogen terhadap agen antimikroba. Pemeriksaan menggunakan MALDI-TOF memiliki ruang untuk mengeksplorasi patogen-patogen jamur yang membawa gen resisten terhadap agen antifungi (6,11,12).

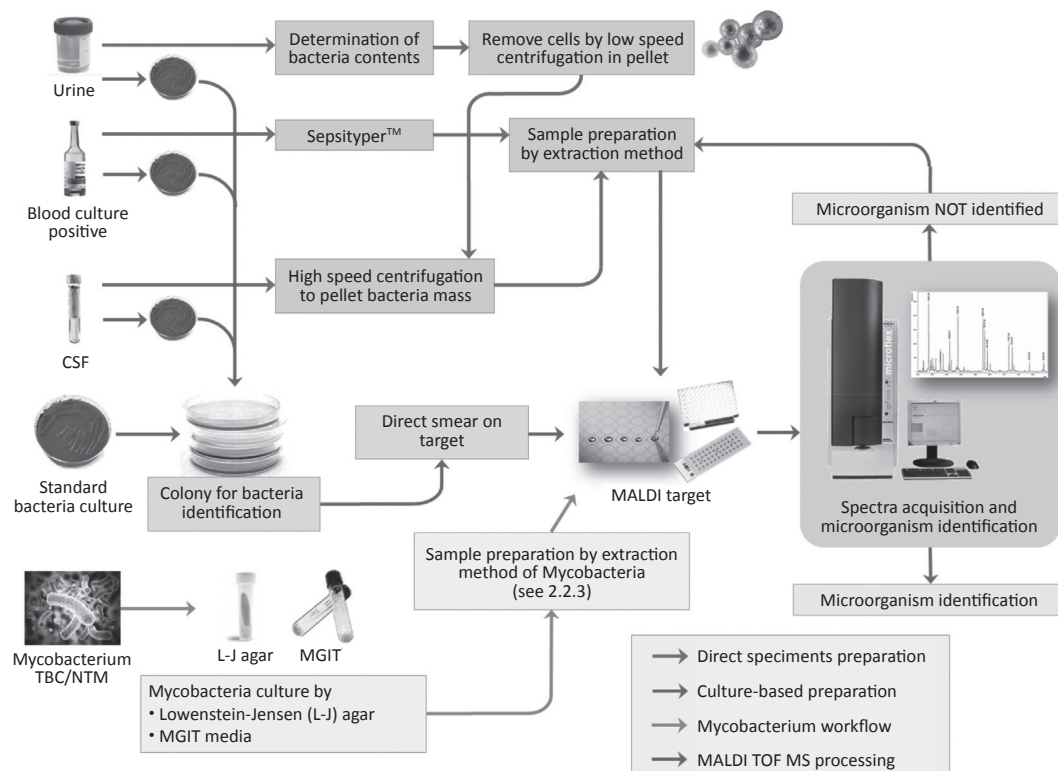
Metode diagnostik yang tepat akan dipilih tergantung pada jenis infeksi, lokasi infeksi, serta ketersediaan sumber daya dan fasilitas diagnostik yang ada. Terkadang, beberapa metode diagnostik dapat digunakan secara bersama-sama untuk memperoleh hasil yang lebih akurat dan komprehensif.

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY PADA LABORATORIUM MIKROBIOLOGI KLINIS

Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) merupakan suatu teknik ionisasi dimana matriks menyerap energi dari laser ultraviolet untuk membentuk ion dari suatu molekul besar dengan fragmentasi minimal. Kemudian *Time of Flight* (TOF) ion diukur menggunakan detektor sehingga dapat diketahui massa ion untuk menentukan rasio massa terhadap muatan (m/z). Rasio inilah yang dideteksi dan dianalisa oleh *Mass Spectrometry* (MS) sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu organisme. Matriks yang digunakan pada MALDI untuk melakukan analisa berbagai jenis mikroorganisme adalah Asam α -Cyano-4-hydroxycinnamic (HCCA) dan Asam 2,5-hydroxybenzoic. Dalam identifikasi mikroorganisme, digunakan protein bermuatan positif dengan berat molekul antara 2000-20.000 m/z . Urutan dan ukuran protein ribosomal pada organisme yang berbeda cenderung tidak

berubah, sehingga dapat digunakan untuk membedakan organisme (11).

Metode MALDI-TOF MS telah menjadi salah satu metode yang berhasil dalam ranah deteksi mikroorganisme terutama di laboratorium diagnostik. Fungsi esensial MALDI-TOF MS tidak hanya dapat digunakan untuk identifikasi bakteri, namun juga dapat dimanfaatkan untuk studi terkait resistensi antimikroba, mendeteksi virus, parasit, hingga fungi. Pada tahapan identifikasi bakteri, sebagian besar sampel bakteri dipisahkan dan ditumbuhkan pada media agar, lalu satu koloni tunggal akan dioleskan (*smeared*) pada target MALDI. Sementara itu, untuk mycobacterium dan fungi berfilamen, diperlukan berbagai tahapan ekstraksi untuk memastikan kualitas proteom, sehingga dapat meningkatkan spektrum dan konfidensi dari identifikasi yang dilakukan oleh sistem. Deteksi patogen penyebab infeksi dapat dilakukan dari berbagai jenis sampel. Jenis sampel yang berbeda akan memerlukan perlakuan serta alur yang berbeda-beda pula



Gambar 3. Alur identifikasi berbagai jenis sampel menggunakan MALDI-TOF MS (11).

sebelum dilakukan analisa menggunakan MALDI-TOF MS (gambar 3). Sebagai contoh, berbagai jenis sampel cairan tubuh biasanya memerlukan tahapan purifikasi untuk memisahkan patogen dari sel-sel host, peptida, serta protein yang terkandung pada sampel (11,15).

Pada kelompok organisme fungi, MALDI-TOF secara efektif dapat mengidentifikasi spesies fungi yang berbeda hingga ke level subspecies serta mengidentifikasi resistensi antifungi, misalnya mengevaluasi resistensi *Candida glabrata* terhadap jenis antifungi anidulafungin dan fluconazole. Beberapa spesies *yeast* terbungkus oleh suatu lapisan kapsul yang menyebabkan protein internal organisme ini sulit diekstrak oleh larutan matriks. Maka dari itu, dalam memproses sampel-sampel tersebut disarankan untuk menggunakan metode ekstrasi *ethanol-formic acid* untuk mendapatkan spektrum berkualitas tinggi (11,15).

MALDI-TOF diketahui dapat secara efektif mengidentifikasi berbagai organisme melalui berbagai jenis sampel. Teknologi ini juga dapat mengidentifikasi kasus koinfeksi sehingga hasil yang diberikan akan semakin bermakna bagi klinisi dan pasien karena dapat mencegah kesalahan diagnosis serta keterlambatan penanganan tanpa harus meningkatkan biaya untuk prosedur tambahan. Salah satu keterbatasan MALDI-TOF yang paling utama ada pada *database* yang dapat membatasi kemampuan identifikasinya. Meski teknologi ini dapat mengidentifikasi organisme secara akurat, namun apabila spektrum massa suatu organisme belum tersedia di dalam *database*, maka ada potensi terjadi kesalahan identifikasi. Namun, hal ini dapat diantisipasi karena berbagai manufaktur memungkinkan pengguna MALDI-TOF untuk dapat memperbarui *database* baik secara mandiri maupun mengikuti pembaharuan dari manufaktur (15).

IDENTIFIKASI PATOGEN FUNGI DENGAN MALDI-TOF MS

Mikologi medis merupakan suatu disiplin ilmu yang berkaitan dengan organisme fungi berukuran mikroskopik dan bersifat patogenik. Umumnya patogen fungi ini terbagi menjadi dua, yakni *yeast* dan fungi berfilamen. Secara tradisional, identifikasi patogen fungi berfilamen dilakukan berdasarkan fitur makroskopik dan mikroskopik dari isolat yang diperiksa. Cara ini memerlukan ahli mikologi medis yang terlatih, karena terdapat spesies fungi berfilamen berbeda yang memiliki kemiripan morfologi, namun memiliki profil kepekaan antifungi yang berbeda. Hal inilah yang menyebabkan identifikasi fungi hingga level spesies sangat diperlukan. Seiring berkembangnya ranah diagnostik, identifikasi patogen fungi dapat dilakukan dengan metode PCR dan DNA sequencing, yang meskipun dapat memberikan hasil akurat, namun memiliki keterbatasan dalam penerapan rutin karena memerlukan waktu lama dan biaya yang tinggi. Pemeriksaan menggunakan MALDI-TOF dapat menjadi jawaban terhadap

Tabel 1. Misidentifikasi umum pada platform konvensional yang teratasi dengan platform MALDI-TOF (13)

Accurate Identification (Method)	Misidentification (Traditional Method)
<i>Candida albicans</i> (MBT)	<i>Candida famata</i> (VITEK 2)
<i>Candida auris</i> (MBT)	<i>Candida catenulata</i> (Microscan), <i>C. famata</i> (Microscan), <i>Candida haemulonii</i> (VITEK 2), <i>Candida inconspicua</i> (Microscan)
<i>Candida dubliniensis</i> (MBT)	<i>C. albicans</i> (Microscan, Phoenix Yeast ID)
<i>Candida fabianii</i> (MBT)	<i>Candida pelliculosa</i> (ID 32C), <i>Candida utilis</i> (ID 32C)
<i>Candida guilliermondii</i> (MBT)	<i>C. famata</i> (API 20C AUX, VITEK2)
<i>Candida intermedia</i> (MBT)	<i>C. famata</i> (Microscan)
<i>Candida metapsilosis</i> (MBT)	<i>Candida parapsilosis</i> (Microscan)
<i>Candida nivariensis</i> (MBT)	<i>Candida glabrata</i> (Microscan, VITEK 2, Phoenix Yeast ID)
<i>Candida orthopsilosis</i> (MBT)	<i>C. parapsilosis</i> (VITEK 2, Microscan)
<i>Candida tropicalis</i> (MBT)	<i>Candida viswanathii</i> (Phoenix Yeast ID)
<i>Candida zeylanoides</i> (MBT)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Phoenix Yeast ID, VITEK 2), <i>Trichosporon asahii</i> (Phoenix Yeast ID, VITEK 2)
<i>Cryptococcus gattii</i> (MBT)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (Microscan)
<i>Saprochaete clavata</i> (SARAMIS)	<i>Geotrichum capitatum</i> (VITEK 2)

kebutuhan pemeriksaan yang cepat dan akurat dalam mendeteksi patogen penyebab infeksi, termasuk fungi. Sumber data terkait patogen-patogen fungi yang signifikan secara klinis pun terus diperbarui sehingga pemanfaatan metode ini dapat diterapkan secara luas (12,16).

Identifikasi patogen fungi menggunakan metode tradisional, seperti metode fenotipik seringkali mengalami misidentifikasi. Kesalahan identifikasi tersebut paling umum ditemukan pada berbagai spesies *Candida*, karena tidak dapat membedakan antar spesies *Candida*, seperti *Candida albicans* dan *Candida dubliniensis*. Hal ini dapat terjadi karena antar spesies

Candida tersebut bisa memiliki kesamaan karakteristik morfologi maupun mikroskopik. Selain itu, platform identifikasi berbasis karakteristik biokimia seperti Vitek 2 juga memiliki kemungkinan tidak dapat membedakan karakteristik biokimia antar spesies dari genus yang sama sehingga menyebabkan kesalahan identifikasi. Untuk mengatasi kekurangan tersebut, berbagai penelitian telah membandingkan dan melaporkan performa dari MALDI-TOF untuk identifikasi patogen fungi. MALDI TOF memiliki reproduksibilitas yang tinggi di berbagai lingkungan pengujian, instrumen, operator, reagen, *slide target*, serta pola peletakan sampel melalui berbagai studi *multicenter*. Apabila dibandingkan dengan identifikasi menggunakan

Tabel 2. Hasil identifikasi jamur berfilamen menggunakan MALDI TOF (14).

Strain	No. of isolates	MALDI TOF MS results, no. (%)			
		Unreliable ID		Genus level ID only	Species level ID
		No ID generated	Incorrect ID (ID generated)		
<i>Aspergillus fumigates</i>	31	0	0	0	31 (100)
<i>Aspergillus flavus</i>	16	0	0	0	16 (100)
<i>Aspergillus niger</i>	7	0	0	0	7 (100)
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	0	0	0	1 (100)
<i>Aspergillus terreus</i>	1	0	0	0	1 (100)
<i>Aspergillus tamarii</i>	1	0	0	1 (100)	0
<i>Aspergillus clavatus</i>	1	0	0	0	1 (100)
<i>Aspergillus ustus</i>	1	0	0	0	1 (100)
<i>Aspergillus versicolor</i>	2	0	0	0	2 (100)
<i>Trichophyton rubrum</i>	23	0	0	16 (69.6)	7 (30.4)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	5	0	0	5 (100)	0
<i>Microsporum canis</i>	5	0	0	4 (80)	1 (20)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	6	0	0	3 (50)	3 (50)
<i>Microsporum gypseum</i>	6	0	0	3 (50)	3 (50)
<i>Sporothrix schenckii</i>	1	0	0	1 (100)	0
<i>Sporothrix globosa</i>	3	3	0	0	0
<i>Rhizopus microspores</i>	1	0	0	0	1 (100)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	0	1 (<i>Penicillium camemberti</i>)	0	0
<i>Purpureocillium lilacinus</i>	1	0	0	1 (100)	0
<i>Beauveria bassiana</i>	1	1	1	0	0
<i>Aspergillus chevalieri</i> ^a	1	1	1	0	0
<i>Talaromyces marneffe</i> ^a	1	1	1	0	0
<i>Trichophyton interdigitale</i>	5	0	0	0	5 (100)
<i>Trichophyton entagrophytes</i>	2	0	2 (<i>Trichophyton equinum</i>)	0	0
Total	123	6 (4.9)	34 (27.6)	34 (27.6)	80 (65.0)

^aSpecies not included in the database. ID, identification; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

pemeriksaan fenotipik konvensional, MALDI-TOF dilaporkan lebih unggul dari segi akurasi karena MALDI-TOF mampu mengidentifikasi dengan benar berbagai patogen fungi yang umum mengalami misidentifikasi pada platform metode fenotipik konvensional (Tabel 1) (13).

Berdasarkan penelitian oleh Peng *et al.* (2019), identifikasi patogen fungi berfilamen menggunakan MALDI-TOF memberikan hasil sebagai berikut. Dari 123 isolat yang diuji, 114 di antaranya (92.7%) dapat diidentifikasi hingga level genus, dan 80 di antaranya dapat diidentifikasi hingga level spesies (Tabel 2). Namun, metode ini ternyata juga mengalami kesalahan identifikasi terutama pada patogen-patogen fungi jenis cryptic yang cenderung memiliki MIC lebih tinggi terhadap antifungi. Hal ini dikarenakan jenis fungi tersebut saat ini menyebabkan kejadian infeksi yang langka, sehingga *database* spektrumnya belum banyak dikembangkan (14,16)

PENUTUP

Infeksi fungi yang invasif merupakan salah satu permasalahan kesehatan yang kian meningkat dan tidak dapat diabaikan. Meski secara natural manusia resisten terhadap infeksi fungi, namun saat ini jumlah orang dengan risiko mengalami infeksi fungi, seperti individu imunokompromais, semakin meningkat. Maka dari itu kebutuhan akan penunjang diagnosis infeksi fungi invasif semakin banyak. Berbagai metode mulai dari metode serologis, molekular, *next generation sequencing*, hingga identifikasi menggunakan MALDI-TOF telah dikembangkan untuk identifikasi fungi. Metode MALDI TOF telah tersedia dan terbukti memiliki kelebihan dapat memberikan hasil identifikasi yang sangat cepat dan akurat karena identifikasinya berdasarkan spektrum massa dari masing-masing spesies. Hal ini memungkinkan MALDI-TOF untuk menjadi pilihan metode identifikasi fungi secara

rutin. Keterbatasan dari segi *database* spektrum massa fungi saat ini dapat diakomodir oleh berbagai platform MALDI-TOF yang tersedia melalui fitur pembaharuan *database* spektrum massa, baik secara mandiri maupun mengikuti pembaharuan rutin dari manufaktur, sehingga menjadikan identifikasi fungi dengan metode MALDI-TOF ini sebagai pilihan identifikasi fungi yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bruch A, Kelani AA, Blango MG. RNA-based therapeutics to treat human fungal infections. *Trends Microbiol.* 2022;30(5):411-420.
2. Kainz K, Bauer MA, Madeo F, Carmona-Gutierrez D. Fungal infections in humans: the silent crisis. *Microb Cell.* 2020;7(6):143-145.
3. Firacative, Carolina. Invasive Fungal Disease in Humans: Are We Aware of the Real Impact? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115:e200430.
4. World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022.
5. Tan BH, Chakrabarti A, Patel A, Chua MMM, Sun PL, Liu Z, Rotjanapan P, Li R, Wahyuningsih R, Chayakulkeeree M, Chen YC; Asia Fungal Working Group (AFWG). Clinicians' challenges in managing patients with invasive fungal diseases in seven Asian countries: An Asia Fungal Working Group (AFWG) Survey. *Int J Infect Dis.* 2020;95:471-80.
6. Wicked BL, Romanelli AM. Diagnostic Mycology: Xtreme Challenges. *J. Clin. Microbiol.* 2020;58(4):e01345-19.
7. Fang, W., Wu, J., Cheng, M. et al. Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. *J Biomed Sci.* 2023;30:42.



8. Li Z, Nielsen K. Morphology Changes in Human Fungal Pathogens upon Interaction with the Host. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4):66.
9. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun*. 2018;9(1):5135.
10. K Hussain K, Malavia D, M Johnson E, Littlechild J, Winlove CP, Vollmer F, Gow NAR. Biosensors and Diagnostics for Fungal Detection. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4):349.
11. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal*. 2019;27(2):404-14.
12. Honsig C, Selitsch B, Hollenstein M, Vossen M.G, Spettel K, Willinger B. Identification of Filamentous Fungi by MALDI-TOF Mass Spectrometry: Evaluation of Three Different Sample Preparation Methods and Validation of an In-House Species Cutoff. *J. Fungi*. 2022;8:383.
13. Lau, A. F. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight for Fungal Identification. *Clin. Lab. Med*, 2021;41(2):267-283.
14. Peng, Y., Zhang, Q., Xu, C., Shi, W."MALDI-TOF MS for the rapid identification and drug susceptibility testing of filamentous fungi". *Exp Ther Med*. 2019;18(6):4865-4873.
15. Alizadeh M, Yousefi L, Pakdel F, Ghotaslou R, Rezaee MA, Khodadadi E, Oskouei MA, Soroush Barhaghi MH, Kafil HS. MALDI-TOF Mass Spectroscopy Applications in Clinical Microbiology. *Adv Pharmacol Pharm Sci*. 2021;2021:9928238.
16. Robert MG, Cornet M, Hennebique A, Rasamoelina T, Caspar Y, Pondérand L, Bidart M, Durand H, Jacquet M, Garnaud C, Maubon D. MALDI-TOF MS in a Medical Mycology Laboratory: On Stage and Backstage. *Microorganisms*. 2021;9(6):1283.
17. Normand A.-C., Gabriel F., Riat A., Cassagne C., Bourgeois N., Huguenin A., Chauvin P., De Geyter D., Bexkens M., Rubio E., et al. Optimization of MALDI-ToF Mass Spectrometry for Yeast Identification: A Multicenter Study. *Med. Mycol*. 2020;58:639-649.
18. Freeman Weiss Z, Leon A, Koo S. The Evolving Landscape of Fungal Diagnostics, Current and Emerging Microbiological Approaches. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(2):127.
19. K Hussain K, Malavia D, M Johnson E, Littlechild J, Winlove CP, Vollmer F, Gow NAR. Biosensors and Diagnostics for Fungal Detection. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4):349.
20. Tsang CC, Teng JLL, Lau SKP, Woo PCY. Rapid Genomic Diagnosis of Fungal Infections in the Age of Next Generation Sequencing. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(8):636.

FORUM DIAGNOSTICUM

ISSN 0854-7173 | No. 5/2023

Redaksi Kehormatan

Drs. Andi Wijaya, Ph.D.
Prof. Dr. dr. FX Budhianto Suhadi

Penanggung Jawab

Dr. Trilis Yulianti, M.Kes.

Ketua Dewan Redaksi

Dr. Siska Darmayanti, S.Si, M.Farm

Anggota Dewan Redaksi

Gianni Yosephine, S.Si., M.Farm
Matthew Justyn, S.Si., M.Farm.Klin.
Bena Zaira, S.Si., M.Farm.Klin.
Amadea Risanggita Kinanthi, S.Si
Bernadette Vania Lundina Arman S.Ked., M.A.

Alamat Redaksi

PT. Prodia Widyahusada, Tbk.
Jl. Kramat Raya 150, Jakarta 10430
Telepon: (021) 3144182 (Hunting)
Fax: (021) 3926675
e-mail: produk@prodia.co.id
website: www.prodia.co.id



Certificate Number : JKT 0403247
Certified to QMS

Desember 2023 - PR0006944