

Penggunaan Teknik Molekuler untuk Mengenali Dermatofita yang Diisolasi dari Hewan Kesayangan di Jakarta dan Bogor

(*MOLECULAR TECHNIQUE FOR DERMATOPHYTE IDENTIFICATION ISOLATED FROM PETS IN JAKARTA AND BOGOR*)

Dwi Endrawati^{1,2}, Eko Sugeng Pribadi¹,
Agustin Indrawati¹, Eni Kusumaningtyas²

¹Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University.

Jln. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16880

²Laboratorium Mikologi, Balai Besar Penelitian Veteriner.

Jln. RE. Martadinata No 30 Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16114

Email: eko.spribadi@yahoo.co.id; d.endrawati@gmail.com

ABSTRACT

Dermatophytosis is one of the superficial mycoses which causes skin health problems in pet animals. This study conducted molecular characterization using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) on specimens obtained from patients suspected of dermatophytosis in several clinics in DKI Jakarta Province and Bogor City. Fifty samples of skin scrapings from patients suspected of clinically dermatophytosis were collected and analyzed by conventional and molecular techniques. The Research aimed to identify dermatophyte that were isolated from pet animals using PCR-RFLP technique. The primers of *ITS 1*, *ITS 4*, *Chytin Synthase*, and cutting enzymes of *Dde1* were used in this Research. Four specimens off 50 spesimens were tested positive using direct and culture PCR examination techniques. Based on the sequencing results, *Microsporium canis* was identified in four spesimens. Specimens that were positive for dermatophytes followed by RFLP using the *Dde 1* enzyme. The results of the study showed that molecular techniques were a reliable way to determine the high-precision dermatophytes in diagnosing dermatophytosis. The Results also showed that molecular arrangement of B1 isolate was different from three other isolates.

Keywords: dermatophytes; molecular identification; restriction enzyme

ABSTRAK

Dermatofitosis adalah salah satu mikosis superfisial yang menyebabkan masalah kesehatan kulit pada hewan piara. Penelitian ini melakukan karakterisasi molekuler menggunakan *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) terhadap spesimen-spesimen yang diperoleh dari pasien yang diduga menderita dermatofitosis di beberapa klinik hewan di Provinsi DKI Jakarta dan Kota Bogor. Sebanyak 50 contoh kerokan kulit dari pasien yang dicurigai secara klinis menderita dermatofitosis dikumpulkan dan dianalisis dengan teknik konvensional dan molekuler. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengenali kapang dermatofita yang diisolasi dari hewan piara menggunakan teknik PCR-RFLP. Penelitian ini menggunakan primer *ITS 1*, *ITS 4*, *Chytin Synthase*, dan enzim pemotong *Dde1*. Dari 50 contoh, empat spesimen dinilai positif menggunakan teknik PCR pemeriksaan langsung dan biakan. Berdasarkan hasil sekuensing diketahui bahwa semua isolat dermatofita yang didapatkan dalam penelitian ini adalah *Microsporium canis*. Spesimen yang positif dermatofita kemudian dilanjutkan dengan RFLP menggunakan enzim pemotong *Dde 1*. Hasil studi memperlihatkan bahwa teknik molekuler adalah cara yang dapat diandalkan untuk menentukan dermatofita dengan ketepatan tinggi mendiagnosis dermatofitosis. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa isolat B1 memiliki susunan molekuler yang berbeda dengan ketiga isolat lainnya.

Kata-kata kunci: dermatofita; pemeriksaan molekuler; enzim pemotong

PENDAHULUAN

Dermatofitosis adalah mikosis superfisial yang menyerang kulit, rambut dan kuku manusia dan hewan (Alshawa *et al.*, 2012). Dermatofitosis sering terjadi pada hewan piara, hewan ternak dan terkadang juga pada satwa liar (Moriello 2014; Pal 2017; Melo *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2018). Dermatofitosis jarang terjadi pada burung (Chermette *et al.*, 2008). Tiga genus kapang dermatofita yang saat diketahui sebagai penyebab dermatofitosis, yaitu *Microsporum*, *Trichophyton* dan *Epidermophyton* (Behzadi *et al.*, 2014). Gejala klinis dermatofitosis terlihat dengan adanya lesi melingkar seperti cincin, berwarna putih, berkerak dan botak (*alopecia*) akibat kerusakan rambut (Gholib dan Rachmawati, 2010). Infeksi kapang dermatofita memengaruhi kesehatan dan hasil asal hewan serta dapat menular dengan mudah (Ahmad dan Gholib, 2016).

Kasus dermatofitosis sering terjadi pada hewan piara di Indonesia. Satu penelitian yang dilakukan di Yogyakarta menunjukkan bahwa 34% anjing menderita dermatofitosis (Indarjulianto *et al.*, 2014). Dermatofitosis pada anjing dan kucing lebih sering disebabkan oleh kapang dermatofita *Microsporum persicolor*, *M. gypsum*, *M. canis*, dan *Trichophyton* sp. (Moriello 2014). Infeksi yang disebabkan oleh *M. canis* dan *Trichophyton mentagrophytes* bersifat zoonotik dan hampir 20-50% dermatofitosis yang terjadi pada manusia disebabkan oleh kedua spesies tersebut. Penularan antar hewan piara oleh kedua spesies ini sangat tinggi dengan tingkat prevalensi sebesar 50-70% (Scott *et al.*, 2001; Weese dan Fulford, 2010; Day *et al.*, 2012).

Diagnosis terhadap dermatofitosis dilakukan menggunakan pemeriksaan mikroskopis terhadap preparat natif menggunakan KOH 10-20% untuk mendapatkan struktur hifa. Waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan hasilnya berkisar 10-15 menit. Pemeriksaan konvensional, yang dianggap sebagai pemeriksaan baku (*gold standard*), dilakukan dengan cara menempatkan spesimen kerokan kulit pasien di atas media agar khusus, seperti *Dermatophyte Selective Agar* (DSA, Sigma), atau *Dermatophyte Test Medium* (DTM, Sigma). Masa inkubasi yang dibutuhkan untuk menumbuhkan koloni dermatofita sekitar 5-14 hari hingga diperoleh koloni yang cukup matang untuk diamati karakter koloninya. Pengamatan koloni kapang dilakukan terhadap tekstur dan

topografi koloni, serta struktur fenotip lainnya, seperti bentuk dan ukuran mikro dan makrokonidia dan cabang pektinat (Liu *et al.*, 2014). Pertumbuhan koloni kapang yang tumbuh pada media agar dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor luar, seperti pemakaian media biakan, suhu, dan kemungkinan pengobatan yang sedang dilakukan saat pengambilan spesimen yang dapat memengaruhi metabolisme kapang sehingga dapat memengaruhi pembacaan hasil pengamatan (Kim *et al.*, 2011).

Metode pemeriksaan secara molekuler berbasis asam nukleat tergantung pada pemeriksaan susunan genotip yang lebih khusus dan lebih tepat karena tidak dipengaruhi oleh faktor dari luar, seperti perbedaan suhu dan pengobatan (Faggi *et al.*, 2001). Teknik molekuler yang dapat digunakan untuk mengenali kapang dermatofita adalah teknik rantai reaksi polimerase (*polymerase chain reaction/PCR*) dan dilanjutkan dengan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) yang menyorot pada *internal transcribed spacer regions* (ITS). Teknik PCR-RFLP adalah perpaduan teknik PCR dan pencernaan (*digesti*) enzimatis dari produk PCR tersebut. Teknik ini dapat mengenali dermatofita karena kemampuannya menghasilkan polimorfisme DNA khusus spesies dermatofita pada pola pita yang terlihat dari hasil pemeriksaan dengan elektroforesis jel agarosa (Mohammadi *et al.*, 2015). Proses *digesti* pada teknik RFLP ini menggunakan enzim pemotong (*restriction enzyme, endonuclease restriction*) yang direaksikan pada produk PCR. Enzim pemotong adalah enzim yang memotong molekul DNA pada rangka gula-fosfat tanpa merusak susunan basa. Setiap enzim mempunyai potongan pengenalan yang unik pada utas DNA, biasanya sepanjang 4-6 pasang basa (*base pairs, bp*). Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengenali isolat kapang dermatofita yang diisolasi dari hewan kesayangan di Jakarta dan Bogor menggunakan PCR-RFLP dengan primer *ITS 1*, *ITS 4*, *Chytin Synthase*, dan enzim pemotong *Dde1*.

METODE PENELITIAN

Isolat Kontrol

Isolat kapang yang digunakan sebagai kontrol adalah *T. mentagrophytes* dari *BBLitvet Culture Collection* (BCC F0217). Isolat kontrol ini digunakan sebagai pembanding dan acuan

gambaran mikroskopis dan posisi pita atas isolat hasil penelitian. Isolat dibiakkan kembali di atas media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA, BD Difco™, USA) yang diimbui antibiotik *chlorampenicol* (Sigma) 0,05% dan *cycloheximide* (Sigma) 0,5% diinkubasi pada suhu 37°C selama 7-14 hari.

Spesimen

Sebanyak 50 spesimen kerokan kulit anjing dan kucing yang diduga mengalami dermatofitosis diperoleh dari klinik-klinik hewan di wilayah Provinsi DKI Jakarta dan Kota Bogor dengan gejala klinis lesi melingkar seperti cincin, berwarna putih, berkerak dan botak (*alopecia*) akibat kerusakan rambut seperti yang dinyatakan oleh Gholib dan Rachmawati (2010). Spesimen disimpan dalam tempat bebas kuman dan sesegera mungkin diperiksa menggunakan mikroskopis terhadap preparat natif dengan penambahan KOH 10% dan dibiakkan ke atas media SDA. Media yang sudah berisi spesimen diinkubasi pada suhu 37°C selama 7-14 hari (Ainsworth dan Austwick, 1973).

Penetapan Kapang Dermatofita

Pengamatan makroskopik terhadap koloni dilakukan setelah masa inkubasi dicapai, atau adanya pertumbuhan koloni yang subur untuk diamati. Pengamatan dilakukan terhadap struktur, morfologi, topografi dan tekstur koloni yang tumbuh dan diduga sebagai koloni dermatofita dengan mengacu pada Al-Doory (1980).

Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA terhadap struktur kapang dermatofita merujuk pada White *et al.* (1990) dengan beberapa penyesuaian. Bahan ekstraksi berupa miselium dermatofita asal isolat murni kontrol dan miselium koloni kapang yang diperoleh dari spesimen kerokan kulit, ditumbuhkan pada media agar SDA yang diimbui antibiotik dan dipanen pada umur inkubasi 14 hari, serta spesimen kerokan kulit yang darinya diisolasi kapang dermatofita. Bahan ekstraksi dimasukkan ke tabung mikro 1,5 mL dan digerus menggunakan *pestel* sampai halus. Sebanyak 500 µL larutan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) ditambahkan ke dalam tabung dan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Campuran didinginkan sesaat, dan kemudian ditambahkan 500 µL larutan *chloroform isoamyl* (CI 24:1). Campuran disentrifugasi pada kecepatan 10.000 *rotation*

per minute (rpm) selama 20 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 500 µL larutan *phenol chloroform isoamyl* (PCI 25:24:1). Campuran disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 100 µL NaOAC 2 M (pH 5,2) dan 500 µL EtOH 100%. Campuran disimpan dalam lemari pembeku selama delapan jam. Setelah masa penyimpanan dicapai, campuran dihangatkan (*thawing*) pada suhu ruang dan kemudian disentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 30 menit dan supernatannya dibuang. Endapan (*pellet*) ditambahkan 500 µL EtOH 70% dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan menggunakan udara pada *vacuum concentrate plus* selama 30 menit. Endapan ditambahkan 50 µL air bebas enzim nuklease (*nuclease free water*) dan 5 µL RNAase. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit dan inkubasi dilanjutkan pada suhu 70°C selama 10 menit (untuk menghentikan aktifitas RNAase). Kemurnian dan persentase kandungan DNA dermatofita diukur menggunakan *NanoDrop Spectrophotometer* pada panjang gelombang 260/280 ÷.

Reaksi Rantai Polimerasi (PCR)

Proses amplifikasi DNA kapang Dermatofita dilakukan menggunakan beberapa primer, yaitu pasangan primer ITS 1 *forward* dan ITS 4 *reverse*; dan primer *Chylin Synthase (CHS1)*. Primer ITS 1 *forward*, (5'-TCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3') dan ITS4 *reverse* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') mengamplifikasi daerah *internal transcribed spacer* (ITS) pada DNA ribosomal (rDNA). Sasaran ampikon kapang Dermatofita sebesar ~600–~700 *bp* (Tartor *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2011). Proses PCR memakai *thermocycler* (Eppendorf, Germany) dengan reagen *master mix platinum green hot start*. Proses reaksi diawali dengan pradenaturasi pada suhu 95°C selama lima menit, 35 siklus amplifikasi DNA pada suhu 95°C selama tiga detik, *annealing* pada suhu 56°C selama satu menit, *extention* pada suhu 72°C selama tiga detik dan *final extention* pada suhu 72°C selama lima menit. Hasil PCR diperiksa menggunakan teknik elektroforesis jel agarose dan pewarna (Invitrogen™ *SYBR™ safe stain*, USA). Hasil elektroforesis diproses supaya menghasilkan gambar pitanya menggunakan ultraviolet (UV) transluminator.

Primer gen *Chitin Synthase 1 (CHS1)* forward 5'-GAA GAA GAT TGT CGT TTG CAT CGT CTC-3' dan reverse 5'-CTC GAG GTC AAA AGC ACG CCA GAG-3' dengan panjang amplikon 288 bp digunakan untuk menentukan keberadaan *dermatophyte specific sequence* dari kapang (Putty *et al.*, 2018). Komposisi larutan kerja dan tahapan pada mesin *thermocycler* yang digunakan untuk primer ini sesuai dengan proses pada saat menggunakan primer ITS, hanya primernya yang diganti menggunakan primer *Chitin Synthase*.

Sekuensing

Hasil PCR yang di-*sekuensing* adalah bahan positif sebagai genus Dermatofita yang dicari sehingga akan diketahui spesiesnya. Pemilihan ini berdasarkan pencocokan hasil PCR antara primer ITS sebagai primer umum kapang dan primer *Chytin Syntase* sebagai primer khusus genus dermatofita.

Urutan DNA hasil *sekuensing* dibaca pertama kali dengan perangkat lunak *Bioedit*[®] dan diselarasakan menggunakan program DNA *Local Alignment Tool* (BLAST) dengan urutan sumber acuan dalam data di *Gene Bank* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Pemotongan Menggunakan Enzim Pemotong

Proses *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dilakukan dengan mencampurkan 10 µL produk PCR (dari ITS) yang positif genus dermatofita, 18 µL air bebas enzim nuklease, 2 µL 10x *Buffer Tango*, 1 µL enzim *Dde I* (ThermoFisher Scientific[®], USA). Campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Reaksi dihentikan dengan memasukkan campuran tersebut pada penangas air (*watherbath*) bersuhu 65°C. Hasil RFLP diperiksa dengan teknik elektroforesis menggunakan jel agarose dan pewarna *SYBR safe* (Invitrogen[®]) yang dialiri listrik dengan tegangan 100 volt selama 25 menit. Hasil elektroforesis dilihat menggunakan UV *transluminator*.

Analisis Data

Data yang didapat dianalisis dengan membedakan gambaran hasil dari spesimen kerokan kulit dan hasil dari pembiakan kerokan kulit. Urutan DNA dianalisis menggunakan *Bioedit* dan *Mega-7* dan disejajarkan dengan basis data pada *GenBank*[®] menggunakan program BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) dan

clustalw2[®] (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). *Open Reading Frame* ditentukan menggunakan <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 50 spesimen diperoleh dari hewan anjing dan kucing yang didiagnosis sebagai dermatofitosis berdasarkan gejala klinis (Tabel 1).

Anjing dan kucing penderita dermatofitosis menunjukkan gejala klinis berupa adanya kebotakan, atau kerontokan rambut yang disertai timbulnya kerak pada daerah luka (lesion) (Tabel 1). Hewan sering menggaruk daerah luka sehingga tidak jarang ditemukan adanya infeksi sekunder oleh bakteri pada lesi akibat garukan yang ditandai dengan adanya penimbunan nanah.

Kapang dermatofita tumbuh dengan koloni berwarna putih dengan dasar koloni pada agar berwarna krem, permukaan atas koloni memiliki tekstur berrambut seperti kapas. Gambaran makroskopik dan mikroskopik koloni dermatofita diperlihatkan pada Gambar 1. Pada Penelitian ini, isolat yang tumbuh pada media SDA yang diimbuhi *cicloheximide* dan *chloramphenicol* tidak semuanya dermatofita. Beberapa dari biakan tersebut ditumbuhi khamir dan beberapa kapang koloni putih (kemungkinan miselia steril). Teknik Riddell (*slide culture*) dan PCR digunakan untuk mengenali kapang berkoloni putih yang mirip dermatofita tersebut.

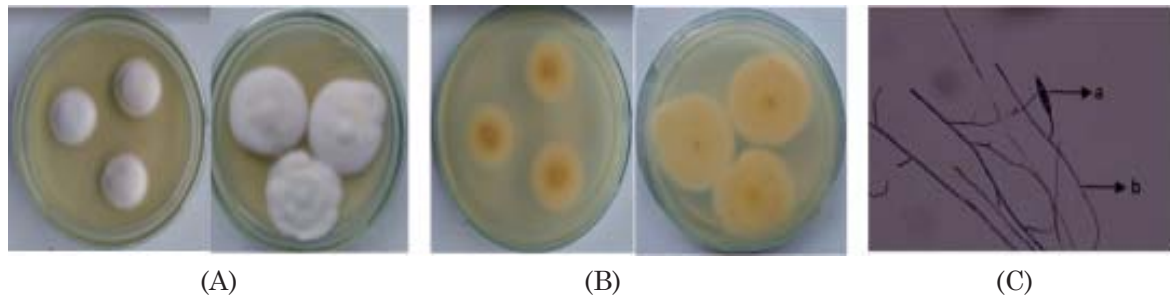
Dari 50 spesimen yang diambil dari pasien terduga menderita dermatofitosis secara klinis, diperoleh isolat kapang dermatofita dari tiga spesimen yang diperiksa dengan teknik biakan dan empat spesimen yang diperiksa dengan teknik molekuler. Spesimen dengan kode B15 merupakan spesimen yang tidak terlacak keberadaan kapang dermatofita yang diperiksa menggunakan teknik biakan, tetapi keberadaan kapang dermatofita dapat terlacak ketika diperiksa menggunakan teknik molekuler. Hasil pemeriksaan kedua teknik disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2 diperoleh data bahwa tidak hanya cendawan dermatofita yang tumbuh pada media penumbuh. Khamir, *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. juga tumbuh pada media agar. Diagnosis banding untuk dermatofitosis, seperti *eczema*, *atopic dermatitis*, dan infeksi *malasezia furfur* menyebabkan

Tabel 1. Data spesimen yang diperoleh dari hewan terduga mengalami dermatofitosis di wilayah Daerah Khusus Ibukota Jakarta dan Kota Bogor

No	Kode spesimen	Jenis hewan	Alamat	Lokasi lesi	Gejala klinik pada pasien
1	J1U1	Anjing	Jakarta	Jari kaki	Kerontokan rambut dan kerak
2	J1U1A	Anjing	Jakarta	Ekor	Kerontokan rambut dan kerak
3	J2	Kucing	Jakarta	Leher	Kulit berkerak dan kemerahan
4	J3	Kucing	Jakarta	Punggung	Kerak tebal dan retak-retak
5	J4	Kucing	Jakarta	Punggung, pangkal ekor	Kerontokan rambut, kerak
6	J4U1	Kucing	Jakarta	Leher	Kerontokan rambut, kerak tebal
7	J5	Kucing	Jakarta	Punggung	Kerontokan rambut
8	J6	Kucing	Jakarta	Punggung	Kerontokan rambut dan kerak
9	J7	Kucing	Jakarta	Ekor	Kerontokan rambut dan kerak
10	J8	Kucing	Jakarta	Leher	Kerontokan rambut
11	B1	Kucing	Bogor	Punggung	Kerak dan peradangan
12	B2	Kucing	Bogor	Punggung	Kerontokan rambut dan kerak
13	B3	Kucing	Bogor	Seluruh tubuh	Kerontokan rambut, peradangan
14	B4	Kucing	Bogor	Ekor	Kerontokan rambut dan kerak
15	B5	Kucing	Bogor	Ekor	Kerak dan peradangan
16	B6	Kucing	Bogor	Bahu dan ekor	Kerontokan rambut dan kerak
17	B7	Kucing	Bogor	Punggung dan ekor	Kerontokan rambut dan kerak
18	B8	Kucing	Bogor	Pinggul	Kerontokan rambut dan kerak
19	B9	Anjing	Bogor	Pinggul	Kerontokan rambut, peradangan
20	B10	Kucing	Bogor	Punggung	Kerontokan rambut, peradangan
21	B11	Kucing	Bogor	Leher	Kerontokan rambut dan kerak
22	B12	Anjing	Bogor	Punggung	Kerontokan rambut dan kerak
23	B13	Kucing	Bogor	Kepala	Kerontokan rambut dan kerak
24	B14	Kucing	Bogor	Kaki kiri	Kerak tebal
25	B15	Kucing	Bogor	Punggung	Kerontokan rambut dan kerak
26	B16	Kucing	Bogor	Kaki	Kerontokan rambut dan kerak
27	B17	Kucing	Bogor	Leher	Kerontokan rambut dan kerak
28	B18	Kucing	Bogor	Tengkuk	Kerontokan rambut dan kerak
29	B19	Kucing	Bogor	Punggung	Kerak pada kulit
30	B20	Anjing	Bogor	Perut, punggung	Kerontokan rambut dan kerak
31	BS1	Anjing	Bogor	Ujung kaki, ekor	Kebotakan, peradangan
32	BS2	Kucing	Bogor	Leher, ekor	Kerontokan rambut, kerak
33	BS3	Kucing	Bogor	Perut, leher, punggung	Kerontokan rambut
34	BS4	Kucing	Bogor	Leher, pangkal ekor	Kerontokan rambut
35	BS5	Kucing	Bogor	Leher, punggung	Kerontokan rambut
36	BS6	Anjing	Bogor	Perut, punggung	Kerontokan rambut, kerak
37	BS7	Kucing	Bogor	Leher	Kerontokan rambut
38	BS8	Kucing	Bogor	Ekor	Kerontokan rambut, kerak
39	BS9	Kucing	Bogor	Ekor	Kerontokan rambut, kerak
40	BS10	Anjing	Bogor	Perut, punggung	Kerak
41	JB1	Anjing	Jakarta	Kepala	Kerontokan rambut, kerak
42	JB2	Anjing	Jakarta	Punggung	Kerontokan rambut, kerak
43	JB3	Anjing	Jakarta	Punggung	Kerak
44	JB4	Kucing	Jakarta	Leher dan punggung	Kerak
45	JB5	Kucing	Jakarta	Punggung, perut	Kerontokan rambut, kerak
46	JB6	Anjing	Jakarta	Kepala, leher	Kerontokan rambut, kerak
47	JB7	Anjing	Jakarta	Leher, punggung	Kerak tebal
48	JB8	Anjing	Jakarta	Perut, punggung	Kerontokan rambut, kerak
49	JB9	Kucing	Jakarta	Kaki, ekor	Kerontokan rambut, kerak
50	JB10	Kucing	Jakarta	Punggung	Kerontokan rambut, kerak

Tabel 2. Keberadaan kapang Dermatofita dan cendawan lainnya pada spesimen uji

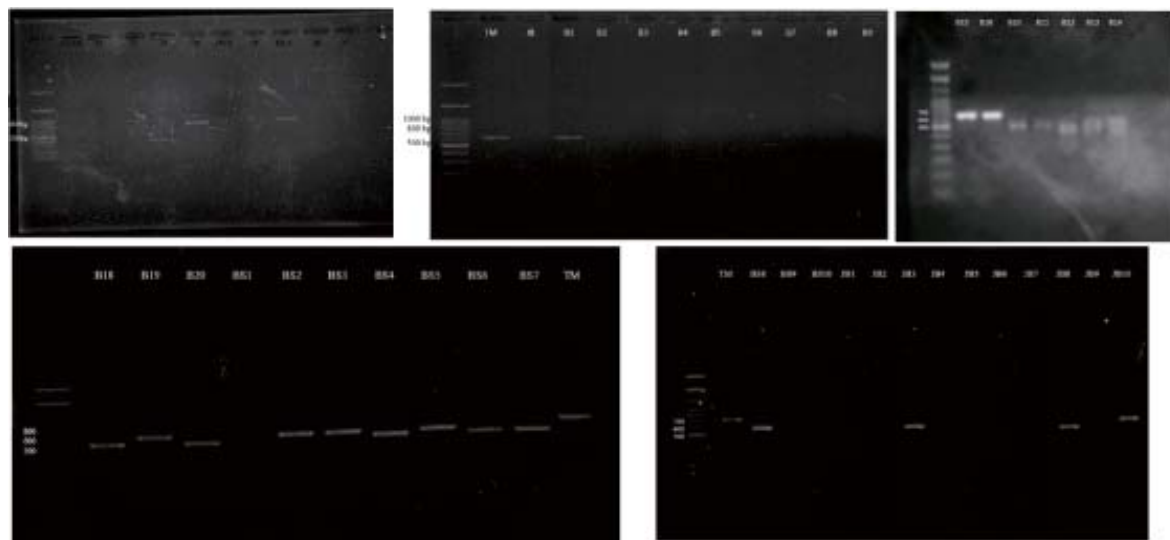
No.	Kode spesimen	Hewan asal spesimen	Keberadaan Dermatofita dari hasil dua teknik pemeriksaan		Jenis cendawan lainnya yang diperoleh dengan teknik biakan
			Biakan	Molekuler	
1	J1U1	Jakarta	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
2	J1U1A	Jakarta	-	-	<i>Chaetomium pachypodiodes</i>
3	J2	Jakarta	-	-	Khamir
4	J3	Jakarta	-	-	Khamir
5	J4	Jakarta	-	-	<i>Chaetomium pachypodiodes</i>
6	J4U1	Jakarta	-	-	Khamir
7	J5	Jakarta	-	-	Khamir
8	J6	Jakarta	-	-	Khamir
9	J7	Jakarta	-	-	<i>Penicillium sp</i>
10	J8	Jakarta	-	-	Kapang koloni putih
11	B1	Bogor	<i>Microsporum sp</i>	<i>Microsporum canis</i>	Khamir
12	B2	Bogor	-	-	<i>Aspergillus subramanianii</i>
13	B3	Bogor	-	-	-
14	B4	Bogor	-	-	-
15	B5	Bogor	-	-	Khamir
16	B6	Bogor	-	-	Khamir
17	B7	Bogor	-	-	-
18	B8	Bogor	-	-	-
19	B9	Bogor	-	-	-
20	B10	Bogor	-	-	-
21	B11	Bogor	-	-	Kapang koloni putih
22	B12	Bogor	-	-	Kapang koloni putih
23	B13	Bogor	-	-	Khamir
24	B14	Bogor	-	-	-
25	B15	Bogor	-	<i>Microsporum canis</i>	-
26	B16	Bogor	<i>Microsporum sp.</i>	<i>Microsporum canis</i>	Khamir
27	B17	Bogor	-	-	Khamir
28	B18	Bogor	-	-	Khamir
29	B19	Bogor	-	-	-
30	B20	Bogor	-	-	Khamir
31	BS1	Bogor	-	-	-
32	BS2	Bogor	-	-	Kapang koloni putih
33	BS3	Bogor	-	-	Kapang koloni putih
34	BS4	Bogor	-	-	Khamir
35	BS5	Bogor	-	-	Khamir
36	BS6	Bogor	-	-	Khamir
37	BS7	Bogor	-	-	Khamir
38	BS8	Bogor	-	-	Khamir
39	BS9	Bogor	-	-	Khamir
40	BS10	Bogor	-	-	Khamir
41	JB1	Jakarta	-	-	Khamir
42	JB2	Jakarta	-	-	Khamir
43	JB3	Jakarta	-	-	Khamir
44	JB4	Jakarta	-	-	-
45	JB5	Jakarta	-	-	Khamir
46	JB6	Jakarta	-	-	Kapang koloni putih
47	JB7	Jakarta	-	-	-
48	JB8	Jakarta	-	-	-
48	JB9	Jakarta	-	-	Khamir
50	JB10	Jakarta	-	-	Khamir



Gambar 1. Tampilan koloni *Microsporium canis* yang diisolasi dari spesimen. (A) Lama inkubasi 14 hari pada media SDA. (B) Tampilan bagian bawah koloni. (C) Gambaran makrokonidia (a) dan hifa (b). Pembesaran: 400 x



Gambar 2. Pita-pita DNA isolat biakan asal spesimen kerokan kulit yang diperiksa menggunakan primer ITS. Lajur TM adalah *Trichophyton mentagrophytes* (BCC F0217) dengan pita DNA pada 750 bp.



Gambar 3. Pita-pita DNA dari spesimen kerokan kulit yang diperiksa menggunakan primer ITS. Lajur TM adalah *Trichophyton mentagrophytes* (BCC F0217) pita DNA pada 750 bp.

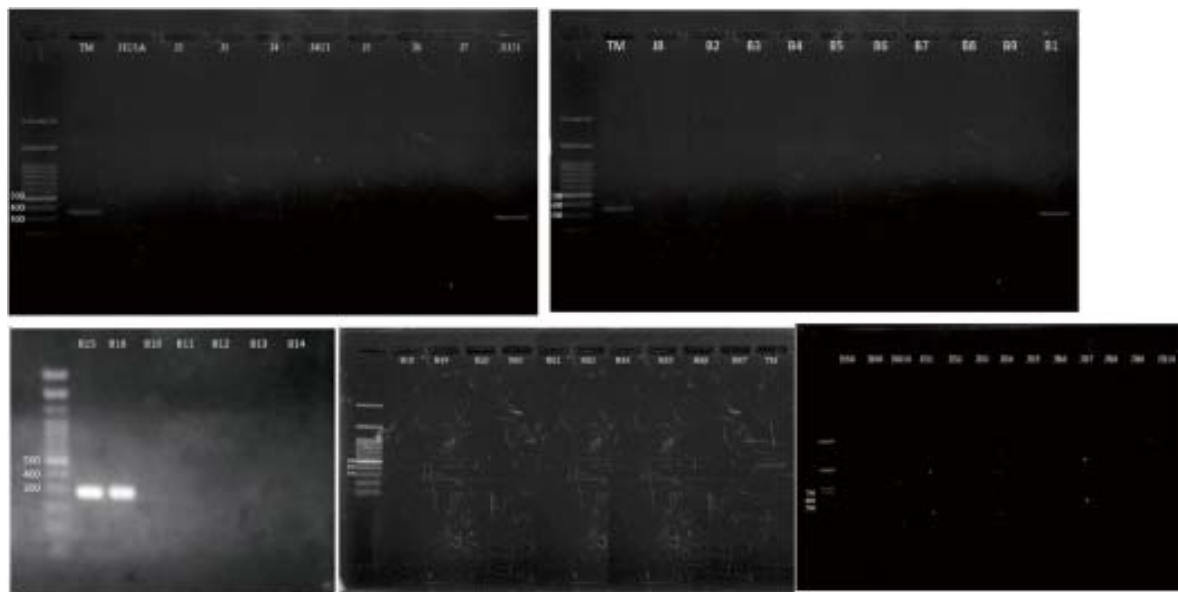
banyaknya kapang nondermatofita yang diisolasi dari spesimen.

Sebagian besar khamir diisolasi dari spesimen. Khamir merupakan mikrob normal dan komensal di permukaan kulit dan dapat dibiakkan dengan media SDA yang ditambah *Chloramphenicol* dan *Cycloheximide* (Chua *et al.*, 2005). Perlu dilakukan kajian lebih lanjut

tentang pertumbuhan *Penicillium* sp. dan *Aspergillus* sp. pada media SDA yang ditambah *Cycloheximide* dan *Chloramphenicol*. Keberadaan dermatofita pada spesimen yang diperiksa dengan teknik molekuler memiliki peluang lebih besar ditemukan dermatofita dibandingkan pemeriksaan dengan teknik biakan pada media penumbuh. Hal ini disebabkan spesimen yang



Gambar 4. Pita-pita DNA *Microsporium* dari hasil pemeriksaan menggunakan primer *CHS* terhadap isolat biakan spesimen kerokan kulit J1U1, B1, dan B16. Lajur TM adalah *Trichophyton mentagrophytes* (BCC F0217) dengan pita DNA pada 350 bp.

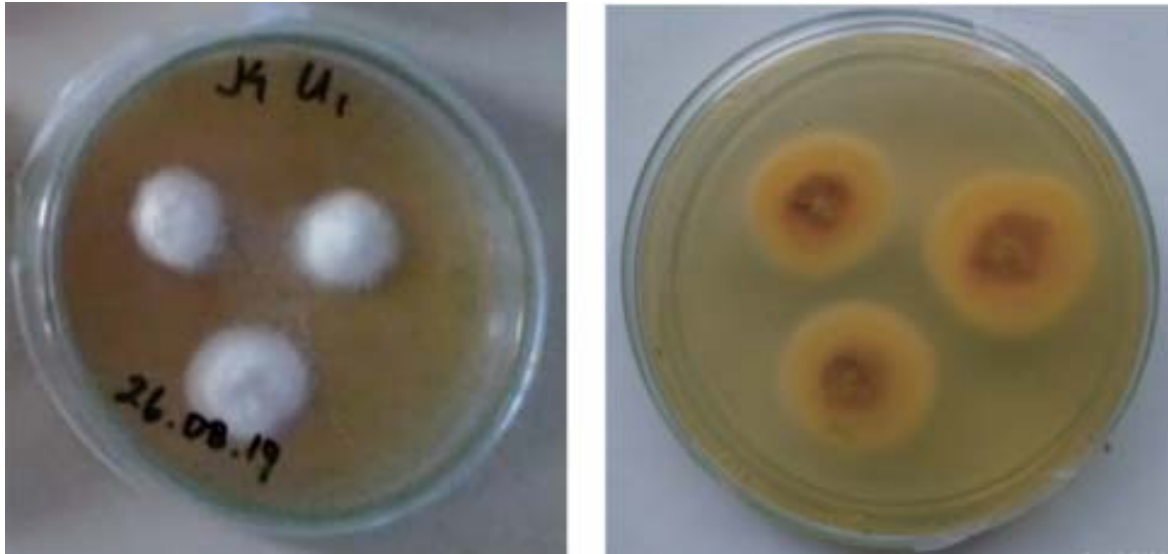


Gambar 5. Pita-pita DNA pada spesimen kerokan kulit J1U1, B1, B15, dan B16 yang diperiksa menggunakan primer *Chytin Synthase*. Lajur TM adalah *Trichophyton mentagrophytes* (BCC F0217) pita DNA pada 350 bp.



Gambar 6. Hasil *digesti* dari hasil PCR menggunakan primer ITS yang dilanjutkan menggunakan enzim *Dde I*. *M. canis* dikenali terdapat di dalam spesimen J1U1, B16, B1, dan B15. Lajur TM adalah isolat kontrol *T. mentagrophytes* (BCC F0217).

tidak ada makrokonidia tidak akan tumbuh ketika dibiakkan di atas SDA. Tetapi komponen hifa yang ada di dalam spesimen tersebut akan teramplifikasi oleh primer yang digunakan dan akan memperlihatkan keberadaan DNA hifa saat diperiksa menggunakan teknik elektroforesis. Kemungkinan lain yang menyebabkan dermatofita tidak tumbuh di media SDA adalah struktur vegetatif dermatofita, seperti hifa dan konidia, di dalam spesimen kerokan kulit sudah mati sehingga. Keberadaan komponen kapang yang mati di dalam kerokan kulit bisa disebabkan sewaktu pengambilan spesimen, hewan dalam rangkaian pengobatan yang dapat mematikan dermatofita, namun lesinya masih belum sembuh sempurna. Namun, dengan teknik PCR, DNA dari struktur kapang yang mati pun masih bisa diekstraksi dan diamplifikasi untuk dilacak keberadaan DNA-nya dari komponen sel menggunakan



Gambar 7. Koloni kapang *Chaetomium pachypodiodes* dengan tekstur berrambut seperti kapas dan padat serta topografi yang memiliki ketinggian hifa yang tidak beraturan.

primer yang sesuai.

Tartor *et al.* (2016) dan Zhang *et al.* (2011) menyatakan bahwa sasaran amplicon dermatofita sebesar ~600–~800 bp. Besaran amplicon ini serupa dengan hasil penelitian ini yang dibandingkan dengan isolat kontrol *T. mentagrophytes* (BCC F0217) yang ditampilkan dalam Gambar 2 dan 3. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa di dalam tiga isolat hasil biakan dari spesimen J1U1, B1, dan B16, dan empat spesimen J1U1, B1, B15, dan B16 terdapat DNA dermatofita menggunakan primer *Chytin Synthase*. Ketika dilanjutkan pemeriksaannya menggunakan primer ITS diperoleh hasil bahwa *M. canis* ada di dalamnya. Hasil pemeriksaan dengan teknik molekuler menunjukkan peluang keberhasilan yang lebih besar dibandingkan dengan pemeriksaan melalui pembiakan spesimen kerokan kulit pada media penumbuh (konvensional). Bentuk makrokonidia dan mikrokonidia pada penelitian ini lebih mudah diamati secara mikroskopis setelah biakan kapang dermatofita berumur 14 hari sebagaimana dinyatakan dalam laporan Ainsworth dan Austwick (1973).

Pada saat diperiksa menggunakan primer ITS, spesimen biakan dan spesimen kerokan kulit menunjukkan pita DNA dengan panjang amplicon tertentu. Namun, ketika diperiksa menggunakan primer *Chytin Synthase*, hanya ada tiga spesimen biakan dan empat spesimen kerokan kulit yang menunjukkan pita pada panjang amplicon sekitar 400 bp. Hal in

disebabkan karena primer ITS merupakan primer umum untuk semua kapang, sedangkan primer *Chytin Synthase* merupakan primer khusus untuk genus-genus dermatofita. Wilayah *internal transcribed spacer* (ITS) merupakan bagian dari *nuclear ribosomal gene cluster* yang digunakan sebagai penanda DNA spesies pada kingdom cendawan (Schoch *et al.*, 2012). Penelitian ini menggunakan primer ITS1 (*forward*) dan ITS4 (*reverse*) sebagai primer umum untuk pengenalan kapang. Gen *Chitin Synthase 1* digunakan untuk menentukan keberadaan *Dermatophyte specific sequence* sehingga pita yang muncul merupakan hasil dari proses PCR dari kapang dermatofita (Putty *et al.*, 2018). Hasil PCR dengan primer *Chitin Synthase 1* disajikan pada Gambar 4 dan 5. Pita DNA yang muncul pada hasil PCR dengan primer gen *Chitin Synthase 1* dapat dipastikan bahwa terdapat empat isolat yang merupakan kapang dermatofita, sedangkan cendawan lain yang muncul pita pada PCR yang menggunakan primer ITS, tetapi tidak muncul pita pada PCR primer gen *Chitin Synthase 1* merupakan cendawan saprofit yang bisa tumbuh pada permukaan kulit dan bukan termasuk genus dermatofita.

Spesimen yang terdapat dermatofita berdasarkan pemeriksaan dengan teknik PCR kemudian dipotong dengan enzim pemotong *Dde1* memperlihatkan pola seperti yang disajikan dalam Gambar 6. Isolat kapang yang diisolasi dari spesimen J1U1, B15, B16, dan B1

U1J1	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAATAATACATGG	60
B15	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAATAATACATGG	60
B16	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAATAATACATGG	60
LC317653	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAATAATACATGG	60
AJ252329.1	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAATAATACATGG	60
B1	-----ATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCG-----AATCTTTGAACG	42
	* * * * *	
U1J1	TGCGTTAGGCCAGCCTGCCGGCCGGTCTGGAGGCGGTGGTATGTCCCATTCGCCCAGGA	120
B15	TGCGTTAGGCCAGCCTGCCGGCCGGTCTGGAGGCGGTGGTATGTCCCATTCGCCCAGGA	120
B16	TGCGTTAGGCCAGCCTGCCGGCCGGTCTGGAGGCGGTGGTATGTCCCATTCGCCCAGGA	120
LC317653	TGCGTTAGGCCAGCCTGCCGGCCGGTCTGGAGGCGGTGGTATGTCCCATTCGCCCAGGA	120
AJ252329.1	TGCGTTAGGCCAGCCTGCCGGCCGGTCTGGAGGCGGTGGTATGTCCCATTCGCCCAGGA	120
B1	CACATTGCGCCCCCTGGCAT----TCCGGGGGCATGCTGTTCGAGCGTCATTTCAC	97
	* * * * *	
U1J1	GCCGGAATCGCGGCCTGACCACTGCTTTTCGGGCGCGTCCCC-CTCCCTCCCACCCCCCT	179
B15	GCCGGAATCGCGGCCTGACCACTGCTTTTCGGGCGCGTCCCC-CTCCCTCCCACCCCCCT	179
B16	GCCGGAATCGCGGCCTGACCACTGCTTTTCGGGCGCGTCCCC-CTCCCTCCCACCCCCCT	179
LC317653	GCCGGAATCGCGGCCTGACCACTGCTTTTCGGGCGCGTCCCC-CTCCCTCCCACCCCCCT	179
AJ252329.1	GCCGGAATCGCGGCCTGACCACTGCTTTTCGGGCGCGTCCCC-CTCCCTCCCACCCCCCT	179
B1	CCCTAAGCCCGGCTTGTGTGATGG----ACGACCGTCCCCTCCCAGTAACCACCC	152
	* * * * *	
U1J1	AAGCGGTGGGTGGTACTGGGGAGGGGG---GACGGTCGTCCATCACACAAGCCGGGCT	235
B15	AAGCGGTGGGTGGTACTGGGGAGGGGG---GACGGTCGTCCATCACACAAGCCGGGCT	235
B16	AAGCGGTGGGTGGTACTGGGGAGGGGG---GACGGTCGTCCATCACACAAGCCGGGCT	235
LC317653	AAGCGGTGGGTGGTACTGGGGAGGGGG---GACGGTCGTCCATCACACAAGCCGGGCT	235
AJ252329.1	AAGCGGTGGGTGGTACTGGGGAGGGGG---GACGGTCGTCCATCACACAAGCCGGGCT	235
B1	ACCGCTTAGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCCCCGAAAAGCAGTGGTCAGGCCGGAT	212
	* * * * *	
U1J1	TGAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGT	295
B15	TGAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGT	295
B16	TGAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGT	295
LC317653	TGAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGT	295
AJ252329.1	TGAGGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGT	295
B1	TCCGGCTCCTGGGCGAATGGGACATACCACCGCCTCCAGGACC---GGCCGGCAGGCTGG	269
	* * * * *	
U1J1	GCGTTCAAAGATTCGATGATTACCGGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGC	355
B15	GCGTTCAAAGATTCGATGATTACCGGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGC	355
B16	GCGTTCAAAGATTCGATGATTACCGGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGC	355
LC317653	GCGTTCAAAGATTCGATGATTACCGGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGC	355
AJ252329.1	GCGTTCAAAGATTCGATGATTACCGGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGC	355
B1	CCTAAGCACCATGTATTATTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTGAAT	329
	* * * * *	
U1J1	TGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAG-----ATCCGTTGTTGAAAGTTTTAA	406
B15	TGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAG-----ATCCGTTGTTGAAAGTTTTAA	406
B16	TGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAG-----ATCCGTTGTTGAAAGTTTTAA	406
LC317653	TGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAG-----ATCCGTTGTTGAAAGTTTTAA	406
AJ252329.1	TGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAG-----ATCCGTTGTTGAAAGTTTTAA	406
B1	TAAGCATATC-AATAAGCCGGAGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTGCAAGTTGGCC	388
	* * * * *	
U1J1	CTGATT-----GCCTTGCTC	422
B15	CTGATT-----GCCTTGCTC	422
B16	CTGATT-----GCCTTGCTC	422
LC317653	CTGATT-----GCCTTGCTC	422
AJ252329.1	CTGATT-----GCCTTGCTC	422
B1	CCGAAGCTCTTCGTTCTCCCCGGGCTCGGGGAAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTC	448
	* * * * *	
U1J1	GCTCAGACGGT--ATGTTCTTTCAAGAGTGTGTTTTCCAGAGTAA-465	
B15	GCTCAGACGGT--ATGTTCTTTCAAGAGTGTGTTTTCCAGAGTAA-465	
B16	GCTCAGACGGT--ATGTTCTTTCAAGAGTGTGTTTTCCAGAGTAA-465	
LC317653	GCTCAGACGGT--ATGTTCTTTCAAGAGTGTGTTTTCCAGAGTAA-465	
AJ252329.1	GCTCAGACGGT--ATGTTCTTTCAAGAGTGTGTTTTCCAGAGTAA-465	
B1	GGCCGACGCTTTCTGGTCTACGGACCGGTTGCCTCGGGCGGCGGCGGCTC 495	
	* * * * *	

Gambar 8. *Sequence alignment* dari isolat *M. canis* pada spesimen U1J1, B15, B16, B1 dimulai dari *start codon*. Isolat *M. canis* LC317653 dan AJ252329.1 diperoleh dari *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

dikenali sebagai *M. canis* berdasarkan hasil sekuensing menggunakan primer ITS1 dan ITS 4 sebagaimana disajikan pada Gambar 8.

Berdasarkan hasil pada Gambar 6, kala direstriksi dengan enzim DdeI, isolat koloni kapang asal J1U1 dan B16 menampilkan lima pita dengan ukuran 750 bp, 550 bp, 420 bp, 220 bp, dan 200 bp. Isolat koloni kapang asal B1 menampilkan dua pita dengan ukuran 220 bp dan 200 bp. Spesimen J1U1, B16, B1 dan B15 menampilkan empat pita dengan ukuran 550 bp, 420 bp, 220 bp, dan 200 bp. Hasil ini memperlihatkan kemungkinan adanya perbedaan susunan basa penyusunnya secara utuh. Oleh karena itu, perlu dirancang penelitian lebih lanjut untuk memastikan apakah pola potongan ini dapat dipakai sebagai marka molekuler, atau tidak.

SIMPULAN

Pemeriksaan menggunakan teknik PCR dinilai memiliki ketepatan yang lebih baik dan cepat untuk mendiagnosis dermatofitosis dibandingkan dengan pemeriksaan konvensional. Genus *Trichophyton* dan spesies *M. canis* mempunyai pola DNA yang berbeda pada pemotongan fragmen ITS dengan enzim *DdeI*. Isolat *M. canis* dari spesimen isolat B1 mempunyai pola pita DNA yang berbeda dengan isolat lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Balai Besar Penelitian Veteriner yang telah mendanai penelitian ini, kepada teknisi laboratorium Mikologi, Bakteriologi dan Bioteknologi BBLitvet yang turut membantu selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad RZ, Gholib D. 2016. An Important Mycotic Diseases In Animal Livestock Caused By Some Agriculture Fungi In Indonesia. *Int J Trop Vet Biomed Res* 1(1): 38-44.
- Ainsworth GC, Austwick PKC. 1973. *Fungal Diseases of Animals*. Second Edition. England. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, 216 p.
- Al-Doory Y. 1980. *Laboratory Medical Mycology*. Philadelphia. Lea & Febiger. 410 p.
- Alshawa K, Beretti JL, Lacroix C, Feuilhade M, Dauphin B, Quesne G. 2012. Successful identification of clinical dermatophytes and *Neoscytalidium* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 50(7): 2277-2281. doi:10.1128/JCM.06634-11.
- Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. 2014. Dermatophyte fungi: Infections, Diagnosis and Treatment. *SMU Medical Journal* 1(2): 50-62.
- Chua KB, Chua I, Chua I, Chong KH, Chua KH. 2005. A modified mycological medium for isolation and culture of *Malassezia furfur*. *Malaysian J Pathol*. 27(2):99-105.
- Day MJ, Breitschwerdt E, Cleaveland S, Karkare U, Khanna C, Kirpensteijn J, Kuiken T, Lappin MR, McQuiston J, Mumford E, Myers T, Palatnik-deSousa CB, Rubin C, Takashima G, Thiermann A. 2012. Surveillance of zoonotic infectious disease transmitted by small companion animals. *Emerg Infect Dis* 18(12): e1. doi:10.3201/eid1812.120664.
- Faggi E, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonzo E, Mancianti F. 2001. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol* 39: 3382-3385. doi:10.1128/JCM.39.9.
- Gholib D, Rachmawati S. 2010. Kapang Dermatofit *Trichophyton verrucosum* Penyebab Penyakit Ringworm Pada Sapi. *Wartazoa* 20(1): 43-53.
- Indarjulianto S, Purnamaningsih H, Raharjo S, Yanuartono, Ikliptikawati DK, Sakan GY. 2014. Isolasi dan Identifikasi *Microsporum canis* pada Anjing Penderita Dermatofitosis di Yogyakarta. *J Veteriner* 15(20): 212-216.
- Kim H, Jin H, Kim S, Wang HY, Choi Y, Bang H, Park J, Lee JH, Won, Y, Ahn KJ, Kim YK, Lee H. 2011. PCR-reverse blot hybridization assay for species identification of dermatophytes. *Korean J Med Mycol* 16: 86-98. doi:10.17966/kjmm.2011.16.3.86.
- Liu G, Chenghua H E, Zhang H. 2014. Identification and characterization of dermatophyte species and strains with PCR amplification. *Exp TherMed*. 8:545-550. doi:10.3892/etm.2014.1785.

- Melo P, Lança A, Mané BA, Regalla A, Tavares L, Fernando B, Ferreira da Silva M J, Oliveira M. 2018. Tinea corporis by *Microsporum audouinii* in a female chimpanzee (*Pan troglodytes*) from Guinea Bissau: A case report. *J Med Primatol* 1-4. doi:10.1111/jmp.12370.
- Mohammadi R, Abastabar M, Mirhendi H, Badali H, Shadzi S, Chadeganipour, M, Pourfathi P, Jalalizand N, Haghani I. 2015. Use of restriction fragment length polymorphism to rapidly identify dermatophyte species related to dermatophytosis. *Jundishapur J. Microbiol.* 8(6):e17296. doi:10.5812/jjm.8(6)2015. 17296.
- Moriello KA. 2001. Diagnostic Techniques for Dermatophytosis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 16(4): 219–224. doi:10.1053/svms.2001.27597.
- Moriello K. 2014. Feline Dermatophytosis Aspects pertinent to disease management in single and multiple cat situations. *J Feline Med Surg* 16: 419–431. doi:10.1177/1098612X14530215.
- Pal M. 2017. Dermatophytosis in an adult cattle due to *Trichophyton verrucosum*. *Anim Husb Dairy Vet Sci* 1(1): 1–3. doi:10.15761/AHDVS.1000106.
- Pereira KHNP, Oliveira ELR, Gonçalves RAB, Rolim LS, Neto RND, Castilho MS, Teixeira RC, Rahal SC. 2018. Dermatophytosis Caused by *Microsporum canis* in a Free-Living Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Acta Sci Vet* 46(Suppl 1): 262.
- Putty K, Jyothi JS, Sharanya M, Reddy MS, Sandeep GSR, Abhilash M, Venkatesh J, Yadav, Purushotham P, Naidu IK, Chowdhary AU, Rani KS, Pavani V, Vishwas K, Reddy M, Srinath Ch, Swapna P, Sreeja A, Kumar E, Reddy NY, Lakshmi KD. 2018. PCR as a Rapid Diagnostic Tool for Detection of Dermatophytes. *Int J Curr Microbiol App Sci* 7(4): 2021-2025. doi:10.20546/ijemas.2018.704.232
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 2011. *Molecular cloning : A Laboratory Manual* 3rd ed. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Consortium FB. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS USA.* 109(16): 6241-6246.
- Scott DW, Miller WH, Griffin CE. 2001. *Muller and Krik's Small Animal Dermatology*. 6th ed. Philadelphia (US):W.B. Saunders. Hlm. 336-361.
- Tartor YH, El Damaty HM, Mahmmud YS. 2016. Diagnostic performance of molecular and conventional methods for identification of dermatophyte species from clinically infected Arabian horse in Egypt. *Vet Dermatol* 27: 401-e102. doi:10.1111/vdet.12372.
- Weese JS, Fulford M. 2010. Fungal Diseases. In. Weese JS, Fulford M: *Companion Animal Zoonoses*. New Jersey. Wiley-Blackwell. Hlm. 278-279.
- Zhang R, Ran Y, Day Y, Zhang H, Lu Y. 2011. A case of kerion celsi caused by *Microsporum gypseum* in a boy following dermatoplasty for a scalp wound from a road accident. *Med Myco* 49: 90-93. doi:10.3109/13693786.2010.503196.