

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN *pneumococcal surface adhesin A (psaA)* SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI *Streptococcus pneumoniae*****ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *pneumococcal surface adhesin A (psaA)* GENE AS A FACTOR VIRULENSI OF *Streptococcus pneumoniae***Mustika Sari<sup>1,2</sup>, Nikmatia Latief<sup>3</sup>, Muh. Nassrum Massi<sup>3</sup>

1. Sekolah Pascasarjana, Ilmu Biomedik, Universitas Hasanuddin
  2. Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Katolik Misi Charitas Palembang
  3. Fakultas Kedokteran Universitas Hassanuddin Makassar
- Corresponding author : Jurnal.sps.unhas@gmail.com

Received 19 Desember 2019 ; Published, 5 Januari 2020

**Abstrak**

*Streptococcus pneumoniae* (pneumokokus) merupakan flora normal pada traktus respiratorius atas yang juga dapat menjadi bakteri patogen penyebab *invasive Pneumococcal Disease* (IPD) seperti pneumoniae, otitis media, dan meningitis. Namun belum banyak yang melaporkan kejadian oleh bakteri ini pada penderita IPD khususnya di Kota Makassar. Belum ada metode *gold standar* dalam mengidentifikasi pneumokokus menjadi salah satu faktor sulitnya menegakkan diagnosis terkait dengan bakteri ini. Maka dari itu tujuan dari penelitian ini untuk mengevaluasi kinerja metode pemeriksaan baik dengan menggunakan metode konvensional (bakteriologi kultur) dan metode molekuler dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam mengisolasi dan identifikasi *gen psaA* sebagai faktor virulensi. Metode yang digunakan secara konvensional adalah mikroskopis, kultur, dan uji biokimia dimana hasilnya mengarahkan pada spesies *Streptococcus* kemudian dilakukan uji susceptibility dengan *ophocin* sedangkan untuk metode molekuler digunakan teknik PCR sebagai pembanding. Diperoleh hasil uji Ophocin 3 (12%) sampel yang sensitive kemudian dilanjutkan dengan melakukan amplifikasi PCR *gen PsaA* menggunakan primer spesifik maka diperoleh juga pita dengan ukuran 834 bp yang menunjukkan bahwa pada ke-3 (100%) isolate *S.pneumoniae* terdeteksi *gen PsaA*

**Kata kunci : Sputum, *psaA*, PCR, *Streptococcus pneumoniae*****Abstract**

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a normal flora in the upper respiratory tract which can also be a pathogenic bacterium that causes *invasive Pneumococcal Disease* (IPD) such as pneumoniae, otitis media, and meningitis. But not many have reported the incident by this bacterium in people with IPD, especially in the city of Makassar. It was only reported that pneumococcal (30-50%) was the main cause of pneumonia, which in 2000 caused more than 2 million deaths in children. There is no method *gold standard* in identifying pneumococcal to be one of the factors in the difficulty of establishing a diagnosis related to this bacterium. Therefore the purpose of this study is to evaluate the performance of the examination method both using conventional methods (culture bacteriology) and molecular methods with *Polymerase Chain Reaction* (PCR) in isolating and identifying *the psaA gene* as a virulence factor. The methods used conventionally are microscopic, culture, and biochemical tests where the results lead to the species *Streptococcus* then a susceptibility test with *ophocin* is performed while for the molecular method the PCR technique is used as a comparison. Test results obtained Ophocin 3 (12%) samples were sensitive then followed by PCR gene amplification using specific primers PSAA then diperoleh also tape the size of 834 bp indicates that the isolates *S. pneumoniae* detected PSAA gene.

**Keywords: Sputum, *psaA*, PCR, *Streptococcus pneumoniae***

## Pendahuluan

*Streptococcus pneumoniae* (pneumokokus) merupakan penyebab utama penyakit pada manusia yang yang dikenal dengan *Invasive Pneumococcal Disease* (IPD). Di negara berkembang, pneumokokus bertanggung jawab atas kematian anak di bawah usia 5 tahun yang sebagian besar (60-80%) disebabkan oleh pneumonia pneumokokus namun bakteri ini juga dapat menyebabkan *sinusitis*, *otitis media*, *mastoiditis*, *conjunctivitis*, *meningitis*, dan *endocarditis* (Dwiyana Yosepha.2015). Infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini terjadi melalui jalan saluran pernafasan kemudian berkolonisasi di dalam nasofaring lalu bakteri akan menembus sistem pertahanan barrier dan masuk ke dalam aliran darah yang selanjutnya persisten di selaput otak dan *Cerebro Spinal Fluid* (CSF) yang pada akhirnya dapat menyebabkan meningitis (Maestro B and Sanz JM, 2016).

Di Indonesia belum ada data prevalensi *pneumokokus* sebagai penyebab IPD, namun menurut Profil Kesehatan Indonesia (2017) pneumonia merupakan penyebab kematian (16%) balita, yaitu diperkirakan sebanyak 920.136 balita di tahun 2015 dan diketahui bahwa *Pneumokokus* merupakan agen etiologi yang paling penting dari terjadinya pneumonia yang didapat di masyarakat (*Community Aquired Pneumonia*) dan termasuk penyebab terbanyak ke dua meningitis setelah bakteri *Neisseria meningitides* (Alonsodevelasco, 1995).

Minimnya pelaporan penyakit oleh bakteri ini khususnya di Indonesian, disebabkan karena diagnosis infeksi *pneumokokus* secara klinis sering tidak khas dan metode kultur (*gold standart method*) yang digunakan untuk mendeteksi sering memberikan hasil negative palsu hal ini bisa disebabkan karena sifat bakteri yang *fastidious* (Bandettini R, Melioli G, 2012). Selain itu tingginya biaya uji baik secara kultur maupun uji antisera, rentan kontaminasi yang tinggi dan fasilitas dalam mengidentifikasi kapsul pneumokokus yang terbatas di setiap laboratorium menyebabkan sulitnya menemukan kasus penyebab bakteri ini sehingga kini dilakukan identifikasi pneumokokus secara molekuler dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Deteksi pneumokokus secara molekuler diketahui memiliki keuntungan dibandingkan dengan metode konvensional (kultur) dimana metode molekuler dapat mendeteksi asam nukleat dari bakteri pada specimen dalam jumlah yang sedikit, tanpa perlu khawatir adanya pengaruh dari pemberian antibiotik pada pasien sebelum sampel diperiksa kemudian biaya dalam pemeriksaan yang relative lebih rendah, dan waktu pemeriksaan yang lebih efisien. Hal ini selain dapat membantu dalam mengidentifikasi juga dapat membantu dalam pemberian terapi secara tepat dan benar kepada pasien yang dicurigai menderita IPD (Bandettini RMG, 2012).

Berdasarkan informasi yang diperoleh dari genom *Streptococcus pneumoniae*, telah berhasil diidentifikasi beberapa gen faktor virulensi yang terdapat pada permukaan dinding sel bakteri salah satunya yaitu *pneumococcal surface adhesion A* (PsaA) yang diketahui dapat menginduksi respon imun humoral (antibody) dan merupakan *protein lipidik* 36-kDa yang menjadi salah satu protein permukaan yang diekspresikan hampir seluruh serotype dari pneumokokus (90 serotipe). Hal ini sejalan dengan penelitian Sanz, et al (2017) menyatakan bahwa teknik PCR yang menggunakan gen PsaA mampu mendeteksi 55 (91,7%) isolate streptococcus pneumoniae dari 60 isolat yang berasal dari cairan pleura. Demikian dengan penelitian Putri (2015) menggunakan PCR dengan gen PsaA yang memperoleh sebesar 52 (71,2%) isolate *pneumokokus* dari 73 isolat yang berasal dari swab nasofaring anak di Lombok (Putri RRH, 2014). Maka tujuan dari penelitian ini untuk mengevaluasi apakah gen *psaA* ini dapat digunakan untuk mendeteksi isolate *streptococcus pneumoniae* pada sampel klinis sputum di RSUP Wahidin Sudirohusodo Makassar.

## Metode Penelitian

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel putum, media agar darah, media agar coklat, reagen pewarnaan gram (gentian violet, safranin, lugol isolat klinis *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49136, agarosa, aquades, buffer TBE, EtBr, loading dye, marker 100 bp, PCR kit

### Metode Kerja

#### 1. Mikroskopis dan Kultur Sputum

Semua sampel yang diperoleh diidentifikasi terlebih dahulu secara mikroskopis dengan pewarnaan gram dan didapat hasil pemeriksaan nya merupakan bakteri gram positif, diplococcus berbentuk lancet. Kemudian sampel diisolasi pada media agar darah plate (*Blood Agar Plate/BAP*) dan agar coklat (*Chocolate Agar Plate/CAP*) agar base oxoid® selama 24 jam dengan suhu inkubasi 35° dengan tambahan CO<sub>2</sub> 5%. Pertumbuhan dari BAP dan CAP menghasilkan pertumbuhan koloni bakteri yang memiliki zona bening α-hemolitik (zona hijau), *waterish*, hasil negative ketika diuji dengan katalse lalu pertumbuhan koloni bakteri ini dikonfirmasi dengan uji suseptibility yang sensitif dengan *Opthochin*.

#### 2. Isolasi gen *PsaA*

Isolasi gen *PsaA* dilakukan dengan metode boiling pemanasan air pada suhu 90-100°C. Pemanasan membantu dalam melisis moleku-molekul selain DNA. Metode ini menggunakan PBS (Phospat buffer saline) sebanyak 200µl dan koloni bakteri yang dimasukkan didalam tabung effendor lalu dimasukkan ke dalam waterbath pada suhu 90°C selama 30 menit.

#### 3. Amplifikasi gen *PsaA* dengan PCR

Komponen reaksi PCR dalam sejumlah 12,5 µL dibuat dengan mereaksikan 0,5 µL primer *forward* (5pmol), 0,5 µL primer *reverse* (5pmol), dan 2,5 µL DNA hasil isolasi dan digenapkan dengan Master Mix go Taq green. Kondisi PCR yang digunakan untuk 35 siklus adalah denaturasi awal 95°C selama 10 menit, penempelan pada primer 52°C selama 30 detik, dan pemanjangan fragmen DNA pada 72°C selama 2 menit. Pemanjangan fragmen DNA akhir pada 72° selama 8 menit. Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan primer spesifik dengan urutan sebagai berikut:

F : [5'CTTTCTGCAATCATTCTTG3'], R : [3'GCCTTCTTTACCTTGTCTGC5'] dengan ukuran gen target *psaA* yang diharapkan adalah 834 bp (Scott,et.al, 2003).

#### 4. Urutan analisis (*Sequence analysis*)

Urutan amplikon dari *Streptococcus pneumoniae* yaitu gen *PsaA* (GenBank accession no. U53509) merupakan data yang diterbitkan dari CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) dimana urutan ini 90% diharapkan dapat digunakan sebagai kontrol positif untuk gen *PsaA* dalam reaksi PCR. (Sampson, J,et.al, 1994).

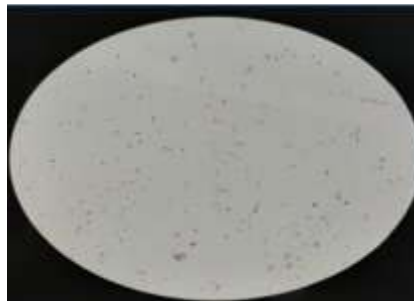
## Hasil

### A. Isolat klinis *Streptococcus pneumoniae*

Penelitian ini menggunakan *Streptococcus pneumoniae* dari sputum pasien suspek pneumonia,. Sputum yang telah dikumpulkan diperiksa secara mikroskopis dan dilanjutkan dengan isolasi kultur menggunakan media BAP dan CAP. kemudian dilakukan uji suseptibiliti dengan *Opthocin* dan diperiksa dengan PCR untuk mengkonfirmasi. Hasil identifikasi dapat dilihat pada gambar dibawah ini.

#### 1. Pemeriksaan secara mikroskopis

Sputum diwarnai dengan metode pewarnaan gram dan diperiksa dengan mikroskop pembesaran 100x diperoleh hasil morfologi dari sampel yang ada yaitu gram positif diplococcus lancet.

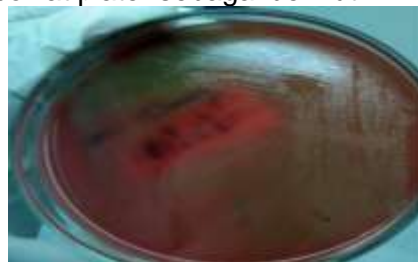


Gambar 1. *Streptococcus pneumoniae*

Sumber: dokumen pribadi

#### 2. Isolasi pada media kultur

Sputum yang telah diidentifikasi secara mikroskopis hasil isolasinya pada media agar darah plate dan media agar coklat plate sebagai berikut:



Gambar 2. Isolate *Streptococcus pneumoinae*

Sumber: dokumen pribadi

#### 3. Uji Opthocin

Isolat *S.pneumoniae* sensitive terhadap *Opthocin*



Gambar 3. Uji sensitivitas

Strain sebelah kiri sensitif terhadap opthocin dan di sebelah kanan resisten dengan opthocin

Tabel 1. Hasil identifikasi sputum

| Sampel | Kultur                                  | Mikroskopis              | Katalase | Ophocin    |
|--------|---|--------------------------|----------|------------|
| Q1     | α- hemolisa, mukoid, permukaan cekung   | Gram + dipcoccus lancet  | Negatif  | S (14 mm)  |
| Q2     | α- hemolisa, mukoid, permukaan cekung   | Gram + dipcoccus, lancet | Negatif  | S (13,5mm) |
| Q3     | α- hemolisa, mukoid, permukaan cekung α | Gram + dipcoccus lancet  | Negatif  | S (14 mm)  |

### B. Amplifikasi gen *pneumococcal surface adhesion A (psaA)*

Pada proses identifikasi dengan teknik PCR digunakan primer spesifik untuk mengisolasi gen *psaA* dengan panjang ukuran pasangan basa nya 834bp. Hasil produk PCR ini divisualisasi dengan metode elektroforesis dengan agarose 2%. Visualisasi hasil amplikasi PCR dapat dilihat pada gambar 5.



**Gambar 4.** Produk PCR gen PsaA

**Sumber:** dokumen pribadi

## Pembahasan

Tahapan awal pada penelitian ini adalah mengumpulkan spesimen sputum dari pasien suspek pneumonia di RSUP Wahidin Sudirohusodo Makassar. Selanjutnya sampel yang telah dikumpulkan diidentifikasi secara mikrobiologik. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 1 dimana hasil pemeriksaan secara mikroskopis dengan pewarnaan gram menunjukkan hasil gram positif diplococcus lancet yang merupakan ciri morfologi *S.pneumoniae*.

Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan melihat koloni bakteri yang tumbuh pada media agar darah dan darah cokelat. Sifat bakteri yang *fastidious* menyebabkannya harus disolasi pada media yang diberi tambahan darah untuk tumbuh. Terlihat pertumbuhan koloni membentuk zona kehijauan (aktivitas  $\alpha$  hemolisa) akibat adanya lisis eritrosit yang parsial (gambar 2). Uji katalase yang negatif, dan uji sensitivitas terhadap *optochin* cukup untuk menunjukkan hasil identifikasi merupakan *Streptococcus pneumoniae*, sesuai dengan identifikasi pada kontrol *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49136.

Terdapat banyak kesulitan dalam mengidentifikasi *S.pneumoniae* secara konvensional terutama pada *S.pneumoniae nontypeable* (NT) yang memiliki kesamaan hasil karakteristik identifikasi secara konvensional dengan bakteri *Streptococcus viridians*. *S. viridians* sendiri cukup peka terhadap optochin (Sensitivitas < 14 mm) dan tidak larut dalam empedu juga terhadap *S.pneumoniae* yang dilaporkan telah ada yang resisten terhadap *Optochin*. Hal ini dapat saja menyebabkan terjadinya kesalahan dalam menginterpretasikan hasil uji sehingga berpotensi menghasilkan hasil yang negative palsu atau sebaliknya positif palsu (Kontinenen dan Sivonen, 1987).

Salah satu teknik molekuler yang saat ini dipercaya dapat digunakan untuk mengidentifikasi *S.pneumoniae* yaitu dengan PCR yang lebih sensitive dan lebih spesifik dalam mengidentifikasi *S.pneumoniae*. Terdapat beberapa protein yang dihasilkan oleh *S.pneumoniae* yang juga berperan dalam menentukan virulensi seperti *pneumolysin (ply)*, *pneumococcal surface protein A (pspA)*, *autolysin (lytA)*, dan *pneumococcal surface adhesion A (psaA)* yang saat ini banyak diteliti apakah semua protein tersebut terdapat pada semua serotype (90 serotipe) *S.pneumoniae*. Sehingga salah satu diantaranya dapat direkomendasikan sebagai gen yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi *S.pneumoniae* baik pada sampel klinis maupun tidak klinis dengan menggunakan teknik PCR. Penelitian ini menggunakan primer gen *psaA* karena berdasarkan penelitian Morrison (2007) menyatakan bahwa *psaA* sangat akurat dalam membedakan pneumokokus NT dari streptokokus atipikal.

Isolat *Streptococcus pneumoniae* diekstrak menggunakan metode boiling dengan suhu 90°C selama 30 menit untuk memperoleh DNA yang berada di membran sel dimana DNA gen ini yang akan digunakan sebagai cetakan pada amplifikasi gen *psaA* dengan PCR. Hasil amplifikasi PCR gen *psaA* dengan menggunakan primer yang spesifik divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan agarose 2 % dan diperoleh adanya pita berukuran 834 bp (gambar 4). Hasil yang diperoleh ini sama dengan hasil yang diperoleh Scott *et.al.*, 2003 yang mendapatkan hasil amplifikasi *psaA* berukuran 834 bp.

## Kesimpulan

Gen *psaA* sebagai faktor virulensi berhasil teridentifikasi pada isolate sputum pasien dengan panjang 834 bp menggunakan teknik PCR konvensional

## Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Universitas Hassanudin Makassar yang telah mendanai penelitian ini melalui Penelitian Hibah Internal Skim Penelitian Dosen Pemula tahun 2019

**Daftar Pustaka**

1. Sampson, J. S., Z. Furlow, A. M. Whitney, D. Williams, R. Facklam, and G. M. Carlone. 1997. Limited diversity of *Streptococcus pneumoniae* *psaA* among pneumococcal vaccine serotypes. *Infect. Immun.* 65:1967–1971.
2. Todar K. *Streptococcus pneumoniae* [Internet]. 2012 [cited 2014 Oct 13].
3. Scott.J.Anthony, Marston. Eric L, Hall.Andrew.J, Marsh. Kevin. Diagnosis Of Pneumococcal Pneumonia By *Psaa* Pcr Analysis Of Lung Aspirates From Adult Patients In Kenya. *Journal Of Clinical Microbiology*, June 2003, P. 2554–2559 Vol. 41, No. 6 0095-1137/03/\$08.00\_0 Doi: 10.1128/Jcm.41.6.2554–2559.2003
4. Maestro B and Sanz JM. Choline Binding Protein from *Streptococcus pneumoniae* : A Dualrole as Enzybiotics and Targets for the Design of New Antimicrobials. *MDPI.* 2016;5: 2-33
5. Ditjen Kementrian Kesehatan. 2018. Data Dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2017. Jakarta
6. Kontiainen S, Sivonen A (1987). Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 6, 422–423.
7. Alonsodevelasco E., Verheul AFM, Verhoef.J, Snippe.H. *Streptococcus pneumoniae: Factor virulence, Pathogen, and Vaccine. Eijkman-Winkler Institute of Medical and Clinical Microbiology, University Hospital, Utrecht, The Netherlands.*1995; 591–603 Vol. 59
8. Bandettini R, Melioli G. Laboratory diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections: past and future. *J Prev Med Hyg.* 2012; 53:85-8.
9. Sanz, et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae* *lytA*, *plyA*, and *psaA*. *Enfermedades Infecciosas Micriobiologia Clinic.* 2017: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2017.07.007>
10. Putri RRH. Identifikasi bakteri *untypeable Streptococcus pneumoniae* menggunakan gen *psaA*, *lytA*, *cpsA*, dan *recA* [Internet]. 2013 [cited 2014 November 5]. Available from: <http://lib.ui.ac.id/file?file=digital/20347654-S47317-Rengganis%20RHP.pdf>.
11. Morrison KE, Lake D, Crook J, Carlone GM, Ades E, Facklam R, et al. Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2007; 38(1):434-7.