

## DETECTION OF PNEUMOLYSIN (PLY) STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE GENES IN ELDERLY BY CULTURE AND PCR

*Deteksi gen pneumolysin (ply) Streptococcus pneumoniae pada Sampel Klinis  
Usia Lanjut secara Kultur dan PCR*

**Muthmainnah<sup>1</sup>, Hatta Mochammad<sup>2</sup>, Hamid Firdaus<sup>2</sup>, Djaharuddin Irawati<sup>3</sup>,  
Ferial Eddyman W.<sup>4</sup>, Zainuddin A. Alfian<sup>5</sup>, Hutabarat Mustika Sari<sup>1</sup>, dan Massi  
Muh. Nasrum<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Biomedik Sekolah pasca sarjana, Universitas Hasanuddin  
Makassar

<sup>2</sup>Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin Makassar

<sup>3</sup>Departemen Pulmonologi dan Respiratori, Fakultas Kedokteran, Universitas  
Hasanuddin Makassar

<sup>4</sup>Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Hasanuddin Makassar

<sup>5</sup>Departemen Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Universitas  
Hasanuddin Makassar

### ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae, a gram-positive bacterium of normal flora but can be a pathogenic bacterium that causes pneumonia if the immune system declines. Community pneumonia ranks fourth and top ten diseases treated per year. Populations that are susceptible to pneumonia are children aged less than 2 years, old age. The Purpose aim to detect ply genes in sputum with suspected pneumonia in elderly as a virulence factor of S. pneumoniae by culture and PCR. This research method is a descriptive study to detect the virulence factor of the S. pneumoniae ply gene in the sputum of patients with suspected pneumonia in the elderly with the culture and PCR methods. Conventionally (culture method) obtained 1 sample from 56 positive samples of S. pneumoniae gram positive bacteria on the molecular method (PCR) there were 7 positive samples of S. pneumoniae bacteria from 56 samples. In detecting ply genes in sputum with suspected pneumonia in elderly as a virulence factor from S. pneumoniae bacteria were culturally detected 1 positive sample from 56 samples and by PCR method detected 7 positive samples from 56 samples. In detecting ply genes using culture and PCR it can be said that the PCR method is more accurate, fast and precise in detecting the S. pneumonia gene in sputum samples with suspected pneumonia in elderly.*

*Keywords: Streptococcus pneumoniae; pneumolysin; elderly; Detection*

### ABSTRAK

Bakteri *Streptococcus pneumoniae*, merupakan bakteri flora normal Gram positif namun dapat menjadi bakteri patogen penyebab pneumonia apabila sistem kekebalan tubuh menurun. Pneumonia komunitas menduduki peringkat keempat dan sepuluh penyakit terbanyak yang dirawat per tahun. Populasi yang rentan terserang pneumonia adalah anak-anak usia kurang dari 2 tahun dan usia lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen *ply* pada sputum penderita suspek pneumonia usia lanjut sebagai faktor virulensi dari *S. pneumoniae* secara kultur dan PCR. Metode penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk mendeteksi adanya faktor virulensi gen *ply S.pneumoniae* pada sputum penderita suspek pneumonia pada lanjut usia dengan metode kultur dan PCR. Secara konvensional (metode kultur) diperoleh 1 sampel dari 56 sampel yang positif bakteri gram positif *S. pneumoniae* pada metode molekuler (PCR) terdapat 7 sampel positif bakteri *S. pneumoniae* dari 56 sampel. Dalam mendeteksi gen *ply* pada sputum penderita suspek pneumonia lansia sebagai faktor virulensi dari bakteri *S.pneumoniae* secara kultur terdeteksi 1 sampel positif dari 56 sampel dan dengan

metode PCR terdeteksi 7 sampel positif dari 56 sampel. Dalam mendeteksi gen *ply* dengan menggunakan kultur dan PCR dapat dikatakan bahwa metode PCR lebih akurat, cepat dan tepat dalam mendeteksi gen *ply S.pneumoniae* pada sampel sputum penderita suspek pneumonia usia lanjut.

Kata kunci: *Streptococcus pneumoniae*; *pnumolysin*; usia lanjut; Deteksi

## PENDAHULUAN

Bakteri *Streptococcus pneumoniae*, merupakan bakteri flora normal Gram positif namun dapat menjadi bakteri patogen penyebab pneumonia apabila sistem kekebalan tubuh menurun.<sup>1</sup> Gejala pneumonia adalah sakit kepala, demam, menggigil, mengeluarkan dahak, batuk, dan sesak napas. Anak-anak usia kurang dari 2 tahun, usia lanjut dan malnutrisi serta gangguan imunologi merupakan populasi yang rentan terserang pneumonia. Pneumonia dapat terjadi pada orang normal tanpa adanya kelainan daya tahan tubuh. Namun ditemukan satu atau lebih penyakit dasar yang mengganggu sistem kekebalan tubuh pada kebanyakan pasien dewasa yang menderita pneumonia. Pneumonia sering dijumpai pada lansia dan penyakit paru obstruksi kronik.<sup>2</sup>

Hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga Depkes tahun 2001, kasus penyakit infeksi saluran nafas merupakan penyebab kematian kedua di Indonesia. Pneumonia komunitas menduduki peringkat keempat dan sepuluh penyakit terbanyak yang dirawat per tahun. Kasus infeksi dan 14,6 % diantaranya kasus non tuberkulosis, Kasus infeksi dan 11,6 % diantaranya kasus non tuberkulosis, pada penderita rawat inap 58,8 %. Di RSUD Dr. Soetomo Surabaya didapatkan data sekitar 180 pneumonia komunitas dengan angka kematian antara 20 - 35 %. Di RSUP H. Adam Malik Medan 53,8 % kasus infeksi dan 28,6 % diantaranya infeksi non tuberkulosis.<sup>3</sup>

Infeksi yang ditimbulkan oleh *S. pneumoniae* disebabkan karena adanya interaksi faktor virulensi terhadap sel inang berupa protein hasil sekresi *S. pneumoniae* yang dapat menyebabkan lisis pada sel inang.<sup>4</sup> Dalam mendeteksi bakteri penyebaran bakteri patogen ini dapat dilakukan secara konvensional dan secara molekular PCR untuk mendeteksi

faktor virulensi gen *S. pneumoniae* menggunakan primer yang spesifik untuk gen *ply*. Gen tersebut merupakan gen target virulen bakteri *S. pneumoniae*, dalam metode konvensional dilakukan metode kultur yang merupakan *gold standar* dalam mendeteksi bakteri ini namun apabila menggunakan metode kultur akan membutuhkan waktu berhari-hari berbeda halnya secara molekular dapat dilakukan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang membutuhkan waktu yang singkat karena mendeteksi DNA bakteri *S. pneumoniae*.<sup>5</sup>

Proses deteksi ini sesuai dengan penelitian sebelumnya. Penelitian Wheeler et al (1999), dalam mendeteksi gen *ply* dengan jumlah sampel 65 sampel sputum terdapat 27 sampel *S. pneumoniae* kultur positif dan 67% sensitive terhadap PCR.<sup>6</sup> Berdasarkan uraian tersebut diatas, maka diperlukan adanya penelitian secara kultur dan PCR dalam mendeteksi gen *ply* pada sputum penderita suspek pneumonia sebagai faktor virulensi dari *S. pneumoniae*.

## METODE PENELITIAN

Metode penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk mendeteksi adanya faktor virulensi gen *ply S.pneumoniae* pada sputum penderita suspek pneumonia pada lanjut usia dengan metode kultur dan PCR. Populasi pada penelitian ini adalah sampel sputum dari pasien suspek pneumonia yang di ambil dari laboratorium Patologi Klinik bagian mikrobiologi RSUP. DR. Wahidin Sudirohusodo Makassar dan akan dilakukan pemeriksaan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Hasanuddin. Subjek penelitian ini adalah sampel sputum pasien penderita suspek pneumonia yang berusia lanjut dengan

kriteria inklusi hasil pewarnaan gram bakteri gram positif.

Seluruh data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisa secara deskriptif. Hasil analisis akan ditampilkan dalam gambar, tabel, dan penjelasan.

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dengan nomor 321/UN4.6.4.5.31/PP36/2019 dengan nomor protokol UH19030146.

## PROSEDUR PENELITIAN

### Pembuatan media BAP

Dilartukan 40 gram agar base dalam 1000 mL aquades di dalam botol. Lalu aduk hingga rata. Masukkan ke dalam *Autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah di *autoclave*, biarkan dingin hingga 47 °C. kemudian ditambahkan 5 % darah kambing. Kemudian homogenkan dan tuang ke dalam cawan petri. Biarkan memadat, dan BAP siap digunakan.

### Isolasi pada BAP

Suspensi bakteri diisolasi pada media BAP lalu Inkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 35-37°C dengan konsentrasi gas CO<sub>2</sub> 5% selama 18-24 jam.

### Uji Katalase

Diteteskan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% di atas permukaan koloni. *S. pneumoniae* ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung-gelembung gas setelah ditetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### Uji Optochin

Mengambil koloni bakteri yang memiliki zona alfa hemolisa dengan jarum ose yang sudah disterilkan. Inokulasi pada BAP lalu letakkan cakram *optochin* pada bagian tengah media yang telah di inokulasikan dengan pinset steril. Inkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 35-37°C dengan konsentrasi gas CO<sub>2</sub> 5% selama 18-24 jam. Hasil uji optochin. Dikatakan sensitif apabila terbentuk zona inhibisi dengan diameter ≥ 14 mm, dikatakan sebagai resistensi jika zona inhibisi yang terbentuk berdiameter ≤ 14 mm terhadap optochin.<sup>7</sup>

### Pengambilan koloni dan isolasi DNA *S.pneumoniae*

Koloni *S.pneumoniae* yang tumbuh pada BAP di panen. Koloni dimasukkan ke dalam larutan PBS sebanyak 200 µl

kemudian di rebus dengan suhu 90°C selama 30 menit.

### PCR

Primer gen *ply* yang akan digunakan adalah primer gen *ply* dengan urutan basa nukleotida *forward*: 5' ATT TCT GTA ACA GCT ACC AAC GA 3' dan *reverse* 5' GAA TTC CCT GTC TTT TCA AAG TC 3' dengan 348bp. Campuran reaksi amplifikasi mengandung 5 µl template DNA bakteri, masing-masing primer sebanyak 0,5µl, 12,5 µl enzim Qiagen blue (mengandung 5U taq polymerase, PCR buffer dengan 3 mM MgCl<sub>2</sub>, dan 400 µM dNTP), dan RNase free water dengan volume akhir 25 µl. Kondisi siklus PCR denaturasi awal selama 5 menit dengan suhu 94°C, denaturasi akhir selama 30 detik dengan suhu 94°C, penempelan selama 30 detik dengan suhu 53°C, pemanjangan awal selama 30 detik dengan suhu 72°C, pemanjangan akhir selama 10 menit dengan suhu 72°C. Pada PCR dilakukan 35 kali siklus.<sup>8</sup>

### Elektroforesis

Gel agarose 2% dibuat dengan cara melarutkan agarose sebanyak 4 gr didalam 200 ml TBE, kemudian dipanaskan dengan microwave selama 3 menit, ditambahkan etidium bromida 0,5 µg/ml kedalam larutan agarose, kemudian di homogen kan dan dituangkan ke dalam cetakan gel yang telah dipasangkan sisir gel. Dinginkan hingga memadat.

### Visualisasi elektroforesis

10 µl produk PCR divisualisasi menggunakan UV transilluminator 2% yang mengandung pewarna etidium bromida 0,5 µg/ml pada 100 volt selama 90 menit. Amplifikasi diamati menggunakan dokumentasi UV transluminator gel. Dimana sampel positif ditandai dengan terbentuknya pita gen *ply* 348 bp.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel penelitian berupa sampel klinis sputum dari pasien lansia penderita suspek pneumonia yang diambil dari laboratorium mikrobiologi RSUP DR. Wahidin Sudirohusodo. Sebanyak 56 sampel sputum penderita lansia suspek pneumonia dengan jenis kelamin laki-laki sebanyak 37 orang dan perempuan

sebanyak 19 orang. Dari penelitian ini ternyata penderita suspek pneumonia lebih banyak diderita oleh laki-laki dibandingkan dengan perempuan.

56 sampel yang telah didapatkan telah memenuhi kriteria inklusi yaitu dengan hasil pewarnaan Gram bakteri dan Gram positif. Selanjutnya dilakukan kultur pada BAP yang telah diisolasi bakteri kemudian diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> dengan konsentrasi gas CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam. Pertumbuhan koloni bakteri *S. pneumoniae* ditandai dengan terbentuknya koloni kecil, keabu-abuan, mucoid, *waterish* dan dikelilingi zona  $\alpha$ -hemolisis.

Dari 56 sampel yang telah di kultur ditemukan 42 sampel yang memiliki karakteristik alfa hemolisis, koloni bulat, abu-abu, mukoid, *waterish* (gambar 1), selanjutnya teridentifikasi 8 sampel yang memiliki karakteristik gamma hemolisis, bulat, mukoid, abu-abu, permukaan cekung sedangkan pada 6 sampel lainnya ditemukan hasil kultur dengan karakteristik koloni beta hemolisis, abu-abu, bulat, cembung.

Setelah dilakukan kultur maka dilakukan lagi pewarnaan Gram yang menunjukkan gram positif diplo kokus dan Gram positif lanset. Dari total 56 sampel yang telah dilakukan pewarnaan Gram, diperoleh 46 sampel koloni bakteri Gram positif diplokokus dan 10 koloni bakteri Gram positif diplokokus lanset.

Koloni yang diduga *Streptococcus sp* yang tumbuh pada BAP yang telah di inkubasi dengan inkubator CO<sub>2</sub> dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 35-37° selama 24 jam dengan karakteristik koloni bening, mukoid, *waterish*, keabu-abuan, memiliki aktivitas alfa hemolisis. Pada isolat tersebut dilakukan uji katalase, dari uji katalase tersebut ditemukan 42 isolat tidak memiliki gelembung gas setelah ditetaskan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang mengindikasikan bahwa isolat tersebut diduga *S. pneumoniae*. Dari 42 isolat yang telah diuji katalase dengan hasil tidak terdapatnya gelembung gas, pada uji katalase ini tidak ditemukan sampel yang memiliki gelembung gas setelah ditetaskan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang mengindikasikan tidak terdapat *S.*

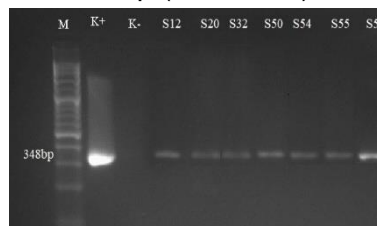
*viridian*. maka selanjutnya dilakukan uji sensitivitas terhadap optochin.

Pada uji sensitivitas optochin ini digunakan 42 sampel dan ditemukan sebanyak 1 sampel yang sensitif terhadap optochin dengan terbentuknya zona inhibisi dengan diameter  $\geq 14$  mm, sedangkan pada 41 sampel terbentuk zona inhibisi dengan diameter  $\leq 14$  mm. setelah dilakukan uji optochin untuk mengetahui sensitivitas terhadap bakteri yang diduga *S. pneumoniae*. Sehingga berdasarkan metode kultur ditemukan 1 sampel yang merupakan bakteri *S. pneumoniae*.



Gambar 1 koloni dari *S. pneumoniae* pada BAP

Secara molekuler, pada penelitian ini digunakan metode PCR untuk men amplifikasi gen target *ply* dari seluruh sampel dengan menggunakan primer spesifik. Gen *ply* dinyatakan positif jika pada hasil elektroforesis ditemukan pita DNA yang berukuran 348bp dan dinyatakan negatif jika pada elektroforesis hasil PCR tidak ditemukan pita yang berukuran 348bp (Gambar 2).



Gambar 2. Amplifikasi hasil produk PCR gen *ply* dengan marker 348bp DNA  
Keterangan: M=Marker, K+=Kontrol positif, K-=Kontrol negatif, S:Sampel.

Berdasarkan dari hasil PCR (gambar 2) terdeteksi pita DNA gen *ply S. pneumoniae* sebanyak 7 dari 56 sampel. Hasil identifikasi bakteri gram positif ini terhadap 56 sampel sputum penderita suspek pneumonia usia lanjut secara konvensional (metode kultur) diperoleh 1 sampel dari 56 sampel yang positif bakteri

gram positif *S. pneumoniae* dan negatif sebanyak 55 sampel (tabel 1). Namun pada metode molekuler (PCR) seluruh sampel di uji secara molekuler terdapat 7 dari 56 sampel positif bakteri *S.pneumoniae*. Terdapat 6 sampel yang

resisten terhadap optochin namun secara PCR terdeteksi positif karena terdapat pita DNA 348bp ketika dilakukan visualisasi. Resistensi pada bakteri *S. pneumoniae* telah dilaporkan sebelumnya pada penelitian.<sup>9</sup>

**Tabel 1. Hasil Identifikasi bakteri *S.pneumoniae* pada sampel sputum penderita suspek pneumonia secara kultur dan PCR**

Metode	Positif	Negatif
Kultur	1	55
PCR	7	56

## SIMPULAN

Dalam mendeteksi gen *ply* pada sputum penderita lansia suspek pneumonia sebagai faktor virulensi dari bakteri *S.pneumoniae* secara kultur terdeteksi 1 sampel positif dari 56 sampel dan dengan metode PCR terdeteksi 7 sampel positif dari 56 sampel. Dalam

mendeteksi gen *ply* dengan menggunakan kultur dan PCR dapat dikatakan bahwa metode PCR lebih akurat, cepat dan tepat dalam mendeteksi gen *ply S.pneumoniae* pada sampel sputum penderita suspek pneumonia usia lanjut.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Donkor ES. Understanding the pneumococcus: Transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;4(MAR):1–5.
2. Lee TWR, Brownlee KG, Chetcuti PAJ. Pneumonia. *Pediatr Thorac Surg.* 2009;95–108.
3. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. Pneumonia komuniti 1973 - 2003. *Pneumonia Komuniti (Pedoman diagnosis dan penatalaksanaan).* 2003;6.
4. Skovstod IC. *Streptococcus pneumoniae SSI Diagnostica.* 2017;47. Available from: SSI Diagnostica, Denmark
5. Korczynski P, Krenke R, Safianowska A, Gorska K, Abou Chaz BM, Maskey-Warzechowska M, et al. Diagnostic utility of pleural fluid and serum markers in differentiation between malignant and non-malignant pleural effusions. *Eur J Med Res.* 2009;14(SUPPL.4):128–33.
6. Wheeler J, Freeman R, Steward M, Henderson K, Lee MJS, Piggott NH, et al. Detection of pneumolysin in sputum. *J Med Microbiol.* 1999;48(9):863–6.
7. Carvalho MDGS, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2460–6.
8. Sourav S, Patricia A, Sharma S, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K. Detection of pneumolysin and autolysin genes among antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* in invasive infections. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28(1):34–9.
9. Pinto TCA, Souza ARV, De Pina SECM, Costa NS, Neto AAB, Neves FPG, et al. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the *atpC* gene. *J Clin Microbiol.* 2013;51(10):3242–9.