

Identifikasi *Streptococcus pneumoniae* yang dibawa oleh Nasofaring Penderita Otitis Media Akut di Kabupaten Banyumas

Miranti Oviani¹, Dodi Safari², Anton Budhi Darmawan², Daniel Joko Wahyono^{1*}

¹Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto 53122, Indonesia

²Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta

*email : danieljokowahyono13@gmail.com.

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 29/08/2019

Disetujui : 03/03/2020

Abstract

The aims of this study are to detect *Streptococcus pneumoniae* carried by nasopharynx of children in primary school (aged 6-12 years) that diagnosed with Acute Otitis Media (AOM). The design of this study is nonexperimental survey with the descriptive analysis. Sampling was conducted in September - December 2018 in Banyumas district primary schools. Detection of *S. pneumoniae* was performed with microbiology methods. The result of this study showed that 26 bacteria isolates were obtained from nasopharynx in children diagnosed with AOM. Based on colony characteristics and optochin disk assay, 35% (9/26) of bacterial isolates were identified as *S. pneumoniae*.

Keywords: *Acute Otitis Media, children, Streptococcus pneumoniae*

Abstrak

Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi *Streptococcus pneumoniae* yang dibawa oleh nasofaring anak-anak penderita Otitis Media Akut (OMA) usia sekolah dasar (6-12 tahun). Desain penelitian ini adalah penelitian survei noneksperimental dengan metode analisis deskriptif. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan September 2018 hingga Desember 2018 di SD Kabupaten Banyumas. Deteksi *S. pneumoniae* pada sampel OMA dapat dilakukan melalui metode identifikasi *S. pneumoniae* secara mikrobiologi. Sebanyak 26 isolat bakteri berhasil diperoleh dari nasofaring anak yang didiagnosis menderita OMA. Berdasarkan karakteristik morfologi koloni dan uji *optochin*, 35% (9/26) isolat teridentifikasi sebagai *S. pneumoniae*.

Kata kunci: *Otitis Media Akute, anak-anak, Streptococcus pneumoniae*

PENDAHULUAN

Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri yang dapat menginfeksi saluran pernapasan dan menyebabkan mortalitas yang tinggi pada anak-anak dengan sistem imun yang lemah (Pinti *et al.*, 2016). Setiap tahunnya, sekitar 541.000 anak-anak di bawah 5 tahun di dunia meninggal karena infeksi dari bakteri ini (WHO, 2004). *S. pneumoniae* adalah flora normal yang terdapat pada permukaan mukosal saluran pernapasan bagian atas. Bakteri ini dapat mengolonisasi nasofaring bersama dengan bakteri lainnya (Kadioglu *et al.*, 2008). Kolonisasi nasofaring yang dilakukan oleh *S. pneumoniae* umumnya tidak menunjukkan gejala penyakit atau disebut dengan karier (CDC, 2015). Namun, apabila *S. pneumoniae* yang mengolonisasi nasofaring berpindah ke jaringan dan organ lain maka akan menyebabkan penyakit (Nonmark-Henriques dan Toumanen, 2013). Salah satu bagian tubuh yang menjadi tempat menyebarnya *S. pneumoniae* adalah telinga tengah. *S. pneumoniae* yang mengolonisasi nasofaring dapat berpindah ke telinga tengah sehingga menyebabkan otitis media (Keller *et al.*, 2016). Kolonisasi *S. pneumoniae* merupakan salah satu sumber utama dalam penyebaran patogen secara horizontal dalam suatu komunitas. Apabila salah satu anggota keluarga membawa *S. pneumoniae*, maka pada kondisi tertentu dapat ditransmisikan ke

anggota keluarga lainnya (Bogaert *et al.*, 2004). Persentase *S. pneumoniae* yang ditemukan pada nasofaring anak-anak sehat di Semarang pada tahun 2010 adalah sebanyak 43% (Farida *et al.*, 2014), sedangkan pada anak-anak sehat usia di bawah 5 tahun di Lombok terdapat 53% *S. pneumoniae* yang mengolonisasi nasofaring (Hadinegoro *et al.*, 2016).

Nasofaring dapat menjadi reservoir bakteri yang dapat menyebabkan penyakit OMA (Bosch *et al.*, 2013). Apabila terjadi gangguan keseimbangan mikrobiota di nasofaring, maka *S. pneumoniae* dapat berpindah ke telinga tengah melalui saluran *eustachius* dan menyebabkan OMA. Korona-Glowniak *et al.* (2018) melaporkan bahwa *S. pneumoniae* dapat ditemukan pada nasofaring penderita OMA. Sehingga pada penelitian ini, isolasi *S. pneumoniae* dilakukan dari sampel usapan nasofaring anak-anak penderita OMA. Studi mengenai kolonisasi *S. pneumoniae* pada nasofaring di Indonesia pada anak-anak penderita otitis media berusia di atas 5 tahun belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mendeteksi *S. pneumoniae* yang dibawa oleh nasofaring anak-anak penderita otitis media berusia di atas 5 tahun.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi *S. pneumoniae* yang dibawa oleh nasofaring anak-anak penderita OMA usia sekolah dasar (6-12 tahun) di

wilayah Kabupaten Banyumas. Hasil penelitian akan bermanfaat untuk memberikan gambaran tentang jumlah *S. pneumoniae* yang dideteksi pada anak-anak penderita OMA usia 6-12 tahun di wilayah kabupaten Banyumas dan memberikan gambaran mengenai implementasi program vaksinasi pneumokokal.

MATERI DAN METODE

Skrining Sampel OMA

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik (*ethical approval*) (Ref. 4015/KEPK/FK/2018) dari Komisi Etika Penelitian, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Skrining untuk menentukan anak-anak yang diduga menderita OMA pertama kali dilakukan di SDN Pangebatan, Karanglewes dengan jumlah total anak yang disklining adalah 400 anak (kelas 1-6), sedangkan untuk skrining kedua di SDN Karanglewes Kidul dengan jumlah total anak 200 anak (kelas 1-6). Kriteria inklusi diduga OMA adalah anak yang mengalami batuk pilek kurang lebih satu minggu dan mengalami sakit pada bagian telinga tengah. Jumlah total anak yang diduga menderita OMA adalah sebanyak 89 anak (34 anak dari skrining pertama dan 55 anak dari skrining kedua).

Teknik Pengambilan Sampel (Satzke *et al.*, 2013).

Sampel *swab* nasofaring diambil dengan menggunakan *FLOQS swab* steril pada bulan September 2018 hingga Desember 2018. Hasil *swab* dari masing-masing pasien yang positif OMA dimasukkan ke dalam *cryotube* yang berisi 1 ml media STGG yang merupakan media transport dan penyimpanan bakteri *S. pneumoniae*, *FLOQS swab* dipotong dengan gunting steril sehingga *cryotube* dapat ditutup rapat, lalu dihomogenkan dengan *vortex* dan disimpan pada *biomedical freezer* -80°C.

Pengayaan Bakteri *S. Pneumoniae* (Carvalho *et al.*, 2010).

Swab nasofaring dari *freezer* dibiarkan mencair lalu di *vortex* selama 10-15 detik. Sebanyak 200 µl diambil dan dimasukkan ke dalam tabung kaca yang berisi 5 ml THYB dan 1 ml serum kelinci, lalu dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂ selama 5-6 jam.

Pembuatan Kultur Bakteri pada Medium Agar Darah 8% (Auranen *et al.*, 2013).

Sampel *swab* nasofaring yang telah diperkaya diambil 10 ul untuk ditumbuhkan pada medium agar darah 8% dengan metode gores *quadrant*. Setelah itu, diinkubasi selama 18-24 jam pada temperatur 37°C dengan 5% CO₂.

Identifikasi dan Karakterisasi Koloni *S. Pneumoniae* (Carvalho *et al.*, 2010).

Koloni bakteri yang tumbuh pada medium agar darah 8% diamati karakter makro-morfologinya. Karakter koloni dari *S. pneumoniae* adalah transparan, lembab, berair, dan dikelilingi oleh zona

berwarna hijau yang menunjukkan terjadinya α-hemolisis.

Identifikasi *S. pneumoniae* dengan *Optochin Disk* (Carvalho *et al.*, 2010).

Koloni dengan karakter *S. pneumoniae* digores ke dalam medium agar darah 8%. Kemudian 5 µg *optochin disk* dengan diameter 6 mm diletakkan di atas area yang telah *distreak*. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C, 5% CO₂ selama 18-24 jam. Jika isolat sensitif terhadap *optochin* (zona hambat ≥14 mm) maka diduga isolat tersebut adalah *S. pneumoniae*.

Uji Kelarutan Garam Empedu (Carvalho *et al.*, 2010).

Sebanyak dua tabung reaksi berisi masing-masing 2 ml (tabung uji) dan 1 ml (tabung kontrol negatif) saline 0.85% disiapkan. Koloni *S. pneumoniae* yang berumur 18-20 jam dipanen menggunakan *disposable loop* 10 µl dan diresuspensi ke dalam tabung uji hingga kekeruhannya setara dengan McFarland standar 1 dan kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Tabung McFarland standar 1 atau densitometer menentukan kekeruhan suspensi sehingga suspensi yang setara dengan McFarland 1 dapat tercapai. Sebanyak 1 ml suspensi yang sudah homogen pada tabung uji dipindahkan menggunakan pipet ke tabung kontrol negatif dan dihomogenkan. Larutan sodium deoxycholate 2% ditambahkan ke tabung uji (1 ml) kemudian di *vortex*. Semua suspensi dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang. Suspensi diamati pada 10 menit pertama dan 2 jam berikutnya. Suspensi pada tabung uji yang berubah menjadi bening (*lisis total*) setelah penambahan sodium deoxycholate 2% disimpulkan sebagai positif uji kelarutan garam empedu sebaliknya suspensi yang masih keruh dianggap sebagai negatif. Penentuan ini bisa dibandingkan dengan kontrol *S. pneumoniae* ATCC.

Pembuatan stok *S. pneumoniae* (Carvalho *et al.*, 2010).

Koloni yang teridentifikasi sebagai *S. pneumoniae* ditumbuhkan kembali pada medium agar darah 8% dan diambil dengan menggunakan *disposable loop*, kemudian dimasukkan pada 1 ml medium STGG lalu dihomogenkan menggunakan *vortex*. Kultur pada STGG disimpan pada *biomedical freezer* bertemperatur -80°C.

Perhitungan Persentase *S. pneumoniae* pada Sampel Nasofaring

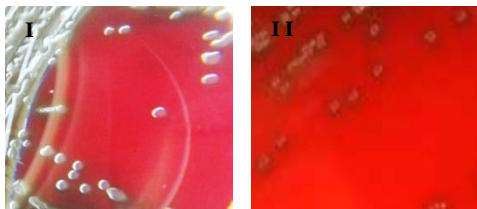
Persentase *S. pneumoniae* diketahui dengan menghitung jumlah isolat *S. pneumoniae* yang ditemukan pada sampel nasofaring penderita OMA dibandingkan dengan total isolat asal sampel usapan nasofaring yang diteliti.

$$\% S. pneumoniae = \frac{\text{jumlah isolat } S. pneumoniae}{\text{total isolat uji}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi *S. pneumoniae* berdasarkan morfologi

Sebanyak 26 isolat bakteri asal usapan nasofaring dari penderita OMA telah berhasil diisolasi dan diberi kode OMP0002, OMP0003, OMP0006, OMP0007, OMP0008, OMP0015, OMP0017, OMP0018, OMP0019, OMP0020, OMP0022, OMP0023, OMP0025, OMP0026, OMP0030, OMP0032, OMP0033, OMP0041, OMP0046, OMP0048, OMP0057, OMP0064, OMP0069, OMP0075, OMP0088, OMP0089. Hasil pengkulturan pada medium agar darah 8% menunjukkan bahwa sebanyak 42% (11/26) isolat memiliki karakter morfologi koloni mirip dengan *S. pneumoniae*. Sedangkan 58% (15/26) isolat lainnya tidak memiliki morfologi koloni seperti *S. pneumoniae*. Menurut CDC (2015), koloni *S. pneumoniae* berbentuk bulat, berwarna keabu-abuan, bersifat basah atau mukoid, berukuran kecil, permukaan koloni cembung dan pada awal pertumbuhan sama seperti *S. viridans*. Namun, setelah waktu inkubasi 18 – 24 jam koloni *S. pneumoniae* akan terbentuk cekungan dibagian tengah atau disebut dengan *flattened and depressed center* (FDC). Selain itu, karakter yang paling penting dari *S. pneumoniae* adalah memiliki zona hijau di sekitar koloni yang menunjukkan terjadinya alfa hemolitik (Gambar 1).



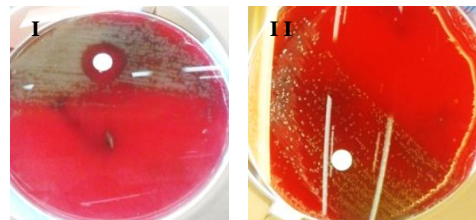
Gambar 1. Morfologi koloni *S. pneumoniae*. Dokumen pribadi. (I) permukaan koloni mukoid, (II) alfa hemolitik di sekitar koloni.

Morfologi *S. pneumoniae* yang dikultur pada medium agar darah akan memiliki zona hijau di sekitar koloni atau disebut dengan alfa hemolitik (Gambar 4.1). Hal ini dapat terjadi karena hemolisin *S. pneumoniae* yang mampu melisis sel darah merah (Bridy-Pappas *et al.*, 2005), sedangkan warna hijau di sekitar koloni disebabkan oleh adanya hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh *S. pneumoniae* yang mampu mengoksidasi ion Fe^{2+} pada hemoglobin darah menjadi ion Fe^{3+} sehingga menjadi methemoglobin yang berwarna hijau (ASM, 2016). Medium agar darah merupakan medium yang cocok untuk kultur *S. pneumoniae*. Pneumolisin pada *S. pneumoniae* dapat memecah eritrosit, sehingga protein yang mengandung heme bisa terlepas. Heme maupun hemoglobin pada sel darah merah dapat memberikan pertumbuhan yang optimal bagi *S. pneumoniae* (Tam *et al.*, 1993).

Pengamatan morfologi koloni lebih lanjut dari 11 isolat yang mirip dengan *S. pneumoniae* menunjukkan bahwa sebanyak 7 isolat memiliki koloni bentuk bulat dengan adanya cekungan di bagian tengah atau disebut juga dengan FDC, berukuran kecil, dan terdapat alfa hemolitik, sedangkan 2 isolat lainnya memiliki koloni bentuk bulat yang berukuran lebih besar dan permukaan yang lebih mukoid dibandingkan dengan yang lain, dan 2 isolat lainnya memiliki koloni berukuran kecil, bersifat alfa hemolitik dan permukaannya kering. Menurut Dunne *et al.*, (2010), morfologi dari *S. pneumoniae* bervariasi dari bulat sempurna atau cembung saat usia koloni masih muda, bagian tengah terdapat cekungan atau FDC, dan mukoid. Menurut Abdelnour *et al.* (2009), apabila kapsul polisakarida pada koloni *S. pneumoniae* sangat tebal maka akan menyebabkan permukaan menjadi terlihat mukoid.

Identifikasi *S. pneumoniae* dengan menggunakan *optochin* disk

Sebanyak 11 isolat yang diduga *S. pneumoniae* dilakukan uji *optochin*. Hasil uji *optochin* menunjukkan bahwa sebanyak 9 isolat (OMP0002, OMP0006, OMP0015, OMP0017, OMP0019, OMP0026, OMP0032, OMP0033, dan OMP0046) memiliki zona hambat dengan diameter ≥ 14 mm yang menunjukkan isolat tersebut sensitif terhadap *optochin*, sedangkan 2 isolat lainnya (OMP0022 dan OMP0069) tidak memiliki zona hambat di sekitar *optochin* yang menunjukkan bahwa isolat tersebut resistan terhadap *optochin* (Gambar 4.2). Isolat dengan morfologi *S. pneumoniae* yang sensitif terhadap *optochin* sudah dipastikan sebagai *S. pneumoniae*, sedangkan isolat yang resistan bisa saja sebagai *S. pneumoniae* apabila memiliki karakter morfologi *S. pneumoniae*. Apabila ada isolat yang resisten terhadap *optochin* dan memiliki morfologi yang sangat mirip dengan *S. pneumoniae*, maka harus dilakukan uji kelarutan garam empedu (CDC, 2015). Oleh karena kedua isolat yang resistan terhadap *optochin* (OMP0022 dan OMP0069) memiliki morfologi permukaan kering, tidak terbentuk FDC, dan berukuran kecil, maka tidak dilakukan uji kelarutan garam empedu.



Gambar 2. Hasil *streak* uji *optochin*. Sumber: Dokumen pribadi. (I) Sensitif *optochin*, dan (II) resisten *optochin*.

Cakram *optochin* yang digunakan memiliki diameter sebesar 6 mm dengan berat 5 µg yang mengandung senyawa *ethylhydrocupreine hydrochloride* (CDC, 2015). Senyawa yang terkandung dalam cakram *optochin* dapat melakukan interaksi dengan kompleks subunit F₀F₁ ATPase pada membran sel. Interaksi ini menyebabkan terganggunya pompa ion H⁺, hidrolisis dan sintesis ATP, sehingga bakteri tidak dapat tumbuh di sekitar cakram *optochin* dan terbentuk zona hambat (Pikis *et al.*, 2001). Enzim F₀F₁ ATPase terdapat pada struktur bakteri yang terdiri dari dua kompleks. Kompleks yang pertama adalah membran intergral F₀ terdiri dari subunit a, b, dan c sebagai saluran pompa proton. Kompleks yang kedua adalah kompleks sitoplasmik F₁ yang terdiri dari subunit α, β, γ, δ, dan ζ yang merupakan situs katalisator untuk hidrolisis ATP (Ferrandiz dan De La Campa., 2002). Enzim F₀F₁ ATPase pada rantai respirasi berperan dalam mensintesis ATP dari gradient proton yang terbentuk. Apabila enzim ini terhambat atau berikatan dengan kompleks yang lain, maka gradient proton tidak akan terbentuk, sehingga proses sintesis dan hidrolisis ATP tidak akan terjadi (Pikis *et al.*, 2001).

SIMPULAN

Berdasarkan karakterisasi morfologi koloni dan pengujian *optochin disk*, sekitar 35% (9/26) isolat bakteri asal nasofaring anak-anak penderita Otitis Media Akut usia 6-12 tahun di wilayah kabupaten Banyumas teridentifikasi sebagai *S. pneumoniae*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Co-Ass THT Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman yang telah membantu dalam proses skrining awal anak-anak penderita OMA.

DAFTAR REFERENSI

- Abdelnour, A., C. Soley, S. Guevara, N. Porat, R. Dagan, & A. Arguedas., 2009. *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 among Costa Rican children with otitis media: Clinical, epidemiological characteristics and antimicrobial resistance patterns. *BMC Pediatry*, 9, pp. 52-56.
- Auranen, K., Rinta-Kokko, H., Goldblatt, D., Nohynek H., & O'Brien, K. L., 2013. Colonisation endpoints in *Streptococcus pneumoniae* vaccine trials. *Vaccine*, 32, pp. 153-158.
- Bogaert, D., De Groot, R., & Hermans, P. W. M., 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*, 4, pp. 144-1454.
- Bosch, A. A., Biesbroek, G., Trzcinski, K., Sanders, E. A., & Bogaert, D., 2013. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog*, 9, pp. 1003057.
- Bridy-Pappas, A. E., Pharm, D., Margolis, M. B., Pharm, D., Center, K. J. M. D., & Isaacman, D. J. M D., 2005. *Streptococcus pneumoniae*: Description of the pathogen disease epidemiology, treatment, and prevention. *Pharmacotherapy*, 25(9), pp. 1193-1212.
- Carvalho, M. D. G., Pimenta, F. C., Jackson, D., Roundtree, A., Ahmad, Y., Millar, E. V., & Beall, B. W., 2010. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *Journal of clinical microbiology*, 48(5), pp. 1611-1618.
- CDC, 2015. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable disease: Pneumococcal disease*. USA: Centers for Disease Control and Prevention.
- Dunne, E. M., Lupiwa, T., & Montgomery, J., 2010. *Streptococcus pneumoniae* serogroups and colony morphology: a look back. *Papua New Guinea Medical Journal*, 53, pp. 166-168.
- Farida, H., Severin, J. A., Gasem M. H., Keuter, M., & Wahyono, H., 2014. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*-prone age groups in Semarang, Java Island, Indonesia. *PLoS ONE*, 9.
- Ferrandiz, M. J., & De la Campa, A. G., 2002. The membrane-associated F₀F₁ ATPase is essential for the viability of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, 212, pp. 133-138.
- Hadinegoro, S.R., Prayitno, A., Khoer, M. M., Djelantik, I. G. G., Dewi, N. E., Indriyani, A. K., Muttaqin, Z., & Safari, D., 2016. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children under five years old in central lombok regency, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 3(3), pp. 1-9.
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., & Andrew, P. W., 2008. The Role of *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and pathogenesis. *mBio*, 7(2), pp. 1792-1815.
- Keller, L. E., D. A. Robinson, & L. S. McDaniel, L. S., 2016. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: emergence and pathogenesis. *American Society for Microbiology*, 7(2), pp. 1-12.
- Korona-Główniak, I., Zychowski, P., Siwiec, R., Mazur, E., Niedzielska, G., & Malm, A., 2018. Resistant *Streptococcus pneumoniae*

- strains in children with acute otitis media-high risk of persistent colonization after treatment. *BMC Infectious Disease*, 18, pp. 1-12.
- Nonmark-Henriques, B., Toumanen, E. I., 2013. The pneumococcus: Epidemiology microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3, pp. 010215.
- Pikis, A., Campos, J. M., Rodriguez, W. J., & Keith, J. M., 2001. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Mechanism, significance, and clinical implications. *The Journal of Infectious Disease*, 184, pp. 582-590.
- Pinti, M., Appay, V., Campisi, J., Frasca, D., Fulop, T., Sauce, D., Larbi, A., Weinberg, B., & Cossarizza, A., 2016. Aging of the immune system-focus on inflammation and vaccination. *European Journal of Immunology*, 46, pp. 2286–2301.
- Satzke, C., Turner, P., Virolainen-Julkunen, A., Adrian, P. V., & Antonio, M., 2013. Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: Updated recommendations from the world health organization pneumococcal carriage working group. *J. Vaccine*, 32, pp. 165-179.
- Tam, S. S., Lee, C., & Winter, R.E., 1993. Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *American Society for Microbiology*. 61(12), pp. 5401-5405.