

**DETEKSI GEN CbpG PADA ISOLAT KLINIS *Streptococcus pneumoniae* DI
RUMAH SAKIT UMUM PUSAT SANGLAH DENPASAR DARI JANUARI 2012 –
MARET 2017 DENGAN MENGGUNAKAN *POLYMERASE CHAIN REACTION*
(PCR)**

Ni Kadek Seri Mahayanti^{1*}, Ni Nyoman Sri Budayanti², Ni Nengah Dwi Fatmawati²

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

²Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah

E-mail: mahayantiseri@yahoo.com

ABSTRAK

Streptococcus pneumoniae adalah bakteri kokus gram positif *fakultative anaerob* penyebab utama kesakitan dan kematian diseluruh dunia. Bakteri ini dapat menyebabkan *Invasive Pneumococcal Disease* (IPD) seperti bakterial pneumonia, meningitis dan bakteremia serta penyakit non-IPD seperti otitis media dan sinusitis. *S. pneumoniae* memiliki beberapa faktor virulensi yang berperan dalam menimbulkan penyakit, salah satunya adalah CbpG. CbpG adalah protein permukaan yang berperan dalam proteolitik dan perlekatan sehingga menimbulkan sepsis. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui keberadaan gen CbpG pada isolat klinis *S. pneumoniae* yang terisolasi di Instalasi Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah Denpasar dengan menggunakan teknik PCR. Penelitian ini menggunakan desain *cross sectional* dengan menggunakan 21 sampel yang diambil dari sputum (42,9%), luka (23,8%), dan darah (33,3%). Sebanyak 3 (14,3%) dari 21 isolat klinis *S. pneumoniae* membawa gen CbpG, menunjukkan bahwa CbpG merupakan salah satu faktor virulensi yang dimiliki isolat klinis *S. pneumoniae*.

Kata kunci: *Streptococcus pneumoniae*, CbpG, Proteolitik, Perlekatan, PCR

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a gram-positive facultative anaerobic coccus leading to morbidity and mortality worldwide. *S. pneumoniae* can cause Invasive Pneumococcal Disease (IPD) such as bacterial pneumonia, meningitis, bacteremia and non-IPD diseases such as otitis media and sinusitis. *S. pneumoniae* has many virulence factors that play a role in causing the disease, one of those is CbpG. CbpG is a surface protein that contribute on proteolytic and attachment resulting in sepsis. This study was conducted to access of CbpG gene among clinical isolates of *S. pneumoniae* that isolated in Clinical Microbiology Laboratory of Sanglah General Hospital Denpasar 2012-2017 by using PCR technique. This is a descriptive with cross sectional study design with the sample of 21 clinical isolates from sputum (42.9%), wound (23.8%) and blood (33.3%). The result is 3 (14.3%) of 21 clinical isolates of *S. pneumoniae* carry CbpG gene, suggested that CbpG is one of the virulence factors in clinical isolates of *S. pneumoniae*.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, CbpG, Proteolytic, Attachment, PCR

PENDAHULUAN

Streptococcus pneumoniae merupakan bakteri gram positif *facultative anaerob* yang menyebabkan *Invasive Pneumococcal Disease* (IPD) seperti bakterial pneumonia, meningitis dan bakterimia. Selain menyebabkan IPD, *S. pneumoniae* juga dapat menyebabkan non-IPD seperti otitis media dan sinusitis. *S. pneumoniae* diperkirakan menjadi penyebab kematian lebih dari 1 juta anak setiap tahun diseluruh dunia.¹ Terdapat 10 negara di kawasan Asia dan Afrika yang memiliki proporsi tertinggi untuk kasus IPD. Dari hasil penelitian telah terjadi 66% kasus IPD diseluruh dunia.²

Sebagai patogen *S. pneumoniae* memiliki beberapa faktor virulensi yang berperan dalam patogenesis infeksi antara lain kapsul polisakarida, pili, pneumolisin, lipoprotein, *cholin-binding proteins* (CBP), *LPXTG-anchored surface protein* dan protein permukaan non-klasik yang berperan terhadap kemampuan *S. pneumoniae* untuk menimbulkan morbiditas serta mortalitas.³

S. pneumoniae resisten terhadap antimikroba yang umum digunakan seperti trimethoprim-sulfametoxazole, penicillin, macrolide, cephalosporin dan fluoroquinolones.³ Penggunaan vaksin telah mengurangi insiden IPD secara signifikan. Vaksin yang digunakan untuk IPD saat ini sangat terkait dengan serotipe dari *S. pneumoniae*. Serotipe yang telah teridentifikasi ialah sebanyak 90 serotipe. Di Indonesia beberapa penelitian dilakukan terkait distribusi serotipe. Penelitian di Jakarta menunjukkan serotipe yang dominan yaitu serotipe 7F. Penelitian di Bali yang menggunakan 21 sampel menunjukkan distribusi dari serotipe 19F, 23F, 6A/B, 7F dan 15B/C.⁴ Terdapat beberapa vaksin yang tersedia yaitu PPV23, PCV7, PCV10 dan PCV13. Namun vaksinasi yang tersedia memiliki keterbatasan cakupan serotipe, hal ini menyebabkan perlu dilakukan pengembangan terhadap strategi intervensi baik antimikroba maupun vaksin.^{5,6}

Protein permukaan *S. pneumoniae* adalah target potensial untuk imunisasi karena aksesibilitas dan fungsinya selama kolonisasi. Protein permukaan pneumococcal diklasifikasikan menjadi CBP, LPxTG binding proteins, lipoprotein dan protein permukaan non-klasik. CBP adalah protein permukaan yang paling baik karakterisasinya dimana bersifat imunogenik dan berperan dalam kolonisasi, dimana CbpG merupakan bagian dari CBP yang menjadi protein yang berperan secara langsung dalam proteolitik dan perlekatan sehingga menyebabkan sepsis.^{7,8} Maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah *S. pneumoniae* yang terisolasi di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah tahun 2012-2017 memiliki gen CbpG ini, yang berikutnya akan berhubungan dengan pengembangan vaksin baru.

BAHAN DAN METODE

Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan nomor kajian etik 428/UN.14.2/KEP/2017.

Peremajaan Bakteri *S. pneumoniae*

Penyimpanan dari stok isolat klinis bakteri *S. pneumoniae* yang terisolasi dari spesimen klinis darah, sputum, dan luka di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah tahun 2012–2017, dilakukan pada suhu sangat rendah -70°C . Rejuvenasi *S. pneumoniae* dilakukan pada media agar darah dan diinkubasi pada suhu 37°C , selama 24 jam. Pengujian *drug susceptibility test* dilakukan dengan *Vitek-2* (Biomereux) berdasarkan CLSI di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah Denpasar tahun 2012-2017.

Pengambilan Koloni dan Isolasi DNA *S. pneumoniae*

Koloni *S. pneumoniae* yang tumbuh pada plat agar darah dipanen. DNA *S. pneumoniae* diisolasi dengan metode *boiling*. Koloni disuspensi pada *buffer* TE dengan pH 8 kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit, lalu segera dimasukkan kedalam es selama 1 menit. Suspensi disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Sebanyak 75 μl supernatan diambil sebagai sumber cetakan untuk diamplifikasi.⁹

PCR untuk Mendeteksi Gen CbpG pada *S. pneumoniae*

PCR untuk mendeteksi gen CbpG dilakukan dengan menggunakan *Go Taq[®]Green Master Mix*. *Uniplex* PCR untuk mendeteksi gen CbpG menggunakan primer; *Forward*: 5'- GGG TTG GCA GGA GAT AAA TG-3' & *Reverse*: 5'- TTG GCT ACC TGT AAC CAT TGC-3'.¹⁰ Konsentrasi masing-masing primer 0,3 μM . Siklus PCR dimulai dengan pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit; 35 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing pada suhu 53°C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik serta ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit.⁹

Elektroforesis

Amplikon yang dihasilkan kemudian dielektroforesis pada 2% gel agarose dalam *buffer TBE* 1x dengan kekuatan listrik sebesar 100 volt selama 35 menit. Selanjutnya, DNA divisualisasikan dengan pewarnaan *GelRed[™]Nucleic Acid Gel*. Pita dianggap positif bila memiliki ukuran 130bp.^{8,10}

Sequencing

Sequencing dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa pita amplikon yang diperoleh merupakan pita CbpG yang diharapkan. *Sequencing* dilakukan dengan menggunakan BigDye Terminator v3.1 Kit yang dilakukan di First Base

(Malaysia). Hasil *sequencing* divisualisasi dan diedit dengan Mega version 7.0. Kemudian dibandingkan dengan data pada GenBank (www.ncbi.gov/BLAST).

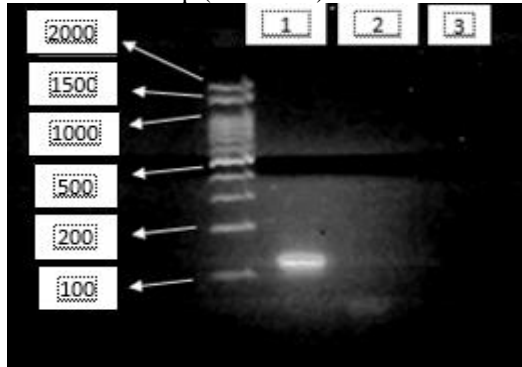
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan 21 sampel *S. pneumoniae* yang diisolasi dari Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar pada tahun 2012-2017. Sampel yang diambil dari sputum (n=9; 42,9%), luka (n=5; 23,8%), darah (n=7; 33,3%). Karakteristik sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Sampel

Jenis Sampel	Tahun						Jumlah
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Sputum	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (66,7%)	2 (22,2%)	1 (11%)	9 (42,9%)
Luka	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)	5 (23,8%)
Darah	4 (57,1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)	2 (28,6%)	0 (0%)	7 (33,3%)
Jumlah	4 (19%)	0 (0%)	1 (4,8%)	8 (38,1%)	6 (28,6%)	2 (9,5%)	21 (100%)

Teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi target gen *CbpG* dari seluruh sampel *S. pneumoniae* dengan menggunakan primer spesifik. Ukuran produk PCR untuk gen *CbpG* adalah 130 bp, gen *CbpG* dinyatakan positif jika pada elektroforesis hasil PCR ditemukan pita berukuran 130 bp dan dinyatakan negatif jika pada elektroforesis hasil PCR tidak ditemukan pita yang berukuran 130 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Amplifikasi PCR gen *CbpG* dengan marker 100 bp DNA dan suhu annealing 53°C.

Pada *lane* 1 gen positif *CbpG* (130 bp); *lane* 2 gen negative *CbpG*; *lane* 3 kontrol negatif H₂O

PCR menunjukkan bahwa 3 (14,3%) sampel positif memiliki gen *CbpG* dan 18 (85,7%) sampel dinyatakan negatif karena tidak menunjukkan adanya pita berukuran 130 bp. Untuk mengkonfirmasi bahwa pita yang teramplifikasi merupakan segmen gen *CbpG* maka dilakukan *sequencing*. *Sequencing* dari produk PCR dikonfirmasi dengan BLAST (CP 025076.1). Hasil *sequencing* produk PCR menunjukkan bahwa pita yang teramplifikasi merupakan segmen gen *CbpG*. Sampel yang positif berasal dari jenis sampel sputum (n=2; 9,5%) dan darah (n=1; 42,8%) (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil PCR gen *CbpG* dari berbagai jenis sampel *Streptococcus pneumoniae* di RSUP Sanglah Denpasar tahun 2012 – 2017

Jenis Sampel	Hasil		Jumlah
	CbpG [+]	CbpG [-]	
Sputum	2 (9,5%)	7 (33,3%)	9 (42,9%)
Luka	0 (0%)	5 (23,8%)	5 (23,8%)
Darah	1 (4,8%)	6 (28,6%)	7 (33,3%)
Jumlah	3 (14,3%)	18 (85,7%)	21 (100%)

Pada penelitian yang dilakukan di Malaysia dari 34 sampel yang digunakan untuk mendeteksi beberapa faktor virulensi diperoleh 59% positif terhadap gen CbpG tetapi penelitian ini menunjukkan hasil positif sebesar 14,3%.¹¹

Penelitian yang menggunakan 4 sampel serotipe yaitu 1, 7F, 19F, dan 23F pada vaksin PPV23 menunjukkan gen CbpG hanya teramplifikasi pada 1 sampel serotipe.⁹ Tidak teramplifikasinya gen CbpG pada seluruh isolat penelitian ini kemungkinan karena adanya gen faktor virulensi lain yang berperan pada proses infeksi *S. pneumoniae*, dimana biasanya gen CbpG akan banyak ditemukan pada isolat darah berdasarkan observasi yang dilakukan oleh Orihuela.¹²

Pada penelitian ini menunjukkan 1 hasil positif dari 6 sampel yang berasal dari darah dan 2 hasil positif lainnya diperoleh dari sputum. Hal ini sama dengan penelitian yang dilakukan Mahdi (2008) bahwa gen CbpG dapat bervariasi pada *setting* atau isolat yang digunakan saat eksperimen, dimana pada penelitian tersebut diperoleh hasil yang tidak signifikan dari keberadaan gen CbpG yang berasal dari darah sedangkan keberadaan gen lainnya menunjukkan hasil positif. Perbedaan ini menunjukkan keberadaan gen CbpG tidak selalu mengikuti *counterparts pneumococcal* dan bervariasi antar *strain* pada model infeksi yang berbeda.^{10,13}

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui distribusi gen CbpG pada isolat klinis *S. pneumoniae* tetapi belum dapat menjelaskan faktor yang mempengaruhi distribusi gen CbpG serta hubungan antara distribusi gen terhadap derajat keparahan penyakit yang ditimbulkan.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini, terdapat 14,3% isolat klinis *S. pneumoniae* di RSUP Sanglah Denpasar dari Januari 2012 – Maret 2017 yang memiliki gen CbpG. Ini menunjukkan bahwa gen CbpG merupakan salah satu faktor virulensi yang berperan dalam penyakit yang disebabkan oleh *S. pneumoniae*. Maka diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui peran faktor virulensi lain dalam menimbulkan penyakit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar telah memberi dukungan, dan Wahyu Hidayati selaku staf Molekuler Mikrobiologi Klinik FK serta Ni Wayan Nilawati selaku staf di Instalasi Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah telah membantu secara teknis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Glover DT, Hollingshead SK. *Streptococcus pneumoniae* surface protein

- PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis. *Infect Immun.* 2008;76(6):2767-2776.
2. Brien KLO, Wolfson LJ, Watt JP, and Henkle. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years. Elsevier Ltd. 2005;374(9693):893-902.
3. States M. Weekly epidemiological record. World Health Organization. 2008;83(42):373-384.
4. Fatmawati, N.N.D., Tarini, N.M.A., and Mayura I.P.B. Multiplex PCR for detection of capsular polysaccharides types of *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in Bali. *International Journal of Bioscience and Biotechnology.* 2015;2(2):93-99.
5. Schulz C and Hammerschmidt S. Exploitation of physiology and metabolomics to identify pneumococcal vaccine candidates. *Expert Review.* 2013;12(9):1061-1075.
6. Steens A and Vestheim DF. A review of the evidence to inform pneumococcal vaccine recommendations for risk groups aged 2 years and older. *REVIEW ARTICLE.* 2014;142:2471-248.
7. Lance E, Luo Xiao, and A Justin. Immunization with Pneumococcal Surface Protein K of Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* Provides Protection in a Mouse Model Colonization. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2015;22(11):1146-1153.
8. 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.
9. Mohaddam TG, Rad M, Mousavi SF, and Ghazvini K. Detection of *lytA*, *pspC* and *rrgA* genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy children. *Iranian Journal of Microbiology.* 2015;7(3): 156-160.
10. Desa MNM, Parasakthi N, Vadivelu and Sekaran. Expression analysis of adherence-associated genes in pneumococcal clinical isolates during adherence to human respiratory epithelial cells (in vitro) by real time PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2008; 288. 125-130.
11. Desa MN, Sekaran SD, Vadivelu and Parasakthi N. Distribution of CBP genes in *Streptococcus pneumoniae* isolates in relation to vaccine types, penicillin susceptibility and clinic site. *Epidemiology and Infection.* 2007;136:940-942

12. Orihuela CJ, Radin JN, Sublett JE. Microarray Analysis of Pneumococcal Gene Expression during Invasive Disease. *Infection and Immunity*. 2004;72. 5582-5596
13. Mahdi LK, Ogunniyit AD, LeMessurier KS, Paton JC. Pneumococcal Virulence Gene Expression and Host Cytokine Profiles during Pathogenesis of Invasive Disease. *Infection and Immunity*. 2008;76.646-657

ISSN: 2303-1395

DOAJ DIRECTORY OF
OPEN ACCESS
JOURNALS

E-JURNAL MEDIKA, VOL. 7 NO.11, Nopember, 2018

