

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Streptococcus pyogenes* PADA ANAK
PENDERITA TONSILOFARINGITIS DENGAN METODE
KULTUR DAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION***

*Identification of Streptococcus pyogenes Bacterium on Children
Suffering From Tonsillopharyngitis by Culture Method and
Technique of Polymerase Chain Reaction*

SYAM S. KUMAJI



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Streptococcus pyogenes* PADA ANAK
PENDERITA TONSILOFARINGITIS DENGAN METODE
KULTUR DAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION***

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

SYAM S. KUMAJI

kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

TESIS

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Streptococcus pyogenes* PADA ANAK PENDERITA
TONSILOFARINGITIS DENGAN METODE KULTUR DAN
TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION**

Disusun dan diajukan oleh

SYAM S. KUMAJI

Nomor Pokok P1506211401

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
pada tanggal 13 Agustus 2013
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Menyetujui
Komisi Penasihat,**

dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D
Ketua

Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D
Anggota

**Ketua Program Studi
Biomedik,**

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D

**Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin,**

Prof. Dr. Ir. Mursalim

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Syam S. Kumaji

Nomor Mahasiswa : P1506211401

Program Studi : Biomedik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Agustus 2013

Yang menyatakan

Syam S. Kumaji

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, yang telah memberikan rahmat, hidayat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Identifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes* pada anak penderita tonsilofaringitis dengan metode kultur dan teknik *Polymerase Chain Reaction*”.

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Kesehatan (M.Kes) dalam bidang keahlian Mikrobiologi pada program studi Biomedik Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Dalam kesempatan ini penulis dengan tulus menyampaikan terima kasih kepada :

1. dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., Ph.D selaku ketua komisi penasehat dan Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D selaku sekretaris komisi penasehat atas bantuan dan bimbingannya yang telah diberikan mulai dari pengembangan minat terhadap permasalahan penelitian ini, pelaksanaan penelitian sampai pada tahap penulisan tesis ini.
2. Prof. Dr. dr. Asaad Maidin, M.Sc, Sp.MK, dr. A. Dwi Bahagia Febriani, Ph.D, Sp. A (K) dan Dr. Rosana Agus, M.Si selaku anggota tim penguji yang telah memberikan masukan dan saran guna penyempurnaan tesis ini.

3. Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, selaku ketua program studi Biomedik Pascasarjana Univeristas Hasanuddin.
4. Prof. dr. Moh. Hatta, Ph.D, Sp.MK, Prof. Dr. drh. Lucia Muslimin, M.Sc, Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D, Dr. dr. Armyn Nurdin, M.Sc dan Dr. dr. Burhanuddin Bahar, M.Kes, sebagai staf dosen program studi Biomedik Konsentrasi Mikrobiologi yang telah memberikan arahan dan bimbingan selama masa studi.
5. Ayahanda Salim Kumaji, Ibunda Nari Karim, kakakku Nino Kumaji, ponakan Eka Rasyid serta nenek Suruni Mohamad dan tanteku Farida Djafar dan Salma Kumaji untuk semua doa dan dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan Magister.
6. Staf di Laboratorium Mikrobiologi dan Unit Penelitian Fakultas Kedokteran, Rumah Sakit Universitas Hasanuddin.
7. Rektor dan Civitas akedemika Universitas Negeri Gorontalo, khususnya Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan IPA atas dukungannya dalam menempuh pendidikan Magister.
8. Rekan-rekan di Program Studi Biomedik Konsentrasi Mikrobiologi angkatan 2011; Syahrini Hidayatullah, Norma Kambuno, Hartati, Anita, drh. Sartika Juwita, dr. Andi Salsa Anggraeni, Arniati Samaila, Sufiah, Alhawaris, Andi Munawir, Fardi, dr. Aslim Taslim dan Andini Umiati.

Dengan keterbatasan pengalaman, pengetahuan maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan perlu pengembangan lebih lanjut agar benar benar bermanfaat. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran agar tesis ini lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

Akhir kata, penulis berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan khususnya pada bidang mikrobiologi.

Makassar, Agustus 2013

Syam S. Kumaji

ABSTRAK

SYAM S. KUMAJI. *Identifikasi bakteri Streptococcus pyogenes Pada Anak Penderita Tonsilofaringitis dengan Metode Kultur dan Teknik Polymerase Chain Reaction* (dibimbing oleh Rizalinda Sjahril dan Muh. Nasrum Massi).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui a) seberapa besar bakteri *Streptococcus pyogenes* merupakan penyebab tonsilofaringitis; b) bagaimana sensitivitas dan spesifisitas *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam mendeteksi bakteri *S. pyogenes*.

Penelitian ini dilaksanakan di Puskesmas Kassi-Kassi, Kota Makassar. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah analisis potong lintang dengan mengumpulkan 60 swab tenggorok anak-anak usia 3 – 14 tahun dengan diagnosis tonsilofaringitis. Data dianalisis dengan menggunakan analisis statistik melalui tabulasi silang kemudian dilanjutkan dengan uji *chi square*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 60 sampel swab tenggorok 1 sampel positif bakteri *S. pyogenes* secara kultur sedangkan 5 sampel positif secara PCR. Pemeriksaan bakteri *S. pyogenes* dari swab tenggorok dengan teknik PCR dan kultur masing-masing memiliki sensitivitas 100% dan spesifisitas 93,2%.



ABSTRACT

SYAM S. KUMAJI. *Identification of Streptococcus pyogenes Bacterium on Children Suffering From Tonsillopharyngitis by Culture Method and Technique of Polymerase Chain Reaction* (supervised by Rizalinda Sjahril and Muh. Nasrum Massi).

The research aimed at investigating: a) how much *Streptococcus pyogenes* bacteria representing the cause tonsillopharyngitis; b) to what extent the sensitivity and specificity of *Polymerase Chain Reaction* (PCR) in detecting the bacterium *Streptococcus pyogenes*.

The research was carried out in Public Health Center, Kassi-Kassi of Makassar City. The research used the cross sectional method by collecting 60 children throat swabs of 3-14 years old. The data were analysed by using the statistic analysis through the cross-tabulation.

The research results indicated that from 60 samples of throat swabs, 1 sample is positive to have the *Streptococcus pyogenes* bacterium culturally, whereas 5 samples are positive by PCR technique. The examination of the *Streptococcus pyogenes* bacterium from the throat swabs by the PCR and culture methods each has the sensitivity of 100% and specificity of 93.2%.



DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xvi
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	6
D. Manfaat Penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i>	
1. Ciri Khas <i>Streptococcus pyogenes</i>	7
2. Klasifikasi <i>Streptococcus pyogenes</i>	8
3. Biakan dan Sifat <i>Streptococcus pyogenes</i>	9
4. Struktur Antigen <i>Streptococcus pyogenes</i>	9
5. Patomekanisme Infeksi <i>Streptococcus pyogenes</i>	15

B. Tonsilofaringitis	
1. Definisi	16
2. Etiologi	17
3. Patomekanisme	19
4. Manifestasi Klinis	20
5. Diagnosis	21
C. Teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i>	
1. Prinsip Umum <i>Polymerase Chain Reaction</i>	24
2. Komponen Utama <i>Polymerase Chain Reaction</i>	26
D. Kerangka Konsep	31
E. Definisi Operasional	35
III. METODOLOGI PENELITIAN	
A. Desain Penelitian	36
B. Tempat dan Waktu Penelitian	36
C. Alat dan Bahan Penelitian	36
D. Populasi dan Sampel Penelitian	37
E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi.	38
F. Izin Penelitian dan <i>Ethical Clearance</i> .	38
G. Prosedur Penelitian	39
H. Teknik Analisis	44
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Penelitian	46
B. Pembahasan	53

V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	60
B. Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	66

DAFTAR TABEL

No		Halaman
1	Mikroorganisme penyebab faringitis akut	18
2	Kriteria Centor modifikasi Mclsaac	22
3	Distribusi pasien tonsilofaringitis menurut umur dan jenis kelamin	47
4	Distribusi gejala klinis penderita tonsilofaringitis berdasarkan skor Centor modifikasi Mclsaac	47
5	Hasil kultur bakteri pada media nutrient agar	49
6	Hasil pewarnaan Gram dan uji katalase	49
7	Hasil kultur bakteri pada media blood agar	49
8	Sensivitas dan spesifitas uji PCR dibandingkan dengan pemeriksaan kultur	51
9	Korelasi antara skor Centor, kultur positif <i>S. pyogenes</i> dan PCR positif <i>S. pyogenes</i>	52

DAFTAR GAMBAR

No		Halaman
1	Struktur tubuh <i>Streptococcus pyogenes</i>	8
2	Infeksi tonsilofaringitis	17
3	Bagan proses <i>Polymerase Chain Reaction</i>	25
4	Kerangka konseptual	34
5	Alur penelitian	45
6	Ciri koloni bakteri kecil, halus dan putih opak (K31) dan koloni besar, putih opak dan cembung (K30) pada media nutrisi agar	48
7	Hasil pewarnaan Gram	48
8	A= Streptokokus α -hemolitik; B = Streptokokus β -hemolitik; C= Streptokokus γ - hemolitik)	50
9	Hasil positif PCR <i>S. pyogenes</i> pada swab tenggorok dengan amplicon 439 bp	51

DAFTAR LAMPIRAN

No		Halaman
1	Riwayat gejala klinis pasien tonsilofaringitis	66
2	Hasil pengamatan koloni, pewarnaan Gram, uji katalasedan uji bacitracin	69
3	Sekuens primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA <i>Streptococcus pyogenes</i>	79
4	Data GeneBank (<i>Streptococcus pyogenes</i> NADase-streptolysin O operon (nga, orf1, slo), complete cds)	80
5	Data uji statistik sensitivitas dan spesifisitas PCR terhadap pemeriksaan kultur	84
6	Surat rekomendasi persetujuan etik	85
7	Surat keterangan melaksanakan penelitian	86

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
WHO	World Health Organization
DNA	Deoxyribonucleic Acid, asam deoksiribonukleat
RNA	Ribonucleic Acid
RADT	Rapid Antigen Detection Test
slo	Streptolysin O
PCR	Polymerase Chain Reaction
GAS	Grup A Streptokokus
EDTA	Etilen Diamin Tetra Acetat
SDS	Sodium Deodesil Sulfat
dNTP	Deoksiribonukleotida Trifosfat
TBE	Tris Borate
UV	Ultraviolet
PBS	Phosphate Buffered Saline
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
DEPC	Diethylpyrocarbonate
bp	Base Pairs

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Tonsilofaringitis adalah suatu penyakit peradangan yang menyebabkan sakit pada tenggorokan terutama adalah bagian belakang tenggorokan. Istilah tonsilofaringitis digunakan untuk menunjukkan semua infeksi akut pada faring, termasuk tonsilitis yang berlangsung hingga 14 hari (Rahajoe, dkk, 2010). Gejalanya biasanya diawali dengan nyeri tenggorokan pada saat menelan, demam, sakit kepala, mual, muntah dan sakit perut (Gerber, 2005; Mandal, *et al*, 2008).

Tonsilofaringitis merupakan infeksi umum yang terjadi pada anak-anak berusia antara 5 – 15 tahun, yaitu sekitar 15% sampai 30 % dan infeksi ini disebarkan melalui kontak orang per orang, melalui tetesan ludah atau sekresi nasal dengan tingkat insidensinya meningkat pada saat musim hujan untuk negara-negara tropis (Cunningham, 2000; Schaad, 2004; Steer, *et al*, 2006).

Menurut hasil penelitian diperkirakan 616 juta kasus faringitis terjadi setiap tahun di seluruh dunia. Di Amerika Serikat dikatakan bahwa pasien faringitis akut yang berkunjung ke dokter selama satu tahun adalah sekitar 12 juta pasien (Halsey, 2012). Sedangkan menurut hasil laporan National Ambulatory Medical Care Survey bahwa di Amerika Serikat dari 200 per

1000 penduduk yang berkunjung ke dokter disebabkan oleh infeksi saluran pernapasan termasuk faringitis akut (Somro, *et al*, 2011).

Tonsilofaringitis dapat disebabkan oleh virus maupun bakteri. Virus merupakan salah etiologi terbanyak penyebab tonsilofaringitis akut, terutama pada anak berusia ≤ 3 tahun (Rahajoe, dkk, 2010). Bakteri yang umumnya menyebabkan tonsilofaringitis adalah *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) atau dikenal dengan Streptococcus beta hemolitikus grup A (Bisno, *et al*, 1997, 2003; Shulman, *et al*, 2012).

S. pyogenes merupakan bakteri patogen penting yang bertanggung jawab untuk berbagai penyakit dengan manifestasi klinis beragam pada manusia karena menimbulkan invasi lokal dan sistemik dan kelainan imunologi pasca infeksi streptokokus (Cole, *et al*, 2011; Jawetz, 2007). Bakteri ini merupakan kelompok bakteri patogen yang memiliki kemampuan untuk menyebabkan infeksi kulit maupun tenggorokan (Darmastadt, *et al*, 2000).

S. pyogenes adalah bakteri penyebab utama morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia terutama di negara-negara berkembang dengan perkiraan 500.000 orang mengalami kematian per tahun, dan sebagian besar disebabkan infeksi invasif, demam rematik akut, dan jantung rematik (Steer, *et al*, 2007; Juhn, *et al*, 2012; Borek, *at al*, 2012). Dari data WHO dilaporkan bahwa penyebab kematian akibat infeksi bakteri *S. pyogenes* menduduki urutan kesembilan di antara sepuluh penyebab kematian utama di dunia (Juhn, *et al*, 2012). Selanjutnya

dilaporkan bahwa bakteri ini menyebabkan 700 juta kasus dengan infeksi ringan dan 650 ribu kasus dengan infeksi berat dengan angka kematian sekitar 25% (Cole, *et al*, 2011).

Infeksi tonsilofaringitis yang disebabkan oleh Streptokokus dan virus sangat sulit untuk dibedakan. Dengan penilaian tertentu atas gejala dan tanda, bisa diprediksi penyebab tonsilofaringitis apakah virus atau bakteri. Usaha untuk membedakan tonsilofaringitis bakteri dan virus bertujuan agar pemberian antibiotik sesuai indikasi. Salah satu cara untuk membedakan penyebab tonsilofaringitis akut bakteri atau virus adalah dengan menggunakan kriteria Centor modifikasi Mclsaac.

Kriteria Centor merupakan kriteria yang telah lama diterima secara luas sebagai kriteria klinis yang divalidasi dalam mendiagnosa tonsilofaringitis akibat bakteri Streptokokus pada orang dewasa sejak 1981. Kriteria ini dimodifikasi oleh Mclsaac pada 1998, dengan penambahan kriteria umur, yaitu umur 3–14 tahun memiliki nilai satu, 15–44 tahun memiliki nilai nol, dan lebih atau sama dengan 45 tahun memiliki nilai minus satu (Mclsaac, *et al*, 2004; Malino, 2012).

Diagnosis tonsilofaringitis tidak dapat ditegakkan hanya berdasarkan gejala klinis dan pemeriksaan fisik. Untuk itu pemeriksaan laboratorium sangatlah penting sebagai penunjang dalam pemeriksaan infeksi Streptokokus ataupun virus. Baku emas penegakan diagnosis tonsilofaringitis bakteri atau virus adalah melalui pemeriksaan kultur dari apusan tenggorok.

Metode kultur masih merupakan standar baku (*gold standart*) pemeriksaan diagnostik untuk deteksi Streptokokus β hemolitik grup A dengan tingkat sensitivitas 90-95% (Steer, *et al*, 2007). Pemeriksaan kultur dapat memberikan gambaran penyebab tonsilofaringitis yang lebih akurat. Pemeriksaan kultur dapat membantu mengurangi pemberian antibiotik yang tidak perlu pada pasien tonsilofaringitis (Rahajoe, dkk, 2010). Namun metode kultur memiliki keterbatasan tersendiri, yaitu dalam identifikasi mikroorganisme penyebab memerlukan waktu sekitar sekitar 2-3 hari, sehingga hal ini akan menyebabkan keterlambatan dalam memulai pengobatan dan dan diperlukan fasilitas laboratorium untuk melakukan kultur tersebut (Aalbers, *et al*, 2011; Jurianti, A, 2008).

Dengan perkembangan biologi molekuler maka telah dilakukan beberapa upaya pengembangan untuk mendeteksi adanya bakteri *S. pyogenes*, salah satunya dengan dengan pendekatan metode molekuler, yaitu teknik *Polymerase Chan Reaction* (PCR) (Goyal, *et al*, 2012).

Polymerase Chan Reaction (PCR) adalah suatu pendekatan metode molekuler dengan cara enzimatis untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida (gen target) tertentu dengan cara *in vitro*. Teknik PCR tersebut sangat sensitif sehingga dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA (Putra, 1999; Yuwono, 2006).

Hasil penelitian Jing *et al* (2006) dari 86 strain streptokokus grup A yang diuji menggunakan primer spesifik ternyata teknik PCR mampu mendeteksi 100% keberaaan bakteri streptokokus grup A, yakni *S.*

pyogenes. Menurut Kaltwasser, G., *et al*, (1997) bahwa teknik PCR dapat digunakan untuk pemeriksaan cepat bakteri *S. pyogenes* dengan tingkat sensitivitas 96%.

Teknik PCR dapat digunakan untuk mengatasi kelemahan diagnostik konvensional (kultur). Penggunaan metode PCR mempunyai banyak kelebihan, yaitu dapat menghasilkan amplifikasi produk yang akurat, cepat, dan spesifik serta hanya membutuhkan jumlah sampel yang sedikit. Berbeda dengan metode konvensional lainnya yang membutuhkan waktu yang lama, jumlah sampel yang banyak dan metode pembacaan hasil yang tidak tepat.

Berdasarkan uraian di atas dan mengingat pentingnya efisiensi waktu dalam pemeriksaan penyakit tonsilofaringitis sehingga tidak menjadi kronis maka perlu dikembangkan suatu metode yang cepat dan aman untuk mendeteksi penyakit tonsilofaringitis secara cepat dan dini, salah satunya dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas maka dapat dirumuskan beberapa pertanyaan sebagai berikut.

1. Seberapa besar bakteri *S. pyogenes* merupakan penyebab tonsilofaringitis pada anak-anak berumur 3 – 14 tahun.
2. Bagaimana sensitivitas dan spesifisitas *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam mendeteksi bakteri *S. pyogenes*.

C. TUJUAN PENELITIAN

a. Tujuan Umum

Untuk mengidentifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes* pada anak penderita tonsilofaringitis dengan metode kultur dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

b. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui seberapa besar bakteri *S. pyogenes* merupakan penyebab tonsilofaringitis pada anak-anak berumur 3 – 14 tahun.
2. Untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam mendeteksi bakteri *S. pyogenes*.

D. MANFAAT PENELITIAN

1. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan bagi dokter dalam penegakan diagnosis tonsilofaringitis pada anak secara klinis, kultur dan PCR.
2. Sebagai sumber data untuk penelitian lanjut tentang infeksi akibat bakteri *S. pyogenes*.

BAB II

LANDASAN TEORI

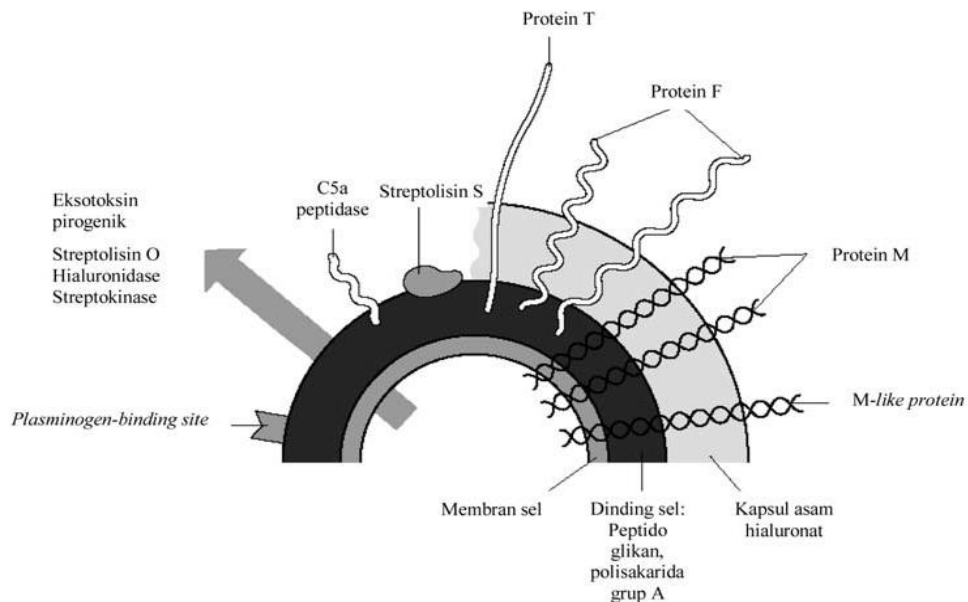
A. Bakteri *Streptococcus pyogenes*

1. Ciri Khas *Streptococcus pyogenes*

Bakteri *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) merupakan Gram positif, nonmotil, tidak berspora, fakultatif anaerob, berbentuk rantai berdiameter 0,6 – 1,0 mikrometer. Kokus membelah pada bidang yang tegak lurus sumbu panjang rantai. Anggota rantai tersebut sering membentuk gambaran diplokokus, dan kadang-kadang terlihat seperti rantai (Cunningham, 2000; Jawetz, *et al*, 2007).

Bakteri *S. pyogenes* terdiri dari kapsul, asam hialuronat, dinding sel, fimbriae dan membran sitoplasma yang menutupi sitoplasma. Kapsul yang terdiri dari asam hialuronat yang biasanya akan terlihat jelas pada biakan yang masih sangat muda dan kapsul ini mengganggu proses fagositosis dan berperan dalam infeksi. Dinding selnya mengandung protein (M, T dan R), karbohidrat yang spesifik dan peptidoglikan. Fimbriae atau pili seperti rambut menonjol menembus kapsul dan sebagian terdiri dari protein M yang dilapisi asam lipoteikoat yang mempunyai peranan untuk melekatkan ke sel epitel. Membran sitoplasma dibentuk dari lipoprotein dan protein yang berperan dalam sintesis dinding

sel (Jawetz, *et al*, 2007; Pardede, 2009). Untuk jelasnya struktur tubuh dari bakteri *Streptococcus* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur tubuh *Streptococcus pyogenes*
Sumber: Pardede, S.O., 2009

2. Klasifikasi *Streptococcus pyogenes*

Setelah bertahun-tahun, klasifikasi streptokokus dikelompokkan menjadi beberapa kategori utama berdasarkan serangkaian pengamatan morfologi, spesifitas serologi, reaksi biokimia dan gambaran ekologi (Jawetz, *et al*, 2007). Untuk jelasnya klasifikasi bakteri *S. pyogenes* berdasarkan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* adalah sebagai berikut.

Kerajaan : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Lactobacillales

Famili : Streptococcaceae
Genus : Streptococcus
Spesies : *S. pyogenes*

3. Biakan dan Sifat *Streptococcus pyogenes*

Bakteri ini tumbuh pada medium padat sebagai koloni diskoid, biasanya berdiameter 1-2 mm. Bakteri ini mampu menghasilkan kapsul sehingga sering membentuk koloni mukoid yang mengkilat atau suram (Jawetz, *et al*, 2007).

Bakteri ini memperoleh energi terutama diperoleh dari penggunaan gula. Pertumbuhan bakteri ini cenderung kurang subur pada medium padat atau kaldu kecuali diperkaya dengan darah atau cairan jaringan. Untuk proses pertumbuhan dan hemolisisnya dibantu dengan inkubasi dalam 10% CO₂. Bakteri ini secara khas menghasilkan zona hemolisis β yang besar (berdiameter 1 cm) disekitar koloni yang berdiameter lebih dari 0,5 mm dan biasanya bersifat sensitif terhadap basitrasin (Jawetz, *et al*, 2007).

4. Struktur Antigen *Streptococcus pyogenes*

a. Antigen Dinding Sel Grup-Spesifik

Karbohidrat ini terdapat pada dinding sel dan menjadi dasar pengelompokan serologi (grup *Lancefield* A-H, K-U). Ekstrak dari antigen spesifik-grup untuk pengelompokan Streptokokus dapat dibuat

dengan mengekstraksi biakan yang telah disentrifugasi dengan asam hidroklorida panas, asam nitrat, atau formamida; dengan proses lisis sel streptococcus secara enzimatis (misalnya dengan pepsin atau tripsin) atau dengan memasukkan substansi sel ke dalam autoklaf dengan tekanan 15 pound selama 15 menit. Spesifitas serologik pada karbohidrat spesifik-grup ditentukan oleh gula amino. Untuk Streptokokus grup A, gula amino tersebut adalah ramnosa-*N*-asetilglukosamin; untuk grup B polisakarida ramnosa-glukosamin; untuk grup C ramnosa-*N*-asetilgalaktosamin; untuk grup D asam gliserol teikoat yang mengandung D-alanin dan glukosa; dan grup F glukopiranosil-*N*-asetilgalaktosamin (Jawetz, *et al*, 2007).

b. Protein M

Substansi ini merupakan faktor virulensi *S. pyogenes* grup A yang utama. Protein-M terlihat seperti tonjolan mirip rambut pada dinding sel Streptokokus. Streptokokus bersifat virulen bila terdapat protein M, dan apabila tidak ada antibodi spesifik-tipe M, organisme ini mampu bertahan terhadap proses fagositosis oleh leukosit polimorfonukleat. Streptokokus grup A yang tidak memiliki protein M tidak bersifat virulen. Kekebalan terhadap infeksi Streptococcus grup A berkaitan dengan adanya antibodi spesifik terhadap protein M. Karena terdapat lebih dari 80 tipe protein M, seseorang dapat mengalami infeksi berulang oleh Streptokokus grup A dengan tipe M yang berbeda.

Molekul protein M mempunyai struktur seperti batang yang melingkar-lingkar dan memisahkan bagian-bagian yang fungsional. Struktur ini memungkinkan serangkaian perubahan yang besar sambil tetap memelihara fungsi, sehingga imunodeterminan protein M dapat berubah dengan mudah.

Tampaknya protein M dan mungkin antigen dinding sel *Streptococcus* lainnya memiliki peran penting pada patogenesis demam rematik. Membran dinding sel *Streptokokus* yang telah dimurnikan menginduksi antibodi yang bereaksi dengan sarkolemma jantung manusia; karakteristik reaksi silang antigen masih belum jelas. Komponen dinding sel tipe M tertentu menginduksi antibodi yang bereaksi dengan jaringan otot jantung. Antigen yang terdapat pada protein M kelas I bereaksi silang dengan otot jantung manusia, dan protein M kelas I mungkin merupakan penentu virulensi untuk demam rematik (Jawetz, *et al*, 2007).

c. Zat T

Antigen ini tidak berhubungan dengan virulensi *Streptokokus*. Tidak seperti protein M, zat T tidak tahan asam dan panas. Zat ini diperoleh dari *Streptokokus* melalui pencernaan proteolitik, yang merusak protein M secara cepat. Zat T memungkinkan pembedaan tipe-tipe *Streptokokus* tertentu melalui aglutinasi dengan antiserum spesifik, sedangkan tipe-tipe

lainnya memiliki zat T yang sama. Antigen permukaan lainnya disebut protein R (Jawetz, *et al*, 2007).

d. Nukleoprotein

Ekstraksi protein dengan basa lemah menghasilkan campuran protein dan zat-zat lainnya dengan spesifisitas serologi yang rendah, dan disebut zat T. Zat ini kemungkinan menyusun sebagian besar badan sel *Streptokokus* (Jawetz, *et al*, 2007).

6. Toksin dan Enzim

Bakteri streptokokus grup A menghasilkan lebih dari 20 produk ekstraseluler antigenik, diantaranya sebagai berikut.

a. Hemolisin

Banyak streptokokus mampu melakukan hemolisis sel darah merah secara *in vitro* dalam berbagai tingkatan. Pemecahan total eritrosit dengan pelepasan hemoglobin disebut β hemolisis. Lisis eritrosit yang tidak sempurna dengan pembentukan pigmen hijau disebut α hemolisis.

S. pyogenes β hemolitik grup A menghasilkan dua jenis hemolisin (streptolisin), yaitu :

- 1) Streptolisin O; merupakan protein (BM 60.000) yang aktif secara hemolitik dalam keadaan tereduksi (mempunyai gugus -SH) tetapi segera tidak aktif bila ada oksigen. Streptolisin O berperan pada beberapa hemolisis yang terlihat ketika pertumbuhan berada dalam

potongan yang dalam medium agar darah. Zat ini secara kuantitatif terikat dengan antistreptolisin O, suatu antibodi yang terdapat pada manusia setelah infeksi streptokokus apapun yang menghasilkan streptolisin O. Antibodi ini menghambat hemolisis oleh streptolisin O, sehingga hal ini menjadi dasar uji kuantitatif untuk antibodi.

- 2) Streptolisin S; zat yang berperan membentuk zona hemolitik di sekitar koloni streptokokus yang tumbuh di permukaan medium agar darah. Zat ini dilepaskan bila ada serum-karena itu disebut streptolisin S. Streptolisin ini tidak bersifat antigenik, tetapi dapat dihambat oleh inhibitor spesifik yang sering terdapat pada serum manusia dan hewan serta tidak tergantung pada pajanan streptokokus terdahulu.

b. Streptokinase (Fibrinolisin)

Streptokinase dihasilkan berbagai strain streptokokus β hemolitik grup A. Enzim ini mengubah plasminogen pada plasma manusia menjadi plasmin, suatu enzim proteolitik yang mencerna fibrin dan protein lain. Proses pencernaan ini dapat terganggu oleh penghambat serum nonspesifik dan antibodi spesifik, yaitu antistreptokinase. Streptokinase diberikan secara intravena untuk menghambat emboli paru serta trombosis arteri dan vena koroner.

c. Streptodornase

Streptodornase (*streptococcal deoxyribonuclease*) melakukan depolimerisasi DNA. Aktivitas enzimatis dapat diukur dengan menghitung viskositas larutan DNA yang diketahui. Viskositas eksudat purulen terutama akibat adanya deoksinukleoriboprotein. Campuran streptodornase dan streptokinase digunakan pada debridemen enzimatis. Campuran tersebut membantu mencairkan eksudat dan membantu pengeluaran pus dan jaringan nekrotik, sehingga obat antimikroba dapat masuk lebih mudah, dan permukaan yang terinfeksi lebih cepat sembuh.

d. Hialuronidase

Hialuronidase memecah asam hialuronat, sebuah komponen penting bahan dasar jaringan ikat. Karena itu hialuronidase membantu penyebaran mikroorganisme yang infeksius. Hialuronidase bersifat antigenik dan spesifik untuk setiap bakteri atau jaringan. Setelah terjadi infeksi oleh mikroorganisme penghasil hialuronidase, ditemukan antibodi spesifik di dalam serum.

e. Eksotoksin Pirogenik

Eksotoksin pirogenik dihasilkan streptokokus grup A yang terdiri dari tiga jenis berdasarkan sifat antigeniknya; A, B dan C. Eksotoksin A merupakan eksotoksin yang mempunyai faga lisogenik yang merupakan sebuah superantigen. Eksotoksin streptokokus pirogenik menimbulkan

sindrom syok toksik streptokokus dan demam Scarlet. Eksotoksin streptokokus pirogenik C juga dapat berperan menyebabkan sindroma ini, sedangkan peran eksotoksin streptokokus pirogenik B masih belum jelas.

f. Difosporidin Nukleotidase

Enzim ini dilepaskan ke lingkungan oleh beberapa streptokokus. Zat ini kemungkinan berkaitan dengan kemampuan organisme membunuh leukosit. Beberapa strain menghasilkan proteinase dan amilase.

7. Patomekanisme Infeksi *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes merupakan salah satu patogen yang banyak menginfeksi manusia. Diperkirakan 5-15% individu normal memiliki bakteri ini dan biasanya terdapat pada saluran pernapasan, namun tidak menimbulkan gejala penyakit. *S. pyogenes* dapat menginfeksi ketika pertahanan tubuh inang menurun ketika organisme tersebut mampu berpenetrasi melewati pertahanan inang yang ada. Bila bakteri ini tersebar sampai ke jaringan yang rentan, maka infeksi supuratif dapat terjadi, seperti faringitis, tonsilitis, impetigo dan demam *scarlet* (Cunningham, 200).

Predileksi masuknya *S. pyogenes* ke dalam tubuh atau kemampuan protein M yang menimbulkan faringitis, tonsilitis atau impetigo/pioderma tidak ada penjelasan yang lengkap. Pada infeksi primer tenggorok adalah kerusakan dari epitel sel faring. Untuk itu bakteri ini

harus bersaing dengan flora di faring, dan bersama dengan *Streptococcus viridans* akan berkoloni ditenggorok dan menghasilkan *bacteriocin like substance*, substansi inilah yang menimbulkan infeksi saluran napas (Soedarmo, dkk, 2010).

Pada keadaan terjadinya impetigo, bakteri *S. pyogenes* harus berkompetisi dengan flora bakteri lokal, terjadi peningkatan *S. pyogenes* pada kulit melalui lemak kulit dan secara *invitro* akan menimbulkan infeksi, mungkin juga masuknya bakteri ini bisa dilawan oleh barrier kulit terhadap terjadinya infeksi. Masuknya bakteri pada jaringan mungkin dibantu oleh bakteri lain yang ada di jaringan itu (Soedarmo, dkk, 2010).

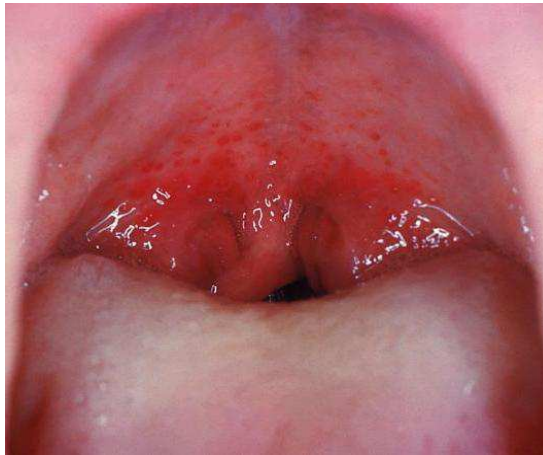
Kerusakan terhadap leukosit dan jaringan sel yang dihasilkan dan produksi toksin, dan menyebarkan infeksi mungkin ditandai oleh enzim spesifik yang menyerang asam hialuronik dan fibrin. Protein M merupakan komponen permukaan dari strain virus, adalah anti fagosit dan juga berisi bahan sitotoksik yang ditunjukkan dari antibodi non spesifik. Beberapa substansi Streptokokus seperti toksin eritrogenik atau pirogenik dan peptidoglikan mempunyai endotoksin (Soedarmo, dkk, 2010).

B. Tonsilofaringitis

1. Definisi

Istilah tonsilofaringitis akut digunakan untuk menunjukkan semua infeksi akut pada faring, termasuk tonsilitis yang berlangsung hingga 14

hari. Tonsilofaringitis merupakan peradangan akut membran mukosa faring dan struktur lain disekitarnya (Gambar 2). Karena letaknya yang sangat dekat dengan hidung dan tonsil, jarang terjadi hanya infeksi lokal faring atau tonsil (Rahajoe, dkk, 2010).



Gambar 2. Infeksi Tonsilofaringitis
Sumber: <http://www.commons.wikimedia.org>

2. Etiologi

Berbagai virus dan bakteri dapat menjadi etiologi tonsilofaringitis, baik tonsilofaringitis sebagai manifestasi tunggal maupun sebagai bagian dari penyakit lain. Virus merupakan etiologi terbanyak faringitis akut terutama pada anak-anak berusia < 3 tahun, misalnya adenovirus, rhinovirus, dan parainfluenza, yaitu sekitar 70% sedangkan bakteri sekitar 20 – 30% (Rahajoe, dkk, 2010; Somro, *et al*, 2011).

S. pyogenes adalah bakteri penyebab terbanyak faringitis akut. Bakteri ini mencakup 15-30% (diluar kejadian epidemik) dari penyebab faringitis akut pada anak, sedangkan pada dewasa hanya sekitar 5-10%. Bakteri *S. pyogenes* biasanya bukan merupakan penyebab yang umum

pada anak usia prasekolah, tetapi pernah dilaporkan terjadi wabah di tempat penitipan anak (Rahajoe, dkk, 2010).

Mikroorganisme seperti Klamidia dan Mikoplasma pernah dilaporkan dapat menyebabkan infeksi tonsilofaringitis, tetapi sangat jarang terjadi. Di negara Inggris dan Skandinavia pernah dilaporkan infeksi oleh *Arcobacterium haemolyticum*. Beberapa bakteri dapat melakukan proliferasi ketika sedang terjadi infeksi virus dan dapat ditemukan pada kultur, tetapi biasanya bukan merupakan penyebab dari faringitis/tonsilofaringitis akut (Rahajoe, dkk, 2010). Beberapa mikroorganisme yang dapat menyebabkan faringitis dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Mikroorganisme Penyebab Faringitis Akut

No	Mikroorganisme	Kelainan yang ditimbulkan
1	Bakteri	
	a. Streptococcus, grup A	Pharyngitis, tonsilitis, demam scarlet
	b. Streptococcus, grup C dan G	Pharyngitis, tonsillitis, scarlatiniform
	c. Campuran bakteri anaerob	Vincent's angina
	d. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Faringitis, tonsilitis
	e. <i>Corynebacterium diphtheria</i>	Difteri
	f. <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	Pharyngitis, scarlatiniform
	g. <i>Yersinia enterocolitica</i>	Pharyngitis, enterokolitis
	h. <i>Yersinia pestis</i>	Plague
	i. <i>Francisella tularensis</i>	Tularemia (oropharyngeal form)
2	Virus	Common cold/ rinitis
	Rhinovirus	Common cold
	Coronavirus	Pharyngoconjunctival fever/ IRA
	Adenovirus	Faringitis, gingivostomatitis
	Virus Herpes simpleks 1	Cold, croup

dan 2	Virus Parainfluenza	Herpangina, hand-foot-and-mouth disease
	Coxsackievirus A	
	Virus Epstein-Barr	Infeksi mononukleus
	Cytomegalovirus	Mononukleosis Sitomegalovirus
	HIV	Infeksi HIV primer
	Virus Influenza A dan B	Influenza
3	Mikoplasma <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Pneumonia, bronkitis, faringitis (?)
4	Klamidia <i>Chlamydia psittaci</i> <i>C. pneumoniae</i>	IRA, pneumonia Pneumonia, faringitis (?)

(Sumber; Bisno, *et al*, 1997)

3. Patomekanisme

Nasofaring dan orofaring adalah tempat masuknya organisme ini, melalui kontak langsung dengan mukosa nasofaring dan orofaring yang terinfeksi atau dengan benda lain yang terkontaminasi. Penyebaran bakteri Streptokokus grup A memerlukan pejamu yang rentan dan difasilitasi dengan kontak yang erat (Rahajoe, dkk, 2010).

Bakteri maupun virus dapat secara langsung menginvasi mukosa faring yang kemudian menyebabkan respon peradangan lokal. Sebagian besar peradangan melibatkan nasofaring, uvula dan palatum mole. Perjalanan penyakitnya ialah terjadi inokulasi dari agen infeksius di faring yang menyebabkan peradangan lokal, sehingga menyebabkan eritema faring, tonsil atau keduanya. Infeksi Streptokokus ditandai dengan invasi lokal serta pelepasan toksin ekstraseluler dan protease. Transmisi bakteri ini terutama terjadi akibat kontak tangan dengan sekret hidung

dibandingkan dengan kontak oral. Gejala tampak setelah masa inkubasi yang pendek, yaitu 24-72 jam (Rahajoe, dkk, 2010).

4. Manifestasi Klinis

Gejala tonsilofaringitis yang khas akibat bakteri *Streptococcus* berupa nyeri tenggorokan dengan awitan mendadak, disfagia dan demam. Urutan gejala yang biasanya dikeluhkan oleh anak berusia di atas 2 tahun adalah nyeri kepala, nyeri perut dan muntah. Selain itu juga didapatkan demam yang dapat mencapai suhu 40 °C, beberapa jam kemudian terdapat nyeri tenggorok. Gejala seperti rinorea, suara serak, batuk, konjungtivitas dan diare biasanya disebabkan virus. Kontak dengan pasien rinitis juga dapat ditemukan pada anamnesis (Rahajoe, dkk, 2010).

Tonsilofaringitis *Streptokokus* sangat mungkin jika dijumpai gejala dan tanda, yaitu awitan akut, disertai mual dan muntah, faring hiperemis, demam, nyeri tenggorokan, tonsil bengkak dengan eksudasi, kelenjar getah bening leher anterior bengkak dan nyeri, uvula bengkak dan merah, ekskoriasi hidung disertai lesi impetigo sekunder, ruam skarlatina dan petekie palatum mole.

Penemuan tersebut bukan merupakan tanda positif tonsilofaringitis *Streptokokus*, karena dapat juga ditemukan pada penyebab tonsilofaringitis yang lain. Sedangkan bila dijumpai gejala dan tanda berikut ini, maka kemungkinan besar bukan tonsilofaringitis *Streptokokus*, yaitu usia di bawah 3 tahun, awitan bertahap, kelainan melibatkan

beberapa mukosa, konjungtivitas, diare, batuk, pilek, suara serak, mengi, ronki di paru, dan eksantern ulseratif.

Pada tonsilofaringitis akibat virus, dapat juga ditemukan ulkus di palatum mole dan dinding faring serta eksudat di palatum dan tonsil, tetapi sulit dibedakan dengan eksudat tonsilofaringitis *Streptococcus*. Gejala yang timbul dapat menghilang dalam 24 jam berlangsung 4-10 hari, jarang menimbulkan komplikasi dan memiliki prognosis yang baik (Rahajoe, dkk, 2010).

4. Diagnosis

Diagnosis ditegakkan berdasarkan gejala klinis, pemeriksaan fisis dan pemeriksaan laboratorium. Sulit membedakan antara tonsilofaringitis streptococcus dan tonsilofaringitis virus hanya berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan fisis. Baku emas penegakan diagnosis tonsilofaringitis bakteri atau virus adalah melalui pemeriksaan kultur dari apusan tenggorok. Apusan tenggorok yang adekuat pada area faring diperlukan untuk menegakkan adanya *S. pyogenes*. Untuk memaksimalkan akurasi, maka diambil apusan dari dinding faring posterior dan regio tonsil, lalu diinokulasikan pada media agar darah domba 5%, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Pemeriksaan kultur yang dilanjutkan dengan uji sensitivitas bakteri dapat membantu mengurangi pemberian antibiotik yang tidak perlu pada pasien faringitis (Rahajoe, dkk, 2010).

Dengan penilaian tertentu atas gejala dan tanda, bisa diprediksi penyebab tonsilofaringitis apakah virus atau bakteri. Usaha untuk membedakan tonsilofaringitis bakteri dan virus bertujuan agar pemberian antibiotik sesuai indikasi. Salah satu cara untuk membedakan penyebab tonsilofaringitis akut bakteri atau virus adalah dengan menggunakan kriteria Centor.

Kriteria Centor merupakan kriteria yang telah diterima secara luas sebagai kriteria klinis yang divalidasi dalam mendiagnosis tonsilofaringitis bakteri karena Streptokokus grup A. Kriteria ini dimodifikasi oleh Mclsaac pada 1998, dengan penambahan kriteria umur, yaitu: umur 3–14 tahun memiliki nilai satu, 15–44 tahun memiliki nilai nol, dan lebih atau sama dengan 45 tahun memiliki nilai minus satu (Malino, 2012). Untuk lebih jelasnya kriteria untuk diagnosis faringitis dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kriteria Centor modifikasi Mclsaac

Kriteria		Skor
Temperatur > 38° C		1
Tidak ada batuk		1
Pembengkakan kelenjar servikal		1
Pembengkakan dan eksudat tonsil		1
Umur		
Usia 3-14 tahun		1
Usia 15-44 tahun		0
Usia 45 tahun		-1

Skor	Resiko Infeksi Streptococcus	
≤ 0	1% - 2,5%	Tanpa pengujian lanjut atau pemberian antibiotik
1	5% - 10%	

2	11% -17%	Kultur dan pemberian antibiotik untuk hasil positif
3	28% - 35%	
≥ 4	51% - 53%	Perlu perlakuan empiris dengan pemberian antibiotik atau kultur

(Sumber; McIsaac, *et al*, 2004)

C. Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Pada dekade terakhir ini telah dikembangkan teknik molekuler yang memungkinkan deteksi dan amplifikasi sejumlah kecil sekuen asam nukleat dari jaringan cairan tubuh. Metode amplifikasi tersebut dapat menghasilkan jutaan kopi sekuen target DNA atau RNA dalam waktu yang tidak lama dan hanya dalam hitungan jam (Sulistyaningsih, 2007).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu teknik amplifikasi asam nukleat *in vitro* yang paling banyak dipelajari dan digunakan secara luas (Putra, 1999). Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis, seorang peneliti di perusahaan CETUS Corporation. PCR merupakan suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu secara *in vitro*. Metode ini telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik (Yuwono, 2006).

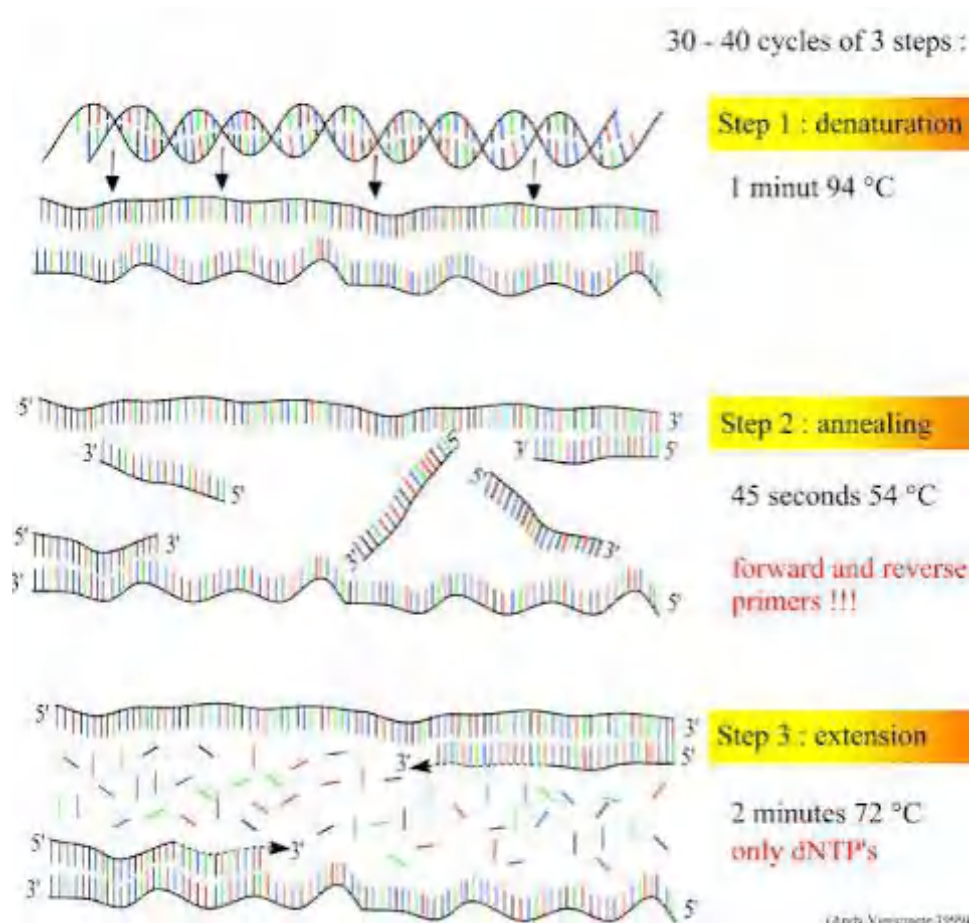
1. Prinsip Umum *Polymerase Chain Reaction*

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

Menurut Yuwono (2006) proses PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan (Gambar 3), yaitu;

a. Denaturasi (*Denaturation*)

Denaturasi DNA untuk siklus pertama dilakukan pada suhu 94-100 °C selama 1-2 menit untuk memisahkan kedua rantai DNA genom secara sempurna melalui pemutusan ikatan hidrogen nukleotida, agar kedua pita DNA terpisah satu dengan yang lain sehingga terbentuk dua pita tunggal DNA sehingga kedua primer menempel setelah penurunan temperatur. Untuk siklus selanjutnya, denaturasi dilakukan pada temperatur 90-95 °C, tetapi optimasi perlu dilakukan untuk reaksi, thermocycler dan tabung reaksi yang berbeda.



Gambar 3. Bagan Proses *Polymerase Chain Reaction*
(Sumber: <http://www.photodekho.com>)

b. Penempelan primer (*Annealing*)

Pada tahap ini temperatur diturunkan sampai 37-65 °C selama 2 menit (tergantung primer yang digunakan) sehingga kedua primer menempel pada rantai DNA target dan tahap ini menentukan spesifitas PCR.

c. Pemanjangan (*Elongation*)

Polimerase DNA mengkatalisis penambahan nukleotida, biasanya dilakukan pada temperatur 70-75 °C selama 3 menit. Enzim taq polimerase (enzim yang berperan dalam pemanjangan DNA) dapat

bekerja secara optimal, guna melengkapi DNA pita tunggal menjadi pita ganda yang merupakan temperatur optimum untuk taq polimerase. Lama tahap pemanjangan tergantung pada panjang DNA yang diamplifikasi. Seringkali tahap pemanjangan terakhir dilakukan lebih lama (sampai 10 menit) untuk menjamin agar semua molekul produk amplifikasi telah dipajangkan secara sempurna (Kornelius, 2012).

2. Komponen Utama *Polymerase Chain Reaction*

Komponen-komponen utama pada proses PCR adalah (1) DNA cetakan (*template*), (2) oligonukleotida primer, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dan (4) enzim polimerase. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer (Yuwono, 2006).

a. DNA cetakan (*template*)

Fungsi DNA templat di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Templat DNA ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA templat tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju. Penyiapan DNA templat untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada. Pemilihan metode yang digunakan di dalam penyiapan DNA templat tergantung dari tujuan eksperimen (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

b. Oligonukleotida primer

Dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database GenBank*. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

c. Deuksiribonukleotida trifosfat (dNTP)

dNTP merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA templat. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

Konsentrasi dNTP yang rendah akan meminimalkan *mispriming* pada daerah non target dan menurunkan kemungkinan perpanjangan nukleotida yang salah, oleh karena itu spesifitas dan ketepatan PCR

meningkat pada konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Sulistyaningsih, 2007).

d. Enzim polimerase

Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim polimerase DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Enzim polimerase DNA diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik sehingga enzim ini bersifat termostabil sampai temperatur 95 °C. Dengan menggunakan teknik PCR, panjang fragmen DNA yang dapat diamplifikasi mencapai 35 kilo basa. Amplifikasi fragmen DNA pendek (kurang dari tiga kilo basa) relatif lebih mudah dilakukan. Untuk mengamplifikasi fragmen DNA panjang (lebih besar dari tiga kilo basa) memerlukan beberapa kondisi khusus, di antaranya adalah diperlukan polimerase DNA dengan aktivitas yang kuat dan juga buffer PCR dengan pH dan kapasitas tinggi (High-salt buffer) (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

e. Buffer

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Fungsi buffer adalah untuk menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion Mg^{2+} , ion tersebut berasal dari $MgCl_2$. $MgCl_2$ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas (senyawa DNA polimerase. Dengan adanya $MgCl_2$ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan templat yang membentuk kompleks larut dengan

dNTP antara). Dalam proses PCR konsentrasi $MgCl_2$ berpengaruh pada spesifisitas dan perolehan proses (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

3. Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul seluler berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Dengan demikian, elektroforesis dapat digunakan untuk pemisahan makromolekul seperti DNA yang bermuatan negatif, jika molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium (gel agarose) kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif. Posisi molekul yang memisah pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, ataupun dilakukan kuantifikasi dengan densitometer (Fatchiya dkk, 2011; Radji, M 2011; Yuwono T 2006; Yuwono T, 2005).

Teknik elektroforesis dapat digunakan untuk analisis DNA, RNA maupun protein. Elektroforesis DNA dilakukan misalnya untuk menganalisis fragmen-fragmen DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi. Fragmen molekul DNA yang telah dipotong-potong dapat ditentukan ukurannya dengan cara membuat gel agarose, yaitu suatu bahan semi padat berupa polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut.

Gel agarosa dibuat dengan melarutkannya dalam suatu buffer yang kemudian dipanaskan. Dalam keadaan panas, gel akan dicetak diatas sebuah lempeng yang terbuat dari Perspex. Sebelum dingin dan memadat, pada ujung gel dibuat lubang menggunakan lembaran perspex tipis yang menyerupai sisir. Sisir tersebut ditancapkan pada salah satu ujung gel yang masih cair. Gel agarose yang sudah terbentuk akan dimasukkan ke dalam suatu tangki yang berisi buffer yang sama dengan yang digunakan untuk membuat gel. Buffer dapat dibuat misalnya dengan *tri-asetat-EDTA* (TAE) atau *tri-borat-EDTA* (TBE) (Yuwono, T, 2005)

Setelah DNA dimasukkan ke dalam lubang sampel, arus listrik dialirkan. Setelah beberapa waktu gel akan direndam dalam larutan yang mengandung ethidium bromida. Etidium bromida akan menyisip kedalam DNA, penggunaan etidium bromida dimaksudkan untuk membantu visualisasi karena etidium bromida dapat memendarkan sinar ultraviolet. Jika gel disinari dengan UV dari bawah maka akan tampak citra berupa pita-pita pada gel. Pita-pita tersebut adalah molekul-molekul DNA yang bergerak sepanjang gel setelah dielektroforesis (Yuwono, T. 2005).

Selain teknik elektroforesis linear sekarang telah dikembangkan teknik elektroforesis yang lain seperti teknik *pulse field gel electrophoresis* (PFGE), *ortogonal field elternation gel electrophoresis* (OFAGE), *transverse alternation field electrophoresis* (TAFE). Di samping itu untuk keperluan tertentu misalnya untuk penentuan urutan basa DNA, maka digunakan gel yang berbeda, yaitu *gel poliakrilamid* (Yuwono, T. 2005).

D. KERANGKA KONSEPTUAL

Beberapa hasil penelitian yang mendukung konsep penelitian seperti yang disajikan di bawah ini.

1. Wessels, M.R. 2011; Bakteri *S. pyogenes* menyebabkan tonsilofaringitis pada anak-anak dengan tingkat kejadian 20% - 30%.
2. Cunningham, M.W. 2000; *S. pyogenes* merupakan bakteri penyebab utama tonsilofaringitis yang pada umumnya menyerang anak-anak usia sekolah, yaitu 5 -15 tahun.
3. Somro, A, *et al*, 2011; Tonsilofaringitis merupakan peradangan pada tenggorok bagian belakang yang disebabkan oleh beberapa virus (rhinovirus, adenivirus, coronavirus) dan beberapa bakteri (*S. pyogenes*, *Corynebacterium*, dan lain-lain).
4. Steer, A. *et al*, 2007; Bakteri Streptokokus grup A lebih banyak menyerang anak-anak dibandingkan orang dewasa dan menyebabkan faringitis dan impetigo.
5. Somro, A, *et al*, 2011; Pemeriksaan yang dapat dilakukan untuk infeksi tonsilofaringitis adalah dengan pemeriksaan fisis, kultur, rapid antigen dan titer antigen-antibodi.
6. Shulman, S.T., *et al*, 2012; Diagnosis yang dianjurkan untuk pemeriksaan faringitis Streptokokus adalah swab tenggorok, RADT dan titer antigen-antibodi.

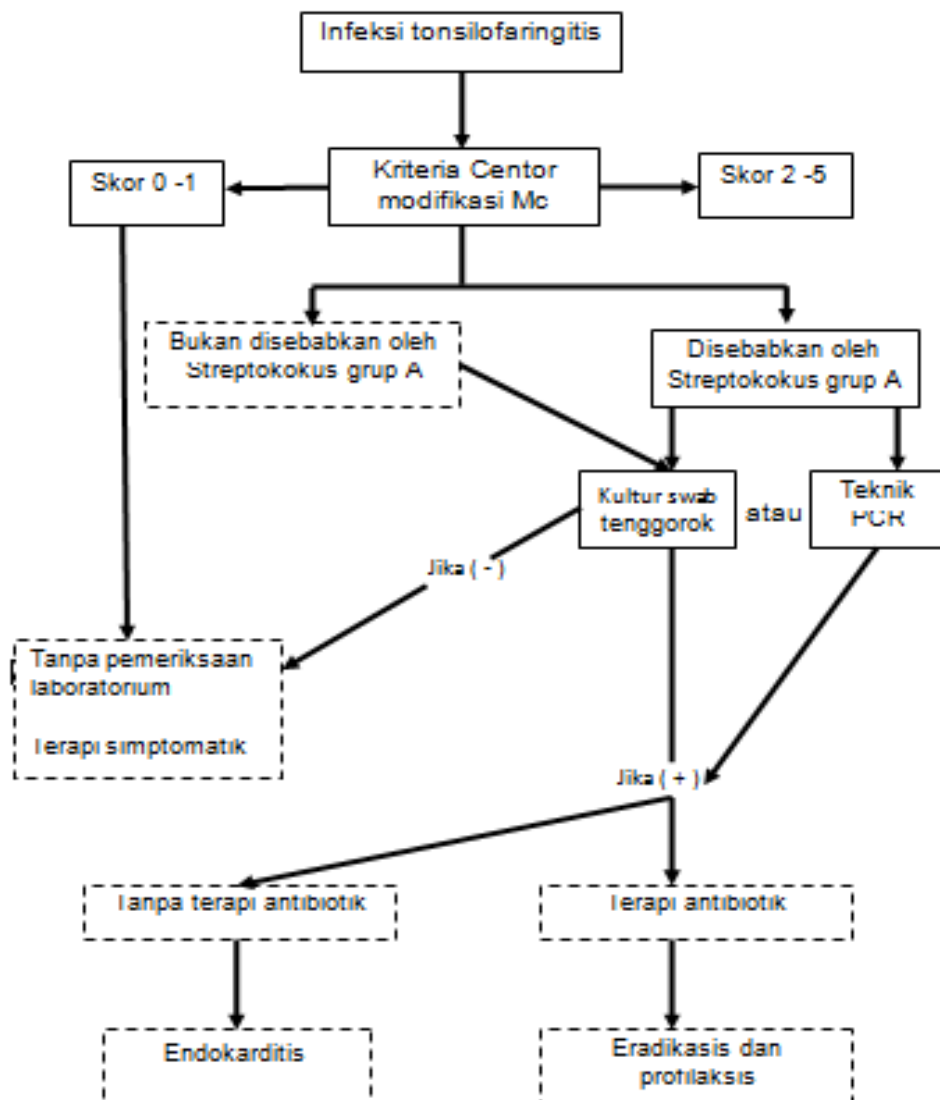
7. Steer, A. *et al*, 2007; Metode kultur masih merupakan standar baku (*Gold Standart*) untuk diagnosis Streptokokus grup A dengan menggunakan media agar darah (*blood agar*) dengan tingkat sensitivitas 90% - 95%.
8. Gerber, M.A dan Shulman, T., 2004; Kit RADTs untuk deteksi *S. pyogenes* memiliki tingkat sensitivitas antara 70% - 90% dibandingkan dengan metode kultur.
9. Gitawati, R dan Isnawati A.,1999; Pemeriksaan bakteri pada tonsilofaringitis diperoleh isolat *Streptococcus viridans* (54,2%), *Branhamella catarrhalis* 22,9%, *Streptococcus β-hemolyticus* 6,11%, *Streptococcus pneumoniae* 3,82% dan *Streptococcus non-hemolyticus* 3,82%.
10. Slinger, R. *et al*, 2011; Pemeriksaan bakteri *S. pyogenes* dengan metode PCR memiliki keunggulan dibandingkan dengan metode kultur karena membutuhkan waktu yang lebih singkat sehingga penanganan terhadap pasien faringitis lebih cepat.
11. Kaltwasser, G, *et al*, 1997; Teknik PCR dapat digunakan untuk pemeriksaan cepat bakteri *S. pyogenes* dengan tingkat sensitivitas 96%.
12. Jing *et al*, 2006; Dari 86 strain streptokokus grup A, menunjukkan bahwa semua sampel yang di uji dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik *slo* pada panjang 439 bp mampu mendeteksi 100% keberaaan bakteri Streptokokus grup A.

13. Thenmozhi, R, *et al*, 2010; Dari 270 sampel swab tenggorok pasien faringitis diperoleh hasil dengan metode kultur teridentifikasi sebanyak 8 sampel positif bakteri *S. pyogenes* sedangkan dengan teknik PCR dengan menggunakan primer spesifik (SCAR) teridentifikasi sebanyak 23 sampel positif bakteri *S. pyogenes*.

Berdasarkan pemaparan berbagai hasil penelitian tersebut, maka dapat dideduksikan untuk menyusun kerangka konseptual sebagai berikut.

Tonsilofaringitis adalah suatu penyakit peradangan yang menyebabkan sakit pada tenggorokan terutama adalah bagian belakang tenggorokan. Infeksi ini dapat disebabkan oleh berbagai macam mikroba diantaranya adalah bakteri *S. pyogenes*. Saat ini diagnosis yang dianjurkan untuk pemeriksaan *S. pyogenes* penyebab faringitis adalah dengan menggunakan metode kultur, RADT dan titer antibodi antigen. Metode kultur masih merupakan standar baku (*Gold Standard*) untuk pemeriksaan bakteri *S. pyogenes*. Namun, metode ini memiliki beberapa kelemahan, sehingga saat ini dikembangkan metode dengan pemeriksaan cepat, yakni menggunakan teknik *Polymerase Chain Reacton* (PCR). Diketahui bahwa teknik *Polymerase Chain Reacton* (PCR) memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi dibandingkan dengan metode kultur.

Agar dapat memudahkan pemahaman terhadap kerangka konseptual tersebut, maka akan ditampilkan dalam bentuk skema (Gambar 4).



Keterangan



Variabel yang diamati



Variabel yang tidak diamati

Gambar 4. Kerangka Konseptual

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Tonsilofaringitis adalah radang atau infeksi akut pada faring dan tonsil yang berlangsung hingga 14 hari.
2. *Streptococcus pyogenes* adalah bakteri Gram positif, nonmotil, tidak berspora, dan membentuk kokus yang berbentuk rantai.
3. Swab tenggorok adalah jenis tes diagnostik dimana kapas diusapkan pada permukaan tenggorok yang meliputi daerah tonsil dan faring.
4. Kriteria Centor adalah kriteria klinis yang divalidasi dalam mendiagnosis tonsilofaringitis bakteri karena *Streptococcus* grup A yang telah dimodifikasi oleh McIsaac.
5. Metode kultur dan metode untuk menumbuhkan bakteri pada media khusus untuk proses pertumbuhannya.
6. Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi fragmen DNA secara *in vitro*.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu penelitian analitik *cross sectional* untuk mengidentifikasi *Streptococcus pyogenes* pada anak penderita tonsilofaringitis.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Puskesmas Kassi-Kassi, Kota Makassar sebagai tempat pengumpulan sampel dan Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Lt.6 sebagai tempat pemeriksaan kultur serta PCR. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2013.

C. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

a. Alat pengambilan sampel

Alat yang digunakan adalah swab kapas steril, medium transpor, termometer dan *ice box*.

b. Alat pengerjaan kultur

Alat yang digunakan adalah cawan petri, ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkubator, kaca objek, mikroskop, *laminary air flow*, sarung tangan, masker, dan bunsen.

c. Alat untuk PCR

Alat yang digunakan adalah sentrifuge, tube 1.5 μ L, mesin PCR, tube PCR, mikropipet 1-1000 μ l, tip aerosol 1000 μ l, 100 μ l, dan 10 μ l, rak tabung, mesin elektroforesis dan gel doc.

2. Bahan Penelitian

a. Bahan untuk kultur, pewarnaan dan uji biokimia

Bahan-bahan yang digunakan adalah swab tonsil dan faring, alkohol 70%, media Blood Agar, BHI Broth, Mueller Hinton Agar, Nutrient Agar, alcohol 96%, kristal violet, lugol, air fuchsin, aquadest, H₂O₂, dan disc bacitracin, Aquades, minyak emersi,

b. PCR

Trizol, glikogen, isopropanol, chloroform, etanol-OH 75%, DEPC-dH₂O, methanol, TBE, marker, loading dye, agarose, ethidium bromide, pure distilled water (baker), primer (lampiran 3).

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah pasien anak-anak yang berumur antara 3 – 14 tahun penderita tonsilofaringitis di Puskesmas Kassi-Kassi, Kota Makassar. Sampel adalah 60 swab tenggorok pada anak. Cara pemilihan

sampel pada penelitian ini adalah *consecutive sampling*, yaitu semua sampel swab tonsil-faring, yang memenuhi kriteria McIsaac.

E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a. Pasien adalah anak-anak umur 3 -14 tahun.
- b. Pasien demam yang bersuhu tubuh $\geq 38^{\circ}\text{C}$ atau ada riwayat demam 12 jam sebelum pemeriksaan disertai pembengkakan tonsil, hiperemis dan memenuhi kriteria Mc Isaac dengan skor > 2 .
- c. Semua pasien yang ikut dalam penelitian ini telah mendapat persetujuan atau izin dari orang tua/ wali dengan menandatangani *informed consent*.

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tidak sedang mengonsumsi antibiotik.
- b. Tidak bersedia untuk ikut dalam penelitian

F. Izin Penelitian dan *Ethical Clearance*

Permintaan persetujuan atau izin dari orang tua/ wali dari pasien yang memenuhi kriteria untuk dijadikan sampel penelitian, serta persetujuan Komisi Etik Penelitian Biomedis pada sampel isolat, Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. *Ethical clearance* tidak memberi kerugian pada subyek penelitian, kerahasiaan data tetap dijaga, dan dilakukan *informed consent* sebelum pengambilan isolat.

G. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan sampel swab tenggorok

Pengambilan swab tenggorok dilakukan dengan menggunakan kapas lidi steril di daerah tonsil, dinding belakang faring dan arkus anterior, kemudian dimasukkan ke dalam medium BHI Broth dan diinkubasi 24 jam pada suhu 37 °C.

2. Isolasi dan identifikasi

- a. Kultur bakteri pada medium *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) setelah 24 jam diinkubasi digoreskan pada medium Nutient Agar selama 24 jam pada suhu 37°C dengan penambahan CO₂ 5%.
- b. Koloni yang tumbuh pada medium Nutient Agar yang diduga sebagai *Streptococcus* diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri pertumbuhan koloninya (kecil, permukaan halus, jernih), kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan Gram.
- c. Koloni yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* yang diduga sebagai *Streptococcus* kemudian ditanam pada Blood Agar dan dinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan penambahan CO₂ 5%.
- d. Koloni yang tumbuh pada agar darah (*Blood agar*) yang diduga sebagai *S. pyogenes* diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri pertumbuhan koloninya dan kemampuannya dalam menghemolisis darah.

3. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram digunakan untuk menentukan jenis bakteri Gram positif atau bakteri Gram negatif serta melihat morfologinya. Cara : kaca objek dibersihkan dengan alkohol sehingga bebas dari lemak, kemudian ditetesi 1-2 tetes NaCl fisiologis. Koloni dari media agar darah diambil dengan jarum ose, diletakkan pada tetesan NaCl fisiologis, campur hingga merata. Biarkan mengering diudara sebentar dan fiksasi di atas api sebanyak 3 kali. Tetesi 2-3 tetes larutan Kristal violet hingga menggenang di atas preparat, biarkan selama 1 menit, bilas dengan air mengalir. Tetesi larutan lugol hingga menggenang dan dibiarkan selama 1 menit, dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan, preparat dibilas dengan alkohol 96% hingga tidak ada zat warna yang keluar dari preparat, cuci dengan air mengalir dan keringkan. Terakhir ditetesi dengan air fuchsin dan dibiarkan selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan lalu diamati di bawah mikroskop. Warna ungu untuk bakteri gram positif dan warna merah untuk bakteri gram negatif. Untuk *S. pyogenes* memiliki bentuk rantai kokus dan bersifat Gram positif.

4. Tes Biokimia

Untuk tes biokimia penentuan spesies bakteri *S. pyogenes* meliputi tes katalase dan tes bacitracin.

a. Tes Katalase

Satu tetes larutan H_2O_2 3% diletakkan di atas kaca objek lalu dengan lidi kayu berujung lancip atau ose, koloni bakteri diambil sedikit dan

langsung dicampur dengan reagen di atas kaca objek, apabila tidak ada gelembung udara berarti tes negatif.

b. Tes Bacitracin

Dengan ose steril koloni bakteri diambil sedikit dan disuspensikan setara dengan 0,5 Mc Farland dan digoreskan secara merata pada permukaan plat agar darah, lalu letakkan 1 buah disk bacitracin pada Mueller Hinton Agar selanjutnya inkubasi pada suhu 35 – 37 °C selama 18 -24 jam, kemudian perhatikan zona hambatan disekeliling disk berarti tes positif.

5. Teknik *Polymerase Chain Reaction*

a. Teknik Ekstraksi DNA dengan Metode Trizol

Disiapkan tabung eppendorf yang bersih (untuk tabung eppendorf seri 1) yang sudah diberi kode sampel lalu dimasukkan ke dalam tabung tersebut 1 µl glikogen dan 200 µl isopropanol kemudian divortex.

Disiapkan tabung eppendorf yang bersih (untuk tabung eppendorf seri 2) yang sudah diberi kode sampel lalu dimasukkan ke dalam tabung tersebut 300 µl trizol dan 100 µl sampel kemudian divortex, kemudian dibiarkan selama 5 menit pada suhu ruang. Setelah dibiarkan 5 menit kemudian di spin down selama 10 detik lalu ditambahkan chloroform 80 µl kemudian divortex selama 1 menit. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C ± 3 menit, kemudian disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm, ± 20 menit pada suhu

4°C. Diambil lapisan yang bening (paling atas) ± 200-210 µl lalu dimasukkan ke dalam seri tabung 1 sesuai kode sampel masing-masing. Lalu di mix sebanyak 30x. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang ± 10 menit, setelah itu dicentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm ± 15 menit, pada suhu 4°C. Setelah dicentrifuge dibuang pelarut, yang tersisa hanya endapan pada permukaan bawah, lalu ditambahkan etanol-OH 75% sebanyak 400 µl. Mix sebanyak 5x. kemudian dicentrifuge lagi dengan kecepatan 12.000 rpm ± 5 menit 4°C. Dibuang pelarut, yang tersisa hanya endapan pada permukaan bawah tabung. Lalu ditambahkan etanol-OH 75% sebanyak 400 µl, mix sebanyak 3-5x. Setelah itu dicentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm ± 2 menit, 4°C. Kemudian dibuang pelarut sampai kering, diperhatikan endapan yang ada di dasar tabung. Sebaiknya pelarut dibuang menggunakan mikropipet untuk menghindari agar endapan yang ada di dasar tabung tidak terbang pada saat pelarut dikeluarkan. Setelah itu dikeringkan selama ± 5 menit. Ditambahkan DEPC-ddH₂O ± 50 µl. Siap untuk di PCR.

b. Amplifikasi DNA dengan PCR

Amplifikasi atau penggandaan fragmen DNA dilakukan dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik yang hanya dapat mengamplifikasi DNA *Streptococcus spp* dan *S. pyogenes* (gen *slo*) pada region yang diinginkan. Proses PCR menggunakan Veriti 96

well PCR (Applied Biosystems, USA) dengan volume reaksi 25 μL yang mengandung 20 μL *mix green*, primer forward dan reverse masing-masing 0,5 μL , dan DNA hasil ekstraksi sebanyak 4 μL . Tahap siklus PCR terdiri dari denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik (30x), annealing 50°C selama 30 detik kemudian dilanjutkan dengan elongasi awal 72 °C selama 1 menit dan elongasi terakhir 72°C selama 7 menit dan diakhiri dengan tahap *cooling* 14 °C selama waktu tidak ditentukan (Jing, *et al*, 2006).

c. Elektroforesis

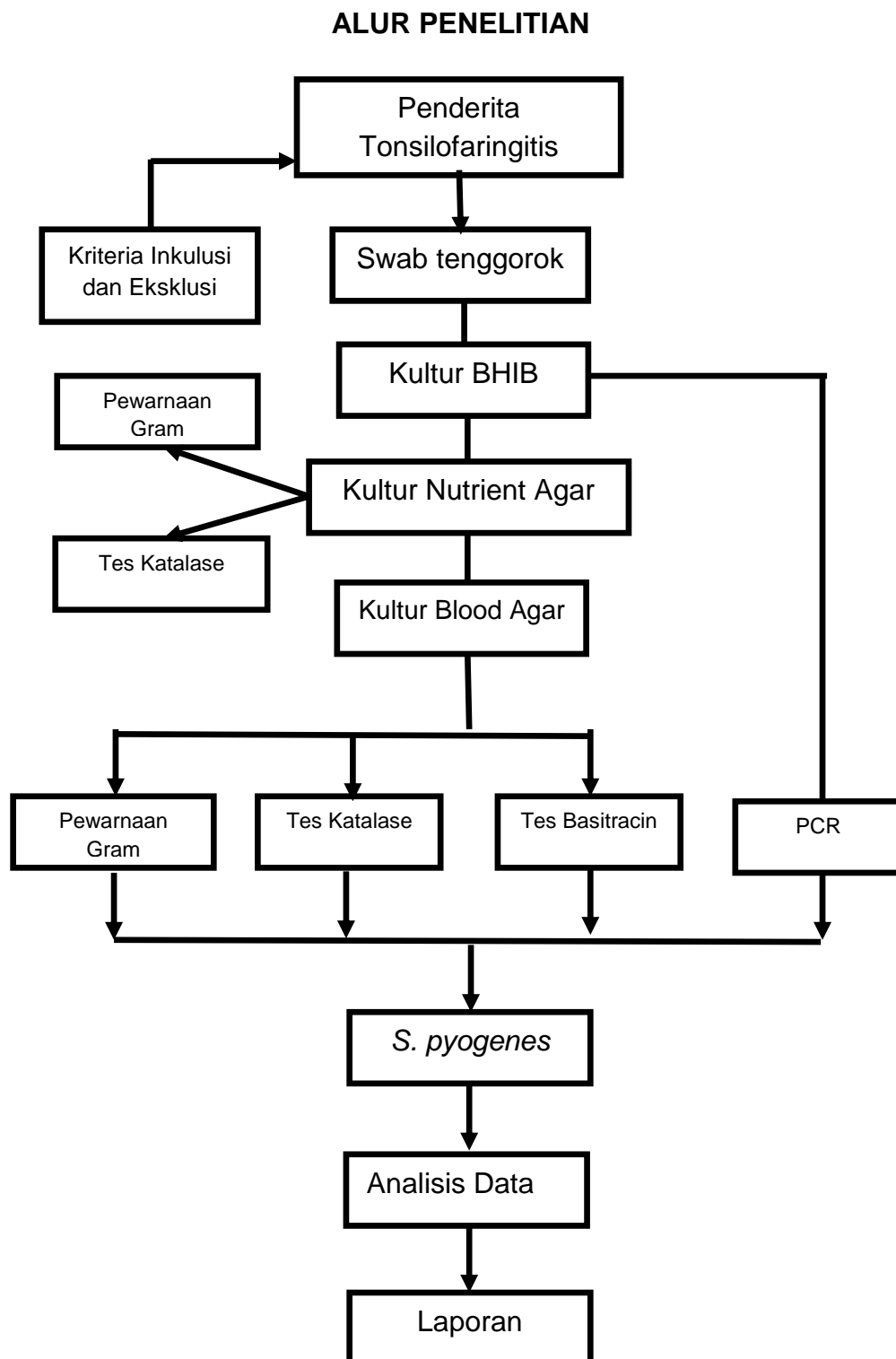
Untuk mengetahui hasil amplifikasi DNA dilakukan proses elektroforesis terhadap produk PCR pada gel agarosa. Sebanyak 2 gram bubuk agarosa dicampur kedalam 100 mL larutan TAE (tiap liter TAE mengandung 4.84 g Tris base, 1,14 mL asam asetat glasial dan 1 mM EDTA) kemudian dimasak menggunakan *microwave* sampai larut dengan sempurna. Sebanyak 3 μL larutan etidium bromida (10 mg/mL) ditambahkan kedalam gel agarosa yang masih cair dan dicampur dengan menggunakan shaker hingga merata, kemudian gel dituangkan ke dalam cetakan gel yang telah disiapkan yang sebelumnya di pasang sisir diukur keseimbangannya. Gel dibiarkan hingga membeku, kemudian sisir diangkat sehingga terbentuklah sumur-sumur gel. Gel agarosa bersama dengan cetakannya diangkat kemudian dipindahkan ke

dalam *container* elektroforesis (BioRad, USA). Larutan TAE kemudian ditambahkan ke dalam *container* elektroforesis hingga menutupi permukaan atas gel. Kemudian kedalam masing-masing sumur, dimasukkan 12 μL produk PCR yang sudah ditambahkan dengan 2 μL *loading dye*. Pada salah satu ujung sumur dimasukkan 5 μL (0.5 μg) *ladder* 100 bp sebagai standar ukur DNA. Perangkat elektroforesis dijalankan dengan mengalirkan aliran listrik bertegangan 100 Volt (V) 400 mA selama 75 menit.

Setelah proses elektroforesis gel agarosa selesai, gel kemudian diangkat dari *container* dan dimasukkan ke dalam perangkat Gel Doc XR (BioRad, USA) dan kemudian disinari dengan sinar ultraviolet (UV). Gambar gel yang terbentuk dibawah sinar UV lalu didokumentasikan. Hasil positif ditunjukkan apabila terbentuk pita DNA (*band*) yang ukurannya sesuai dengan ukuran produk PCR yang diharapkan.

H. Teknik Analisis

Data diperoleh dari hasil pembacaan kedua metode yang digunakan kemudian dibuat perbandingan. Analisis data dengan menggunakan tabulasi silang kemudian dilanjutkan dengan uji *Chi Square* dan hasilnya ditampilkan dalam bentuk tabel dan dinarasikan.



Gambar 5. Alur penelitian

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Karakteristik Demografi Pasien Tonsilofaringitis

Sebagai bahan dari penelitian ini adalah 60 sampel swab tenggorok dari pasien anak-anak yang berumur 3-14 tahun yang berobat di Puskesmas Kassi-Kassi Makassar selama bulan April-Juni 2013 dengan gejala klinis yang didasarkan atas kriteria Mc Isaac.

Selanjutnya berdasarkan rata-rata umur diperoleh anak-anak yang menderita tonsilofaringitis berumur 7,6 tahun dengan umur terendah adalah 3 tahun dan umur tertinggi adalah 13 tahun. Dilihat dari jenis kelamin ternyata laki-laki mempunyai proporsi terbesar, yaitu 32 orang (53,3%) dan perempuan 28 orang (46,7%). Hasil pengamatan distribusi pasien tonsilofaringitis menurut umur dan jenis kelamin ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Distribusi pasien tonsilofaringitis menurut umur dan jenis kelamin

Karakteristik	n = 60
a. Umur (tahun)	
1) Median	7,6
2) Minimum	3
3) Maksimum	13
b. Jenis Kelamin	
1) Laki-laki	32
2) Perempuan	28

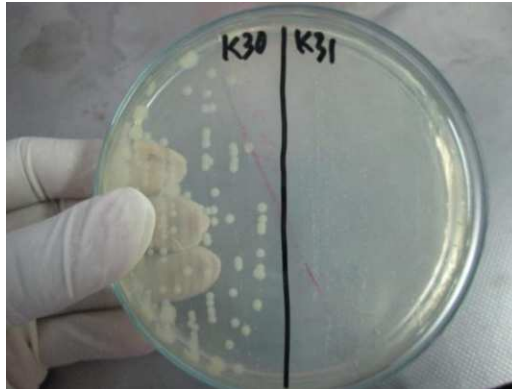
Hasil penilaian berdasarkan skor Centor modifikasi Mc Isaac terhadap 60 sampel pasien dengan diagnosis tonsilofaringitis ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Distribusi gejala klinis penderita tonsilofaringitis berdasarkan skor Centor Modifikasi Mc Isaac

Skor Centor	N (Jumlah pasien)	%
3	7	11,6
4	31	51,7
5	22	36,7
Total	60	100

2. Hasil Kultur Pada Media Nutrient Agar dan Blood Agar

Dari 60 sampel swab di kultur pada media Nutrien agar (NA) selama 1x 24 jam sebagai penyaringan awal *Streptococcus* sp yang membedakan dengan bakteri lainnya dengan ciri koloni kecil, halus dan berwarna putih opak. Hasil pengamatan bentuk koloni tersebut ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Ciri koloni bakteri kecil, halus dan putih opak (K31) dan koloni besar, putih opak dan cembung (K30) pada media nutrisi agar

Koloni yang tumbuh pada media NA yang dicurigai sebagai bakteri *Streptococcus* kemudian dilakukan uji katalase dan pewarnaan Gram dimana hasil uji katalase menunjukkan hasil negatif (-) dan pewarnaan Gram adalah Gram positif (+) (Gambar 7). Selanjutnya dilakukan penanaman pada media Blood Agar.



Gambar 7. Hasil pewarnaan Gram

Hasil pertumbuhan bakteri pada media Nutrient Agar ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil kultur bakteri pada media nutrient agar

Sampel	n	%
Ada pertumbuhan	60	100
Tidak ada pertumbuhan	0	0
Total	60	100

Keenam puluh sampel yang tumbuh pada media nutrient agar dilakukan uji pewarnaan Gram dan uji katalase, didapatkan hasil seperti ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil pewarnaan Gram dan uji katalase

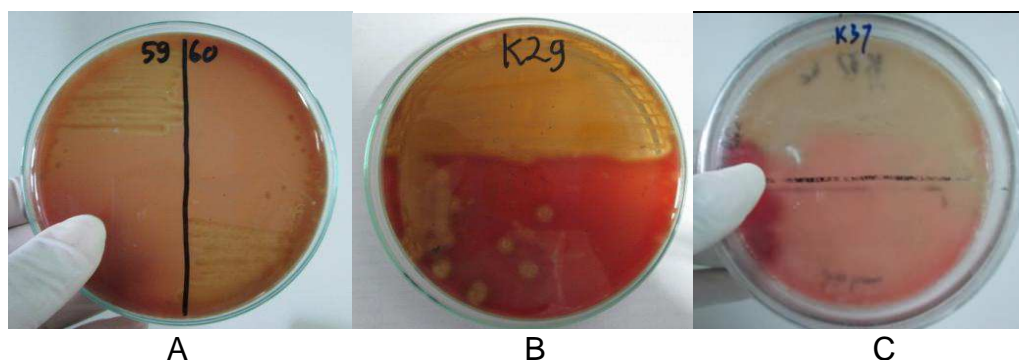
Sampel	Isolat (n)
Gram positif (+) / katalase (-)	37
Gram negatif (-) / katalase (+)	23

Ketiga puluh tujuh sampel dengan hasil Gram positif dan uji katalase negatif, kemudian ditanam pada media Blood Agar, hasilnya ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil kultur bakteri pada media blood agar

Kelompok Streptococcus	N	%
Streptococcus α -hemolitik	28	75,7
Streptococcus β -hemolitik	2	5,4
Streptococcus γ - hemolitik	7	18,9
Total	37	100

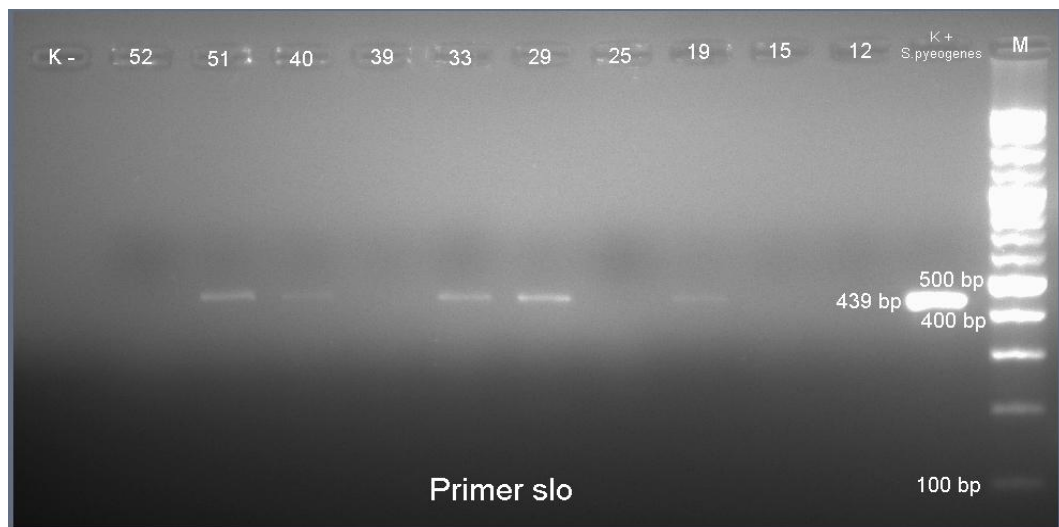
Ciri koloni *Streptococcus* α -hemolitik ditandai oleh hemolisis yang tidak sempurna dan berwarna hijau, *Streptococcus* β -hemolitik ditandai oleh hemolisi darah yang sempurna sedangkan *Streptococcus* γ -hemolitik tidak terjadi hemolisis. Perbedaan ketiga kelompok *Streptococcus* tersebut dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. A= *Streptococcus* α -hemolitik; B = *Streptococcus* β -hemolitik; C= *Streptococcus* γ -hemolitik)

3. Hasil Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction*

Dari hasil pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dari 60 sampel swab tenggorok dari pasien anak-anak yang didiagnosis tonsilofaringitis dengan menggunakan primer gen *slo* dengan panjang 439 bp diperoleh 5 sampel positif *S. pyogenes*, yakni sampel kode 19, 29, 33, 40 dan 51. Hasil PCR dengan menggunakan primer *slo* ditunjukkan pada Gambar 9.



Gambar 9. Hasil positif PCR *S. pyogenes* pada swab tenggorok dengan amplicon 439 bp

Untuk mengetahui lebih lanjut hubungan antara pemeriksaan kultur dengan uji PCR, maka dilakukan perhitungan uji sensitivitas dan spesifisitas. Hasil perhitungan sensitivitas pengujian PCR untuk mendeteksi *S. pyogenes* pada swab tonsilofaringitis dibandingkan dengan teknik kultur dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Sensitivitas dan spesifisitas uji PCR dibandingkan dengan pemeriksaan kultur

		Uji Kultur		
		Positif	Negatif	Jumlah
Uji	Positif	1	4	5
PCR	Negatif	0	55	55
Jumlah		1	59	60

Hasil pengujian sensitivitas dan spesifitas menunjukkan 1 sampel positif pada PCR dan 1 sampel positif pada pemeriksaan kultur, 4 sampel positif PCR dan 4 negatif kultur dan 55 sampel negatif pada pemeriksaan PCR dan pemeriksaan kultur. Sensitivitas pengujian PCR untuk mendeteksi *S. pyogenes* pada swab tonsilofaringitis dibandingkan dengan pemeriksaan kultur bakteri adalah 100% dan spesifisitasnya adalah 93,2% (Lampiran 6).

Setelah dilakukan pemeriksaan kultur dan PCR, maka untuk melihat kesesuaian antara gejala klinik berdasarkan skor Centor modifikasi Mc Isaac dengan pemeriksaan laboratorik maka dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Korelasi antara skor Centor, kultur positif *S. pyogenes* dan PCR positif *S. pyogenes*

Skor Centor	Kultur	PCR
3	0	0
4	0	2
5	1	3

Dari Tabel 9 dapat dilihat bahwa dari hasil pemeriksaan gejala klinik berdasarkan skor Centor modifikasi Mc Isaac dihubungkan dengan hasil kultur dan PCR diperoleh bahwa gejala klinik dengan skor 5 mempunyai korelasi dengan hasil pemeriksaan kultur dan PCR, yaitu hasil kultur 1 positif dan PCR diperoleh 3 positif. Untuk skor 4 tidak diperoleh hasil kultur sedangkan dengan PCR diperoleh 2 positif. Selanjutnya skor 3 tidak diperoleh hasil baik secara kultur maupun PCR.

B. Pembahasan

Penelitian ini menggunakan 60 sampel swab tenggorok yang terdiri dari pasien anak-anak usia antara 3-14 tahun yang berobat di Puskesmas Kassi-Kassi Makassar selama bulan April-Juni 2013 dengan gejala klinis yang didasarkan atas kriteria Mc Issac, yaitu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$, tidak batuk, pembengkakan kelenjar servikal, pembengkakan dan eksudat tonsil. Dari 60 subjek tersebut terdiri dari 32 laki-laki dan 28 perempuan. Hal ini disebabkan karena laki-laki lebih aktif dibandingkan dengan perempuan dimana laki-laki suka bermain dan berinteraksi dengan lingkungan luar sehingga akan lebih rentan terpapar bakteri yang bisa menyebabkan tonsilofaringitis (Rizkianti, A. 2009).

Berdasarkan umur diperoleh rata-rata anak-anak yang menderita tonsilofaringitis berumur 7,6 tahun dengan umur terendah adalah 3 tahun dan umur tertinggi adalah 13 tahun. Menurut Malino (2012) bahwa insidensi tonsilofaringitis meningkat sesuai dengan umur dan mencapai puncaknya pada 4–7 tahun, dan berlanjut hingga dewasa. Secara epidemiologik, penelitian pada penderita dengan infeksi tenggorok menunjukkan bahwa penyebaran melalui udara (droplet nuklei, debu) dan lingkungan yang tercemar serta penyebaran dalam keluarga dan sekolah sering terjadi (Soedarmo, dkk, 2010).

Dari hasil perhitungan berdasarkan skor Centor modifikasi Mc Isaac dari 60 sampel pasien yang didiagnosis tonsilofaringitis adalah skor 3

sebanyak 7 orang (11,6%), skor 4 sebanyak 31 orang (51,7%) dan skor 5 sebanyak 22 orang (36,7%). Dari penelitian yang dilakukan Isnaeni (2012) dari 50 sampel diperoleh hasil 9 pasien dengan 5 gejala, 33 pasien dengan 4 gejala, 7 pasien dengan 3 gejala dan 1 pasien dengan 2 gejala.

Menurut Brodsky, L. dan Poje, C. (2006) bila terdapat > 3 gejala kemungkinan besar adalah infeksi oleh *Streptococcus* β -hemolitik grup A sehingga memerlukan pengobatan antibiotik. Sedangkan skor 2-3 gejala memerlukan pemeriksaan lanjut apakah infeksi oleh *Streptococcus* β -hemolitik grup A, dan jika skor kurang dari 2 gejala, umumnya disebabkan oleh infeksi virus.

Berdasarkan kriteria Centor modifikasi Mc Isaac pada pasien dengan tonsilofaringitis yang positif *Streptococcus* diperoleh data skor rata-rata ≥ 2 yang berarti bahwa infeksi ini disebabkan oleh bakteri khususnya *Streptococcus* dan untuk tindakan lebih lanjut harus segera diberi antibiotik, jika tidak penyakit ini akan kronis dan dapat mengakibatkan komplikasi seperti peritonsilar abses, parafaring abses, demam reumatik dan glomerulonefritis akut dan radang katup jantung (Brodsky, L. dan Poje, C. 2006).

Hasil kultur tonsil-faring diperoleh data bahwa mikroba yang tumbuh pada medium NA sejumlah 60 (100%). Media Nutrien agar (NA) digunakan sebagai penyaringan awal *Streptococcus* sp yang membedakan dengan bakteri lainnya dengan ciri koloni kecil dan halus.

Dari koloni NA yang tumbuh dan dicurigai sebagai *Streptococcus sp* maka dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan uji katalase.

Bakteri Streptokokus termasuk pada kelompok bakteri Gram positif berbentuk kokus (bulat atau oval), berpasangan dan membentuk rantai pendek atau panjang, sedangkan dengan uji katalase termasuk pada katalase negatif (Cunningham, 2000; Jawetz, *et al*, 2007 dan Soemarno, 2000).

Dari hasil pewarnaan Gram dan uji katalase, koloni bakteri yang dicurigai sebagai Streptococcus kemudian ditanam pada media Blood Agar. Dari hasil kultur diperoleh hasil untuk bakteri Streptococcus α -hemolitik sebanyak 28 (75,7%) isolat, Streptococcus β -hemolitik 2 (5,4%) isolat dan Streptococcus γ -hemolitik 7 (18,9%).

Pengelompokkan bakteri Streptococcus ini didasarkan oleh kemampuan dalam menghemolisis darah. Streptococcus golongan α -hemolisis menyebabkan hemolisis tidak sempurna pada eritrosit medium di sekitar koloni sehingga dihasilkan hemoglobin yang menyebabkan daerah sekitar koloni berwarna kehijauan sedangkan Streptococcus β -hemolitik menyebabkan hemolisis sempurna pada eritrosit medium di sekitar koloni sehingga dihasilkan hemoglobin yang menyebabkan daerah sekitar koloni berwarna kuning (Madjid, B. 2001).

Dari isolat Streptococcus β -hemolitik yang dicurigai sebagai bakteri *S. pyogenes* adalah sebanyak 1 isolat, hal ini didasarkan pada uji bacitracin dimana bakteri ini bersifat sensitif terhadap antibiotik bacitracin.

Uji bacitracin dilakukan pada isolat bakteri *Streptococcus* β -hemolitik karena bakteri ini biasanya sensitif terhadap basitrasin (Nandi, S., *et al*, 2001; Soemarno, 2000; Jawetz, *et al*, 2007).

Berdasarkan hasil pengujian PCR dengan menggunakan primer gen *slo* yang memiliki panjang amplicon 439 bp yang merupakan daerah penanda gen pada bakteri *S. pyogenes* diperoleh 5 sampel positif bakteri *Streptococcus pyogenes*. Dari hasil elektroforesis terlihat pita DNA terbentuk pada sumur nomor 19, 29, 33, 40, 51 sedangkan kontrol negatif tidak terbentuk pita DNA. Pita DNA yang terbentuk menunjukkan bahwa dalam sampel swab tonsilofaringitis positif mengandung *S. pyogenes* dengan ketebalan pita yang berbeda-beda. Pita DNA yang terbentuk memperlihatkan ketebalan yang berbeda-beda yang tergantung pada banyaknya DNA yang akan diampifikasi. Semakin banyak DNA yang diampifikasi maka semakin tebal/terang pita DNA yang terbentuk (Hatta, dkk, 2004).

Dari hasil penelitian yang dilakukan Jing *et al* (2006) dari 86 strain streptokokus grup A yang diambil dari sampel darah (n = 10), epifaring (n = 47), nanah (n = 7), luka dan dari sumber lain (n = 15), menunjukkan bahwa semua sampel yang di uji dengan menggunakan primer gen *slo* pada panjang 439 bp mampu mendeteksi 100% keberadaan bakteri. Selanjutnya penelitian yang dilakukan oleh Thenmozhi, R, *et al*, (2010) dari 270 sampel swab tenggorok pasien faringitis diperoleh hasil dengan metode kultur teridentifikasi sebanyak 8 sampel positif bakteri *S.*

pyogenes sedangkan dengan teknik PCR dengan menggunakan primer spesifik (SCAR) teridentifikasi sebanyak 23 sampel positif bakteri *S. pyogenes*

Dari hasil pemeriksaan PCR yang dilakukan terhadap 60 sampel swab tenggorok diperoleh 5 sampel positif *S. pyogenes*, dan 1 diantara hasil yang positif PCR bersesuaian dengan pemeriksaan kultur (beta hemolitik), sedangkan hasil kultur 4 sampel lainnya menunjukkan hasil alfa hemolitik. Perbedaan yang terjadi antara pemeriksaan kultur dan PCR tersebut, disebabkan karena kultur memiliki beberapa kelemahan. Menurut Thenmozhi, *et al* (2010) dalam penelitiannya tentang primer spesifik untuk mendeteksi *S. pyogenes* menyatakan bahwa bahwa terdapat beberapa kelemahan kultur dalam mendeteksi bakteri keberadaan *S. pyogenes*. Metode kultur tidak dapat mendeteksi keberadaan bakteri dalam jumlah yang sedikit, selain itu dapat terjadi pertumbuhan cepat organisme tertentu sehingga organisme yang diharapkan tidak tumbuh karena terjadi persaingan dalam memperoleh nutrisi dan untuk mengidentifikasi bakteri beta hemolitik sulit dilakukan sehingga mungkin diperoleh hasil yang negatif palsu.

PCR telah terbukti memiliki tingkat sensitivitas yang sama atau lebih besar dari pemeriksaan kultur. Dari hasil penelitian ini diperoleh tingkat sensitivitas PCR adalah 100% sedangkan spesifisitasnya adalah 93,2%. Metode PCR dapat digunakan untuk pemeriksaan cepat bakteri *S. pyogenes* dengan tingkat sensitivitas 96% (Kaltwasser, G, *et al*, 1997).

Dari hasil penilaian Centor modifikasi McIsaac yang dihubungkan dengan pemeriksaan laboratorium diperoleh hasil bahwa dengan skor 5 ternyata berkorelasi dengan hasil kultur dan PCR, yaitu ditemukan adanya bakteri *S. pyogenes* pada penderita tonsilofaringitis. Sedangkan dari hasil pemeriksaan gejala klinis dengan skor 4 secara kultur tidak ditemukan bakteri *S. pyogenes* tetapi dari pemeriksaan PCR diperoleh 2 sampel positif bakteri *S. pyogenes* dan skor 3 tidak ditemukan adanya *S. pyogenes* pada pemeriksaan kultur dan PCR.

Berdasarkan pengalaman dilapangan para klinisi menegakkan diagnosis dan pemberian antibiotik pada pasien tonsilofaringitis hanya berdasarkan pada gejala klinis dan pemeriksaan fisik, tanpa disertai dengan pemeriksaan laboratorium seperti pemeriksaan kultur dan pemeriksaan penunjang (PCR), sehingga dikhawatirkan akan berpengaruh terhadap resistensi terhadap suatu antibiotik.

Penegakan diagnosa yang didasarkan pada hasil pemeriksaan laboratorium menjadi masalah penting untuk mencegah pemberian antibiotik terlalu dini, jenis antibiotik yang tidak tepat, dosis, serta jangka waktu pemberian. Penelitian ini menunjukkan 2 (dua) metode pemeriksaan laboratorium yang dapat dijadikan pilihan bagi para klinisi untuk mengetahui jenis bakteri yang menjadi penyebab infeksi tonsilofaringitis, yakni metode kultur dan teknik PCR.

Metode kultur merupakan metode konvensional yang merupakan standar baku (*gold standart*) pemeriksaan diagnostik untuk mendeteksi bakteri *S. pyogenes*. Metode kultur mempunyai kelebihan diantaranya biaya murah, dapat dikerjakan di laboratorium standar (laboratorium puskesmas) dan mampu mengidentifikasi lebih dari satu jenis bakteri. Namun, metode kultur memiliki beberapa kelemahan diantaranya dalam pemeriksaan membutuhkan waktu yang lama, jumlah sampel yang banyak serta membutuhkan keahlian khusus dalam mengidentifikasi bakteri.

Teknik PCR merupakan salah satu metode molekuler yang telah banyak menjadi pilihan klinisi selama beberapa tahun terakhir. Beberapa alasan yang mendasari hal tersebut adalah metode ini mampu mengidentifikasi bakteri dalam waktu yang cepat, membutuhkan jumlah sampel yang sedikit. Namun, metode ini memiliki beberapa kelemahan, yaitu membutuhkan alat yang canggih dan bahan yang lebih mahal dan

Kedua metode diatas, tetap menjadi pilihan bagi para klinisi dengan pertimbangan kelebihan dan kekurangan dari setiap metode. Pentingnya metode identifikasi sebelum penentuan terapi bertujuan untuk mengurangi pemberian antibiotik yang tidak perlu pada pasien tonsilofaringitis.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 60 sampel swab tenggorok pada anak-anak berumur 3 - 14 tahun yang didiagnosis tonsilofaringitis diperoleh 1 sampel (1,7%) positif bakteri *S. pyogenes* dengan metode pemeriksaan kultur dan 5 sampel (8,3%) positif bakteri *S. pyogenes* dengan teknik PCR.
2. Teknik PCR memiliki tingkat sensitivitas 100% dan spesifisitas 93,2% dalam mendeteksi *S. pyogenes* dengan menggunakan primer *s/o* yang memiliki panjang amplikon 439 bp.

B. Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih banyak terutama pada pasien anak-anak.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk teknik PCR dengan menggunakan gen target yang lain untuk penanda keberadaan *S. pyogenes*.

DAFTAR PUSTKA

- Aalbers, J., O'Brien, K.K., Chan, W.S., Falk, G.A., Teljeur, C., Dimitrov, B.D and Fahey, T. 2011. Predicting Streptococcal Pharyngitis In Adults In Primary Care: A Systematic Review of The Diagnostic Accuracy of Symptoms and Signs and Validation of The Centor Score. *J BMC Medicine* 2011, 9:67
- Bisno, A.L., Chairman, Gerber, M.A., Gwaltney, J.M., Jr., Kaplan, E.L., and Schwartz, R.H. 1997. Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis: A Practice Guideline. *J Clinical Infectious Diseases* 1997;25:574–83.
- Bisno, A.L. Brito, M.O., and Collins, C.M. Molecular Basis Of Group A Streptococcal Virulence. *J Clinical Infectious Diseases Vol 3 April* 2003.
- Borek, A.L., Obszańska, K., Hryniewicz, W., and Sitkiewicz, I. 2012. Detection of Streptococcus Pyogenes Virulence Factors by Multiplex PCR. *J Virulence* 3:6, 529–533.
- Brodsky L, and Poje C, 2006. *Tonsillitis, Tonsillectomy, and Adenoidectomy*. In: Bailey JB, Johnson JT editors, Head and Neck Surgery Otolaryngology, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p.1183-98.
- Cole, J.N., Barnett, T.C., Nizet, V., and Walker, M.J. 2011. *Molecular Insight Into Invasive Group A Streptococcal Disease*. USA ; Department of Pediatrics and Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California San Diego, La Jolla.
- Cunningham, M.W. 2000. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *J Clinical Microbiology*, July 2000, p. 470–511, Vol. 13, No. 3
- Darmstadt, G.L., Mentele, L., Podbielski, A., and Rubens, C.E. 2000. Role of Group A Streptococcal Virulence Factors in Adherence to Keratinocytes. *J Infection And Immunity*, Mar. 2000, p. 1215–1221
- Fatchiyah., Arumingtyas, E.L., Widyarti, S., dan Rahayu, S. *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.

- Gerber, M.A. 2005. Diagnosis and Treatment of Pharyngitis in Children. *J Pediatr Clin N Am* 52 (2005) 729– 747.
- Ginawati R, Isnawati A. 1999. *Pola Sensitivitas Kuman Dari Isolat Hasil Usap Tenggorok Penderita Tonsilo-Farigitis Akut di Puskesmas Jakarta Pusat Terhadap Beberapa Antimikroba Betalaktam.* [dikutip tanggal 1 Februari 2013]; diakses dari : http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/cdk_155_THT.pdf.
- Goyal, K., Chitransh, R., Khare, S., Chaudary, R., dan Kumar, A. 2012. Rapid PCR Based Diagnosis of Pharyngitis and Rheumatic Heart Disease Using mga Gene as a Spesific Genetic Marker. *The Journal of Bioscience and Medicine* 2, 1 (2012)
- Halsey, E.S. 2012. *Bacterial Pharyngitis*. Online; <http://emedicine.medscape.com/article/225243-overview#a0199>
- Handoyo, D dan Rudiretna A. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Unitas, Vol. 9, No. 1, September 2000 - Pebruari 2001, 17-29.*
- Hatta, Moch, Eka W, Zaraswati D, Rosana A, M. Sabir, Yadi, Masyhudi. 2004. Pengaruh dekontaminasi dalam identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen dan Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Kedokteran Yarsi* 12(3) : 17-24.
- Isnaeni, D. 2012. *Korelasi Kultur Streptococcus Sp Pada Penderita Dengan Tonsilofaringitis Dengan Tes Anti Streptolisin-O.* (Tesis). Makassar : Universitas Hasanuddin.
- Jawetz, Melnick and Adelberg. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Jing, H., Ning, B., Hao, H., Zheng, Y., Chang, D., Jiang, W., and Jiang, Y. 2006. Epidemiological Analysis of Group A Streptococci Recovered From Patients In China. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1101-1107.
- Juhn, Y.J. Frey, D., Li, X., and Jacobson, R. 2012. Streptococcus Pyogenes Upper Respiratory Infection and Atopic Conditions Other Than Asthma: A Retrospective Cohort Study. *J Prim Care Respir J* 2012; 21(2): 153-158

- Jurianti, A. 2008. *Faringitis Grup A β Hemolitik Streptokokus Pada Anak-Anak: Klinis dan Kultur Tenggorok*. Tesis. Yogyakarta: Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada
- Kaltwesser, G., Diego, J., Wellby-Sellenerieck, P.L, Farret, G., Capparon, M. 1997. Polymerase Chain Reaction For Streptococcus Pyogenes Used To Evaluate An Optical Immunoassay for The Detection of Group A Streptococci In Children With Pharyngitis. *J Clinical Infection Disease of Pediatric Vol 748-53*
- Madjid, B. 2002. *Mikrobiologi*. Makassar; Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNHAS.
- Malino, I.Y. 2012. *Uji Diagnosis Kriteria McIsaac Pada Faringitis Akut Streptokokus β Hemolitikus Grup A*. Tesis. Program Studi Ilmu Kedokteran Klinis Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada
- Mandal, B.K., Wilkins, E.G.L., Dunbar, E.M., and Mayon-White, R.T. *Lecture Notes; Penyakit Infeksi*. Jakarta: Erlangga.
- McIsaac, W.J., Kellner, J.D., Aufricht, P., Vanjaka, A., dan Low, D.E. 2004. Empirical Validation of Guidelines for the Management of Pharyngitis in Children and Adults. *J American Medical Association Vol 291 No. 13*
- Nandi, S., Kumar, R., Ray, P., Vohra, H., dan Ganguly, N.K. 2001. Group A Streptococcal Sore throat In A Periurban Population of Northern India: A One-Year Prospective Study. *Bulletin of the World Health Organization, 2001, 79: 528–533*
- Pardede, S.O. 2009. Struktur Sel Streptokokus dan Patogenitas Glomerulonefritis Akut Pascastreptokokus. *Jurnal Sari Pediatri, Vol. 11 No. 1*.
- Putra, S.T. 1999. *Biologi Molekuler Kedokteran*. Surabaya; Airlangga University Press.
- Radji, M. 2011. *Rekayasa Genetika: Pengantar Untuk Profesi Kesehatan*. Jakarta: Sagung Seto.
- Rahajoe, N., Supriyatno, B., dan Setyanto, D.B. 2010. *Buku Ajar; Respirologi Anak Edisi Pertama*. Ikatan Dokter Anak Indonesia.

- Rizkianti, A. 2009. *Faktor-Faktor yang berhubungan Dengan Kejadian Pneumonia Pada Balita 10-59 Bulan yang Dirawat Inap di RSUP Persahabatan Jakarta 2008*. Skripsi. Jakarta: FKM UI
- Schaad, U.B. 2004. Acute Streptococcal Tonsillopharyngitis; a Review of Clinical Efficacy and Bacteriological Eradication. *The Journal of International Medical Research*, 2004; 32: 1 – 13
- Shulman, S.T., Bisno, A.L., Clegg, H.W., Gerber, M.AKaplan, E.L., Lee, G., Martin, J.M., and Beneden, C.V. 2012. Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis: 2012 Update by the Infectious Diseases Society of America. *J Clinical Infectious Diseases* 2012 DOI: 10.1093/cid/cis629
- Slinger, R., Goldfarb, D., Rajakumar, D., Moldovan, I., Barrowman, N., Tam, R., and Chan, F. 2011. Rapid PCR Detection of Group A Streptococcus From Flocked Throat Swabs; A Retrospective Clinical Study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, Vol. 10:33
- Soedarmo, S.S.P., Garna, H., Hadinegoro, S.R.S dan Satari, H.I. 2010. *Buku Ajar; Infeksi dan Pediatri Tropis Edisi Kedua*. Ikatan Dokter Anak Indonesia.
- Soemarno. 2000. *Isolasi dan Identifikasi Bacteri Klinik*. Yogyakarta; Akademi Analis Kesehatan Yogyakarta, Depkes RI.
- Somro, A., Akram, M., Khan, M.I., Asif, H.M., Sami, A., Ali Shah, S.M., Shahan, G., Ahmed, K. and Rehman, R.U. 2011. Pharyngitis and Sore Throat: A Review. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(33), pp. 6190-6197, 6 July, 2011.
- Steer, A.C., Danchin, M.H and Carapetis, J.R. 2007. Group A Streptococcal Infections In Children. *Journal of Paediatrics and Child Health* 43 (2007) 203–213.
- Sulistyaningsih, E. 2007. *Polymerase Chain Reaction (PCR); Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi*. *Jurnal Biomedis* Vol 1 No. 1 Juni 2007.

- Thenmozhi, R., Balaji, K., Kanagavel, M. And Pandian, S.K. 2010. Development of Species-Specific Primers for Detection of *Streptococcus pyogenes* from Throat Swabs. *Federation of European Microbiological Societies*.
- Wessels, M.R. 2011. Streptococcal Pharyngitis. *The New England Journal of Medicine*, 364;7.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi; Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta; Andi.

Lampiran 1. Riwayat Gejala Klinik Pasien Tonsilofaringitis

No	Kode Sampel	Umur	JK	Gejala Pemeriksaan Fisis								Skor
				Bengkak Tonsil	Hiperemis	Sakit Menelan	Demam	Batuk	Sakit Perut	Pusing	Bengkak Kelenjar Servikal	
1	K1	6	P	(+)	(+)	(-)	(+) 43	(-)	(+)	(-)	(+)	5
2	K2	4	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38,2	(+)	(-)	(-)	(+)	3
3	K3	4,7	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38,3	(+)	(-)	(-)	(+)	4
4	K4	7	L	(+)	(+)	(+)	(+) 37,7	(-)	(+)	(-)	(+)	4
5	K5	6,5	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38	(-)	(-)	(-)	(+)	5
6	K6	13	L	(+)	(+)	(-)	(+) 37,5	(-)	(-)	(-)	(+)	4
7	K7	10	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,3	(-)	(-)	(-)	(+)	5
8	K8	9	P	(+)	(+)	(+)	37,8	(+)	(+)	(-)	(+)	3
9	K9	13	P	(+)	(+)	(+)	(+) 37,3	(+)	(+)	(-)	(+)	3
10	K10	12	L	(+)	(+)	(-)	(+) 36,7	(-)	(-)	(-)	(+)	4
11	K11	4,5	L	(+)	(+)	(-)	(+) 37,2	(-)	(-)	(-)	(+)	4
12	K12	4,8	L	(+)	(+)	(-)	(+) 36,4	(-)	(-)	(-)	(+)	4
13	K13	12	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,3	(-)	(+)	(+)	(+)	5
14	K14	6	P	(+)	(+)	(+)	(+) 37,8	(-)	(-)	(-)	(+)	4
15	K15	13	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38	(+)	(-)	(-)	(+)	4
16	K16	10	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38,4	(-)	(-)	(-)	(+)	5
17	K17	9	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,1	(-)	(-)	(-)	(+)	5
18	K18	10	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38	(+)	(-)	(-)	(+)	4
19	K19	9	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,8	(+)	(-)	(-)	(+)	4
20	K20	5	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38,6	(+)	(-)	(-)	(+)	4
21	K21	11	L	(+)	(+)	(-)	(+) 37,9	(+)	(-)	(-)	(+)	3
22	K22	12	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38,3	(-)	(-)	(+)	(+)	5
23	K23	7	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38	(-)	(-)	(-)	(+)	5

24	K24	5	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38,2	(+)	(-)	(-)	(+)	4
25	K25	8	P	(+)	(+)	(+)	(+) 37,5	(-)	(-)	(-)	(+)	4
26	K26	5	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,2	(-)	(-)	(-)	(+)	5
27	K27	8	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38	(-)	(-)	(-)	(+)	5
28	K28	11	L	(+)	(+)	(-)	(+) 37,6	(-)	(-)	(-)	(+)	4
29	K29	8	L	(+)	(+)	(+)	(+) 38	(-)	(-)	(-)	(+)	5
30	K30	3	L	(+)	(+)	(+)	(+) 38,2	(-)	(-)	(-)	(+)	5
31	K31	7	P	(+)	(+)	(+)	(+) 38,4	(-)	(-)	(-)	(+)	5
32	K32	6	P	(+)	(+)	(+)	(+) 38,9	(-)	(-)	(-)	(+)	5
33	K33	13	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,1	(-)	(-)	(-)	(+)	5
34	K34	10	L	(+)	(+)	(-)	(+) 37,4	(-)	(-)	(-)	(+)	4
35	K35	5	L	(+)	(+)	(+)	(+) 37,5	(-)	(-)	(-)	(+)	4
36	K36	8	P	(+)	(+)	(-)	(+) 37,5	(-)	(-)	(-)	(+)	4
37	K37	7	L	(+)	(+)	(+)	(+) 38,9	(-)	(-)	(-)	(+)	5
38	K38	6	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,8	(-)	(-)	(-)	(+)	5
39	K39	10	L	(+)	(+)	(-)	(+) 36,7	(-)	(-)	(-)	(+)	4
40	K40	9	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,5	(-)	(+)	(-)	(+)	5
41	K41	7	L	(+)	(+)	(-)	(+) 37,9	(-)	(-)	(-)	(+)	4
42	K42	4	L	(+)	(+)	(+)	(+) 36,8	(+)	(-)	(-)	(+)	3
43	K43	7	P	(+)	(+)	(+)	(+) 37	(-)	(-)	(-)	(+)	4
44	K44	3	P	(+)	(+)	(+)	(+) 37,1	(-)	(-)	(-)	(+)	4
45	K45	4	P	(+)	(+)	(-)	(+) 37,5	(-)	(-)	(-)	(+)	4
46	K46	4	L	(+)	(+)	(+)	(+) 36,5	(-)	(-)	(-)	(+)	4
47	K47	9	P	(+)	(+)	(-)	(+) 37,8	(-)	(+)	(-)	(+)	4
48	K48	5	P	(+)	(+)	(-)	(+) 37,4	(-)	(+)	(-)	(+)	4
49	K49	8	L	(+)	(+)	(-)	(+) 36,7	(-)	(-)	(-)	(+)	4
50	K50	7	P	(+)	(+)	(+)	(+) 38,4	(-)	(+)	(-)	(+)	5
51	K51	9	L	(+)	(+)	(+)	(+) 36,5	(-)	(+)	(-)	(+)	4

52	K52	6	P	(+)	(+)	(-)	(+) 36,7	(-)	(-)	(-)	(+)	4
53	K53	8	P	(+)	(+)	(-)	(+) 44	(+)	(+)	(-)	(+)	4
54	K54	10	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,3	(-)	(+)	(-)	(+)	5
55	K55	3,5	L	(+)	(+)	(+)	(+) 36,9	(-)	(+)	(-)	(+)	4
56	K56	7	L	(+)	(+)	(-)	(+) 38,4	(-)	(-)	(-)	(+)	5
57	K57	6	L	(+)	(+)	(+)	(+) 37,5	(-)	(-)	(-)	(+)	4
58	K58	4	P	(+)	(+)	(-)	(+) 38,2	(-)	(-)	(-)	(+)	5
59	K59	12	P	(+)	(+)	(-)	(+) 37	(+)	(-)	(-)	(+)	3
60	K60	8	L	(+)	(+)	(-)	(+) 37	(+)	(-)	(-)	(+)	3

Lampiran 2. Hasil Pengamatan Koloni, Pewarnaan Gram, Uji Katalase dan Uji Bacitracin

No	Kode	Media	Ciri Koloni	Gram/Bentuk	Katalase	Uji Obat		Keterangan
						Bacitracin	SXT	
1	K1	NA	Putih, halus, kecil	(+)	(-)			
		BA	Kehijaun			34	12	Beta
		MC						
		MSA	Kuning					St. Aureus
2		NA	Putih, besar	(-) Basil	(+)			
		BA						
		MC	Merah, berlendir					
		MSA						
3		NA	Kecil, halus	(+) coccus	(+)			
		BA						
		MC						
		MSA						
4		NA	Kecil, halus	(+) coccus	(-)			
		BA	Kecil, putih, halus					Alfa
		MC						
		MSA						
5		NA	Kecil, halus	(+) coccus	(-)			
		BA	Kehijaun					Alfa
		MC						
		MSA						
6		NA	Kecil, halus	(+) coccus	(-)			

		BA	Kehijaun					Alfa
		MC						
		MSA						
7		NA	Kecil, halus	(-) coccus	(-)			
		BA	Kehijaun					Alfa
		MC						
		MSA						
8		NA	Besar, putih	(-) Cocobasil	(+)			
		BA						
		MC						
		MSA						
9		NA	Besar, putih	(-) Cocobasil	(+)			
		BA						
		MC						
		MSA						
10		NA	Kecil, putih, halus	(+)	(-)			
		BA	Kehijaun					Alfa
		MC						
		MSA						
11		NA	Kecil, putih, halus	(+)	(-)			
		BA	Kehijaun					Alfa
		MC						
		MSA						
12		NA	Kecil, putih, halus	(+)	(-)			
		BA	Kehijaun					Alfa

		MC					
		MSA					
13		NA	Kecil, putih, halus	(+)	(-)		
		BA	Kehijaun				Alfa
		MC					
		MSA					
14		NA	Putih, besar	(-)	(+)		
		BA					
		MC					
		MSA					
15		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)		
		BA	Kehijauan				Alfa
		MC	Merah, berlendir				
		MSA					
16		NA	Putih, besar	(-)	(+)		
		BA					
		MC					
		MSA					
17		NA	Besar, putih	(-)	(+)		
		BA					
		MC					
		MSA					
18		NA	Putih, besar	(-)	(+)		
		BA					
		MC	Merah, berlendir				

		MSA					
19		NA	Putih, kecil	(+)	(-)		
		BA					Alfa
		MC	Merah, berlendir				
		MSA					
20		NA	Putih, besar	(-)	(+)		
		BA					
		MC					
		MSA					
21		NA	Putih, halus, kecil	(+)	(-)		
		BA	Kehijauan				Alfa
		MC					
		MSA					
22		NA	Putih, kecil	(+)	(-)		
		BA	Kehijauan				Alfa
		MC	Merah, berlendir				
		MSA					
23		NA	Putih, besar	(+) basil berspora	(+)		
		BA					
		MC					
		MSA					
24		NA	Putih, besar	(+) basil berspora	(+)		
		BA					
		MC					
		MSA					

25	NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)			
	BA	Kehijauan					Alfa
	MC	Kering					
	MSA	Kuning, bulat kecil					St. Aureus
26	NA	Putih, besar	(-) Kokobasil	(+)			
	BA						
	MC	Merah, berlendir					
	MSA						
27	NA	Putih, besar	(-) Kokobasil	(+)			
	BA						
	MC	Merah, berlendir					
	MSA	Kuning, bulat kecil					St. Aureus
28	NA	Putih, besar	(-) Kokobasil	(+)			
	BA						
	MC						
	MSA						
29	NA	Putih, kecil, halus	(+) coccus	(-)			
	BA	Hemolisis			21	8	Beta
	MC						
	MSA						
30	NA	Putih, kecil	(+)	(-)			
	BA	Kehijauan					Alfa
	MC	Bulat, kering					
	MSA						
31	NA	Putih. Kecil	(+)	(-)			

		BA	Putih					Gamma
		MC						
		MSA						
32		NA	Putih, kecil	(+)	(-)			
		BA	Putih					Gamma
		MC						
		MSA						
33		NA	Putih, kecil	(+)	(-)			
		BA	Kehijauan					Alfa
		MC						
		MSA	Kuning, bulat kecil					St. Aureus
34		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)			
		BA	Putih, kecil					Gamma
		MC						
		MSA	Merah muda					St. Epidermidis
35		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)			
		BA	Putih, kecil					Gamma
		MC						
		MSA						
36		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)			
		BA	Putih, kecil					Gamma
		MC						
		MSA						
37		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)			
		BA	Putih, kecil					Gamma

		MC					
		MSA					
38		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)		
		BA	Kehijauan				Alfa
		MC					
		MSA					
39		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)		
		BA	Kehijauan				Alfa
		MC					
		MSA					
40		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)		
		BA	Kehijauan				Alfa
		MC					
		MSA					
41		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)		
		BA	Putih				Gamma
		MC	Bulat, kering, bintik hitam				
		MSA					
42		NA	Putih, bulat, besar	(-) basil	(+)		
		BA					
		MC	Bulat, kering, bintik hitam				
		MSA					
43		NA	Putih, bulat, besar	(-) basil	(+)		
		BA					
		MC	Bulat, kering, bintik hitam				

		MSA					
44		NA	Putih, bulat, kecil	(+) coccus	(-)		
		BA	Kehijauan				Alfa
		MC					
		MSA					
45		NA	Putih, besar	(-)	(+)		
		BA					
		MC	Bulat, kering				
		MSA					
46		NA	Putih, bulat, besar	(-)	(+)		
		BA					
		MC	Bulat, kering				
		MSA					
47		NA	Putih, bulat, besar	(-)	(+)		
		BA					
		MC	Bulat, kering				
		MSA					
48		NA	Putih, bulat, besar	(-)	(+)		
		BA					
		MC	Bulat, kering				
		MSA					
49		NA	Putih, bulat, besar	(-)	(+)		
		BA					
		MC	Bulat, kering				
		MSA					

50	NA	Putih, bulat, kecil, halus	(+)	(-)			
	BA	Kehijauan					Alfa
	MC						
	MSA						
51	NA	Putih, bulat, kecil, halus	(+)	(-)			
	BA	Kehijauan					Alfa
	MC						
	MSA						
52	NA	Putih, bulat, kecil, halus	(+)	(-)			
	BA	Kehijauan					Alfa
	MC						
	MSA						
53	NA	Putih, bulat, kecil, halus	(+)	(-)			
	BA	Kehijauan					Alfa
	MC						
	MSA						
54	NA	Putih, besar	(-)	(+)			
	BA						
	MC	Bulat, kering, mengkilap					
	MSA						
55	NA	Putih, halus, kecil	(+)	(-)			
	BA	Kehijauan					Alfa
	MC						
	MSA						
56	NA	Putih, besar	(-) Cocobasil	(+)			

		BA					
		MC	Bulat, kecil, halus, licin				
		MSA					
57		NA	Putih, kecil, halus	(+)	(-)		
		BA	Kehijauan				Alfa
		MC	Putih, licin				
		MSA	Kuning				St. aureus
58		NA	Putih, halus, kecil	(+)	(-)		
		BA	Kehijaun				Alfa
		MC					
		MSA					
59		NA	Putih, halus, kecil	(+)	(-)		
		BA	Kehijaun				Alfa
		MC	Putih, licin				
		MSA					
60		NA	Putih, halus, kecil	(+)	(-)		
		BA	Kehijaun				Alfa
		MC					
		MSA					

Lampiran 3. Sekuens primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA
Streptococcus pyogenes

Primer	Sekuens nukleotida (5' – 3')	Tm (°C)	Posisi
<i>S.pyogenes gen Slo F</i> <i>S.pyogenes gen Slo R</i>	GCCAATGTTTCAACAGCTATTG CGGAGCTGCACTAAAGGCCGC	50	439

Lampiran 4. Data GeneBank (*Streptococcus pyogenes* NADase-streptolysin O operon (nga, orf1, slo), complete cds)

LOCUS AB128036 4356 bp DNA linear BCT 17-JAN-2012

DEFINITION *Streptococcus pyogenes* NADase-streptolysin O operon (nga, orf1, slo), complete cds.

ACCESSION AB128036

VERSION AB128036.1 GI:56403937

KEYWORDS .

SOURCE *Streptococcus pyogenes*
ORGANISM [Streptococcus pyogenes](#)
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus.

REFERENCE 1
AUTHORS Kimoto,H., Fujii,Y., Yokota,Y. and Taketo,A.
TITLE Molecular characterization of NADase-streptolysin O operon of hemolytic streptococci
JOURNAL Biochim. Biophys. Acta 1681 (2-3), 134-149 (2005)
PUBMED [15627505](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 4356)
AUTHORS Kimoto,H.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-DEC-2003) Contact:Hisashi Kimoto Fukui Prefectural University; 4-1-1 Matsuokakenjojima, Eihei-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1195, Japan

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..4356
/organism="Streptococcus pyogenes"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Sa"
/db_xref="taxon:[1314](#)"
[operon](#) 1..4356
/operon="NADase-streptolysin O operon"
[gene](#) 363..1706
/gene="nga"
/operon="NADase-streptolysin O operon"
[CDS](#) 363..1706
/gene="nga"
/operon="NADase-streptolysin O operon"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="NADase"
/protein_id="[BAD77792.1](#)"
/db_xref="GI:56403938"

/translation="MRNKKVTLAHIVAKTSVAIALAGAMGSSLLANSTTYAVSGKENK
KSDVKYETTKVMEANATSSKEDNHVMHTLDGSMSTVWEENSPGGGVGEVLSYKFASPM
HIGRILIVNGDTSSKENYYKKNRIAKADV KYNGNQLVLFHKIELGDTYTKKPHHIEI
DKKLDVDRIDIEVTEVHQGNKDILALSEVTFGNIERDIFEKKFKEIKDKWVTDKQAD
EFIETADKYADKAIQMSAVASRAEYYRMYVSRKYHYKKEFVEKLGKQVYKESGASHVTS
KKDVMLAFDDAKRKSTIGRQENGLFVTSFAEDMALLFTDQGKLSADQIENIKGVDSG

KYSDGVYQYEYDSELTKNIDKLGYIRTASGDTPGANS LNIPGCQ TWSGKHIENSESEL

IFP SISVKDLKSKAVLAEIDA KGYFEI IDPTII APNGDHKKVTGRFKIKKMQRK"

[gene](#) 1711..2196
 /gene="orf1"
 /operon="NADase-streptolysin O operon"
[CDS](#) 1711..2196
 /gene="orf1"
 /operon="NADase-streptolysin O operon"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="hypothetical protein"
 /protein_id="[BAD77793.1](#)"
 /db_xref="GI:56403939"

/translation="MYKVPKGLEHYQKMFQKEVTVNDLKKYLIGSDKEYRITRRDSYM

GDISDPEVILEYGVYPAFIKGYTQLKANIEEALLEMSNSGQALDIYQAVQTLNAENML

LNYYESLPFYLNRSIVANMTKALKDAHIREAMAHYKLGFEFAHYQDTMLDMVERTIET
 F"

[gene](#) 2220..3935
 /gene="slo"
 /operon="NADase-streptolysin O operon"
[CDS](#) 2220..3935
 /gene="slo"
 /operon="NADase-streptolysin O operon"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="streptolysin O"
 /protein_id="[BAD77794.2](#)"
 /db_xref="GI:71061062"

/translation="MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALIIGNLVTANAESNKQNTASTETT

TTSEQPKPESEL TIEKAGQKMDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKKSE

EDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFIVIERKKKNINTTP

VDISIIDSVTDRTPAALQLANKGF TENKPD AVVTKRNPQKIHI DLPGMGDKATVEVN

DPTYANVST AIDNLVNQWHDNYSGGNTLPARTQYTESMVYSKSQIEAALNVNSKILDG

TLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQIF YTVSANLPNNPADVFDKSVTFKDLQRKGSNEA

PPLFVSNVAYGR TVFVKLETSSKSN DVEAAFS AALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAV

VLGGDAAEHNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT

EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEIN YDDKGKEVITKRRWDNNWYSKTS

PFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAW EWRKVIDERDVKLSKEINVNISGSTLSPYG
 SITYK"

ORIGIN

```

1 aggtctgatg gtctcagtct taccatcaga ccttttttag ttggaagtga agcgtgtgtc
61 caaacaaagg tatgactatc gttaacatca ttgtaatcag agataattaa cagatctatt
121 actgataacg gtgctactat caaatattta actagtactt ttaatctggt ttaaatagaa
181 cagatgtgaa ggttctgtga taataagatg gaaatatccc cttgaaactt gtaacagttg
241 gctacttggt tttttgtggt catttatctg atagaaaagt ctaaaacgat gttaataaat
301 cgcattgaca aaaactatct gctaattgat agtttactta aaaataatat aaggtggttt

```

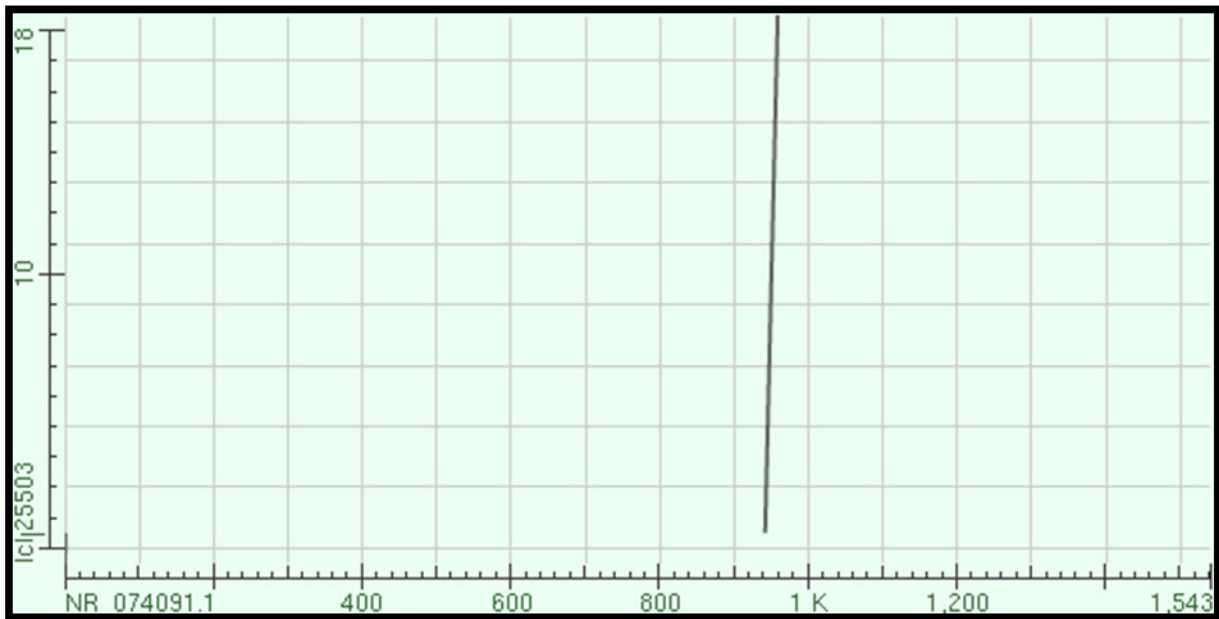
361 acatgagaaa caaaaaagta acattagctc atattgtcgc aaagacaagt gttgctattg
 421 ctttggctgg agcaatgggt agcagtttat tagctaatag cacaacgtac gctgttagtg
 481 gcaaagaaaa taaaaaagc gatgtcaa atgaaacgac caaagttatg gaagctaacg
 541 caacttctc taaagaagac aatcatgtca tgcacacatt agacggctca atgagtactg
 601 tctgggagga aaattcacct ggtgggtggtg ttgggtgaagt actttcctac aagtttgctg
 661 ccccgatgca tattgggaga attttaattg ttaatggaga tacatctagc aaggagaatt
 721 actacaagaa aatagaatt gcaaaggctg atgttaaata ctataacggg aatcaattgg
 781 tcctctttca caaaattgaa ttaggcgaca cctacactaa aaaaccgcat cacattgaga
 841 ttgataaaaa attagatggt gatcgtattg atattgaggt aacagaggtc catcagggac
 901 aaaacaagga tatttttagcc ttgtcagagg tcacttttgg caatatagaa cgcgatattt
 961 ttgaaaaaaa gtttaaagaa attaaagata aatgggtaac agataaaca gcatagatgt
 1021 ttattgaaac tgccgacaag tatgctgata aagctattca gatgtctgct gttgcgtcac
 1081 gtgctgagta ttaccggatg tatgttagcc gcaaatacca ctacaaaaaa gagtttgctg
 1141 aaaaactaaa acaagtctac aaagaaagcg gagcttcca cgttacaagc aaaaaagatg
 1201 tgatgttagc ttttgacgat gctaaaagaa agtcaacgat tggctgacaa gaaaacggtc
 1261 tttttgtgac aagttttgct gaagatatgg cattgctctt tactgatcaa ggtaagttaa
 1321 aatcagctga ccaattgaa aatataaaaag gtgtcgatag cggaaaaat agtgatgggg
 1381 tttatcaata tgagtacgat tctgaactaa caaaaaacat tgataagcta ggctatatcc
 1441 gaacagctag cggagatact cctggagcaa attcgtcaa cattcctggt tgccaaacgt
 1501 ggtcaggaaa acacattgaa aattcagaaa gtgaattaat tttcccatcg attagtgtta
 1561 aagatctaaa atctaaagct gtcttagcag agattgatgc caaaggctat tttgaaatta
 1621 ttgatcctac catcattgct ccaaatggtg accataaaaa agtaactggt cgcttcaaaa
 1681 ttaagaaaat gcaagatagg aagtaacaat atgtataagg tgccaaaggg tttagaacat
 1741 taccaaaaaa tgtttcaaaa agaagtaact gttaatgatt taaaaaata cttgataggt
 1801 agtgacaaa agtatcgtat cactaggaga gactcttata tgggagatat ttctgatcca
 1861 gaagttatth tagagtatgg ggtttaccct gctttcataa aaggctatac ccaattgaaa
 1921 gctaacatcg aagaagcatt attagaaatg tcaaatagcg gtcaagcatt agacatttac
 1981 caagcggttc aaaccctaaa cgctgaaaa acatagatg aatagacca aagcgttaa agatgcgat
 2041 ttttatttaa accgtcaaag ctatggcaca ttacaaatta ggagaatttg ctactatca agatactatg
 2101 attagatagg tcgaaagaac aatagaaaca ttttagaatg ataaaaaggt atgaaggaca
 2161 cttgatatgg tcgaaagaac aatagaaaca ttttagaatg ataaaaaggt atgaaggaca
 2221 tgtctaataa aaaaacattt aaaaaataca gtcgctcgc tgggctacta acggcagctc
 2281 ttatcattgg taatcttggt actgctaata ctgaaatcga caaacaacac actgctagta
 2341 cagaaaccac aacgacaagt gagcaaccaa aaccagaaag tagtgagcta actatcgaaa
 2401 aagcaggtca gaaaatggat gatatgctta actctaacga tatgattaag cttgctcca
 2461 aagaaatgcc actagaatct gcagaaaaag aagaaaaaaa gtcagaagac aaaaaaaga
 2521 gcgaagaaga tcacactgaa gaaatcaatg acaagattta ttcactaaat tataatgagc
 2581 ttgaagtact tgctaaaaat ggtgaaacca ttgaaaattt tgttcctaaa gaaggcgta
 2641 agaaagctga taaatttatt gtcattgaaa gaaagaaaaa aaatatcaac actacaccag
 2701 tcgatatttc cattat **Primer gen slo Forward** gaccta tccagcagcc cttcagctgg
 2761 ctaataaagg ttttac **Primer gen slo Forward** ggtagt caccaagcga aaccacaaa
 2821 aatccatat tgattt **Primer gen slo Forward** ggtatgggag acaaaagcaac ggttgaggtc aatgacccta
 2881 cctat **gcaa** **tgtttcaaca** **gctattg** ata atcttgttaa ccaatggcat gataattatt
 2941 ctggtggtaa tacgcttctt gccagaacac aatatactga atcaatggta tattctaagt
 3001 cacagattga agcagctcta aatgttaata gcaaaatctt agatggtact ttaggcattg
 3061 atttcaagtc gattt **Primer gen slo reverse** gtgatgat tgagcctac aagcaaattt
 3121 tttacaccgt atcag **Primer gen slo reverse** ctgctgga tgtgtttgat aaatcagtga
 3181 cctttaaaga tttgcaacga aaaggtgtca gcaatgaagc tccgccactc tttgtgagta
 3241 acgtagccta tggtcgaact gttttgtgca aactagaaac aagttctaaa agtaatgatg
 3301 ttgaa **gcggc** **ctttagtga** **gctc** taaaag gaacagatgt taaaacgaat ggaaataact
 3361 ctgatatctt agaaaaatagc tcatttacag ctgtcgtttt aggaggagat gctgcagagc
 3421 acaataaggt ggtcacaaaa gactttgatg ttattagaaa cgttatcaaa gacaatgcta
 3481 ccttcagtag aaaaaaccca gcttatccta tttcatacac cagtgttttc cttaaaaaata
 3541 ataaaattgc ggggtgcaat aacagaactg aatacgttga aacaacatct accgagtaca
 3601 ctagtggaaa aattaacctg tctcatcaag gcgcgtatgt tgctcaatat gaaatccttt
 3661 gggatgaaat caattatgat gacaaaggaa aagaagtgat taaaaacga cgttgggaca
 3721 acaactggta tagtaagaca tcaccattta gcacagttat cccactagga gctaattcac
 3781 gaaatatccg tatcatggct agagagtgca ccggcttagc ttgggaatgg tggcgaagag
 3841 tgatcgacga aagagatgtg aaactatcta aagaaatcaa tgtcaacatc tcaggatcaa
 3901 ccttgagccc atatggttcg attacttata agtaggactg gttcaagagg ttcgtcaagc
 3961 accttgatgc tgcttatctc ttgaggcttt gtgcctactc ctctcaciaa tacagaaaaa

```

4021 agcttgtcta tgagatacct tcatagacaa gcttttttat aactggtgtc tcactatfff
4081 gtgactatat ccgtagtagg ctgatctccc atcaacaagt gttttgtcctt atagaataac
4141 cagctgatag gtctgcaata tccatagaaa ttgtaactac agcaatttgt tccatctgca
4201 catgcttgag tagctactgc ctcatctgcc gaaacagttt ggttttttgg tgttgcaagg
4261 ctaaggccta caacagcagc agttgcgatc tttgccgaaa cagtttggtt ttttggtgtt
4321 gcaaggctaa ggcctacaac agcagcagtt gcgatc

```

Hasil BLAST Primer Spesifik *S. pyogenes* (Gen slo)



Download ▾ GenBank Graphics Sort by: E value ▾

Streptococcus pyogenes NADase-streptolysin O operon (nga, orf1, slo), complete cds
Sequence ID: [dbj|AB128036.1](#) Length: 4356 Number of Matches: 2

Range 1: 2886 to 2907 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
44.1 bits(22)	0.058	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

```

Query 1      GCCAATGTTTCAACAGCTATTG 22
             |||
Sbjct 2886   GCCAATGTTTCAACAGCTATTG 2907

```

Range 2: 3306 to 3324 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
38.2 bits(19)	3.6	19/19(100%)	0/19(0%)	Plus/Minus

```

Query 25     GAGCTGCACTAAAGGCCGC 43
             |||
Sbjct 3324   GAGCTGCACTAAAGGCCGC 3306

```

Lampiran 5. Data uji statistik sensitivitas dan spesifisitas PCR terhadap pemeriksaan kultur

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
pcr * kultur	60	100.0%	0	.0%	60	100.0%

pcr * kultur Crosstabulation

			kultur		Total
			positif	negatif	positif
pcr	Positif	Count	1	4	5
		% within pcr	20.0%	80.0%	100.0%
		% within kultur	100.0%	6.8%	8.3%
	Negativ e	Count	0	55	55
		% within pcr	.0%	100.0%	100.0%
		% within kultur	.0%	93.2%	91.7%
Total	Count	1	59	60	
	% within pcr	1.7%	98.3%	100.0%	
	% within kultur	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	11.186(b)	1	.001		
Continuity Correction(a)	2.311	1	.128		
Likelihood Ratio	5.168	1	.023		
Fisher's Exact Test				.083	.083
Linear-by-Linear Association	11.000	1	.001		
N of Valid Cases	60				

a Computed only for a 2x2 table

b 3 cells (75.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .08.



KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Sekretariat : Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu
JL.PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10, Makassar. Telp. (0411)5780103, Fax (0411) 581431.
Contact person dr. Agussalim Bukhari,PhD,SpGK (HP. 081241850858), email: agussalimbukhari@yahoo.com

REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK
Nomor : 607 /H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2013

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, setelah melalui pembahasan dan penilaian, pada rapat tertanggal 20 Maret 2013, telah memutuskan, protokol penelitian berjudul:

Studi Mikrobiologis Penyebab Tonsilofaringitis pad Pasien yang Berobat di Puskesmas di Kota Makassar

dengan Peneliti Utama: dr. Rizalinda Sjahril.,PhD

No. Register

U	H	1	3	0	3	0	1	0	8
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

yang diterima pada tanggal: 8 Maret 2013

Perbaikan diterima tanggal: 4 April 2013

dapat disetujui untuk dilaksanakan di Unit Penelitian FKUH, Puskesmas Kassi-Kassi, Jum Pandang Baru, Cenderawasih dan Puskesmas Tamalanrea Makassar. Persetujuan Etik ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK Fakultas Kedokteran Unhas. Jika ada perubahan protokol dan /atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Makassar, 17 April 2013

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fak. Kedokteran Unhas



Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, Sp.GK

NIP 19600504 1986 01 2 002



KEMENTERIAN PENDIDIKAN & KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
UNIT PENELITIAN FAKULTAS KEDOKTERAN
RUMAH SAKIT UNIVERSITAS HASANUDDIN

Gedung A, Lantai 6 Rumah Sakit Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Tamalanrea, Makassar 90245, Telp 0411580687
Email: unitpenelitian@ymail.com

No : 009/UP/RS-UH/VIII/2013
Tanggal : 26 Agustus 2013
Hal : **Keterangan melaksanakan penelitian**

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : dr. Sitti Wahyuni, Ph.D
Jabatan : Kepala Pusat Penelitian Kedokteran

Dengan ini menerangkan bahwa mahasiswa yang beridentitas :

Nama : Syam S. Kumaji
NIM : P 1506211401
Institusi : Biomedik Pascasarjana Unhas

Telah melakukan penelitian:

Laboratorium : Mikrobiologi Unit Penelitian
Terhitung : mulai 1 Maret 2013 sampai dengan 20 Juli 2013
Sampel : Swab tenggorok sebanyak 60

untuk memperoleh data dalam rangka penyusunan skripsi/tesis/disertasi yang berjudul:

Identifikasi Bakteri Streptococcus pyogenes Pada Anak Penderita Tonsilofaringitis dengan Metode Kultur dan Teknik Polymerase Chain Reaction

Demikian surat keterangan ini dibuat dan diberikan kepada yang bersangkutan untuk dipergunakan seperlunya.

dr. Sitti Wahyuni, Ph.D
NIP: 19661219 199603 01 002