

**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

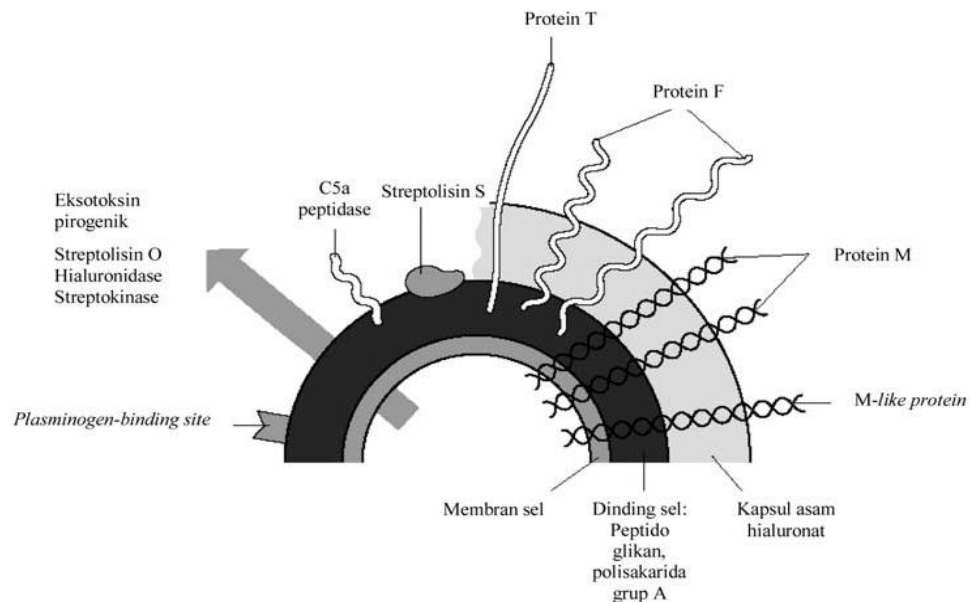
A. Bakteri *Streptococcus pyogenes*

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/tonsilofarongitis 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 empiris pemberian antibiotik atau kultur perlakuan dengan antibiotik

(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).

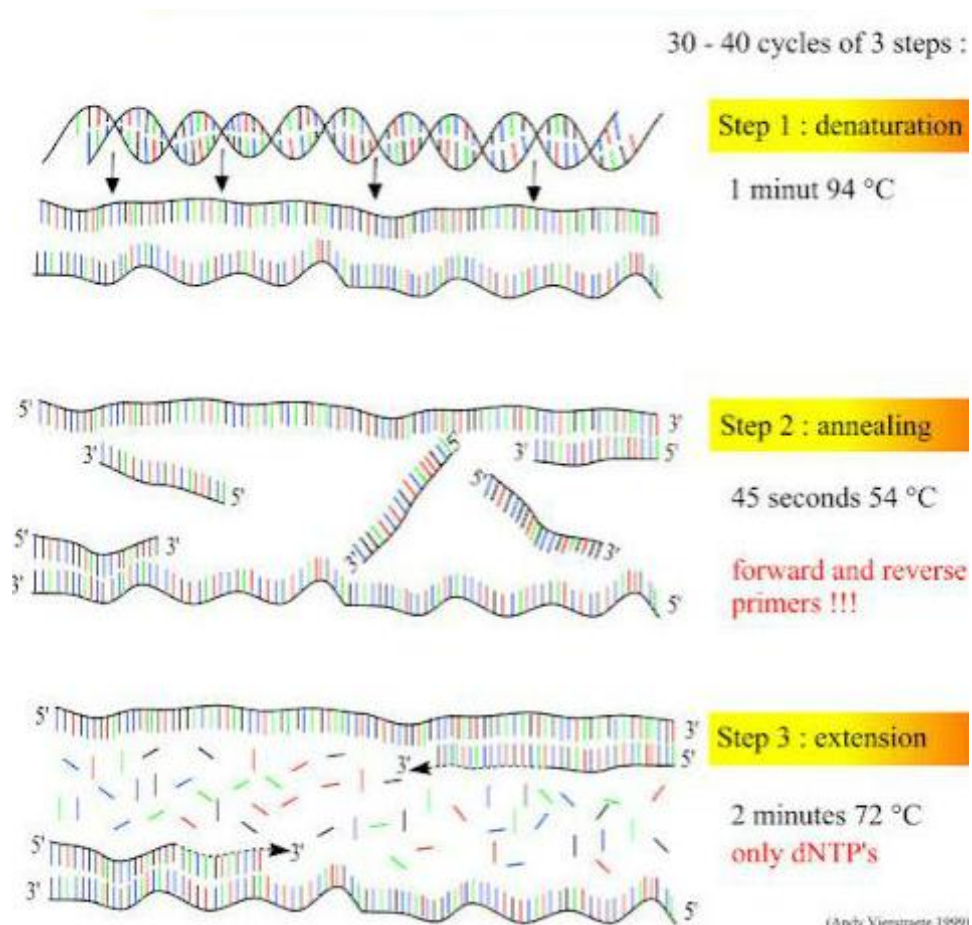
1. Prinsip Umum *Polymerase Chain Reaction*

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) deuksiribonukleotida 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. Deoksiribonukleotida 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.

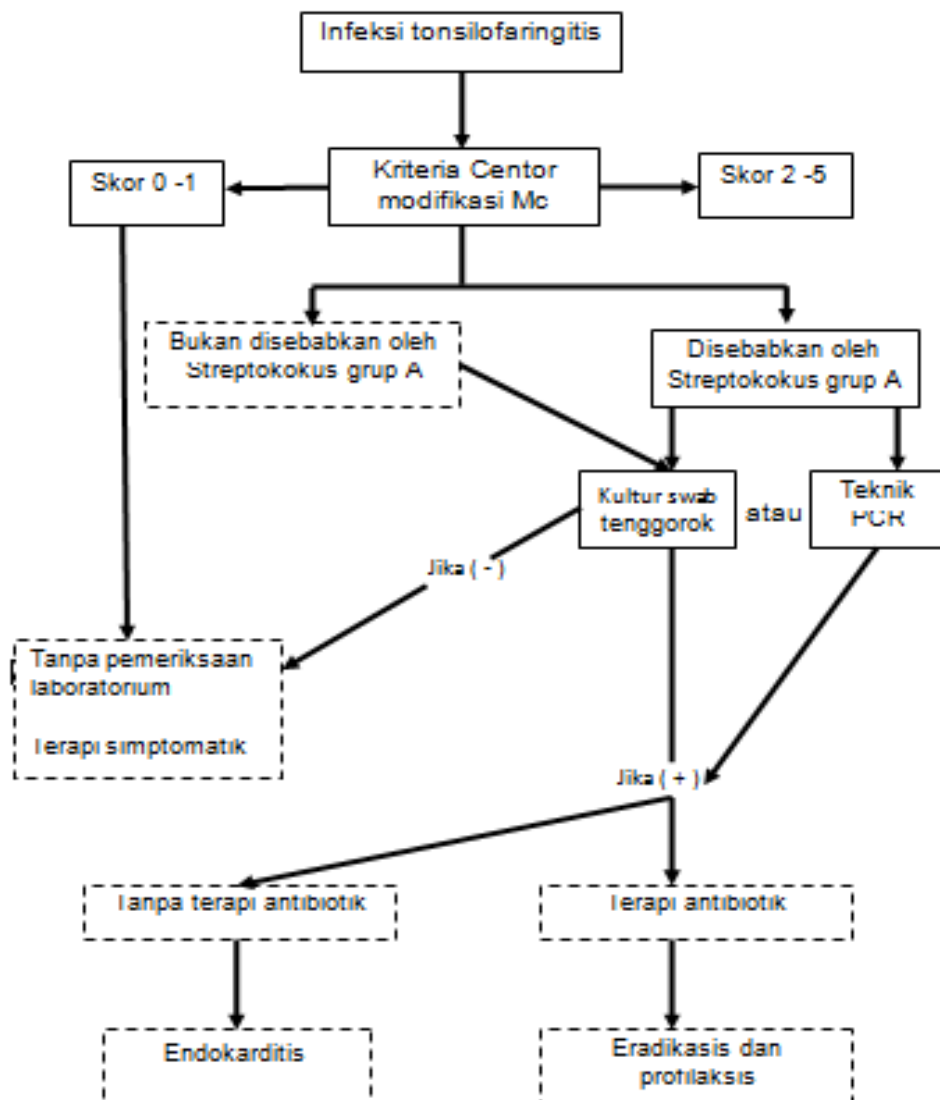
7. Steer, A. *et al*, 2007; Metode kultur masih merupakan standar baku (*Gold Standart*) untuk diagnosis Streptokokus grup A dengan menggunakan media agar darah (*blood agar*) dengan tingkat sensitivitas 90% - 95%.
8. Gerber, M.A dan Shulman, T., 2004; Kit RADTs untuk deteksi *S. pyogenes* memiliki tingkat 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*.