

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

2.1.1 Bakteriologi

Streptococcus pneumoniae atau pneumokokus adalah bakteri kokus gram positif yang sering ditemukan berpasangan, namun dapat juga ditemukan dalam keadaan satuan atau rantai pendek. Bakteri ini merupakan bakteri non motil dan tidak berspora dengan kapsul polisakarida. *S. pneumoniae* memiliki beberapa persamaan dengan spesies *Streptococcus* lainnya yaitu tidak memiliki enzim katalase dan dapat memfermentasi glukosa menjadi asam laktat. Namun, *S. pneumoniae* tidak memiliki protein M, menghidrolisis inulin, dan dinding selnya terdiri atas peptidoglikan dan asam teichoic.^{17,18}

S. pneumoniae diselubungi oleh kapsul polisakarida yang menghasilkan beberapa serotipe antigen.¹⁸ Strain *S. pneumoniae* yang berkapsul dapat bersifat patogen pada manusia dan hewan coba, sedangkan strain *S. pneumoniae* yang tidak berkapsul bersifat *avirulent*.¹⁹ Kapsul ini merupakan faktor virulensi yang berperan penting dalam invasi bakteri. Dalam proses fagositosis bakteri, kapsul dapat menghambat terjadinya opsonisasi bakteri oleh komplemen C3b. Hingga saat ini, telah ditemukan 90 jenis kapsul *S. pneumoniae*.^{17,18}

Beberapa strain *S. pneumoniae* digambarkan memiliki struktur menyerupai rambut atau pili yang merupakan ekstensi dari permukaan bakteri. Pili berkontribusi dalam terjadinya kolonisasi pneumokokus pada saluran napas atas dan

menyebabkan bertambahnya jumlah *tumor necrosis factor* (TNF) yang dihasilkan oleh sistem imun pada saat infeksi. Diperkirakan terdapat 500 protein permukaan pada *S. pneumoniae*. Beberapa adalah lipoprotein yang berasosiasi pada membran dan beberapa lainnya berasosiasi pada dinding sel. Protein permukaan yang unik pada pneumokokus adalah kelompok *choline-binding proteins* (CBPs). Di dalam kelompok CBP terdapat beberapa faktor virulensi penting seperti PspA (*protective antigen*), LytA, B, dan C (*autolysin*), dan CbpA (adhesin).¹⁷

2.1.2 Kultur

Streptococcus pneumoniae bersifat *fastidious* hanya dapat tumbuh pada media yang diperkaya dengan suplementasi darah.¹⁹ Bakteri dengan enzim katalase negatif akan tumbuh lebih baik dengan adanya sumber katalase seperti sel darah merah untuk menetralkan H_2O_2 yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. *S. pneumoniae* diklasifikasikan kembali sebagai bakteri anaerob yang *aerotolerant*. Penambahan 5-10% CO_2 akan meningkatkan pertumbuhan bakteri ini.^{17,18}

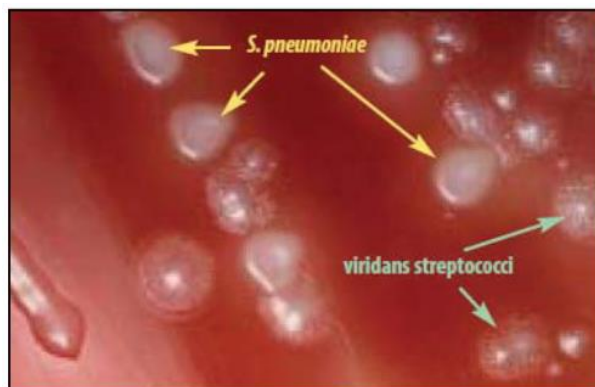
S. pneumoniae membutuhkan kolin untuk pertumbuhannya. Sebagian besar strain *S. pneumoniae* memerlukan vitamin B kompleks (biotin, nicotinamide, pantothenate, pyridoxal, riboflavin dan thiamine), adenine, guanine, uracil, dan 7–10 asam amino. Metabolisme energinya bersifat fermentatif, menghasilkan asam laktat yang dapat menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae*, penambahan zat yang bersifat alkali pada kultur dengan interval tertentu diketahui dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri. pH optimum untuk pertumbuhan *S. pneumoniae* adalah 7.8 dengan rentang 6.5–8.3.^{17,18,20}

Koloni bakteri bersifat hemolisis- α pada agar darah bila diinkubasi secara aerob, hal ini disebabkan adanya *pneumolysin* yang merupakan enzim yang dapat mendegradasi hemoglobin, menghasilkan warna kehijauan.¹⁹ Namun bila diinkubasi secara anaerob, *S. pneumoniae* mungkin dapat memberikan gambaran hemolisis- β karena terdapat *oxygen-labile hemolysin*.^{17,19}



Gambar 1. Koloni *S. pneumoniae* dengan alfa hemolisis pada agar darah²¹

Streptococcus pneumoniae mempunyai enzim autolisin yang menyebabkan bakteri tersebut bersifat rapuh. Enzim autolisin dapat melisiskan pneumokokus jika tumbuh hingga mencapai fase stasioner. Proses autolisis akan menyebabkan perubahan pada morfologi koloni *S. pneumoniae* setelah 18-24 jam diinkubasi pada kondisi optimum. Pada awalnya koloni yang muncul akan berbentuk seperti kubah, namun dengan terjadinya autolisis koloni akan membentuk cekungan di tengah koloni. Proses autolisis tidak terjadi pada *Streptococcus* grup *viridans*, sehingga dapat dibedakan.^{17,18}



Gambar 2. Koloni *S. pneumoniae* dan *Streptococcus* grup *viridans*²²

Pada umumnya, pneumokokus membentuk zona inhibisi sebesar 16 mm disekeliling 5 mg cakram optochin, dan mengalami lisis oleh garam empedu. Selain mengidentifikasi *S. pneumoniae* dari karakteristik koloni dan pengecatan gram, pemeriksaan tambahan yang perlu dilakukan seperti pemeriksaan fermentasi inulin, *bile-solubility*, dan tes quellung.¹⁷

2.2 Agar Darah Domba

Media agar darah terdiri dari dua komponen utama, yaitu *agar base* dan darah.¹⁹ Agar yang disuplementasi dengan 5% darah hewan adalah media pertumbuhan yang umum digunakan untuk mengidentifikasi bakteri patogen. Media ini dapat menumbuhkan banyak bakteri patogen namun juga dapat mengidentifikasi bakteri berdasarkan karakteristik pertumbuhan, morfologi koloni, dan kemampuan hemolisis.²³ Media agar dengan darah domba menjadi media yang direkomendasikan untuk melakukan kultur *S. pneumoniae*.^{9,23,24}

Darah domba diambil melalui pungsi vena jugularis sebanyak 350ml per hewan.²³ Darah yang digunakan tidak boleh mengalami penggumpalan sehingga harus dilakukan defibrinasi pada saat pengambilan darah atau ditampung pada

kantong dengan antikoagulan sitrat.²⁴ Darah domba yang didefibrinasi maupun diberi antikoagulan memberikan hasil yang sama baik apabila digunakan sebagai suplemen media agar untuk menumbuhkan dan tes kepekaan antibiotik *S. pneumoniae*.²³

Morfologi dan struktur membran sel darah merah domba memengaruhi kemampuan hemolisis oleh bakteri. Eritrosit domba berukuran lebih kecil dibandingkan dengan eritrosit manusia, sehingga lebih mudah terjadi hemolisis.²³

2.3 Trypticase Soy Agar

Trypticase Soy Agar adalah agar non selektif yang dapat digunakan secara luas untuk menumbuhkan dan mengisolasi bakteri *fastidious* dan *non-fastidious*, namun tanpa suplementasi darah tidak dapat menumbuhkan bakteri yang sangat *fastidious*. TSA dapat digunakan untuk melakukan kultur secara aerob maupun anaerob.^{19,25} TSA adalah *agar base* yang direkomendasikan WHO untuk melakukan kultur *S. pneumoniae*.⁹

Komposisi TSA per liter adalah 15 gram *pancreatic digest of casein*, 5 gram *papaic digest of soybean meal*, 15 gram agar, dan 5 gram NaCl. Agar ini memiliki pH 7.3 ± 0.2 pada suhu 25°C. *Pancreatic digest of casein* adalah kasein yang telah dihidrolisis secara parsial oleh enzim yang berasal dari pankreas menghasilkan pepton yang dikenal sebagai *tryptone*. *Tryptone* memiliki kadar nitrogen yang tinggi dan karbohidrat yang rendah, menjadi sumber utama nitrogen pada TSA dan mengandung asam amino triptofan. *Papaic digest of soybean meal* atau *soytone* merupakan hidrolisat *soybean flour* dengan enzim pepaya yang memiliki kadar karbohidrat tinggi.^{11,25}

TSA tidak dapat digunakan sebagai media isolasi spesimen klinis yang mengandung berbagai jenis patogen, kecuali disuplementasi dengan 5% darah.¹¹ Tidak terdapat karbohidrat tambahan pada TSA, sehingga dapat digunakan untuk menentukan hemolisis bakteri. Karbohidrat tambahan pada media pertumbuhan *S. pneumoniae* dapat menyebabkan pH lebih cepat menjadi asam yang merupakan hasil metabolisme energi oleh bakteri.^{11,20}

2.4 *Columbia Agar*

Columbia agar merupakan media bernutrisi tinggi yang dapat menumbuhkan dan mengisolasi berbagai macam bakteri, termasuk bakteri yang sangat *fastidious* seperti *Streptococcus* dan *Pneumococcus*. *Columbia agar* dapat menumbuhkan koloni bakteri lebih lebat, dengan darah domba zona hemolisis terlihat lebih jelas dan karakteristik koloni yang khas.²⁶

Columbia blood agar base per liter terdiri dari 23 gram *special peptone*, 10 gram agar, 5 gram NaCl, dan 1 gram *starch*. Agar ini memiliki pH 7.3 ± 0.2 pada suhu 25°C.¹⁴ *Special peptone* adalah pepton yang terdiri dari berbagai macam campuran pepton termasuk daging, tanaman, dan *yeast*. Pepton yang terdapat pada *Columbia agar* adalah komposisi utama untuk menumbuhkan koloni pada agar, pepton ini mengandung spektrum luas berbagai ukuran peptida bersama dengan vitamin, mineral, nukleotida, dan karbon.¹³ Pati berperan menjadi sumber energi dan NaCl dalam media berfungsi sebagai penyeimbang osmotik.²⁶

Pertumbuhan *S. pneumoniae* membutuhkan vitamin B kompleks yang bisa didapatkan dari *yeast* dalam *special peptone*. Penelitian yang dilakukan oleh

Restrepo *et al.* menunjukkan peningkatan *S. pneumoniae* yang tumbuh pada optimalisasi media kultur dengan suplementasi *yeast*.²⁰

Kandungan karbohidrat yang tinggi pada *Columbia agar* dapat menyebabkan hemolisis- β memberikan warna kehijauan yang sering salah teridentifikasi sebagai hemolisis- α .²⁷ Pertumbuhan bakteri dapat tersupresi oleh tingginya kadar karbohidrat dalam media yang diakibatkan oleh terbentuknya asam laktat sebagai hasil metabolisme energi *S. pneumoniae* yang fermentatif.¹⁸⁻²⁰

2.5 Penambahan Gentamisin pada Agar Darah

Pada penelitian yang dilakukan oleh Dilworth *et al.* dan Sondag *et al.* penambahan gentamisin sebanyak 5 $\mu\text{g/ml}$ dapat meningkatkan kemampuan agar darah untuk mengisolasi *S. pneumoniae* dengan mensupresi pertumbuhan mikroorganisme lain yang dapat tumbuh pada media agar darah domba tanpa gentamisin.²⁸⁻³⁰ Penggunaan agar darah dengan gentamisin dapat digunakan sebagai metode sederhana dan tidak membutuhkan banyak biaya untuk mengisolasi *S. pneumoniae* pada sputum atau eksudat telinga yang kemungkinan terdapat bakteri *fastidious* lainnya.³¹

Media kultur yang ditambah gentamisin direkomendasikan untuk meningkatkan isolasi *S. pneumoniae* dari saluran pernafasan. Aminoglikosida dapat menghambat pertumbuhan flora normal saluran pernafasan lain dan membantu mengisolasi *S. pneumoniae* yang secara intrinsik resisten terhadap gentamisin.^{9,12}

2.6 Karakteristik Koloni *S. pneumoniae* pada Agar Darah

2.6.1 Jumlah dan Diameter Koloni

Jumlah koloni *S. pneumoniae* yang ditanam pada media agar darah berbeda tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.²⁴ Diameter koloni *S. pneumoniae* yang memiliki kapsul biasanya nampak besar dan membulat bila di kultur pada agar darah dengan diameter 1-3 mm, namun bila dikultur pada agar coklat akan nampak koloni yang lebih kecil. Koloni *S. pneumoniae* yang tidak berkapsul nampak kecil dan datar. Semua koloni memiliki cekungan pada bagian tengah dikarenakan proses autolisis yang berkembang seiring dengan lama inkubasi.¹⁹

2.6.2 Aktivitas Hemolisis

Pada media agar darah domba zona hemolisis yang nampak jelas dengan diameter zona hemolisis 1-5 mm.²⁴ Kultur *S. pneumoniae* tidak melisiskan sel secara sempurna sehingga nampak zona hemolisis- α pada agar darah yang diinkubasi secara aerob. Zona hemolisis- α nampak berwarna kehijauan disebabkan oleh adanya enzim *pneumolysin*.¹⁹ *S. pneumoniae* mungkin dapat memberikan gambaran hemolisis- β bila diinkubasi secara anaerob karena terdapat *oxygen-labile hemolysin*.^{17,19}

2.6.3 Tampilan Koloni

Koloni *S. pneumoniae* tampak sebagai koloni yang besar (2-3 mm) mengkilap, bulat, dan mukoid pada 2 serotipe yaitu serotipe 3 dan 37. Namun juga bisa tampak sebagai koloni datar dan kecil (1 mm) yang disebut koloni 'draughtsman'.³² Tampilan koloni bervariasi dari opak hingga transparan, berwarna keabuan. Awalnya koloni berbentuk seperti kubah namun akan terjadi autolisis yang menyebabkan ada cekungan pada bagian tengah koloni, menyebabkan peninggian pada tepi koloni.¹⁷⁻¹⁹

2.7 Swab Nasofaring

Pendeteksian kolonisasi mikroba pada saluran pernafasan atas, dapat diambil sampel dari orofaring, nasofaring, atau hidung. *Streptococcus pneumoniae* dapat dideteksi pada orofaring dan nasofaring namun penelitian yang dilakukan Rapola *et al.* menunjukkan pengambilan sampel dari swab nasofaring anak-anak lebih optimal untuk pneumokokus.^{9,33}

Keberhasilan kultur *S. pneumoniae* dari sampel klinis terutama swab nasofaring dipengaruhi oleh keberadaan bakteri lain yang berkolonisasi, serotipe, dan pola distribusi di suatu daerah.

2.7.1 Keberadaan Bakteri Lain yang Berkolonisasi

Kolonisasi bakteri pada nasofaring adalah proses dinamis terjadi naik turunnya spesies dan serotipe yang berkolonisasi. Kompetisi interspesies diperkirakan menjadi penyebab terganggunya komposisi flora normal nasofaring. Keseimbangan antara flora normal seperti *α-hemolytic Streptococcus*, menghambat kolonisasi *S. pneumoniae*.¹

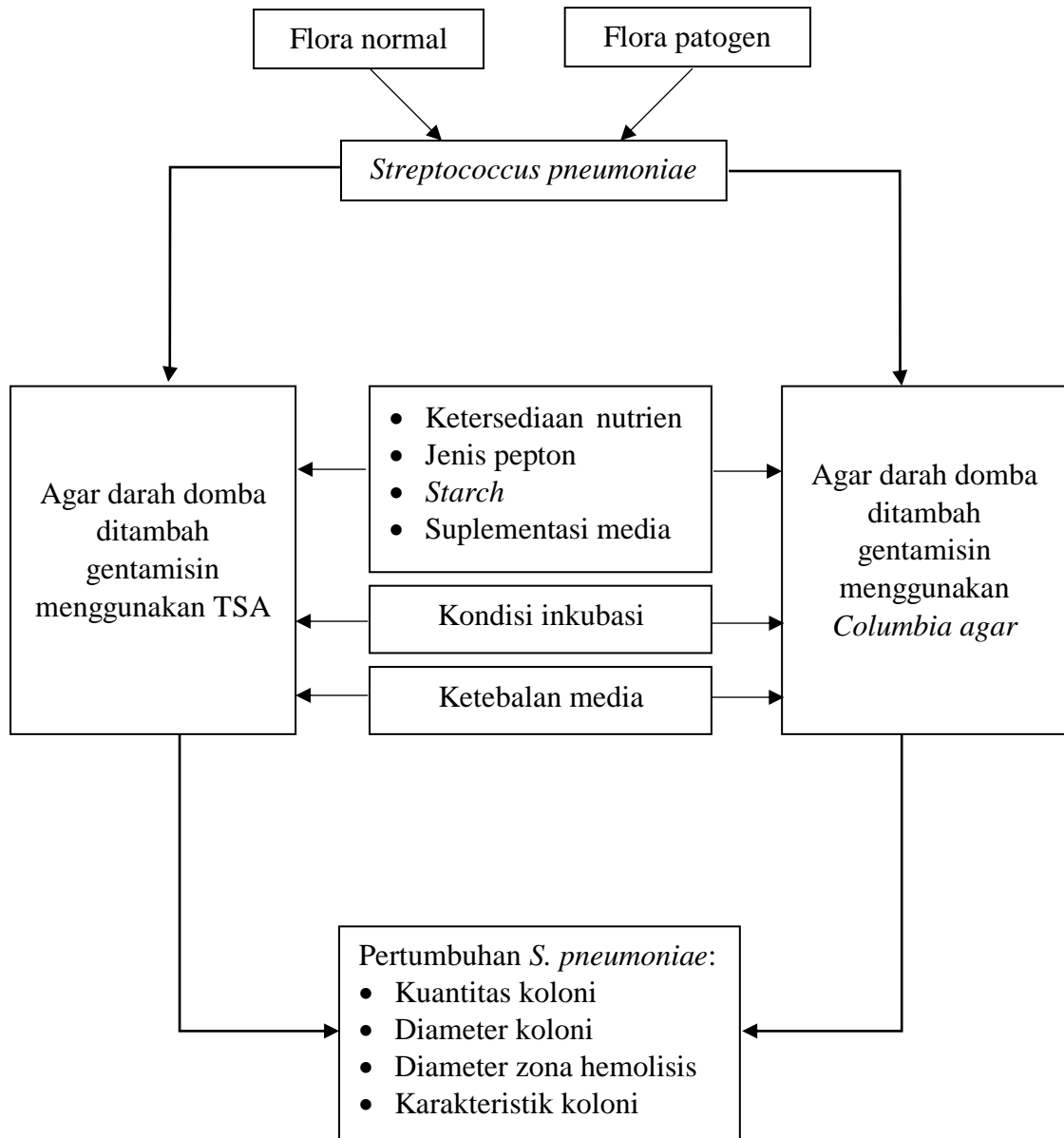
Terdapat asosiasi negatif antara *Streptococcus grup viridans* dengan *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, dan *M. catarrhalis* yang menjadi predominan infeksi saluran pernapasan atas. Spesies bakteri patogen yang berbeda menunjukkan hubungan yang kompetitif satu sama lain.^{1,4} Kolonisasi *S. pneumoniae* menyebabkan berkurangnya kolonisasi *S. aureus* disebabkan oleh peroksida yang dihasilkan *S. pneumoniae*.⁴

2.7.2 Serotipe dan Pola Distribusi

Distribusi serotipe pada isolat nasofaring menunjukkan hasil beragam pada negara dan kelompok umur yang berbeda. Amerika Serikat dan Eropa menunjukkan persebaran serotipe yang hampir sama dengan perbedaan minor pada beberapa serotipe, contohnya di Belanda 19F (19%), 6B (16%), 6A (13%), 9V (7%), dan 23F (7%) paling banyak ditemukan pada anak di bawah usia 3 tahun. Serotipe dan serogrup yang mirip ditemukan pada isolat nasofaring anak sehat di benua Asia. Serogrup yang paling banyak dijumpai di India adalah serogrup 6, 14, 19, dan 15. Serogrup yang banyak ditemukan di Vietnam adalah 19, 23, 14, 6, dan 18.¹

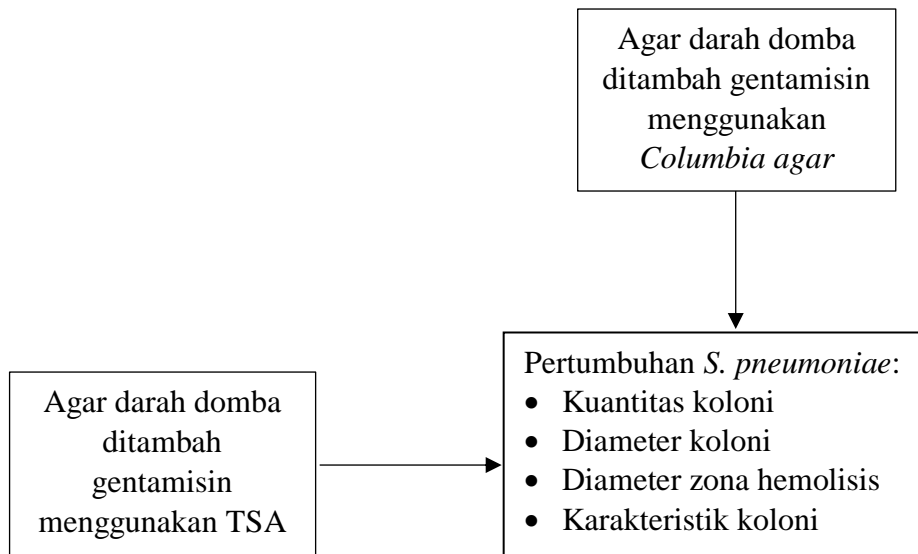
Penelitian persebaran serotipe yang dilakukan di Lombok, Indonesia memberikan hasil yang berbeda dengan penelitian lain yang dilakukan di Asia, serogrup yang paling banyak ditemukan adalah serogrup 6 (25%) dan 23 (21%) diikuti oleh serogrup 15 (8%), 33 (8%), 19 (6%), 12 (5%), dan 3 (4%). Pada penelitian yang dilakukan oleh Farida *et al.* di Semarang, Indonesia juga ditemukan serotipe 6A/B adalah serotipe yang paling sering ditemukan pada semua kelompok umur (19% pada anak dan 39% pada dewasa).^{1,6}

2.8 Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka teori

2.9 Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka konsep

2.10 Hipotesis

Pertumbuhan *S. pneumoniae* pada media agar darah domba dengan TSA lebih baik dibandingkan dengan pada media agar darah domba dengan *Columbia agar* yang diukur dari kuantitas koloni yang lebih banyak, diameter koloni lebih besar, diameter zona hemolisis lebih besar, dan karakteristik tampilan koloni lebih mudah dibedakan.