

PS1

28

Jakarta

LAPORAN PENELITIAN

Pengembangan Database Molekuler Differensial
Circulation dan Subtyping Typing dengan Metode PCR



Nama Penyusun Laporan :

1. Susanto
2. Kambang Sutedji
3. Holly Arif Wibowo

Pusat Biometrik dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Jl. Percetakan Negeri No. 29 Jakarta

2011

LAPORAN PENELITIAN

Pengembangan Deteksi Molekuler Difteri dan *Corynebacterium diphtheriae* Typing dengan Metode PCR



Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan	
PERPUSTAKAAN	
Tanggal :	_____
No. Induk :	_____
Nb. Kelas :	PS 1
	28.
	Jakarta

Nama Penyusun Laporan :

1. Sunarno
2. Kambang Sariadji
3. Holly Arif Wibowo

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
JI. Percetakan Negara No. 29 Jakarta

2011



KEPUTUSAN
KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
NOMOR : HK.03.05/1/ 393/2011

TENTANG

PENETAPAN TIM PELAKSANA
RISET PEMBINAAN ILMU PENGETAHUAN DAN TEKNOLOGI KEDOKTERAN
TAHUN 2011

KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN.

Menimbang

- a. bahwa untuk meningkatkan kapasitas penelitian dan pengembangan di bidang kesehatan perlu dilakukan pembinaan kepada para peneliti muda;
- b. bahwa dalam rangka pembinaan dan menggali potensi peneliti muda perlu dilakukan Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran;
- c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan b perlu ditetapkan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran Tahun 2011;

Mengingat

1. Undang-Undang Nomor 18 tahun 2002 tentang Sistem Nasional Penelitian, Pengembangan dan Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 2002 Nomor 84, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4219);
2. Undang-Undang Nomor 36 tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5063);
3. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3609);



KEPUTUSAN
KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
NOMOR : HK.03.05/1/ 393/2011

TENTANG

PENETAPAN TIM PELAKSANA
RISET PEMBINAAN ILMU PENGETAHUAN DAN TEKNOLOGI KEDOKTERAN
TAHUN 2011

KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN,

Menimbang

- a. bahwa untuk meningkatkan kapasitas penelitian dan pengembangan di bidang kesehatan perlu dilakukan pembinaan kepada para peneliti muda;
- b. bahwa dalam rangka pembinaan dan menggali potensi peneliti muda perlu dilakukan Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran;
- c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan b perlu ditetapkan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran Tahun 2011;

Mengingat

1. Undang-Undang Nomor 18 tahun 2002 tentang Sistem Nasional Penelitian, Pengembangan dan Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 2002 Nomor 84, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4219);
2. Undang-Undang Nomor 36 tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5063);
3. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3609);



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4245933

E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

- Kelima Dalam melaksanakan tugasnya, Tim Pelaksana Risbin Iptekdok 2011 dapat berkonsultasi dan berkoordinasi dengan Tim Panel Pakar dan Tim Pengelola Administrasi Risbin Iptekdok;
- Keenam Biaya kegiatan Risbin Iptekdok 2011 dibebankan pada DIPA Sekretariat Badan Litbangkes Nomor : 0682/024-11.1.01/00/2011;
- Ketujuh Dengan berlakunya Keputusan ini, maka Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nomor : HK.03.05/1/1092/2010 tanggal 17 Maret 2010 tentang Penetapan Tim Pelaksana Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran Tahun 2010 dinyatakan tidak berlaku lagi;
- Kedelapan Keputusan ini berlaku sejak ditetapkan sampai 31 Desember 2011, dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam keputusan ini dapat dilakukan perubahan dan perbaikan sebagaimana mestinya.



Dr. dr. Trihono, MSc
NIP. 195402141980121001

Tembusan:

1. Menteri Kesehatan Republik Indonesia;
2. Sekretaris Jenderal Kementerian Kesehatan;
3. Inspektur Jenderal Kementerian Kesehatan;
4. Kepala Kantor Pelayanan Perbendaharaan Negara Jakarta V;
5. Pejabat Pembuat Komitmen Risbin Iptekdok;
6. Bendahara Pengeluaran Badan Litbang Kesehatan.

LAMPIRAN
KEPUTUSAN KEPALA BADAN LITBANG KESEHATAN
NOMOR : HK.03.05/11 393 /2011
TANGGAL : 19 JANUARI 2011

NO	INSTANSI	PENELITI 1	PENELITI 2	PENELITI 3	STAF ADMINISTRASI	JUDUL RISET	ANGGARAN (Rp)
FK UNIVERSITAS LAMBUNG MANGKURAT, SAMARINDA							
39	1	Agus Yuzono, dr. SpPD	Bambang Setiawan, S.Ked		Sari Febriani	Efek anti-angiostatin sebagai Antiapoptosis Endothelial Progenitor Cell akibat Paparan Carboxy Methyl Lysine melalui Pathway Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)	144.785.000
FK UNIVERSITAS MULAWARMAN, BANJARMASIN							
40	1	Eva Rachmi, dr. M.Kes, Sp.PKec	Ahmad Wisnu Wihandana, dr		Junaedi Sidik	Isolasi dan Mekanisme Aksi Vasodilator dari Kulit Balang Alstonia Wallicensis secara in vitro	114.435.000
41	2	Ika Fitriani, dr. M.Kes	Eva Marlinda, S.Si, M.Si	Sjarif Ismail, dr., M.Kes	Junaedi Sidik	Isolasi Senyawa Aktif dari Macaranga Tanarius sebagai Antioksidan dan Hepatoprotector	143.615.000
42	3	Nuzul Hasanah, dr. M.Kes	Yuniaty, dr. M.Kes		Junaedi Sidik	Kajian Ekstraksi Batang Dracontomelon dan disertai Penjujukan Preklinik Antibakteri, Antioksidan dan Sistem Imun secara in vitro dan in vivo	134.980.000
FK UNIVERSITAS AL KHAIRAAT, PALU							
43	1	Julia Sari, dr	Wijoyo Halim, dr	Maryalisa Abikusno, dr	Zaltri Durzo, S.Kom	Pengaruh Pemberian Probiotik pada Penderita Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA) di Palu	139.814.000
FK UNIVERSITAS UDAYANA, DENPASAR							
44	1	Ni Wayan Triening, S.Si, M.Kes	Bagas Adi Pradnyana Dwi S, dr		Desak Md. Widiyandani, dr. M.Kes	Hubungan Polimorfisme Gene Matrix Metaloproteinase-9 (MMP-9) dengan Remodeling Ventrikel Kiri yang Diperburu dengan Strain dan Strain Rate Ekokardiografi serta Nilai Prognostiknya pada Penderita Infark Miokard Akut (IMA) di Denpasar	124.992.000
PUSLITBANG BIOMEDIS DAN FARMASI, JAKARTA							
45	1	Sunarno, S.Kep, M.Si Med	Kamboang Sarudji, S.Si	Hafiy Anif Wibawa, S.Si	Yudi Hertoyo, S.Kom	Pengembangan Deteksi Molekuler Difteri dan Corynebacterium diphtheriae Typing dengan Metode PCR	126.705.000

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kami panjatkan ke hadirat Allah swt yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian dan membuat laporan penelitian tepat pada waktunya. Ucapan terima kasih tak lupa kami sampaikan kepada:

1. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kemenkes RI melalui Sekretariat Risbin Iptekdok yang telah memberikan dana bagi terlaksananya penelitian ini.
2. Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan atas kesempatan yang diberikan kepada kami untuk melaksanakan penelitian ini.
3. Seluruh Panel Pakar yang telah memberikan arahan dari awal hingga akhir proses penelitian.
4. Sekretariat dan panitia Risbin Iptekdok 2011
5. Seluruh rekan kerja dan rekan peneliti dalam penelitian Risbin Iptekdok 2011.
6. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Semoga seluruh amal ibadahnya diterima oleh Allah swt dan dibalas dengan kebaikan yang berlipat ganda.

RINGKASAN EKSEKUTIF

Pendahuluan

Difteri merupakan salah satu penyakit menular yang masih menjadi permasalahan global, termasuk Indonesia. Difteri dan *diphtheria-like diseases* disebabkan oleh *Corynebacterium* potensial toksigenik (*C.diphtheriae*, *C.ulcerans*, *C.pseudotuberculosis*). Rata-rata kematian kasus (CFR) difteri sekitar 10% dan meningkat sampai dengan 50% pada keadaan berat. Faktor kecepatan dan ketepatan diagnosis serta penatalaksanaan menjadi kunci utama untuk menurunkan CFR. Oleh karena itu alat bantu diagnosis yang cepat dan akurat sangat dibutuhkan. Penelitian bertujuan untuk mengembangkan alat bantu diagnosis difteri yang cepat dan akurat menggunakan PCR Multipleks.

Metode

Disain penelitian berupa studi eksperimen laboratorium menggunakan 44 sampel isolat bakteri dan jamur yang terdiri dari 23 isolat *Corynebacterium* potensial toksigenik (22 *Corynebacterium diphtheriae* dan 1 *Corynebacterium ulcerans*), 4 isolat *Corynebacterium* spesies non toksigenik dan 17 isolat non-*Corynebacterium*. Semua sampel diperiksa menggunakan PCR Multipleks dengan 3 pasang primer yang mempunyai target gen *dtx/tox*, *dtxR* dan *16S rRNA* untuk mendeteksi dan mengidentifikasi *Corynebacterium* potensial toksigenik penyebab difteri. Metode konvensional (*gold standard*) secara kultur, mikroskopik, tes biokimia dan tes toksigenisitas digunakan sebagai kontrol.

Hasil

Kesesuaian hasil pemeriksaan difteri terhadap isolat tersimpan (*stock culture*) antara PCR Multipleks dan metode konvensional mencapai 100%. PCR Multipleks membutuhkan waktu 5-8 jam, sementara metode konvensional membutuhkan waktu 48 jam atau lebih.

Kesimpulan

PCR Multipleks merupakan salah satu metode yang dapat dikembangkan untuk mendeteksi sekaligus mengidentifikasi bakteri penyebab difteri sehingga bisa dipakai sebagai alat bantu diagnosis secara cepat dan akurat.

ABSTRAK

Secara konvensional (gold standard), diagnosis difteri ditetapkan dengan pemeriksaan mikroskopik dan kultur bakteri yang diikuti dengan reaksi biokimia dan test toksigenisitas. Bagaimanapun juga metode konvensional memerlukan waktu yang cukup lama (>48 jam) dan sangat dipengaruhi oleh riwayat pemberian antimikrobia. Di sisi lain keterlambatan pengobatan bisa meningkatkan angka kematian hingga 20 kali lipat. Penelitian bertujuan untuk mengembangkan alat bantu diagnosis difteri yang cepat dan akurat serta relatif tidak terpengaruh pemberian antibiotik dengan menggunakan PCR Multipleks.

Disain penelitian berupa studi eksperimen laboratorium menggunakan 44 sampel isolat bakteri dan jamur yang terdiri dari 23 isolat Corynebacterium potensial toksigenik, 4 isolat Corynebacterium spesies non toksigenik dan 17 isolat non-Corynebacterium. Semua sampel diperiksa menggunakan PCR Multipleks dengan 3 pasang primer yang mempunyai target gen dtx/tox, dtxR dan 16S rRNA untuk mendeteksi dan mengidentifikasi Corynebacterium potensial toksigenik penyebab difteri. Metode konvensional (gold standard) secara kultur, mikroskopik, tes biokimia dan tes toksigenisitas digunakan sebagai kontrol.

Penelitian menunjukkan bahwa kesesuaian hasil pemeriksaan difteri terhadap isolat tersimpan (stock culture) antara PCR Multipleks dengan metode konvensional mencapai 100%. PCR Multipleks memiliki kelebihan karena lebih cepat mendapatkan hasil. Oleh karena itu disimpulkan bahwa PCR Multipleks merupakan salah satu metode yang dapat dikembangkan untuk mendeteksi sekaligus mengidentifikasi bakteri penyebab difteri sehingga bisa dipakai sebagai alat bantu diagnosis secara cepat dan akurat.

DAFTAR ANGGOTA TIM PENELITIAN

No	Nama	Kedudukan dalam Tim	Kepakaran
1	Sunarno, S.Kep, M.Si.Med	Peneliti Utama	Mikrobiologi
2	Kambang Sariadji, S.Si	Peneliti	Mikrobiologi
3	Holly Arif Wibowo	Peneliti	Biologi Molekular

DAFTAR ISI

Kata Pengantar.....	i
Ringkasan Eksekutif.....	ii
Abstrak.....	iii
Daftar Isi.....	iv
Daftar Tabel.....	v
Daftar Gambar.....	vi
Daftar Lampiran.....	vii
Bab I. Pendahuluan.....	1
Bab II. Tinjauan Pustaka.....	4
Bab III. Tujuan dan Manfaat Penelitian	19
Bab IV. Metode Penelitian.....	20
Bab V. Hasil dan Pembahasan.....	26
Bab VI. Kesimpulan dan Saran.....	35
Ucapan Terima Kasih.....	36
Daftar Pustaka.....	40
Lampiran	

DAFTAR TABEL

- Tabel 1. Identifikasi *Corynebacteria* berdasarkan reaksi biokimia
- Tabel 2. Identifikasi *Corynebacterium diphtheriae* berdasarkan morfologi koloni
- Tabel 3. Sampel Penelitian
- Tabel 4. Perbandingan hasil pemeriksaan difteri dengan PCR Multipleks dengan Metode Konvensional
- Tabel 5. Perbandingan Konsumsi Biaya antara PCR Multipleks dan Metode Konvensional

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1. Represi toksin difteri oleh gen *dtxR* atas pengaruh Iron (Fe)
- Gambar 2. Skema Alur Pemeriksaan Laboratorium Difteri
- Gambar 3. Morfologi Koloni Bakteri dan Jamur pada Medium CTBA
- Gambar 4. Morfologi sel pada pemeriksaan mikroskopik
- Gambar 5. Reaksi Biokimia *Corynebacterium* Potensial Toksigenik
- Gambar 6. Tes Toksigenisitas
- Gambar 7. Hasil Pemeriksaan PCR Multipleks

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. *Etical Clearence*
- Lampiran 2. Personalia Tim Penelitian
- Lampiran 3. Surat Pernyataan
- Lampiran 4. Lembar Pengesahan

BAB I PENDAHULUAN

Hingga saat ini kasus difteri masih terus terjadi di berbagai daerah, bahkan cenderung mengalami peningkatan pada tahun-tahun terakhir. KLB difteri telah terjadi di beberapa daerah, seperti di Kabupaten Tasikmalaya tahun 2005 dan 2006 sebanyak 55 kasus dan 15 diantaranya (27%) meninggal, di Cianjur Desember 2006, 1 kasus, di Garut Januari 2007 sebanyak 17 kasus, 2 diantaranya (11,8%) meninggal¹, dan di Padang November 2007 ditemukan 1 kasus.² Peningkatan kasus difteri yang sangat menyolok terjadi di Jawa Timur. Pada tahun 2003 teridentifikasi 5 kasus positif. Tahun berikutnya (2004) meningkat 3 kali lipat menjadi 15 kasus (4 meninggal). Tahun 2005 dan 2006 meningkat kembali sekitar 3 kali lipat menjadi 52 dan 44 kasus (8 meninggal). Pada tahun 2007 meningkat kembali 2 kali lipat menjadi 86 kasus dan 6 diantaranya meninggal. Selanjutnya pada tahun 2008 teridentifikasi 76 kasus, 12 diantaranya meninggal. Pada tahun 2009 kembali meningkat 2 kali lipat menjadi 140 kasus, 8 diantaranya meninggal. Tahun berikutnya (2010) kembali meningkat 2 kali lipat menjadi 304 kasus dan 21 meninggal. Kasus kembali meningkat pada tahun 2011, dimana dalam rentang Januari – Oktober 2011 telah teridentifikasi 333 kasus dan 11 meninggal.^{3,4}

Difteri merupakan penyakit infeksi akut yang umumnya menyerang saluran nafas atas,⁵ tapi beberapa kasus juga ditemukan di kulit serta beberapa organ lainnya.⁶ Tanda khas pada saluran nafas berupa terbentuknya pseudomembran dan dilepaskannya eksotoksin yang sangat ganas. Penyakit ini mudah menular melalui udara dengan masa inkubasi antara 1 – 10 (tersering 2-5) hari.⁷ Tingkat kematian akibat difteri mencapai 3 – 5%,⁵ bahkan lebih^{2,3} dari seluruh kasus yang umumnya terjadi karena gangguan saluran nafas dan kardiovaskuler. Penyakit ini biasanya menyerang anak-anak, tapi dapat juga terjadi pada orang dewasa.^{8,9}

Difteri disebabkan oleh *Corynebacterium diphtheriae* yang merupakan bakteri gram positif, bersifat aerobe, tidak bergerak dan tidak membentuk spora. Bakteri ini berbentuk basil seperti palu (pembesaran pada salah satu ujung) dengan diameter 0,1 – 1 µm dan panjang beberapa µm. Bakteri dapat dibedakan menjadi 4 sub tipe, yaitu gravis, mitis, intermedius dan belfanti.⁸ Tipe gravis umumnya bersifat toksigenik dan

mempunyai prognosis jelek, di mana angka kematian bisa mencapai 50%, sedangkan tipe belfanti merupakan tipe nontoksigenik.^{5,8} Meskipun demikian, jenis toksigenik dapat berubah menjadi nontoksigenik dan juga sebaliknya. Hal ini dipengaruhi oleh insersi *Corynephage* yang membawa gen *tox*¹⁰ atau subkultur yang berulang di laboratorium, terutama oleh kadar Fe di media pertumbuhan.⁸

Secara konvensional, diagnosis difteri ditetapkan dengan pemeriksaan mikroskopik dan kultur bakteri yang diikuti dengan reaksi biokimia dan test toksigenisitas. *Gold standard* untuk pemeriksaan toksigenisitas dengan cara *Elek's test (in vitro)* maupun *Genuine pig* dan *vero cell cytotoxicity (in vivo)*. Bagaimanapun juga metode konvensional memerlukan waktu yang cukup lama (>48 jam).^{11,12} Di sisi lain keterlambatan pengobatan bisa meningkatkan angka kematian hingga 20 kali lipat. Hal ini yang menjadi dilema para dokter sehingga pada umumnya terapi difteri diberikan berdasarkan gambaran klinis penderita sambil menunggu hasil pemeriksaan laboratorium selesai.^{5,8} Lebih lanjut, metode konvensional juga sangat dipengaruhi oleh riwayat pemberian antimikrobal sehingga kurang cocok dilakukan pada sampel kontak yang telah mendapatkan profilaksis sebelumnya.^{13,14} Oleh karena itu, diperlukan alat bantu diagnosis yang cepat dan akurat serta relatif tidak terpengaruh oleh pemberian antimikrobal sehingga dapat mengurangi penyebaran penyakit dan menurunkan angka kematian.

Salah satu metode pemeriksaan difteri yang cukup cepat dan relatif tidak terpengaruh oleh pemberian antimikrobal adalah teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan target gen *tox* region A dan B yang telah dikembangkan oleh Nakao, et al.¹⁵ Hasil uji coba pada *direct specimen* cukup baik, tapi beberapa kendala muncul kemudian karena tidak semua bakteri yang mempunyai gen *tox* akan mengekspresikan dan menghasilkan toksin secara fenotif.¹⁶ Selain itu bakteri yang tidak mempunyai gen *tox* tidak akan terdeteksi dengan pemeriksaan ini. Padahal, beberapa laporan terbaru menyebutkan bahwa *Corynebacterium diphtheriae* nontoksigenik juga dapat menyebabkan penyakit yang mematikan.^{17,18} Bakteri jenis nontoksigenik juga dapat berubah menjadi toksigenik bila terinsersi oleh *Corynephage* yang membawa gen *tox*, seperti telah dikemukakan di awal.¹⁰

Beberapa tahun kemudian Pimenta, et al. mengembangkan PCR Multipleks untuk pemeriksaan difteri dengan target gen *tox* atau *dtx* dan gen *dtxR*. Uji coba pada

isolat bakteri dari *stock culture* menunjukkan keistimewaannya dalam mendeteksi sekaligus membedakan secara simultan *Corynebacterium diphtheriae* tipe toksigenik maupun nontoksigenik.¹⁹ Meskipun demikian, pemeriksaan ini masih memiliki keterbatasan, dimana spesies lain dari *Corynebacterium* (*ulcerans* dan *pseudotuberculosis*) tidak dapat terdeteksi. Kedua jenis bakteri tersebut dapat menyebabkan penyakit yang menyerupai difteri pada manusia, baik dari gambaran klinis maupun hasil pemeriksaan laboratoriumnya.^{20,21} Keterbatasan lain dari teknik yang telah dikembangkan ini adalah bahwa beberapa sub tipe dari *Corynebacterium diphtheriae* (*gravis*, *mitis*, *intermedius* dan *belfanti*) tidak bisa dibedakan satu sama lain.¹⁹

Penelitian ini merupakan upaya pengembangan pemeriksaan difteri untuk melengkapi kekurangan-kekurangan dari pemeriksaan yang telah ada. Metode pemeriksaan akan dilakukan dengan teknik PCR Multipleks menggunakan 3-6 pasang primer dengan target gen *dtx*, *dtxR*, *pld* dan atau *16S rRNA*.^{20,22} Gen *tox* berfungsi untuk mengkode produksi toksin sehingga dapat membedakan antara jenis toksigenik dan nontoksigenik, sedangkan gen *dtxR* dimiliki oleh semua jenis *Corynebacterium diphtheriae* (baik toksigenik maupun non toksigenik) sehingga dapat membedakan antara *Corynebacterium diphtheriae* dengan non-*Corynebacterium diphtheriae*. Sementara itu, *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis* memiliki gen *pld* dan *16S rRNA* spesifik yang tidak dimiliki oleh *Corynebacterium diphtheriae*. Gen-gen tersebut (*dtx*, *dtxR*, *pld* dan atau *16S rRNA*) akan dapat membedakan antara *Corynebacterium* potensial toksigenik dan bukan, antara spesies *diphtheriae* dan bukan, dan antara toksigenik dan non-toksigenik.²³

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Difteri

Difteri adalah penyakit infeksi akut yang disebabkan oleh *Corynebacterium diphtheriae*, ditandai dengan terbentuknya eksudat berbentuk pseudomembran pada tempat infeksi dan diikuti oleh gejala umum akibat eksotoksin yang diproduksi bakteri penyebab. Penyakit ini mudah dan cepat menyebar melalui droplet dan kontak langsung dengan penderita atau karier. Bakteri ditularkan langsung melalui batuk, bersin dan berbicara maupun secara tidak langsung melalui debu, baju, buku dan barang-barang yang terkontaminasi karena bakteri cukup resisten terhadap udara panas, dingin dan kering.^{4,24} Meskipun pernah ditemukan *Corynebacterium diphtheriae* pada kucing, tapi belum ada bukti difteri sebagai penyakit zoonosis.²⁵ Pembahasan selengkapnya tentang *Corynebacterium diphtheriae* dan spesies lain dari *Corynebacterium* yang dapat menyebabkan penyakit menyerupai difteri dapat dilihat pada poin B.

Kelompok risiko tinggi terserang difteri adalah anak-anak dan orang lanjut usia, tapi pada era vaksinasi seperti saat ini terjadi perubahan epidemiologi dimana difteri juga sering terjadi pada orang dewasa.^{26,27} Terjadinya epidemi atau peningkatan kasus pada suatu daerah yang sudah lama bebas dari penyakit ini dapat ditimbulkan karena adanya penderita atau karier yang datang dari daerah endemik, penurunan cakupan imunisasi dan terjadinya perubahan virulensi bakteri.^{28,29}

Penyakit difteri timbul dimulai dengan masuknya bakteri penyebab ke dalam tubuh dan berkembang biak terutama pada mukosa saluran nafas atas untuk selanjutnya memproduksi eksotoksin yang disebut *diphtheria toxin* (DT). Toksin yang terbentuk akan diserap melalui membran mukosa, menimbulkan peradangan dan destruksi epitel menyebabkan terjadinya nekrosis. Pada daerah nekrosis terbentuk fibrin yang diinfiltrasi leukosit. Hal ini menyebabkan terbentuknya *patchy exudate* yang pada permulaannya masih bisa mengelupas, tapi pada keadaan lanjut akan terbentuk *fibrous exudate* (membran palsu). Membran ini sulit terlepas dan mudah berdarah. Membran palsu (pseudomembran) biasanya terbentuk pada tonsil, faring, laring, bahkan bisa meluas sampai dengan trakhea dan bronkus. Pseudomembran ini diikuti dengan edema

jaringan mukosa dibawahnya. Inilah yang sering menyebabkan terjadinya obstruksi saluran nafas.^{4,13,30}

Selanjutnya toksin akan memasuki peredaran darah dan menyebar ke seluruh tubuh, menyebabkan degenerasi dan nekrosis terutama pada jantung dan jaringan saraf karena pada sel jantung dan saraf terdapat banyak reseptor DT. Apabila mengenai jantung akan mengakibatkan terjadinya miokarditis dan payah jantung, sedangkan pada jaringan saraf akan menyebabkan polyneuropati. Kematian biasanya disebabkan gagal jantung dan gangguan pernafasan.^{4,30,31}

Mekanisme terjadinya kerusakan sel oleh toksin difteri sejak lama telah diteliti. Ikatan toksin dengan reseptor pada permukaan sel host menyebabkan proses yang disebut *receptor-mediated endocytosis*. Proses ini menyebabkan toksin masuk ke dalam lisosom dan terjadi translokasi *catalytic (C) domain* ke dalam sitosol. *Catalytic domain* akan menyebabkan inaktivasi protein seluler yang disebut *elongation factor 2 (EF-2)*. Hal ini menyebabkan kegagalan sintesis protein dan pada akhirnya terjadi kematian sel.^{32,33,34} Sekali masuk ke dalam sel, tidak ada cara untuk menghentikan kerusakan sel yang diakibatkan oleh toksin karena anti bodi tidak mampu menetralsasi toksin yang telah berikatan dengan jaringan/sel.^{8,22}

Prognosis difteri tergantung pada virulensi bakteri, lokasi dan perluasan membran, status kekebalan, kecepatan mendapatkan pengobatan, dan perawatan. Difteri yang disebabkan biotipe gravis mempunyai prognosis paling jelek dan bila terjadi *bullneck diphtheria*, angka kematian bisa mencapai 50%. Berdasarkan lokasi yang terkena, difteri laring lebih cepat menyebabkan obstruksi jalan nafas sehingga resiko kematian lebih tinggi. Selain itu, faktor lain yang sangat menentukan adalah kecepatan dan ketepatan menegakkan diagnosis sehingga pasien bisa segera mendapatkan pengobatan secara tepat. Keterlambatan pengobatan dapat meningkatkan angka kematian hingga 20 kali lipat karena seperti telah disampaikan di awal bahwa antitoksin hanya dapat menetralsir toksin yang belum berikatan dengan jaringan atau belum masuk ke dalam sel.^{4,22}

Kematian kasus (*CFR: case fatality rate*) akibat difteri masih cukup tinggi, yaitu sekitar 3-10%. Sementara di Indonesia berdasarkan laporan kasus difteri beberapa tahun terakhir menunjukkan bahwa CFR akibat difteri berkisar antara 5,6% sampai dengan 27%.^{1,2,24}

2.2. *Corynebacterium* Potensial Toksigenik (*C.diphtheriae*, *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis*)

Corynebacterium diphtheriae adalah spesies utama penyebab penyakit pada manusia dari genus *Corynebacterium*. *C.diphtheriae* merupakan agen penyebab difteri, dimana manusia hanya sebagai host dan tidak diketahui *environmental reservoir*-nya. Dinding sel *Corynebacterium* mengandung *meso-diaminopimelic acid* dan *short-chain mycolic acid* dengan 22-36 atom karbon. *Palmitic, oleic, dan stearic acid* merupakan asam lemak seluler utama pada bakteri ini. Komposisi G+C pada DNA *Corynebacterium* meliputi 46% sampai dengan 74%. *Corynebacterium diphtheriae* adalah kuman gram positif, tersusun berpasangan, tidak bergerak, tidak membentuk spora, aerobik, dan dapat memproduksi eksotoksin. Bentuknya seperti palu (pembesaran pada salah satu atau kedua ujung), diameter 0,1-1 μm dan panjangnya beberapa μm .^{22,35,36,37,38}

Bakteri ini hanya tumbuh pada medium tertentu, seperti Loeffler, telluride atau Tinsdale serta memfermentasi glukosa. Pada medium Loeffler, bakteri tumbuh dengan cepat membentuk koloni kecil-kecil, bergranular dan berwarna abu-abu. Pada medium Telluride, bakteri tumbuh lebih lambat dan membentuk koloni berwarna abu-abu kehitaman karena mereduksi telluride. Tapi, ini bukan tanda khas karena bakteri lain (*Staphylococcus* dan *Streptococcus*) juga demikian. Ketika ditumbuhkan di medium yang dikembangkan oleh Tinsdale dan dimodifikasi oleh Moore and Parsons, *C.diphtheriae* (juga *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis*) memproduksi halo disekitar koloni kehitaman, dimana ini jarang terjadi pada *Streptococcus* dan *Staphylococcus*. Halo coklat dihasilkan dari H₂S yang diproduksi oleh aksi cysteinase pada L-cystine dan potassium telluride yang direduksi untuk *metallic tellurium*. Pembentukan halo juga tergantung pada pengasaman medium oleh bakteri. Gambaran lain dari *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis* dibandingkan *Corynebacterium* lain yang diisolasi dari manusia adalah penghambatan pirazimidase.^{4,22,36,38}

Ada 4 biotipe *C.diphtheriae*, yaitu: *gravis*, *mitis*, *intermedius* dan *belfanti*. *Chang et al.* membedakannya berdasarkan kultur dan reaksi biokimia. Jenis *gravis* menghasilkan koloni besar, kasar, irreguler, warna abu-abu, dan tidak menimbulkan hemolisis eritrosit. Jenis *mitis* mempunyai koloni kecil, halus, konveks dan dapat

menimbulkan hemolisis eritrosit. Jenis intermedius mempunyai koloni kecil, halus, mempunyai bintik hitam di tengahnya dan menimbulkan hemolisis eritrosit.^{8,22,38}

C.diphtheriae juga dibedakan berdasarkan sifat toksigenisitas atau kemampuannya dalam memproduksi toksin. Jenis bakteri yang mampu memproduksi toksin disebut strain toksigenik, sementara yang tidak memproduksi toksin disebut strain non-toksigenik. Manifestasi klinik difteri dihubungkan dengan keberadaan strain toksigenik. Meskipun demikian, sifat toksigenisitas ini bisa berubah karena pengaruh bakteriofag atau subkultur berulang di laboratorium. Ketika dilisogenik bakteriofag, bakteri non-toksigenik akan berubah menjadi toksigenik dan virulen. Strain toksigenik mungkin juga akan berubah menjadi non-toksigenik setelah dilakukan subkultur berulang di laboratorium. Oleh karena itu, keberadaan strain non-toksigenik ini perlu mendapatkan perhatian dalam upaya pemberantasan difteri.^{4,8,37,38}

Strain non-toksigenik juga telah diketahui menyebabkan penyakit lokal dan kadang-kadang infeksi sistemik. Strain non-toksigenik biotipe gravis pernah dilaporkan sebagai penyebab outbreak pada *boy's residential school* tahun 1975. Organisme ini diisolasi pada 7 dari 19 anak. Strain non-toksigenik sering diisolasi dari kasus pharingitis. Baru-baru ini terdapat laporan yang menghubungkan strain non-toksigenik dengan endocarditis dan sepsis. Bagaimanapun juga, masih sangat sedikit pengetahuan tentang patogenisitas strain non-toksigenik. Organisme diperkirakan menyerang endotel pembuluh darah.^{17,18,22}

Corynebacterium (non) *diphtheriae* yang dapat menyebabkan penyakit mirip difteri (*diphtheria-like disease*) pada manusia adalah *Corynebacterium ulcerans* dan *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Kedua bakteri tersebut merupakan patogen pada binatang/ternak, tapi beberapa laporan menghubungkannya dengan kasus *diphtheria-like Disease* pada manusia selungga perlu mendapatkan perhatian serius.^{39,40,41,42}

Corynebacterium ulcerans pertama kali diisolasi tahun 1926 dari lesi tenggorok oleh Gilbert and Stewart. Koloni serupa dengan *C.diphtheriae* biotipe gravis, dimana bakteri ini bersifat mengkilat dan kehitaman, dengan hemolysis jelas, diameter 1-2 mm pada inkubasi 24 jam. Pada medium Tinsdale, bakteri menghasilkan koloni hitam dengan halo di sekitarnya. Pada test biokimia bersifat urease positif, nitrat negative dan memfermentasi glukosa, maltosa serta glikogen. Kemampuannya menghidrolisis urea dan kurang mereduksi nitrat membedakannya dari *C.diphtheriae*.^{22,38}

Bakteri ini ketika dilisogenik oleh bakteriofag yang membawa *gen tox* akan memproduksi 2 eksotoksin. Pertama, serupa dengan toksin difteri (DT) dan dapat dinetralkan oleh antitoksin difteri serta dapat dideteksi dengan Elek's test. Kedua, identik dengan toksin *C.pseudotuberculosis*, yaitu *pld* yang tidak bisa dinetralkan oleh antitoksin difteri. Bakteri ini merupakan patogen pada ternak/binatang dan menyebabkan mastitis pada sapi dan ternak lain. Strain toksigenik dihubungkan dengan penyakit yang menyerupai difteri klasik dengan gejala yang lebih ringan. Minimal 3 kematian telah terjadi akibat bakteri ini. Biasanya infeksi pada manusia didapat dari kontak dengan binatang atau mengkonsumsi produknya yang tidak dipasteurisasi.^{22,38,43}

Corynebacterium pseudotuberculosis yang sebelumnya dikenal dengan *C.ovis* pertama kali diisolasi tahun 1890 dari ginjal domba yang nekrotik. Koloni berwarna putih kekuningan, opag dan convex dengan permukaan kusut, berdiameter 1-2 mm setelah inkubasi 48 jam serta menghasilkan hemolysis. Seperti *C.ulcerans* bakteri ini juga urease positif dan memproduksi halo pada medium Tinsdale serta gagal menghidrolisis pyrazinamidase. Tes biokimia yang paling membedakannya dengan *C.ulcerans* adalah bahwa *C.ulcerans* menghidrolisis glikogen sedangkan *C.pseudotuberculosis* distimulasi lipid.^{22,38}

C.pseudotuberculosis memproduksi *dermonecrotic toxin* atau *pld* yang merupakan faktor virulensi bagi *C.pseudotuberculosis*. *Pld* merupakan protein yang lebih kecil dari DT (14.000 dalton). Lebih dari 10% isolat *C.pseudotuberculosis* juga memproduksi *diphtheria toxin* (DT). Bakteri ini menyebabkan limfadenitis pada kambing dan domba, limfangitis ulseratif pada kuda dan lesi serta abses kulit pada binatang lain. Infeksi pada manusia dilaporkan pada pekerja di peternakan yang terekspos binatang terinfeksi, biasanya bermanifestasi sebagai limfadenitis.^{22,44}

2.3. Diphtheria Toxin

Faktor utama yang mempengaruhi virulensi bakteri adalah toksin difteri (DT), penyebab komplikasi sistemik yang terlihat pada difteri. Produksi toksin difteri dikode seperangkat gen yang disebut gen *diphtheria toxin (dtx/tox)*. Gen *tox* dibawa oleh bakteriofag yang berintegrasi dalam kromosom strain non-toksigenik dan non-virulen sehingga menjadi virulen dan sangat toksigenik. DT hanya diproduksi oleh strain yang terinfeksi secara lisogenik oleh bakteriofag. Beberapa perbedaan tipe *Lysogenic*

Corynebacterium yang telah dikenal antara lain β -tox, γ -tox, dan ω -tox. Beberapa phage juga mampu melisogenik *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis*.^{49,50,51}

Toksin difteri disintesis sebagai *single polypeptide chain* dengan berat molekul sekitar 62.000 dalton. Setelah disekresi, beberapa bagian dirusak oleh enzim proteolitik yang dihasilkan oleh sel bakteri. Toksin difteri mudah dipecah dengan enzim protease menjadi 2 fragmen. Fragmen A merupakan bagian aktif toksin yang berhubungan dengan efek letal atau tanda dan gejala penyakit, sedangkan fragmen B merupakan bagian yang berikatan dengan permukaan sel host. Kedua fragmen dihubungkan dengan ikatan *single disulfide*.^{52,53,54}

Studi struktur 3 dimensi menunjukkan bahwa toksin dibagi menjadi beberapa domain:

- *Amino-terminal C (catalytic) domain*, bertanggungjawab terhadap ribosilasi ADP *elongation factor 2* (EF2) yang memblokir sintesis protein.
- *Transmembran atau translocation (T) domain*, mengandung 9 alfa heliks (TH1-TH9) yang bertanggungjawab terhadap insersi ke dalam membran pada tingkat keasaman, formasi channel dan translokasi C-domain menyeberang *endosomal membrane* untuk mencapai sitosol.
- *Carboxyl-terminal R-domain*, bertanggungjawab terhadap ikatan DT terhadap *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF), yaitu prekursor yang berfungsi sebagai DT reseptor pada sel yang peka.

HB-EGF *receptor* adalah protein pada permukaan banyak tipe sel. Distribusi HB-EGF *receptor* pada sel menentukan kepekaan spesies binatang dan sel terhadap DT. Reseptor ini banyak ditemukan pada permukaan sel jantung dan saraf sehingga pada keadaan berat akan terjadi kegagalan jantung dan kerusakan saraf.^{8,22,54}

Pada keadaan absen fragmen B, fragmen A adalah non toksik karena tidak dapat menyeberangi membran plasma untuk menjangkau sitoplasma. Telah didemonstrasikan secara invitro bahwa molekul tunggal fragmen A pada sitoplasma cukup untuk membunuh 1 sel eukariot. Minimal letal dosis terhadap manusia dan hewan di bawah 0,1 mikrogram/kg berat badan.^{55,56}

Produksi DT oleh strain toksigenik dipengaruhi oleh komposisi media pertumbuhan. Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa DT diproduksi secara optimal pada kondisi kekurangan besi dan produksi terhambat pada kadar besi tinggi.

Penelitian tentang regulasi produksi DT dimulai tahun 1970-an. Pada tahun 1974 Murpy, dkk melaporkan bahwa *tox* dari β -*Corynephage* mempengaruhi sintesis DT dan protein yang dikode phage lain dan bahwa penambahan ekstrak *C.diphtheriae* menghambat sintesis DT. Sehingga ada hipotesis bahwa *C.diphtheriae* mengandung faktor yang berfungsi sebagai kontrol negatif.^{57,58,59}

Pada tahun 1989 ditemukan bukti bahwa sebuah DT repressor dikode kromosom. Peneliti mengobservasi bahwa protein pada ekstrak kasar *C.diphtheriae* yang tumbuh pada keadaan besi tinggi dapat mengikat secara spesifik *tox* operator dan mencegah *DNase I digestion*. Pada 1992 Krafft, dkk menunjukkan bahwa sebuah *iron-dependent repressor* yang menghambat transkripsi gen *tox* oleh *B-corynephage* pada keadaan besi tinggi, dikode oleh *C.diphtheriae* genom (gen *dtxR*).^{57,58,59}

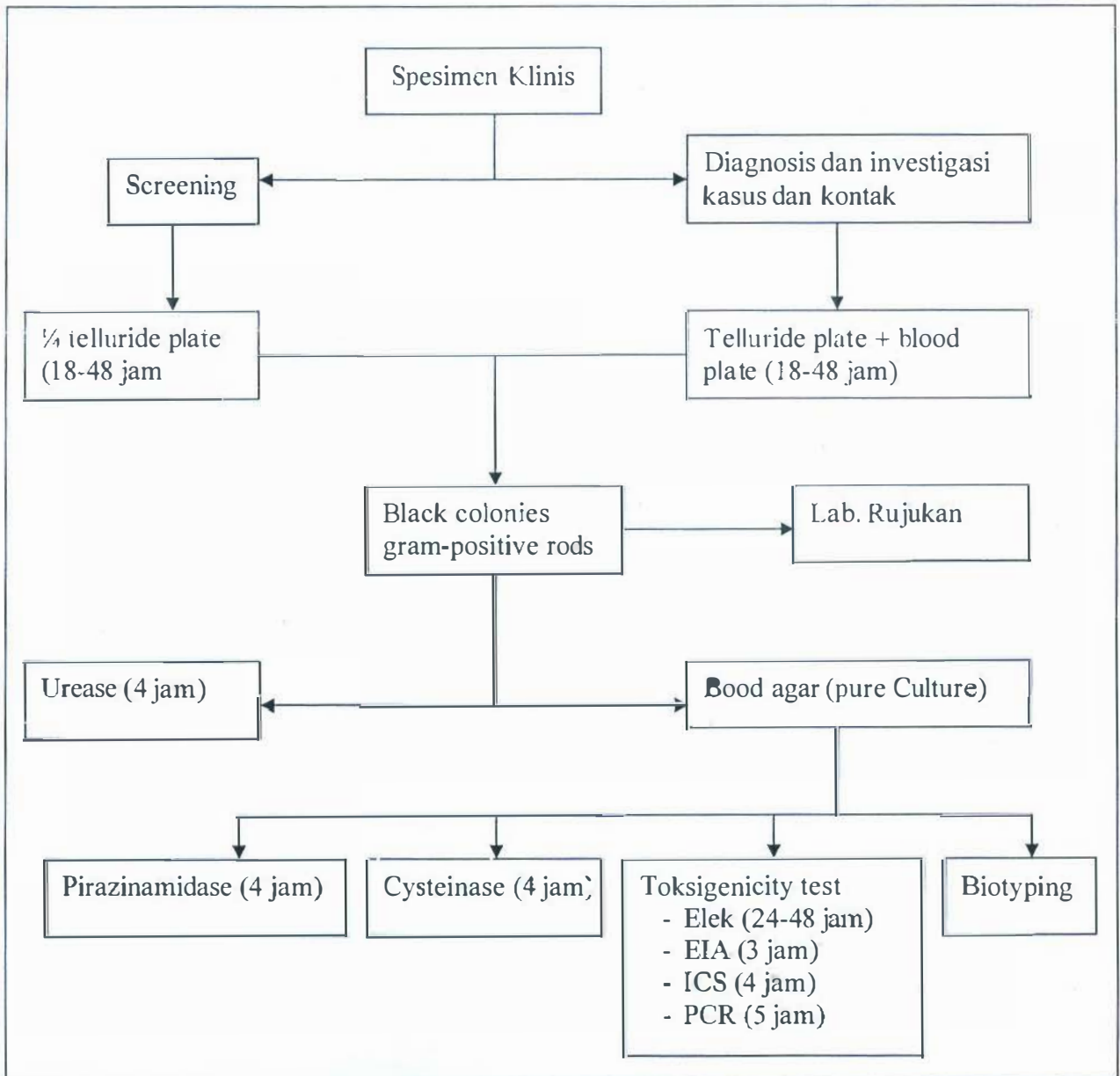


Gambar 1.
Represi toksin difteri oleh gen *dtxR* atas pengaruh Iron (Fe)

Gen *dtxR* diklon oleh Boyd, dkk pada tahun 1990 dan Schmitt & Holmes 1991. analisis DNA sequens mengindikasikan bahwa gen *dtxR* dikode polypeptida yang mengandung 226 asam amino. Masing-masing *dtxR* monomer mempunyai 3 domain. Domain 1 (residu 1-73) terletak pada amino terminal dan dibutuhkan untuk mengikat

DNA. Domain 2 (residu 74-144) bertanggungjawab untuk dimeriasi dan memiliki 2 *metal-binding site*. Domain 3 terletak pada carboxyl terminal. Domain 3 tidak terpecah dalam struktur 3 dimensi *dtxR* dan fungsinya belum diketahui.^{57,58,59}

2.4. Pemeriksaan Laboratorium Difteri



Gambar 2.

Skema Alur Pemeriksaan Laboratorium Difteri

2.4.1. Pengambilan dan Pengiriman Spesimen

Kultur mikrobiologi penting untuk konfirmasi difteri. Dalam hal ini, spesimen harus segera diambil ketika pasien dicurigai menderita difteri. Multispesimen yang berasal dari hidung, telinga, tenggorok, dan nasofaring dibutuhkan untuk meningkatkan ketepatan hasil. Jika memungkinkan, swab seharusnya diambil dari bawah membran, tempat bakteri berkumpul. Pada difteri kulit, swab diambil dari lesi kulit. Beberapa materi krusta seharusnya dibuang terlebih dahulu dan usap diambil dari dasar luka. Materi membran yang dibuang juga memungkinkan untuk diperiksa secara kultur dan mikroskopik. Pada kasus endocarditis, kultur darah penting dilakukan untuk screening difteri. Swab hidung dan tenggorok seharusnya juga diambil dari sampel kontak. Hasil pemeriksaan terhadap sampel kontak dapat digunakan untuk konfirmasi kasus jika hasil pemeriksaan terhadap penderita negatif.^{22,60}

Spesimen yang didapat harus segera dikirim ke laboratorium dan jika spesimen tidak bisa segera dikirim ke laboratorium maka harus digunakan media transportasi seperti Amies atau Loeffler serum. Jika waktu transportasi lebih dari 24 jam, spesimen seharusnya disimpan dalam kemasan khusus yang mengandung pengering seperti *silica gel*. Seluruh isolat *Corynebacteria* toksigenik (*C.diphtheriae*, *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis*) seharusnya dikirim ke laboratorium rujukan untuk konfirmasi hasil dan pemeriksaan lebih lanjut.^{22,61}

2.4.2. Processing dan Staining

Di laboratorium, swab diinokulasi pada agar darah, Loeffler serum dan CTBA. Jika fasilitas kultur tidak memadai, swab distreak ke dalam Loeffler serum atau Amies sebagai media transport. Swab yang lain distreak ke dalam slide dan dibuat hapusan tipis. Pada semua kasus, dilakukan pewarnaan Gram. Jika dengan pewarnaan Gram menunjukkan gambaran seperti *C.diphtheriae*, dilanjutkan dengan pewarnaan Albert. Jika sampel positif difteri, dengan pewarnaan Gram akan tampak basil gram (+), pembesaran pada salah satu atau kedua ujung, dan lurus atau sedikit melengkung. Sementara itu dengan pewarnaan Albert akan tampak *metachromatic granules*. Hal ini yang membedakannya dari *Corynebacteria* lain (basil diphtheroid). Pewarnaan dilakukan sebelum kultur (dari swab) dan setelah kultur dari koloni tersangka. Tapi pemeriksaan mikroskopik secara langsung dari spesimen klinis tidak dianjurkan untuk menentukan diagnosis karena rawan terjadi negatif dan positif palsu.^{22,60,61,62}

2.4.3. Kultur dan Isolasi

Idealnya, spesimen langsung ditanam ke dalam media kultur. Kultur spesimen dianjurkan menggunakan *Blood Agar* + telluride dan diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 sampai dengan 48 jam. Telluride mengandung media yang menekan pertumbuhan bakteri komensal dan memungkinkan *C.diphtheriae* tumbuh, juga corynebacteria lainnya serta stafilocokus dan jamur. *C.diphtheriae* akan menghasilkan koloni berwarna hitam.^{12,22,81}

C. diphtheriae juga tumbuh dengan cepat pada medium Loeffler yang kaya lipid. Pewarnaan gram dari koloni yang tumbuh pada medium Loeffler menunjukkan *metachromatic granule* terbaik. Selain itu, *C.diphtheriae* dan *C.ulcerans* juga tumbuh pada medium pertumbuhan standard seperti *blood agar* dan *cocolate agar*. Beberapa laboratorium kadang-kadang menggunakan medium Tinsdale untuk kultur primer, tapi medium ini sangat selektif sehingga meningkatkan kemungkinan negatif palsu terutama jika spesimen mengandung sejumlah kecil bakteri. Bagaimanapun juga, medium Tinsdale mengandung *cysteinase* yang ideal untuk identifikasi presumtif Corynebacteria. Pada medium Tinsdale tiga spesies yang berpotensi toksigenik (*C.diphtheriae*, *C.ulcerans*, *C.pseudotuberculosis*) menghasilkan koloni hitam yang dikelilingi halo coklat. Selain dengan *cysteinase*, spesies corynebacteria yang berpotensi toksigenik ditandai dengan tidak adanya aktivitas pirazinamidase.^{12,22,80}

Tabel 1. Identifikasi Corynebacteria berdasarkan reaksi biokimia

Spesies	Pirazina- midase	Cystein- ase	Nitrat	Urea	Fermentasi			
					glukosa	maltosa	sukrosa	starch
<i>C.diphtheriae (gravis)</i>	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>C.diphtheriae (mitis)</i>	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>C.diphtheriae (intermedius)</i>	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>C.diphtheriae (beljanti)</i>	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>C.ulcerans</i>	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>C.pseudotuberculosis</i>	-	+	-	+	+	+	-	+
Corynebacterium lain (spesies non-toksigenik)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-

Setelah diisolasi, bakteri diidentifikasi menggunakan tes biokimia. Karakteristik biokimia dapat membedakan *C.diphtheriae* (4 sub tipe), *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis* serta Corynebacteria lain yang mungkin ada di tenggorok. Dalam hal ini, sediaan komersial seperti "API Coryne" dan "Rosco diagnostica" memiliki keakuratan yang tinggi.^{11,12,22}

Selain berdasarkan reaksi biokimia, 4 sub tipe *C.diphtheriae* dibedakan menurut morfologi koloninya.

Tabel 2. Identifikasi *Corynebacterium diphtheriae* berdasarkan morfologi koloni

Biotipe	Morfologi Koloni
gravis	Kering, abu-abu kusam, opak, diameter 1,5-2 mm, rapuh, mudah pecah menjadi serpihan kecil bila distreake, biasanya nonhemolitik.
mitis	Abu-abu, opak, diameter 1,5-2 mm, ukuran bervariasi, menghambat zona hemolitik agar darah.
intermedius	Kecil-kecil, abu-abu, diameter 0,5-1 mm.

2.4.4. Tes Toksigenisitas

Tes toksigenisitas penting untuk diagnostik difteri secara mikrobiologik. Tes toksigenisitas secara *in-vivo* menggunakan binatang guinea pig merupakan *gold standard*. Tapi, resiko kecelakaan dan lamanya mendapatkan hasil membuat tes ini kurang disukai. Belum lagi adanya pihak-pihak tertentu yang menolak/memprotes digunakannya binatang untuk kegiatan penelitian. Sebagai alternatif adalah pemeriksaan secara *in-vitro* menggunakan *Vero cell* yang didasarkan pada sitotoksitas *Vero cell* teradap toksin difteri. Pemeriksaan lain untuk tes toksigenisitas adalah Elek test menggunakan prinsip imunodifusi yang dipublikasikan oleh Elek tahun 1949. Pemeriksaan ini memiliki keterbatasan karena memerlukan keahlian khusus dan membutuhkan waktu hingga 48 jam. Engler, dkk telah mengembangkan modifikasi Elek test yang dipublikasikan tahun 1997. Modifikasi ini dapat menyingkat waktu pemeriksaan sehingga hasil terbaca dalam 16-24 jam. Metode *in-vitro* lain yang digunakan antara lain PCR, enzyme immunoassay (EIA) dan immunochromatographic strip (ICS).^{12,39,63,64}

Diantara semua metode yang ada, PCR banyak dipilih karena cepat, simpel dan mudah diinterpretasi. Meskipun demikian PCR mempunyai beberapa keterbatasan diantaranya bahwa tidak semua bakteri yang memiliki gen *tox* akan menghasilkan toksin. Begitu juga dengan *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis* tidak terdeteksi dengan PCR untuk difteri. Dalam hal ini *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis* yang diisolasi dari pasien suspek difteri harus diperiksa toksigenisitasnya.^{16,19,65}

2.4.5. Tes Suseptibilitas

Belum ada petunjuk khusus untuk melakukan tes kepekaan terhadap antibiotik untuk *Corynebacteria* potensial toksigenik. Tidak ada ketentuan medium pertumbuhan apa yang seharusnya digunakan untuk teknik agar dilusi. Kriteria interpretasi seperti yang direkomendasikan untuk spesies Gram positif seperti *Streptococcus* dan *Staphylococcus*. Biasanya mereka peka terhadap golongan penicillin dan macrolide. Tapi perkembangan terkini menunjukkan adanya peningkatan resistensi terhadap 2 jenis obat tersebut.^{22,36}

2.4.6. Tes Serologi

Tes serologi dilakukan dengan beberapa alasan, diantaranya membantu diagnosis klinis, pengukuran imunitas individu atau populasi dan investigasi respon imun pada individu tertentu. Pengukuran antibodi serum terhadap toksin difteri pada suspek kasus sebelum pemberian antitoksin mungkin akan membantu menegakkan diagnosis khususnya bila hasil kultur negatif. Jika kadar antibodi rendah, tidak bisa mengeliminasi diagnosis dan jika kadar antibodi tinggi seharusnya serangan difteri tidak akan menjadi infeksi sistemik.^{12,22,66}

Beberapa teknik untuk memeriksa kadar antibodi diantaranya *in-vivo toxin neutralisation test* sebagai *gold standard*. Tes alternatif menggunakan kultur sel. Sementara itu ELISA dan *passive haemagglutination test* memiliki kelebihan karena cepat dan mudah dilakukan, tapi kurang reliabel. Kedua test tersebut kurang sensitif dalam mendeteksi kadar antibodi < 0,1 IU/mL sehingga memberikan hasil negatif palsu. Hasil positif palsu juga mungkin terjadi bila terjadi ikatan *non-neutralization antibody*. ELISA biasanya digunakan untuk *preliminary screening* yang akan dites ulang dengan kultur atau *in-vivo neutralization* jika titer antibodi < 0,1 IU/mL. Selain itu ada juga laporan bahwa ELISA tidak reliabel meskipun kadar antibodi > 0,1 IU/mL.^{12,22}

2.4.7. Pemeriksaan Khusus: *Molecular Typing*

Keterbatasan metode fonotipik mempengaruhi pengembangan *molecular typing C.diphtheriae*. Tahun 1983 Pappenheimer and Murphy menunjukkan potensi *molecular typing C.diphtheriae* dengan RFLP dengan perbedaan Probe untuk membedakan area gen toksin. Pada 1987 Rappouli menggunakan insersi eleven *C.diphtheriae* sebagai Probe untuk mengkarakterisasi strain Swedia dari outbreak pada alkoholik. Tahun 1989 Coyle, dkk melakukan studi *molecular epidemiology* terhadap 3 biotipe *C.diphtheiae* dengan RFLP.^{10,12,22}

Selain RFLP, beberapa metode yang telah dikembangkan untuk *Molecular Typing* diantaranya ribotyping, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), PCR typing, single stranded confirmational polymorphisms (SSCP) dan amplified fragment length polymorphisms (AFLP). Diantara berbagai metode tersebut ribotyping telah diterima sebagai gold standard. "DipIdent" database tentang pola *molecular typing C.diphtheriae* telah disepakati diantara anggota *European Laboratory Working Group on Diphtheria* (ELWGD) untuk investigasi epidemiologi molekuler. Central database berada di Institute Pasteur Paris dan Sub-database berada di UK. Database berisi hasil pemeriksaan dari sedikitnya 600 isolat *C.diphtheriae* dari seluruh dunia. Database ini memungkinkan untuk digunakan dalam identifikasi heterogenitas dan homogenitas *C.diphtheriae* dari seluruh dunia.^{22,67,68,69}

2.5. Multiplex PCR

Multiplex PCR adalah varian PCR yang secara simultan mengamplifikasi 2 atau lebih lokus dalam satu reaksi. Multiplex PCR merupakan modifikasi PCR untuk mendeteksi delesi atau duplikasi pada *large gene* secara cepat. Hal ini dilakukan dengan cara mengamplifikasi sampel DNA menggunakan multipel primer dan sebuah *temperature-mediated DNA polymerase* pada sebuah *thermal cycler*. Multiplex PCR mengandung multipel primer yang diset dalam sebuah *single PCR mixture* untuk menghasilkan ampikon yang bervariasi ukurannya dan spesifik untuk sekuense DNA yang berbeda. Karena mempunyai target multipel gen dengan sekali reaksi, informasi tambahan mungkin bisa didapatkan dari single test yang akan membutuhkan beberapa reagen dan tambahan waktu. *Annealing temperature* untuk masing-masing primer juga harus dioptimasi dengan *single reaction* agar dapat bekerja dengan baik. Selain itu

perbedaan ukuran ampikon harus cukup untuk divisualisasi dengan *gel electrophoresis*.^{70,71,72}

Multiplex PCR telah digunakan untuk mendeteksi virus, bakteri serta agen penyebab penyakit infeksi lain dengan sekali reaksi sehingga dapat menghemat biaya. Pada awalnya multiplex PCR mempunyai banyak hambatan yang dapat mempengaruhi sensitifitas dan spesifitas pemeriksaan, tapi saat ini telah dikembangkan protokol sistematis dan teknik yang simpel untuk mengatasinya. Pada umumnya dilakukan dengan pemilihan primer dan penggunaan *hot start-based PCR*.^{70,71,72}

Saat ini ada beberapa alternatif metode multiplex PCR. Metode multiplex yang paling tua adalah dengan menggunakan beberapa primer untuk target yang berbeda yang menghasilkan beberapa ampikon yang dapat dibedakan dengan *gel electrophoresis*. Metode ini dapat menggunakan single PCR atau nested PCR agar lebih sensitive. Keuntungannya adalah metode ini kurang peka pada variasi sekuense dibandingkan menggunakan real time PCR, namun demikian tetap lebih membutuhkan usaha intensif dan mengandalkan interpretasi subjektif pada hasil *gel electrophoresis*. Teknologi yang terbaru adalah PCR dengan menggunakan *capillary electrophoresis*.^{70,71,72}

Teknologi Real Time saat ini juga dapat digunakan untuk hal-hal yang umum dan dapat dimanfaatkan pula untuk multiplex PCR dengan menggunakan probe yang telah di label dengan fluorophore yang dapat di deteksi pada panjang gelombang yang berbeda. Namun walaupun Thermocycler pada real time PCR dapat mendeteksi 6 (enam) pilihan panjang gelombang yang berbeda, kebanyakan teknisi kesulitan untuk merancang multiplex yang memuaskan jika menggunakan lebih dari 3 jenis label probe yang berbeda pada pemeriksaan. Tentu saja masih memungkinkan menggunakan multiplex assay dengan primer yang banyak melebihi triplex Real Time PCR. Tapi, hal ini dapat menyebabkan munculnya resiko kontaminasi silang pada laboratorium, salah satu bahaya pada nested PCR. Hal ini dapat dikurangi dengan membatasi siklus proses awal PCR pada multiplex menjadi 10-20 siklus, prinsip ini digunakan oleh Stanley dan Swezuk pada prosedur tandem assay mereka.^{70,71,72}

Teknologi Luminex beads mampu mendeteksi 100 target dalam sekali pemeriksaan namun secara praktek sebaiknya dipertimbangkan menggunakan 30 target. Metode ini menggunakan generic PCR dengan beberapa primer yang di label dengan

biotin. Produk multipleks dihibridisasi dengan beads Luminex yang membawa probe yang spesifik terhadap multiple target. Bead tersebut dapat mengidentifikasi karakteristik (uniquilly) sampai 100 jenis tipe beads yang masing-masing terdiri dari jumlah dan bahan fluorescence yang berbeda kemudian diidentifikasi oleh Luminex. Avidin yang di label sebagai fluorescence digunakan kemudian dibilas untuk menghilangkan bahan fluorescens tersebut sebelum beads diproses dalam flow cytometer.^{70,71,72}

Pendekatan multiplex yang terbaru dan masih asing (novel) disarankan menggunakan Mass taq PCR. Target dalam jumlah banyak dapat di deteksi dengan teknologi microarray DNA tapi sensitifitasnya terbatas tergantung pada material target yang digunakan jika dibandingkan dengn PCR biasa. Teknologi array cukup mahal namun sangat berguna untuk mendeteksi factor virulensi dan gene yang berperan pada resistensi antibiotic pada kultur bakteri dengan kuantitas target yang tidak terbatas dan gen ini dapat diidentifikasi dengan sequencing.^{70,71,72}

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan

2.1.1. Tujuan Umum

Menghasilkan metode diagnostik difteri yang lebih efektif, efisien dan akurat melalui identifikasi *Corynebacterium* potensial toksigenik dengan PCR Multipleks.

2.1.2. Tujuan Khusus

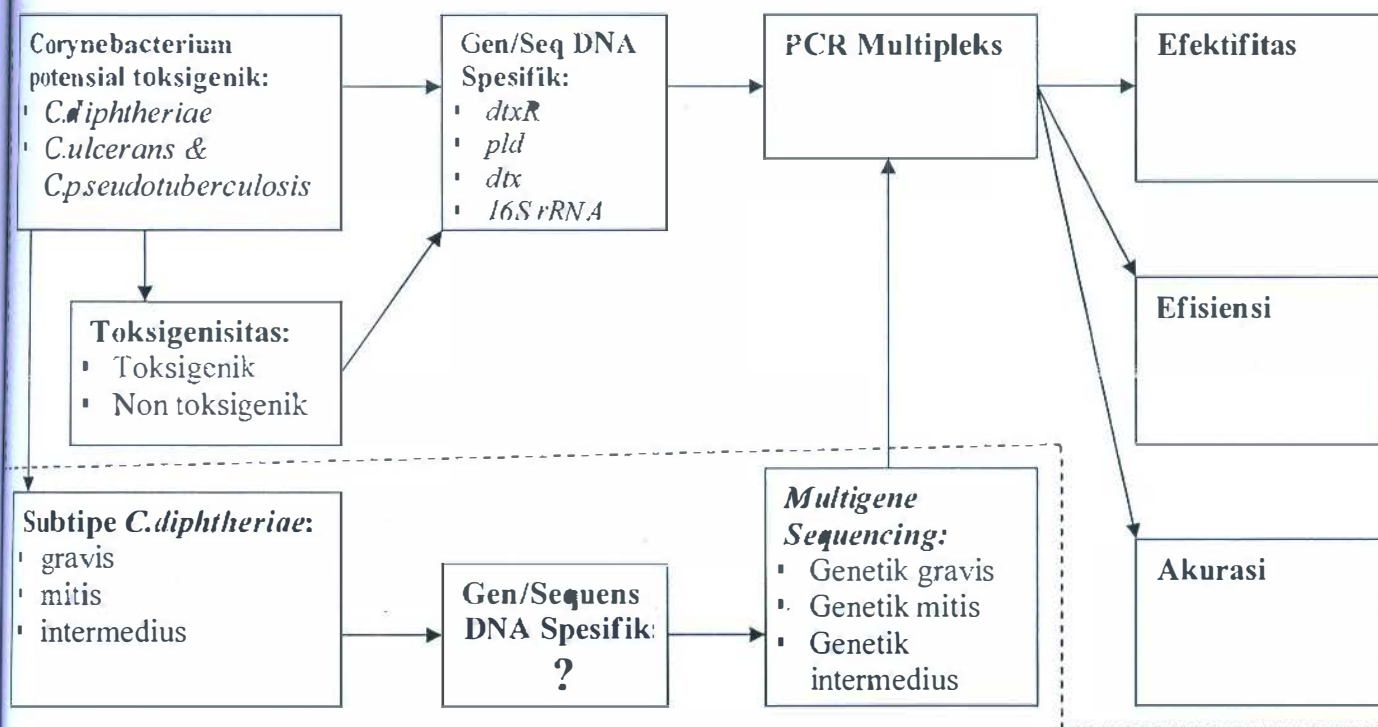
- Mendapatkan disain primer yang cocok untuk pemeriksaan difteri dengan PCR Multipleks.
- Mendapatkan teknik PCR Multipleks yang optimal untuk identifikasi *Corynebacterium* potensial toksigenik.
- Menentukan efektifitas, efisiensi dan akurasi PCR Multipleks yang dikembangkan dibandingkan dengan metode konvensional.

2.2. Manfaat

Hasil penelitian bermanfaat secara klinis untuk membantu menegakkan diagnosis difteri dengan lengkap, cepat dan akurat sehingga penderita bisa segera mendapatkan penatalaksanaan yang tepat dan pada akhirnya dapat menurunkan penyebaran penyakit dan angka kematian akibat difteri, secara keilmuan untuk memperkaya literatur khususnya tentang difteri dan sebagai studi pendahuluan untuk penelitian lanjutan.

BAB IV METODE PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep



: Lingkup Penelitian

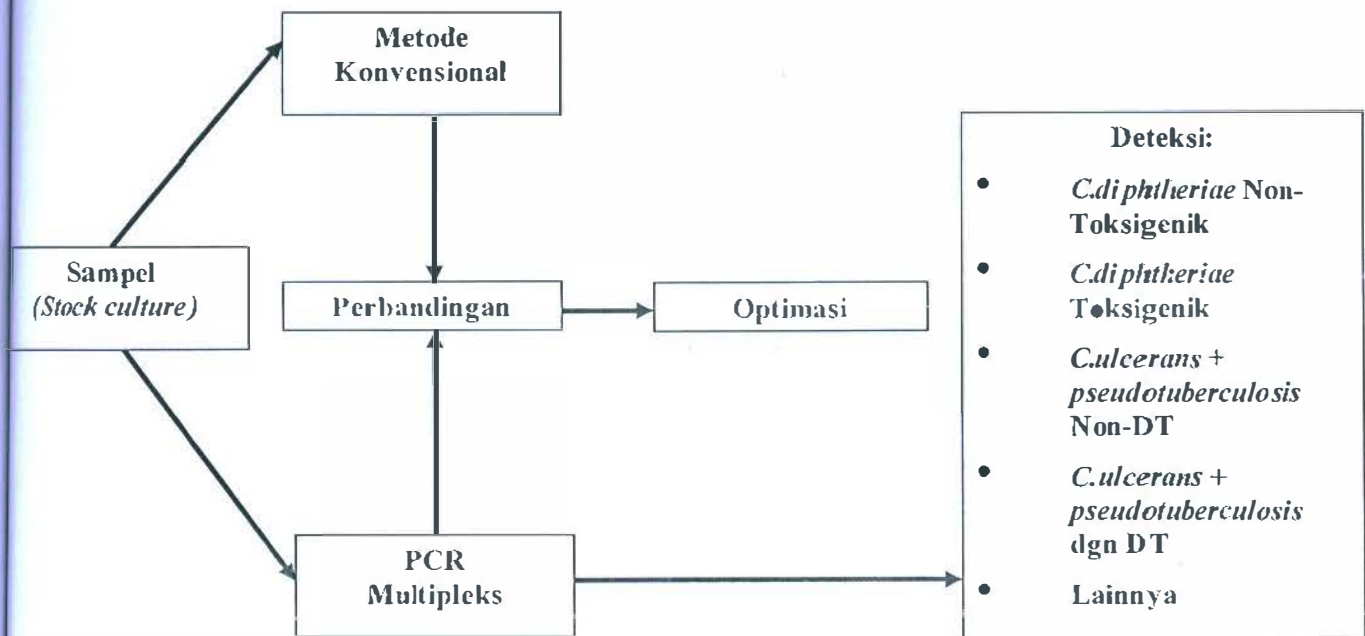
3.2. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Biologi Molekuler Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2011.

3.3. Jenis dan Disain Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimen laboratorium dengan disain/rancangan penelitian sebagai berikut:

Disain penelitian tahap:



3.4. Populasi dan Sampel

Populasi target adalah seluruh spesimen atau isolate yang positif atau dicurigai positif mengandung *C.diphtheriae* dan bakteri lain yang dapat menyebabkan reaksi silang dengan *C.diphtheriae*. Sampel penelitian tahap I adalah strain *C.diphtheriae* (ATCC 9059, ATCC 8032, ATCC 8024 dan ATCC 11913), strain *C.Pseudotuberculosis* (ATCC 19410), *C.ulcerans* (ATCC 9015), strain *S.epidermidis* (ATCC 12228), strain *S.aureus* (ATCC 25923) dan isolate *C.diphtheriae* yang telah diisolasi dari spesimen hasil investigasi KLB difteri di Indonesia. Jumlah sampel minimal 30 untuk mendapatkan asumsi data dengan distribusi normal.

3.5. Variabel

Variabel independen dalam penelitian ini adalah Metode pemeriksaan. Sedangkan variabel dependennya adalah efektifitas, efisiensi dan akurasi.

3.6. Definisi Operasional

No	Variabel	Pengertian	Skala	Nilai
1	Metode pemeriksaan	Pemeriksaan laboratorium untuk membantu diagnosis difteri	Nominal	1. Metode konvensional 2. PCR Multipleks
2	Efektifitas	Penilaian berdasarkan waktu	Nominal	1. lebih cepat 2. sama 3. lebih lambat
3	Efisiensi	Penilaian berdasarkan biaya	Nominal	1. lebih mahal 2. sama 3. lebih murah
4	Akurasi	Sensitifitas, Spesifitas, <i>Positive & Negative Predictive Value</i>	Nominal	1. akurat 2. tidak akurat

3.7. Instrumen dan Cara Pengambilan Data

Instrumen penelitian berupa jaringan internet, kit untuk pemeriksaan PCR Multipleks, kit untuk pemeriksaan difteri dengan metode konvensional serta form isian untuk mencatat hasil pemeriksaan. Disain primer didapatkan dengan memanfaatkan jaringan internet (bioinformatika). Hasil pemeriksaan PCR Multipleks berupa penampakan *bands* pada titik tertentu sesuai dengan primer yang digunakan untuk menentukan jenis bakteri. Interpretasi hasil mengikuti ketentuan sebagai berikut:

Jenis Bakteri	<i>Dtx</i>	<i>dtxR</i>	<i>Ptd/16SrRNA</i>
<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	+	+	-
<i>C.diphtheriae</i> nontoksigenik	-	+	-
<i>C. ucerans</i> & <i>C. pseudotuberculosis</i> Non DT	-	-	+
<i>C. ucerans</i> & <i>C. pseudotuberculosis</i> dengan DT	+	-	+
Bukan Corynebacterium potensial toksigenik	-	-	-

Hasil pemeriksaan dengan metode konvensional berupa penentuan jenis bakteri berdasarkan kriteria seperti yang tampak pada Tabel 1 dan 2 serta toksigenisitas bakteri dengan Elek Test, dikatakan positif bila tampak garis presipitasi dan negatif bila tak tampak garis presipitasi. Optimasi dilakukan dengan memodifikasi dan mengulang pemeriksaan sampai mendapatkan hasil optimal seperti yang dikehendaki.

3.8. Prosedur Kerja

3.8.1. Kultur dan Mikroskopik

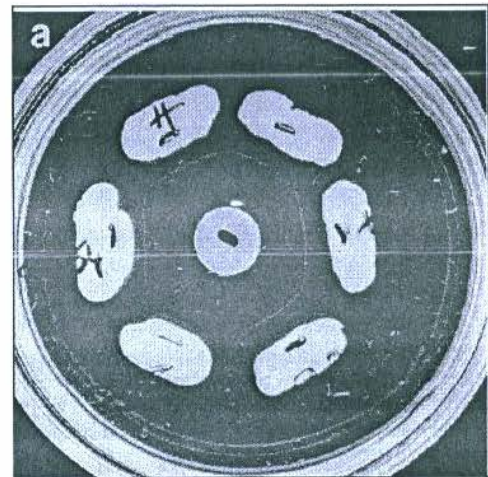
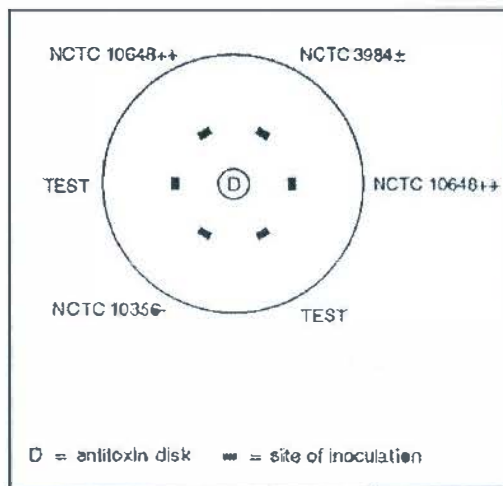
- Gunakan swab dari pasien, streak ke dalam blood agar, blood tellurite agar dan inokulasi pada Loeffler serum.
- Inkubasi pada suhu 35 °C
- Setelah 4-6 jam, siapkan smear dari Loeffler serum dan warnai dengan pewarnaan Gram dan Albert.
- Jika terlihat bakteri yang mengindikasikan *C. diphtheriae*, lakukan subkultur pada blood tellurite agar.
- Periksa dalam 24-48 jam; bila ditemukan koloni kehitaman, warnai lagi dengan pewarnaan Gram dan Albert.
- Periksa dengan mikroskop.

3.8.2. Reaksi Biokimia (API Coryne Kit)

- Persiapan Inokulasi: Inkubasi *pure culture* dari organisme tunggal dalam sheep BAP x3 selama 24 jam pada suhu 35°C dengan kadar CO₂ 5%. Gunakan swab steril, ambil culture dari BAP dan inokulasi dalam 3 ml saline steril untuk memberikan turbiditas minimal McFarland.
- Persiapan strip: *incubation tray* disiapkan untuk masing-masing strip. Masukkan 5 ml air ke dalam sumuran *tray*.
- Inokulasi strip: inokulasi test 1-11 dari strip (NIT sampai GEL)
- Tambahkan 3 tetes ke dalam masing-masing *cupule* untuk test NIT sampai ES.
- Untuk URE test, isi *tube* saja.
- Untuk GEL test, isi keduanya (*tube* dan *cupule*).
- Untuk 9 test yang terakhir (O sampai GLYG) pindahkan 0,5 ml suspensi bakteri ke dalam ampul GP medium kemudian campur dengan baik. Distribusikan suspensi baru ke dalam *tube* saja dari O sampai GLYG.
- Tutup *cupule* URE dan O sampai GLYG dengan mineral oil.
- Tutup dengan *incubation lid* dan inkubasi strip selama 24 jam pada suhu 35 °C (non CO₂).
- Baca hasil reaksi dengan membandingkan perubahan warna terhadap index.

3.8.3. Tes Toksigenisitas (Modified Elek test)

- Tambahkan newborn bovine serum (NBS) ke dalam 2,5 ml molten Elek base pada suhu 45 °C dan tuangkan ke dalam plate dengan diameter 4,5 cm.
- Inokulasi strain yang akan dites ke dalam plate dan 3 strain control dan antitoxin disk (10 IU/disk) seperti yang ditunjukkan pada gambar.
- Inkubasi plate selama 48 jam pada suhu 37 °C dan amati garis presipitasi pada 16, 24 dan 48 jam oleh 2 individu seperti yang ditunjukkan pada gambar.



3.8.4. Multiplex PCR

a. Disain Primer

Lakukan pemilihan primer sequence. Primer PCR didisain untuk 3 gen target untuk kepentingan multiplex PCR sehingga memenuhi beberapa persyaratan, yaitu: GC 30-60%, 20 bp atau lebih, *gel-sparable amplification*.

b. Single locus PCR

- Siapkan template DNA yang diekstraksi dari sampel.
- Amplifikasi semua lokus sendiri-sendiri (dengan kondisi yang sama).
- Ambil 1x PCR buffer tanpa adjuvan.
- Stel kondisi *cycling*.

c. Multiplex PCR: *primer mix*

- 0,1-0,4 μ M masing-masing primer.

- Lakukan seperti poin (b).
- d. Optimasi kondisi *multiplex PCR cycling*, meliputi:
 - Temperatur extension
 - Waktu extension
 - Temperatur dan waktu annealing
 - Jumlah PCR cycle
- e. Optimasi komponen reaksi Multiplex, meliputi:
 - Jumlah primer
 - Konsentrasi dNTP dan MgCl₂.
 - Konsentrasi PCR buffer.
 - Jumlah template DNA dan Taq DNA Polymerase.
 - Penggunaan adjuvant (DMSO, glycerol, BSA).
- f. Lakukan Elektroforesis terhadap Produk PCR yang dihasilkan
- g. Baca hasil Elektroforesis dengan gel doc.

Lakukan analisis terhadap bands yang

3.9. Manajemen dan Analisis Data

Data yang terkumpul dilakukan *editing*, *coding* dan *entry*. Setelah dilakukan *cleaning*, data dianalisis secara statistik dan secara manual. Analisis deskriptif menampilkan gambaran hasil pemeriksaan spesimen yang dibuat dalam bentuk gambar, tabel dan grafik. Efektifitas, efisiensi dan akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pemeriksaan metode konvensional dan metode PCR Multipleks dikembangkan.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Gambaran Sampel

Gambaran sampel yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Sampel Penelitian

No	Nama Bakteri/Organisme	Jumlah
1	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	22
2	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1
3	<i>Corynebacterium striatum</i>	1
4	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	1
5	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
6	<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i>	1
7	<i>Neisseria meningitidis</i>	1
8	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
12	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
13	<i>Legionella pneumophilla</i>	1
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
15	<i>Enterobacteria sakazakii</i>	1
16	<i>Clostridium tetany</i>	1
17	<i>Salmonella typhimurium</i>	1
18	<i>Salmonella typhi</i>	1
19	<i>Shigella flexneri</i>	1
20	<i>Aeromonas hydrophilla</i>	1
21	<i>Vibrio cholerae</i>	1
22	<i>Eschericia coli</i>	1
23	<i>Candida albican</i>	1
Total		44

Jumlah keseluruhan sampel sebanyak 44 isolat, yang terdiri dari 23 isolat *Corynebacterium* potensial toksigenik (19 *Corynebacterium diphtheriae* dan 1 *Corynebacterium ulcerans*), 4 isolat *Corynebacterium* spesies non toksigenik dan 17 isolat non-*Corynebacterium*.

Sampel target adalah *Corynebacterium* potensial toksigenik (*C.diphtheriae* dan *C.ulcerans*), baik toksigenik maupun non toksigenik. Beberapa *Corynebacterium* spesies non toksigenik diambil untuk menentukan spesifitas primer yang digunakan karena secara filogenetik mempunyai kekerabatan yang paling dekat dengan *C.diphtheriae* dan *C.ulcerans*. *Mycobacterium tuberculosis* dipakai sebagai sampel karena bakteri tersebut mempunyai gen yang menyerupai *dtxR* pada *C.diphtheriae*. Beberapa jenis bakteri seperti *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Legionella*, *Klebsiella* dan *Candida* digunakan sebagai sampel karena bakteri-bakteri tersebut

seringkali didapatkan pada spesimen usap tenggorok. Bakteri lain digunakan sebagai kontrol negatif karena *C.diphtheriae* selain menyebabkan infeksi saluran nafas juga dapat menginfeksi kulit, urogenetal dan organ lainnya.

5.2. Disain Primer

Pemeriksaan difteri menggunakan PCR Multipleks membutuhkan beberapa pasang primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sequens DNA berdasarkan target yang ingin dicapai. Primer didisain menggunakan Software dan jaringan internet dari strain referensi yang ada di Gene Bank. Sebelum digunakan primer diujicoba secara bioinformatik. Setelah primer dianggap sudah tepat, maka primer dapat dipesan ke pabrik berdasarkan desain yang dibuat. Setelah selesai, primer diuji coba lagi dengan sampel kontrol.

Pada penelitian ini digunakan 3 pasang primer PCR dengan spesifikasi sebagai berikut (sebagian basa tidak ditunjukkan):

Gen: TOX/Dtx [toxic C. diphtheriae]			
Forward primer	AACTATGCGGCGTGGGC...	20	60.00% (Tm 67.61C)
Reverse primer	...GAACGGCACCGTCTGCAA	21	61.90% (Tm 68.52C)
Product length	139		
Gen: DtxR [C. diphtheriae]			
Forward primer	TGCCCCGATATGGAGCGCG...	20	65.00% (Tm 68.00C)
Reverse primer	...CCCAGCGGCAGGCTTCA	20	65.00% (Tm 68.17C)
Product length	182		
Gen: 16S rRNA [C. pseudotuberculosis, C. ulcerans]			
Forward primer	GCGCGGTAGCTCTTAGCGG...	20	70.00% (Tm 68.01C)
Reverse primer	...CGCGCTCCTGACCTGTGC	20	65.00% (Tm 68.99C)
Product length	815		

5.3. Optimasi

Optimasi dilakukan untuk mendapatkan teknik atau metode PCR Multipleks yang paling optimum. Adapun optimasi yang dilakukan meliputi jenis alat/bahan yang dipakai, suhu annealing, dan waktu/lama elongation. Beberapa prosedur mengikuti hasil optimasi yang telah dilakukan dalam penelitian sebelumnya.

Beberapa metode/teknik PCR Multipleks untuk pemeriksaan difteri berdasarkan hasil optimasi meliputi hal-hal berikut ini. Swab yang digunakan untuk mengambil sampel menggunakan dacron swab karena lebih baik dibandingkan catton swab. Sementara prosedur untuk ekstraksi DNA menggunakan QIAamp Blood Kit (sesuai petunjuk

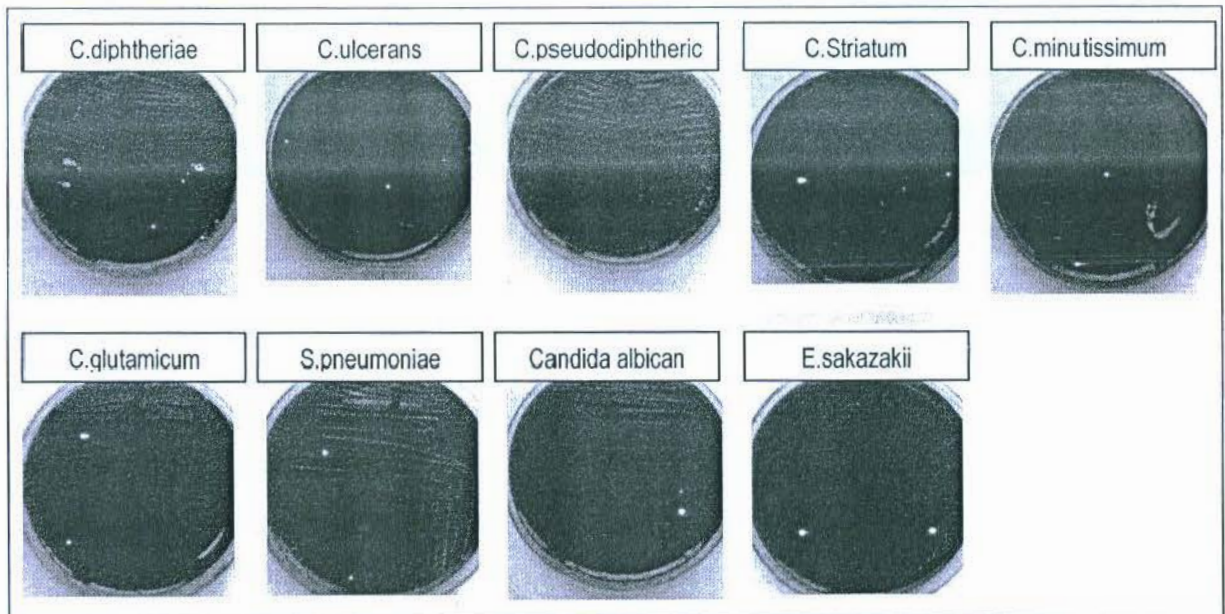
pabrik) dengan terlebih dahulu dipanaskan dalam suhu 96 °C selama 15 menit. Amplifikasi DNA menggunakan *termal cycler* (Bioered) dengan rincian sebagai berikut: denaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit, diikuti 35 *amplification cycles* pada suhu 95°C selama 30 detik, 67°C selama 30 detik, dan 72°C selama 1 menit.

5.4. Hasil Pemeriksaan

Pemeriksaan laboratorium menggunakan teknik PCR Multipleks dan metode konvensional sebagai kontrol.

5.4.1. Metode Konvensional

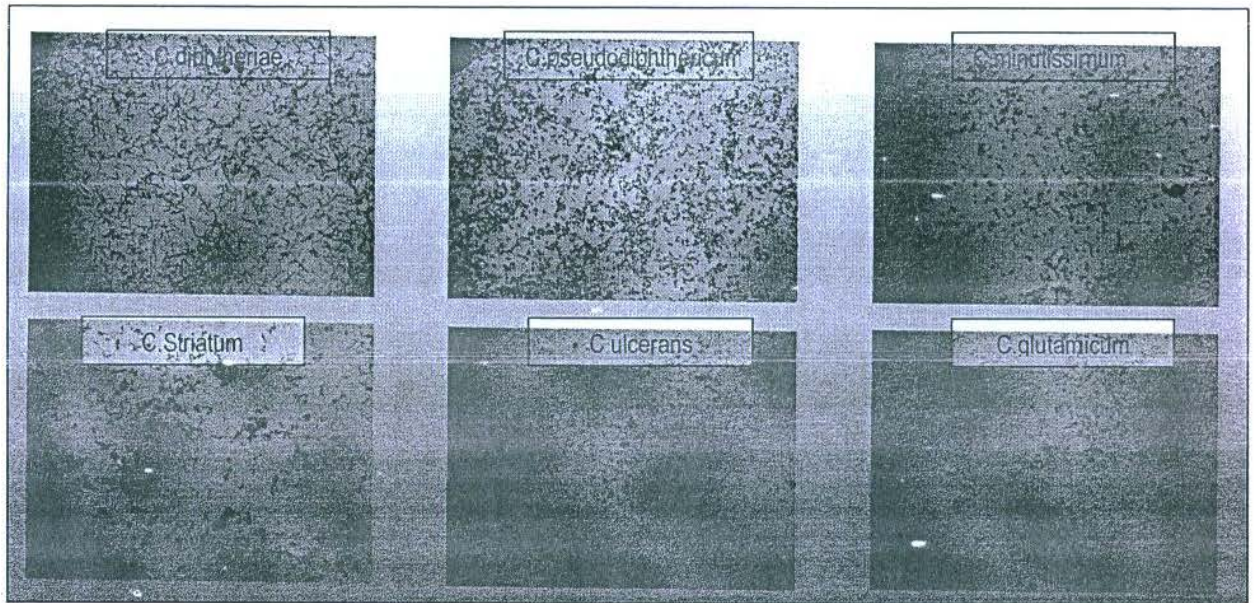
Gambar 3,4,5 dan 6 memperlihatkan hasil pemeriksaan difteri dengan metode konvensional yang meliputi kultur pada medium Cystine Tellurite Blood Agar (CTBA), pemeriksaan mikroskopik, tes biokimia dan test toksigenisitas *Elek test*.



Gambar 3
Morfologi Koloni Bakteri dan Jamur pada Medium CTBA

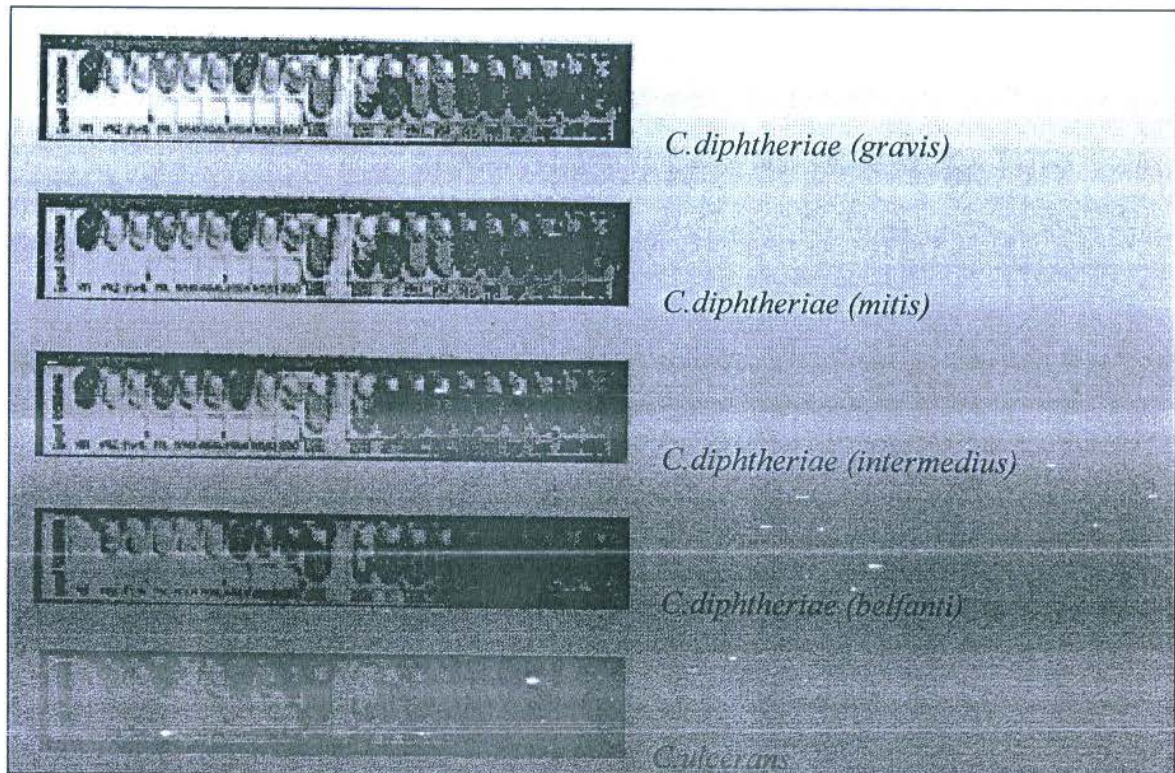
Pada Gambar 3 terlihat bahwa seluruh spesies *Corynebacterium*, baik *Corynebacterium* potensial toksigenik maupun spesies non toksigenik tumbuh pada medium CTBA dengan morfologi koloni yang tidak jauh berbeda. Untuk membedakannya diperlukan tes biokimia. Selain *Corynebacterium*, beberapa

mikroorganisme yang tumbuh pada medium selektif tersebut antara lain *Streptococcus pneumoniae*, *E. sakazakii*, dan *Candida albican*. Mikroorganisme tersebut bisa menjadi faktor yang menyebabkan kesalahan interpretasi hasil pemeriksaan dengan metode konvensional. Sementara itu mikroorganisme lain yang menjadi sampel penelitian tidak tumbuh pada medium tersebut.



Gambar 4
Morfologi sel pada pemeriksaan mikroskopik

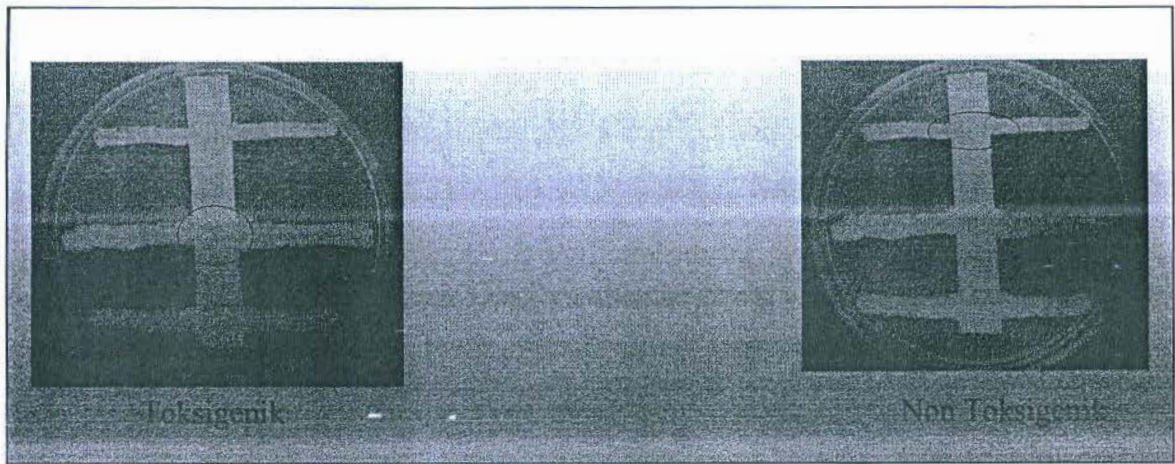
Pada gambar 4 terlihat bahwa seluruh spesies *Corynebacterium* memperlihatkan morfologi sel khas (difteroid), yaitu bentuk batang dengan granula atau pembesaran pada salah satu atau kedua ujung sel. Sementara itu mikroorganisme selain *Corynebacterium* memperlihatkan morfologi sel yang berbeda. Pemeriksaan ini dapat digunakan untuk menyingkirkan sampel yang mengandung bakteri-bakteri non-*Corynebacterium*.



Gambar 5
Reaksi Biokimia Corynebacterium Potensial Toksigenik

Pada gambar 5 terlihat bahwa pada *C. diphtheriae* sub tipe *gravis*, *mitis*, *intermedius* mereduksi nitrat. Ketiganya dibedakan dengan reaksi fermentasi gula-gula. Sementara itu *C. diphtheriae* sub tipe *belfanti* dan *C. ulcerans* tidak mereduksi nitrat. Keduanya dibedakan dengan tes urease, dimana *C. ulcerans* positif urease. Tes biokimia bermanfaat untuk menentukan spesies *Corynebacterium* sehingga dapat menyingkirkan sampel yang mengandung *Corynebacterium* spesies non toksigenik dari sampel yang mengandung *Corynebacterium* potensial toksigenik. Akan tetapi pemeriksaan ini tidak dapat membedakan jenis toksigenik dan non toksigenik sehingga perlu dilakukan tes toksigenisitas seperti yang terlihat pada Gambar 6.

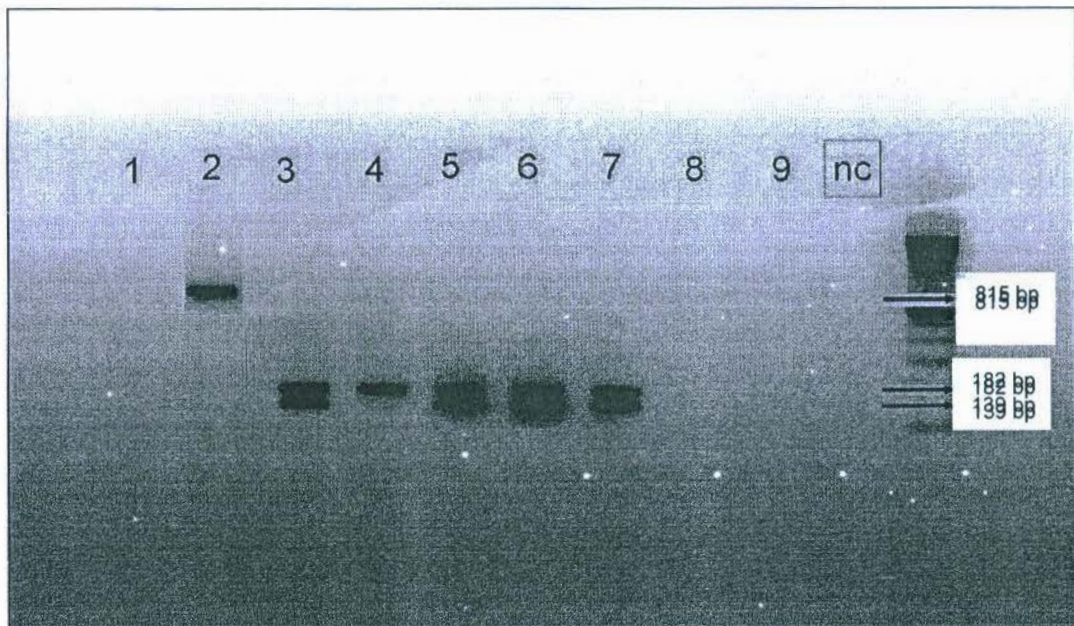
Gambar 6 menunjukkan bahwa pada sampel toksigenik terlihat garis presipitasi yang merupakan ikatan antigen (toksin) dan antibodi (ADS). Sementara pada jenis non toksigenik, garis tidak tampak.



Gambar 6
Tes Toksigenisitas

5.4.2. PCR Multipleks

Hasil pemeriksaan difteri dengan PCR Multipleks dapat dilihat pada gambar 7 berikut ini.



Gambar 7
Hasil Pemeriksaan PCR Multipleks

Pada gambar 7 terlihat bahwa seluruh sekuens DNA *Corynebacterium diphtheriae* toksigenik (sampel nomor 3,5,6 dan 7) yang diperiksa teramplifikasi oleh primer dengan target gen *dtx (tox)* dan *dtxR* sehingga tampak bands pada 139 bp dan 184 bp, tetapi tidak teramplifikasi primer dengan target gen *16S rRNA* sehingga tidak tampak bands pada 815 bp. Pada *Corynebacterium diphtheriae* non toksigenik (sampel nomor 4), hanya band pada 184 bp yang terlihat. Hal ini menandakan bahwa pada *Corynebacterium diphtheriae* non toksigenik tidak terdapat gen *tox*.

Gen *dtx/tox* dibawa oleh bakteriofag yang juga dapat melisogenik *Corynebacterium non-diphtheriae* (*C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis*) sehingga bakteri tersebut memproduksi toksin dan menimbulkan penyakit yang menyerupai difteri. Dalam kondisi demikian maka bakteri tersebut memiliki gen *tox/dtx* tapi tidak memiliki gen *dtxR*. Akan tetapi pada penelitian ini tidak digunakan isolat *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis* toksigenik sehingga tidak ada sampel yang menunjukkan garis hanya pada gen *dtx* (139 bp).^{50,51,52}

Sekuens DNA *Corynebacterium ulcerans* (sampel nomor 2) dapat teramplifikasi primer dengan target gen *16S rRNA* tapi tidak oleh primer dengan target gen *tox* dan *dtxR*. Hal ini menandakan bahwa bakteri tersebut non toksigenik. Sementara pada sampel non-*Corynebacterium* potensial toksigenik, ketiga pasang primer tidak mengamplifikasi sekuens DNA sehingga tidak tampak bands, begitu juga pada bakteri non-*Corynebacterium*.

5.5. Efektifitas, Efisiensi dan Akurasi

Efektifitas, efisiensi dan akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pemeriksaan menggunakan PCR Multipleks dibandingkan dengan metode konvensional. Perbandingan meliputi konsumsi waktu yang dibutuhkan untuk mengukur efektifitas, konsumsi biaya yang dibutuhkan untuk mengukur efisiensi dan kesesuaian hasil untuk mengukur akurasi.

Perbandingan waktu yang diperlukan untuk pemeriksaan difteri cukup jauh. Pemeriksaan menggunakan metode konvensional membutuhkan waktu minimal 48 jam. Sementara itu pemeriksaan dengan PCR Multipleks hanya membutuhkan waktu 5-8 jam. Sementara itu perbandingan biaya yang dibutuhkan untuk kedua jenis pemeriksaan dapat dilihat dalam Tabel berikut.

Tabel 5. Perbandingan Konsumsi Biaya antara PCR Multipleks dan Metode Konvensional

PCR Multipleks		Metode Konvensional	
Bahan:	Harga	Bahan	Harga
- Kultur	20.000	- Primer PCR	10.000
- Mikroskopik	10.000	- Ekstraksi	100.000
- Biokimia	200.000	- PCR	100.000
- Elek test	50.000	- Elektroforesis	40.000
Total	280.000	Total	250.000

Catatan: Peralatan untuk masing-masing pemeriksaan telah tersedia

Pada Tabel 5 terlihat bahwa konsumsi biaya yang dibutuhkan untuk pemeriksaan PCR Multipleks dan metode konvensional tidak jauh berbeda dan cenderung lebih mahal untuk pemeriksaan dengan metode konvensional.

Sementara itu kesesuaian hasil PCR Multipleks dengan metode konvensional sebagai kontrol dapat dilihat pada tabel 4 berikut ini.

Tabel 4. Perbandingan hasil pemeriksaan difteri dengan PCR Multipleks dengan Metode Konvensional

No Urut	PCR Multipleks	Gold Standard	Keterangan
1	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
2	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
3	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
4	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
5	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
6	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
7	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
8	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
9	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
10	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
11	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
12	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
13	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
14	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
15	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
16	C.diphtheriae non toksigenik	C.diphtheriae non toksigenik	Sesuai
17	C.ulcerans non toksigenik	C.ulcerans non toksigenik	Sesuai
18	NCPT	<i>C.striatum</i>	Sesuai
19	NCPT	<i>C.minutissimum</i>	Sesuai
20	NCPT	<i>C.glutamicum</i>	Sesuai
21	NCPT	<i>C.pseudodiphthericum</i>	Sesuai
22	NCPT	<i>Neisseria meningitidis</i>	Sesuai
23	NCPT	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sesuai
24	NCPT	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sesuai
25	NCPT	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sesuai
26	NCPT	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sesuai
27	NCPT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Sesuai
28	NCPT	<i>Legionella pneumophillia</i>	Sesuai
29	NCPT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sesuai
30	NCPT	<i>Enterobacteria sakazakii</i>	Sesuai
31	NCPT	<i>Clostridium tetany</i>	Sesuai
32	NCPT	<i>Salmonella typhimurium</i>	Sesuai
33	NCPT	<i>Salmonella typhi</i>	Sesuai
34	NCPT	<i>Shigella flexneri</i>	Sesuai

35	NCPT	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	Sesuai
36	NCPT	<i>Vibrio cholerae</i>	Sesuai
37	NCPT	<i>Escherichia coli</i>	Sesuai
38	NCPT	<i>Candida albican</i>	Sesuai
39	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
40	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
41	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
42	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
43	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai
44	C.diphtheriae toksigenik	C.diphtheriae toksigenik	Sesuai

Ket:

NCPT: non-Corynebacterium potensial toksigenik.

Dari tabel di atas terlihat bahwa kesesuaian pemeriksaan difteri dengan PCR multipleks dan metode konvensional (gold standard) dalam penelitian ini mencapai 100%. Meskipun ada penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa tidak semua *C.diphtheriae* yang mempunyai gen *tox* akan mengeluarkan toksin (toksigenik), namun jumlahnya relatif sedikit.¹⁶ Pada penelitian ini hal tersebut tidak terjadi seperti juga hasil penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Nakao, et al. dan Mikhailnikovich, et al.^{15,73}

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

4.1. Kesimpulan

PCR Multipleks merupakan salah satu metode yang dapat dikembangkan untuk mendeteksi sekaligus mengidentifikasi bakteri penyebab difteri sehingga bisa dipakai sebagai alat bantu diagnosis secara cepat dan akurat serta cukup efisien.

4.2. Saran

Perlu dilakukan uji coba pemeriksaan difteri dengan PCR Multipleks terhadap spesimen klinis untuk mengetahui apakah pemeriksaan ini dapat diaplikasikan di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada semua pihak yang terlibat dalam program Risbin Iptekdok 2011 sebagai penyandang dana penelitian, khususnya Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada seluruh Panel Pakar Risbin Iptekdok khususnya Panel Penyakit Menular beserta Panitia/Sekretariat Risbin Iptekdok 2011. Tak lupa juga kami sampaikan ucapan terima kasih kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti program Risbin Iptekdok 2011.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ditjen PP&PL Kemenkes RI. Gambaran KLB Difteri Th 2000-2010 di Jawa Timur. 2010.
2. Kartno B, Purwana R, Djaja IM. Hubungan Lingkungan Rumah dengan Kejadian Luar Biasa (KLB) Difteri di Kabupaten Tasikmalaya (2005-2006) dan Garut Januari 2007, Jawa Barat. Makara Kesehatan. 2008; 12: 8 – 12.
3. Gentina, Fionaliza, Nelisna M, Zulkifli, Aryentina R. Laporan Hasil Penyelidikan Epidmiologi Kasus Difteri Klinis di Komplek Pondok Ranah Minang Lubuk Kilangan. Dinkes Kota Padang. 18 April 2008.
4. Acang N. Difteri. Dalam: Noer HMS, editor. Ilmu Penyakit Dalam Jilid 1 Ed. ke-3. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 1996.
5. Vetrichevvel TP, Pise GA, Agrawal KK, Thappa DM. Cutaneous diphtheria masquerading as a sexually transmitted disease. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2008;74:187.
6. de Benoist AC, White JM, Efstratiou A, Kelly C, Mann G, Nazareth B, Irish C, et.al. Imported Cutaneous Diphtheria, United Kingdom. EID. 2004;10(3):511-513.
7. Tiwari TSP. The Pre-Travel Consultation Routine Vaccine-Preventable Diseases: Diphtheria. In: CDC. Travelers' Health – Yellow Book. 2010.
8. Guilfoile PG. Deadly diseases and epidemics: diphtheria. New York: Chelsea House Publishers;2009.
9. Bitragunta S, Murhekar MV, Hutin YJ, Penumur PP and Gupte MD. Persistence of diphtheria, Hyderabad, India, 2003-2006. Emerging Infectiuous Diseases. 2008;14(7):1144-1146.
10. Titov L, Kolodkina V, Dronina A, Grimont F, Grimont PAD, Lejay-Collin M, Zoysa A, et.al. Genotypic and Phentopic characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* strainisolated from patients in Belarus during an epidemic period. JCM.2003;41(3):1285-1288.
11. Efstratiou A, George RC. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. Commun Dis Public Health. 1999; 2: 250-7.
12. Efstratiou A, Engler KH, Mazurova IK, Glushkevich T, Vuopio-Varkila J, and Popovic T. Current Approaches to the Laboratory Diagnosis of Diphtheria. JID. 2000;181(Suppl 1):S138-45.
13. Lumio J. Studies on the Epidemiology and Clinical Characteristics of Diphtheria during the Russian Epidemic of the 1990s (dissertation). Finlandia: University of Tampere; 2003.
14. Arfijanto MV, Masithah SI, Widiyanti P, Bramantono. Case Report: A Patien with Suspected Diphtheria. Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease. 2010;1(2):69-75.
15. Nakao H & Popovic T. Development of a Direct PCR Assay for Detection of the Diphtheria Toxin Gene. J Clin Microbiol. 1997;35(7):1651-1655
16. Efstratiou A, Engler KH, Dawes CS, and Sesardic D. Comparison of Phenotypic and Genotypic Methods for Dctection of Diphtheria Toxin among Isolates of Pathogenic *Corynebacteria*. J.Clin.Microbiol. 1998;36(11):3173-3177.

17. Zasada AA, Zaleska M, Podlasin RB and Seferyńska I. The first case of septicemia due to nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Poland: case report. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2005, 4:8
18. Reacher M, Ramsay M, White J, Zoysa AD, Efstratiou A, Mann G, Mackay A, et al. Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* : An emerging pathogen in England and Wales. *Emerging Infectious Diseases*. 2000;6(6):640-644.
19. Pimenta FP, Hirata R, Rosa ACP, Milagres LG and Mattos-Guaraldi AL. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxicogenic and toxicogenic isolates. *JMM*.2008;1438-1439.
20. Pacheco LGC, Pena RR, Castro TLP, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, Frota MNL, et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure culture and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *JMM*.2007;56:480-486.
21. Seto Y, Komiya T, Iwaki M, Kohda T, Mukamoto M, Takahashi M and Kozaki S. Properties of Coryneophage Attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis*. 2008;61:116-122.
22. De Zoysa A & Efstratiou A. *Corynebacterium spp*. In: Gillespie SH & Hawkey PM. Editor. *Principles and Practice of Clinical bacteriology* 2nd ed. 2006. USA:John Wiley & Son, Ltd.
23. Bolt F, Cassiday P, Tondella ML, De Zoysa A, Efstratiou A, Sing A, Zasada A, et al. Multilocus Sequence Typing Identifies Evidence for Recombination and Two Distinct Lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. *J.Clin.Microbiol*. 2010;48(11):4177-4185.
24. Johnson VG, Nichols PJ, Habig WH, and Youle RJ. The Role of Proline 345 in Diphtheria Toxin Translocation. *JBC*.1993;268(5):3514-3519.
25. Hall AJ, Cassiday PK, Bernard KA, Bolt F, Steigerwalt AG, Bixler D, Pawloski LC, et al. Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(4):688-691.
26. McCluney NA, McKerrow WS. Should We Concerned about diphtheria in the UK. *Surg JR Coll Surg Edinb Irel*. 2004;2(4):234-235.
27. Galazkaa A. The Changing Epidemiology of Diphtheria in the Vaccine Era. *The Journal of Infectious Diseases* 2000;181(Suppl 1):S2-9
28. Markina SS, Maksimova NM, Vitek CR, Bogatyreva EY, and Monisov AA. Diphtheria in the Russian Federation in the 1990s. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181(Suppl 1):S27-34.
29. Golaz A, Hardy IR, Strebel P, Bisgard KM, Vitek C, Popovic T, and Wharton M. Epidemic Diphtheria in the Newly Independent States of the Former Soviet Union: Implications for Diphtheria Control in the United States. *The Journal of Infectious Diseases* 2000;181(Suppl 1):S237-43.
30. Sabbadini PS, Genovez MRN, da Silva CF, Adelino TLN, dos Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, et al. Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2010; 105(5): 706-711.
31. Holmes KR. Diphtheria. In: Fauci AS, et al. Editor. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 17th ed. 2008. USA: McGraw-Hills.

32. Collier RJ. Diphtheria Toxin: Mode of Action and Structure. *Bacteriological Reviews*. 1975;39(1):54-85.
33. Collier RJ & Kandel J. Structure and activity of diphtheria toxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1971;246(5):1496-1503.
34. Metz B. Structural Characterisation of Diphtheria Toxoid. 2005. Netherlands: Universiteit Utrecht (dissertation)
35. Berner R, Leititis JU, FuÈrste HO, Brandis M. Bacterial tracheitis caused by *Corynebacterium diphtheriae*. *Eur J Pediatr*. 1997;156:207-208.
36. Funke G, Graevenitz AV, Clarridge JE, and Bernard KA. Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997;10(1):125–159.
37. Schiffler B, Barth E, Daffe' M, and Benz R. *Corynebacterium diphtheriae*: Identification and Characterization of a Channel-Forming Protein in the Cell Wall. *J.Bacteriol*. 2007;189(21):7709–7719.
38. Health Protection Agency. Identification of *Corynebacterium* species. 2008. National Public Health Service for Wales.UK.
39. Engler KH, Glushkevich T, Mazurova IK, George RC and Efstratiou A. A Modified Elek Test for Detection of Toxigenic *Corynebacteria* in the Diagnostic Laboratory. *J.Clin.Microbiol*. 1997;35(2): 495-498
40. Mattos-Guaraldi AL, Sampaio JLM, Santos CS, Pimenta FP, Pereira GA, Pacheco LGC, Miyoshi A, et al. First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing a diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2008;103(4): 396-400.
41. Wagner J, Ignatius R, Voss S, Hoÿpfner V, Ehlers S, Funke G, Weber U and Hahn H. Infection of the Skin Caused by *Corynebacterium ulcerans* and Mimicking Classical Cutaneous Diphtheria. *CID*. 2001; 33:1598–600
42. Tiwari TSP, Golaz A, Yu DT, Ehresmann KR, Jones TF, Hill HE, Cassidy PK, et al. Investigations of 2 Cases of Diphtheria-Like Illness Due to Toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *CID*. 2008; 46:395–401
43. Sing A, Bierschenk S, and Heesemann J. Classical Diphtheria Caused by *Corynebacterium ulcerans* in Germany: Amino Acid Sequence Differences between Diphtheria Toxins from *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *CID*. 2005; 40:325–6
44. McNamara PJ, Bradley GA and Songer JG. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Molecular Microbiology* (1994) 12(6). 921-930
45. Stone N, Gillett P and Burge S. Breast abscess due to *Corynebacterium striatum*. *British Journal of Dermatologi*. 1997; 137: 623-625.
46. Granok AB, Benjamin P, and Garrett LS. *Corynebacterium minutissimum* Bacteremia in an Immunocompetent Host with Cellulitis. *CID*. 2002; 35:e40–2
47. Simoons-Smit AM, Savelkoul PHM, Newling DWW, Vandenbroucke-Grauls CMJ. Chronic Cystitis Caused by *Corynebacterium urealyticum* Detected by Polymerase Chain Reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2000) 19 :949–952
48. Mookadam F, Cikes M, Baddour LM, Tleyjeh IM, Mookadam M. *Corynebacterium jeikeium* endocarditis: a systematic overview spanning four decades. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2006) 25: 349–353
49. Wagner PL & Waldor MK. Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. *Infect.Immun*. 2002;70(8): 3985–3993.

50. Holmes RK. Biology and Molecular Epidemiology of Diphtheria Toxin and the *tox* Gene. JID. 2000;181(Suppl 1):S156-67.
51. Zalman LS & Wisnieski. Mechanism of insertion of diphtheria toxin: Peptide entry and pore size determinations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81:3341-3345.
52. Greenfield L, Bjorn MJ, Horn G, Fong D, Bucktt GA, Collier RJ, and Kaplan DA. Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage 18. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983; 80:6853-6857.
53. Gill DM & Dinius LL. Observations on the Structure of Diphtheria Toxin. The Journal of Biological Chemistry. 1971;246(5):1485-1491.
54. Tortorella D, Sesardic D, Dawes CS, and London E. Immunochemical Analysis of the Structure of Diphtheria Toxin Shows All Three Domains Undergo Structural Changes at Low pH. The Journal of Biological Chemistry. 1995;270(46):27439-27445
55. Venter BR and Kaplan NO. Diphtheria Toxin Effects on Human Cells in Tissue Culture. Cancer Research. 1976; 36: 4590-4594.
56. Abraham AK, Flatmark T, Tangerang A, and Phil A. Inhibition of mitochondrial protein synthesis and energy coupling by fragmen A of Diphtheria Toxin. Eur.J.Biochem. 1982;123:201-207.
57. Oram DM, Avdalovic A, and Holmes RK. Construction and Characterization of Transposon Insertion Mutations in *Corynebacterium diphtheriae* That Affect Expression of the Diphtheria Toxin Repressor (DtxR). J.Bacteriol. 2002;184(20): 5723-5732
58. Xu T, Schiering N, Hui-yan Z, Ringe D and Murphy JR. Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. Molecular Microbiology. 1994;14(2):191-197
59. Boyd J, Oza MN, Murphy AJ. Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria tox iron-dependent regulatory element (dtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990;87:5968-5972.
60. Albert H. Diphtheria bacillus stains with a description of A "new" one. The American Journal Of Public Health. 1919:334-337.
61. Elek SD. The Plate Virulence Test for Diphtheria. J. clin. Path. 1949;2:250-258.
62. Babych EM, Ryzhkova TA, Kalinichenko SV, and Sklyar NI. General characteristic of the methode for detection of diphtheria toxin. Annals of Mechnikov Institute. 2008;4:19-21
63. Neal SE & Efstratiou A. International External Quality Assurance for Laboratory Diagnosis of Diphtheria. J.Clin.Microbiol.2009;47(12): 4037-4042
64. Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA, Hirata Jr R, Camello TCF and Mattos-Guaraldi AL. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. Letters in Applied Microbiology. 2008;46: 307-311.
65. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy O, Vance GH and Vogt PH. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. BioTechniques. 1997;23:504-511
66. Galazka AM. The Immunological Basis for Immunization Series. Module 2: Diphtheria. Global Programme for Vaccines and Immunization, Expanded Programme on Immunization. Geneva:WHO.1996.
67. Bouchet V, Hout H and Goldstein R. Molecular Genetic Basis of Ribotyping. Clinical Microbiology Reviews. 2008;21(2):262-272.
68. De Zoysa A & Efstratieau A. Use of Amplified Fragment Length Polymorphisme for Typing *Corynebacterium diphtheriae*. JCM. 2000;38(10):3843-3845

69. Dallman T, Neal S, Green J and Efstratieau A. Development of an Online Database for Diphtheria Molecular Epidemiology Under the Remit of The Dipnet Project. *Eurosurveillance*. 2008;13(19):1-2.
70. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy O, Vance GH and Vogt PH. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*. 1997;23:504-511.
71. Loffert D, Karger S, Twieling G, Ulber V and Jie K. Optimization of Multiplex PCR. *Qiagen News*. 1999;2:5-8.
72. Sachse K. Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assay. In: Sachse K & Frey J, editor. *PCR Detection of Microbial Pathogen*. Totowa, New Jersey:2003
73. Mikhailnikov VM, Melnikov VG, Mazurova IK, Wachsmuth IK, Wenger JD, Wharton M, Nakao H, et al. Application of PCR for Detection of Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* Strains Isolated during the Russian Diphtheria Epidemic, 1990 through 1994. *J.Clin Microbiol*. 1995;33(11):3061-3063



PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor : KE.01.02 / EC / 050 / 2011

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Pengembangan Deteksi Molekuler Difteri dan Corynebacterium diphtheria typing Dengan Metode PCR"

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

Sunarno, S.Kep., MSi. Med.

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

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

Jakarta, 18 Februari 2011

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo

Lampiran 2. Personalia Tim Peneliti

1. Peneliti Utama

Nama: Sunarno	Gelar: S.Kep, MSi.Med	
Tempat lahir: Raman Fajar	Tanggal lahir: 12 April 1977	Kelamin: Laki-laki
Jabatan: Peneliti Pertama	Golongan: IIIa	
Bagian/Divisi: Laboratorium Bakteriologi		
Institusi asal: Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes		
Telepon: 021-4244375 Ext 540	Faksimile: 021-4245386	
Alamat Korespondensi Pos: Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta 10560		
Alamat E-mail: no_nar@yahoo.com		
Telepon Rumah: 021-8629032	HP: 081541155269	

Kualifikasi Akademik

Tahun: 2005	Institusi: PSIK-FK Undip	Gelar: S.Kep
Tahun: 2007	Institusi: Pascasarjana Undip	Gelar: MSi.Med.

Waktu yang tersedia untuk riset ini: 20 jam per minggu.

2. Peneliti 1

Nama: Kambang Sariadji	Gelar: SSi.	
Tempat lahir: Jakarta	Tanggal lahir: 12 April 1972	Kelamin: Laki-laki
Jabatan: Peneliti Pertama	Golongan: IIIa	
Bagian/Divisi: Laboratorium Bakteriologi		
Institusi asal: Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes		
Telepon: 021-4244375 Ext 540	Faksimile: 021-4245386	
Alamat Korespondensi Pos: Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta 10560		
Alamat E-mail: kambang_sar@yahoo.com		
Telepon Rumah: -	HP: 081316230097	

Kualifikasi Akademik

Tahun: 2009	Institusi: F. Biologi Unas	Gelar: SSi
-------------	----------------------------	------------

Waktu yang tersedia untuk riset ini: 20 jam per minggu.

3. Peneliti 2

Nama: Holy Arif Wibowo	Gelar: S.Si	
Tempat lahir: Jakarta	Tanggal lahir: 10 Maret 1983	Kelamin: Laki-laki
Jabatan: Peneliti Pertama	Golongan: IIIa	
Bagian/Divisi: Laboratorium Biologi Molekuler		
Institusi asal: Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes		
Telepon: 021-4244375 Ext 540	Faksimile: 021-4245386	
Alamat Korespondensi Pos: Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta 10560		
Alamat E-mail:		
Telepon Rumah:	HP: 08179684999	

Kualifikasi Akademik

Tahun: 2003	Institusi: F.Biologi Unika Atmajaya	Gelar: S.Si
-------------	-------------------------------------	-------------

Waktu yang tersedia untuk riset ini: 20 jam per minggu.

4. Kesekretariatan/Administrasi

Nama: Yudi Hartoyo	Gelar: S.Kom
Jabatan: Staf Administrasi	Golongan: IIIa
Bagian/Divisi: Laboratorium Bakteriologi	
Telepon: 021-4244375 Ext 540	Faksimile: 021-4245386
Alamat Korespondensi Pos: Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta 10560	
Alamat E-mail: -	
Telepon rumah: -	HP: 08567875507

Waktu yang tersedia untuk riset ini: 6 bulan.

5. Konsultan/Supervisor

Dengan ini kami menyatakan kesediaan kami untuk ikut serta dalam riset dengan judul seperti tertera pada butir 3 sebagai konsultan/supervisor dengan tidak dialokasikan dana dalam anggaran kegiatan peneliti.

Nama: Syahril Harun	Gelar: Drs., MS
Tempat lahir: Padang	Tanggal lahir: 15 Juni 1950
Jabatan: Peneliti	Kelamin: Laki-laki
Golongan: IVa	
Bagian/Divisi: Laboratorium Biologi Molekuler	
Institusi asal: Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes	
Telepon: 021-4244375 Ext 540	Faksimile: 021-4245386
Alamat Korespondensi Pos: Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta 10560	
Alamat E-mail: syharuna@yahoo.com	
Telepon Rumah: 021-8716739	HP: 081310159815

Kualifikasi Akademik

Tahun: 1990	Institusi: F. Biologi Unas	Gelar: Drs.
Tahun: 2000	Institusi: Pascasarjana UI	Gelar: MS.

Waktu yang tersedia untuk riset ini: 20 jam per minggu.

Pengesahan Institusi Penanggung Jawab

Jakarta, Desember 2011



Drs. ●ndri Dwi Sampurno, M.Si, Apt.
NIP. 19621119 198803 1 001

Ketua Pelaksana Penelitian,

A handwritten signature in black ink, consisting of a circle followed by several vertical and diagonal strokes.

Sunarno, S.Kep, M.Si.Med
NIP. 19770412 199603 1 001