

POTENSI GEN *dtx* DAN *dtxR* SEBAGAI MARKER UNTUK DETEKSI DAN PEMERIKSAAN TOKSIGENISITAS *Corynebacterium diphtheriae*

Sunarno^{*}, Kambang Sariadji dan Holly Arif Wibowo

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

* E-mail: no_nar@yahoo.com

Abstract.

Corynebacterium diphtheriae is the causative agent of diphtheria. The main virulence determinant of the bacteria is diphtheria toxin, the cause of the systemic complication seen with diphtheria. Production of diphtheria toxin by toxigenic strain encoded by *dtx/tox* gene and repressed by *dtxR* gene. Gold standard for bacterial toxigenicity test carried out by conventional methods (*Elek test*, Guinea pig and *vero cell* cytotoxicity). However, *Elek test* have variety result, time consume and problem of the reagent availability. On the other hand, the animal (Guinea pig) testing was opposed by many animal lovers and the *vero cell* cytotoxicity test require high cost. The study purposed to evaluate the using of *dtx* and *dtxR* genes as a detection marker of *C.diphtheriae* and bacterial toxigenicity test simultaneously by Multiplex PCR. The study examined 44 bacterial and fungal isolates, included 22 *C.diphtheriae* (4 reference strains and 18 clinical isolates), 5 other specieses of *Corynebacterium* (reference strains) and 17 non-*Corynebacterium* (10 reference strains and 7 stock cultures). All of sample were examined by Multiplex PCR for 2 primer pairs targeted *dtx* and *dtxR* genes. The study showed that the Multiplex PCR for *dtx* and *dtxR* as target genes able to detect all of sample correctly thus concluded that *dtx* and *dtxR* genes could be used as a marker for alternative detection and toxigenicity test of *C.diphtheriae* by Multiplex PCR rapidly and accurately.

Key words: Corynebacterium diphtheriae, dtx, dan dtxR

Abstrak.

Corynebacterium diphtheriae merupakan agen penyebab penyakit difteri.. Faktor virulensi utama *C. diphtheriae* adalah toksigenisitas (kemampuan memproduksi toksin) bakteri toxin. Produksi toksin diatur seperangkat gen yang disebut gen *tox/dtx* dan diregulasi oleh gen *dtxR*. *Gold standard* untuk pemeriksaan toksigenisitas *C.diphtheriae* adalah dengan metode konvensional (*Elek test*, Guinea pig dan *vero cell* cytotoxicity),namun *Elek test* mempunyai variasi hasil yang cukup beragam, membutuhkan waktu yang cukup lama, serta masalah ketersediaan reagen standard. Di sisi lain pemeriksaan dengan hewan coba banyak ditentang oleh para pecinta satwa. Sementara itu, pemeriksaan dengan *vero cell* membutuhkan biaya yang sangat tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi gen *dtx* dan *dtxR* sebagai marker deteksi *C.diphtheriae* sekaligus pemeriksaan toksigenisitas bakteri menggunakan PCR Multipleks. Jumlah sampel penelitian sebanyak 44 isolat, termasuk 22 *C.diphtheriae* (4 strain referensi dan 18 isolat klinik), 5 spesies lain *Corynebacterium* (strain referensi) dan 17 isolat non-*Corynebacterium* (10 strain referensi dan 7 isolat tersimpan). Semua

sampel dilakukan pemeriksaan menggunakan PCR Multipleks dengan 2 pasang primer yang mempunyai target gen *dtx* dan *dtxR* Hasil penelitian menunjukkan bahwa Gen *dtx* dan *dtxR* dapat digunakan sebagai marker (gen target) dalam metode deteksi dan pemeriksaan toksigenisitas *C.diphtheriae* menggunakan PCR Multipleks sehingga menjadi alternatif metode diagnosis difteri yang cepat dan akurat

Kata Kunci: *Corynebacterium diphtheriae*, *dtx*, dan *dtxR*

PENDAHULUAN

Corynebacterium diphtheriae merupakan agen penyebab penyakit difteri. Penyakit ini biasanya menyerang saluran nafas atas, ⁽¹⁾ pada beberapa kasus mengenai kulit ⁽²⁾ dan beberapa organ lainnya. ⁽³⁾ Difteri mudah menular melalui udara dengan masa inkubasi antara 1 – 10 (tersering 2-5) hari. ⁽⁴⁾ Kelompok risiko tinggi adalah anak-anak dan orang lanjut usia, namun pada era vaksinasi sekarang ini terjadi perubahan epidemiologi, dimana difteri juga terjadi pada orang dewasa. ^(5, 6) Epidemik atau peningkatan kasus di suatu daerah yang sudah lama bebas dari penyakit difteri dapat timbul karena adanya penderita atau karier yang datang dari daerah endemik, penurunan cakupan imunisasi dan perubahan virulensi bakteri. ^(7, 8)

Di Indonesia, kasus difteri masih terus terjadi di berbagai daerah, bahkan cenderung mengalami peningkatan pada tahun-tahun terakhir. Peningkatan kasus difteri yang sangat menyolok terjadi di Jawa Timur. Tahun 2003 teridentifikasi 5 kasus positif, tahun 2004, 15 kasus (4 meninggal), tahun 2005 dan 2006, 52 dan 44 kasus (8 meninggal), tahun 2007, 86 kasus (6 meninggal), tahun 2008, 76 kasus (12 meninggal), tahun 2009, 140 kasus (8 meninggal) dan tahun 2010, 304 kasus (21 meninggal). Kasus terus meningkat pada tahun 2011, dalam rentang Januari – November 2011, telah teridentifikasi 511 kasus (12 meninggal). ^(9, 10)

Faktor virulensi utama *C. diphtheriae* adalah toksigenisitas (kemampuan memproduksi toksin) bakteri. Toksin menimbulkan

peradangan dan destruksi epitel pada daerah yang terinfeksi, akibatnya akan terjadi nekrosis jaringan dan terbentuk membran palsu (pseudomembran). Pseudomembran diikuti dengan terjadinya edema jaringan mukosa dibawahnya. Inilah yang sering menyebabkan terjadinya obstruksi saluran nafas. Selanjutnya toksin akan menyebar ke seluruh tubuh, menyebabkan degenerasi dan nekrosis terutama pada jantung dan sel saraf. Kematian biasanya disebabkan gagal jantung dan gangguan pernafasan. ^(11, 12, 13, 14) Produksi toksin diatur seperangkat gen yang disebut gen *tox/dtx*. Gen *dtx* dibawa oleh bakteriofag yang berintegrasi dalam kromosom strain non-toksigenik dan non-virulen sehingga menjadi virulen dan sangat toksigenik. Ekspresi gen *dtx* dalam memproduksi toksin diregulasi oleh gen *dtxR* yang dikatalis oleh besi (Fe). ^(15, 16, 17)

Gold standard untuk pemeriksaan toksigenisitas *C.diphtheriae* adalah dengan metode konvensional (*Elek test*, *Guinea pig* dan *vero cell cytotoxicity*), namun dalam pelaksanaannya, teknik tersebut tidak selalu bisa dilaksanakan. *Elek test* mempunyai variasi hasil yang cukup beragam sehingga memerlukan laboratorium terstandar dan teknisi yang berpengalaman serta membutuhkan waktu yang cukup lama. Selain itu ketersediaan reagen standar untuk pemeriksaan merupakan masalah tersendiri di beberapa negara, termasuk Indonesia. Di sisi lain pemeriksaan dengan hewan coba banyak ditentang oleh para pecinta satwa. Sementara itu, pemeriksaan dengan *vero cell* membutuhkan biaya yang sangat tinggi dan

hanya bisa dilakukan di laboratorium tertentu.^(18, 19)

Salah satu alternatif pemeriksaan toksigenisitas *C.diphtheriae* adalah teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan target gen *tox* region A dan B yang telah dikembangkan oleh Nakao, et al.⁽²⁰⁾ Kendala muncul karena bakteri yang tidak mempunyai gen *tox* (strain nontoksigenik) tidak terdeteksi, padahal beberapa laporan menyebutkan bahwa strain nontoksigenik juga dapat menyebabkan penyakit mematikan^(21, 22) dan dapat berubah menjadi toksigenik bila terinsersi oleh *Corynephage* yang membawa gen *tox*.⁽²³⁾ Oleh sebab itu, dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengevaluasi potensi gen *dtx* dan *dtxR* sebagai marker deteksi *C.diphtheriae* sekaligus pemeriksaan toksigenisitas bakteri menggunakan PCR Multipleks. Penelitian serupa pernah dilakukan oleh Pimenta, et al. tahun 2008, namun sayangnya mereka tidak memberikan disain primer yang digunakan sehingga tidak bisa diaplikasikan. Selain itu, isolat yang digunakan terbatas dari Brazil dan kontrol negatif hanya menggunakan *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis*⁽²⁴⁾ sehingga perlu dilakukan pengujian dengan isolat yang lebih bervariasi dengan disain primer dan kondisi PCR yang berbeda.

BAHAN DAN METODA

Pengumpulan Sampel

Pengumpulan sampel dimulai bulan April 2011. Jumlah sampel penelitian sebanyak 44 isolat, yang terdiri dari 23 isolat *Corynebacterium* potensial toksigenik (22 *C.diphtheriae* dan 1 *C.ulcerans*), 4 isolat *Corynebacterium* spesies non toksigenik dan 17 isolat non-*Corynebacterium*. Sampel terbagi menjadi 2 jenis, yaitu strain referensi (*National Collection of Type Cultures*: NCTC dan *American Type Culture Collection*: ATCC) dan isolat klinik yang berasal

dari pasien. Isolat referensi diperoleh dari perusahaan penyedia (MicroBioLogics) melalui distributor lokal (PT. Dipa Puspa Labsains), sebagian dari *Health Protection Agency* (HPA), UK melalui Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya, dan 1 strain dari Laboratorium Bioteknologi, Pusat Antar Universitas (PAU) UGM.

Strain referensi terdiri dari 4 isolat *C.diphtheriae* (NCTC 10356, NCTC 10648, NCTC 3984 dan ATCC 13812), 1 *C.ulcerans* (NCTC 12077), 1 *C.striatum* (NCTC 764), 1 *C.minutissimum* (ATCC 23346), 1 *C.pseudodiphthericum* (ATCC 10700), 1 *C.glutamicum*, 1 *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077), 1 *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 10015), 1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 12493), 1 *Staphylococcus epidermidis* (12228), 1 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA-1144), 1 *Legionella pneumophillia* (ATCC 33152), 1 *Enterobacter Sakazakii*, 1 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), dan 1 *Clostridium tetani* (ATCC 19406). Isolat klinik berupa isolat tersimpan (*stock culture*) milik Laboratorium Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (PBTDK) yang terdiri dari 18 *Corynebacterium diphtheriae* dan 1 *Candida albicans* (isolat KLB difteri tahun 2009 – 2011), *S.typhimurium*, *S.typhi*, *S.flexineri*, *A.hydropillia*, *V.chollerae*, dan *E.coli* (isolat eks-NAMRU-2).

Semua sampel (termasuk strain referensi) diidentifikasi ulang menggunakan metode konvensional (*gold standard*) dan diberi label berupa kode angka sebelum dilakukan pemeriksaan menggunakan PCR Multipleks.

Disain Primer

Pemeriksaan difteri menggunakan PCR Multipleks membutuhkan beberapa pasang primer yang digunakan untuk hibridisasi dan amplifikasi sekuns DNA berdasarkan target yang ingin dicapai. Primer

didisain menggunakan strain referensi dan fasilitas disain primer yang tersedia di Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primer diujicoba secara bioinformatik (BLAST) untuk mengetahui sensitifitas dan spesifisitasnya. Setelah disain dianggap tepat, selanjutnya primer dipesan ke penyedia jasa

pembuatan primer PCR (1st BASE CUSTOM OLIGOS) berdasarkan desain yang dibuat.

Pada penelitian ini digunakan 2 pasang primer PCR dengan spesifikasi sebagai berikut :

Gen: TOX/Dtx	[toxgenic <i>C. diphtheriae</i>]		
Forward primer	AACTATGCGGCGTGGGCAGT	20	60.00% (Tm 67.61C)
Reverse primer	GGTGAACGGCACCGTCTGCAA	21	61.90% (Tm 68.52C)
Product length	139		
Gen: DtxR	[<i>C. diphtheriae</i>]		
Forward primer	TGCCCGTATGGAGCGCGATG	20	65.00% (Tm 68.00C)
Reverse primer	GTTCCCAGCGGCAGGCTTCA	20	65.00% (Tm 68.17C)
Product length	182		

PCR Multipleks

Optimasi dilakukan untuk mendapatkan teknik atau metode PCR Multipleks yang paling optimum. Adapun optimasi yang dilakukan meliputi jenis alat/bahan yang dipakai, *setting*/kondisi PCR, dan elektroforesis. Beberapa prosedur mengikuti hasil optimasi yang telah dilakukan dalam penelitian sebelumnya.⁽²⁰⁾ Beberapa metode/teknik PCR Multipleks untuk pemeriksaan difteri berdasarkan hasil optimasi meliputi hal-hal berikut ini. Swab untuk pengambilan sampel menggunakan *dacron swab*. Prosedur untuk ekstraksi DNA menggunakan QIAamp Blood Kit (sesuai petunjuk pabrik) dengan terlebih dahulu dipanaskan pada suhu 96 °C selama 15 menit. Konsentrasi dan kualitas DNA diperiksa menggunakan NanoDrop (Thermo Scientific).

Formulasi PCR terdiri dari 12,5 ul *Mastermix* (Genekam), 5 ul primer (2 ps), 3 ul *molecular water*, dan 4,5 ul DNA *template*. Amplifikasi DNA menggunakan thermocycler (C 1000, Biorad) 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, diikuti ekstensi final 72°C

selama 10 menit. Kontrol negatif PCR menggunakan aquadest, sedangkan semua isolat *Corynebacterium diphtheriae* digunakan sebagai kontrol positif sekaligus sampel.

Produk PCR kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis (Biorad) dengan formulasi 1,5% Agarose (Genekam) yang dilarutkan pada 1x TBE buffer (Invitrogen) dan diwarnai dengan *Ethidium bromide* (EtBr). Elektroforesis dijalankan dengan kekuatan 100 volt selama 1 jam, dan dibaca dengan mesin *Gel doc* (XR plus: Biorad). Hasil pemeriksaan PCR Multipleks berupa penampakan *bands* (pita) pada titik tertentu (139 bp untuk gen *dtx* dan 182 bp untuk gen *dtxR*) sesuai dengan primer yang digunakan. Bila pada kedua tempat (139 bp dan 182 bp) tampak garis, maka disimpulkan *C. diphtheriae* toksigenik. Bila garis hanya tampak pada 182 bp, maka disimpulkan *C. diphtheriae* non toksigenik. Bila tidak tampak garis disimpulkan bukan *C. diphtheriae*.

Analisis Data

Parameter yang diukur berupa hasil pemeriksaan PCR Multipleks dibandingkan dengan hasil identifikasi menggunakan metode konvensional. Indikator yang dinilai

meliputi akurasi, waktu, biaya, dan ketersediaan bahan.

HASIL

Hasil pemeriksaan difteri dengan PCR Multipleks dapat dilihat pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Hasil Pemeriksaan PCR Multipleks. Sampel 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, dan 13 adalah isolat *C.diphtheriae* toksigenik, tampak 2 garis (139 bp dan 182 bp). Sampel 12 adalah isolat *C.diphtheriae* non toksigenik, tampak 1 garis (182 bp). Sampel 3 dan 10 adalah isolat non *C.diphtheriae*, tidak tampak garis sama sekali. N adalah kontrol negatif (aquadest) dan M adalah Marker (Generuler).

Gambar 1. menunjukkan bahwa semua sekuens DNA *C. diphtheriae* toksigenik teramplifikasi pada kedua gen target (*dtx* dan *dtxR*) sehingga tampak pita pada 139 bp dan 184 bp.

Pada *C. diphtheriae* non toksigenik, hanya pita pada 184 bp yang terlihat. Hal ini menandakan bahwa pada *C. diphtheriae* non toksigenik tidak terdapat gen *dtx*. Sementara itu, pada sampel non-*C. diphtheriae*, tidak tampak garis pada kedua tempat. Hal ini menandakan bahwa semua sampel non-*C. diphtheriae* yang diperiksa pada penelitian

ini tidak memiliki gen *dtx* dan *dtxR* atau urutan sekuens DNA yang menyerupai gen tersebut. Akurasi hasil PCR Multipleks dibandingkan dengan metode konvensional dalam mendeteksi dan memeriksa toksigenisitas *C.diphtheriae* (Tabel 1).

Pada Tabel 1 terlihat bahwa PCR multipleks dengan menggunakan primer yang mempunyai target gen *dtx* dan *dtxR* mampu mendeteksi *C.diphtheriae* sekaligus menentukan sifat toksigenisitas bakteri dengan tepat. Kesesuaian hasil PCR Multipleks dengan metode konvensional (*gold standard*) mencapai 100%. Sementara itu, perbandingan konsumsi waktu, biaya, dan ketersediaan bahan antara PCR Multipleks dengan metode konvensional (Tabel 2).

Pada Tabel 2 terlihat bahwa konsumsi waktu yang dibutuhkan untuk deteksi *C. diphtheriae* dan pemeriksaan toksigenisitas bakteri dengan PCR Multipleks dan metode konvensional jauh berbeda, terutama jika sampel berupa spesimen klinik dari pasien. Begitu juga untuk ketersediaan bahan pemeriksaan, reagen untuk PCR Multipleks lebih mudah didapat daripada reagen untuk metode konvensional. Untuk konsumsi biaya, relatif sama antara PCR Multipleks dengan metode konvensional, tergantung dari tingkatan dan merk bahan.

PEMBAHASAN

Sampel target adalah *C. diphtheriae*, 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* ⁽²⁵⁾ begitu juga dengan *Mycobacterium tuberculosis* yang mempunyai gen mirip *dtxR* pada *C. diphtheriae*. ⁽²⁶⁾ Beberapa jenis bakteri seperti *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphilococcus*, *Legionella*, *Klebsiella* dan *Candida* digunakan

Tabel 1. Perbandingan Hasil PCR Multipleks dan Metode Konvensional (*gold standard*)

No Urut	Hasil PCR Multipleks	Metode Konvensional	Keterangan
1	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
2	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
3	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
4	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
5	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
6	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
7	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
8	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
9	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
10	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
11	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
12	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
13	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
14	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
15	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
16	<i>C.diphtheriae</i> non toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> non toksigenik	Sesuai
17	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>C.ulcerans</i> non toksigenik	Sesuai
18	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>C.striatum</i>	Sesuai
19	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>C.minutissimum</i>	Sesuai
20	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>C.glutamicum</i>	Sesuai
21	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>C.pseudodiphthericum</i>	Sesuai
22	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	Sesuai
23	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sesuai
24	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Staphilococcus aureus</i>	Sesuai
25	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Staphilococcus epidermidis</i>	Sesuai
26	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sesuai
27	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Sesuai
28	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Legionella pneumophillia</i>	Sesuai
29	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sesuai
30	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Enterobacteria sakazakii</i>	Sesuai
31	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Clostridium tetany</i>	Sesuai
32	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Sesuai
33	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Salmonella typhi</i>	Sesuai
34	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Shigella flexineri</i>	Sesuai
35	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Aeromonas hydrophillia</i>	Sesuai
36	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	Sesuai
37	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Eschericia coli</i>	Sesuai
38	Bukan <i>C.diphtheriae</i>	<i>Candida albican</i>	Sesuai
39	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
40	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
41	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
42	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
43	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai
44	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	<i>C.diphtheriae</i> toksigenik	Sesuai

Tabel 2. Perbandingan Waktu, Biaya, dan Ketersediaan Bahan antara PCR Multipleks dan Metode Konvensional

	PCR Multipleks	Metode Konvensional
Estimasi Waktu	5 – 8 jam	≥ 48 jam (spesimen klinik) ≥ 18 jam (isolat)
Estimasi Biaya	± 250.000,-/sampel	250.000,- – 350.000,-/sampel
Ketersediaan Bahan	1 – 4 minggu Banyak pilihan	≥ 3 bulan Sedikit pilihan

Catatan: Peralatan untuk masing-masing pemeriksaan telah tersedia

sebagai sampel karena bakteri-bakteri tersebut seringkali didapatkan pada spesimen usap tenggorok. ⁽²⁷⁾ Bakteri lain seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium tetani*, *E. sakazakii*, *S. typhimurium*, *S. typhi*, *S. flexineri*, *A. hydrophilla*, *V. cholerae*, *E. coli*, dan *C. albican* digunakan untuk melihat spesifisitas primer karena difteri juga dapat menginfeksi kulit, urogenital dan organ lainnya, ^(2, 3) dimana bakteri-bakteri tersebut sering menginfeksi manusia. ⁽²⁷⁾ Selain itu, beberapa jenis bakteri dapat tumbuh pada medium selektif *C. diphtheriae* (CTBA). ⁽¹¹⁾

Corynebacterium diphtheriae merupakan bakteri gram positif, bersifat aerob, tidak bergerak dan tidak membentuk spora. Bakteri ini berbentuk basil seperti palu (pembesaran pada salah satu atau kedua ujung) dengan diameter 0,1 – 1 µm dan panjang beberapa µm. Ada 4 biotipe *C. diphtheriae*, yaitu: gravis, mitis, intermedius dan belfanti. *Chang et al.* membedakannya berdasarkan kultur dan reaksi biokimia. Pada medium rutin, jenis gravis menghasilkan koloni besar, kasar, irreguler, warna abu-abu, dan tidak mengakibatkan hemolisis eritrosit. Jenis mitis membentuk koloni kecil, halus, konveks dan dapat mengakibatkan hemolisis eritrosit. Jenis intermedius terlihat sebagai koloni kecil dan halus dengan bintik hitam di tengahnya serta mengakibatkan hemolisis

eritrosit. ^(11, 28) Bakteri 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. Toksin inilah yang sering menyebabkan gejala sistemik dan kematian pada penderita difteri. ⁽¹³⁾

Produksi toksin difteri dikode oleh seperangkat gen yang disebut *dtx* dan hanya bakteri yang memiliki gen *dtx* yang mampu mengeluarkan toksin sehingga ini dapat digunakan sebagai penanda strain toksigenik. Fungsi gen *dtx* dalam memproduksi toksin diregulasi oleh seperangkat gen lain yang disebut *dtxR*. Gen *dtxR* selain meregulasi/ merepresi produksi toksin juga merepresi protein lain, seperti *Corynebactin*. Gen *dtxR* dimiliki oleh semua strain *C. diphtheriae*, baik toksigenik maupun non toksigenik sehingga gen ini dapat digunakan sebagai penanda *C. diphtheriae*. ^(15, 16, 17)

Keberadaan gen *dtx* pada strain toksigenik dan gen *dtxR* pada semua strain *C. diphtheriae* dapat dideteksi dengan metode PCR Multipleks dengan target gen *dtx* dan *dtxR*, seperti yang tampak pada Gambar 1. Sesuai dengan panjang produk PCR yang dihasilkan oleh amplifikasi gen *dtx* dan *dtxR* berdasarkan disain primer yang dibuat,

semua sampel *C.diphtheriae* memperlihatkan pita pada 182 bp, sedangkan pita pada 139 bp hanya tampak pada sampel *C.diphtheriae* toksigenik.

Spesifisitas pemeriksaan terlihat pada sampel non-*C.diphtheriae*, dimana tidak tampak pita sama sekali, baik pada 139 bp maupun 182 bp. Gen *dtx* dibawa oleh bakteriofaga yang juga dapat menginfeksi *Corynebacterium* potensial toksigenik lain (*C. ulcerans* dan *C. pseudotuberculosis*) sehingga dapat memproduksi toksin dan menimbulkan penyakit yang menyerupai difteri. Dalam kondisi demikian maka bakteri tersebut memiliki gen *tox/dtx* tapi tidak memiliki gen *dtxR*.^(29, 30) Penelitian ini tidak menggunakan isolat *C.ulcerans* dan *C. pseudotuberculosis* toksigenik sehingga tidak ada sampel yang hanya menunjukkan pita pada 139 bp.

Akurasi pemeriksaan PCR Multipleks sangat baik. Pada Tabel 1. terlihat bahwa PCR Multipleks berhasil mendeteksi 22 sampel *C. diphtheriae* dan mengidentifikasi toksigenisitas 21 sampel *C. diphtheriae* toksigenik. PCR Multipleks juga cukup spesifik dalam mendeteksi *C. diphtheriae* sehingga semua sampel non-*C. diphtheriae* dapat dieliminasi dengan benar. Meskipun ada penelitian yang menyebutkan bahwa tidak semua *C. diphtheriae* yang mempunyai gen *tox* akan mengeluarkan toksin (toksigenik), namun jumlahnya relatif sedikit.⁽³¹⁾ Pada penelitian ini hal tersebut tidak terjadi, begitu juga pada penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Nakao, *et al.* dan Mikhailnikovich, *et. al.*^(20, 32)

Pemeriksaan PCR Multipleks mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode konvensional, seperti yang terlihat pada Tabel 2. Kecepatan pemeriksaan dan ketersediaan bahan merupakan alasan yang sering digunakan untuk memilih metode PCR. Selain itu, metode PCR juga relatif lebih mudah dilakukan serta

kurang terpengaruh oleh pemberian antimikrobal sebelumnya.^(18, 19) Namun, metode PCR juga memiliki beberapa keterbatasan karena tidak dapat digunakan untuk mengumpulkan isolat hidup yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai kepentingan, diantaranya tes suseptibilitas terhadap antimikrobal.⁽²⁷⁾

KESIMPULAN

Gen *dtx* dan *dtxR* dapat digunakan sebagai marker (gen target) dalam metode deteksi dan pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* menggunakan PCR Multipleks sehingga menjadi alternatif metode diagnosis difteri yang cepat dan akurat. Untuk aplikasi, perlu dilakukan uji coba pemeriksaan terhadap spesimen klinik dari pasien suspek difteri dan sampel kontak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Risbin Iptekdok tahun 2011. Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Koordinator Laboratorium Bakteriologi, PBTDK beserta staf yang telah membantu penyediaan dan pemilihan sampel penelitian. Terima kasih juga kepada Hidayat Trimarsanto, Ph.D (Eijkman) dan Drs. Syahrial Harun, MS yang telah memberikan pengarahan dalam pemeriksaan laboratorium.

DAFTAR RUJUKAN

1. Acang N. Difteri. Dalam: Noer HMS, editor. Ilmu Penyakit Dalam Jilid 1 Ed. ke-3. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 1996.
2. 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.
3. Vetrichevvel TP, Pise GA, Agrawal KK, Thappa DM. Cutaneous diphtheria masquerading as a sexually transmitted disease. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2008;74:187.

4. Tiwari TSP. The Pre-Travel Consultation Routine Vaccine-Preventable Diseases: Diphtheria. In: CDC. Travelers' Health – Yellow Book. 2010.
5. McCluney NA, McKerrow WS. Should We Concerned about diphtheria in the UK. *Surg JR Coll Surg Edinb Irel.* 2004;2(4):234-235.
6. Galazkaa A. The Changing Epidemiology of Diphtheria in the Vaccine Era. *The Journal of Infectious Diseases* 2000;181(Suppl 1):S2–9
7. 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.
8. 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.
9. Ditjen PP&PL Kemenkes RI. Gambaran KLB Diphteri Th 2000-2010 di Jawa Timur. 2011.
10. Dinkes Jatim. Situasi Penyakit Diphteri Kabupaten/Kota per Tanggal 24 November 2011.
11. 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.
12. Lumio J. Studies on the Epidemiology and Clinical Characteristics of Diphteria during the Russian Epidemic of the 1990s (dissertation). Finlandia: University of Tampere; 2003.
13. Guilfoile PG. *Deadly diseases and epidemics: diphtheria.* New York: Chelsea House Publishers;2009.
14. Holmes KR. Diphtheria. In: Fauci AS, et al. Editor. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 17th ed. 2008. USA: McGraw-Hills.
15. Cerdeño-Tárraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MT, Pallen M, Bentley SD, Besra GS, et al. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acid Res.* 2003;31(22):6516-23.
16. 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
17. 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. Nati. Acad. Sci. USA.* 1990;87:5968-5972.
18. 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.
19. 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.
20. 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
21. 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
22. Reacher M, Ramsay M, White J, Zoysa AD, Efstratiou A, Mann G, Mackay A, et.al. Nontoxigenic *Corinebacterium diphtheriae* : An emerging pathogen in England and Wales. *Emerging Infectiuous Diseases.* 2000;6(6):640-644.
23. Titov L, Kolodkina V, Dronina A, Grimont F, Grimont PAD, Lejay-Collin M, Zoysa A, et.al. Genotypic and Phenotypic characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from patients in Belarus during an epidemic period. *JCM.*2003;41(3):1285-1288.
24. 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-toxigenic and toxigenic isolates. *JMM.*2008:1438-1439.
25. Khamis A, Raoult D, La Scola B. rpoB gene Sequencing for Identification of *Corynebacterium* Spesies. *J.Clin.Microbiol.* 2004;42(9):3925-3931.
26. Manabe YC, Hatem CL, Kesavan AK, Durack J, and Murphy JR. IdeR(D177K) are dominant positive repressors of IdeR-regulated genes in *M. tuberculosis*. *Infect. Immun.* 2005;73(9):5988-5994.

27. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, and Zinkernagel RM. Medical Microbiology. Stuttgart: Thieme; 2005
28. Health Protection Agency. Identification of *Corynebacterium* species. 2008. National Public Health Service for Wales.UK.
29. Efstratiou A, Engler KH, Dawes CS, and Seward D. Comparison of Phenotypic and Genotypic Methods for Detection of Diphtheria Toxin among Isolates of Pathogenic *Corynebacteria*. *J.Clin.Microbiol.* 1998;36(11):3173-3177.
30. 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
31. 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
32. 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