

***Direct Polymerase Chain Reaction:* Sebuah Alternatif Metode Diagnostik Difteri Secara Cepat, Mudah dan Hemat**

Sunarno^{1,4*}, Aulia Rizki¹, Kambang Sariadji¹, Amarila Malik², Anis Karuniawati³ dan Amin Soebandrio³

1. Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI, Jakarta 10560, Indonesia
2. Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia
3. Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10320, Indonesia
4. Program Doktor Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

*E-mail: no_nar@yahoo.com

Abstrak

Beberapa jenis penyakit membutuhkan penatalaksanaan secara cepat dan tepat guna menurunkan risiko fatal penderita, salah satu diantaranya adalah difteri. Waktu sangat berharga untuk bisa menolong penderita karena keterlambatan penatalaksanaan bisa meningkatkan kematian kasus hingga 20 kali lipat. Di sisi lain, metode diagnostik konvensional sebagai *gold standard* membutuhkan waktu 3–5 hari sehingga diperlukan metode diagnostik alternatif untuk membantu menegakkan diagnosis difteri. *Direct polymerase chain reaction* (PCR) dapat menjawab tantangan atas besarnya biaya dan lamanya waktu yang dibutuhkan untuk pemeriksaan laboratorium. Penelitian bertujuan untuk mengembangkan metode *direct PCR* sebagai metode alternatif diagnostik difteri secara cepat, mudah dan hemat. Sebanyak 15 sampel yang terdiri dari 10 isolat *Corynebacterium diphtheriae* toksigenik dan 3 *Corynebacterium non-diphtheriae* nontoksigenik ditambah dengan 2 spesimen klinis (usap tenggorok) digunakan untuk optimasi metode *direct PCR* dibandingkan dengan PCR *standard* sebagai kontrol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *direct PCR* dapat digunakan untuk deteksi dan amplifikasi gen target dengan benar seperti halnya PCR *standard* sehingga pada seluruh sampel *C. diphtheriae* tampak pita pada 168 bp (penanda gen *dtxR*) dan 551 bp (penanda gen *tox*). Sebaliknya pada sampel lain tidak tampak pita pada kedua tempat tersebut. *Direct PCR* dapat mendeteksi sel bakteri sampai dengan 71 CFU/uL. Oleh karena itu, disimpulkan bahwa *direct PCR* dapat digunakan sebagai metode diagnostik alternatif untuk membantu menegakkan diagnosis difteri secara cepat, mudah dan hemat.

Abstract

Direct PCR: Alternative Diagnostic Method for Diagnosis of Diphtheria Rapidly, Easily and Cost Effective. Some diseases require immediate and appropriate treatment to decrease the fatality risk patients incident, for example diphtheria. Time to help patients is very crucial since delay of therapy may increase the mortality cases up to 20 times. In other hands, conventional diagnostic methods (the gold standard) for diagnosis of diphtheria is time consuming and laborious. Therefore, an alternative diagnostic method which is rapid, easy and inexpensive is needed. In this case, direct PCR has been proved to reduce time and cost in laboratory examination. This study aimed to develop direct PCR as alternative diagnostic method for diagnosis of diphtheria rapidly, easily, and inexpensive. Fifteen samples include 10 isolates of *Corynebacterium diphtheriae* (toxigenic) and 3 isolates of *Corynebacterium non-diphtheriae* (nontoxigenic) and 2 clinical specimens (throat swab) was examined by performing direct PCR method and a standard PCR method was used for optimizing the protocols. Result showed that direct PCR can be used to amplify target genes correctly as well as standard PCR. All of *C. diphtheriae* samples showed bands at 168 bp (*dtxR* gene marker) and 551 bp (*tox* gene marker) while no band appeared in others. Direct PCR detected at least 71 CFU/uL of bacterial cells in samples. We concluded that direct PCR can be used for alternative diagnostic method for diagnosis of diphtheria which is rapid, easy and cost effective.

Keywords: direct PCR, C. diphtheriae, diphtheria, diagnostic method, effective

Pendahuluan

Perkembangan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) terus mengalami kemajuan hingga saat ini. Berbagai

modifikasi dilakukan untuk mendapatkan hasil terbaik sesuai tujuan yang ingin dicapai. Salah satu modifikasi dilakukan untuk mempersingkat proses, mempermudah pekerjaan dan menurunkan biaya pemeriksaan melalui

pengembangan *direct* PCR. Jika pada umumnya proses PCR didahului dengan isolasi/ekstraksi DNA yang akan digunakan sebagai sampel atau DNA template, hal itu tidak dilakukan pada *direct* PCR. Isolasi DNA pada umumnya cukup melelahkan karena membutuhkan waktu hingga beberapa jam bahkan beberapa hari tergantung metode yang digunakan. Selain itu biaya yang harus dikeluarkan untuk pembelian reagen maupun kit komersial isolasi DNA juga tidak murah, bervariasi dari puluhan hingga ratusan ribu rupiah. Hal ini yang diusahakan untuk direduksi pada *direct* PCR sehingga hasil dapat diketahui hanya dalam hitungan menit dan biaya dapat dihemat hingga ratusan ribu rupiah.¹⁻³

Direct PCR memberikan harapan baru untuk menjawab tantangan atas besarnya biaya dan lamanya waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi DNA pada pemeriksaan PCR. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk aplikasi di laboratorium dengan mengembangkan *direct* PCR untuk pemeriksaan berbagai macam sampel dengan cara yang berbeda-beda. Pathmanathan, *et al.* (2003) berhasil mengembangkan *direct* PCR untuk Salmonella dengan ekstraksi DNA sederhana (*boiling*).⁴ Sharma *et al.* (2012) berhasil mengembangkan *direct* PCR untuk sampel tanaman/tumbuhan, meskipun pre-treatment sampel dengan alkohol absolut tetap dilakukan.⁵ Ahsani & Samsaddini (2012) berhasil mengembangkan *direct* PCR untuk Clostridium perfringens.⁶ Penelitian lain mengembangkan *direct* PCR untuk Mycoplasma pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis dan DNA manusia.⁷⁻⁹

Pemanfaatan *Direct* PCR sebagai metode diagnostik yang cepat, mudah dan terjangkau cocok digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis berbagai macam penyakit, khususnya penyakit yang membutuhkan penatalaksanaan sesegera mungkin, seperti difteri. Difteri merupakan 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 karrier, dimana kelompok risiko 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. Terjadinya perubahan 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 atau terjadinya perubahan virulensi bakteri.¹⁰⁻¹²

Diagnosis difteri secara konvensional (*gold standard*) ditetapkan dengan pemeriksaan kultur bakteri dan mikroskopik yang diikuti dengan reaksi biokimia dan test toksigenisitas. Bagaimanapun juga metode

konvensional memerlukan waktu yang cukup lama (>48 jam) sehingga biasanya terapi diberikan berdasarkan gambaran klinis penderita dan riwayat penyakit tanpa menunggu hasil pemeriksaan laboratorium selesai.¹³⁻¹⁵ Di sisi lain, diagnosis berdasarkan gambaran klinis sering kali sulit dan terlambat ditegakkan karena pada kasus ringan atau dini gambaran penyakit menyerupai faringitis yang disebabkan oleh bakteri lain, padahal keterlambatan penatalaksanaan akan meningkatkan risiko fatal penderita hingga 20 kali lipat.¹⁰⁻¹² Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan *direct* PCR sebagai alternatif metode diagnostik difteri yang cepat, mudah dan hemat sehingga diagnosis lebih cepat ditegakkan, penatalaksanaan secara tepat dapat segera diberikan dan kamatian kasus dapat diturunkan.

Metode Penelitian

Sampel. Sampel penelitian meliputi 2 jenis spesimen, yaitu spesimen klinis berupa 2 swab tenggorok dan spesimen tersimpan berupa 13 isolat bakteri yang terdiri dari 10 *C. diphtheriae* dan 3 *Corynebacterium non diphtheriae* (*C. ulcerans*, *C. striatum*, *C. minutissimum*) milik Laboratorium Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Seluruh spesimen tersimpan dikultur pada Agar darah dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sel bakteri dipanen dari koloni yang tumbuh, dimasukkan dalam tabung mikro 1,5 mL yang berisi 200 uL aquadest dan siap digunakan untuk pemeriksaan *direct* PCR. Swab tenggorok dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL yang berisi 500 uL aquadest, divortex dan swab dibuang. Supernatan siap digunakan sebagai sampel untuk pemeriksaan *direct* PCR.

Sebagian sampel dalam tabung mikro 1,5 mL diekstraksi untuk mendapatkan sampel DNA yang digunakan sebagai DNA template pada pemeriksaan dengan PCR *standard*. Metode ekstraksi menggunakan kit komersial (QiAmp DNA minikit) mengikuti prosedur dari pabrik pembuatnya dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 100 uL suspensi sel dimasukkan dalam microtube 1,5 mL ditambahkan dengan 10 uL proteinase K dan 100 uL buffer AL, divortex selama 15 detik dan diinkubasi pada suhu 56 °C selama 15 menit dan 96 °C selama 10 menit. Campuran tersebut ditambah dengan 100 uL ethanol absolut, divortex selama 15 detik, kemudian dipindahkan dalam tube berfilter (mini *column*) dan disentrifugasi dengan kekuatan 8000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dan filter dibilas dengan 350 uL buffer AW1, disentrifugasi 8000 rpm selama 3 menit dan supernatant dibuang. Proses pembilasan ini dilakukan lagi dengan cara yang sama menggunakan buffer AW2. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kering dengan kekuatan 14000 rpm selama 1 menit. Terakhir, filter ditempatkan pada tube baru, dibilas dengan 100 uL buffer AE, dan disentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Filter dibuang

Tabel 1. Perbedaan Prinsip *Direct* PCR dan PCR *Standard*

Tahapan	<i>Direct</i> PCR	PCR <i>Standard</i>
Ekstraksi DNA	Tidak	Ya
PCR	Ya	Ya
- Inisial Denaturasi	15 menit	3 menit
- Denaturasi	35 x 15 detik	35 x 15 detik
- Elongasi	35 x 30 detik	35 x 30 detik
- Ekstensi	35 x 30 detik	35 x 30 detik
Elektroforesis	Ya	Ya

dan supernatant disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan sebagai template DNA.

PCR. Pemeriksaan PCR dilakukan dengan 2 cara, yaitu *direct* PCR dan cara standar yang didahului dengan isolasi DNA sebagai pembanding. Proses amplifikasi dilakukan dengan prinsip PCR Multiplex menggunakan 2 pasang primer (1st Base Oligos) dengan target gen *dtx/tox* region A dan gen *dtxR*. Panjang produk PCR adalah 551 bp untuk gen *tox* region A dan 168 untuk gen *dtxR*.

Komposisi dan konsentrasi Untuk *direct* PCR terdiri dari 12,5 uL Kapa Multiplex 2G fast (Kapa Biosystem) yang berisi DNA polymerase 1 U, PCR buffer, dNTP 0,2 mM, MgCl 3 mM dan stabilizer, ditambah dengan 0,5 uL (0,2 uM) masing-masing primer, 8 uL molecular water (Genekam) dan 2,5 uL *crude sample*. Proses amplifikasi menggunakan mesin *thermal cycler* C1000 (Biorad) mengikuti kondisi PCR sebagai berikut: 97°C selama 15 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari 95°C selama 15 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Untuk PCR *standard*, komposisi dan konsentrasi PCR terdiri dari 12,5 uL Kapa Multiplex 2G fast (Kapa Biosystem), 0,5 uL masing-masing primer, 8 uL molecular water (Genekam) dan 2,5 uL DNA template. Proses amplifikasi menggunakan mesin *thermal cycler* C1000 (Biorad) mengikuti kondisi PCR sebagai berikut: 95°C selama 3 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari 95°C selama 15 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Perbedaan prinsip *direct* PCR dan PCR *standard* dapat dilihat pada Tabel 1.

Produk PCR (amplikon) diparasi dengan mesin elektroforesis (150 Volt selama 30 menit) pada 2% Gel Agarose (Genekam) yang distaining dengan Gel red (Biorad) menggunakan TBE buffer (Invitrogen). Hasil dibaca/divisualisasi dengan Gel doc XR plus (Biorad).

Optimasi. Optimasi dilakukan untuk mendapatkan hasil terbaik dengan *direct* PCR. Suhu untuk inisiasi denaturasi dibuat berjenjang, yaitu 97°C , 98°C dan 99°C selama 10 dan 15 menit. Sampel diencerkan dengan

aquades dengan beberapa kali pengenceran untuk melihat sensitifitas pemeriksaan.

Hasil dan Pembahasan

Pada umumnya, *direct* PCR dilakukan dengan menambahkan beberapa reagen pada PCR *Mix*. Reagen ini berfungsi untuk membantu mengeluarkan DNA dari dalam sel dan mereduksi debris yang dapat menjadi inhibitor pada proses PCR maupun elektroforesis.¹⁶⁻¹⁸ Pada penelitian ini, *direct* PCR berhasil dilakukan hanya dengan memodifikasi suhu pada proses PCR. Suhu untuk inisial denaturasi DNA yang biasanya menggunakan 95°C atau 94°C selama 3-5 menit, dilakukan dengan pemanasan 97°C selama 15 menit. Hal ini dilakukan untuk merusak/lisis dinding sel bakteri sehingga DNA keluar dari dalam sel dan sekaligus terdenaturasi. Pemilihan suhu dilakukan berdasarkan hasil optimasi yang dilakukan, dimana suhu tersebut memberikan hasil terbaik (hasil optimasi tidak ditampilkan). Suhu yang lebih rendah akan menurunkan efektifitas lisis dinding sel sehingga tidak cukup banyak DNA yang dapat teramplifikasi, sebaliknya suhu lebih tinggi meskipun akan meningkatkan dan mempersingkat proses lisis dinding sel, tapi ini dapat merusak enzim DNA polymerase yang merupakan komponen utama untuk proses amplifikasi DNA. Oleh karena itu, kondisi PCR yang digunakan bersifat spesifik tergantung dari reagen, terutama DNA polymerase yang digunakan.^{19,20}

Kondisi atau suhu yang digunakan pada *direct* PCR juga tergantung pada sampel yang digunakan. Perbedaan komposisi, terutama dinding sel akan mempengaruhi keberhasilan dan efektifitas *direct* PCR dan ini berbeda antara satu jenis sel dengan yang lain. Misalnya, bakteri gram positif cenderung memiliki dinding sel yang relatif lebih kuat daripada bakteri gram negatif, begitu juga sel jaringan pada eukariote akan lebih sulit terdegradasi dibandingkan sel prokariote. Pada penelitian ini *direct* PCR ditujukan untuk membantu menegakkan diagnosis difteri yang disebabkan oleh *Corynebacterium diphtheriae*. *C. diphtheriae* merupakan bakteri gram positif dengan komposisi dinding sel 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.^{11,21} Hasil pemeriksaan sampel dengan *direct PCR* dan *PCR standard* dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 2.

Gambar 1 dan Tabel 2 memperlihatkan bahwa semua isolate *C. diphtheriae* terdeteksi dengan baik menggunakan *direct PCR*, seperti halnya pemeriksaan menggunakan *PCR standard* yang ditandai dengan penampakan pita pada 168 bp dan 551 bp, sementara pada isolate *C.(non) diphtheriae* tidak tampak pita pada region tersebut. Hal serupa juga terlihat pada sampel klinis, dimana sampel positif difteri menunjukkan pita pada 168 dan 551 bp, sementara pada sampel klinis negatif difteri hal tersebut tidak tampak. Hasil ini menunjukkan bahwa pemeriksaan menggunakan *direct PCR* dapat mendeteksi *C. diphtheriae* yang berasal dari

isolat maupun sampel klinis langsung seperti halnya *PCR standard*.

C. diphtheriae dan 2 spesies *Corynebacterium non-diphtheriae* (*C. ulcerans* dan *C. pseudotuberculosis*) dapat menghasilkan toksin difteri yang merupakan faktor virulensi utama bakteri. Produksi toksin disandi oleh seperangkat gen yang disebut gen *tox/dtx*. Gen tersebut dapat dimanfaatkan sebagai penanda toksigenisitas bakteri yang membedakan antara jenis toksigenik (menghasilkan toksin) atau nontoksigenik, seperti yang terlihat pada Gambar 1. Jenis toksigenik memperlihatkan adanya gen *tox* sehingga terlihat pita pada 551 bp (sampel 1-10, dan 14) sesuai panjang produk PCR yang dihasilkan oleh sepasang primer dengan target gen *tox*, sementara jenis nontoksigenik tidak memperlihatkan pita pada daerah tersebut (sampel 11-13).



Gambar 1. Hasil Pemeriksaan *Direct PCR* (A) dan *PCR Standard* (B); M: Marker, 1-10: *C. diphtheriae* Toksigenik, 11-13: *C.(non) diphtheriae*, 14: Sampel Klinis Positif Difteri, 15: Sampel Klinis Negatif Difteri, N: Kontrol Negative

Tabel 2. Perbandingan Hasil Pemeriksaan antara *direct PCR* dan *PCR Standard*

Hasil	<i>Direct PCR</i>	<i>PCR Standard</i>
Isolat		
- Positif difteri	10	10
- Negatif difteri	3	3
Sampel Klinis		
- Positif difteri	1	1
- Negatif difteri	1	1

Fungsi gen *tox* pada *C. diphtheriae* dalam menyandi produksi toksin diregulasi seperangkat gen lain yang disebut gen *dtxR*. Gen ini bekerja dengan bantuan Fe menekan fungsi gen *tox*. Gen *dtxR* dapat dimanfaatkan sebagai penanda *C. diphtheriae* sebagaimana terlihat pada Gambar 1, dimana seluruh *C. diphtheriae* (sampel 1-10 dan 14) memperlihatkan pita pada 168 bp sesuai panjang produk PCR yang dihasilkan sepasang primer dengan target gen *dtxR*.^{15,22,23} Sementara itu, perbandingan waktu dan biaya serta tingkat kesulitan antara *direct* PCR dibandingkan dengan PCR *standard* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. memperlihatkan bahwa *direct* PCR memiliki keistimewaan, dimana waktu lebih cepat, biaya lebih murah, dan prosedur lebih mudah sehingga tidak melelahkan dengan keakuratan hasil serupa dengan PCR *standard*.

Direct PCR memiliki beberapa kelebihan dibandingkan PCR *standard*, seperti penghematan waktu dan biaya serta kemudahan prosedur seperti yang tampak pada Tabel 3. Hal ini terjadi karena pada *direct* PCR tidak membutuhkan proses ekstraksi DNA secara khusus dan terpisah. Ekstraksi DNA dilakukan secara sederhana dengan pemanasan 97 °C selama 15 menit bersamaan dengan inisial denaturasi DNA dalam tabung reaksi yang juga digunakan untuk proses amplifikasi. Proses ekstraksi DNA serupa dengan yang terjadi pada metode *boiling*. Metode ini termasuk cara ekstraksi sederhana yang cukup memadai untuk pemeriksaan PCR *C.*

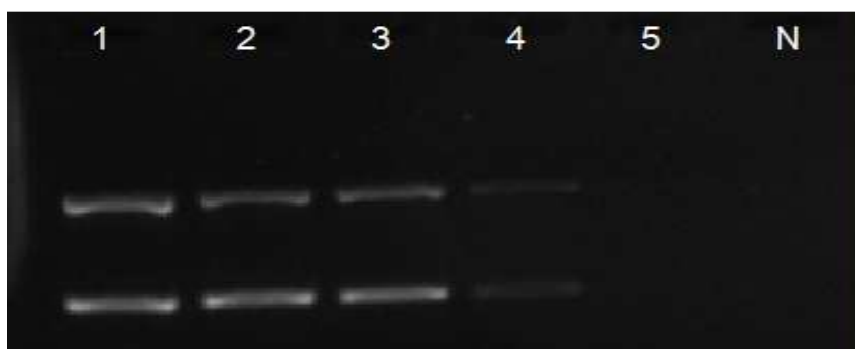
diphtheriae.^{22,24} Hasil pemeriksaan juga menunjukkan bahwa *direct* PCR dengan inisial denaturasi 97 °C selama 15 menit dapat menghasilkan/mengeluarkan cukup banyak DNA dari dalam sel sehingga pemeriksaan dengan *direct* PCR cukup sensitif mendeteksi sejumlah kecil sel bakteri yang ada dalam sampel. Hal ini terlihat dari sensitifitas pemeriksaan dengan beragam pengenceran sampel seperti yang tampak pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan hasil pemeriksaan pada beberapa sampel yang telah diencerkan dan memperlihatkan bahwa *direct* PCR dapat mendeteksi dengan baik sel bakteri hingga pengenceran 10^{-4} (71 CFU/uL). Secara teori, bila efisiensi proses PCR mencapai 100 %, jumlah akhir copy DNA dalam produk PCR dengan 35 cycle adalah $142 \text{ s-d } 143 \times 3,44 \times 10^{10} = 488,48 \text{ s-d } 491,92 \times 10^{10} = 4.884.800.000.000 \text{ s-d } 4.919.200.000.000$ copy DNA. Meskipun demikian, perhitungan jumlah bakteri didasarkan pada pertumbuhan koloni. Hal ini memungkinkan adanya bakteri yang mati tetapi masih memiliki DNA utuh ikut terdeteksi sehingga jumlah sebenarnya sel bakteri dalam sebuah reaksi bisa lebih besar dari jumlah tersebut.

Pengembangan *direct* PCR untuk membantu menegakkan diagnosis sangat dibutuhkan terutama pada kasus dimana suatu penyakit membutuhkan penatalaksanaan sesegera mungkin. Penelitian ini merupakan upaya mengembangkan *direct* PCR untuk membantu menegakkan diagnosis difteri. Penyakit ini membutuhkan

Tabel 3. Perbandingan *Direct* PCR dan PCR *Standard*

	<i>Direct</i> PCR	PCR <i>Standard</i>
Waktu	1-2 jam	3-5 jam
Biaya	25 – 50 rb/sampel	100-150 rb/sampel
Prosedur	Sederhana	Lebih kompleks
Tingkat kesulitan	Mudah	Lebih sulit
Hasil	Akurat	Akurat



Gambar 2.. Hasil Pemeriksaan *Direct* PCR pada beberapa Pengenceran Sampel. 1: Tanpa Pengenceran (71×10^3 CFU/uL), 2: Pengenceran 10^{-2} (71×10^2 CFU/uL), 3: Pengenceran 10^{-3} (71×10 CFU/uL), 4: Pengenceran 10^{-4} (71 CFU/uL), 5: Pengenceran 10^{-5} (9 CFU/uL), N: Kontrol Negative (Aquadest)

penanganan yang tepat sesegera mungkin dengan pemberian antibiotik dan serum anti difteri (ADS) untuk menetralkan toksin difteri yang dikeluarkan bakteri penyebab. Secara invitro, *C. diphtheriae* akan mengeluarkan toksin dalam 24-48 jam. Toksin akan segera menyebar ke seluruh tubuh melalui pembuluh darah dan ditangkap oleh reseptor toksin pada sel target (terutama sel jantung dan saraf). Ikatan toksin dengan reseptor pada permukaan sel menyebabkan proses yang disebut *receptor-mediated endocytosis*. Proses ini menyebabkan toksin masuk ke dalam lisosom dan terjadi translokasi *catalytic 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.^{13,15,25} Oleh karena itu, penundaan pengobatan berarti meningkatkan risiko fatal penderita.

Setiap metode diagnostik memiliki kelebihan dan kekurangan. *Direct PCR* untuk membantu menegakkan diagnosis difteri, sebagaimana *PCR standard* harus tetap diiringi atau dikontrol dengan metode konvensional sebagai *gold standard*. Meskipun sangat jarang, beberapa kasus ditemukan adanya *C. diphtheriae* yang menunjukkan keberadaan gen *tox* namun tidak terekspresi sehingga tidak mengeluarkan toksin difteri secara fenotip. Selain itu, aplikasi *direct PCR* untuk diagnosis difteri menggunakan lebih banyak sampel terutama sampel klinis dibutuhkan untuk lebih memastikan keakuratan pemeriksaan.

Simpulan

Penelitian ini membuktikan bahwa *direct PCR* memberikan hasil yang sama dengan *PCR standard*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *direct PCR* dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan *C. diphtheriae* pada sampel dengan benar dan cukup sensitif. Oleh karena itu disimpulkan bahwa *direct PCR* merupakan metode diagnostik alternatif untuk membantu menegakkan diagnosis difteri secara cepat, mudah dan hemat sehingga penatalaksanaan dapat dilakukan dengan tepat sesegera mungkin dan kematian penderita dapat diturunkan.

Daftar Acuan

1. Handoyo D & Rudiretna A. Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). Unitas, 2001; 9(1):17-29
2. Bellstedt DU, Pirie MD, Visser JC, de Villiers MJ, and Gehrke B. A rapid and inexpensive methods for the direct PCR amplification of DNA from plants. *AJB*.2010;e65-e68.
3. Migliaro D, Morreale G, Gardiman M, Landolfo S and Crespan M. Direct multiplex PCR for grapevine genotyping and varietal identification. *Plant Genetic Resource*.2012:1-4.

4. Pathmanathan SG, Cardona-Castro N, Sa'nchez-Jime'nez MM, Correa-Ochoa MM, Puthuchery SD, and Thong KL. Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the *hliA* gene. *Journal of Medical Microbiology* (2003), 52, 773-776.
5. Sharma R, Kumar V & Mohapatra T. A Simple and Non-destructive Method of Direct-PCR for Plant System. *J. Plant Biol.* (2012) 55:114-122
6. Ahsani MR & Shamsaddini. Compare of two methods of direct PCR and PCR with DNA extraction in *Clostridium perfringens* typing. *IVJ*. 2013; 8(4): 102-113.
7. Tjhie JHT, van Kuppeveld FJM, Roosendaal R, Melchers WJG, Gordijn R, MacLaren DM, Walboomers JMM, Meijer CJLM, and vanden Brule AJC. Direct PCR Enables Detection of *Mycoplasma pneumonia* in Patients with Respiratory Tract Infection. *JCM*.1994;32(1):11-16.
8. Renton BJ, Morrel PD, Cooke RPD, and Davis PDO. Direct real-time PCR examination for *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples can be cost effective. *SciRes*. 2009;1(2):63-66.
9. Swaran YC & Welch L. Successful Generation of DNA profiles using Direct PCR. *MJSF*. 2011;2(1):46-49.
10. Acang N. Difteri. Dalam: Noer HMS, editor. Ilmu Penyakit Dalam Jilid 1 Ed. ke-3. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 1996.
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 Diphtheria during the Russian Epidemic of the 1990s (dissertation). Finlandia: University of Tampere; 2003.
13. 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.
14. 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.
15. Guilfoile PG. Deadly diseases and epidemics: diphtheria. New York: Chelsea House Publishers; 2009
16. Grevelding CG, Kampkotter A, Hollmann M, Schafer U, and Kunz W. Direct PCR on fruitflies and blood flukes without prior DNA isolation. *Nucleic Acid Research*. 1996;24(20):4100-4101.
17. Demeke T & Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 396:1977-1990.

18. Pak YC & Andre C. Direct PCR from mouse Tissue using PhireTM Hot Start DNA Polymerase and PikoTM Thermal Cycler. Finnzymes Oy. Application Note.
19. Viljoen GJ, Nel LH, and Crowther JR. Molecular Diagnostic PCR Handbook. 2005; Netherland:Springer.
20. Da Silva GA, Bernardi TL, Schaker PDC, Menegotto M, and Valente P. Rapid Yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. Braz.Arch.Biol.Technol. 2012; 55(2):319-327.
21. Trivedi PC, Pandey S, Bhadauria S. Text Book of Microbiology. 2010. Jaipur, India: Aavishkar publishers.
22. 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.
23. Sunarno, Kambang Sariadji, Holly Arif Wibowo. Potensi gen dtx dan dtxR sebagai marker untuk deteksi dan pemeriksaan toksigenisitas *Corynebacterium diphtheriae*. Bullet. Penelit. Kesehat. 2013.
24. Sunarno, Muna F, Fitri N, Malik A, Karuniawati A, Soebandrio A. Metode Cepat ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* untuk pemeriksaan PCR. (Dalam proses publikasi)
25. Collier RJ. Diphtheria Toxin: Mode of Action and Structure. Bacteriological Reviews. 1975;39(1):54-85.