

Perbandingan Pemeriksaan Toksigenisitas secara Genotip dan Fenotip pada Beberapa Isolat *Corynebacterium diphtheriae* Penyebab Difteri di Indonesia

Sunarno¹, Kambang Sariadji²

²Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Email: kambang@gmail.com

Abstract

*Corynebacterium diphtheriae's toxin can be detected by using in vivo and in vitro examination. Detection of the toxin using the guinea pig is a gold standard. This method requires a long time and has been opposed by animal right organization. There is another alternative method such as vero cell cytotoxicity and Elek test. The limitation of these methods are reagent procurements, technical skill, and a long processing time. Other alternative method like polymerase chain reaction (PCR) can overcome the limitation. PCR can detect the toxin quickly and the results can be interpreted easily. Some previous study showed there was the difference results between PCR and Elek test or vero cell cytotoxicity. The Aim of this study is to compare genotypic toxin detection using PCR and phenotypic detection using Elek test, on some isolates that caused diphtheria outbreak in Indonesia. A total of 12 isolates have been tested in this study. These isolates were obtained from the outbreak cases in Indonesia and isolated in Bacteriology Laboratory, Center for Research and Development of Biomedical and Basic Technology of Health. This study used reference strains as positive and negative controls (NCTC 10648, NCTC 3984 and NCTC 10356). All samples were examined by PCR for toxin genotyping detection, and Elek test for phenotyping detection. The results showed as many as 10 isolates were toxigenic *C. diphtheriae* while the remaining were non-toxigenic. There was no nontoxigenic tox-gene bearing (NTTB). There were no difference results between PCR and Elek test to detect the toxin. Base on the results of this study, there was a 100% conformity results between PCR and Elek test to detect the toxin of *C. diphtheriae*.*

Key word: *C. diphtheria, toxigenicity, PCR, Elek test.*

Abstrak

Toksigenisitas (kemampuan mengeluarkan toksin) *Corynebacterium diphtheriae* dapat diketahui dengan pemeriksaan in vivo maupun in vitro. Pemeriksaan in vivo menggunakan guinea pig sebagai gold standard banyak ditentang pecinta binatang dan memakan waktu cukup lama. Sebagai alternatif gold standard adalah vero cell cytotoxicity dan Elek test. Kedua pemeriksaan ini terkendala pengadaan reagen, kemampuan teknis dan lama waktu yang dibutuhkan. PCR (polymerase chain reaction) menjadi alternatif pilihan untuk pemeriksaan toksigenisitas secara cepat dan relatif lebih mudah dalam interpretasi hasil. Namun demikian, beberapa penelitian sebelumnya mengindikasikan adanya perbedaan hasil antara PCR dengan Elek test dan vero cell cytotoxicity. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan hasil pemeriksaan toksigenisitas secara genotip menggunakan PCR dan fenotip menggunakan Elek test pada beberapa isolat *C. diphtheriae* penyebab difteri di Indonesia. Sampel penelitian berupa 12 isolat klinis *C. diphtheriae* penyebab kasus difteri di Indonesia, milik Laboratorium Bakteriologi, Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Kontrol positif dan negatif pemeriksaan menggunakan strain referensi (NCTC 10648, NCTC 3984 dan NCTC 10356). Semua sampel diidentifikasi secara genotip menggunakan PCR dan fenotip menggunakan Elek test. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 12 isolat yang diperiksa, 10 diantaranya adalah jenis toksigenik dan 2 lainnya non-toksigenik. Tidak ditemukan adanya strain non-toxigenic tox-gene bearing (NTTB). Hasil yang sama terlihat pada pemeriksaan PCR maupun Elek test. Oleh karena itu disimpulkan bahwa pada penelitian ini kesesuaian hasil pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* penyebab kasus difteri di Indonesia secara genotip menggunakan PCR dan fenotip menggunakan Elek test mencapai 100%.

Kata kunci: *C. diphtheriae, toksigenisitas, PCR, Elek test.*

Pendahuluan

Corynebacterium diphtheriae adalah agen penyebab penyakit difteri dan merupakan spesies utama penyebab penyakit pada manusia dari Genus *Corynebacterium*.¹ Sebelum era vaksinasi, difteri merupakan penyebab utama kematian pada anak-anak. Sejak dilakukannya program imunisasi secara global, kasus difteri menurun secara signifikan di berbagai belahan dunia.² Namun demikian, difteri belum bisa dieradikasi, wabah difteri tetap terjadi di berbagai negara. Kasus wabah difteri terbesar pada era vaksinasi terjadi di Rusia dan negara-negara bekas Uni Soviet tahun 1990-an dengan korban lebih dari 4.000 penderita meninggal dunia.^{3,4} Khusus di Indonesia, kejadian luar biasa (KLB) difteri terjadi hampir di seluruh provinsi. Pada beberapa tahun terakhir, Indonesia selalu menempati peringkat ke-2 penderita difteri terbanyak setelah India, baru pada tahun 2014 dan 2015 menempati peringkat ke-3 setelah terjadi peningkatan kasus di Nepal dan Madagascar.^{5,6}

Faktor virulensi utama *C. diphtheriae* adalah toksin difteri yang berhubungan dengan gambaran sistemik penyakit difteri. *C. diphtheriae* yang masuk ke dalam tubuh, melekat dan berkembang biak pada mukosa saluran nafas atas. Bakteri akan mengeluarkan beberapa produk metabolit, diantaranya toksin difteri. Toksin yang terbentuk akan diserap melalui membran mukosa, menimbulkan peradangan, destruksi sel epitel dan akhirnya terjadinya nekrosis. Pada daerah nekrosis terbentuk fibrin yang diinfiltrasi leukosit. Hal ini menyebabkan terbentuknya membran palsu yang sulit terlepas dan mudah berdarah. Membran palsu (*pseudomembran*) biasanya terbentuk pada tonsil, faring, laring, bahkan bisa meluas sampai dengan trakhea dan bronkhus. *Pseudomembran* ini diikuti

dengan edema jaringan mukosa di bawahnya sehingga dapat menyebabkan terjadinya obstruksi saluran nafas. Selanjutnya toksin akan memasuki peredaran darah dan menyerang berbagai organ terutama sel jantung dan saraf karena pada tempat tersebut terdapat banyak reseptor toksin difteri. Efek pada jantung dapat mengakibatkan terjadinya *myocarditis* dan payah jantung, sedangkan pada jaringan saraf akan menyebabkan terjadinya polineuropati. Kematian biasanya disebabkan gagal jantung dan gangguan pernafasan.^{7,8,9,10}

Berdasarkan kemampuannya dalam menghasilkan toksin difteri, *C. diphtheriae* dibedakan menjadi 2, yaitu toksigenik dan non-toksigenik. Bakteri yang mampu menghasilkan toksin difteri disebut strain toksigenik, sementara bakteri yang tidak mampu memproduksi toksin disebut strain non-toksigenik.^{11,12} Selain itu ada yang dikenal dengan istilah strain *nontoxigenic tox-gene bearing* (NTTB). Strain NTTB adalah bakteri yang secara genetik memiliki gen pengkode sintesis toksin (gen *tox*), namun tidak terekspresi sehingga secara fenotif tidak menghasilkan toksin.^{13,14} Gen *tox* merupakan seperangkat gen yang dibawa oleh *Corynephage*, sejenis virus yang menginfeksi bakteri penyebab difteri. Jika terjadi proses lysogenik, gen *tox* akan terinsersi ke dalam kromosom bakteri dan mempengaruhi perilaku bakteri tersebut yang pada awalnya bersifat non-toksigenik akan menjadi toksigenik.¹⁵ Gen *tox* inilah yang dideteksi dan digunakan sebagai penanda toksigenisitas bakteri secara genotip pada pemeriksaan PCR.^{16,17,18}

Pemeriksaan toksigenisitas secara genotip dengan PCR menjadi alternatif pilihan di banyak laboratorium karena lebih cepat dan relatif lebih mudah dalam interpretasi hasil.¹⁹ PCR juga bermanfaat untuk pemeriksaan toksigenisitas pada kasus yang —bakterinya tidak dapat

diisolasi (kultur negatif). Namun seperti telah dikemukakan di awal bahwa pada strain NTTB, secara fenotip bakteri tidak menghasilkan toksin difteri. Dalam kasus demikian, akan terjadi perbedaan hasil pemeriksaan antara metode PCR yang berbasis genotip dengan metode konvensional yang berbasis fenotip. Ada beberapa penelitian yang menemukan ketidaksesuaian hasil PCR dibandingkan dengan metode konvensional (Elek test dan *vero cell cytotoxicity*).^{20,21}

Elek test dan *vero cell cytotoxicity* merupakan alternatif *gold standard* pemeriksaan toksigenisitas bakteri penyebab difteri yang dalam pemeriksaan dengan guinea pig sebagai *gold standard* menemui banyak hambatan. Namun, aplikasi kedua pemeriksaan ini di laboratorium sering terkendala masalah ketersediaan bahan, keterbatasan kemampuan teknisi dan lama waktu yang dibutuhkan.^{22,23} Di sisi lain, realitas di lapangan menunjukkan bahwa jumlah strain NTTB tidak banyak ditemukan sehingga pada beberapa penelitian, kesesuaian hasil antara PCR dan metode konvensional mencapai 100%.^{16,18} Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan hasil pemeriksaan toksigenisitas secara genotip menggunakan PCR dan fenotip menggunakan Elek test pada beberapa isolat *C. diphtheriae* penyebab difteri di Indonesia.

Metode

Sampel

Penggunaan sampel isolat klinis dan seluruh prosedur yang ada dalam penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Badan Litbangkes No. LB.02.01/52/KE.200/2014. Sampel penelitian berupa 12 isolat klinis *C. diphtheriae* penyebab kasus difteri di Indonesia (milik Laboratorium Bakteriologi, Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan). Tiga isolat *C. diphtheriae* strain referensi (NCTC 10648, NCTC 3984 dan NCTC 10356)

digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif pemeriksaan. NCTC 10648 dan NCTC 3984 adalah *C. diphtheriae* toksigenik yang mampu menghasilkan toksin difteri. NCTC 10356 adalah *C. diphtheriae* biotipe belfanti yang tidak mampu menghasilkan toksin difteri (non-toksigenik). Isolat referensi diperoleh dari *Health Protection Agency* (HPA) United Kingdom melalui Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

Seluruh sampel baik isolat klinik maupun isolat strain referensi dikultur pada medium agar darah dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sel bakteri dipanen dari koloni yang tumbuh untuk pemeriksaan toksigenisitas secara genotip menggunakan PCR maupun fenotip menggunakan *Elek test*.

Elek Test

Pemeriksaan toksigenisitas secara fenotip dilakukan dengan metode *Elek test* yang telah dimodifikasi mengikuti prosedur yang dikembangkan oleh Engler, et.al.²⁴ Elek base medium 2,5 ml dalam tabung reaksi disterilisasi dengan autoclave 121 °C selama 15 menit, didiamkan sampai suhu 55 °C, ditambahkan/dicampur dengan 0,5 ml Newborn Bovine Serum (Sigma) dan dituang ke *petri disc* kecil (diameter 4,5 cm). *Disc* antitoksin berisi 10 IU ADS (Biofarma) diletakkan di bagian tengah *petri disc* dan isolat *C. diphtheriae* diinokulasi pada bagian tepi dengan jarak 1 cm dari disk antitoksin. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Presipitasi berbentuk garis putih dievaluasi di antara disk antitoksin dan inokulasi bakteri. Bila terlihat garis presipitasi maka disimpulkan hasil *Elek test* positif dan jika tidak terlihat presipitasi maka hasil dianggap negatif.

Elek base medium dibuat berdasarkan formula yang dikembangkan dan dipublikasi oleh Stephen D. Elek tahun 1949.²⁵ Campuran pertama terdiri dari 22 gr proteose peptone (difco), 3 gr maltose (Merk), dan 0,7 ml asam laktat

(Oxoid) dilarutkan dalam Aquadest 500 ml ditambah dengan 40% NaOH, kemudian direbus sampai semua bahan terlarut dan disaring dengan kertas filter. Untuk membuat pH 7,8 ditambahkan HCL. Campuran kedua terdiri dari 3% *agar base* ditambah 1% NaCl dan HCL untuk membuat pH 7,8 dalam 500 ml aquadest. Setelah disaring, campuran pertama ditambah campuran kedua, dimasukkan ke dalam tabung, dan disterilisasi dengan autoclave 121 °C selama 10 menit.

PCR

Pemeriksaan toksigenitas secara genotip dilakukan dengan metode PCR. Ekstraksi DNA dilakukan dengan kit komersial QiaAmp DNA Minikit (Qiagen). Prosedur ekstraksi mengikuti petunjuk yang terlampir dalam kit dengan sedikit modifikasi pada volume sampel dan volume akhir. Sebanyak 100 ul suspensi sel dimasukkan dalam microtube 1,5 ml ditambahkan dengan 20 ul proteinase K dan 200 ul buffer AL, dihomogenisasi dengan vortex selama 15 detik dan diinkubasi pada suhu 56 °C selama 10 menit serta 95 °C selama 5 menit. Campuran tersebut ditambah dengan 100 ul ethanol absolut, dihomogenisasi dengan vortex selama 15 detik, kemudian dipindahkan dalam *tube* berfilter (*mini column*) dan disentrifugasi 8.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dan filter dibilas dengan 750 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

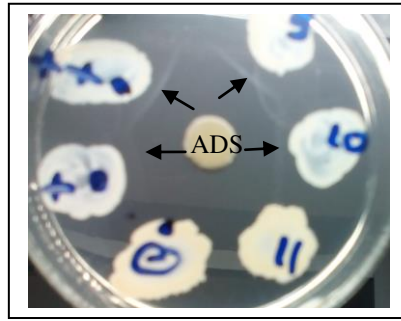
sentrifugasi kering dengan kekuatan 14.000 rpm selama 1 menit. Terakhir, filter ditempatkan pada tabung baru, dibilas dengan 200 ul buffer AE, dan disentrifugasi 8.000 rpm selama 1 menit. Filter dibuang dan supernatant disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan sebagai *template* DNA.

Proses amplifikasi dilakukan menggunakan sepasang primer (1st Base Oligos) dengan target gen *dtx/tox* dengan panjang produk PCR 551 bp. Sekuens primer adalah sebagai berikut:

Forward Primer (F) : 5'-
CAAAGGTTTCGGTGATGGTGCTTC -
3'

Reverse Primer (R) : 5'-
GACAATTCAGGATGCTCTAATGCC -
3'

Volume final sebanyak 25 ul terdiri dari 12,5 ul Kapa Multiplex 2G fast (Kapa Biosystem), 1,25 ul masing-masing primer, 8 ul molecular water (Genekam) dan 2 ul template DNA. 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. Produk PCR (amplikon) diseparasi dengan mesin elektroforesis (150 Volt selama 30 menit) pada 2% Gel Agarose (Genekam) yang diwarnai dengan Gel red (Biotium) menggunakan TBE buffer (Invitrogen). Hasil dibaca/divisualisasi dengan Gel doc XR plus (Biorad).



Gambar 1
Hasil Elek test: garis presipitasi ditunjukkan dengan tanda panah

Hasil

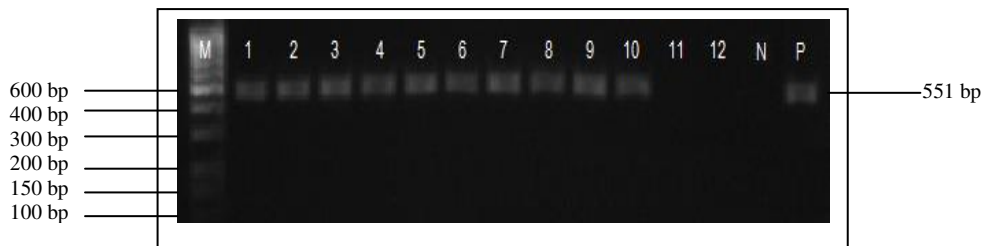
Elek test

Gambaran hasil pemeriksaan Elek test dapat dilihat pada Gambar 1. Gambar 1 menunjukkan bahwa garis presipitasi berwarna putih di antara cakram antitoksin (tengah) dan tempat inokulasi bakteri terlihat pada kedua

kontrol positif (++) dan (+) serta sampel no 9 dan 10. Hal ini menunjukkan bahwa sampel tersebut merupakan jenis toksigenik. Sementara itu, pada kontrol negatif (-) dan sampel nomor 11 tidak terlihat adanya garis presipitasi. Hal ini menunjukkan bahwa sampel tersebut merupakan jenis non-toksigenik.

PCR

Hasil pemeriksaan toksigenisitas dengan PCR dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil pemeriksaan toksigenisitas dengan PCR: Marker, 100 bp DNA ladder (M), *C. diphtheriae* toksigenik (1-10), *C. diphtheriae* non-toksigenik (11-12), kontrol negatif dengan ddH₂O (N), kontrol positif (P)

Gambar 2 menunjukkan bahwa pita dengan panjang sekitar 551 bp terlihat pada sampel 1-10, sebagaimana terlihat juga pada kontrol positif (P). Hal ini menunjukkan adanya gen *tox* pada sampel dan disimpulkan bahwa hasil positif toksigenik. Sementara itu pada sampel 11 dan 12, pita tidak terlihat

sama sekali sebagaimana juga tidak terlihat pada kontrol negatif (N). Hal ini menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut adalah jenis non-toksigenik.

Perbandingan hasil pemeriksaan PCR dan *Elek test* semua sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan hasil PCR dan *Elek test*.

| No Sampel | PCR | Elek test | Keterangan |
|-----------|----------------|----------------|------------|
| Sampel 01 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 02 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 03 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 04 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 05 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 06 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 07 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 08 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 09 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 10 | Toksigenik | Toksigenik | Sesuai |
| Sampel 11 | Non-toksigenik | Non-toksigenik | Sesuai |
| Sampel 12 | Non-toksigenik | Non-toksigenik | Sesuai |

Pembahasan

Toksin difteri disintesis sebagai polipeptida rantai tunggal dengan berat molekul sekitar 62.000 dalton. Toksin difteri dapat dipecah dengan enzim protease menjadi 2 fragmen, A (*active* atau *catalytic domain*) dan B (*binding domain*). Fragmen A merupakan bagian aktif toksin yang berhubungan dengan efek letal sel host, sedangkan fragmen B merupakan bagian yang berikatan dengan reseptor pada permukaan sel host. Kedua fragmen dihubungkan dengan ikatan *single disulfide*. Pada keadaan absensi fragmen B, fragmen A adalah non toksik karena tidak dapat menyeberangi membran plasma untuk menjangkau sitoplasma. Ikatan fragmen B dengan reseptor pada permukaan sel host yang disebut *heparin binding epidermal growth factor* (HB-EGF) menyebabkan terjadinya proses *receptor-mediated endocytosis*. Proses ini berakibat pada masuknya toksin difteri ke dalam sel. Perubahan pH lingkungan sekitar menyebabkan terjadinya translokasi fragmen A ke dalam sitosol. Fragmen A akan menginaktivasi protein seluler yang disebut *elongation factor 2* (EF-2). Hal

ini berdampak pada kegagalan sintesis protein dan pada akhirnya terjadi kematian sel.^{26,27}

Pemeriksaan toksigenisitas bakteri *C. diphtheriae* penting dilakukan untuk kepentingan investigasi kasus dan pengobatan. Strain toksigenik membutuhkan penatalaksanaan sesegera mungkin dengan antibiotik dan ADS (serum anti difteri). Keterlambatan pengobatan akan menyebabkan toksin menyebar ke seluruh tubuh dan berikatan dengan reseptor toksin pada permukaan sel, terutama sel saraf dan jantung. Toksin yang telah berikatan dengan permukaan sel tidak dapat dinetralisasi dengan ADS sehingga sel akan mengalami kerusakan dan kematian. Oleh karena itu, seharusnya ADS telah diberikan pada 3 hari pertama sejak timbul gejala klinis.¹⁰

Pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* dapat dilakukan secara genotip maupun fenotip. Pemeriksaan toksigenisitas secara fenotip yang dilakukan dengan *Elek test*, sebagaimana terlihat pada Gambar 1 menggunakan prinsip immunopresipitasi. Antigen berupa toksin difteri yang dihasilkan oleh bakteri penyebab difteri

(yang diinokulasi) akan berikatan dengan antibodi (ADS) yang berasal dari disc antitoksin. Ikatan tersebut akan membentuk garis presipitasi yang dapat diamati dengan mata telanjang. Ketebalan medium, jarak antara tempat inokulasi bakteri dengan disc antitoksin dan kadar antitoksin dalam disc, bahkan asal atau pabrik pembuat reagen pun dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan.^{24,25} Elek test ditemukan dan dipublikasikan oleh Stephen Elek tahun 1949.²⁵ Beberapa modifikasi telah dilakukan untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal. Pemeriksaan toksigenisitas bakteri secara fenotip dengan Elek test memiliki beberapa kendala untuk dilaksanakan secara rutin, diantaranya keterampilan teknis dan lamanya waktu yang dibutuhkan.²³

Pemeriksaan toksigenisitas secara genotip dengan PCR sebagaimana terlihat pada Gambar 2 memiliki keunggulan dari sisi kecepatan dan kemudahan dalam interpretasi hasil. Berbagai cara dan modifikasi telah dilakukan untuk mendapatkan hasil yang optimal. Nakao, et al. (1997) mengembangkan PCR untuk diaplikasikan pada spesimen klinis (swab tenggorok dan nasofaring).¹⁸ Ahmed, et al menggunakan PCR untuk deteksi *C. diphtheriae* toksigenik pada susu.²⁸ PCR untuk pemeriksaan difteri terus dikembangkan dengan teknik *Real Time PCR*, *Light Cycler PCR*, dan PCR multipleks.^{17,29,30} Namun demikian, pemeriksaan PCR pada umumnya memiliki keterbatasan untuk identifikasi toksigenisitas strain NTTB sehingga lebih banyak digunakan untuk kepentingan skrining toksigenisitas bakteri dan dilanjutkan dengan Elek test. Metode PCR yang digunakan pada penelitian ini adalah *in-house PCR* dengan sepasang primer yang didesain untuk tidak mengamplifikasi beberapa strain NTTB. Hal ini dilakukan dengan

menempatkan salah satu mutasi pada strain NTTB sebagai tempat penempelan ujung 3' primer PCR.

Hasil penelitian sebagaimana terlihat pada Tabel 1. menunjukkan bahwa pemeriksaan toksigenisitas 12 isolat *C. diphtheriae* penyebab kasus difteri di Indonesia menggunakan PCR, 100% sesuai dengan hasil pemeriksaan Elek test. Kedua metode tersebut mengidentifikasi 10 strain toksigenik dan 2 strain non-toksigenik dari 12 sampel yang diperiksa. Kesesuaian hasil toksigenisitas antara pemeriksaan secara genotip dan fenotip ini dapat terjadi karena tidak adanya strain NTTB diantara 12 sampel atau ada strain NTTB namun tidak terjadi hibridisasi dan amplifikasi "*pseudogen*" *tox* pada strain tersebut. Hasil penelitian ini serupa dengan penelitian lain yang dilakukan Nakao, et.al dan Pimenta, et al.^{17,18} Penelitian ini memiliki keterbatasan pada jumlah sampel sehingga perlu dilakukan evaluasi dengan jumlah sampel yang lebih banyak.

Kesimpulan

Pada penelitian ini kesesuaian hasil pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* penyebab kasus difteri di Indonesia secara genotip menggunakan PCR dan fenotip menggunakan Elek test mencapai 100%.

Saran

PCR merupakan metode alternatif yang cepat, terutama untuk skrining pemeriksaan toksigenisitas *C. diphtheriae* yang dapat diaplikasikan di laboratorium. Namun demikian, kepastian toksigenisitas bakteri secara fenotip dengan pemeriksaan *Elek test* maupun yang lain tetap disarankan untuk dilakukan.

Daftar Rujukan

1. Burkovski A. Diphtheria and its Etiological Agent. In: Burkovski A, Editor. *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. 2014. Springer. <http://libgen.org/> (Accessed 27 February 2015).
2. Tasman A & Lansberg HP. Problem concerning the prophylaxis, pathogenesis and therapy of diphtheria. *Bull Wld Hlth Org.* 1957;16:939-973.
3. Adler NR, Mahony A, and Friedman ND. Diphtheria: forgotten, but not gone. *Inter Med J.* 2013;206-210.
4. Hardy IRB, Dittmann S, and Sutter RW. Current situation and control strategies for resurgence of diphtheria in newly independent states of the former Soviet Union. *The Lancet.* 1996;347(9017):1739-1744.
5. CDC Indonesia, Ministry of Health. Diphtheria Surveillance Data -- Monthly Integrated VPD Report. Indonesia: 2014.
6. WHO. Diphtheria reported cases. http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidence/diphtheria.html (Accessed 27 September 2016)
7. Todar K. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Updated 2009. <http://textbookofbacteriology.net/diphtheria.html>. (Accessed 27 February 2015).
8. Nursyamsi-Agustina N, Wahyutomo R, Hapsari MMDEAH, and Wahjono H. Tonsilopharyngitis diphtheriae complicated with diphtheritic myocarditis in 13 years old girl at DR Kariadi Hospital Semarang-Indonesia. *JCMID.* 2014;1(1):2355-1909.
9. Kolybo DV, Labyntsev AA, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OM, Korotkevich NV, and Komisarenko SV. Immunobiology of diphtheria. Recent approaches for the prevention, diagnosis, and treatment of disease. *Biotechnologia Acta.* 2013;6(4):43-62.
10. Lumio J. Studies on the Epidemiology and Clinical Characteristics of Diphtheria during the Russian Epidemic of the 1990s. Dissertation. Finlandia: University of Tampere; 2003.
11. Shashikala P, Reddy PVV, Prashant K, Kanungo R, Devi S, Anitha P, Rajarajeshwari, and Cherian TM. Persistence of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* Biotype Gravis Strains in Pondicherry, Southern India. *J Clin Microbiol.* 2010;49(2):763-764.
12. Shashikala P, Reddy PVV, Prashant K, Kanungo R, Devi S, Anitha P, Rajarajeshwari, and Cherian TM. Persistence of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* Biotype Gravis Strains in Pondicherry, Southern India. *J Clin Microbiol.* 2010;49(2):763-764.
13. Eisenberg T, Kutzer P, Peters M, Sing A, Contzen M, and Rau J. Nontoxigenic toxin-bearing *Corynebacterium ulcerans* Infection among Game Animals, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(3):448-452.
14. Zakikhany K, Neal S, and Efstratiou. Emergence and molecular characterization of non-toxigenic toxin gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovar mitis in the United Kingdom, 2003-2012. *Euro Surveill.* 2014;19(22):1-8.
15. Sekizuka T, Yamamoto A, Komiya T, Kenri T, Takeuchi F, Shibayama K, Takahashi M, Kuroda M, and Iwaki M. *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C.diphtheriae* NCTC 13129 prophage. *BMC Microbiology.* 2012;12:72.
16. Sunarno, Kambang Sariadji, Holly Arif Wibowo. Potensi gen dtx dan dtxR sebagai marker untuk deteksi dan pemeriksaan toksigenisitas *Corynebacterium diphtheriae*. *Bullet. Penelit. Kesehatan.* 2013;41(1):1-10.
17. 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.
18. 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.
19. Sunarno, Sariadji K, Rizky A. Malik A, Karunaiwati A, Soebandrio A. *Direct Polymerase Chain Reaction*, sebuah metode alternatif untuk diagnosis difteri secara cepat, mudah dan hemat. *Makara seri Kesehatan.* 2013;17(2):88-94
20. Wagner KS, White JM, Neal S, Crowcroft NS, Kupreviciene N, Paberza R, Lucenko I, Joks U, Akbas E, Athanassoulis HA,

- Detcheva A, Vuopio J, von Hunolstein C, Murphy PG, Andrews N, and Efstratiou A. Screening for *Corynebacterium diphtheriae* and *C.ulcerans* in patients with upper respiratory tract infections 2007-2008: a multicentre European study. *Clin Microb Infect.* 2010;17(4):519-525.
21. Hall AJ, Cassidy PK, Bernard KA, Bolt F, Steigerwalt AG, Bixler D, Pawloski LC, et al. Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(4):688-691.
 22. Babychh EM, Ryzhkova TA, Kalinichenco SV, and Sklyar NI. General characteristic of the methods for detection of diphtheria toxin. *Annals of Mechnickov Institute.* 2008;N4:19-21.
 23. Neal SE & Efstratiou A. International External Quality assurance for Laboratory Diagnosis of Diphtheria. *J Clin Microbiol.* 2009;47(12):4037-4042.
 24. 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
 25. Elek SD. The Plate Virulence Test for Diphtheria. *J Clin Path.* 1949;2:250-258.
 26. Guilfoile PG. Deadly diseases and epidemics: diphtheria. 2009 New York: Chelsea House Publishers. <http://libgen.org/> (Accessed 27 February 2015).
 27. Murphy JR. Mechanism of Diphtheria Toxin Catalytic Domain Delivery to the Eukaryotic Cell Cytosol and the Cellular Factors that Directly Participate in the Process. *Toxin.* 2011;3:294-308.
 28. Ahmed AAH, Saad NM, Wahba NM, and Mosa AIH. Polymerase Chain Reaction for Detection of Toxigenic Strains of *Corynebacterium diphtheriae* in Milk and Some Milk Products. *Inter J Dairy Sci.* 2011;6(5):287-294.
 29. Schuegger R, Lindermayer M, Kugler R, Heesemann J, Busch U, and Sing A. Detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheria* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2822-2823.
 30. Sing A, Berger A, Schneider-Brachert W, Holzmann T, and Reischl U. Rapid detection and molecular differentiation of toxigenic *Corynebacterium diphtheria* and *Corynebacterium ulcerans* strains by Light Cycler PCR. *J Clin Microbiol.*2011;49(7):2485-2489.