

Penerapan Diagnostik Laboratorium pada Kasus Tersangka Positif Difteri pada Kejadian Luar Biasa di Kota Pontianak, Kalimantan Barat

Kambang Sariadji, Sunarno, Rudi Hendro Putranto

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes, Kemenkes RI

E-mail: kambang_sar@yahoo.com

Abstract

Based on national health research 2010, the coverage of basic immunization on West Kalimantan were 52,1%. It's causes concern of outbreaks some immunizable prevented diseases in West Kalimantan . One of them is diphtheria. It was reported incidence of diphtheria suspect in Dalam Bugis, Pontianak Timur, Kota Pontianak, West Kalimantan in April 2013. A suspect of 12 years old girl was reported with a clinical diagnosis of diphtheria. Confirmation of positive suspect of diphtheria outbreaks occurred in West Kalimantan. A suspected case of diphtheriae and her mother were taken throat swabs on April 4, 2013, then she was retaken throat swabs and also 29 of her classmate as a contacts of case on April 24th 2013. Microscopic examination by staining Albert. Culture and isolation using blood agar and blood agar telurit. Suspect colonies are followed by biochemical tests using the API Coryne commercial product. Toxigenic test performed by polymerase chain reaction. A suspected case throat swab was taken on 4 April 2013 shows a microscopic results found difteroid form. Then the results of culture, isolation and biochemical have possibility > 89.5% of bacteria *Corynebacterium diphtheriae* type mitis. Toxigenic test showed that positif toxigenic bacteria which characterized by amplification gene *tox (dtx)* along 248 bp. Meanwhile her mother is a negative culture results *C.diphtheriae*. On 24th April 2013 the suspected case was re-taken of throat swab including 29 contacts from her classmate which showing negative culture result of *C.diphtheriae*. The suspected case was infected of *C.diphtheriae* type mitis toxigenic. It's cases makes an outbreak in West Kalimantan.

Key words : *Corynebacterium diphtheriae*, Culture and isolation, Biochemical test

Abstrak

Rendahnya cakupan imunisasi dasar di Provinsi Kalimantan Barat menyebabkan kekhawatiran timbulnya penyakit yang dapat dicegah dengan imunisasi (PD3I) salah satunya adalah difteri. Kejadian difteri yang dilaporkan ini terjadi di Kelurahan Dalam Bugis, Kecamatan Pontianak Timur, Kota Pontianak, Provinsi Kalimantan Barat pada bulan April 2013. dilaporkan adanya kasus suspek dengan diagnosis klinis difteri pada anak perempuan usia 12 tahun. Mengidentifikasi suspek positif kasus kejadian luar biasa difteri yang terjadi di Kalimantan Barat. Suspek dan ibu suspek diambil swab tenggorok tanggal 4 April 2013, kemudian suspek diambil swab tenggorok lagi beserta 29 kontak teman sekolahnya pada tanggal 24 April 2013. dilakukan pemeriksaan secara mikroskopik dengan pewarnaan Albert. Kultur dan isolasi menggunakan medium agar darah dan telurit agar darah. Koloni tersangka dilanjutkan dengan uji biokimia menggunakan produk komersial API Coryne . Uji toksigenitas dilakukan dengan *polymerase chain reaction* Suspek yang diambil swab tenggorok pada tanggal 4 April 2013 menunjukkan hasil mikroskopis ditemukan bentuk difteroid. Hasil kultur, isolasi dan uji biokimia menunjukkan possibility > 89,5 % bakteri *Corynebacterium diphtheriae* tipe mitis. Uji toksigenitas menunjukkan bakteri tersebut toksigenik yang ditandai dengan terbentuk produk amplifikasi dari gen *dtx (tox)* sepanjang 248 pb. Sementara hasil kultur Ibu suspek negatif *C.diphtheriae*. Pada pengambilan swab tenggorok tanggal 24 April 2013 terhadap suspek yang sama dan 29 kontak dari teman kontak menunjukkan hasil kultur negatif *C.diphtheriae*. Suspek terinfeksi *C.diphtheriae* tipe mitis toksigenik yang menjadikan Kasus tersebut menjadi kasus Kejadian Luar Biasa di provinsi Kalimantan Barat.

Kata Kunci : *Corynebacterium diphtheriae*, Kultur dan isolasi, Uji biokimia

Pendahuluan

Mengingat cakupan Imunisasi dasar lengkap di Indonesia yang masih rendah berdasarkan Riset Kesehatan Dasar tahun 2010 yakni 53.8 % menyebabkan kekhawatiran timbulnya penyakit yang dapat dicegah dengan imunisasi (PD3I). Salah satu penyakit tersebut adalah difteri yang disebabkan oleh bakteri *Corynebacterium diphtheria* dari biotipe *gravis*, *mitis* atau *intermedius*. Bakteri ini terutama menyerang tonsil, faring, laring, hidung, adakalanya menyerang selaput lendir atau kulit serta kadang-kadang konjungtiva atau vagina. Gejala difteri adalah tenggorokan terasa sakit, timbul lesi membran diikuti dengan kelenjar limfe yang membesar dan melunak. Pada kasus yang sedang sampai berat ditandai dengan pembengkakan dan oedema di leher dengan pembentukan membran pada trachea secara ekstensif dan dapat terjadi obstruksi jalan napas.^{1,2,3,4}

Di Indonesia berdasarkan data Kementerian Kesehatan, pada tahun 2004 frekuensi kejadian luar biasa (KLB) difteri terjadi 34 kali dengan jumlah kasus 106 di Indonesia. Tahun 2008 ada 77 kali KLB dengan 123 kasus, termasuk di Jawa Timur dengan jumlah kasus 73. Tahun 2011, terjadi KLB di Jatim dengan 330 kasus, 11 orang meninggal awal Oktober 2011. Kejadian luar biasa (KLB) penyakit menular seperti difteri masih sering ditemukan Indonesia. Difteri di Indonesia harusnya sudah bebas mengingat program vaksinasi difteri telah digalakkan, namun demikian adanya satu kasus kejadian difteri maka sudah dapat dianggap suatu keadaan KLB yang harus dan masih perhatian serius pemerintah.³

Rendahnya cakupan imunisasi dasar lengkap di Provinsi Kalimantan Barat yakni sebesar 52.1 % serta tingginya mobilisasi penduduk dari Jawa ke Kalimantan dan sebaliknya ini berdampak pada salah satu masalah timbulnya penyakit difteri. Seperti yang terjadi di Kelurahan Dalam Bugis, Kecamatan Pontianak

Timur, Provinsi Kalimantan Barat bulan April 2013 lalu, dilaporkan adanya kasus difteri pada anak perempuan usia 12 tahun dengan gejala demam, susah menelan, *bullneck*, dan timbulnya pseudomembran. Menurut informasi keluarga merasa bahwa pasien tersebut telah mendapatkan imunisasi dasar yang lengkap. Informasi lainnya pasien baru pulang dari berkunjung ke Madura, Jawa Timur.^{4,5}

Saat ini diagnosis laboratorium difteri ditegakkan dengan menggunakan metode konvensional kultur dan uji toksigenitas dilakukan dengan menggunakan elek test. Pada kasus KLB ini diagnosis laboratorium ditegakkan menggunakan serangkaian uji yakni mikroskopik, kultur, uji biokimia dengan *Analytical Profile Index* (API) test dan uji toksigenitas test menggunakan PCR. Serangkaian uji ini diharapkan dapat mengidentifikasi kasus tersangka dan kontak difteri secara akurat yang terjadi di Kalimantan Barat.

Investigasi penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mengidentifikasi temuan kasus dan kontak pada kejadian luar biasa difteri di Kelurahan Dalam Bugis, Kecamatan Pontianak Timur, Kota Pontianak, Kalimantan Barat.

Metode

Spesimen tersangka difteri diambil dua kali pengambilan swab tenggorok menggunakan medium transport Amies, yang pertama tanggal 4 April 2013 terhadap tersangka dan ibunya. Spesimen berikutnya tanggal 24 April 2013 terhadap tersangka dan 29 kontak teman sekolahnya. Semua spesimen swab tenggorok diambil oleh petugas surveilans Dinkes Pontianak Provinsi Kalimantan Barat. Spesimen swab tenggorok langsung dikirim ke Laboratorium Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan.

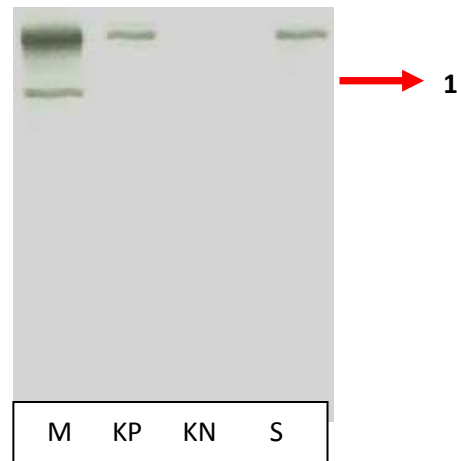
Pemeriksaan laboratorium terdiri dari pemeriksaan mikroskopik, kultur, uji biokimia dan uji toksigenitas. Pertama spesimen swab tenggorok diinokulasi pada medium selektif cystine tellurite blood agar (CTBA), inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Adanya koloni yang diduga koloni *C.diphtheriae* pada medium CTBA dengan ciri koloni bulat, hitam keabuan divalidasi dengan pemeriksaan mikroskopik menggunakan pewarnaan Albert. Morfologi *C.diphtheriae* secara mikroskopik menunjukkan gambaran bentuk batang dengan pembesaran (granul) pada salah satu atau kedua ujungnya. Pengujian dilanjutkan dengan uji biokimia dan uji toksigenitas.⁶

Uji biokimia dilakukan dengan melakukan inokulasi kembali koloni yang diduga pada medium CTBA ke medium agar darah. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan uji biokimia menggunakan produk komersial *API Coryne* dan dianalisis dengan *software* komputer dari pabrikan.⁷ Setelah dipastikan bahwa bakteri yang diperiksa adalah *Corynebacterium diphtheriae*, dilakukan uji toksigenitas untuk mengetahui kemampuan bakteri mengeluarkan toksin difteri yang merupakan faktor virulensi utama bakteri tersebut.

Uji toksigenitas untuk difteri dilakukan dengan metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan Salah satu pasangan primer dengan target gen *tox (dtx)* yakni 5'GTTTGCCTCAATCTTAATAGGG3' (dengan posisi nukleotida 15-36) dan 5'ACCTTGGTGTGATCTACTGTTT3' (dengan posisi nukleotida 1622-1634); dengan *primer* tersebut akan dihasilkan produk PCR (*amplicon*) sepanjang 248 pb (pasang basa). Ekstraksi DNA menggunakan Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen) sesuai dengan prosedur yang dikeluarkan Qiagen.^{8,9}

Hasil

Pada pemeriksaan spesimen pertama tanggal 4 April 2013 terhadap tersangka dan ibu tersangka, ditemukan koloni spesifik difteri pada spesimen tersangka di medium CTBA dengan karakteristik berwarna hitam, bulat, dengan diameter 1-1,5 mm. Adanya pertumbuhan spesifik difteri ini kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan mikroskopik, uji biokimia dan uji toksigenitas. Pada pemeriksaan lanjutan secara mikroskopik ditemukan adanya bentuk difteroid yang merupakan ciri khas dari bakteri genus *Corynebacterium*. Hal ini diperlukan untuk memastikan bahwa bakteri yang akan diperiksa untuk uji biokimia adalah *Corynebacterium*, bukan jenis lain. Pada pemeriksaan dengan uji biokimia menggunakan produk *API Coryne* menunjukkan menunjukkan >89,5% *possibility* spesies *C. diphtheriae* tipe mitis. Hasil uji toksigenitas menunjukkan bakteri tersebut positif toksigenik, hasil pemeriksaan PCR pada Gambar 1. hasil pemeriksaan ibu tersangka tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni, sehingga tidak dilanjutkan pemeriksaan berikutnya.



Keterangan :

- 1 : gen *tox (dtx)* *Corynebacterium diphtheriae*
Ukuran 248 bp
- M : Marker 1000 bp
- KP : Kontrol Positif
- KN : Kontrol Negatif
- S : Sampel suspek

Gambar 1. Hasil Pembacaan Penggandaan Produk DNA pada Spesimen Tersangka dengan Teknik PCR

Pada pemeriksaan spesimen kedua terhadap tersangka dan 29 kontak teman sekolahnya menunjukkan tidak ada pertumbuhan koloni khas difteri pada medium CTBA, sehingga tidak dilakukan pemeriksaan lebih lanjut.

Pembahasan

Pada pengambilan spesimen pertama terhadap tersangka melalui pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan Albert menunjukkan gambaran *metachromatic granules*. Pewarnaan ini dilakukan terhadap koloni tersangka yang tumbuh pada medium TCBA, sehingga lebih mudah dalam pengamatannya. Pengamatan mikroskopik pada pewarnaan langsung dari sampel swab tenggorok memerlukan teknik keahlian dan konsentrasi yang tinggi, karena harus membedakan juga bentuk bakteri lainnya. Pemeriksaan mikroskopik secara langsung dari spesimen klinis tidak dianjurkan untuk menentukan diagnosis karena rawan menimbulkan terjadinya penafsiran negatif dan positif palsu. Diagnosis laboratorium tunggal secara mikroskopik tidak bisa dijadikan penentuan terhadap *C. diphtheriae* karena ada beberapa spesies *Corynebacterium* yang bersifat flora normal mempunyai kesamaan morfologi dengan spesimen *Corynebacterium* lainnya yakni bentuk difteroid. Oleh karena itu perlu dilakukan kultur, reaksi biokimia dan test toksigenisitas.¹⁰⁻¹² Setelah diisolasi pada agar darah, bakteri diidentifikasi lebih lanjut menggunakan uji biokimia komersial API test⁷. Uji biokimia komersial "API Coryne" memiliki keakuratan yang tinggi karena jumlah uji biokimianya lebih banyak (20 test) dibandingkan dengan penggunaan uji biokimia yang sederhana. (5 test)¹⁰

Uji toksigenitas penting untuk diagnostik difteri secara mikrobiologik, diantara semua metode yang ada untuk uji toksigenisitas, PCR banyak dipilih karena cepat dan mudah interpretasinya.^{8,9} Gambar 1 menunjukkan hasil positif difteri pada sampel tersangka ditunjukkan dengan

adanya pita DNA sepanjang 248 pb, yang berarti bahwa sampel tersebut mengandung gen *tox*, yang menyandi toksin difteri. Walaupun hampir dapat dipastikan bakteri tersebut menghasilkan toksin, namun ada kelemahan dari pemeriksaan PCR ini karena ternyata sebagian kuman difteri tidak memproduksi toksin secara biologis, meskipun mempunyai gen *tox* yang menyandi produksi toksin, untuk memastikan toksigenitas kuman difteri perlu dilakukan uji lain (misalnya tes elek).^{8,9,13}

Pada pengambilan spesimen swab tenggorok yang kedua terhadap tersangka dan 29 kontak dari teman terdekat menunjukkan hasil yang negatif terhadap pemeriksaan kultur *C. diphtheriae*. Hasil investigasi dari Dinkes Provinsi Kalimantan Barat dikatakan bahwa setelah diketahui tersangka positif difteri secara klinis, maka dilakukan perawatan karantina dan terapi terhadap tersangka. Terhadap kontak diberikan profilaksis erytromicin selama seminggu. Setelah 20 hari dilakukan pemeriksaan kultur ulang terhadap tersangka ditambah dengan 29 kontak. Hasil negatif kultur ulang difteri terhadap tersangka menunjukkan tersangka tidak lagi mengandung *C. diphtheriae*, dan kondisi tersangka mengalami perbaikan secara klinis.

Pemeriksaan kultur terhadap 29 kontak ini sebagai tindakan preventif untuk mencegah penularan yang lebih luas. Kontak dapat menjadi karier dan dapat menjadi sumber penularan bagi anggota keluarga lainnya dan lingkungannya. Seseorang yang terinfeksi *C. diphtheriae* dengan status adanya riwayat imunisasi DPT tidak menimbulkan gejala, atau sekalipun timbul gejala bersifat ringan, namun berpotensi menjadi sumber penularan.

Melihat dari cakupan imunisasi dasar lengkap di Provinsi Kalimantan Barat yang masih rendah, maka perlu diwaspadai

proses timbulnya serta penularan penyakit difteri dikalangan anak – anak yang belum mendapat imunisasi. Pemberian imunisasi pada seseorang hanya bersifat mencegah bukan berarti bebas dari infeksi bakteri *C.diphtheriae*. Bakteri *C. diphtheriae* akan tetap hidup dan akan menjadi sumber penularan bagi anak – anak yang belum pernah di imunisasi.

Kesimpulan

Dalam menegakkan diagnosis laboratorium difteri dengan menggunakan metode mikroskopik, kultur, identifikasi lanjut dengan uji biokimia API coryne dan uji toksigenitas PCR didapatkan Kasus tersangka positif *C.diphtheriae* yang terjadi di Kelurahan Dalam Bugis, Kecamatan Pontianak Timur, Provinsi Kalimantan Barat.

Saran

Dalam menegakan diagnosis difteri laboratorium mikrobiologi hendaknya melakukan serangkaian metode pemeriksaan mulai dari mikroskopik, kultur, identifikasi lanjut dengan uji biokimia API coryne dan uji toksigenitas PCR, sehingga didapatkan hasil yang akurat

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada, Kepala Dinkes Kota Pontianak dan Kepala Dinkes Provinsi Kalimantan Barat. Penulis mengucapkan terima kasih kepada teman sejawat Laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah membantu selama proses penanganan spesimen KLB difteri.

Daftar Rujukan

1. Kandun I Nyoman. Manual Pemberantasan Penyakit Menular. Dirjen P2PL Departemen Kesehatan, 2000.
2. Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Buku Ajar

Mikrobiologi Kedokteran . Binarupa Aksara. 1993.

3. Ditjen PP&PL Kemenkes RI. Gambaran KLB Difteri Th 2000-2010 di Jawa Timur. 2011.
4. Balitbangkes Kemenkes RI. Riskesdas 2010
5. Dinkes Kota Pontianak, Kalimantan Barat. Laporan Penyelidikan Epidemiologi Kasus KLB difteri di Kelurahan Dalam Bugis Kecamatan Pontianak Timur. 2013
6. Albert H. Diphtheria bacillus stains with a description of A "new" one. The American Journal Of Public Health. 1919:334-337
7. Biomerieuxl. Manual Packed Insert API Coryne .
8. Handayani S. Deteksi Kuman Difteri Dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). CDK-191/ vol. 39 no. 3. 2012
9. Sunarno, Kambang Sariadji , Holly Arif Wibowo. Potensi Gen *dtx* dan *dtxR* sebagai Marker dalam Metode Deteksi dan Pemeriksaan Toksigenitas *Corynebacterium diphtheriae*. 2011.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Elek SD. The Plate Virulence Test for Diphtheria. J. clin. Path. 1949;2:250-258.

