

DETEKSI GEN TOKSIGENIK DIFTERI MENGGUNAKAN *REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-qPCR)* PADA KEJADIAN LUAR BIASA DIFTERI DI JAWA BARAT, INDONESIA

Detection of Diphtheria Toxigenic Genes using Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) during Diphtheria Outbreak in West Java, Indonesia

Adelina Khristiani Rahayu¹, Rifki Walujayati Rachman^{1*}, Akifah Nur'Azmi¹, Annisa Meliana Shani¹, Azzania Fibriani², Naufalni Anwar¹, Gusti Ayu Prani Pradani¹, Ryan Bayusantika Ristandi³, Kiki Homisatul Miskiyah⁴

¹ Divisi Biomolekuler, Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat, Bandung

² Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung

³ Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat, Bandung

⁴ Divisi Mikrobiologi, Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat, Bandung

*Corresponding author

E-mail: rifky26@gmail.com

Abstrak

Difteri merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan adanya Kejadian Luar Biasa (KLB) di Kabupaten Garut, pada bulan Februari 2023. Metode pemeriksaan yang biasa dilakukan di Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat adalah menggunakan kultur difteri, namun metode ini memerlukan waktu yang lama. Penelitian ini dilakukan untuk optimasi metode ekstraksi dan RT-qPCR dalam rangka mendeteksi gen toksigenik difteri pada KLB Difteri di Jawa Barat sebagai metode diagnostik yang lebih cepat. Optimasi metode ekstraksi kultur DNA *C. diphtheriae* dilakukan dengan beberapa metode, yaitu pemanasan (100°C selama 30 menit), *DNA MiniPrep Kit*, dan *DNeasy Blood and Tissue Kit* yang termodifikasi. Hasil optimasi metode ekstraksi kemudian diujikan pada 20 sampel kultur *C. diphtheriae* dan 4 sampel *C. diphtheriae* dari apus tenggorokan dengan hasil kultur positif *C. diphtheriae* untuk membandingkan kesesuaian hasil uji berdasarkan sumber sampel. Selanjutnya, dilakukan pengujian RT-qPCR pada 6 sampel kultur negatif *C. diphtheriae* untuk mendeteksi gen toksigenik. Berdasarkan hasil RT-qPCR diketahui bahwa nilai *cycle threshold* (CT) dari berbagai metode ekstraksi relatif sama, sedangkan metode ekstraksi dengan pemanasan menghasilkan konsentrasi DNA tertinggi. Hasil pemeriksaan RT-qPCR menunjukkan 20 sampel kultur teridentifikasi sebagai difteri toksigenik, dan 4 sampel usap tenggorokan yang diuji secara RT-qPCR dan kultur memberikan hasil pemeriksaan positif *C. diphtheriae* yang sama. Hasil pemeriksaan juga menunjukkan bahwa metode RT-qPCR lebih sensitif daripada metode kultur karena dapat mendeteksi 2 sampel positif *C. diphtheriae* pada sampel usap tenggorokan dengan hasil kultur negatif *C. diphtheriae*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode RT-qPCR berhasil mendeteksi adanya gen toksigenik difteri dengan hasil pemeriksaan yang sama dengan hasil kultur difteri.

Kata kunci: *Corynebacterium diphtheriae*; Difteri; Ekstraksi DNA; RT-qPCR Diagnostik

Abstract

Diphtheria is one of the diseases that caused an outbreak (KLB) in Garut Regency in February 2023. The diagnostic method commonly used at the West Java Provincial Health Laboratory is diphtheria culture; however, this method requires a long processing time. This study aimed to optimize the

© 2025 Sound of Health Journal. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



extraction and RT-qPCR methods to detect the toxigenic gene of diphtheria during the outbreak in West Java as faster diagnostic method. The optimization of C. diphtheriae DNA extraction from cultures was conducted using several methods: heating (100°C for 30 minutes), DNA MiniPrep Kit, and a modified DNeasy Blood and Tissue Kit. The optimized extraction methods were then tested on 20 C. diphtheriae culture samples and 4 throat swab samples with positive C. diphtheriae culture results to compare the consistency of test outcomes based on sample sources. Subsequently, RT-qPCR testing was performed on 6 culture-negative C. diphtheriae samples to detect the tox gene. Based on the RT-qPCR results, the cycle threshold (CT) values obtained from various extraction methods were relatively similar, while extraction method by heating produced the highest DNA concentration. RT-qPCR analysis revealed that all 20 culture samples were identified as toxigenic diphtheria, and the 4 throat swab samples tested by both RT-qPCR and culture yielded consistent positive results for C. diphtheriae. Furthermore, the results indicated that the RT-qPCR method is more sensitive than the culture method, as it was able to detect two positive C. diphtheriae samples from throat swabs that were culture-negative. These findings demonstrate that the RT-qPCR method successfully detected the toxigenic diphtheria gene with diagnostic results consistent with those obtained from diphtheria culture.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae; Diphtheria; DNA extraction; RT-qPCR diagnostic*

PENDAHULUAN

Difteri merupakan penyakit menular disebabkan oleh toksin yang diproduksi oleh bakteri *C. diphtheriae*. Gejala penyakit ini biasanya dimulai sejak 2-5 hari setelah terpapar, yang ditandai dengan gejala berupa demam dan sakit tenggorokan.¹ Pada kasus difteri lebih serius, toksin yang diproduksi oleh *C. diphtheriae* akan mengakibatkan pembentukan bercak tebal berwarna abu-abu atau putih di bagian belakang tenggorokan yang mengakibatkan penyumbatan di area pernapasan. Toksin yang dihasilkan juga dapat masuk ke aliran darah dan menyebabkan komplikasi sistemik lebih serius seperti kerusakan jantung, saraf, dan ginjal, hingga kematian.²

Munculnya kembali wabah difteri yang cukup masif di Indonesia terjadi pada tahun 2017. Pada periode Januari hingga Desember 2017, dilaporkan sebanyak 939 kasus dari 170 daerah di 30 provinsi, dan penambahan kasus terus terjadi hingga tahun 2018.³⁻⁵ Wabah difteri kemudian muncul kembali pada bulan Februari 2023 di kabupaten Garut, hingga Pemerintah Daerah Kabupaten (Pemdakab) Garut menetapkan kasus penyakit difteri di Kabupaten Garut sebagai Kejadian Luar Biasa (KLB) sejak bulan Februari hingga Oktober 2023. Wabah difteri yang muncul kembali tersebut diduga terjadi akibat beberapa pasien yang diketahui tidak menerima vaksin difteri. Pada KLB Difteri di Garut dilaporkan sebanyak 9 orang meninggal dunia.⁶

C. diphtheriae berdasarkan toksigenitasnya dibedakan menjadi dua, yaitu toksigenik dan nontoksigenik. Selain itu dikenal pula *strain nontoxigenic tox-gene bearing* (NTTB), yaitu kelompok yang memiliki gen pengkode toksin (gen tox), namun tidak mengekspresikan gen tersebut, sehingga umumnya *strain* yang mengandung gen tersebut dikelompokkan sebagai difteri nontoksigenik. Struktur gen toksin pada *C. diphtheriae* mengekspresikan protein yang terdiri dari subunit A dan B. Subunit A merupakan domain katalitik, sementara fragmen B merupakan bagian yang berikatan dengan reseptor pada permukaan sel inang.⁷

Pada saat KLB Difteri di Garut terjadi, uji toksigenisitas difteri menggunakan metode Elek belum tersedia untuk dilakukan. Metode Elek merupakan metode pemeriksaan difteri menggunakan prinsip immunopresipitasi. Bila bakteri menghasilkan toksin difteri, maka akan terjadi ikatan antigen-antibodi yang membentuk presipitasi.⁸ Metode tersebut jarang dimiliki oleh laboratorium kesehatan sebagai

pemeriksa sampel difteri karena keterbatasan fasilitas dan lamanya waktu pemeriksaan. Metode pemeriksaan yang dimiliki oleh Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat (Labkes Jawa Barat) dalam memeriksa sampel difteri adalah metode konvensional kultur difteri, namun metode ini juga membutuhkan waktu pemeriksaan yang lama. Sebagai alternatif, maka beberapa penelitian mulai mengembangkan pemeriksaan toksigenisitas difteri menggunakan metode molekuler, yakni PCR kuantitatif/*quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR). Adapun keunggulan uji toksigenisitas menggunakan PCR dibanding uji Elek antara lain, lebih cepat dan relatif lebih mudah dalam interpretasi hasil. Selain itu PCR juga dapat mendeteksi toksigenisitas sampel yang bakterinya tidak dapat dikultur (dapat terjadi karena jumlah bakteri kurang, sehingga memberikan hasil negatif jika dikultur/tidak dapat dikultur/*false negative*).⁹ Kralik *et al.*, juga menjelaskan bahwa metode kultur didasarkan pada perbanyakan bakteri, jika jumlah bakteri tidak cukup banyak, maka dapat juga menghasilkan *false negatif* pada hasil pemeriksaan.¹⁹ Beberapa penelitian menunjukkan kesesuaian antara hasil PCR dan uji Elek bisa mencapai 100%. Hasil penelitian yang dilakukan di Indonesia menunjukkan kesesuaian hasil pemeriksaan toksigenisitas 12 sampel klinis *C. diphtheriae* penyebab kasus difteri di Indonesia secara genotip menggunakan PCR dan fenotip menggunakan Elek test mencapai 100%.⁹

Pada penelitian ini, dilakukan optimasi metode ekstraksi dan kondisi (pengaturan suhu *annealing*) RT-qPCR untuk mendiagnosis toksigenitas difteri dari beberapa sampel kejadian luar biasa (KLB) difteri di Garut dan sekitar Jawa Barat yang diterima Labkes Jawa Barat. Pengujian dilakukan pada 20 sampel kultur dan 4 sampel usap tenggorokan untuk membandingkan hasil uji berdasarkan sumber sampel. Selain itu, dilakukan pengujian RT-qPCR pada sampel negatif kultur untuk mendeteksi toksigenisitas pada sampel negatif.

METODE

Desain penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Juni 2023 di Labkes Provinsi Jawa Barat dan Institut Teknologi Bandung (ITB). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan variabel bebasnya adalah metode ekstraksi, suhu *annealing* ekstraksi dan suhu *annealing* RT-qPCR yang digunakan. Sedangkan variabel terikat adalah sampel difteri yang digunakan.

Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan spesimen usap tenggorokan klinis dari pasien terduga difteri pada Kejadian Luar Biasa (KLB) di Garut, Jawa Barat, Indonesia, yang diterima oleh Labkes Provinsi Jawa Barat. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas 20 sampel usap tenggorokan hasil kultur pada media *Cystine Tellurite Blood Agar* (CTAB), empat sampel usap tenggorokan dengan hasil kultur positif, dan enam sampel usap tenggorokan dengan hasil kultur negatif.

Seluruh spesimen usap tenggorokan klinis dari pasien terduga difteri dikultur pada media selektif CTAB. Kultur bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Sampel yang berhasil tumbuh pada media CTAB selanjutnya dikonfirmasi secara mikroskopis dan menggunakan metode *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI-TOF) dengan alat VITEK 2 (Biomérieux).

Ekstraksi DNA dan kuantifikasi konsentrasi DNA

Optimasi metode ekstraksi kultur DNA dilakukan dengan tiga metode berbeda, yaitu pemanasan (100°C selama 30 menit), menggunakan DNA MiniPrep Kit (ZymoBIOMICS), dan *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen) yang termodifikasi menggunakan satu kultur sampel.¹⁰ Setelah itu, dilakukan ekstraksi DNA dari spesimen usap tenggorokan menggunakan metode pemanasan terhadap 20 sampel hasil kultur, 4 sampel usap tenggorokan dengan hasil kultur positif dan 6 sampel usap tenggorokan dengan hasil kultur negatif. Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi diukur dan ditentukan dengan Spektrofotometer NanoDrop UV-Vis (Thermo Scientific).

Analisis ekspresi gen

Terdapat dua set primer yang digunakan, yaitu primer yang menargetkan subunit A dan B gen toksin difteri: primer Tox 1 (ATCCACTTTTAGTGCAGAACCTTCGTCA) dan Tox 2 (GAAACTTTTCTTCGTACCA CGGGACTAA) (248 bp; subunit A)¹¹ dan primer Dipht 6F (ATACTTCCTGG TATCGGTAGC) dan Dipht 6R (CGAATCTCAACAGTGTCCA) (297 bp; subunit B). Kualitas primer dikonfirmasi menggunakan *OligoAnalyzer™ Tool (Integrated DNA Technologies)*.

HASIL DAN DISKUSI

Optimasi Ekstraksi dan Suhu Annealing RT-qPCR.

Hasil penelitian pada Tabel 1 menunjukkan *yield* DNA tertinggi didapatkan menggunakan metode pemanasan 100°C selama 30 menit. Nilai kemurnian DNA dengan metode pemanasan memiliki nilai di bawah 1,8; sedangkan nilai kemurnian metode menggunakan kit, baik menggunakan kit ZymoBIOMICS maupun Qiagen, memiliki nilai kemurnian di atas 2. Rasio A260/A280 memberikan gambaran kasar mengenai kemurnian asam nukleat. Biasanya, kontaminasi protein dapat dideteksi dengan pengurangan nilai rasio, sedangkan kontaminasi RNA dapat dideteksi dengan peningkatan nilai rasio.¹² Rasio di bawah 1,8 menunjukkan DNA terkontaminasi oleh protein, fenol, atau senyawa aromatik lainnya.¹³ Sedangkan nilai rasio di atas 2 menunjukkan kemungkinan adanya kontaminasi RNA. RNA biasanya memiliki rasio absorbansi 260/280 yang lebih tinggi karena rasio urasil yang lebih tinggi dibandingkan timin.¹⁴

Dalam penelitian ini, nilai kemurnian DNA dengan metode pemanasan adalah di bawah 1,8. Hasil tersebut menunjukkan ekstraksi menggunakan metode pemanasan cenderung terkontaminasi protein. Hal tersebut disebabkan karena pada metode ekstraksi pemanasan tidak terdapat proses purifikasi setelah tahapan lisis sel, sehingga pada *template* DNA akan terkontaminasi dengan protein-protein sel.

Tabel 1. Hasil konsentrasi dan kemurnian DNA berdasarkan metode ekstraksi

Metode Ekstraksi DNA	Konsentrasi DNA (ng/nl)	Kemurnian DNA (A260/A280)
Pemanasan 100°C selama 30 menit	24,3	1,73
DNA MiniPrep Kit (ZymoBIOMICS)	17,4	2,32
DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)	8,8	2,32

Selain menghasilkan *yield* yang tinggi, keseluruhan proses metode pemanasan juga relatif lebih efisien dalam segi waktu, reagen, alat dan langkah kerja dibandingkan dengan penggunaan kit Zymo dan Qiagen. Oleh karena itu, metode pemanasan dipilih sebagai metode ekstraksi dalam deteksi toksigenisitas yang menggunakan metode RT-qPCR pada penelitian ini.

Hasil RT-qPCR menunjukkan bahwa nilai CT di antara keempat variasi suhu *annealing* tidak jauh berbeda (Tabel 2). Semakin tinggi suhu *annealing*, umumnya primer mempunyai spesifisitas dan kemampuan penempelan terhadap DNA *template* yang lebih baik.¹⁵ Oleh karena itu, suhu *annealing* yang paling tinggi, yaitu 57°C dipilih sebagai suhu optimal *annealing*.

Tabel 2. Nilai CT gen tox A dan gen tox B hasil optimasi pada berbagai suhu annealing dan metode ekstraksi

No. Sampel	Suhu (°C)	Pemanasan		ZymoBiomics		Qiagen	
		Gen toxA	Gen toxB	Gen toxA	Gen toxB	Gen toxA	Gen toxB
1	50	15,83	15,37	13,40	12,6	15,83	15,37
2	52	15,82	15,73	13,51	15,73	15,82	15,73
3	55	15,77	15,74	13,43	13,28	15,77	15,74
4	57	16,06	15,67	13,69	13,06	16,06	15,67

Perbandingan hasil PCR dari sampel kultur dan sampel usap tenggorokan

Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 3 diketahui bahwa dari 20 sampel hasil kultur yang diperiksa menggunakan RT-qPCR didapatkan bahwa semua sampel positif memiliki gen toksin. Meskipun demikian dalam penelitian ini primer tidak diujikan pada sampel *C. diphtheriae* yang bersifat non-toksigenik (sebagai kontrol) karena ketiadaan sampel. Namun, kemampuan primer Tox 1 dan Tox 2 (subunit A) dalam membedakan strain toksigenik dan non-toksigenik telah dibuktikan oleh Pallen (1991) dengan menggunakan metode PCR konvensional. Primer Tox 1 dan Tox 2 dapat menempel secara spesifik pada *C. diphtheriae* yang memiliki gen tox. Gen tox merupakan gen penyandi subunit A, yang dapat menginaktivasi faktor elongasi 2, sehingga dapat menyebabkan penghambatan sintesis berbagai protein pada sel inang. Subunit B merupakan protein yang akan berikatan pada reseptor sel inang. Pengikatan subunit B pada sel inang akan menyebabkan subunit A masuk ke dalam sel inang.¹⁶ Oleh karena itu, *C. diphtheriae* yang bersifat toksigenik dapat diperiksa menggunakan primer Tox 1 dan Tox 2 karena memiliki kedua gen tersebut, berbeda dengan *C. diphtheriae* yang bersifat non-toksigenik. Selain itu, kemampuan primer Tox 1 dan Tox 2 (subunit A) dan primer Dipht 6F dan Dipht 6R (subunit B) dalam membedakan strain toksigenik dan non-toksigenik juga telah dibuktikan dengan menggunakan metode PCR konvensional.¹⁷

Tabel 3. Nilai CT hasil pemeriksaan RT-qPCR pada sampel kultur *C. diphtheriae*

Kode Sampel	CT toxA	CT toxB	Kode Sampel	CT toxA	CT toxB
01	20,26	19,66	11	19,84	20,89
02	17,72	18,36	12	23,02	24,37
03	17,64	18,36	13	18,28	19,22
04	17,17	18,11	14	18,00	18,79
05	19,08	19,35	15	19,72	19,99
06	19,15	20,08	16	23,79	22,74
07	37,86	35,56	17	20,23	20,35
08	24,23	22,03	18	19,38	19,23
09	18,79	17,10	19	19,35	19,64
10	20,75	21,46	20	17,62	17,28

Perbedaan hasil RT-qPCR terhadap sampel *C. diphtheriae* dari hasil kultur dan sampel klinis (sampel usap tenggorokan langsung) pada penelitian ini diamati berdasarkan nilai CT pada 4 sampel usap tenggorokan yang dibandingkan dengan hasil kultur. Hasil penelitian seperti pada Tabel 4 menunjukkan bahwa keempat sampel tersebut memiliki hasil pemeriksaan yang konsisten sama, yaitu positif memiliki gen toksin. Hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan metode RT-qPCR

dapat langsung dilakukan pada sampel klinis usap tenggorokan. Metode ini diharapkan dapat mempersingkat waktu diagnostik, karena toksigenisitas sampel dapat diperiksa tanpa perlu mengkultur sampel, yang biasanya memerlukan waktu 2–3 hari. Proses diagnostik RT-qPCR terhadap sampel klinis akan mempersingkat waktu pemeriksaan hanya dalam hitungan jam setelah sampel klinis diterima serta lebih mudah dalam interpretasi hasil.

Tabel 4. Nilai CT hasil pemeriksaan RT-qPCR pada sampel kultur dan usap tenggorokan

Kode Sampel	Kultur		Usap tenggorokan	
	CT toxA	CT toxB	CT toxA	CT toxB
05	19,08	19,35	25,08	24,65
06	19,15	20,08	22,82	22,10
08	24,23	22,03	22,71	21,70
09	18,79	17,10	25,36	24,52

Hasil pemeriksaan sampel usap tenggorokan dengan hasil kultur negatif

Pada penelitian ini diketahui terdapat 2 sampel yang menunjukkan hasil positif toksin pada sampel usap tenggorokan (Tabel 5) yang tidak tumbuh saat dikultur pada media CTBA. Hal tersebut dapat terjadi karena kemungkinan sedikitnya jumlah sel dalam media usap tenggorokan atau sel sudah tidak *viable*, sehingga tidak dapat tumbuh saat dikultur, namun materi genetik yang terdapat dalam sampel tetap terdeteksi saat diperiksa menggunakan metode genotif seperti RT-qPCR. Hal tersebut dapat terjadi karena *direct* RT-qPCR lebih sensitif dalam mendeteksi target DNA dibandingkan dengan kultur. Hal ini dibuktikan oleh studi lain yang menunjukkan bahwa adanya beberapa sampel yang memberikan nilai positif dengan metode PCR dengan kultur yang negatif,¹⁸ sehingga hal ini menjadi kelebihan metode PCR. Metode PCR sebaiknya dikonfirmasi menggunakan metode Elek untuk memberikan gambaran informasi toksigenisitas yang utuh. Namun, RT-qPCR juga metode yang baik dalam memberikan gambaran penyebaran difteri toksigenik di wilayah tertentu atau untuk melihat penyebaran difteri toksigenik di sekitar suspek positif serta sebagai informasi dalam surveilans difteri dalam waktu yang singkat. Kralik *et al.*, juga menjelaskan bahwa metode kultur didasarkan pada perbanyakan bakteri, jika jumlah bakteri tidak cukup banyak, maka dapat juga menghasilkan *false negatif* pada hasil pemeriksaan.¹⁹ Oleh karena itu, metode *direct* RT-qPCR dianggap sebagai metode alternatif yang dapat diandalkan karena memungkinkan untuk mengeluarkan hasil yang lebih cepat sehingga dapat mempersingkat waktu yang dibutuhkan bagi klinisi dalam menentukan diagnosis seorang pasien.^{19,20}

Tabel 5. Nilai CT dari RT-RT-qPCR sampel usap dengan pemeriksaan kultur negatif

Kode Sampel	CT toxA	CT toxB
SA	-	-
SB	-	-
SC	28,87	29,59
SE	-	-
SF	-	-
SD	28,87	29,29

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil RT-qPCR diketahui bahwa variasi metode ekstraksi memiliki nilai CT yang tidak jauh berbeda. Metode ekstraksi yang optimal dalam penelitian ini adalah metode pemanasan dengan *yield* DNA yang tinggi, waktu yang lebih cepat, reagen, alat dan langkah kerja yang lebih mudah jika dibandingkan metode ekstraksi menggunakan kit ekstraksi. Pemeriksaan pada sampel klinis menunjukkan 20 sampel kultur yang diperiksa teridentifikasi sebagai difteri toksigenik, dan 4 sampel

usap tenggorokan yang diuji secara RT-qPCR dan kultur memberikan hasil pemeriksaan yang sama. Pemeriksaan pada 6 sampel usap tenggorokan dengan hasil kultur negatif, terdapat 2 sampel yang memiliki nilai CT tox positif, sedangkan 4 sampel usap tenggorokan lainnya memiliki nilai CT tox negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemeriksaan *C. diphtheriae* dengan metode RT-qPCR lebih sensitif jika dibandingkan dengan metode kultur. Hasil ini menunjukkan bahwa metode RT-qPCR dapat dijadikan alternatif deteksi gen toksin dalam pemeriksaan sampel difteri.

ACKNOWLEDGEMENT

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Institut Teknologi Bandung atas bantuan alat yang mendukung terselesaikannya penelitian ini.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Diphtheria [Internet]. 2023 Sep 18 [cited 2023 Nov 15]. Available from: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/diphtheria#:~:text=Diphtheria%20is%20an%20infection%20caused,a%20sore%20throat%20and%20fever>
2. Skogmar S, Tham J. Severe diphtheria with neurologic and myocardial involvement in a Swedish patient: a case report. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):359. doi:10.1186/s12879-018-3264-9
3. Arguni E, Karyanti MR, Satari HI, Hadinegoro SR. Diphtheria outbreak in Jakarta and Tangerang, Indonesia: Epidemiological and clinical predictor factors for death. *PLoS One.* 2021;16(2):e0246301. doi:10.1371/journal.pone.0246301
4. Harapan H, Anwar S, Dimiati H, Hayati Z, Mudatsir M. Diphtheria outbreak in Indonesia, 2017: An outbreak of an ancient and vaccine-preventable disease in the third millennium. *Clin Epidemiol Glob Health.* 2019;7(2):261–262. doi:10.1016/j.cegh.2018.03.007
5. Sadoh AE, Oladokun RE. Re-emergence of diphtheria and pertussis: Implications for Nigeria. *Vaccine.* 2012;30(50):7221–7228. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.014
6. Pemerintah Daerah Kabupaten Garut. Pemda Kab Garut Tetapkan Kasus Difteri sebagai Kejadian Luar Biasa [Internet]. Bandung: Portal JabarProvGold; 2023 Feb 23 [cited 2023 Dec 7]. Available from: <https://jabarprov.go.id/berita/pemdakab-garut-tetapkan-kasus-difteri-sebagai-kejadian-luar-biasa-8506>
7. Murphy JR. Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process. *Toxins (Basel).* 2011;3(3):294–308. doi:10.3390/toxins3030294
8. Sariadji K, Sunarno S. Toksigenitas *Corynebacterium diphtheriae* Pada Sampel Kejadian Luar Biasa Difteri Tahun 2010-2015 Menggunakan Elektes. *Jurnal Kesehatan Andalas.* 2017 Jul 20;6(1):208-12.
9. Sunarno S, Sariadji K. Perbandingan pemeriksaan toksigenisitas secara genotip dan fenotip pada beberapa isolat *Corynebacterium diphtheriae* penyebab difteri di Indonesia. *J Biotek Medisiana Indones.* 2016;5(2). doi:10.22435/jbmi.v5i2.1672
10. Badell E, Guillot S, Tulliez M, Pascal M, Panunzi LG, Rose S, Litt D, Fry NK, Brisse S. Improved quadruplex real-time PCR assay for the diagnosis of diphtheria. *Journal of medical microbiology.* 2019 Oct;68(10):1455-65. doi:10.1099/jmm.0.001070
11. Pallen MJ. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* 1991;44(12):1025–1026. doi:10.1136/jcp.44.12.1025
12. Koetsier G, Cantor E. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers [Internet]. New England BioLabs; 2019 [cited 2023 Dec 7]. Available from: https://www.neb.com/en/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mv5_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf
13. Promega. Calculating nucleic acid or protein concentration [Internet]. 2019 Jul [cited 2023 Dec 7]. Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/application-notes/pathlength/calculating-nucleic-acid-or-protein-concentration-using-the-glomax-multi-microplate-instrument.pdf>
14. NanoDrop. NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-sample spectrophotometers [Internet]. Wilmington (DE): NanoDrop; 2007 [cited 2023 Dec 7]. Available from: https://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf
15. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: current methods and applications. 1st ed. Totowa (NJ): Humana Press Inc.; 1993.

16. Jamal SB, Tiwari S, Silva A, Azevedo V. Pathogenesis of *Corynebacterium diphtheriae* and available vaccines; an overview. *Glob. J. Infect. Dis. Clin. Res.* 2017;3:20-4. doi: 10.17352/2455-5363.000014
17. Nakao H, Pruckler JM, Mazurova IK, Narvskaia OV, Glushkevich T, Marijevski VF, Kravetz AN, Fields BS, Wachsmuth IK, Popovic T. Heterogeneity of diphtheria toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine. *Journal of clinical microbiology.* 1996 Jul;34(7):1711-6. doi: 10.1128/JCM.34.7.1711-1716.1996
18. Sunarno S, Puspendari N, Febriyana D, Febrianti T, Saraswati RD, Sulistyanningrum N, Pracoyo NE. Application of polymerase chain reaction in diphtheria laboratory examination: a field need. *Jundishapur J Microbiol.* 2021 Jul 1;14(7):e117884. doi: 10.5812/jjm.117884
19. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real-time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol.* 2017;8:108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108
20. Sunarno S, Rizki A, Sariadji K, Malik A, Karuniawati A, Soebandrio A. Direct PCR: alternative diagnostic method for diagnosis of diphtheria rapidly, easily and cost effective. *Makara J Health Res.* 2014;18(3):88-94. doi: 10.7454/msk.v17i2.3031