LAPORAN PENELITIAN

POLA STRAIN *Corynebacterium diphtheriae* PADA KASUS DAN ORANG KONTAK SERTA TINGKAT KEKEBALANNYA DI DAERAH KLB TAHUN 2015

Penyusun:

Noer Endah Pracoyo

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN RI
2015

PERSETUJUAN ATASAN

Mengetahui Kepala Bidang Biomedis	Ketua Pelaksana
dr. Roselinda, M.Epid	Dra. Noer Endah Pracoyo, M.Kes
NIP. 1958 0701 1987 01 2001	NIP. 1956 0308 1984 03 2001
Ketua Panitia Pembina Ilmiah Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan	Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Dra. Sarwo Handayani , M.S1.	Dra. Pretty Multihartina, PhD
NIP. 1966 0625 1991 03 2001	NIP. 1963 0927 1989 01 2001

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kami panjatkan atas karunia-Nya, kami berhasil menyelesaikan penelitian dari tahap persiapan sampai dengan penyusunan laporan. Judul penelitian ini adalah ”Pola strain *Corynebacterium diphtheriae* pada kasus dan orang kontak serta tingkat kekebalannya di daerah KLB tahun 2015”. Dalam kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kepala Pusat (Puslitbang) Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (PBTDK) selaku penanggung jawab seluruh kegiatan penelitian di PBTDK.
2. Kepala Dinas Kesehatan Propinsi Bangka Belitung, Sumatra Selatan, Banten, Jawa Timur, Bali, Kalimantan Barat, dan Kalimantan Timur beserta staf yang telah membantu pelaksanaan kegiatan di lapangan, khususnya dalam pengumpulan data.
3. Kepala BBLK Surabaya dan Palembang serta Kepala BLK Bangka Belitung, Banten, Kalimantan Barat, Kalimantan Timur, dan Bali beserta staf yang telah membantu di lapangan khususnya dalam pengambilan spesimen.
4. Ketua dan anggota Panitia Pembina Ilmuah PBTDK yang bertanggung jawab terhadap kegiatan pembinaan penelitian di PBTDK.
5. Koordinator Laboratorium Penelitian Penyakit Infeksi Prof. dr. Sri Oemijati dan staf yang telah membantu memprasaranai pemeriksaan spesimen.
6. Penanggung Jawab Laboratorium Bakteriologi beserta staf yang telah membantu pemeriksaan spesimen.
7. Anggota Tim Peneliti yang telah bahu membahu dalam menyelesaikan seluruh rangkaian kegiatan penelitian.
8. Seluruh pihak yang turut berperan dalam pelaksanaan kegiatan penelitian.

Semoga Allah swt membalas segala kebaikan yang telah dilakukan. Kami berharap agar hasil penelitian ini mendatangkan manfaat bagi masyarakat.

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL…… i

PERSETUJUAN ATASAN ii

SK PENELITIAN..... iii

KATA PENGANTAR..... iv

DAFTAR ISI v

DAFTAR TABEL…… vii

DAFTAR GAMBAR…….. viii

DAFTAR LAMPIRAN…… ix

RINGKASAN PENELITIAN..... x

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang…… 1

1.2. Permasalahan Penelitian..... 2

1.3. Tujuan Penelitian..... 2

1.4. Manfaat Penelitian..... 3

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pengertian dan Etiologi Difteri…… 4

2.2. Gambaran Epidemiologi……. 4

2.3. Pemeriksaan Laboratorium…….. 5

2.4. Pencegahan dan Pengobatan…….. 6

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep ….....…… 8

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian..... 8

3.3. Jenis dan Desain Penelitian 9

3.4. Populasi dan Sampel Penelitian..... 9

3.5. Pemilihan dan Jumlah Sampel 9

3.6. Variabel Penelitian…… 9

3.7. Definisi Operasional..... 9

3.8. Kriteria Inklusi dan Eksklusi ……..... 10

3.10. Instrumen dan Cara Pengumpulan Data Penelitian 10

3.9. Bahan dan Cara Kerja 11

3.11. Manajemen dan Analisis Data 13

3.12. Izin dan Etik Penelitian……..... 13

BAB 4. HASIL PENELITIAN

4.1. Sampel..... 14

4.2. Imunitas Responden..... 15

4.3 Faktor Lingkungan..... 16

4.4. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Penyebab Difteri..... 16

BAB 5. PEMBAHASAN
5.1. Sampel..... 21
5.2. Imunitas Responden 21
5.3. Faktor Lingkungan..... 22
5.4. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Penyebab Difteri..... 22
5.5. Keterbatasan Penelitian..... 24

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.
6.1. Kesimpulan…… 27
6.2. Saran……... 27

DAFTAR PUSTAKA ..... …….. 28

LAMPIRAN……. 28

BIODATA KETUA PELAKSANA…… 38

DAFTAR TABEL

Tabel 2. Proporsi sampel (kasus dan kontak) berdasarkan daerah asal

Tabel 2. Karakteristik sampel (kasus dan kontak) berdasarkan usia dan jenis kelamin

Tabel 3. Riwayat imunisasi responden umur ≤ 15 tahun

Tabel 4. Titer antibodi (IgG difteri) kontak erat penderita difteri

Tabel 5. Riwayat kontak dengan penderita difteri sebelumnya

Tabel 6. Hasil identifikasi bakteri penyebab difteri

Tabel 7. Gambaran hasil pemeriksaan laboratorium difteri berdasarkan daerah asal

Tabel 8. Karakteristik bakteri berdasarkan spesies

Tabel 9. Karakteristik bakteri berdasarkan subtipe

Tabel 10. Karakteristik bakteri berdasarkan toksigenisitas bakteri

Tabel 11. Resistensi bakteri terhadap antibiotik

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Hasil Pemeriksaan PCR
Gambar 2. Hasil Pemeriksaan Elek test

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Persetujuan Etik Penelitian

Lampiran 2. Naskah Penjelasan

Lampiran 3. Data kasus difteri di Indonesia

Lampiran 4. Bahan dan Cara Kerja

RINGKASAN PENELITIAN

Difteri disebabkan oleh *Corynebacterium diphtheriae* yang dapat menghasilkan eksotoksin. Penyakit ini ditularkan melalui udara atau *airborne deseases* atau kontak langsung dengan lesi difteri kulit. Kenaikan kasus secara fluktuatif terjadi sejak tahun 2000 dan saat ini telah menyebar hampir di seluruh propinsi di Indonesia. Tujuan penelitian adalah mengidentifikasi bakteri penyebab penyakit difteri yang beredar di beberapa provinsi di Indonesia dan faktor risiko yang mempengaruhi terjadinya kasus di daerah penelitian.

Penelitian dilakukan dengan design *cross sectional* (potong lintang). Sampel penelitian sebanyak 172 responden yang terdiri dari 31 kasus suspek difteri dan 141 kontak erat penderita. Spesimen klinis berupa swab tenggorok/ hidung/ lesi kulit diambil dari responden penderita difteri dan orang kontak penderita difteri, sementara darah vena hanya diambil dari orang kontak. Kuesioner pendukung berisi tentang data demografi (umur dan jenis kelamin) imunitas responden, dll. Penelitian dilakukan pada bulan Januari - Desember 2015. Daerah penelitian meliputi Bangka Belitung, Sumatera Selatan, Banten, Jawa Timur, Bali, Kalimantan Barat, dan Kalimantan Timur. Analisis hasil identifikasi kuman dianalisis dengan cara diskriptif dan regresi logistik menggunakan program *SPSS 17.00 for window*.

Identifikasi sampel dengan metode konvensional secara kultur mendapatkan 3 (9,7 %) dari 31 kasus dan 5 (3,5%) dari 141 kontak erat penderita, positif ditemukan *Corynebacterium diphtheriae* pada spesimen klinisnya. Sementara itu dengan pemeriksaan PCR teridentifikasi 6 (19,4%) dari 31 kasus dan 10 (7,1%) dari 141 kontak positif *C. diphtheriae.* Seluruh *C. diphtheriae* yang teridentifikasi merupakan jenis toksigenik. Sebanyak 6 (75%) dari 8 bakteri yang berhasil diisolasi merupakan subtype gravis dan 2 (25%) isolat masing-masing biotipe mitis dan intermedius. Hasil pemeriksaan titer antibodi menunjukkan bahwa hanya 105 (80,7%) dari 130 sampel darah yang berhasil dikumpulkan dari kontak erat penderita mempunyai titer antibodi protektif, sedangkan 25 (19,3%) lainnya memiliki titer antibodi tidak protektif. Hasil uji resistensi antibiotik pada 8 isolat *C. diphtheriae* menunjukkan bahwa semua isolat resisten terhadap Tetrasiklin dan ditemukan isolate resisiten terhadap Penicilin G dan Erythromycin.

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa bakteri penyebab difteri di Indonesia cukup bervariasi dan sebagian telah resisten terhadap antibiotik utama untuk difteri (Penisilin dan Erythromycin). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa cukup banyak

responden tidak mempunyai titer antibodi yang dapat melindungi terhadap penyakit difteri. Oleh karena itu disarankan untuk melakukan monitoring resistensi bakteri penyebab difteri terhadap antibiotik dan dilakukan peningkatan cakupan imunisasi.

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Difteri merupakan penyakit yang disebabkan oleh *C. diphtheriae* dan umumnya menyerang saluran nafas atas atau kulit. Gejala spesifik penyakit adalah timbulnya membran asimetris keabu-abuan yang dikelilingi oleh radang kemerahan pada tenggorokan dan pembesaran kelenjar getah bening leher. Bakteri penyebab difteri mampu menghasilkan eksotoksin yang dapat menyerang jantung, ginjal, dan sistem saraf pusat sehingga dapat berakibat kematian mendadak. Masa inkubasi berkisar antara 2-5 hari atau lebih dengan masa penularan selama 2 minggu. Difteri kulit meskipun jarang, namun memegang peranan yang cukup penting secara epidemiologik karena seringkali tidak teridentifikasi dan menularkan kuman ke orang lain. Penyakit difteri ditularkan melalui udara, percikan ludah saat berbicara dan kontak langsung dengan penderita difteri kulit. Orang yang tertular dapat menjadi sakit atau menjadi karrier. Penyakit ini sering ditemukan di daerah tropik dan daerah dengan kondisi higiene perorangan yang kurang. Pada musim dingin di negara subtropik penyakit ini banyak menyerang anak-anak dibawah usia 5 tahun, terutama pada anak yang belum pernah diimunisasi.[1,2,3]

Penyakit difteri ditetapkan sebagai penyakit yang dapat menyebabkan wabah berdasarkan Undang-Undang No. 4 tahun 1984 tentang wabah penyakit menular, Peraturan Pemerintah No. 40 tahun 1989 tentang wabah penyakit menular, dan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 560 MENKESPER/VIII/1989 tentang Jenis Penyakit tertentu yang dapat menimbulkan Wabah. Setiap kasus wabah/ KLB harus dilaporkan kurang dari 24 jam, dan ditindak lanjuti dengan penyelidikan epidemiologi dan dilakukan penanggulangan.[4,5,6]

Kasus difteri masih terus dilaporkan dari berbagai wilayah Indonesia dan mencapai puncaknya pada tahun 2012 dengan 1129 kasus. Hal ini telah menempatkan Indonesia sebagai negara penyumbang kasus difteri terbanyak nomor 2 setelah India dengan 3133 kasus pada tahun yang sama berdasarkan laporan tahunan dari WHO. Sementara itu, berdasarkan data surveilans difteri tahun 2014 yang dikeluarkan oleh Ditjen Penanggulangan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, kasus difteri terbanyak berasal dari Jawa Timur dengan 295 kasus. Peringkat ke-2 ditempati Kalimantan Barat dengan 21 kasus dan disusul Banten serta Jawa Barat dengan masing-masing 16 kasus. Lebih dari separuh propinsi di

Indonesia telah melaporkan adanya kasus difteri, mulai dari Aceh (5 kasus) hingga Papua (1 kasus).[7,8]

Penyakit difteri merupakan jenis penyakit yang dapat dicegah dengan cara pemberian vaksin difteri pada orang sehat untuk memperoleh kekebalan terhadap penyakit difteri berat. Di Indonesia program vaksinasi yang dicanangkan adalah vaksinasi dasar yakni ketika anak berusia kurang dari satu tahun. Tujuan dari vaksinasi tersebut adalah melindungi anak dari penyakit difteri berat akibat toksin difteri. Pada tahun 1998 diprogramkan pemberian *booster*, yakni vaksinasi satu kali pada anak usia sekolah kelas 1 SD pada saat BIAS (Bulan Imunisasi Anak Sekolah). Tujuan pemberian *booster* tersebut adalah melindungi anak terhadap penyakit difteri selama 10 tahun setelah pemberian *booster*.[9]

Meskipun demikian, hasil penelitian yang dilakukan Susyanty, dkk menunjukkan bahwa jumlah petugas pengelola vaksin masih kurang di Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota maupun Puskesmas. Meskipun dalam Pedoman Penyelenggaraan Imunisasi dibutuhkan minimal dua tenaga pelaksana imunisasi, namun di banyak tempat hanya memiliki 1 orang tenaga. Pengetahuan pengelola vaksin di puskesmas juga masih kurang, terutama dalam hal pengenalan vaksin dan pengenalan rantai dingin vaksin. Hal serupa dilaporkan oleh Pracoyo, dkk yang menunjukkan bahwa pengelolaan vaksin tidak benar terjadi di lebih dari 50% tempat yang disurvei. Hal ini dipengaruhi oleh kurangnya pelatihan petugas.[10,11] Oleh karena itu perlu dilakukan pemantauan titer antibodi terhadap difteri di masyarakat, khususnya pada kontak erat penderita difteri.

1.2. Permasalahan Penelitian

Ada beberapa hal yang menjadi permasalahan pada penyakit difteri, meliputi:

a. Mikroba penyebab difteri bervariasi, baik spesies, subtipe, toksigenisitas maupun resistensi terhadap antibiotik.
b. Perlu adanya informasi tentang kekebalan orang kontak penderita difteri.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian adalah untuk mengidentifikasi karakteristik bakteri penyebab difteri dan tingkat kekebalan orang kontak penderita difteri.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dalam penelitian ini adalah untuk:

a. Mengetahui jumlah kasus penderita difteri di daerah dan selama waktu penelitian.
b. Membuat pemetaan bakteri penyebab difteri berdasarkan spesies, subtipe, toksigenisitas, dan resistensi terhadap antibiotik.
c. Mengukur tingkat kekebalan orang kontak penderita difteri

1.4. Manfaat

Hasil Penelitian ini dapat dimanfaatkan oleh berbagai pihak. Informasi tentang faktor yang mempengaruhi kejadian difteri, karakteristik bakteri penyabab difteri, dan titer antibodi kontak dapat dimanfaatkan dalam perencanaan program pencegahan dan penanggulangan penyakit difteri di Indonesia. Informasi tentang karakteristik bakteri juga dapat dimanfaatkan oleh klinisi dalam penanganan kasus difteri.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pengertian dan Etiologi Difteri

Difteri merupakan penyakit infeksi akut yang biasanya menyerang saluran nafas bagian atas, ditandai dengan respon inflamasi pada tempat infeksi dan terbentuknya pseudomembran diikuti oleh gejala sistemik berupa gangguan jantung, saraf dan ginjal akibat toksin difteri. Penyakit ini mudah menular melalui droplet dan kontak langsung dengan penderita atau karier. Selain itu, penyakit juga bisa ditularkan dengan perantara barang, termasuk konsumsi susu atau produk susu yang terkontaminasi. Kelompok risiko terserang difteri adalah anak-anak dan orang lanjut usia, tapi pada era vaksinasi seperti saat ini terjadi perubahan epidemiologi yang ditandai dengan banyaknya kasus pada orang dewasa. Ada 3 spesies dari genus *Corynebacterium* yang diketahui dapat menghasilkan toksin difteri, yaitu *C.diphtheriae, C.ulcerans,* dan *C.pseudotuberculosis.*[12]

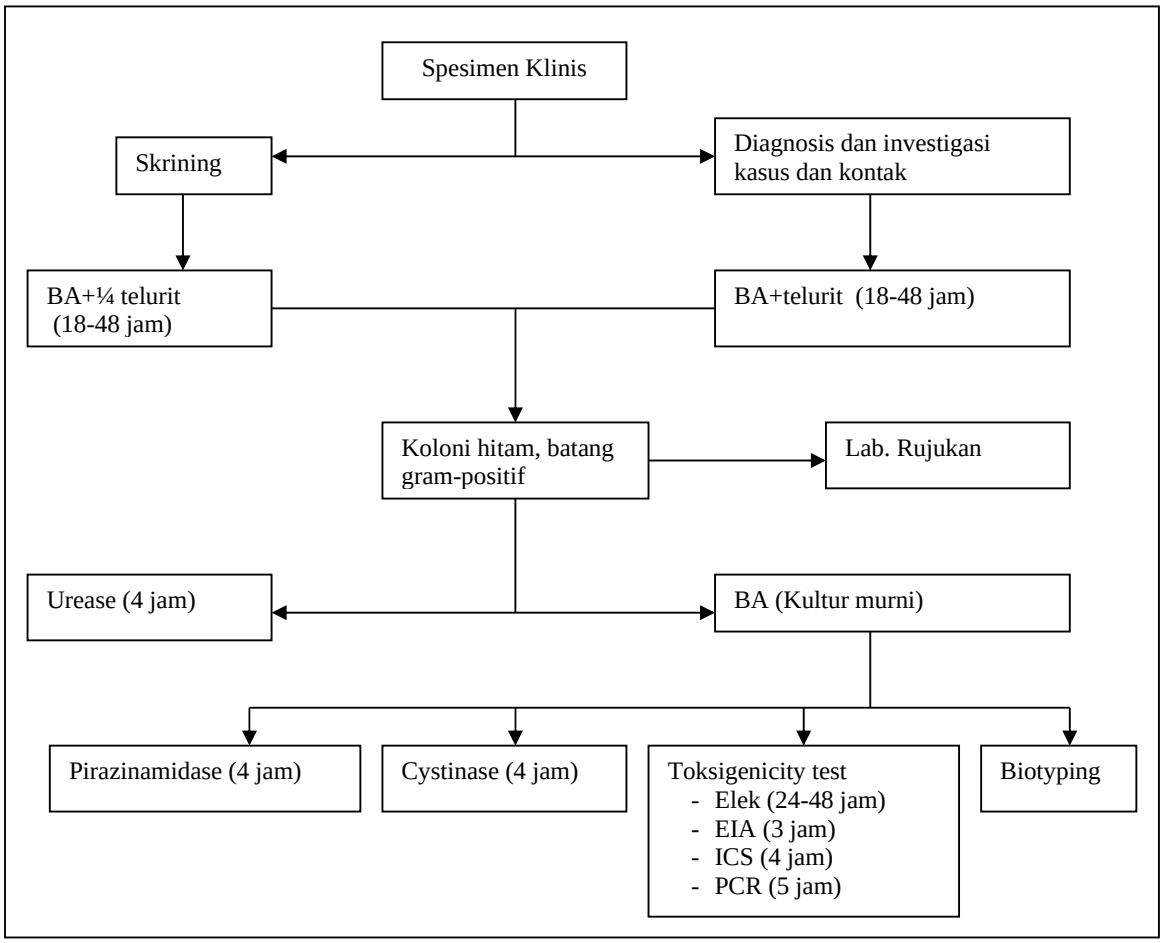
2.2. Gambaran Epidemiologi

Insiden difteri menurun setelah vaksin difteri digunakan secara global di seluruh dunia. Namun demikian, tahun 1990-an insiden kembali terjadi di bekas negara Uni Soviet dengan lebih dari 150 ribu kasus dan lebih dari 4 ribu diantaranya meninggal dunia. Kasus mulai menurun setelah dilakukan strategi kontrol difteri secara agresif (imunisasi massal terhadap seluruh populasi). Distribusi penyakit difteri menyebar di seluruh dunia terutama di negara-negara yang penduduknya tinggal pada tempat pemukiman padat, higiene-sanitasi jelek dan fasilitas kesehatan kurang. Menurut data WHO, dalam 5 tahun terakhir India menduduki peringkat pertama penderita difteri terbanyak di seluruh dunia dengan 3977 kasus pada tahun 2008, 3529 kasus pada tahun 2009, 3434 kasus pada tahun 2010, 4233 kasus pada tahun 2011, dan 2525 kasus pada tahun 2012. Kejadian difteri meliputi beberapa wilayah, antara lain Andhra Pradesh, Delhi, Maharashtra, Chandigarh, Gujarat, Assam, West Bengal, Madhya Pradesh, Uttar Pradesh, Rajasthan dan Haryana.[12]

Di Indonesia, kasus difteri juga mengalami peningkatan yang mencapai puncaknya tahun 2012. Hal ini menempatkan Indonesia berada pada urutan ke-2 dan ke-3 penderita difteri terbanyak di dunia setelah India dan Nepal pada beberapa tahun terakhir. Kasus terbanyak terjadi di Jawa Timur yang meliputi seluruh kabupaten/kota dan menyumbang sekitar 80% kasus difteri nasional. Kematian kasus difteri di Jawa Timur berkisar antara 3-14%.[12]

2.3. Pemeriksaan Laboratorium

Alur pemeriksaan difteri di laboratorium sesuai dengan pedoman WHO mengikuti bagan di bawah ini.



Spesimen klinis berupa swab seharusnya diambil dari berbagai lokasi yang dicurigai, seperti tenggorok, nasofaring dan lesi pada kulit penderita dan kontak erat penderita. Swab diambil di bawah membran tempat bakteri berkumpul, beberapa materi krusta dibuang terlebih dahulu dan usapan diambil dari dasar luka. Fragmen membran juga memungkinkan untuk diperiksa. Spesimen harus segera dikirim ke laboratorium dan jika spesimen tidak bisa segera dikirim ke laboratorium maka harus digunakan media transpor seperti Amies. Di laboratorium, swab diinokulasi pada agar darah, medium Loeffler dan medium yang mengandung telurit. Telurit menekan pertumbuhan bakteri lain dan memungkinkan bakteri penyebab difteri (*C. diphtheriae, C. ulcerans* dan *C. pseudotuberculosis*) tumbuh serta menghasilkan koloni khas.[12,13]

Bila pada pemeriksaan mikroskopik dari koloni tersangka terlihat gambaran difteroid, dilakukan isolasi dan purifikasi pada medium agar darah (BA) dan diidentifikasi menggunakan tes biokimia. Karakteristik biokimia dapat membedakan bakteri penyebab difteri dari bakteri lain dengan reaksi cystinase dan pyrazinamidase. Reaksi biokimia juga dapat membedakan spesies *C.diphtheriae* dari *C.ulcerans* dan *C.pseudotuberculosis* dengan reaksi nitrat dan urease. Selain itu reaksi fermentasi gula-gula dapat membedakan masing-masing subtipe *C.diphtheriae* dan membedakan *C.ulcerans* dari *C.pseudotuberculosis*. Dalam hal ini, sediaan komersial seperti *"API Coryne* (bioMérieux)*", " rapID CB plus* (remel)*"* dan *"Rosco diagnostica"* memiliki keakuratan yang tinggi.[12,13]

Tes toksigenisitas penting untuk diagnosis difteri secara mikrobiologik. Tes toksigenisitas secara *in-vivo* menggunakan binatang Guinea pig merupakan baku emas (*gold standard*) namun kurang disukai karena membutuhkan waktu cukup lama dan pihak tertentu menolak digunakannya binatang untuk kegiatan penelitian. Sebagai alternatif uji toksigenitas adalah adalah tes Elek menggunakan prinsip imunopresipitasi yang dikembangkan oleh Elek (1949) dan dimodifikasi oleh Engler, e al. (1997). Metode in-vitro lain yang digunakan untuk tes toksigenisitas antara lain PCR, *enzyme immunoassay* (EIA) dan *immunochromatographic strip* (ICS). PCR banyak dipilih karena lebih cepat dan mudah diinterpretasi. Meskipun demikian, PCR mempunyai beberapa keterbatasan diantaranya tidak dapat digunakan untuk identifikasi strain NTTB, yaitu bakteri yang memiliki gen *tox* tapi tidak terekspresi secara fenotip sehingga positif toksigenik secara PCR belum tentu positif toksigenik dengan *Vero Cell* maupun tes Elek.[12,13]

2.4. Pencegahan dan Pengobatan

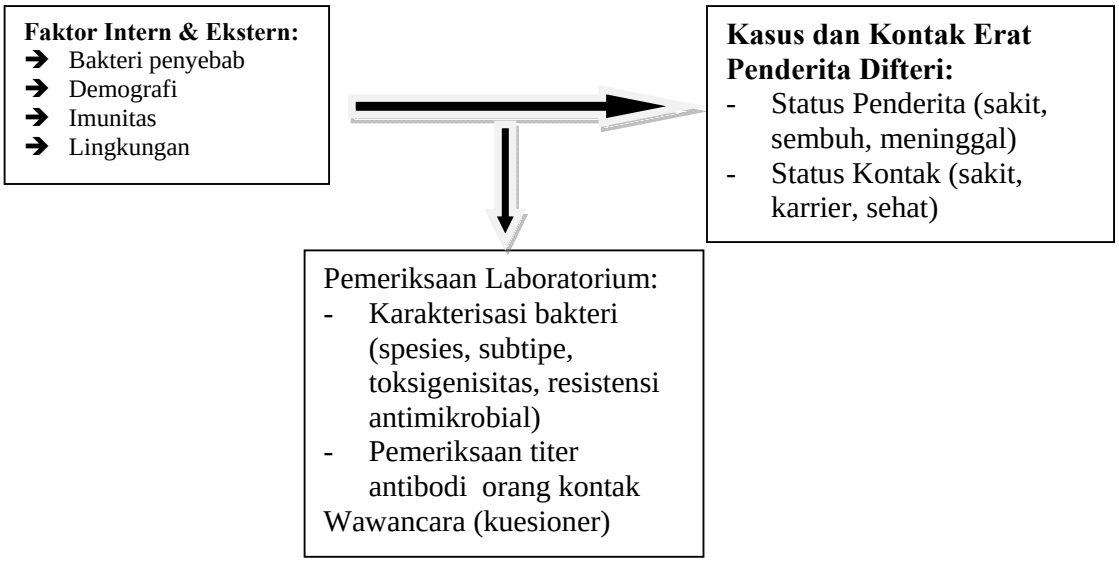
Pencegahan penyakit difteri dilakukan dengan vaksinasi toksoid difteri. Tingginya kasus di suatu wilayah biasanya berbanding terbalik dengan cakupan imunisasi pada wilayah tersebut. Namun demikian, orang yang divaksin tetap dapat terserang difteri dengan gejala klinis yang lebih ringan. Pengobatan difteri membutuhkan antitoksin (ADS) dan antibiotik. ADS dan antibiotik diberikan secara bersama karena ADS tidak dapat digunakan untuk eliminasi bakteri penyebab, begitu juga sebaliknya, antibiotik tidak dapat menggantikan peran ADS untuk menetralisasi toksin difteri. ADS akan efektif bila diberikan pada 3 hari pertama sejak timbul gejala. Penundaan pemberian ADS akan meningkatkan risiko komplikasi dan kematian. Pemberian antibiotik dibutuhkan untuk eliminasi bakteri penyebab dan mencegah penularan penyakit. Golongan penisilin dan eritromisin merupakan antibiotik pilihan utama. Namun demikian, uji kepekaan bakteri terhadap antibiotik perlu terus

dilakukan untuk mengetahui perkembangan resistensi bakteri karena telah dilaporkan adanya penurunan kepekaan bakteri penyebab terhadap eritromisin dan antibiotik lainnya.[12]

BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep

Kasus difteri disebabkan oleh adanya bakteri penyebab yang masuk kedalam tubuh manusia. Virulensi bakteri dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti spesies, subtipe, toksigenisitas dan resistensi terhadap antibiotik. Terjadinya penularan dari penderita positif difteri ke orang lain dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain adanya paparan bakteri penyebab difteri terutama pada kontak erat penderita, faktor demografi, imunitas, adat dan perilaku serta lingkungan.



3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel diambil dari 7 propinsi dengan prevalensi difteri tertinggi pada tahun 2013 yaitu Bangka Belitung, Sumatera Selatan, Banten, Jawa Timur, Bali, Kalimantan Barat, dan Kalimantan Timur. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan Desember 2015, mulai tahapan persiapan, pre survei (sosialisasi, pelatihan pengambilan, pengepakan dan pengiriman sampel), pengirim bahan/ reagen untuk pengambilan sampel di daerah, pemeriksaan sampel di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Litbang Kes Jakarta, dan pelaporan hasil penelitian.

3.3. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian adalah deskriptif analitik dengan desain *Cross Sectional* (Potong Lintang). Penelitian mencakup pemeriksaan spesimen dari swab tenggorok dan atau swab hidung dan atau swab lesi pada kulit penderita difteri dan kontak erat penderita, pemeriksaan serum darah kontak erat penderita difteri, dan wawancara terstruktur tentang demografi, lingkungan, perilaku dan gejala penderita difteri.

3.4. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah seluruh penderita difteri yang dirawat di Rumah Sakit di propinsi (tempat penelitian) serta kontak erat penderita. Sampel penelitian adalah panderita difteri yang ditemukan dan dilaporkan serta kontak erat penderita selama kurun waktu penelitian.

3.5. Pemilihan dan Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang berhasil dikumpulkan adalah sebanyak 172 responden yang terdiri dari 31 kasus dan 141 kontak erat penderita dari estimasi awal sebanyak 270 responden. Perbedaan jumlah dengan estimasi awal terjadi karena adanya penurunan kasus difteri di Indonesia pada tahun 2015 dibandingkan tahun sebelumnya.

3.6. Variabel Penelitian

Variabel dependen dalam penelitian ini berupa status penderita atau kasus dan kontak erat penderita. Variabel independen terdiri dari faktor demografi (umur, jenis kelamin), Imunitas (riwayat imunisasi, titer antibodi), lingkungan (riwayat kontak penderita difteril), dan karakteristik bakteri (spesies, subtype, toksigenisitas, resistensi).

3.7. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Umur	Umur pada ulang tahun terakhir	Kuesioner	Umur (skala Hurlock) 1. 0-4 tahun 2. 5-9 tahun 3. 10-14 tahun 4. >14 tahun	Ordinal
Jenis Kelamin	Jenis kelamin anak yang terlihat secara fisik	Kuesioner	1. Laki-laki 2. Perempuan	Nominal
Riwayat Imunisasi	Riwayat imunisasi DPT/DT/TD	Kuesioner	1. Lengkap 2. Tidak Lengkap 3. Tidak Imunisasi	Ordinal

Titer Antibodi	Titer IgG terhadap toksin difteri	ELISA	1. Long Protection 2. Protection 3. Tidak Proteksi	Ordinal
Tempat Tinggal	Sanitasi Lingkungan di sekitar rumah	Kuesioner/Observasi	1. Baik 2. Buruk	Nominal
Riwayat Kontak	Riwayat kontak dengan penderita difteri	Kuesioner	1. Ya 2. Tidak	Nominal
Spesies	Spesies bakteri penyebab difteri	Biokimia + PCR	1. *C. diphtheriae* 2. *C. ulcerans* 3. *C. pseudotuberculosis*	Nominal
Subtipe	Subtipe bakteri penyebab difteri	Kultur + Biokimia	1. Gravis 2. mitis 3. intermedius	Nominal
Toksigenisitas	Toksigenisitas bakteri penyebab difteri	Elek test + PCR	1. Toksigenik 2. Nontoksigenik 3. NTTB	Ordinal
Resistensi	Resistensi bakteri penyebab difteri terhadap antibiotik	MIC	1. Resisten 2. Intermediete 3. Sensitif/Peka	Ordinal

3.8. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi dalam penelitian ini meliputi:

a. Pasien yang dinyatakan secara klinis menderita penyakit difteri oleh dokter yang merawat atau orang yang pernah kontak dengan penderita difteri.
b. Bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani informed consent.

Kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah pasien dengan keadaan umum berat yang menghalangi pengambilan spesimen klinis.

3.9. Instrumen dan Cara Pengumpulan Data

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

a. Kuesioner untuk mengetahui data demografi, lingkungan, riwayat imunisasi, dll.
b. Pemeriksaan laboratorium (kultur, biokimia, Elek test, PCR, dan ELISA) untuk mengetahui karekteristik bakteri penyebab difteri dan titer antibody.

Kuesioner digunakan untuk panduan wawancara penderita/wali dan orang yang pernah kontak erat dengan penderita difteri. Setiap kuesioner akan diberi nomer sesuai dengan nomer sampel. Peralatan yang digunakan mengambil sampel swab tenggorok adalah swab dan media transport *"Amies"* untuk pemeriksaan bakteri difetri dan spuit yang digunakan untuk mengambil darah vena untuk diperiksa titer antibodi difteri.

Tata-laksana yang dilaksanakan di setiap lokasi meliputi:

a. Tim petugas lapangan akan dikoordinir oleh petugas dari Dinas Kesehatan Provinsi
b. Perekrutan tim petugas lapangan akan dilaksanakan oleh petugas dari Dinkes Provinsi

daerah penelitian

c. Tim petugas lapangan terdiri dari petugas surveilans, dan petugas laboratorium di daerah penelitian.
d. Apabila ada informasi bahwa telah terjadi kasus suspek difteri, tim surveilans dan tim laboratorium akan melaksanakan pengambilan sampel penderita dan orang kontak erat penderita disertai wawancara .
e. Semua sampel berupa sampel biomedis dan kuesioner di *matching* antara kueisoner dan sampel biomedis kemudian diberi label dan nomer yang sama dikirim ke PBTDK , Litbang Kes Jakarat.
f. Semua tim baik di lapangan maupun di PBTDK akan diberi TOR untuk dapat mempelajari jalannya penelitian.

3.10. Bahan dan Cara Kerja

3.10.1. Cara Pengambilan, pengepakan pengiriman dan pemeriksaan sampel

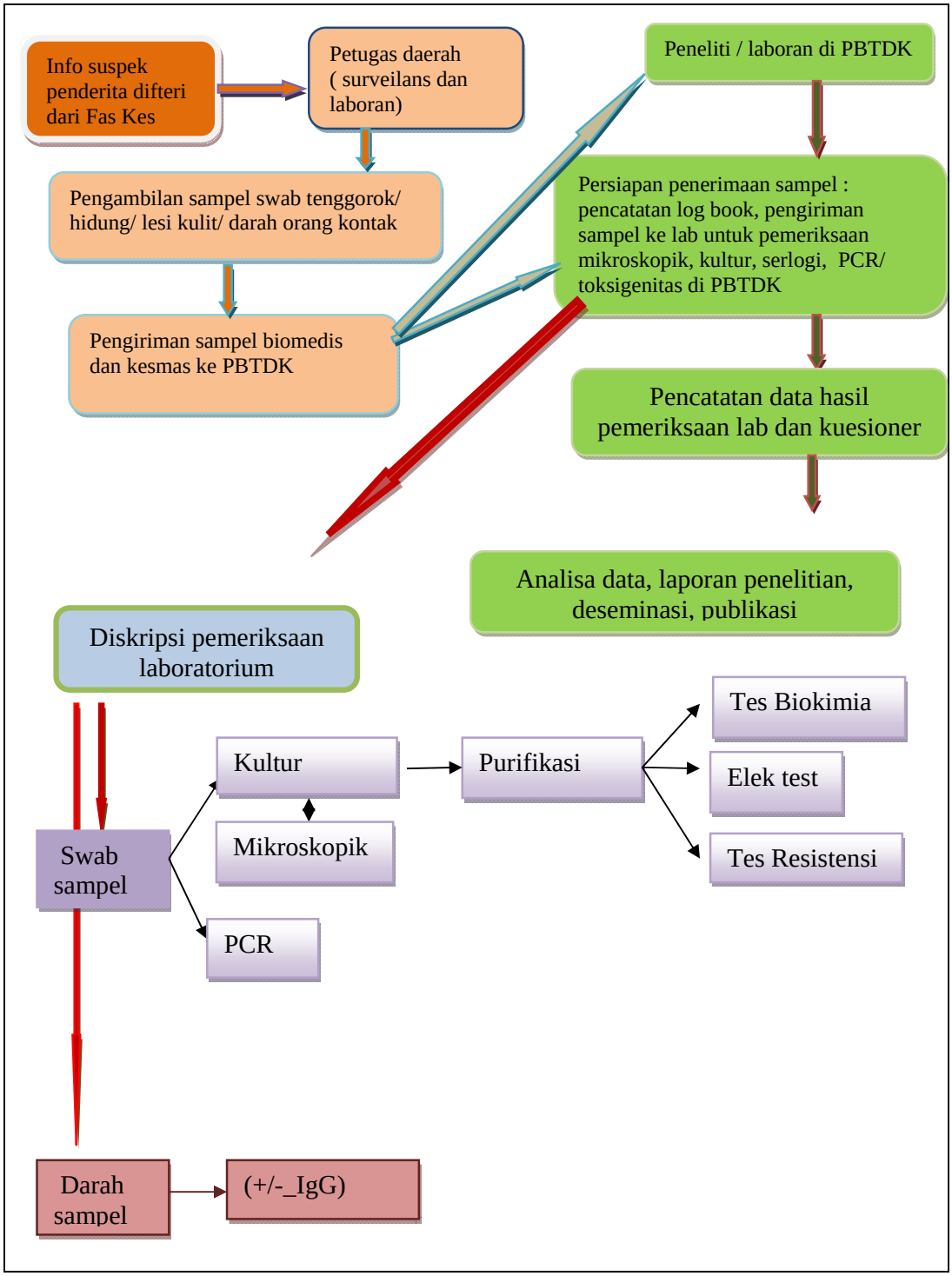
a. Apabila ada informasi kasus suspek difteri dari fasilitas pelayanan kesehatan didaerah penelitian .
b. Petugas Dinas Kesehatan daerah / BBLK daerah penelitian mengambil swab penderita, swab orang kontak dan darah vena orang kontak.
c. Sampel swab pasien di Fas Kes, (pasien belum mendapatkan profilaksis atau mendapatkan profilaksis maksimum máximum selama 2 hari).
d. Swab dari orang yang pernah kontak dekat dengan penderita.
e. Apabila orang kontak ternyata ditemukan hasil kultur positip difteri, maka orang kontak tersebut akan diberi profilaksis berupa *erytromysin* selama 7 hari sesuai dengan Program.
f. Apabila orang kontak mempunyai gejala klinis seperti penderita difteri dan hasil kultur positip, maka orang kontak akan diperlakukan sama seperti penderita kasus dan orang kontak tersebut dijadikan kasus. (huruf tak perlu tebal)
g. Serum darah orang yang pernah kontak dengan penderita.
h. Swab tenggorok/ hidung dan lesi kulit akan dimasukkan kedalam transpor media, serum darah disimpan kedalam cryotube suhu -4 ^{0} C kemudian di kirm ke Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatn di Litbangkes Jakarta .

3.10.2. Pemeriksaan Laboratorium

Spesimen klinis yang diterima di laboratorium akan diperiksa untuk identifikasi bakteri penyebab difteri dengan beberapa jenis pemeriksaan, meliputi kultur, mikroskopik,

biokimia, Elek test, PCR, resistensi antibiotik, dan ELISA. Bahan dan cara kerja masing-masing pemeriksaan dapat dilihat pada Lampiran.

Secara singkat alur pelaksanan pengambilan, pengepakan, pengiriman, dan pemeriksaan sampel terlihat pada bagan berikut ini.



3.8. Manajemen dan Analisis Data

Isian pada kuesioner yang berhasil dikumpulkan diedit, di-*entry*, di-*cleaning* pada program komputer bersama dengan hasil pemeriksaan laboratorium spesimen klinis dari kasus dan kontak serta serum darah orang kontak erat penderita difteri. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program *SPSS 17.00 for window*.

3.9. Perizinan dan Etik Penelitian

Izin penelitian diperoleh dari Kemendagri bidang Sosial Politik dan Kesbang Linmas, Pemerintah Daerah tempat penelitian dan fasilitas kesehatan setempat. *Ethical Clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbangkes dengan persetujuan etik No LB.02.01/5.2/KE328/2015 tanggal 23 Juni 2015.

BAB 4

HASIL PENELITIAN

4.1. Sampel

Jumlah sampel yang berhasil dikumpulkan sebanyak 172 responden, terdiri dari 31 kasus suspek difteri dan 141 kontak erat penderita yang berasal dari 7 propinsi di Indonesia. Proporsi sampel berdasarkan daerah asal dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Proporsi sampel (kasus dan kontak) berdasarkan daerah asal

Daerah Asal	Jumlah	%
Kasus		
Sumatra Selatan	1	3,2
Bangka Belitung	1	3,2
Kalimantan Barat	8	25,8
Kalimantan Timur	2	6,5
Banten	8	25,8
Jawa timur	7	22,6
Bali	4	12,9
Total	**31**	**100**
Kontak		
Sumatra Selatan	5	3,5
Bangka Belitung	5	3,5
Kalimantan Barat	27	19,1
Kalimantan Timur	11	7,8
Banten	50	35,5
Jawa timur	35	24.8
Bali	8	5,7
Total	**141**	**100**

Tebel 1 menunjukkan bahwa proporsi terbesar sampel berasal dari daerah Banten, baik untuk kasus maupun kontak. Khusus untuk kasus, sampel dari Banten sama banyak dengan sampel dari Kalimantan Barat. Karakteristik sampel berdasarkan usia dan jenis kelamin responden dapat dilihat pada Tabel 2. Ada perbedaan kelompok usia antara kasus dan kontak, sebagian besar (45,2%) kasus berusia 5-9 tahun, sedangkan 70,2% kontak erat penderita berusia 15 tahun ke atas. Selain berdasarkan usia, sampel juga digolongkan berdasarkan jenis kelamin. Tabel 2 menunjukkan bahwa baik kasus maupun kontak, jumlah responden perempuan lebih banyak dibandingkan dengan responden laki-laki dengan perbandingan 1,4:1 untuk kasus dan 1,5:1 untuk kontak.

Tabel 2. Karakteristik sampel (kasus dan kontak) berdasarkan usia dan jenis kelamin

Usia Responden	Laki-laki	Perempuan	Jumlah	%
Kasus				
< 1 tahun	0	0	0	0
1-4 tahun	5	1	6	19,4
5-9 tahun	6	8	14	45,2
10-14 tahun	2	2	4	12,9
>14 tahun	0	7	7	22,6
Total	**13**	**18**	**31**	**100**
Kontak				
< 1 tahun	0	0	0	0
1-4 tahun	3	4	7	5,0
5-9 tahun	4	12	16	11,4
10-14 tahun	8	9	17	12,1
>14 tahun	42	58	100	71,4
Total	**57**	**83**	**140**	**100**

4.2. Imunitas Responden

Kekebalan atau imunitas individu sangat mempengaruhi kejadian kesakitan dan prognosis penyakit difteri. Data imunitas responden terhadap difteri yang dikumpulkan mencakup 2 hal, yaitu riwayat imunisasi responden (kasus dan kontak umur $\leq$ 15 tahun) dan titer antibodi (kusus kontak). Data tentang riwayat imunisasi responden dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Riwayat imunisasi responden umur $\leq$ 15 tahun

Riwayat Imunisasi	Jumlah	%
Pernah Imunisasi Difteri	27	67,5
Tidak Pernah Imunisasi Difteri	10	25
Tidak tahu	3	7,5
Total	**40**	**100**

Tabel 3 menunjukkan bahwa 25-33 % responden, baik kasus maupun kontak berusia 15 tahun ke bawah tidak pernah diimunisasi difteri. Titer antibodi terhadap difteri pada sampel (kontak erat penderita) dapat dilihat pada Tabel 4 yang menunjukkan bahwa hanya 80 % kontak erat penderita yang memiliki titer antibodi protektif terhadap difteri, dengan kata lain 20 % kontak erat berrisiko terserang difteri berat.

Tabel 4. Titer antibodi (IgG difteri) kontak erat penderita difteri

Titer Antibodi	Jumlah	%
Protektif	105	80,8
Tidak Protektif	25	19,2
Total	130	100

4.3. Faktor Lingkungan

Beberapa faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi kejadian difteri diantaranya riwayat kontak dengan penderita difteri. Gambaran ada tidaknya riwayat kontak dengan penderita difteri pada kasus dapat dilihat pada Tabel 5 berikut ini.

Tabel 5 Riwayat kontak dengan penderita difteri sebelumnya

Riwayat Kontak	Jumlah	%
Ya	5	16,1
Tidak	19	61,3
Tidak Tahu	7	22,6
Total	31	100

Tabel 5 menunjukkan bahwa hanya 16,1 % kasus yang diketahui kontak dengan penderita difteri sebelumnya.

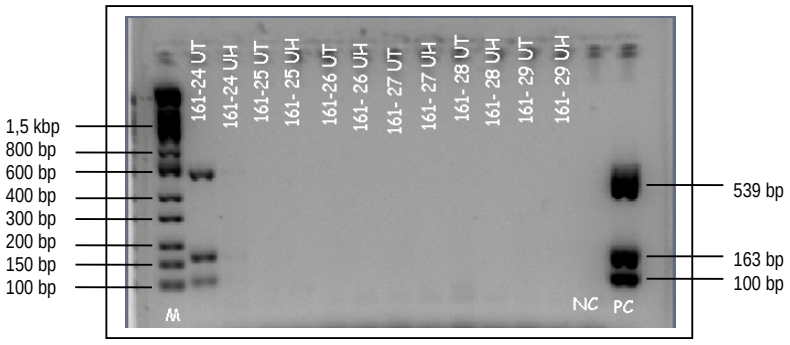
4.4. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Penyebab Difteri

Bakteri penyebab difteri yang berhasil diidentifikasi pada spesimen klinis sebanyak 16 (9,3%) dengan metode PCR dan 8 (4,7%) dengan metode konvensional dari 170 responden yang diperiksa. Selengkapnya tentang hal tersebut dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi bakteri penyebab difteri

Hasil pemeriksaan	Metode Konvensional		PCR	
	Jumlah	%	Jumlah	%
Kasus				
Positif	3	9,7	6	19,4
Negatif	28	90,3	25	80,6
Total	**31**	**100**	**31**	**100**
Kontak				
Positif	5	3,5	10	7,1
Negatif	136	96,5	131	92,9
Total	**141**	**100**	**141**	**100**

Tabel 6 menunjukkan bahwa pemeriksaan PCR memiliki sensitifitas 2 kali lipat dibandingkan metode konvensional untuk identifikasi bakteri penyebab difteri. Hal ini terlihat dari hasil pemeriksaan sampel, baik pada kasus maupun kontak. Sebagian hasil pemeriksaan PCR dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1
Hasil pemeriksaan PCR: 100 bp DNA ladder (M), positif terdeteksi *C. diphtheriae* toksigenik (161-24UT), tidak terdeteksi bakteri penyebab difteri (161-24UH s-d 161-29UH), ddH2O untuk kontrol negatif (NC), kontrol positif (PC).

Gambar 1. Menunjukkan bahwa pada sampel positif akan tampak pita sebagai penanda spesies (163 bp) dengan atau tanpa pita penanda toksigenisitas bakteri (100 bp dan 539 bp). Pita tersebut tidak tampak pada sampel yang tidak terdapat bakteri penyebab difteri di dalamnya (negatif). Gambaran hasil pemeriksaan laboratorium difteri (metode konvensional dan PCR) berdasarkan daerah asal sampel dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Gambaran hasil pemeriksaan laboratorium difteri berdasarkan daerah asal

Daerah Asal	**Positif**		**Negatif**		**Jumlah**	
	Σ	**%**	**Σ**	**%**	**Σ**	**%**
Sumatra Selatan	0	0	6	100	6	100
Bangka Belitung	0	0	6	100	6	100
Kalimantan Barat	2	5,7	33	94,3	35	100
Kalimantan Timur	0	0	13	100	13	100
Banten	4	6,9	54	93,1	58	100
Jawa timur	10	23,8	32	76,2	42	100
Bali	0	0	12	100	12	100
Total	**16**	**9,3**	**156**	**90,7**	**172**	**100**

Tabel 7 menunjukkan bahwa meskipun secara kuantitas, jumlah responden dari Banten paling banyak, namun sampel positif terbanyak berasal dari daerah Jawa Timur (23,8%).

Karakterisasi bakteri penyebab difteri yang dilakukan pada penelitian ini meliputi spesies dengan metode konvensional dan PCR, subtyping dengan metode konvensional, toksigenisitas dengan metode konvensional (Elek test) dan PCR, serta resistensi bakteri terhadap antibiotik dengan metode konvensional (E-test). Karekteristik bakteri berdasarkan spesies dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Karakteristik bakteri berdasarkan spesies

Spesies	**Jumlah**	**%**
C. diphtheriae	16	100
C. ulcerans	0	0
C. pseudotuberculosis	0	0
Total	16	100

Tabel 8 menunjukkan bahwa bakteri penyebab difteri di Indonesia didominasi oleh *C. diphtheriae,* diantara 16 hasil positif tidak ada kasus yang disebabkan *C. ulcerans* maupun *C. pseudotuberculosis.* Karakteristik 8 bakteri yang berhasil diisolasi dengan metode konvensional berdasarkan subtipe dapat dilihat pada Tabel 9 berikut ini.

Tabel 9. Karakteristik bakteri berdasarkan subtipe

Subtipe	**Jumlah**	**%**
Gravis	6	75
Mitis	1	12,5
Intermedius	1	12,5
Belfanti	0	0
Total	8*	100

*hasil positif dengan metode konvensional

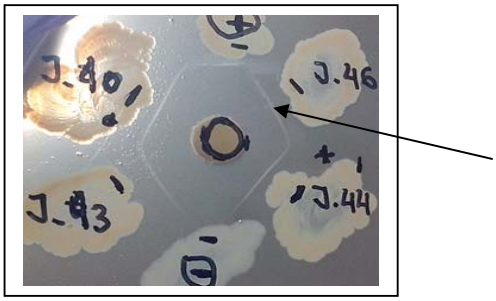
Tabel 9 menunjukkan bahwa bakteri penyebab difteri didominasi oleh *C. diphtheriae* subtype gravis dan tidak ditemukan subtipe belfanti diantara 8 isolat yang berhasil diisolasi. Karakteristik bakteri berdasarkan toksigenisitas bakteri dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Karakteristik bakteri berdasarkan toksigenisitas bakteri

Toksigenisitas	**Jumlah**	**%**
Toksigenik	16	100
Nontoksigenik	0	0
NTTB	0	0
Total	16	100

Tabel 10 menunjukkan bahwa semua bakteri penyebab difteri (*C. diphtheriae*) yang berhasil diidentifikasi termasuk jenis toksigenik.

Pemeriksaan toksigenisitas bakteri dilakukan dengan 2 metode, yaitu PCR sebagaimana telah disebutkan sebelumnya pada Gambar 1 dan Elek test. Pemeriksaan Elek test dilakukan terhadap 8 isolat *C.diphtheriae* yang berhasil diisolasi dari 8 sampel penelitian menggunakan metode konvensional. Gambaran pemeriksaan Elek test dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini.



Gambar 2

Hasil pemeriksaan Elek test: hasil positif toksigenik ditunjukkan dengan adanya garis presipitasi (tanda panah) diantara inokulasi bakteri dan cakram ADS

Karakteristik bakteri berdasarkan resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik dapat dilihat pada Tabel 11 berikut ini.

Tabel 11. Resistensi bakteri terhadap antibiotik (n = 8)

Antibiotik	**Sensitif (*Susceptible*)**		**Intermediete**		**Resisten**	
	Σ	**%**	**Σ**	**%**	**Σ**	**%**
Penisilin	4	50	1	12,5	3	37,5
Erithromycin	7	87,5	0	0	1	12,5
Clindamisin	7	87,5	0	0	1	12,5
Gentamisin	8	100	0	0	0	0
Vancomisin	6	75	2	25	0	0
Tetrasiklin	0	0	0	0	8	100
Linezolid	8	100	0	0	0	0
Co-tromoxazole	7	87,5	0	0	1	12,5
Moxifloxacin	8	100	0	0	0	0
Rifampicin	8	100	0	0	0	0

Tabel 11 menunjukkan bahwa semua isolat resisten dengan antibiotik Tetrasiklin dan telah ditemukan isolat resisten terhadap Penisilin dan Erythomycin sebagai antibiotik utama untuk pencegahan dan pengobatan difteri.

BAB 5
PEMBAHASAN

5.1. Sampel

Pada penelitian ini selain penderita difteri (kasus), kontak erat penderita juga dijadikan responden. Identifikasi spesimen klinis dari kontak bermanfaat untuk mengetahui pola penyebaran dan deteksi dini penyakit untuk pengobatan dan pencegahan penularan. Sebagaimana terlihat pada Tabel 1, kasus terbanyak masih terjadi di daerah Banten, Kalimantan Barat, dan Jawa Timur yang dalam beberapa tahun terakhir menjadi daerah endemis difteri. Hal yang perlu dicatat bahwa tahun 2015 juga terjadi wabah difteri di Sumatra Barat, namun karena tidak termasuk daerah penelitian sehingga tidak masuk sebagai sampel penelitian.

Perbedaan proporsi penyakit berdasarkan usia dan jenis kelamin. Sebagaimana terlihat pada Tabel 2, kasus difteri di Indonesia masih didominasi usia dibawah 15 tahun (79,4%). Keadaan tersebut merupakan gambaran umum kasus difteri yang terjadi di daerah atau negara dengan cakupan imunisasi rendah atau kondisi pada era pre-vaksinasi, yaitu < 30% kasus berusia 15 tahun ke atas. Sebaliknya, di negara-negara dengan cakupan imunisasi tinggi umumnya terjadi peningkatan proporsi kasus pada usia dewasa. Di sisi lain, proporsi kasus pada perempuan juga terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan laki-laki. Hal ini serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan Meera & Rajarao di India, namun berbeda dengan kondisi di Australia sebagaimana dilaporkan oleh Gidding, et al.[14,15]

5.2. Imunitas Responden

Difteri dapat terjadi pada anak yang tidak diimunisasi maupun diimunisasi sebagaimana terlihat pada Tabel 3. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan kejadian difteri pada anak/orang yang mendapatkan imunisasi. Pertama, kualitas vaksin yang tidak terjaga selama transportasi dan penyimpanan serta status gizi anak yang buruk akan menyebabkan kegagalan tubuh dalam membentuk respon imun. Kedua setelah imunisasi, titer antibodi di dalam tubuh akan bertahan dalam jangka waktu tertentu kemudian menurun seiring berjalannya waktu. Bila tidak dilakukan *booster* maka penurunan antibodi akan terus terjadi dan imunitas terhadap difteri juga akan menurun. Ketiga, vaksin difteri yang diberikan saat imunisasi berupa toksoid difteri, imunitas yang terbentuk berfungsi untuk netralisasi toksin difteri yang dihasilkan bakteri penyebab. Oleh karena itu, seseorang yang telah diimunisasi

masih dapat terserang difteri, namun umumnya hanya ringan karena toksin difteri dapat dinetralisasi.[14,16]

Pada penelitian ini, pemeriksaan titer antibodi (IgG) terhadap difteri dilakukan pada kontak erat penderita dengan metode ELISA. Pada kasus, tidak diperiksa titer antibodi karena bias dengan peningkatan antibodi yang terbentuk secara alami karena adanya infeksi difteri. Titer antibodi protektif ($\geq$ 0,1 dengan ELISA atau $\geq$ 0,01 dengan netralisasi) terdapat pada sekitar 80% responden sebagaimana terlihat pada Tabel 4. Hal ini serupa dengan hasil penelitian pada Riskesdas 2007 dan 2013 yang menunjukkan bahwa titer antibodi protektif terhadap difteri terdapat pada sekitar 80% masyarakat indonesia. Bila dicermati, titer antibodi protektif terlihat lebih tinggi dari cakupan imunisasi responden. Hal ini dapat terjadi karena adanya bakteri penyebab difteri yang bersirkulasi di lingkungan maupun reaksi silang dengan antigen lain.[17,18]

5.3. Faktor Lingkungan

Prediksi adanya sirkulasi bakteri penyebab difteri di lingkungan dikuatkan adanya bukti bahwa pada 61,3 % kasus tidak ada riwayat dan pada 22,6 % kasus tidak diketahui riwayat kontak dengan penderita difteri sebagaimana terlihat pada Tabel 5. Penularan diferi umumnya terjadi melalui kontak antara orang dengan orang *(C. diphtheriae)* dan orang dengan binatang *(C. ulcerans* dan *C. pseudotuberculosis).* Selain itu, difteri dapat ditularkan secara tidak langsung melalui benda yang terkontaminasi, misalnya debu, peralatan sehari-hari, bahkan susu. Hal ini dipengaruhi oleh kemampuan bakteri penyebab bertahan hidup cukup lama dalam suasana yang kering. Riwayat kontak dengan orang lain yang membawa bakteri penyebab difteri mungkin tidak akan teridentifikasi pada beberapa keadaan. Pertama, kontak dengan karrier, yaitu orang yang membawa bakteri penyebab difteri tanpa adanya gejala klinis penyakit. Kedua, dengan penderita yang sedang dalam masa inkubasi, artinya saat terjadi kontak penderita tersebut belum menunjukkan gejala klinis.[19,20,21]

5.4. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Penyebab Difteri

Pada penelitian ini konfirmasi laboratorium dilakukan dengan 2 metode, metode konvensional dan PCR. Sebagaimana terlihat pada Tabel 6, sebanyak 8 responden yang terdiri dari 3 kasus dan 5 kontak erat penderita terkonfirmasi positif difteri dengan metode konvensional yang merupakan *gold standard* pemeriksaan difteri. Sementara itu dengan metode PCR, kasus yang terkonfirmasi sebanyak 6 responden dan kontak yang terkonfirmasi sebanyak 10 responden. Dengan demikian, sensitifitas PCR terlihat 2 kali lipat lebih tinggi

dari metode konvensional. Hal ini, serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Nakao, et al. meskipun dengan persentase yang berbeda, yaitu 36%:70%. Pemeriksaan PCR sangat membantu dalam konfirmasi hasil laboratorium difteri, khususnya di negara kepulauan seperti Indonesia. Kadang diperlukan waktu berhari-hari sebelum spesimen sampai ke laboratorium untuk diidentifikasi. Dalam kondisi demikian, viabilitas bakteri telah menurun dan identifikasi dengan metode konvensional dapat mengalami kendala. Selain lebih sensitif, PCR juga lebih cepat dan relatif lebih mudah dalam interpretasi hasil dibandingkan metode konvensional.[22]

PCR juga dapat digunakan sebagai alternatif untuk pemeriksaan spesies dan toksigenisitas secara bersamaan. Pemeriksaan toksigenisitas dengan metode PCR memiliki kelebihan karena dapat dilakukan dengan cepat dan lebih mudah dalam interpretasi. Namun demikian, pemeriksaan toksigenisitas dengan PCR memiliki keterbatasan dalam identifikasi strain *non-toxigenic tox gene bearing* (NTTB). Pada strain NTTB gen tox yang dibawa bakteri tidak terekspresi sehingga secara fenotip tidak menghasilkan toksin. Dalam kasus tersebut akan ada perbedaan hasil antara PCR dengan Elek test, dimana positif toksigenik secara PCR namun nontoksigenik secara Elek test. Dalam hal ini, Badan litbangkes telah mengembangkan suatu metode PCR yang dapat digunakan untuk identifikasi strain NTTB dan telah terbukti akurat untuk menentukan toksigenisitas bakteri penyebab difteri.[23]

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kemampuan petugas dalam menjaring kasus difteri masih bervariasi antar daerah, sebagaimana terlihat pada Tabel 7. Persentase kasus positif tertinggi yang terkonfirmasi hasil laboratorium berasal dari Jawa Timur, disusul Banten dan Kalimantan Barat. Hal ini dapat terjadi karena ketiga daerah tersebut merupakan endemis difteri sehingga kemampuan petugas maupun system yang dijalankan untuk menemukan dan mengidentifikasi kasus difteri cenderung labih baik dibandingkan daerah lain. Klinisi yang sering menjumpai kasus difteri akan cenderung lebih cepat dan tepat dalam menentukan diagnosis difteri. Kecepatan diagnosis dan pengambilan spesimen sebelum pemberian antibiotik akan meningkatkan keberhasilan dalam konfirmasi laboratorium. Selain itu, keberhasilan pemeriksaan juga ditentukan oleh kemampuan petugas dalam pengambil spesimen.[8]

Bakteri penyebab difteri meliputi *C.diphtheriae, C.ulcerans,* dan *C.pseudotuberculosis* yang juga dikenal dengan *potentially toxigenic Corynebacteria*. Ketiga spesies bakteri tersebut dideteksi dan diidentifikasi pada penelitian ini. Seluruh bakteri yang berhasil diidentifikasi dari sampel penelitian merupakan jenis *C.diphtheriae* sebagaimana terlihat pada Tabel 8. Hal ini serupa dengan hasil penelitian yang dilaporkan sebelumnya oleh

Sunarno. *C.diphtheriae* merupakan penyebab utama di negara-negara dengan cakupan imunisasi yang masih rendah. Sementara di negara maju dengan cakupan imunisasi baik, khususnya di Inggris kasus difteri yang disebabkan oleh *C.ulcerans* terlihat meningkat dan bahkan lebih banyak dari *C.diphtheriae.* Hal ini diduga terjadi karena imunitas yang terbentuk dari imunisasi toksoid difteri tidak sepenuhnya proteksi terhadap kasus difteri yang disebabkan oleh *C.ulcerans.*[23,24]

Tabel 9 menunjukkan bahwa subtype *C. diphtheriae* yang menyebabkan difteri di Indonesia tahu 2015 didominasi subtype gravis. Hanya sebagian kecil subtype mitis dan intermedius. Meskipun sebagian literatur menyebutkan bahwa subtype gravis dapat menghasilkan toksin difteri dengan lebih cepat dan cenderung menyebabkan penyakit yang lebih berat, namun kenyataan di lapangan tidak selalu demikian. Bahkan strain PW 8 yang dikenal paling banyak menghasilkan toksin difteri bukanlah subtype gravis.[25,26] Tabel 10 menunjukkan bahwa bakteri penyebab difteri di Indonesia didominasi oleh spesies *C. diphtheriae* toksigenik. *C. diphtheriae* non-toksigenik belakangan banyak ditemukan di negara maju, namun pernah juga ditemukan sebagai penyebab kasus difteri di Indonesia oleh Sunarno.[23,27]

Resistensi bakteri penyebab difteri terhadap antibiotik perlu mendapat perhatian yang serius. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa telah ditemukan strain resisten terhadap Erythromycin dan Penicillin sebagaimana terlihat pada Tabel 11. Kedua antibiotik tersebut merupakan antibiotik utama untuk profilaksis dan pengobatan difteri. Resistensi bakteri penyebab difteri terhadap Penisilin dan Erythromycin sebelumnya dilaporkan oleh Phalkey tahun 2013 dan Coyle tahun 1979. Resistensi yang lebih tinggi terlihat pada antibiotik Tetrasiklin yang mencapai 100%. Resistensi bakteri penyebab difteri terhadap Tetrasiklin telah terjadi secara global, bahkan telah ditemukan di Indonesia berdasarkan laporan Rockhill, et al. tahun 1982.[28,29,30]

5.5. Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini hanya dilakukan di 7 Propinsi dengan kasus difteri tertinggi tahun 2013. Pada tahun 2015 terjadi perubahan distribusi penyakit sehingga beberapa daerah seperti Sumatra Barat dengan kasus cukup tinggi tidak diambil sebagai sampel. Selain itu, jangka waktu pengumpulan data efektif hanya sekitar 6 bulan sehingga beberapa kasus difteri di daerah penelitian tidak terambil sebagai sampel. Keterbatasan lain terletak pada metode untuk karakterisasi yang terbatas pada spesies, biotipe, toksigenisitas dan resistensi terhadap antibiotik, tidak dilakukan *molecular typing* sehingga ada keterbatasan dalam variasi bakteri.

BAB 6
KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. KESIMPULAN

a. Jumlah kasus difteri terbanyak yang berhasil ditemukan dalam rentang waktu penelitian berasal dari Banten dan Kalimantan Barat dengan masing-masing 8 kasus, disusul Jawa Timur dengan 7 kasus, Bali 4 kasus dan Sumatra Selatan serta Bangka Belitung masing-masing 1 kasus. Namun demikian, kasus/kontak yang terkonfirmasi dengan pemeriksaan laboratorium terbanyak berasal dari Jawa Timur.
b. Bakteri penyebab difteri yang berhasil diidentifikasi dari kasus maupun kontak dengan metode konvensional maupun PCR seluruhnya adalah spesies *C. diphtheriae* dan jenis toksigenik. Subtype bakteri terbanyak adalah gravis, disusul dengan mitis dan intermedius dengan proporsi yang sama. Seluruh bakteri penyebab difteri resisten terhadap antibiotik Tetrasiklin dan ditemukan bakteri yang telah resisten terhadap Penisilin maupun Erythromycin.
c. Sekitar 80% kontak erat penderita memiliki titer antibodi protektif terhadap difteri berdasarkan pemeriksaan ELISA, 20% lainnya memiliki risiko terserang difteri berat.

6.2. SARAN

a. Perlu meningkatkan upaya pencegahan dan pengendalian difteri, khususnya di daerah endemis.
b. Perlu monitoring pola penyebaran dan resistensi bakteri penyebab difteri terhadap antibiotik.
c. Perlu meningkatkan cakupan imunisasi dasar, khususnya yang mengandung toksoid difteri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinserling VA, and Yakovlev AA. The pathology of diphtheria. *J Infect Dis*.2000;181(Suppl 1):S116-S120.
2. Nursyamsi-Agustina N, Wahyutomo R, Hapsari MMDEAH, and Wahjono H. Tonsilopharingitis diphtheriae complicated with diphtheritic myocarditis in 13 years old girl at DR Kariadi Hospital Semarang-Indonesia. *JCMID.* 2014;1(1):2355-1909.
3. Lindhusen-Lindhe E, Dotevall L, and Berglund M. Imported laryngeal and cutaneous diphtheria in tourists returning from Western Africa to Sweden, March 2012. *Eurosurveillance.*2012;17(23):5-7.
4. Undang-Undang No. 4 tahun 1984 tentang wabah penyakit menular.
5. Peraturan Pemerintah No. 40 tahun 1989 tentang wabah penyakit menular.
6. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 560 MENKESPER/VIII/1989 tentang Jenis Penyakit tertentu yang dapat menimbulkan wabah.
7. WHO. Diphtheria reported cases. 2014.
8. Ditjen PP&PL, Kemenkes RI. Diphtheria surveillance data—Monthly Integrated VPD Report. 2014.
9. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 42 tahun 2013 tentang penyelenggaraan imunisasi.
10. Susyanty AL, Supardi S, Herman MJ, dan Lestary H. Kondisi sumber daya tenaga pengelola vaksin di Dinas Kesehatan Provinsi, Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota dan Puskesmas. *Bul Penelit Sistem Kesehat.* 2014;17(3):285-296.
11. Pracoyo NE, Jekti RP, Puspandari N, dan Bagus WD. Hubungan antara pengetahuan dan sikap pengelola vaksin dengan skor pengelolaan vaksin di daerah kasus difteri di Jawa Timur. *Media Litbangkes.* 2013;23(3):102-109.
12. Sunarno, Sariadji K, Pracoyo N, Putranto RH. Pengembangan metode diagnostik cepat laboratorium untuk identifikasi penyebab difteri: Aplikasi PCR multipleks untuk identifikasi cepat penyebab difteri. 2015; Jakarta:Pustaka Obor.
13. Putranto RH, Sariadji K, Sunarno, Roselinda. *Corynebacterium diphtheriae:* pemeriksaan laboratorium bakteriologi. 2014; Jakarta:Pustaka Obor.
14. Meera M & Rajarao M. Diphtheria in Andhra Pradesh-a clinical-epidemiology study. *IJID.* 2014;19:74-78.
15. Gidding HF, Burgess MA, and Gilbert GL. Diphtheria in Australia, recent trends and future prevention strategies. *CDI.* 2000;24(6):165-167.
16. Lumio J, Olander R-M, and Groundstroem K. Epidemiology of three cases of severe diphtheria in Finnish patients with low antitoxin antibody levels. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20:705-710.
17. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes RI. Laporan hasil Riskesdas 2007.
18. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kemenkes RI. Laporan Riskesdas 2013.
19. Burkovski A. Diphtheria and its Etiological Agent. In: Burkovski A, Editor. *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. 2014. Springer.
20. Sharp JCM. Infection associated with milk and dairy products in Europe and North America, 1980-85. *Bulletin WHO.* 1987;65(3):397-406.

21. Kim-Farley RJ, Soewarso TI, Rejeki S, Soeharto, Karyadi A, Nurhayati S, and Soeharto S. Silica gel as transport medium for Corynebacterium diphtheriae under tropical condition (Indonesia). *J Clin Microbial.* 1987;25(5):964-965.
22. 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.
23. Sunarno. Development of multiplex PCR for identify species and toxigenicity (toxigenic, non-toxigenic and NTTB) *potentially toxigenic Corynebacteria* (dissertation). 2015: Universitas Indonesia.
24. Wagner KS, White JM, Crowcroft NS, de Martin S, Mann G, and Efstratieau A. Diphtheria in United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans. Epidemiol Infect*. 2010;138:1519-1530.
25. Todar K. Todar's Online Textbook of Bacteriology. 2009. http://textbookofbacteriology.net/diphtheria.html. (Accessed 27 February 2015).
26. Russell LM & Holmes RK. Highly toxigenic but avirulent Park-Williams 8 strain of *Corynebacterium diphtheriae* does not produce Siderophore. *Infect Immun.* 1985;47(2):575-578.
27. Zasada AA, Baczewska-Rej M, and Wardak S. An increase in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland – molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreak and those currently circulating in Poland. *Int J Infect Dis.* 2010;14(10):e907-e912.
28. Phalkey1 RK, Bhosale RV, Joshi AP, Wakchoure SS, Tambe MP, Awate P and Marx M. Preventing the preventable through effective surveillance: the case of diphtheria in a rural district of Maharashtra, India. *BMC Public Health*. 2013. 13:317.
29. Choyle MB, Minshew BH, Bland JA, and Hsu PC. Erithromycin and clindamycin resistance in Corynebacterium diphtheriae from skin lesions. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979;16(4):525-527.
30. Rockhill RC, Sumarmo, Hadiputranto H, Siregar SP, and Muslihun B. Tetracycline resistance of Corynebacterium diphtheriae isolated from diphtheria patients in Jakarta, Indonesia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;21(5):842-843.

Lampiran 1. Persetujuan Etik Penelitian

KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon (021) 4261088 Faksimile (021) 4243933
E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id. *Website:* http://www.litbang.depkes.go.id

PERSETUJUAN ETIK (*ETHICAL APPROVAL*)

Nomor LB.02.01/5.2/KE. 525 /2015

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian berdasarkan *Nuremberg Code* dan Deklarasi Hensinki, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Pola Strain C. Diphtheriae pada Kasus dan Orang Kontak serta Tingkat Kekebalannya di Daerah KLB Tahun 2015"

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

Dra. Noer Endah Pracoyo, M.Kes.

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol dengan masa berlaku maksimum selama 1 (satu) tahun.

Selama penelitian berlangsung, laporan kemajuan (setelah 50% penelitian terlaksana), laporan *Serious Adverse Event/SAE* (bila ada) harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan/atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 23 Juni 2015

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo

Lampiran 2. Naskah Penjelasan

NASKAH PENJELASAN
(*informed consent*)

"Pola Strain *C.Diphtheriae* Pada Kasus Dan Orang Kontak Serta Tingkat Kekebalannya Di Daerah KLB Tahun 2015"

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia melakukan penelitian mengenai "Pola Strain *C.Diphtheriae* Pada Kasus Dan Orang Kontak Serta Tingkat Kekebalannya Di Daerah KLB Tahun 2015" pada penderita yang berobat di Rumah sakit dan Puskesmas. Sebagai orang tua/ wali dari putra /putri, Bapak/ Ibu diminta kesediaannya untuk berpartisipasi dalam penelitian ini.
Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kuman / bakteri penyebab difteri yang berobat di rumah sakit dan Puskesmas **serta** untuk melihat titer antibodi (**kekebalan)** difteri pada responden yang pernah kontak dekat dengan penderita difteri. Informasi yang diperoleh bermanfaat dalam perencanaan pengendalian penyakit difteri pada umumnya dan sebagai dasar penentuan pengobatan serta data dasar toksigenitas kuman dari penderita.
Penyakit difteri merupakan masalah kesehatan masyarakat, penyakit ini mudah menular terutama di daerah dengan sanitasi lingkungan yang kurang baik, penyakit ini dapat ditularkan secara langsung dari penderita ke orang dekat melalui percikan ludah saat berbicara, melalui minuman dan makanan serta melalui udara di sekitarnya, jika tidak segera mendapat perawatan dapat berakibat keparahan bagi penderita.

Selama anak Bapak/ ibu / saudara/ saudari ikut dalam penelitian ini kami akan melakukan beberapa prosedur yaitu wawancara mengenai riwayat penyakit difteri yang diderita, **selam kurang lebih 15 menit.** Pengambilan sampel usap tenggorok/ hidung /lesi kulit, serta darah vena sebanyak 1cc bagi anda yang pernah kontak denga penderita difteri. Wawancara dan pengambilan swab dan darah vena akan dilakukan oleh tenaga kesehatan yang berpengalaman di rumah sakit atau di Puskemas.
Anda hanya akan mengalami sedikit rasa tidak nyaman pada waktu pengambilan usap tenggorok/usap hidung, setelah itu akan segera merasa baik/sehat kembali.

Keuntungan yang akan Anda peroleh bakteri difteri yang Anda derita serta kekebalan difteri pada anda yang pernah kontak dengan penderita difteri tanpa dipungut biaya.
Bahan swab tenggorok/ hidung/lesi kulit akan diperiksa di Laboratorium Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia di Jakarta. Temuan hasil pemeriksaan pemeriksaan akan disimpan di laboratorium Pusat Biomedis dan teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, juga akan di informasikan ke Dinas Kesehatan setempat di daerah Penelitian.

Partisipasi anak Bapak/ Ibu/ saudara/ saudari sepenuhnya bersifat suka rela, tidak ada sangsi bila tidak bersedia berpartisipasi, dapat mengundurkan diri kapan saja dan tidak akan kehilangan manfaat apapun.

Semua informasi akan dijaga kerahasiaannya, dan bila kelak diperlukan materi ini akan digunakan untuk pengembangan di bidang kesehatan. Bila ingin mendapatkan keterangan lebih lanjut mengenai penelitian ini, Bapak Ibu dapat menghubungi Dra. Noer Endah Pracoyo, M.Kes (telp : 081314122929) dengan alamat Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jalan Percetakan Negara 23, Jakarta 10560. Telp. (021) 42881754 Ext :129. atau dokter di RS/ Puskesmas tempat anak/

bapak ibu berobat**. Dan beberapa nama sebagai koordinator daerah penelitian seperti pada daftar dibawah ini (tulisan tidak perlu tebal)**

Daftar nama dan koordinator daerah penelitian yang bisa dihubunngi

Daerah / Provinsi Penelitian	Koordinator daerah (Provinsi)	No HP
1. Banten	Hadi Safaat, SKM M.Kes	0813109858809
2. Sumatera Selatan	Anita Riantina SKM	08127840760
3. Bangka Belitung	Debby Mahariska SKM	081367495812
4.Bali	Putu Dwi Adi SKM, M.Kes	081999262662
5.Jawa Timur	Drs. Bambang Wuryono K. M.Kes	08123048270
6.Kalimantan Timur	Mirza Alfian, SKM. M.Kes	081347306726
7.Kalimantan Barat	Aida AM	081256192566.

Apabila Bapak/ Ibu/ saudara setuju ikut berpartisipasi, mohon didisi dan ditanda tangani surat persetujuan yangb ada dibawah penjelasan ini, aslinya dapat Bapak Ibu ambil dan lembar berikutnya dikembalikan ke petugas.

"POLA STRAIN *C.DIPHTHERIAE* PADA KASUS DAN ORANG KONTAK SERTA TINGKAT KEKEBALANNYA DI DAERAH KLB TAHUN 2015"

Saya telah mendapat waktu yang cukup untuk membaca, bertanya dan mendapat penjelasan yang cukup jelas. Saya juga mengerti bahwa partisipasi ini adalah secara suka rela dan dapat mengundurkan diri tanpa suatu beban ataupun sangsi, tanpa kehilangan manfaat apapun yang sudah merupakan hak kami.

Nama : .....
Tanggal lahir : .....

Nama dan tanda tangan Orang tua/ wali : Nama Jelas :	Tanggal : ...../...../.....
Nama dan tanda tangan saksi : Nama jelas :.....	Tanggal : ...../...../.....
Nama dan tanda tangan dokter / Petugas Kesehatan Nama jelas :	Tanggal: ...../...../.....

Lampiran 3. Data kasus difteri di Indonesia

Data kasus difteri sampai tanggal 20 Mei 2015

No	Province	2011			2012			2013			2014		
		Total			Total			Total			Total		
		Death	Vaccinated	Total	Death	Vaccinated	Total	Death	Vaccinated	Total	Death	Vaccinated	Total
1	Aceh	0	0	0	1	0	1	2	2	6	1	0	5
2	Sumatera Utara	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	2	4
3	Sumatera Barat	0	1	1	2	0	2	0	0	0	0	8	9
4	Riau	0	0	0	0	0	4	1	0	3	0	1	1
5	Kepulauan Riau	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
6	Jambi	1	0	1	0	0	0	1	2	2	0	1	1
7	Bengkulu	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
8	Sumatera Selatan	0	2	2	0	1	5	0	0	0	1	1	3
9	Bangka Belitung	0	2	3	1	0	1	0	0	1	0	0	1
10	Lampung	0	1	1	0	0	0	0	3	3	0	0	0
11	Jakarta	1	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	2
12	Banten	7	4	12	4	4	13	5	10	20	6	4	19
13	Jawa Barat	6	6	45	1	8	31	0	0	9	5	20	47
14	Jawa Tengah	0	3	8	0	30	32	0	6	9	0	1	2
15	DI Yogyakarta	0	1	1	0	2	2	0	2	2	0	0	0
16	Jawa Timur	20	375	664	37	494	954	24	353	610	3	203	295
17	Kalimantan Barat	1	5	6	4	6	15	3	6	29	1	6	21
18	Kalimantan Tengah	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
19	Kalimantan Selatan	0	0	1	13	0	61	3	3	15	0	1	3
20	Kalimantan Timur	0	42	56	0	8	13	0	6	15	0	2	2
21	Sulawesi Utara	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	2	3
22	Gorontalo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	Sulawesi Tengah	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	1	2
24	Sulawesi Selatan	0	1	6	12	5	50	0	1	12	0	5	5
25	Sulawesi Barat	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0
26	Sulawesi Tenggara	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	Bali	1	1	1	0	2	2	0	4	4	0	1	1
28	NTB	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
29	NTT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	Maluku	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
31	Maluku Utara	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	Papua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
33	Papua Barat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		39	446	816	76	564	1192	39	406	778	21	258	430

Lampiran 4. Bahan dan Cara Kerja

Pengumpulan Spesimen

Alat dan Bahan

a. *Tongue spatel* sterile
b. Dua buah lidi Kapas (*cotton swab*) steril
c. *End Frosted Slide*
d. Amies Transport medium
e. *Cool Box*
f. Senter

Cara

a. Semua bahan-bahan yang dibutuhkan dipersiapkan terlebih dahulu
b. *End frosted slide* dan Amies transport medium diberi identitas yang sesuai dengan pasien
c. Minta pasien membuka mulut tanpa mengeluarkana lidahnya sambil berkata Ahhhh….
d. *Tongue spatel* digunakan untuk menekan lidah pasien hingga bagian belakang tenggorokan dapat terlihat
e. Kapas lidi steril diusap beberapa kali pada tenggorokan, tonsil dan area yang berwarna putih (membran) pada tonsil, hindari menyentuh lidah
f. Jika tidak terlihat daerah yang abnormal, apuskan lidi kapas pada FAUCES DAN *palatum molle*
g. Langkah di atas kembali diulangi pada lidi kapas kedua, masukkan ke dalam tabung Amies Transport Medium
h. Ambil juga apusan dari hidung dan lesi kulit (jika ada) dengan cara yang sama.

Transport dan Penyimpanan

Berikut langkah-langkah yang dilakukan setelah spesimen tiba di Laboratorium.

a. Gunakan swab pertama untuk diinokulasikan pada agar darah (*Sheep Blood Agar*), *Loeffler serum slope* dan *Blood Tellurite* agar.
b. Gunakan swab kedua untuk membuat apusan pada slide dengan cara melakukan gerakan memutar di atas slide, sehingga diperoleh hapusan yang tipis.
c. Jika hanya diperoleh satu swab saja, maka diwajibkan pertama kali menggunakannya untuk kultur guna menghindarkan dari kontaminasi pada kultur dan memastikan spesimen yang digunakan cukup untuk kultur.

Kultur

Alat dan Bahan

a. Agar Darah
b. Loeffler serum slope
c. *Tellurite* agar
d. Ose
e. Api Bunsen

Cara Kerja

a. Gunakan swab yang baru diambil dari pasien, oleskan pada agar darah, *Tellurite* agar dan inokulasikan pada air kondensasi yang terdapat di media *loeffler serum slope*
b. Dengan menggunakan ose yang sudah disterilkan dengan api Bunsen, lakukan sterak pada tempat olesan di masing-masing media tersebut
c. Inkubasi ketiga media pada suhu 35°C
d. Setelah 4-6 jam hasil pertumbuhan bakteri pada media *loeffler* dapat diwarnai dengan pewarnaan gram dan Albert, jika diduga bakteri yang tumbuh adalah *C. Diphtheriae* dapat langsung di subkultur pada *Tellurite* agar
e. Kultur yang tumbuh pada *Tellurite* agar dapat dinilai pada 24 dan 48 jam. Lakukan pewarnaan Gram dan Albert pada koloni yang berwarna hitam.

Pewarnaan

Prosedur pewarnaan Gram adalah sebagai berikut:

a. Buatlah sediaan apus tipis di atas objek glass yang bersih, kiringkan di udara, fiksasi di atas Bunsen
b. Genangi permukaan apusan dengan crystal violet selama 1 menit
c. Bilas dengan air, kemudian genangi dengan larutan gram iodine selama 1 menit
d. Bilas sediaan dengan air
e. Lakukan decoulaorisasi dengan acetone/alcohol, genangi sediaan dengan acetone/alkohol selama 10-15 detik sambil digoyang-goyang perlahan hinggan warna jingga tampak muncul pada sediaan
f. Segera bilas dengan air
g. Genangi sediaan dengan safranin selama 30 detik
h. Bilas kembali dengan air, keringkan dan baca di bawah mikroskop dengan bantuan minyak imersi

Prosedur pewarnaan Albert adalah sebagai berikut:

a. Fiksasi sediaan apus di atas Bunsen
b. Genangi dengan larutan Albert I selama 2 menit
c. Bilas dengan air
d. Genangi dengan larutan Albert II selama 2 menit
e. Bilas kembali dengan air, keringkan dan baca di bawah mikroskop

Dengan menggunakan pewarnaan Albert, granula metachromatic *C.diphtheriae* akan tampak biru kehitaman, sementara badan dari basil tampak hijau kebiruan. *Corynebacterium diphtheriae* adalah basil gram positif yang memiliki tonjolan pada salah satu atau kedua ujungnya dan memiliki susunan seperti huruf V, W, T atau L.

Tes Biokimia

Corynebacterium diphtheria dapat diidentifikasi dengan melakukan inokulasi koloni tersangka pada beberapa media biokimia, antara lain : *dextrose, sucrose, amylum (starch), glycogen broth, nitrate infusion broth, hearth infusion broth,* dan *media christensen's urea* agar. Teteskan 2 ml *heart infusion broth* ke atas permukaan *loeffler slent medium*, kemudian dengan menggunakan pipet Pasteur steril, inokulasikan 4 tetes cairan tersebut ke atas masing-masing media Biokimia, inkubasi selama 48 jam. Lakukan pengamatan pada 24 dan 48 jam inkubasi pada media karbohidrat. Karakteristik Biokimia dari masing-masing spesies *Corynebacterium* spp adalah sebagai berikut.

Organisme	Glucose	Sucrose	Amylum/ Glikogen	Nitrate	Urea	Cystinase
C. diphtheria biotype intermedius	+	-	-	+	-	+
C. diphtheria biotype mitis	+	-	-	+	-	+
C. diphtheria biotype mitis varian belfanti	+	-	-	-	-	+
C. diphtheria biotype gravis	+	-	+	+	-	+
C. ulcerans	+	+/-	+	-	+	+
C. pseudotuberculosis	+	-	-	-	+	+

Tes biokimia dapat dilakukan dengan kit komersial API *Coryne* dengan prosedur sebagai berikut.

a. Persiapan Inokulasi: Inkubasi *pure culture* dari organisme tunggal dalam sheep BAP x3 selama 24 jam pada suhu 35^{o}C dengan kadar CO_2 5%. Gunakan swab steril, ambil culture dari BAP dan inokulasi dalam 3 ml saline steril untuk memberikan turbiditas minimal McFarland.
b. Persiapan strip: *incubation tray* disiapkan untuk masing-masing strip. Masukkan 5 ml air ke dalam sumuran *tray*.
c. Inokulasi strip: inokulasi test 1-11 dari strip (NIT sampai GEL)
d. Tambahkan 3 tetes ke dalam masing-masing *cupule* untuk test NIT sampai ES.
e. Untuk URE test, isi *tube* saja.
f. Untuk GEL test, isi keduanya (*tube* dan *cupule*).
g. Untuk 9 test yang terakhir (O sampai GLYG) pindahkan 0,5 ml suspensi bakteri ke dalam ampul GP medium kemudian campur dengan baik. Distribusikan suspensi baru ke dalam *tube* saja dari O sampai GLYG.
h. Tutup *cupule* URE dan O sampai GLYG dengan mineral oil.
i. Tutup dengan *incubation lid* dan inkubasi strip selam 24 jam pada suhu 35 ^{o}C (non CO_2).
j. Baca hasil reaksi dengan membandingkan perubahan warna terhadap index.

Tes Toksigenisitas dengan Modified Elek test

Prosedur Modified Elek test adalah sebagai berikut:

a. Tambahkan newborn bovine serum (NBS) ke dalam 2,5 ml molten Elek base pada suhu 45 ^{o}C dan tuangkan ke dalam plate dengan diameter 4,5 cm.
b. Inokulasi strain yang akan dites dan 3 strain control ke dalam plate 4,5 cm membentuk lingkaran.
c. Letakkan antitoxin disk (10 IU/disk) ditengah lingkaran dengan jarak kurang lebih 1 cm dari tempat inokulasi isolate.
d. Inkubasi plate selama 48 jam pada suhu 37 ^{o}C dan amati garis presipitasi diantara tempat inokulasi isolate dan disk antitoksin pada 24 dan 48 jam kemudian.

Multiplex PCR

Prosedur *multiplex PCR* adalah sebagai berikut:

a. Lakukan ekstraksi DNA dari isolat maupun spesimen klinis.

b. Buat master mix untuk reaksi multipleks dengan 5 pasang primer untuk identifikasi *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, toksigenisitas bakteri, termasuk strain NTTB sebagaimana dilaporkan oleh Sunarno.[23]
c. Tambahkan DNA template hasil ekstraksi lakukan proses amplifikasi pada mesin Thermal Cycler.
d. Lakukan sparasi produk PCR dengan Gel Elektroforesis dan diwarnai dengan Gel red atau sejenisnya.
e. Lakukan visualisasi dan analisis hasil dengan Gel doc.

BIODATA KETUA PELAKSANA

I. NAMA PENGUSUL

Dra. Noer Endah Pracoyo, DAP&E, M.Kes

II. A L A M A T

Rumah :

Jalan Angrek II Taman Meruya Blok A6/ No : 3 Kembangan, Jakarta Barat 11620

Kantor :

Jalan Percetakan Negara No. 23, Jakarta 10560

Telp : (021) 4261088 ext. 327

Email : noerendah@litbang.depkes.go.id.

III. RIWAYAT PENDIDIKAN

- Biologi UNS Sebelas Maret Surakarta.1982
- Diploma *Applied Parasitology & Enthomology*. Institute Medical Research Malaysia 1985
- Magister Epidemiologi Klinik Univ Gajah Mada Yogyakarta.2008.

IV. RIWAYAT PEKERJAAN

1. Peneliti pada Puslitbang BMF Litbangkes 1984 s/d 2008, sekarang

V. PUBLIKASI

VI.

1. **Survei titer antibodi anak sekolah usia 6-17 tahun di daerah KLB difteri dan non KLb difteri Di Indonesia** (penulis pertama). Buletin Penelitian Kesehatan . Vol 41 No 4. Desember 2013 (237-247).
2. **Hubungan antara Pengetahuan dan sikap Pengelola vaksin dengan skor Pengelolaan Vaksin didaerah kasus difteri di Jawa Timur** (penulis pertama). Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan . Vol 23 No 3 , September 2013 . (102-109).
3. **Proporsi titer antibodi penyakit yang dapat dicegah dengan imunisasi dari responmden hasil riskesdas 2007** (penulis pertama). Proseding seminar Nasional Biologi, Sains, lingkungan dan Pembelajarannya . Surakarta , 06 Juli 2013 . Volume II. Program Studi Pendidikan Biologi , FKIP, Uiv Sebelas Maret Surakarta. ISBN 978-602-8580-94-6.
4. **Sero survei status kekebalan Campak hasil riskesdas 2007** (penulis pertama). Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.Vol 23 No 2 Juni 2013 (89-94).
5. **Penyebab infeksi Avian Influenza A (H5N1) di Indonesia**. Journal Ekologi Kesehatan, vol 8. No 4. Desember 2009 : 1094-1099 (penulis pertama).
6. **Dampak Bencana Tsunami terhadap higiene sanitasi makanan dan air di barak pengungsian Nangroe Aceh Darusallam**. Media Litbang Kesehatan.

Volume XVIII, Nomor 3 tahun 2008. (penulis pertama)

7. **Kepekaan antibiotik terhadap kuman penyebab suspek Avian Influenza yang dinyatakan negatif H5N1 dan Infeksi Saluran Pernafasan Atas**. Proseding Seminar Nasional XII. Kimia dalam Pembangunan. Hotel Santika, Yogyakarta. 6 Agustus 2009. (penulis pertama)
8. **Penelitian Jamur pada rumah permanen, semi permanen, tidak permanen**. Proseding Seminar Nasional XII. Kimia dalam Pembangunan. Hotel Santika, Yogyakarta. 6 Agustus 2009. (penulis pertama)
9. **Kandungan Kimia Bawang putih sebagai repelen nyamuk**. Proseding Seminar Nasional Hari Nyamuk, IPB International Convention Center–*Botanical Square*, Bogor 10 Agustus 2009. (penulis kedua).

Penelitian yang pernah dilakukan :

1. Penelitian identifikasi penyebab difteri dalam rangka pencegahan KLB di Indonesia sub judul : Uji Metode diagnose cepat untuk identifikasi Penyebab difteri tahun 2014 (ketua pelaksana).
2. Penelitian sero survey penyakit yang dapat dicegah dengan imunisasi (analisa lanjut tahun 2012 (ketua pelaksana).
3. Penelitian potensi vaksin difteri di Jawa Timur tahun 2010-2011 (ketua pelaksana).
4. Penelitian Sero survei titer antibodi difteri pada anak usia 6-17 tahun di daerah KLB dan non KLB difteri tahun 2008-2009. (ketua pelaksana).
5. Penelitian faktor risiko infeksi AI (H5N1) pada penjamah unggas di daerah yang pernah terjadi KLB flu burung. (2007-2008). (ketua pelaksana).
6. Penelitian Ko Infeksi Avian Influenza H5N1 pada orang kontak suspek AI (H5N1) di Indonesia.(2006-2007) (ketua pelaksana)
7. Penelitian hiegine dan sanitasi makanan minuman di Tempat Pengolahan Makanan di daerah Pasca Bencana Tsunami NAD, (2005-2006). (ketua pelaksana)