

RED BIOTECHNOLOGY: SOLUSI PENANGANAN DIFTERI SEBUAH REVIEW

Muhammad Iqbal Filayani

Tadris Biologi, Fakultas Tarbiyah dan Ilmu Keguruan, IAIN Tulungagung

Muhammadiqbalfilayani16@gmail.com

ABSTRAK

Difteri penyakit yang menyerang saluran pernafasan disebabkan oleh suatu jenis mikroorganisme yaitu *Corynebacterium diphtheriae*. Bakteri tersebut memiliki racun eksotoksin yang bisa menginfeksi saluran pernafasan. Eksotoksin bakteri *C.diphtheriae* diregulasi oleh gen *dtxR*. Penelitian tentang pembuatan anti toksin dilakukan dengan memberikan difteri toksin (DT) pada sel VERO. Vaksin dapat dibuat dengan menambahkan bahan kimia tertentu seperti merkuri dan alumunium ke dalam difteri toksin, dan juga vaksin dapat dibuat dari mutan *C.diphtheriae* yang non toksik.

Kata kunci: Difteri, *Corynebacterium diphtheriae*, gen *dtxR*, difteria toksin, anti toksin, vaksin

Pendahuluan

Difteri merupakan penyakit toksik yang disebabkan oleh suatu jenis mikroorganisme dari golongan bakteri yaitu *Corynebacterium diphtheriae*. Bakteri tersebut membentuk pseudomembran pada saluran pernafasan sehingga merusak saluran pernafasan, dan ada juga yang menyerang kulit dan juga beberapa organ lainnya. *Corynebacterium diphtheriae* biasa menyerang pada anak kecil, orang tua dan menyebabkan kematian (Daskalaki, 2018). Namun pada epidemiologi sekarang ini difteri tidak hanya terjadi pada anak kecil saja melainkan pada orang dewasa (Sunarno *et al.*, 2013). Difteri ini merupakan penyakit menular pertama yang pengendaliannya menggunakan aplikasi mikrobiologi modern, imunologi, rekayasa genetika, bioteknologi dan juga kesehatan masyarakat, sehingga penyebaran dan toksisitas difteri dapat dikontrol terutama di negara maju (Daskalaki, 2018).

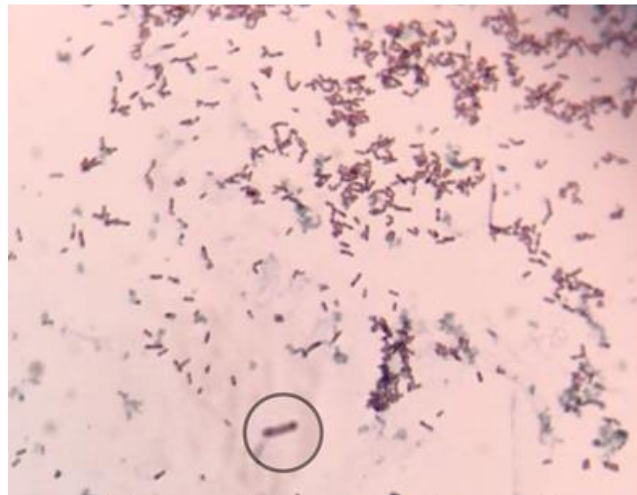
Etiologi

Corynebacterium merupakan bakteri anaerobik, tidak berkapsul dan tidak berspora serta berbentuk batang (basil), umumnya non motil, Gram positif (Gambar 1), katalase

positif, oksidasi negatif dapat ditumbuhkan pada media selektif yaitu media CTBA (*Cystine-Tellurite Blood Agar*), koloni positif akan berwarna abu-abu sampai hitam (Poor *et al.*, 2017). Mempunyai tiga sub spesies yaitu *C. diphtheriae mitis*, *C. diphtheriae gravis*, *C. diphtheriae intermdius*, dan ketiganya dapat menghasilkan toksik. Ketiga sub spesies tersebut dibedakan atas morfologi koloni, kemampuan hemolisisnya dan juga reaksi fermentasi. Selain *C.diphtheriae* yang toksik ada juga *C.diphtheriae* yang non-toksik, akan tetapi spesies yang non-toksik dapat berubah menjadi toksik melalui infeksi lisogenik (Daskalaki, 2018).

Epidemiologi

Bakteri *Coryneform* ("diphtheroids") ada di mana-mana di alam. Mereka ditemukan pada kulit manusia dan selaput lendir, pada tanaman, di tanah, di air tawar dan air asin. Manusia adalah satu-satunya yang diketahui sebagai sumber diisolasinya *C. diphtheriae*, meskipun strain baru diisolasi dari kucing (Christenson *et al.*, 1983). Difteri terjadi secara luas di daerah yang beriklim sedang dan insidensinya dapat berlangsung berbulan bulan selama musim dingin. Difteri sering terjadi pada negara berkembang dimana tingkat imunisasinya masih rendah.



Gambar 1. Morfologi *C. diphtheriae*, Gram positif (Salmuna *et al.*, 2018).

Patogenesisitas

Corynebacterium diphtheriae yang toksik maupun non toksik sama-sama dapat mengakibatkan infeksi pada kulit dan mukosa. Bakteri tersebut berada di lapisan kulit yang luka dan juga di lapisan mukosa saluran pernafasan sehingga menginduksi reaksi inflamasi pada daerah tersebut. Faktor virulensi utama adalah eksotoksin polipeptida 62

kd yang kuat yang terdiri dari segmen pengikatan A dan segmen aktif B yang, bila dibelah, diinternalisasi dapat menonaktifkan transfer *RNA translocase*, mencegah penambahan asam amino selama sintesis protein, dalam beberapa hari pertama infeksi saluran pernafasan, membentuk "pseudomembran" yang nekrotik padat, terdiri dari organisme, sel epitel, fibrin, leukosit, dan eritrosit. Pseudomembran akan terikat kuat dan jika dipaksa untuk dihilangkan akan mengalami pendarahan (Daskalaki, 2018). Hal tersebut mengakibatkan obstruksi saluran pernafasan, sehingga pada tahap selanjutnya toksin akan menyebar ke seluruh tubuh, menyebabkan degenerasi dan nekrosis pada jantung dan sel saraf (Sunarno *et al.*, 2013).

Perkembangan bioteknologi penanganan difteri

Sekuensing genom bakteri *C. diphtheriae* secara utuh dan lengkap baru pada tahun 2013 dan merupakan capaian besar dalam penelitian patogen pada manusia. Genom *C. diphtheriae* berisikan kromosom tunggal yang sirkular sebesar 2.448.635 bp, tidak memiliki plasmid dan basa nitrogennya kebanyakan guanin dan sitosin. Pembentukan toksin difteri pada *C. diphtheriae* dikontrol oleh *dtxR transcriptional regulator* yang mengikat Fe bebas untuk regulator gen (Mokrousov, 2009).

Penyelidikan gen yang mengatur sintesis dari eksotoksin bakteri *C. diphtheriae* dapat dilakukan dengan cara mengembangbiakan berbagai isolat kultur murni dari *C. diphtheriae* pada media deferensiasi yang khusus untuk menumbuhkan bakteri tersebut seperti *Columbia Agar Base* dengan ditambah 5% dari darah domba, atau dengan CTBA (*Cystine-Tellurite Blood Agar*), kemudian setelah panen atau sejumlah bakteri tertentu didapatkan untuk uji lebih lanjut, terlebih dahulu dibuat stok dengan cara bakteri dimasukkan ke dalam wadah kultur dengan ditambah gliserol 25% dan disimpan pada suhu -20 °C. Uji lanjut untuk mengetahui toksisitas dari gen *dtxR/tox* digunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk assay (Pimenta *et al.*, 2008).

Ekstraksi DNA bakteri *C. diphtheriae* dilakukan dengan cara memanaskan 500 µl suspensi bakteri tersebut ke dalam air steril selama 10 menit. Suspensi tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dan 2 µl supernatan diambil untuk uji selanjutnya. Tahapan berikutnya ialah membuat larutan untuk uji PCR sebanyak 25 µl yang berisikan 1x *Taq polymerase buffer*, 1.5 µM MgCl₂, 4 µM primer *dtxR*, 200 µM *deoxynucleoside triphosphates*, dan 1.25 unit *Taq DNA polymerase*. Tahap selanjutnya ialah mengatur PCR dengan 35 siklus pada suhu 94 °C selama 60 detik, suhu 55 °C

selama 60 detik, dan suhu 72 °C selama 90 detik. Reaksi dihentikan dengan tahap terakhir yaitu pada suhu 72 °C selama 10 menit. Primer yang digunakan pada uji PCR ini (*dtxR*1FGGGACTACAACGCAACAAGAA;*dtxR*1RCAACGGTTTGGCTAACTGTA), kemudian hasil dari PCR ini diteruskan dengan uji Elektroforesis. Selain primer di atas juga bisa menggunakan seperti primer pada Gambar 2. Elektroforesis bertujuan untuk melihat hasil dari PCR yaitu DNA dengan berat molekul tertentu itulah yang menunjukkan DNA atau gen yang mengatur eksotoksin dari bakteri *C. diphtheriae* (Pimenta *et al.*, 2008).

Produk PCR kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis (Bioered) dengan formulasi 1,5% Agarose (Genekam) yang dilarutkan pada 1x TBE buffer (Invitrogen) dan diwarnai dengan *Ethidium Bromide* (EtBr). Elektroforesis dijalankan dengan kekuatan 100 volt selama 1 jam, dan dibaca dengan mesin *Gel doc* (XR plus: Bioered). Hasil pemeriksaan PCR Multipleks berupa penampakan *bands* (pita) pada titik tertentu (139 bp untuk gen *dtx* dan 182 bp untuk gen *dtxR*) sesuai dengan primer yang digunakan. Bila pada kedua tempat (139 bp dan 182 bp) tampak garis, maka disimpulkan *C. diphtheriae* toksigenik (Sunarno *et al.*, 2013).

Gen: TOX/Dtx	[toxigenic <i>C. diphtheriae</i>]			
Forward primer	AACTATGCGGCGTGGGCAGT	20	60.00%	(Tm 67.61C)
Reverse primer	GGTGAACGGCACCCTGCTGCAA	21	61.90%	(Tm 68.52C)
Product length	139			
Gen: DtxR	[<i>C. diphtheriae</i>]			
Forward primer	TGCCCGTATGGAGCGCGATG	20	65.00%	(Tm 68.00C)
Reverse primer	GTTCCCAGCGGCAGGCTTCA	20	65.00%	(Tm 68.17C)
Product length	182			

Gambar 2. Primer gen *dtxR* yang digunakan untuk PCR (Sunarno *et al.*, 2013)

Elektroforesis memiliki prinsip memisahkan suatu molekul seperti protein atau asam nukleat atau nuklotida berdasarkan muatannya dan berat molekulnya menggunakan *Agarose gel* yang diberi *wells* (sumuran) yang mana volumenya hanya 1 µl, kemudian molekul akan bergerak berdasarkan muatannya dan bert molekulnya ketika dialiri listrik. Molekul uji akan terlihat pada gel tersebut seperti pada Gambar 3.

Hasil dari penelitian yang mengungkap gen yang mengatur sintesis dari eksotoksin bakteri *C. diphtheriae* yaitu gen *dtxR*, maka penelitian selanjutnya ialah membuat antitoksin atau vaksin untuk melawan toksin dari *C. diphtheriae*. *Diphtheria toxin* (DT) merupakan nama toksin dari *C. diphtheriae*, dan diregulasi oleh gen *dtxR*. Dilihat dari

struktur proteinya dan penyusun asam amino serta nukleotidnya maka toksin ini kebanyakan didominasi oleh basa nitrogen G-C (Sauvè *et al.*, 2018).



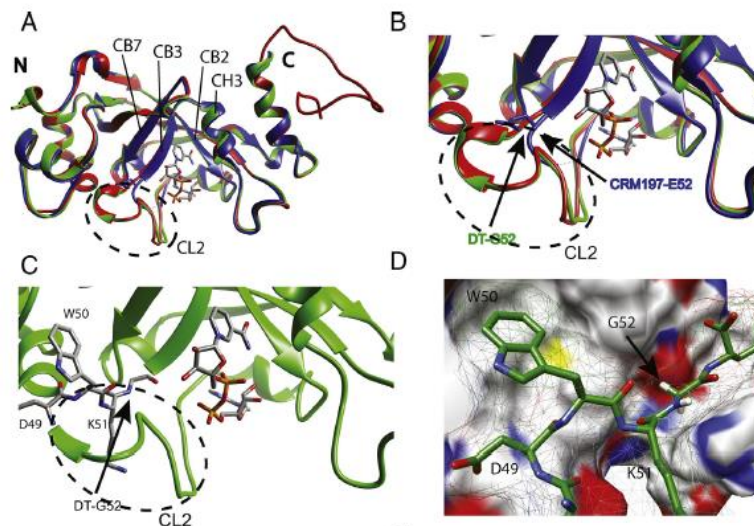
Gambar 3. Hasil Elektroforesis pada gel agarosa untuk melihat gen *dtxR*, pada angka 139 bp dan 182 bp nampak pita tebal yang menunjukkan isolat mengandung gen *dtxR* (Sunarno *et al.*, 2013).

Awal mula anti toksin ditemukan dengan memasukkan toksin ke dalam kultur embrio ayam, kemudian lebih lanjut lagi antitoksin dikembangkan dengan memasukkan toksin ke dalam kultur sel ginjal dari kera dengan indikasi ada perubahan fenol merah pada kultur, kemudian senyawa antitoksin tersebut dititrasi. Penelitian lebih lanjut lagi untuk pengembangan antitoksin dilakukan pada *VERO cell* dimana alasan menggunakan sel *VERO* ialah karena kesensitifitasnya hampir mirip dengan sel manusia (Miyamura *et al.*, 1974).

Prosedur yang dilakukan Miyamura *et al.* (1974) ialah dengan memasukkan berbagai serum yang sebelumnya diberi *Diphtheria Toxoid* (DT) ke dalam kultur sel *VERO*. Serum yang sudah diberi DT diambil dari manusia umur 12 tahun, babi dan kelinci. Tahapan selanjutnya ialah mempersiapkan sel *VERO* dengan cara sel *VERO* diberi media MEM (*Minimum Essential Medium*) yang dilarutkan dengan cairn PBS (*phosphate Buffer Solution*) dengan ditambah 0,25 % Tripsin dan 0,01 % EDTA dan dihitung jumlah selnya, jumlah sel yang dibutuhkan sebesar 2×10^5 sel/ml. Hal ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel *VERO*. Setelah preparasi dari sel kultur maka langkah selanjutnya ialah membuat media untuk proses titrasi dari antitoksin, fenol merah 0,003 % dan glukosa 0,4 % ditambahkan ke dalam media MEM. Sebelum melakukan titrasi terlebih dahulu menentukan *minimum cytopathic dose* (MCD) dengan cara 50 μ l sel *VERO* (2×10^5 sel/ml) dimasukkan dalam 125 μ l media MEM, dan di

inkubasi selama 4-5 hari pada suhu 37 °C, jika aktifitas metabolisme dalam suspensi tersebut berhenti akibat aktifitas toksin maka suspensi berubah menjadi merah, kemudian suspensi diencerkan, dan jika dalam proses pengenceran tersebut suspensi menjadi tidak berwarna maka dapat dihitung sebagai 1 MCD. Langkah terakhir ialah proses titrasi, proses titrasi diawali dengan mengencerkan 25 µl toksin ditambah 100 µl media MEM dan 50 µl sel VERO kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Dua puluh lima µl dari pengenceran tadi diambil ditambahkan 25 µl serum dan 25 µl toksin (tidak boleh kurang dari 4 MCD) dan dimasukkan ke dalam pengocok mikro, dikocok dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Suspensi tersebut kemudian dipindah pada *microplate* yang bersumur atau mempunyai *well* sebanyak 50 µl yang di dalam *well* sudah diberi 100 µl media, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 4-5 hari. Mulanya warna dalam media berwarna merah namun setelah proses titrasi maka warna media akan berubah menjadi kuning, barulah antitoksin dapat diambil.

Pembuatan vaksin dapat dilakukan dengan cara 2 Lf (2,5 µg) toksoid atau toksin dari *C. diphtheriae* dicampur dengan 0,53 mg aluminium, 100 µg formaldehid dan 0,3 µg merkuri (Massbiologics, 2009). Selain itu vaksin juga dapat dibuat dari mutan *C. diphtheriae* yang non-toksik dengan mensubstitusi asam amino glisin dengan glutamat, dengan merubah basa nitrogen (G-C) menjadi (G-A), kemudian vaksin tersebut dimasukkan ke dalam tubuh manusia supaya *T-cell* memberikan respon imun dan membuat antibody untuk difteri (Gambar 4) (Sauvè *et al.*, 2018).



Gambar 4. A) merupakan bentuk 3 dimensi dari toksin difteri (DT) warna hijau dan mutan non-toksik warna merah, B) substitusi glisin (warna hijau) dengan glutamat (warna biru), C) glutamat menggantikan glisin (Sauvè *et al.*, 2018).

Kesimpulan

Difteri yang merupakan penyakit menyerang saluran pernafasan dan dapat menyebabkan kematian dapat dicegah atau diobati dengan vaksin atau antitoksin. Setelah genom dari penyebab penyakit difteri yaitu bakteri *Corynebacterium diphtheriae* maka dapat diketahui gen yang mengatur eksotoksin dari bakteri tersebut. Gen yang mensintesis toksin difteri adalah gen dtxR. Diketuainya gen tersebut maka dapat dilakukan berbagai macam penelitian tentang pembuatan antitoksin dan juga vaksin, dan pada akhirnya penyakit difteri dapat ditanggulangi atau dapat diobati.

DAFTAR PUSTAKA

- Christenson B., Hellstrom L, Aust-Kettis A.1989. Diphtheria in Stockholm, with A Theory Concerning Transmission. *J Infect* 19:177–183.
- Daskalaki, I. 2018. *Corynebacterium diphtheriae Principle and Practice of Pediatric Infectious Disease (Fifth Edition)*. Philadelphia: Elsevier, Inc. All right reserved
- Massbiologics. 2009. *Tetanus And Diphtheria Toxoids Adsorbed*. Boston : University of Massachusetts Medical School
- Miyamura, K., S. Nisho, A. Ito, R. Murata, R. Knot. 1974. Micro Cell Culture Method for Determination of Diphtheria Toxin and Antitoxin Titres Using VERO cells I. Studies on Factors Affecting The Toxin and Antitoxin Titration. *Journal of Biological Standardization* 2:189-201
- Mokrousov, I. 2009. *Corynebacterium diphtheriae: Genome Diversity, Population Structure and Genotyping Perspectives*. *Infection, Genetics and Evolution* 9:1–15
- Pimenta, P.P., G. A. M. Matias, G. A. Pereira, T. C. F. Camello, G. B. Alves, A. C. P. Rosa, R. Hirata, A. L. Mattos-Guaraldi. 2008. A PCR for dtxR Gene: Application to Diagnosis of Non-Toxigenic and Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Molecular and Cellular Probes* 22:189–192
- Poor A. P., L. Z. Moreno, C. E. C. Matajira, B. M. Parra, V. T. M. Gomes, P. S. Silva, M. C. Dutra, A. P. G. Christ, M. R. F. Barbosa, M. I. Z. Sato, A. M. Moreno. 2017. Characterization of *Corynebacterium diphtheriae*, *C. confusum* and *C. amycolatum* Isolated from Sows with Genitourinary Infection. *Veterinary Microbiology* 207:149–152
- Salmuna Z. N., W. A. W. A. Azim, M. Hassan, A. Harun, S. A. Hasan, A. M. Besar, M. R. Zain. 2018. *Corynebacterium diphtheriae* Infection: Two Case Reports and Literature Review. *Clinical Microbiology Newsletter* 10:10-16

Sauvé S., G. Gingras, Y. Aubin. 2018. NMR Study of Mutations of Glycine-52 of The Catalytic Domain of Diphtheria Toxin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 150: 72–79

Sunarno, K. Ariadji, H. A. Wibowo. 2013. Potensi Gen *dtx* dan *dtxR* Sebagai Marker Untuk Deteksi dan Pemeriksaan Toksigenisitas *Corynebacterium diphtheriae*. *Bul. Penelit. Kesehat* 41(1): 1 – 10