

1. HLA - ANTIGENS

2. LEPROSY

Diterbitkan untuk Ujian
Akhir Tahap II

DISERTASI

HUBUNGAN TIPE HLA DENGAN KERENTANAN TUBUH PADA PENYAKIT LEPRO

Suatu pendekatan imunogenetik pada populasi
etnik Bugis - Makassar



KK.
DLS
Dik K 17/02.

Kan
h.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

OLEH :

JOHANNA MANTU KANDOUW
099010872 D

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1999

**HUBUNGAN TIPE HLA DENGAN KERENTANAN TUBUH
PADA PENYAKIT LEPRO**

**SUATU PENDEKATAN IMUNOGENETIK
PADA POPULASI ETNIK BUGIS - MAKASSAR**

Disertasi
Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Ilmu Kedokteran
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
di bawah pimpinan Rektor Universitas Airlangga

Prof H Soedarto, dr, DTM&H, PhD

Untuk dipertahankan dihadapan
Rapat Terbuka Senat Universitas Airlangga

Oleh :

JOHANNA MANTU KANDOUW
NIM : 099010872 D

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1999**

Lembar Pengesahan

Disertasi ini telah disetujui untuk diajukan dalam ujian akhir tahap II
pada tanggal : 12 Mei 1999

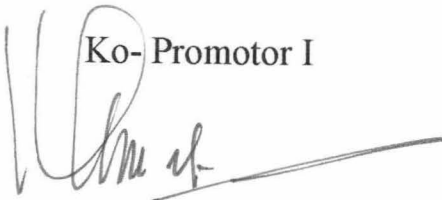
Oleh :

Promotor



Prof. dr. Rachmat Santoso
NIP : 130 445 294

Ko-Promotor I



DR. dr. Suhartono Taat Putra, MS
NIP : 130 934 628

Ko-Promotor II



Prof. dr. Solihin Wirasugena
NIP : 130 432 978

Promotor : Prof Rachmat Santoso, dr

Ko-promotor I : Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS

Ko-promotor II : Prof Solihin Wirasugena, dr

Telah diuji pada ujian tertutup
Tanggal 14 April 1999

PANITIA PENGUJI DISERTASI

KETUA : Prof Roemwerdiniadi Soedoko, dr

ANGGOTA : 1. Prof Rachmat Santoso, dr
2. Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS
3. Prof Solihin Wirasugena, dr
4. Prof Dr Hardyanto Soebono, dr
5. Prof IGB Amitaba, drh
6. Dr Fedik Abd Rantam, drh

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 3108/J03/PP/1999
Tanggal : 20 April 1999

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya yang telah dilimpahkan sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan disertasi ini. Dengan selesainya disertasi ini, maka dengan tulus hati dan penuh rasa syukur saya sampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

Pemerintah Republik Indonesia, dalam hal ini Departemen Pendidikan & Kebudayaan yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Pascasarjana dengan bantuan dana TMPD.

Rektor Universitas Airlangga, Prof H Soedarto, dr, DTM&H, PhD dan para mantan Rektor Universitas Airlangga yaitu masing-masing Prof H R Soedarso Djojonegoro, dr dan Prof H Bambang Rahino Setokoesoemo, dr, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr H Soedijono, dr, dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yaitu Prof Dr Soetarjadi, Apt, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof Rachmat Santoso, dr, SpPA, guru besar dalam ilmu Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, selaku Promotor yang telah memberikan bimbingan, nasehat, petunjuk dan dorongan moral yang sangat berguna dalam melaksanakan penelitian dan penyelesaian disertasi ini.

Prof Dr Thomas Kardjito, dr, SpPD, sebagai mantan Ko-promotor I yang telah banyak memberikan bimbingan dan petunjuk serta dorongan moral mulai dari perencanaan penelitian hingga penyelesaian disertasi ini.

Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS, sebagai Ko-promotor I yang baru, yang juga telah banyak memberikan petunjuk serta berbagai saran yang sangat berharga khususnya di bidang biologi molekuler dan imunopatologi, demi penyempurnaan penelitian disertasi ini.

Prof Solihin Wirasugena, dr, SpPA, selaku Ko-promotor II yang juga telah banyak memberikan petunjuk dan dorongan moral dalam penyelesaian disertasi ini. Sekaligus beliau sebagai Kepala Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, tempat saya bekerja, tak henti-hentinya memacu saya untuk segera dapat menyelesaikan tugas penelitian ini.

Rektor Universitas Hasanuddin, Prof Dr H Radi A Gani, Ir, dan mantan Rektor Universitas Hasanuddin, Prof Dr H Basri Hasanuddin, Drs, atas izin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program doktor di Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Prof H Moh Farid, dr, SpA dan mantan Dekan Prof H Junus Alkatiri, dr, SpPD, atas izin serta dorongan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program doktor di Universitas Airlangga.

Kepala Dinas Kesehatan Tingkat I Propinsi Sulawesi Selatan, yang dengan bantuan dan kerjasamanya yang baik memberikan izin melakukan kegiatan penelitian di wilayah kerjanya Sulawesi Selatan.

Direktur Rumah Sakit Dr Wahidin Sudirohusodo Ujung Pandang, yang telah memberikan izin kepada saya untuk mengambil sebagian sampel penderita lepra sebagai objek penelitian ini.

Direktur Rumah Sakit Kusta - Daya, Ujung Pandang, beserta stafnya, yang telah memberikan izin pula buat saya untuk memperoleh sampel penderita lepra baik yang rawat inap maupun pengunjung poliklinik kusta setiap harinya. Kerja-sama yang begitu baik yang diperlihatkan seluruh teman sejawat serta petugas laboratorium demi kelancaran tugas penelitian ini, sekali lagi saya ucapkan beribu-ribu terima kasih.

Kepala Palang Merah Indonesia Cabang Ujung Pandang yaitu Borahima Lami, dr, SpAn beserta seluruh stafnya, terutama Unit Transfusi Darah yang telah memberikan izin dan kerja sama yang baik dalam mengambil sampel donor darah sebagai obyek penelitian ini, sekali lagi saya ucapkan banyak terima kasih.

Kepala Balai Pengobatan Kusta dan Penyakit Kulit dan Kelamin - Kalimbu Ujung Pandang, yaitu Marla Rumengan, dr, dan seluruh staf serta mantan Kepala Balai Pengobatan, Sahabuddin DM, dr, yang memberikan izin untuk mengambil sampel penelitian dan sekaligus kegiatan penelitian lainnya (biopsi kulit) di lokasi ini.

Khusus kepada teman sejawat Marla Rumengan, dr, yang juga merangkap Kepala Puskesmas yang berlokasi di dalam Perkampungan ex Penderita Kusta - Jongaya, Ujung Pandang, yang dengan antusias memberikan bantuan dan kerja sama yang sangat baik dalam pengambilan bahan sampel penelitian ini, sekali lagi saya menyampaikan banyak terima kasih.

Kepala Bagian Penyakit Kulit & Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Rumah Sakit Dr Wahidin Sudirohusodo yaitu Prof Zainuddin Maskur,

dr, SpKK dan seluruh staf yang telah memberikan izin untuk melaksanakan pengumpulan bahan sampel serta kegiatan penelitian lainnya terhadap penderita lepra yang datang ke Poliklinik Penyakit Kulit.

Kepala Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Chaeruddin Lakare, dr, SpM yang telah memberikan izin kepada peneliti untuk menggunakan sebagian ruangan bagian ini sebagai lokasi laboratorium kerja penelitian. Atas kerja sama yang baik ini sekali lagi saya mengucapkan banyak terima kasih.

Kepada para teknisi, yaitu Nurhayati, Dra, Chalid, Muskandar dan Haslia Halim serta Sdr Haruna (paramedis) yang dengan setia dan sabar membantu saya mengumpulkan sampel, melakukan pemeriksaan dalam rangka menyelesaikan penelitian ini tanpa mengenal lelah. Rasa terima kasih yang sebesar-besarnya sekali lagi saya sampaikan kepada Saudara.

Semua teman sejawat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Ujung Pandang, yang selalu mendorong saya dan dengan penuh pengertian membantu menggantikan tugas saya selama saya menempuh pendidikan Program Doktor di Surabaya.

Prof RRP de Vries, dr, mantan Kepala Laboratorium Imunohematologi, University Hospital, Leiden, the Netherlands dan Prof Dr FHJ Claas, dr, Kepala Laboratorium yang baru, yang juga merupakan Konsultan saya, atas bantuannya berupa pemberian sebagian antisera HLA yang akan diteliti dalam penelitian ini. Demikian pula bantuan konsultasi dan segala saran yang sangat berharga di bidang

metode penelitian demi penyempurnaan penelitian disertasi ini. Saya sampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga.

Dr Shinzo Izumi, Pathologist, Wakil Direktur National Institute for Leprosy Research, Tokyo, Japan, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk dapat belajar lebih dalam tentang berbagai teknik pewarnaan imunohistokimia terbaru dan pemeriksaan penting di bidang imunologi lainnya serta sekaligus mengerjakan penelitian disertasi (histopatologi) di laboratorium yang beliau pimpin. Atas bimbingan dan berbagai saran beliau sehingga saya bisa menyelesaikan penelitian ini sekali lagi saya mengucapkan rasa terima kasih yang setinggi-tingginya dan penghargaan yang sebesar-besarnya.

Prof Dr H Kaneoka, Genetician, Kepala Divisi Genetic Research - Marianna University, School of Medicine, Yokohama, Japan atas kesempatan yang diberikan kepada peneliti untuk mendalami bidang HLA dan mengerjakan sebagian penelitian ini di laboratoriumnya. Beliau juga membantu dalam pemberian sebagian antisera HLA yang diteliti. Saya mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya.

Prof Dr Dali Amiruddin, dr, SpKK, Kepala Sub Divisi Penyakit Lepra Bagian Penyakit Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Rumah Sakit Dr Wahidin Sudiro Husodo, atas bantuan dan berbagai saran yang sangat berharga khususnya di bidang klinis lepra, demi penyempurnaan penelitian disertasi ini. Rasa terima kasih yang setinggi-tingginya saya haturkan bagi beliau.

Prof Dr Hardijanto Soebono, dr, SpKK, Kepala Bagian Penyakit Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada - RSUP Dr Sardjito - Yogyakarta atas izin dan bimbingannya saat latihan awal teknik pemeriksaan

separasi limfosit dan peminjaman tanki Nitrogen Cair serta bantuan acuan pustaka yang amat berharga bagi saya dalam penyelesaian disertasi ini. Ucapan terima kasih yang setinggi-tingginya dan penghargaan yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada beliau.

Widodo J Pujirahardjo, dr, MS, MPH, Dr PH, atas segala bantuan dan saran yang berharga, khususnya di bidang metodologi penelitian dan analisis statistik, baik dalam rangka pembuatan kerangka usulan penelitian disertasi, maupun laporan akhir disertasi ini. Saya mengucapkan banyak terima kasih.

Dr Kusworini Handono, dr, MKes, Staf Bagian Patologi Klinik Universitas Brawijaya, Malang, atas kesempatan dan bimbingan serius tanpa kenal lelah dalam pelaksanaan pemeriksaan HLA secara molekuler teknik PCR kepada saya, sehingga saya bisa menyelesaikan penelitian ini di laboratorium beliau. Saya mengucapkan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dr Indropo Agusni, dr, SpKK, Kepala Sub-Bagian Penyakit Kusta Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga - RSUD Dr Soetomo atas petunjuk dan berbagi saran serta bantuan acuan pustaka yang amat berharga untuk penyelesaian disertasi ini. Saya mengucapkan banyak terima kasih.

Rosmini Day, dr, MPH, staf senior pada Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular - Divisi Penyakit Kusta - Departemen Kesehatan RI - Jakarta atas bantuan acuan pustaka dan data mutakhir Kusta Nasional yang amat berguna dalam penyelesaian penelitian ini, saya ucapkan banyak terima kasih.

Djohan Kurnia, dr, SKM, Kepala Pusat Latihan Kusta Nasional (PLKN) Ujung Pandang, atas segala bantuan fasilitas perpustakaan bagi saya yang sangat

dibutuhkan sebagai acuan pustaka yang amat berharga untuk penyelesaian penelitian ini.

Sitti Sumaningsih, Dra, Staf Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung, atas kesempatan yang diberikan dalam melaksanakan latihan pemeriksaan HLA di laboratorium yang beliau pimpin.

Prof Dr PG Konthen, dr, SpPD dan Dr FM Judajana, dr, SpPK atas segala dorongan dan berbagai saran dalam perbaikan naskah disertasi ini.

Kepada Prof Dr Hj Roemwerdiniadi Soedoko, dr, SpPA, sebagai Ketua Tim Penguji disertasi, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya atas dorongan dan berbagai saran perbaikan untuk disertasi ini.

Kepada Prof Dr IGB Amitaba, drh, sebagai anggota Tim Penguji disertasi, saya tak lupa mengucapkan banyak terima kasih atas nasehat dan saran perbaikan naskah disertasi ini.

Kepada Dr Fedik Abdul Rantam, drh, sebagai anggota Tim Penguji disertasi, saya mengucapkan banyak terima kasih atas sarannya dalam perbaikan disertasi ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya, rasa hormat dan penghargaan setinggi-tingginya, saya haturkan kepada kedua orang tua, ayah, almarhum Prof AGJ Kandouw, dr, MPH dan ibu, Ny Hj Boki Kandouw Soleiman atas semangat yang ditanamkan untuk menuntut ilmu yang setinggi-tingginya, doa restunya, dan dorongannya untuk mencapai cita-cita serta senantiasa bertakwa kepada Tuhan Yang Maha Esa. Untuk semua jasa kedua beliau tersebut, saya sampaikan terima kasih yang tak terhingga.

Akhirnya kepada suami yang tercinta, Prof Farid Nurmantu, dr, SpBA, FICS, saya sampaikan rasa terima kasih yang setinggi-tingginya dan penghargaan yang sebesar-besarnya atas pengertian, pengorbanan serta dorongannya selama saya mengikuti program Doktor ini.

Kepada kedua putri tercinta, Melanie dan Yukiko, saya sampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala pengertian dan dorongannya yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk lebih berkonsentrasi dalam menyelesaikan pendidikan ini. Tak lupa saya sampaikan permohonan maaf yang setulus-tulusnya atas pengorbanannya selama ini. Banyak waktu yang seharusnya saya curahkan untuk mereka, tetapi saya justru gunakan untuk penyelesaian disertasi ini.

Semoga Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang selalu melimpahkan karunia dan rahmatNya kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyelesaian disertasi ini.

RINGKASAN

Lepra atau Kusta merupakan suatu penyakit infeksi menahun yang disebabkan oleh *Mycobacterium Leprae*, yang secara primer menyerang saraf tepi dan sekunder menyerang kulit serta berbagai organ tubuh lainnya. Penyakit ini bisa mengakibatkan kecacatan tubuh serta menimbulkan masalah psikososial, baik bagi penderita maupun keluarganya, akibat stigma buruk yang ditimbulkan di dalam masyarakat (Chatterjse, 1973; Hastings, 1994).

Meskipun sejak implementasi program pengobatan kombinasi (*Multi Drug Therapy*, MDT) di Indonesia tahun 1989 telah dapat menurunkan jumlah penderita secara nyata, tetapi insidensi kasus baru, dari tahun ke tahun belum menunjukkan penurunan. Hal ini mengisyaratkan perlu adanya usaha pemahaman terhadap segala kendala penyebabnya.

Usaha tersebut sehubungan dengan masalah yang belum tuntas penjelasannya adalah "*patogenesis*" lepra, yang memerlukan usaha identifikasi kendala penyebab yang berpengaruh dan karakteristik yang terdapat pada populasi lepra di Indonesia. Masalah patogenesis ini diduga berkaitan dengan defek *cell mediated immunity* (CMI) yang berlangsung secara bertahap, yang mengakibatkan terjadinya respons imun yang abnormal yang mencetuskan timbulnya kerusakan jaringan yang tampak pada manifestasi klinisnya. Keadaan tersebut timbul terutama karena adanya predisposisi genetik yang diturunkan secara *recessive autosomal trait*, ditambah kontribusi faktor lingkungan dan faktor sosial ekonomi (Smith, 1979). Di antara

faktor penyebab penyakit lepra, maka faktor sistim HLA (HLA klas I dan klas II) dipercaya merupakan faktor yang terpenting (Spiket, 1964; Beiguelman, 1965).

Peran biologik sistem HLA (*Human Leucocyte Antigen*) yang dikenal sebagai sistem genetik yang berpengaruh pada respons imun, yang ternyata pada perkembangan selanjutnya, pada penyakit lepra khususnya juga ikut memodulasi/mengatur kearah mana tipe lepra kelak terjadi, tetapi hal ini tidak berpengaruh terhadap lepra "*per se*" (secara keseluruhan).

Beberapa penelitian sebelumnya secara konsisten membuktikan bahwa HLA klas II memainkan peranan penting terhadap kerentanan penyakit lepra, sedangkan HLA klas I tidak begitu konsisten (de Vries, 1984; Soebono, 1996). Bertitik tolak dari penemuan tersebut diatas, maka penelitian ini dilakukan disamping untuk mendapatkan gambaran petanda genetik dan peran HLA klas I dan klas II terhadap lepra, juga memberikan peluang untuk membuka tabir kesangsian tersebut.

Tujuan penelitian ini adalah menetapkan dasar genetik penderita lepra pada populasi suku Bugis - Makassar di Indonesia. Hal ini akan ditunjukkan baik dengan menilai hubungan lepra maupun tipe lepra dengan antigen dan gen HLA baik klas I maupun klas II.

Sulawesi Selatan merupakan propinsi di urutan ke 3 tertinggi prevalensi lepra se Indonesia (3,26 per 10.000 penduduk), setelah propinsi Irian Jaya dan Maluku (Dep Kes RI, 1998). Suku Bugis - Makassar merupakan suku mayoritas yang mendiami berbagai kabupaten yang mempunyai prevalensi lepra tinggi. Dengan demikian kedua suku tersebut bisa dianggap dapat mewakili daerah endemisitas lepra yang tinggi di Indonesia.

Rancangan penelitian ini adalah studi asosiasi dengan pendekatan rancangan kasus-kontrol. Populasi kasus penelitian adalah infinite (*on going population*), yaitu penderita lepra yang datang berobat ke RS dr Wahidin Sudirohusodo, RS Kusta - Daya, Balai Pengobatan Penyakit Kulit dan Kelamin Kalimbu, Puskesmas pembantu di perkampungan ex penderita Kusta - Jongaya. Semuanya berlokasi di kotamadya Ujung Pandang. Populasi kontrol juga infinite (*on going population*), yaitu para pegawai negeri maupun swasta, anggota ABRI dan para mahasiswa yang datang ke Palang Merah Indonesia Cabang Ujung Pandang untuk mendonorkan darahnya.

Sebagai kasus adalah penderita lepra baru, atau yang sedang dalam program pengobatan atau yang sudah dinyatakan bebas dari program pengobatan (RFT). Sebagai kontrol adalah orang yang dinyatakan sehat dengan umur, jenis kelamin dan suku yang sesuai.

Besar sampel dihitung berdasarkan rumus estimasi proporsi (**Browner, 1988 dalam Handono, 1998**), yang dibedakan menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kasus dan kelompok kontrol. Pada penelitian ini berhasil diperiksa 101 orang kasus dan 113 orang kontrol.

Penelitian dilaksanakan pada kedua tipe polar lepra, yaitu tipe TT dan tipe LL, masing-masing sebanyak 20 orang dan 81 orang, sedangkan tipe Boderline lepra (BB), dikeluarkan dari penelitian ini sebab status imunologis tipe BB labil. Gambaran pola HLA yang dihasilkan secara lengkap dan baru pertama kali di Indonesia ini, diharapkan dapat merupakan suatu usaha antisipasi terhadap kemungkinan cara pengobatan lepra dimasa yang akan datang, yaitu melalui vaksinasi.

Pemeriksaan antigen / gen HLA menggunakan cara Microlymphocytotoxicity dan PCR-SSO (khusus untuk HLA-DR). Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS/PC. Untuk menetapkan kemaknaan hubungan antara lepra dengan antigen / gen HLA klas I atau HLA klas II digunakan test chi-square atau Fisher exact dengan koreksi Yates dan dengan tabel 2 x 2. Nilai $P < 0,05$ dipandang sebagai bermakna. Estimasi resiko relatif untuk timbulnya tipe lepra tertentu pada antigen / gen HLA klas I maupun HLA klas II diperhitungkan dengan menggunakan *Odds Ratio* (OR).

Hasil penelitian adalah sebagai berikut :

1. Berdasarkan OR yang dimiliki oleh kelompok HLA klas I rerata lebih besar daripada kelompok HLA klas II, maka diduga bahwa HLA klas I lebih berperan, baik terhadap lepra maupun tipe lepra dibanding HLA klas II pada populasi suku Bugis – Makassar.
2. Kerentanan untuk timbulnya lepra pada populasi suku Bugis – Makassar berhubungan dengan HLA-A1, HLA-B8, HLA-CW2, HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) dan HLA-DQW1. Besarnya resiko untuk timbulnya lepra pada individu dengan antigen / gen tersebut masing-masing adalah 11 kali, 15 kali, 3 kali, 2 kali dan 1 kali.
3. Frekuensi HLA-A32(19), HLA-B17, HLA-CW2 dan HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) lebih tinggi pada penderita lepra tuberculoid daripada kontrol sehat, sehingga antigen / gen tersebut diatas merupakan faktor resiko lepra tuberculoid.

4. Frekuensi HLA-A28, HLA-B7, HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) lebih tinggi pada penderita lepra lepromatosa daripada kontrol sehat, sehingga antigen / gen tersebut di atas merupakan faktor resiko lepra lepromatosa.
5. Antigen / gen HLA-A2, HLA-CW1, HLA-DRB1* 1404 (= DR14) dan HLA-DQW2 mempunyai frekuensi yang lebih tinggi pada kelompok kontrol sehat daripada kelompok kasus, sehingga antigen / gen tersebut di atas merupakan faktor proteksi lepra pada populasi suku Bugis – Makassar.
6. Kombinasi alel HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) baik dengan HLA-DRB5* 0102, 0103, 0203 atau dengan HLA-DRB5* 0101 akan meningkatkan resiko timbulnya lepra. Sebaliknya kombinasi alel HLA-DRB1* 1201, 1202 baik dengan HLA-DRB3* 0201-0204 atau dengan HLA-DRB5* 0101 akan menurunkan resiko terjadinya lepra.
7. Data pendahuluan mengenai distribusi frekuensi antigen / gen HLA pada populasi normal suku Bugis - Makassar, menunjukkan bahwa antigen HLA-A2 mempunyai frekuensi tertinggi di antara antigen HLA klas I ($f_a = 58,40\%$) dan HLA-A33(19) serta HLA-B8 tampil dengan frekuensi terendah ($f_a = 0,88\%$ dan $f_a = 0,88\%$). Sedangkan di kalangan antigen / gen HLA klas II, antigen HLA-DR2 mempunyai frekuensi tertinggi ($f_a = 45,13\%$) dan HLA-DR16 (2) muncul dengan frekuensi yang terendah ($f_a = 0,88\%$).

ABSTRACT

Keywords : HLA system, leprosy, genetic susceptibility

Genetic factors are considered to be important in leprosy and influence both susceptibility to the disease and its mode of expression. In order to investigate the role of immunogenetic factors in determining the form of leprosy, the HLA class I and class II were studied by HLA typing serologically (Microlymphocytotoxicity) and by a PCR - SSO typing technique in 101 patients (20 TT types and 81 LL types) and 113 healthy controls. The diagnosis of leprosy was based on clinical, bacteriological, histopathological and immunological examination. The design of the study was a case - control. The data were analyzed by Chi-Square test or Fisher exact with Yates correction to compare the number of patients and controls positive for an antigen and alleles. The level of significance was set at 0,05. Estimated relative risk (OR) was calculated by Wolf formula and by Browner for the estimation of proportion on the sample size.

The result of the study showed: (1) There was a positive association between susceptibility to leprosy in the population of Bugis – Makassar with HLA-A1, HLA-B8, HLA-CW2, HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) and HLA-DQW1 (OR 11, 15, 3, 2 and 1 times). (2) Based on the Odds Ratio (OR) of HLA-class I locus, highest than HLA-class II, it was concluded that HLA-class I plays more important in controlling for susceptibility to leprosy in the population of Bugis – Makassar. (3) The frequencies of HLA-A23(19), HLA-B17, HLA-CW2 and HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) are highest in Tuberculoid leprosy groups than in healthy controls. It can called as the risk factors for Tuberculoid leprosy. (4) The frequencies of HLA-A28, HLA-B7, HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) are highest in Lepromatous leprosy groups than in healthy controls. It can called as the risk factors for Lepromatous leprosy. (5) The antigens of HLA-A2, HLA-CW1, HLA-DQW2, HLA-DRB1* 1404 (= DR14) were the highest frequencies in healthy controls group compare in case groups in the population of Bugis – Makassar. It can called as a protective factors for leprosy. (6) The combination of allel HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) with HLA-DRB5* 0101 or with HLA-DRB5* 0102, 0103, 0203 were found to increase the risk of leprosy. In the contrary, the combination of allel HLA-DRB1* 1201, 1202 with HLA-DRB3* 0201-0204 or with HLA-DRB5* 0101 were found to decrease the risk of leprosy. (7) Preliminary data shows that in Bugis – Makassar ethnics groups, HLA-antigen A2, has the highest frequency among HLA-class I antigens, where as among HLA-antigens class II, DR2 has the highest frequency.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xvii
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR GAMBAR	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiv
DAFTAR SINGKATAN	xxv
DAFTAR TERJEMAHAN	xxvii
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.3.1 Tujuan Umum	9
1.3.2 Tujuan Khusus	9
1.4 Manfaat Penelitian	10
1.4.1 Manfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan	10
1.4.2 Manfaat untuk kepentingan terapan	10
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan singkat penyakit lepra	11
2.1.1 Definisi	11
2.1.2 Perjalanan klinik penyakit lepra	11
2.1.3 Klasifikasi penyakit lepra	12
2.1.4 Immunopatologi penyakit lepra	13
a. Respon imun pada penyakit lepra	13
a) Innate immunity pada penyakit lepra	14
b) Adaptive immunity pada penyakit lepra	15
b. Respon imun humoral pada lepra	18
2.1.5 Predisposisi genetik sebagai salah satu hipotesa penyebab anergi pada lepra tipe LL	19
2.2 Major Histocompatibility Complex (MHC)	21
2.2.1 Antigen leukosit manusia	21
2.2.2 Gena HLA Kompleks	23
2.2.3 Nomenklatur sistem HLA	24
2.2.4 Struktur dan distribusi molekul HLA	25

a.	Antigen HLA klas I	26
b.	Antigen HLA klas II	28
a)	Organisasi genom gen HLA klas II	31
b)	Struktur dan fungsi molekul HLA klas II	33
c.	Antigen HLA klas III	36
2.2.5	Fungsi biologik molekul MHC	37
2.2.6	Pewarisan keturunan dari molekul HLA	39
2.2.7	Genetika populasi	39
2.2.8	Linkage disequilibrium (Timpang Rantai)	41
2.2.9	Pemisahan jalur pemrosesan dan penyajian antigen exogen dan endogen oleh molekul MHC klas I dan klas II	42
2.2.10	Manfaat klinik sistem HLA	44
a.	Tranplantasi jaringan	44
b.	Transfusi leukosit dan trombosit	44
c.	Studi keayahan/paterniti	44
d.	Asosiasi HLA dan Penyakit	45
2.2.11	Perkembangan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk pemeriksaan gen HLA klas II	45
a.	Teknik Berdasarkan Hibridisasi Pelacak	46
b.	Teknik Berdasarkan Elektroforesis	47
2.3	Asosiasi Sistem HLA Dengan Penyakit	49
2.3.1	HLA dengan penyakit	49
2.3.2	HLA dengan penyakit lepra	54
3.	KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1	Kerangka Konseptual	57
3.2	Kerangka Operasional	59
3.3	Hipotesis	60
4.	METODE PENELITIAN	
4.1	Rancang bangun penelitian	61
4.2	Populasi, sampel, besar sampel dan kriteria sampel	61
4.2.1	Populasi sampel	61
4.2.2	Lokasi	62
4.2.3	Kriteria sampel	62
4.2.4	Besar sampel	63
4.3	Variabel penelitian	64
4.3.1	Klasifikasi variabel	64
4.3.2	Karakteristik variabel yang diteliti	65
4.3.3	Definisi operasional variabel	65
a.	Dasar diagnosis lepra	65

	b. Klasifikasi penyakit lepra	66
	c. Variabel bebas	68
	d. Faktor penyerta	68
	e. Pemeriksaan bakteriologis	68
	f. Pemeriksaan lepromin	69
	g. Pemeriksaan histopatologis	70
4.3.4	Cara pengolahan data	72
4.4	Cara pemeriksaan laboratorium	74
4.4.1	Bahan pemeriksaan	74
4.4.2	Cara pemeriksaan antigen	76
	a. Metode serologi	76
	a) Isolasi limfosit	76
	b) Cara Kerja Pemisahan limfosit T & limfosit B	79
	c) Penentuan antigen HLA	80
	1. Penentuan antigen HLA-klas I (-A,-B,-C)	81
	2. Penentuan antigen HLA-klas II (-DR,-DQ)	82
	3. Cara pembacaan/penilaian hasil test	83
	4. Pemantapan mutu	85
	5. Sumber-sumber kesalahan	87
	b. Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide (PCR-SSO)	88
	a. Ekstraksi DNA	89
	b. Gen HLA-klas II	89
	c. Pemeriksaan gen HLA-DRB	90
4.5	Protokol penelitian	95
5.	HASIL PENELITIAN	
5.1	Karakteristik sampel kasus dan kontrol yang diteliti	96
5.1.1	Distribusi umur	97
5.1.2	Jenis Kelamin	97
5.1.3	Suku	97
5.2	Frekuensi antigen / gen HLA pada populasi	97
5.2.1	Frekuensi antigen / gen HLA-A	98
5.2.2	Frekuensi antigen / gen HLA-B	99
5.2.3	Frekuensi antigen / gen HLA-C	101
5.2.4	Frekuensi antigen / gen HLA-DR	101
5.2.5	Frekuensi antigen / gen HLA-DQ	103
5.3	Hubungan antara HLA klas I dan klas II dengan kerentanan lepra....	103
5.3.1	Hubungan antigen HLA-A dengan timbulnya lepra	104
5.3.2	Hubungan antigen HLA-B dengan timbulnya lepra	105

5.3.3	Hubungan antigen HLA-C dengan timbulnya lepra	108
5.3.4	Hubungan antigen HLA-DRB dengan timbulnya lepra	108
5.3.5	Hubungan antigen HLA-DQ dengan timbulnya lepra	110
5.4	Hubungan antar alel HLA-DRB berdasarkan organisasi genom	110
5.5	Antigen / gen kerentanan dan protektif untuk timbulnya lepra atau tipe lepra	111
6.	PEMBAHASAN	
6.1	Karakteristik penderita lepra yang diteliti	120
6.1.1	Umur penderita	120
6.1.2	Jenis kelamin	121
6.1.3	Suku	122
6.1.4	Penelitian Hasil analisis genetika populasi	122
6.2	Analisis frekuensi antigen / gen HLA pada populasi suku Bugis-Makassar di Ujung Pandang	123
6.2.1	Frekuensi antigen / gen HLA-A	123
6.2.2	Frekuensi antigen / gen HLA-B	124
6.2.3	Frekuensi antigen / gen HLA-C	124
6.2.4	Frekuensi antigen / gen HLA-DR	125
6.2.5	Frekuensi antigen / gen HLA-DQ	127
6.3	Hubungan antigen / gen HLA-A, -B, -C, -DRB, -DQ dengan kerentanan lepra	127
7.	SIMPULAN DAN SARAN	
7.1	Simpulan	133
7.2	Saran	134
	DAFTAR PUSTAKA	135
	RINGKASAN	xi
	ABSTRACT	xvi

DAFTAR TABEL

1.	Tabel 2.1	: Asosiasi antara antigen HLA dan penyakit	49
2.	Tabel 4.1	: Aspek klinik-klasifikasi Ridley-Jopling	67
3.	Tabel 4.2	: Sistem scoring bacterial index	69
4.	Tabel 4.3	: Patokan pemeriksaan histologis sesuai klasifikasi	71
5.	Tabel 5.1	: Analisis perbedaan antara kelompok kasus dan kontrol berdasarkan jenis kelamin, umur dan suku	96
6.	Tabel 5.2	: Hasil frekuensi antigen / gen HLA-A pada populasi suku Bugis-Makassar di Ujung Pandang	98
7.	Tabel 5.3	: Hasil frekuensi antigen / gen HLA-B pada populasi suku Bugis-Makassar di Ujung Pandang	99
8.	Tabel 5.4	: Hasil frekuensi antigen / gen HLA-C pada populasi suku Bugis-Makassar di Ujung Pandang	101
9.	Tabel 5.5	: Hasil frekuensi antigen / gen HLA-DR pada populasi suku Bugis-Makassar di Ujung Pandang	102
10.	Tabel 5.6	: Hasil frekuensi antigen / gen HLA-DQ pada populasi suku Bugis-Makassar di Ujung Pandang	103
11.	Tabel 5.7	: Perbedaan frekuensi antigen HLA-A pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing antigen (OR)	105
12.	Tabel 5.8	: Perbedaan frekuensi antigen HLA-B pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing antigen (OR)	107
13.	Tabel 5.9	: Perbedaan frekuensi antigen HLA-C pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing antigen (OR)	108
14.	Tabel 5.10	: Perbedaan frekuensi antigen HLA-DRB (dengan PCR) pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing antigen (OR)	109

15. Tabel 5.11	: Perbedaan frekuensi antigen HLA-DQ pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing antigen (OR)	110
16. Tabel 5.12	: Perbedaan frekuensi kombinasi alel HLA-DRB1* 15 - DRB5* dan HLA-DRB1* 12 - DRB3* pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing kombinasi alel (OR)	111
17. Tabel 5.13	: Daftar antigen / gen HLA yang rentan terhadap lepra	112
18. Tabel 5.14	: Daftar antigen / gen HLA yang protektif terhadap lepra	113
19. Tabel 5.15	: Frekuensi dan Odd's Ratio antigen/gen HLA kelas I dan kelas II yang rentan terhadap lepra tipe TT serta kontrol sehat	114
20. Tabel 5.16	: Frekuensi dan Odd's Ratio antigen/gen HLA kelas I dan kelas II yang rentan terhadap lepra tipe LL serta kontrol sehat	115

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: Skema perjalanan klinis penyakit lepra	12
Gambar 2.2	: Konsep klasik kerjasama makrofag dan sel T	15
Gambar 2.3	: Perkembangan konsep hipotesis respons imun pada Penyakit lepra	16
Gambar 2.4	: Hubungan HLA dengan tipe lepra	21
Gambar 2.5	: HLA Kompleks	24
Gambar 2.6	: Skema molekul HLA klas I	27
Gambar 2.7	: Skema molekul HLA klas II	30
Gambar 2.8	: Peta regio dan organisasi HLA pada lengan pendek Kromosom 6	32
Gambar 2.9	: Molekul HLA klas II secara skematik	33
Gambar 2.10	: Diagram struktur molekul HLA klas I	35
Gambar 2.11	: Model pemisahan jalur pemrosesan dan penyajian antigen exogen dan endogen oleh molekul MHC klas I dan klas II ...	43
Gambar 3.1	: Kerangka konseptual penelitian	58
Gambar 3.2	: Kerangka operasional penelitian	59
Gambar 4.1	: Pelaksanaan teknis penentuan antigen HLA cara mikrolimfositotoksitas	86
Gambar 4.2	: Prinsip pemeriksaan gen HLA-DRB dengan metode PCR-SSO reverse dot blot	92
Gambar 4.3	: Hasil HLA-DRB typing dengan teknik PCR-SSO Reverse dot blot	93
Gambar 4.4	: Protokol Penelitian	95

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Proses pencarian (Thawing)	145
Lampiran 2 : Cara isolasi DNA dengan metode salting out	146
Lampiran 3 : Penilaian kualitas DNA	148
Lampiran 4 : Cara pemeriksaan gen HLA-DRB dengan metode PCR-SSO reverse dot blot	149
Lampiran 5 : Prosedur kerja pewarnaan LAM-B	152
Lampiran 6 : Hasil pewarnaan imunohistokimia LAM-B untuk Diagnosis lepra	154
Lampiran 7 : Complete listing of recognized HLA specificities	156
Lampiran 8 : Broad specificities : Splits, Associated antigens and Inclusions	157
Lampiran 9 : HLA-DR antigens and DRB* alleles	158
Lampiran 10 : Cross-reactivity HLA-A Locus	159
Lampiran 11 : Cross-reactivity HLA-B Locus	160
Lampiran 12 : Organisasi genom HLA-DR	161
Lampiran 13 : Daftar pemicu dan pelacak HLA-DRB Resolusi Rendah ...	162
Lampiran 14 : Formulir persetujuan	166
Lampiran 15 : Formulir pemeriksaan HLA-Lepra (penderita)	167
Lampiran 16 : Formulir pemeriksaan HLA-Lepra (kontrol)	169
Lampiran 17 : Chart pemeriksaan HLA-typing (serology)	171
Lampiran 18 : Formulir pemeriksaan histopatologi lepra	173

DAFTAR SINGKATAN

dATP	=	Deoxyadenosinetriphosphate
dCTP	=	Deoxycytosinetriphosphate
dGTP	=	Deoxyguaninetriphosphate
dUTP	=	Deoxyuraciltriophosphate
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EL buffer	=	Erythrocyte Lysis buffer
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
EP	=	Electrophoresis
MHC	=	Major Histocompatibility Complex
HLA	=	Human Leucocyte Antigen
HRP-SA	=	Horseradish Peroxidase - Streptavidine
IFN	=	Interferon
IgG	=	Immunoglobulin G
IgM	=	Immunoglobulin M
KD	=	Kilo Dalton
NK	=	Natural Killer
OR	=	Odds Ratio
PBS	=	Phosphate Buffer Solution
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIA	=	Radioimmunoassay

RNA	=	Ribonucleic acid
SDS	=	Sodium dodecylsulphate
SSO	=	Sequence Specific Oligonucleotide
SSP	=	Sequence Specific Primers
SW	=	Stringent Wash
TCR	=	T Cell Receptor
TE	=	Tris EDTA
WCB	=	Wash Citrate Buffer
WHO	=	World Health Organization

DAFTAR TERJEMAHAN

Association	=	hubungan
Bands	=	pita
Blank	=	kosong
Cleft	=	celah
Clone	=	keluarga
Closely related	=	sangat mirip
Concordance	=	kesesuaian / konkordansi
Copy	=	salinan
Defect	=	kecacatan
Haplotype	=	haplotipe
HLA-typing	=	penetapan HLA
Human Leucocyte Antigen	=	antigen lekosit manusia
Informed consent	=	lembar persetujuan
Linkage	=	keterpautan
Linkage analysis	=	analisis keterpautan
Linkage disequilibrium	=	ketidakseimbangan keterpautan
Major Histocompatibility Complex	=	kompleks histokompatibilitas mayor
Polymerase Chain Reaction	=	reaksi rantai polimerase
Primer	=	pemicu
Probe	=	pelacak
Repertoire	=	perkembangan

Reverse transcription	=	transkripsi terbalik
Sequence	=	urutan
Sequencing	=	penetapan urutan
Sequestered antigen	=	antigen terkurung
Target	=	sasaran
Template	=	acuan
Water bath	=	pemanas air

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lepra atau kusta adalah suatu penyakit infeksi kronis yang disebabkan oleh *Mycobacterium leprae* yang tahan asam dan tidak toxic. Kuman ini dapat menyerang organ tubuh seperti mata, testis, tulang, otot, tendon, persendian, membran mukosa, khususnya hati, ginjal dan kelenjar adrenal. Kerusakan pada lepra selalu terjadi pada saraf perifer dan melibatkan kulit. Penyakit ini dapat menyebabkan deformitas dan kecacatan tubuh yang permanen dan progresif sehingga pada gilirannya menimbulkan problem sosial dan ekonomi yang serius. Kecacatan inilah yang sangat ditakuti, bukan karena kecacatan tersebut dapat menyebabkan kematian, tetapi penderitaan yang bakal timbul bagi penderitanya sendiri dan keluarganya akibat stigma serta diskriminasi sosial oleh masyarakat lingkungannya. Oleh karena itu penyakit lepra bukanlah problem di bidang medis semata, tetapi merupakan masalah kesehatan masyarakat yang saling berkaitan erat dengan bidang sosial, budaya dan pendidikan masyarakat.

Diperkirakan saat ini di seluruh dunia tercatat penderita lepra sebanyak 2,4 juta orang (WHO, 1994). Pada tahun 1993 terjadi penurunan 23% dibandingkan dengan perkiraan 3,1 juta penderita dan pada tahun 1991 terjadi penurunan 56% bila dibandingkan dengan perkiraan jumlah penderita sebanyak 5,5 juta orang (WHO, 1994). Dari 6 wilayah kerja WHO (Afrika, Amerika, Asia Tenggara, Eropa, Mediterania, Pasifik), tercatat Asia Tenggara tampil dengan jumlah penderita lepra

tertinggi 1,8 juta orang dan angka prevalensi 5,6 per 10.000 penduduk (WHO, 1994). Indonesia berada di posisi ke 4 dengan jumlah penderita 54.289 orang dengan prevalensi 2,8 per 10.000 setelah India, Myanmar dan Thailand dalam jumlah penderita lepra terbanyak di kawasan tersebut (WHO, 1994). Jika dibandingkan dengan penyakit infeksi lain, jumlah penderita dan angka prevalensi lepra memang tidak terlalu tinggi, tetapi karena cacat yang diakibatkan, menjadikan lepra merupakan salah satu dari 6 penyakit tropis di dunia yang mendapat prioritas oleh WHO. Angka kecacatan akibat lepra berkisar antara 20-30% kasus baru, dan saat ini diperkirakan ada sekitar 1-2 juta penderita cacat lepra yang memerlukan penanganan rehabilitasi (WHO, 1994; Soebono, 1996).

Menurut laporan Departemen Kesehatan RI Direktorat Pemberantasan Penyakit Menular tahun 1998, situasi lepra di Indonesia agak menggembirakan, sebab terjadi penurunan sebesar 13,78% dari 31.695 penderita lepra yang tercatat di tahun 1997 menjadi 27.325 orang penderita di tahun 1998. Prevalensi secara nasional tercatat 1,57 per 10.000 penduduk (Depkes RI, 1998).

Distribusi penderita lepra di Indonesia tidak merata, sebagian besar ditemukan di Indonesia Bagian Timur (IBT) pada berbagai kantong endemik lepra (Louhenapessy dalam Amiruddin, 1996). Sulawesi Selatan merupakan salah satu daerah endemik lepra, sebab sampai dengan bulan Maret 1998, tercatat jumlah penderita sebanyak 2664 orang dengan prevalensi 3,26 per 10.000 penduduk. Di Indonesia Bagian Barat (IBB) angka prevalensi lepra tidak terlalu tinggi, seperti DKI Jakarta 0,87 per 10.000 penduduk atau Sumatera Utara hanya 0,29 per 10.000 penduduk. Meskipun sejak implementasi program pengobatan kombinasi di Indonesia

sudah dimulai sejak 1983, akan tetapi baru nanti pada tahun 1989 terjadi peningkatan program MDT yang sangat menonjol, jumlah penderita dilaporkan menunjukkan penurunan yang berarti. Namun hal ini belum diikuti dengan penurunan insidensi secara nyata dari tahun ke tahun bahkan cenderung mengalami kenaikan (Soebono, 1996).

Salah satu hal yang menarik perhatian para peneliti dalam masalah lepra adalah adanya variasi *symptom* interindividual dalam perkembangan penyakit setelah kena infeksi. Mayoritas individu mempunyai daya tahan tubuh yang prima atau respons imun yang efektif selama pemaparan dengan *M Leprae* dan melindungi mereka ke arah perkembangan penyakit. Namun pada sekelompok minoritas terjadi kekurangan daya tahan tubuh atau reaktivitas imun yang tidak efektif sehingga mudah berkembang ke arah penyakit setelah terinfeksi kuman. Perbedaan spektrum manifestasi klinik yang terjadi dapat bergerak dari kutub yang ringan (Tuberculoid) sampai ke kutub yang berat (lepromatous) seiring dengan penurunan *cell mediated immunity* (CMI) secara bertahap. Perubahan derajat imunitas seluler seseorang terhadap infeksi kuman patogen diatur oleh faktor genetik. Perubahan tersebut timbul karena adanya predisposisi genetik. Menurut Smith pada tahun 1978 perubahan tersebut diturunkan secara *recessive autosomal trait*, diperberat dengan kontribusi faktor lingkungan, seperti nutrisi, pekerjaan, kebersihan diri dan lingkungan, status ekonomi dan besarnya keluarga. Bukti bahwa faktor genetik berperan pada pemunculan lepra didasarkan adanya peningkatan frekuensi lepra, frekuensi abnormalitas respons imun, baik komponen respons seluler maupun humoral, yang bisa dibuktikan baik pada keluarga penderita maupun pada kembar identik (De Vries,

1976:1987; Ali dalam Job, 1980). Sampai saat ini telah diketahui adanya gen yang diduga berperan dalam predisposisi tersebut, antara lain HLA-DR2 merupakan petanda genetik bagi kerentanan terhadap tipe TT dan HLA-DR6 sebagai gen protektif terhadap lepra dalam populasi di Suriname (De Vries, 1976). Dari peneliti yang sama, pada tahun 1992, dilaporkan bahwa HLA-DR3 berhubungan dengan lepra tuberculoid dan HLA-DQ1 lebih umum dengan lepra lepromatosa. Sebaliknya menurut Izumi, 1982, HLA-DR2 merupakan petanda genetik terhadap kerentanan terhadap tipe LL pada populasi Jepang. Sementara Soebono, pada tahun 1997 membuktikan bahwa HLA-DR2, -DQB501, -DQ1 dan -DQ5 merupakan faktor resiko terhadap lepra lepromatosa, dan HLA-DR12 merupakan faktor proteksi terhadap lepra secara keseluruhan pada populasi Jawa.

Dari berbagai penelitian tersebut membuktikan bahwa HLA klas II memainkan peranan yang lebih penting terhadap kerentanan penyakit, sedangkan HLA klas I tidak begitu konsisten berhubungan dengan lepra. Oleh karena itu disimpulkan bahwa antigen HLA klas I tidak secara langsung bertanggung jawab pada kerentanan terhadap penyakit lepra (De Vries, 1987; Soebono, 1996). Dari penelitian Todd (1990) di Louisiana, dibuktikan bahwa hanya HLA-DR2 dan HLA-DQ1 berhubungan dengan lepra, baik tipe Tuberculoid (TT) maupun tipe Lepromatosa (LL).

Sejak tahun 1973 telah dilakukan penelitian di bidang epidemiologi-genetik di berbagai negara di dunia dalam berbagai studi populasi yang bertujuan untuk menganalisis distribusi HLA-A, HLA-B dan HLA-DR pada penderita lepra dan kontrol yang sehat (Serjeantson, 1983). Dari Ethiopia, Thorsby (1973) melaporkan

tingginya frekuensi HLA-B21 pada semua tipe klinik lepra, kecuali tipe LL. **Escobar (1973)**, melakukan penelitian di Mexico dengan hasil kedua HLA-A2 dan HLA-A3 frekuensi rendah. Dari Spanyol **Kresler (1974)** melaporkan tingginya frekuensi HLA-B14. Dari benua Asia, oleh peneliti **Smith (1975)** dilaporkan dari India tingginya frekuensi HLA-B8 pada tipe LL dan rendahnya frekuensi HLA-A9 pada tipe TT. Dari Singapura dilaporkan oleh **Chan (1979)** adanya HLA-B17 yang tinggi pada tipe TT diantara penduduk Cina di sana (hasil berbagai laporan penelitian tersebut di atas dikutip dari **Job, 1980**).

Namun baru pada tahun 1978 **De Vries** dari Belanda melakukan penelitian berdasarkan "**Studi Famili**" (Analisa pedigree/garis keturunan). Dari penelitian yang dilakukan terhadap 16 keluarga di Suriname diperoleh hasil bahwa HLA-DR2 yang tinggi dianggap sebagai petanda genetik untuk kerentanan tubuh. Sedang HLA-DR6 yang tinggi dianggap sebagai petanda genetik untuk ketahanan tubuh. Kualitas ketahanan tubuh ini sangat menentukan variasi antar individu dalam gejala klinik yang terus berkembang setelah kena infeksi.

Dari berbagai penelitian atas bermacam-macam suku bangsa/ras di dunia ini, dapat diambil kesimpulan bahwa ada perbedaan petanda genetik antar bangsa/ras dalam kaitannya dengan penyakit lepra, karena setiap populasi bangsa/ras mempunyai variasi pola genetik yang tertentu.

Adapun berbagai keuntungan yang diperoleh dalam mempelajari adanya keterpautan pengendalian genetik pada lepra adalah mampu memprediksi individu yang beresiko tinggi terhadap perkembangan tipe lepra di kemudian hari dan sekaligus mengusahakan pengobatan pencegahannya (misal dengan vaksinasi),

disamping itu berbagai data yang dihasilkan dari berbagai penelitian populasi di dunia dapat mengungkap peranan HLA sebagai salah satu pengendali kontrol genetik pada lepra, secara lebih rinci. Dengan mengetahui pola HLA dan peranannya pada lepra dapat dipakai sebagai dasar pengembangan vaksin lepra di masa datang.

Sampai saat ini, masalah lepra yang masih belum tuntas dijelaskan adalah bidang patogenesis. Beberapa upaya telah dilakukan melalui berbagai penelitian dasar, dan sementara ini dapat disimpulkan, bahwa lepra menjurus ke suatu sebab yang multifaktorial, antara lain, faktor genetik dan imunologik. Semua faktor tersebut berinteraksi satu sama lain menghasilkan gambaran klinik penyakit lepra (**De Vries, 1976; Serjeantson, 1983; Bodmer, 1984; Van Eden dan De Vries, 1984; Fine, 1988;**).

Usaha pemahaman yang lebih mendalam terhadap setiap faktor tersebut sangat diperlukan, karena akan memberikan wawasan yang tepat dan mendasar bagi pemecahan masalah pengelolaan penyakit lepra. Misalnya identifikasi komponen genetik, atau faktor imun akan bermanfaat bagi pengurangan morbiditas baik pencegahan primer maupun komplikasi lepra (**WHO, 1990**).

Tujuan tersebut dimungkinkan karena kemajuan yang sangat pesat dalam bidang biologi-molekuler, yang ternyata membawa perubahan mendasar bagi perkembangan ilmu dalam lingkup biologi medik pada umumnya dan bidang genetik pada khususnya (**Bieguelman, 1965**).

Suatu pendekatan immunogenetik dalam suatu penyakit merupakan langkah awal yang tepat dan mendasar untuk aplikasi klinik di masa mendatang, diantaranya sebagai predisposisi genetik dari suatu penyakit (**Fine, 1988; de Vries, 1987, 1992;**

Judajana, 1994).

Bangsa Indonesia mempunyai keunikan karena terbentuk dari berbagai macam suku dan terpengaruh oleh berbagai ras/bangsa di dunia ini akibat migrasi penduduk dan arus gene yang terjadi pada masa yang lalu (**Rusdi, 1992; Panigoro, 1995).**

Berdasarkan keinginan memahami masalah patogenesis penyakit lepra pada populasi di Indonesia melalui pendekatan immunogenetik, maka penelitian ini bertujuan menelusuri asosiasi antara antigen HLA dengan penderita lepra pada populasi Indonesia di Ujung Pandang dan sekitarnya.

Untuk maksud tersebut, dipilihlah daerah sasaran yang berinsidensi lepra tinggi (prevalensi > 7%) di Sulawesi Selatan, yang kebetulan Kotamadya Ujung Pandang memenuhi persyaratan tersebut, serta penduduknya di dominasi oleh kedua suku mayoritas yaitu suku Bugis-Makassar.

Perhatian paling besar ditujukan pada antigen leukosit manusia (*Human Leucocyte Antigen* atau HLA). Hal ini dapat dipahami karena peran HLA yang amat penting dalam mengawali tercetusnya respons imun (**Kaplan dan Cohn, 1986, 1986b; Ottenhoff, 1994; Langrange 1996).**

Sistem HLA adalah kompleks molekul glicoprotein yang terdapat pada permukaan sel, yang ekspresinya dikendalikan oleh gen pada kromosom nomor 6 lengan pendek dan berfungsi sebagai petanda immunogenetik pada jaringan tubuh manusia dan berpengaruh pada respons imun (**Brycesson dan Pflatzgraf, 1990; Donegan dan Bossom, 1991; Harris, 1994).**

Landasan teori yang mendukung adanya asosiasi antara molekul HLA dengan

suatu penyakit, berupa beberapa hipotesis, antara lain teori gen respons imun (*Ir gene theory*) dan teori reseptor (Tiwari dan Terasaki, 1985; Bellanti, 1993).

Penelitian tentang dasar genetik lepra yaitu hubungan lepra dengan HLA klas I dan HLA klas II belum pernah dilakukan di Indonesia, namun bila berkaitan khusus dengan HLA klas II terhadap lepra subklinis dan klinis sudah pernah dilakukan oleh Soebono, tahun 1996 dengan hasil HLA-DR2, -DQB501, -DQ1 dan -DQ5 merupakan faktor resiko terhadap lepra lepromatosa, sedangkan HLA-DR12 merupakan faktor proteksi terhadap lepra secara keseluruhan pada populasi yang diteliti.

Penentuan molekul HLA klas I dan klas II di Indonesia sampai saat ini masih dilakukan dengan menggunakan teknik serologi (*lymphocytotoxic*). Teknik ini hanya dapat menetapkan spesifitas glikoprotein HLA yang terekspresi dipermukaan sel. Walaupun molekul tersebut penting dalam informasi imunologik, akan tetapi ini hanya merupakan representasi yang kasar dari molekul HLA yang disandi oleh urutan DNA pada kromosom 6. Pada kebanyakan kasus hal itu dapat menutupi heterogenitas antigen dan gen HLA (Browning and McMichael, 1996). Dengan perkembangan teknologi baru seperti penggunaan reaksi rantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction* atau PCR) dimungkinkan identifikasi seluruh variasi urutan antigen dan gen HLA, sehingga diharapkan dapat diperoleh penjelasan dasar genetik lepra yang lebih baik.

Sejalan dengan tekad pemerintah Indonesia yang sesuai target global WHO yaitu "*Eliminasi lepra di tahun 2000*", yaitu pencapaian angka prevalensi lepra kurang dari 1 per 10.000 penduduk (Bechelli, 1994; Noordeen 1994; Fine, 1997;

Dep Kes RI, 1998), maka diperlukan kerja keras di segala bidang terutama bidang pelayanan dan penelitian serta terlibatnya partisipasi aktif dari seluruh lapisan masyarakat.

1.2 Rumusan Masalah

1. Adakah asosiasi antara jenis antigen / gen HLA tertentu dengan penyakit lepra tipe TT pada populasi suku Bugis-Makassar ?
2. Adakah asosiasi antara jenis antigen / gen HLA tertentu dengan penyakit lepra tipe LL pada populasi suku Bugis-Makassar ?
3. Berapakah resiko relatif jenis antigen / gen HLA tersebut pada masing-masing tipe lepra ?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk menemukan jenis antigen / gen HLA yang rentan terhadap M Leprae pada suku Bugis - Makassar melalui pendekatan imunogenetik. Hal ini akan ditunjukkan dengan menilai hubungan tipe lepra dengan antigen / gen HLA klas I serta HLA klas II. Kuatnya hubungan tersebut dapat dinyatakan dengan estimasi resiko relatif (Odd's Ratio).

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menentukan jenis antigen / gen HLA yang berasosiasi dengan lepra tipe TT pada populasi suku Bugis - Makassar.
2. Menentukan jenis antigen / gen HLA yang berasosiasi dengan lepra tipe LL

pada populasi suku Bugis – Makassar.

3. Menentukan resiko relatif jenis antigen / gen HLA tersebut pada masing-masing tipe lepra.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain :

1.4.1 Manfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan

1. Dapat digunakan sebagai dasar untuk mengidentifikasi genetik lepra pada populasi Indonesia. Dengan pengetahuan tersebut akan dapat lebih diyakinkan bahwa adanya antigen tertentu merupakan dasar genetik untuk timbulnya perubahan respons imun sebagai mekanisme patogenik lepra.
2. Dengan ditemukannya antigen / gen HLA yang berasosiasi dengan lepra, maka akan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menetapkan urutan asam amino molekul HLA mana yang berperan. Hal ini selanjutnya akan dapat dijadikan dasar pengembangan vaksin di masa mendatang.

1.4.2 Manfaat untuk kepentingan praktis atau klinis

1. Dengan ditemukannya antigen / gen kerentanan terhadap lepra, maka akan dapat diketahui orang Indonesia yang mempunyai resiko lebih tinggi untuk timbulnya penyakit lepra.
2. Dengan diketahuinya individu yang beresiko tinggi untuk mendapatkan penyakit lepra, maka dapat dilakukan upaya pencegahan selektif, yang berarti memutuskan rantai transmisi infeksi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Singkat Penyakit Lepra

2.1.1 Definisi

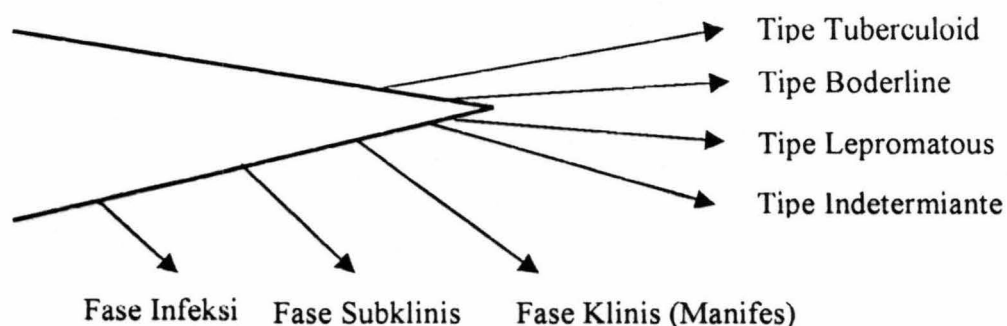
Penyakit Lepra (Morbus Hansen, Lepra) adalah suatu penyakit infeksi menahun yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium Leprae* yang primer menyerang saraf tepi dan sekunder menyerang kulit serta organ tubuh lainnya (Jopling, 1971). Penyakit ini dapat mengakibatkan kecacatan tubuh serta menimbulkan masalah psikososial akibat adanya *stigma* (cap buruk) dari penyakit ini di masyarakat.

2.1.2 Perjalanan Klinik Penyakit Lepra

Sebagian besar penduduk yang tinggal di daerah endemik lepra pernah terinfeksi kuman *M Leprae* namun karena adanya kekebalan alamiah hanya sekitar 15% dari mereka yang mungkin akan menjadi sakit. Pada mereka yang kekebalan alamiah tidak berhasil membunuh kuman yang masuk, terjadilah perkembangbiakan kuman di dalam sel tubuh tertentu, terutama pada sel Schwann di perineurium. Proses ini berjalan sangat lamban sebelum gejala klinik yang pertama timbul. Kini telah diketahui adanya beberapa kelainan laboratorik dalam masa inkubasi, antara lain test LTT (*Lymphocyte Transformation Test*) pada limfosit dan peningkatan kadar antibodi spesifik. Keadaan ini disebut infeksi klinik. Setelah melewati masa inkubasi yang cukup lama (sekitar 2-5 tahun) akan muncul gejala awal yang masih belum

jelas dan sulit dipastikan. Fase ini disebut fase atau tipe indeterminat (*indeterminate phase*), pada fase ini telah ada kelainan kulit berupa bercak dengan sedikit gangguan sensasi dan gangguan produksi keringat (**Hastings, 1994**).

Fase manifes penyakit lepra akan terjadi beberapa tahun setelah fase indeterminate, yang ditandai dengan munculnya gejala klinis yang khas. Bentuk gejala klinis ini bervariasi dan tergantung pada tipe penyakit. Bila tidak diberikan pengobatan maka penyakit ini akan menjadi parah dan akan mengakibatkan banyak kecacatan tubuh. Penderita biasanya meninggal bukan karena penyakit lepranya, tetapi disebabkan oleh penyakit yang timbul sekunder setelah lepra (**Hastings, 1994 ; Noorden, 1994**)



Gambar 2.1 Skema perjalanan klinis penyakit Lepra (Ridley, 1988)

2.1.3 Klasifikasi penyakit lepra

Pada penyakit Lepra yang telah manifest, jenis kelainan klinis dibagi sesuai dengan klasifikasi menurut cara Ridley & Jopling, yang umum dipakai di dunia medis atas rekomendasi WHO (1996).

Klasifikasi tersebut adalah :

- Tipe TT (Polar Tuberculoid) : bentuk ringan
- Tipe BT (Borderline Tuberculoid) }
 Tipe BB (Boderline) } : bentuk peralihan
 Tipe BL (Borderline Lepromatous) }
- Tipe LL (Polar Lepromatous) : bentuk berat

Menurut klasifikasi diatas, maka terdapat dua kutub yang dianggap stabil dalam imunitasnya, yaitu tipe TT (Polar Tuberculoid) dimana imunitas selulernya sangat baik, dan tipe LL (Polar Lepromatous) yang imunitas selulernya sangat jelek. Di antara kedua kutub ini terdapat spektrum penyakit Lepra yang imunitasnya tidak stabil, sehingga dapat berubah-ubah ke arah perbaikan ataupun penurunan. Perubahan imunitas ini bila terjadi secara mendadak dapat menimbulkan episode "reaksi Lepra" yang selalu menjadi penyulit dalam pengobatan Lepra (Agusni, 1996).

2.1.4 Immunopatologi Penyakit Lepra

Beberapa pakar menganggap bahwa penyakit Lepra adalah penyakit dengan defek imunologis yang ditimbulkan oleh *M Leprae* (Gill and Godal, 1986). Namun belum didapatkan kejelasan pada tahap mana dalam respons imun seluler, defek ini terjadi serta sejauh mana peranan kuman dalam interaksi dengan tubuh yang mungkin menyebabkan defek tersebut (Goodman, 1991; Hasting, 1994; Choudhuri, 1995).

a. Respons Imun pada Penyakit Lepra

Karena defek imunologik pada lepra bersifat spesifik, hal ini menunjukkan bahwa gangguan yang terjadi adalah pada tingkat adaptive / *acquired immunity* dan bukan pada tingkat *innate immunity*.

a) ***Innate Immunity*** pada penyakit lepra

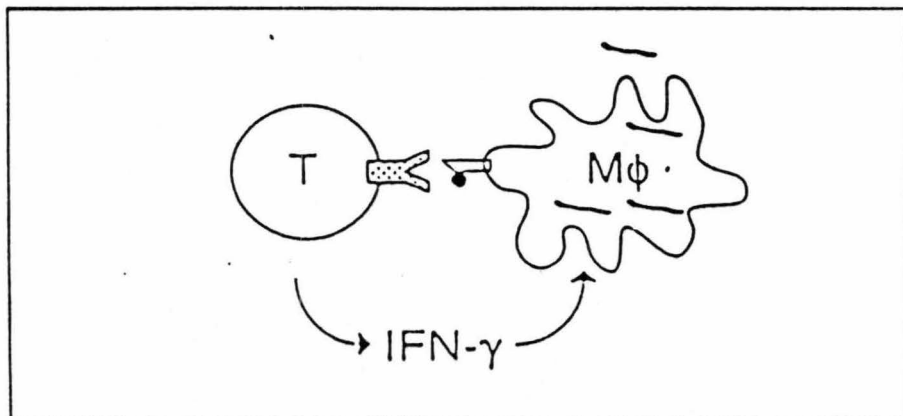
Kuman *M Leprae* yang masuk dalam tubuh dan berhasil melewati sistem pertahanan lapis pertama akan di fagosit, kemudian ikut bersama monosit dalam aliran darah. Selama di dalam monosit, kuman tersebut tidak terbunuh dan bahkan bisa berkembang biak. Keadaan ini disebut *Trojan horse phenomenon*, yaitu kuman ikut menumpang dan berkembang dalam salah satu sel tubuh tanpa dideteksi oleh sistem imunitas yang ada. Suatu saat monosit tersebut akan mati dan pecah, kuman menyebar dan akan mencapai sel Schwann di perineurium saraf tepi yang merupakan predileksi untuk hidupnya *M Leprae*. Sel ini adalah suatu *non profesional phagocyte* dan tidak mengekspresikan molekul MHC kelas II dipermukaannya, kecuali bila sudah diaktifkan oleh IFN gamma (Steinmann dan Young, 1991). Dengan tidak adanya MHC kelas II ini maka sel Schwann yang terinfeksi tidak bisa berkomunikasi dengan limfosit T, dengan akibat kuman di dalam sel Schwann tidak bisa terdeteksi oleh sistem imun. Karena *M. Leprae* sendiri tahan terhadap lisosim (sebab terbungkus lilin / wax) maka kuman tersebut bisa berkembang biak di dalam sel Schwann (Kaplan dan Cohn, 1986). Selanjutnya bila sel Schwann tersebut mati, *M Leprae* akan keluar sewaktu sel pecah dan ditangkap kembali oleh fagosit lainnya, termasuk juga sel Schwann. Respons imun seluler akan bekerja bila kuman ditangkap oleh fagosit yang profesional / aktif khususnya sel makrofag. Setelah melewati

fase pencernaan dan penyajian oleh molekul MHC kelas II selanjutnya limfosit Th CD4⁺ akan mengenal dan dimulailah rangkaian proses respons imun seluler.

b) *Adaptive Immunity* pada Penyakit Lepra

Setelah kuman yang masuk dikenal oleh sistem imun tubuh, maka proses imunitas yang spesifik mulai bekerja. Karena sifat *M Leprae* adalah obligat intra-seluler. Pada individu yang sehat rangkaian respon imun seluler akan segera berlangsung dengan hasil akhir penghancuran *M Leprae* di dalam makrofag, baik lewat penghancuran di dalam makrofag maupun penghancuran sel target oleh sel T- cytotoxic (Tc) (Rawlinson, 1988).

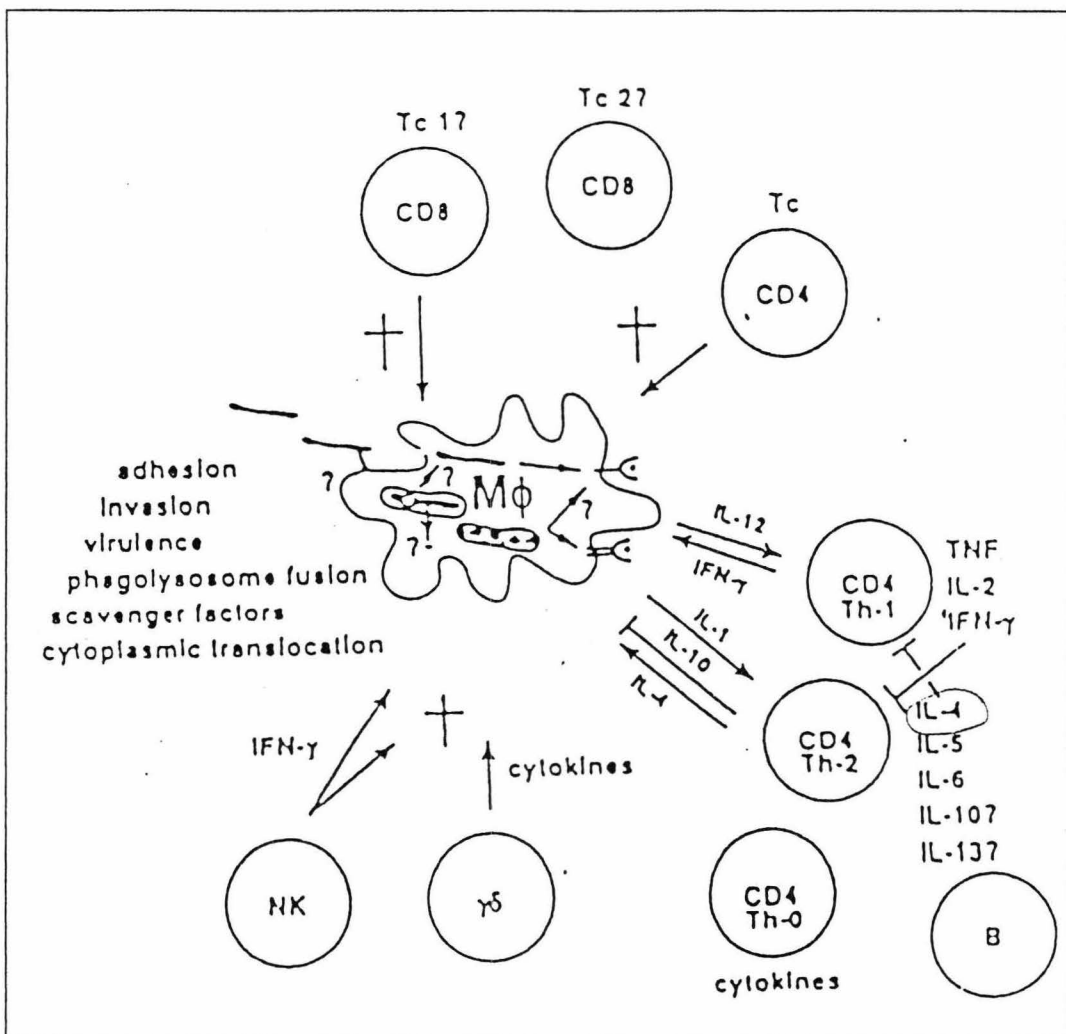
Respons imun seluler pada penyakit lepra ditujukan untuk mengeliminasi kuman *M Leprae* yang hidup dan berkembang di dalam sel tubuh. Dalam konsep yang klasik telah diketahui bahwa penghancuran *M Leprae* di dalam makrofag terjadi sebagai hasil kerjasama antara makrofag dan Limfosit-T.



Gambar 2.2 Konsep klasik kerjasama makrofag dan sel T (Ottenhoff, 1994)

Teori yang klasik dalam respon imun seluler penyakit lepra adalah dimulai dengan makrofag yang menangkap dan memproses antigen, selanjutnya terjadi kontak dengan sel limfosit T yang akan memproduksi IFN-gamma untuk mengaktifkan makrofag tersebut dalam penghancuran antigen (*M. Leprae*).

Namun dalam perkembangannya ternyata diketahui bahwa proses yang terjadi tidak sederhana diatas, melainkan sangat kompleks dan melibatkan berjenis-jenis sitokin.



Gambar 2.3. Perkembangan konsep hipotesis respon imun pada penyakit lepra (Ottenhof, 1993)

Makrofag yang telah menangkap dan menyajikan antigen akan mengaktifkan limfosit CD4 dan CD8, menghasilkan proliferasi dan diferensiasi menjadi beberapa jenis limfosit yang aktif. Terbentuk beberapa jenis sel Tc dari CD4 dan CD8, yang akan menyerang makrofag yang mengandung antigen yang dikenalnya. Disamping itu dengan bantuan sitokin dari sel gamma - delta serta INF-gamma dari sel NK, makrofag akan memperkuat proses penghancuran kuman dalam fungsi fagosom - lisosom. Terbentuk pula limfosit CD4 yang memproduksi sitokin yaitu limfosit Th1, Th2 dan Th0 dengan masing-masing jenis sitokinnya. Aktifitas Th1 dan Th2 saling berantagonis dalam membentuk keseimbangan antara imunitas seluler dan humoral (Ottenhoff, 1994).

Faktor lain yang masih terus diteliti adalah peranan sitokin pada penyakit lepra. Apabila dihubungkan dengan adanya keseimbangan dalam pengaruh interleukin hasil dari Th1 dan Th2, maka pada penyakit lepra Th1 berperan dominan pada tipe Tuberkuloid serta Nara-kontak lepra. Didapatkan adanya produksi yang tinggi dari IFN-gamma dan IL-4 yang rendah pada limfosit penderita tersebut bila dirangsang dengan *M Leprae* (Haanen dan Mutis, 1991; Mutis, 1993). Begitu pula secara histokimia terlihat bahwa limfosit pada jaringan lesi kulit tipe tuberkuloid memproduksi cukup banyak IL-2. Pada tipe Lepromatosa didapatkan konsentrasi

IL-4, IL-5 dan IL-10 yang tinggi pada lesi lepromatosa dan tidak ditemukan IFN-gamma maupun IL-2 (Modlin dan Rea, 1991).

Di samping itu ternyata beberapa jenis sel Th2 bisa menekan aktifitas sel Th1 dengan cara pelepasan IL-4 lebih banyak daripada IFN-gamma (Salgame dan Birdie, 1991). Pemberian antibodi pada IL-4 ternyata menghilangkan efek supresi diatas, sehingga disimpulkan bahwa IL-4 berperan dalam supresi sel Th1.

b. Respons Imun Humoral pada Lepra

Pada penyakit lepra juga terjadi perubahan dalam sistem imunitas humoral, namun peranannya dalam menghancurkan kuman *M Leprae* yang letaknya intra-seluler kurang penting, dibandingkan dengan peranan imunitas seluler / CMI (*Cell Mediated Immunity*). Justru perubahan-perubahan dalam sistem ini menyebabkan terjadinya beberapa penyulit yang menghambat pengobatan dan penyembuhan penyakit. Sistem imunitas humoral merupakan aktifitas dari limfosit B yang berada di jaringan limfoid dan sebagian kecil di dalam sirkulasi darah. Rangsangan antigen akan merubah limfosit B ini menghasilkan imunoglobulin yaitu protein serum yang mempunyai aktifitas antibodi. Pada penyakit lepra biasanya terjadi di IgG, IgM dan kadang-kadang juga IgA (Sehgal, 1989). Peningkatan imunoglobulin ini juga diikuti dengan meningkatnya kadar komplemen dalam sirkulasi darah.

2.1.5 Predisposisi genetik sebagai salah satu hipotesis penyebab anergi pada lepra tipe LL.

Keadaan anergi pada lepra tipe LL telah banyak diselidiki, namun belum ada kesepakatan mengenai mekanisme terjadinya keadaan tersebut. Beberapa hipotesis telah dikemukakan a.l. faktor predisposisi genetik.

Telah lama dicurigai bahwa faktor genetik berperan dalam penyakit lepra dimana penderita lepra seakan-akan sudah diprogram secara genetik untuk tidak memberi respons terhadap *M Leprae*. Penelitian di daerah endemis lepra menunjukkan adanya beberapa individu dalam keluarga yang tes leprominnya selalu negatif (Beiguelman, 1972).

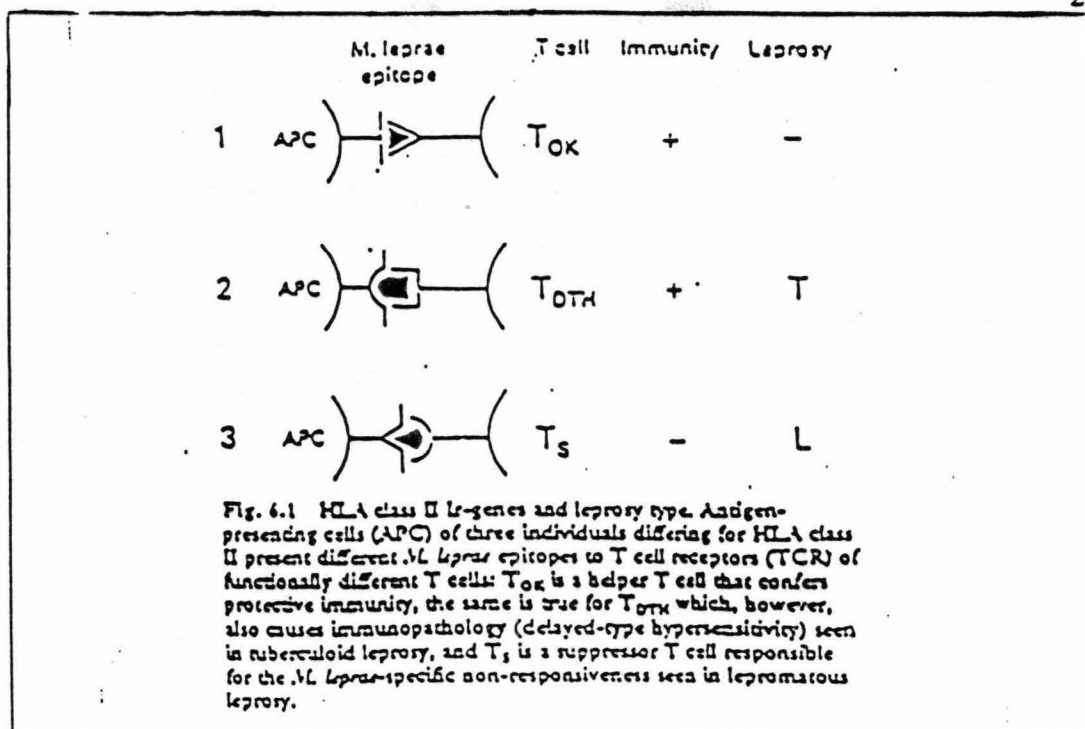
Penyelidikan dalam bidang genetika khususnya HLA, menunjukkan bahwa insiden HLA-DR2 dan HLA-DR3 meningkat pada lepra tipe TT, sedang HLA-DR2-DQW1 meningkat pada tipe lepromatosa (De Vries, 1976; Fine, 1981; Van Eden dan De Vries, 1984; Shields 1987). Pada saat ini secara umum pendapat yang diterima adalah bahwa faktor genetik hanya berperan dalam menentukan kedalam tipe apa seseorang akan menderita lepra bila infeksi *M Leprae* telah menjadi manifes.

Peranan imunogenetik pada penyakit lepra ini terutama bekerja pada tingkat makrofag. Telah diketahui bahwa untuk pengenalan dan penyajian antigen oleh sel APC diatur oleh molekul MHC kelas II. MHC ini sendiri adalah produk dari HLA, khususnya HLA-D (DP, DQ dan DR). Gen Ir (*immune response gene*) dari HLA ini akan mengontrol molekul MHC kelas II di permukaan makrofag, sehingga hanya epitope tertentu yang akan disajikan kepada sel T (Ottenhoff dan De Vries, 1994). Dengan demikian epitope tersebut hanya bisa menempel pada reseptor sel T yang

tertentu pula. Apabila reseptor sel T ini dimiliki oleh sel T yang membangkitkan imunitas, maka proses yang timbul mengaktifkan respons imun seluler. Sebaliknya apabila yang terangsang adalah milik sel T supresor, maka yang terjadi adalah penekanan dari respons imun seluler. Dengan demikian terjadinya bentuk klinik tuberkuloid dan lepromatosa bisa diterangkan (lihat gambar 2.4).

Tipe lepromatosa terjadi apabila epitope yang disajikan merangsang sistem T-supresor, sedangkan tipe tuberkuloid terjadi apabila sistem T-DTH (*Delayed Type Hypersensitivity*) terangsang. Pada sebagian besar masyarakat, orang tidak menjadi sakit meskipun terinfeksi *M Leprae* karena epitop yang disajikan kepada sel T merangsang sistem imun yang protektif (De Vries & Ottenhoff, 1993).

HLA-DR3 diketahui memberikan respon pada jenis subset antigen tertentu dari *M Leprae* seperti protein HSP (*Heat Shock Protein*) 70, 65 dan 18, dimana peptida jenis itulah yang akan disajikan kepada sel Th. Jenis sel Th yang akan teraktifkan juga tertentu sesuai dengan jenis peptida yang disajikan. Hal ini penting diketahui dalam pembuatan vaksin lepra, yaitu mencari epitop yang bisa merangsang sel T yang protektif (De Vries, 1994; Agusni, 1996).



Gambar 2.4. Hubungan HLA dengan tipe lepra (De Vries, 1994).

Dari konsep imunogenetika diatas terlihat bahwa peran HLA cukup besar dalam penentuan kearah mana penyakit lepra akan berlangsung, apabila seseorang terinfeksi oleh *M. Leprae*. Namun teori ini tidak dapat menjelaskan mengapa dalam perjalanan klinik terjadi perubahan dari tipe T ke tipe L atau sebaliknya (Agusni, 1996).

2.2 Major Histocompatibility Complex

2.2.1 Antigen lekosit manusia

Human Leucocyte Antigen atau HLA dihasilkan oleh suatu lokus gena yang polimorf, yang menempati semua segmen kurang lebih dua centi morgan (cM) pada lengan pendek kromosom nomor 6 (Walker, 1987; Schwartz, 1994; Browning and Michael, 1996). Regio genetik tersebut di atas dikenal sebagai *Major*

Histocompatibility Complex (MHC), dan mengandung suatu seri loki yang saling berhubungan erat. Gena pada loki ABC dan D merupakan subset MHC, yang dikenal sebagai *Human Leucocyte Antigen*.

Sistem MHC sendiri terdiri dari sekelompok antigen glikoprotein yang dapat dijumpai pada hampir semua permukaan sel berinti, kecuali sel spermatozoa dan sel amnion (Walker, 1987; Bryceson, 1996).

Antigen HLA pertama dilaporkan oleh Jean Dauset pada tahun 1958, namun oleh karena ketidakpastian pada waktu itu, maka sistem tersebut belum banyak berkembang. Baru setelah metode mikrolimfositotoksisitas yang dikemukakan oleh Terasaki, diterima sebagai metode standar pada lokakarya Histokompabilitas International kedua di Leiden Netherland 1985, maka sistem HLA berkembang dengan pesat.

Kini diketahui bahwa antigen MHC merupakan antigen terpenting yang berperan dalam proses pengendalian pengenalan sendiri (*self recognition*), yang bersangkutan paut dengan sistem pertahanan tubuh di mana setiap jenis antigen, baik antigen diri sendiri (*self*) atau bukan diri sendiri (*non-self*), hanya akan dikenal oleh limfosit, bila terdapat bersamaan dengan molekul MHC.

Kegagalan dalam proses pengenalan antigen diri sendiri tersebut diatas, dapat berakibat terjadinya penyakit autoimun, sedangkan kegagalan pengenalan terhadap antigen asing, dapat berakibat terjadinya keadaan imunodefisiensi, dengan resiko terjadinya infeksi yang meluas, serta pertumbuhan dan penyebaran jaringan tumor.

2.2.2 Gena HLA Kompleks

Kelompok HLA diketahui terdiri dari 7 loki yang saling terkait dengan erat (*closely-linked*) pada lengan pendek kromosom 6. Loki tersebut adalah HLA-A, -B, -C, -DR, -DP dan -DQ.

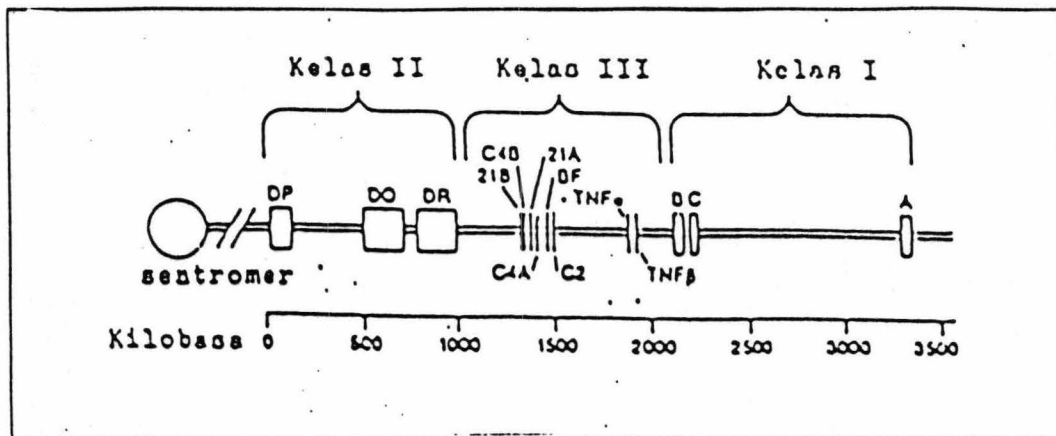
Di samping itu, beberapa regio genetik lain juga dapat dijumpai pada kompleks HLA tersebut, antara lain regio komplemen C2, C4 dan faktor B properdin (BF) yang terletak antara regio HLA-B dan DR. Juga gena yang menentukan aktivitas 21-hidroksilase A dan B dalam biosintesis steroid, dapat dijumpai di regio tersebut, dimana hanya gena B yang berfungsi pada manusia (**Giphart dan Van der Poel, 1992; Schwartz, 1994**).

Gena untuk faktor nekrosis tumor alfa dan beta, yang juga dikenal sebagai cachectin dan lymphotoxin, akhir-akhir ini juga telah dipetakan di antara regio komplemen dan regio HLA-B (**Schwartz, 1994**).

Karakteristik dari sistem HLA sangat polimorfik, dimana beberapa alleles berada bersamaan dalam satu lokus. Misalnya, sekurang-kurangnya terdapat 24 alleles yang berada pada lokus HLA-A, dan sedikitnya 50 alleles yang berbeda pada lokus HLA-B. Tiap allele diketahui menentukan struktur dari rantai glikoprotein (**Schwartz, 1994**).

Produk dari allele HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ dan -DP semuanya merupakan molekul permukaan sel dengan determinan antigenik tersendiri, yang dapat dikenal in vitro melalui berbagai tes histokompatibilitas.

Loki genetik HLA-A, -B dan -C akan menentukan produk molekul HLA klas I, sedangkan subregio genetik HLA-DR, -DQ dan -DP akan menentukan produk molekul HLA klas II.



Gambar 2.5 HLA Kompleks
(Schwartz, 1994)

2.2.3 Nomenklatur Sistem HLA

Nomenklatur sistem HLA berasal dari HLA Nomenclature Committee of the World Health Organization yang dibentuk pada tahun 1969, dan dilaporkan pertama kali pada tahun 1970. Panitia tersebut sepakat untuk bertemu pada setiap kesempatan lokakarya International mengenai *histocompatibility testing*, untuk mengadakan perbaikan maupun tambahan nomenklatur terhadap faktor yang baru ditemukan, baik secara serologik maupun secara *cellular typing* (Tiwari dan Terasaki, 1985).

Kini ada 7 kelompok antigen yang secara resmi telah dikenal oleh HLA Nomenclature Committee WHO, yaitu : HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ dan -DP, sedangkan antigen yang belum secara resmi dikenal, dinyatakan dengan huruf W, yang merupakan singkatan daripada workshop dan ditempatkan di depan angka, contoh : HLA-DRW12.

Sistem HLA sangat polimorfik dan mempunyai bentuk alternatif yang multipel atau alleles dari gena pada setiap lokus diketahui.

Spesifitas HLA yang lengkap dan terbaru dapat dilihat pada lampiran 7, yang dikutip dari "The 12th International Histocompatibility Workshop", France, 1996.

Antigen HLA yang ditemukan pada molekul tunggal dan tidak pada yang lain, disebut sebagai HLA private antigens, sedangkan yang merupakan determinan umum terhadap beberapa molekul HLA., dimana masing-masing dapat membawakan HLA private antigen disebut sebagai HLA public antigen. Sebagai contoh adalah HLA-BW4 dan -BW6, dimana satu atau yang lain dapat ditemukan pada setiap molekul yang ditentukan oleh HLA-B alleles.

Beberapa antigen yang semula diduga merupakan *single private antigens*, terbukti kemudian terdiri dari sekelompok 2 atau tiga antigen yang saling erat berhubungan, dan masing-masing mempunyai spesifikasi yang sempit. Antigen tersebut kemudian disebut sebagai split dari antigen dengan spesifisitas yang lebar. Penelitian biokimia menunjukkan bahwa split sebetulnya adalah varian yang secara struktural mempunyai hubungan erat satu dengan yang lain (Tiwari dan Terasaki, 1985; Schwartz, 1994). Daftar lengkap terbaru splits antigen HLA dapat dilihat pada lampiran 8.

2.2.4 Struktur dan Distribusi Molekul HLA

Molekul HLA beserta gena yang memprogram sintesisnya, dapat digolongkan dalam 3 klas, yaitu klas I, II dan III.

a. **Antigen HLA Klas I**

Molekul HLA klas I juga disebut sebagai molekul histokompatibilitas klasik, termasuk didalamnya molekul HLA-A, -B dan -C yang bersifat polimorfik.

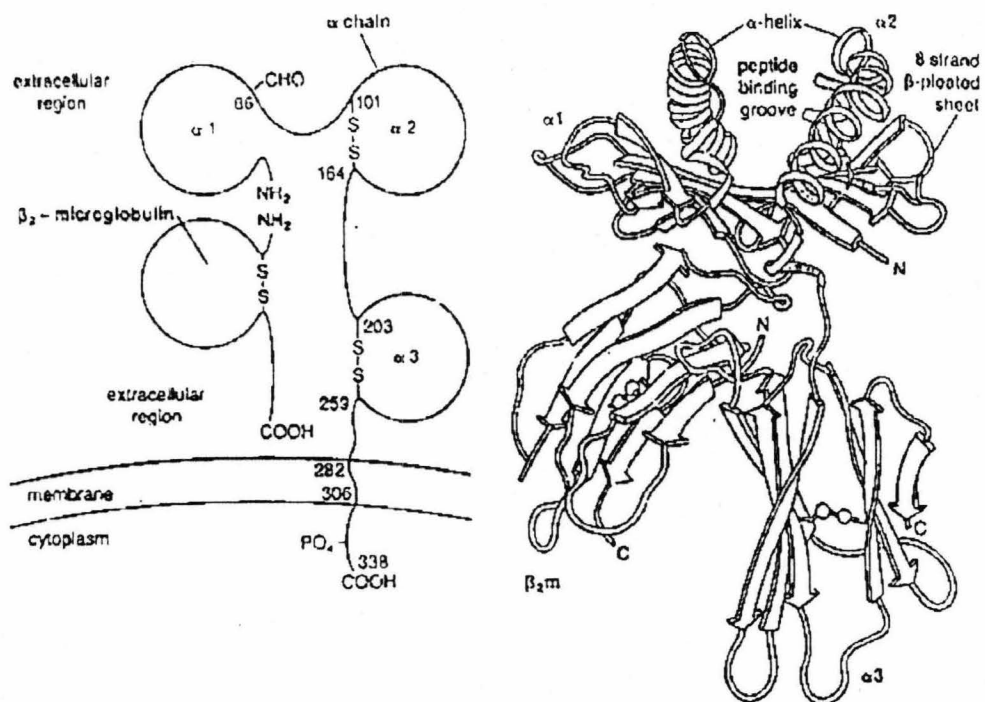
Masing-masing molekul tersebut di atas terdiri dari dua struktur rantai, yaitu rantai alfa dan beta. Rantai alfa mempunyai berat molekul 44,000 dengan tipe domain diluar membran sel yaitu alfa1, alfa2 dan alfa3. Rantai alfa merupakan glikoprotein polimorfik, yang sintesisnya diprogram oleh gena di kompleks HLA pada kromosom 6. Rantai ini berikatan secara non-kovalen dengan rantai protein non-polimorfik, beta 2-mikroglobulin dengan berat molekul 12.000, yang program sintesisnya diatur oleh gena pada kromosom 15. Beta 2 mikroglobulin selalu akan ditemukan pada molekul HLA klas I (**Walter, 1987; Schwartz, 1994**). Ketiga domain ekstra-membran dari rantai alfa terdiri dari : N-terminal glycan region yang bersifat variabel, alpha2-disulphide loop peptide, bersifat variabel, dan alpha3 disulphide loop peptide, bersifat tidak variabel dan berasosiasi dengan beta2-mikro globulin (**Walter, 1987; Schwartz, 1994**).

Ujung carboxyl terminal dari rantai alfa, tertanam lapisan ganda folsofilid membran ke dalam sel (Gambar 2.6).

Penelitian menunjukkan bahwa antigenik determinan molekul HLA, terutama terletak pada domain alfa1 dan alfa2. Kedua domain

tersebut masing-masing terdiri dari 4 beta strands, dan satu alpha helix, yang membentuk bagian atas molekul HLA klas I.

Kedelapan beta strands dari domain alfa1 dan alfa2 tersebut diatas, membentuk lipatan lembaran beta, yang bertindak sebagai penyanggah kedua alfa helix. Alfa helix sendiri membentuk celah yang berfungsi sebagai tempat pengikat fragmen peptida antigen, dan menentukan sifat polimorfisme molekul HLA klas I (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Skema Molekul HLA klas I
(Schwartz, 1994)

Agar antigen dikenal oleh reseptor antigen dari limfosit T sitotoksik (CD8), maka fragmen peptida antigen, harus dalam hubungan fisik

dengan antigen HLA klas I tertentu. Fenomena ini dikenal sebagai HLA restriction.

Molekul HLA klas I seperti diketahui terpaparkan pada permukaan semua sel berinti, kecuali sel spermatozoa dan sel amnion.

Menurut **Doran (1988)**, molekul HLA klas I juga dapat dijumpai larut dalam plasma, terabsorpsi pada permukaan trombosit, dan hanya sedikit terabsorpsi pada sel darah merah.

Di samping loki polimorfik (-A, -B, dan -C), masih ada kurang lebih 14 loki antigen HLA lain dengan polimorfisme yang terbatas, sayang perannya dalam peristiwa penolakan pencangkokan jaringan, sampai sekarang masih diragukan, antara lain antigen HLA-E (**Doran, 1988**).

b. Antigen HLA Klas II

Molekul HLA klas II (HLA-DR, -DP dan -DQ), juga terdiri dari dua rantai polipeptida, yaitu rantai alfa yang tersusun dari 229 asam amino (BM 34.000), dan rantai beta yang tersusun dari 237 asam amino (BM 29.000). Kedua rantai alfa dan beta saling berikatan secara non-kovalen, dan kedua-duanya juga ditanamkan ke dalam sel.

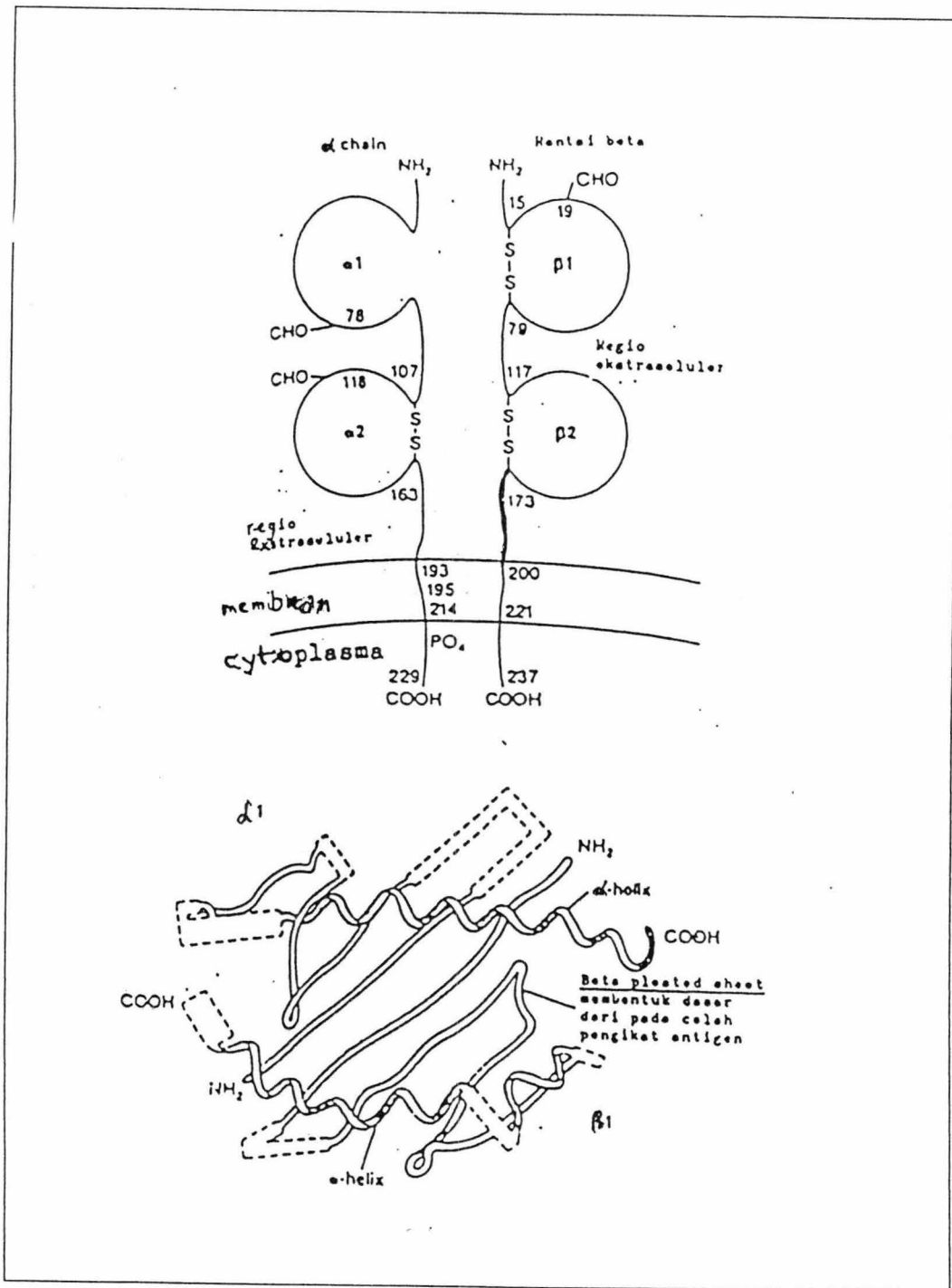
Berbeda dengan molekul HLA klas I, pada HLA klas II justru beta yang mengandung urutan asam amino variabel, dan yang menentukan epitope, sedangkan rantai alfa justru tidak variabel dan tidak menentukan epitope.

Masing-masing rantai alfa dan beta mengandung tiga regio, yaitu : regio hidrofilik ekstra-sel, regio hidrofobik transmembran, dan regio hidrofilik intraseluler.

Regio hidrofilik ekstra seluler rantai alfa, mengandung dua domain alfa 1 dan alfa 2. Regio hidrofilik ekstra-seluler rantai beta, juga mengandung dua domain, disebut masing-masing beta 1 dan beta 2. Domain alfa 2 dan beta 2 kedua-duanya menunjukkan banyak persamaan dengan domains dari regio imunoglobulin yang tetap.

Struktur molekuler daripada DQ dan DP sama dengan DR, perbedaannya hanya terletak pada jumlah asam amino rantai alfa dan betanya. Rantai alfa dan beta molekul DR, masing-masing mempunyai 229 dan 237 asam amino, rantai alfa dan beta molekul DQ, masing-masing mengandung 234 dan 229 asam amino, sedangkan rantai alfa dan beta molekul DP, masing-masing 229 asam amino.

Seperti pada molekul HLA klas I, pada molekul HLA klas II, juga terdapat celah yang dibentuk oleh kedua helix alfa dari domain alfa 1 dan beta 1, dan lipatan lembaran beta sebagai dasar. Celah tersebut berfungsi sebagai pengikat antigen, dan menentukan sifat polimorfisme molekul HLA klas II (Gambar 2.7).

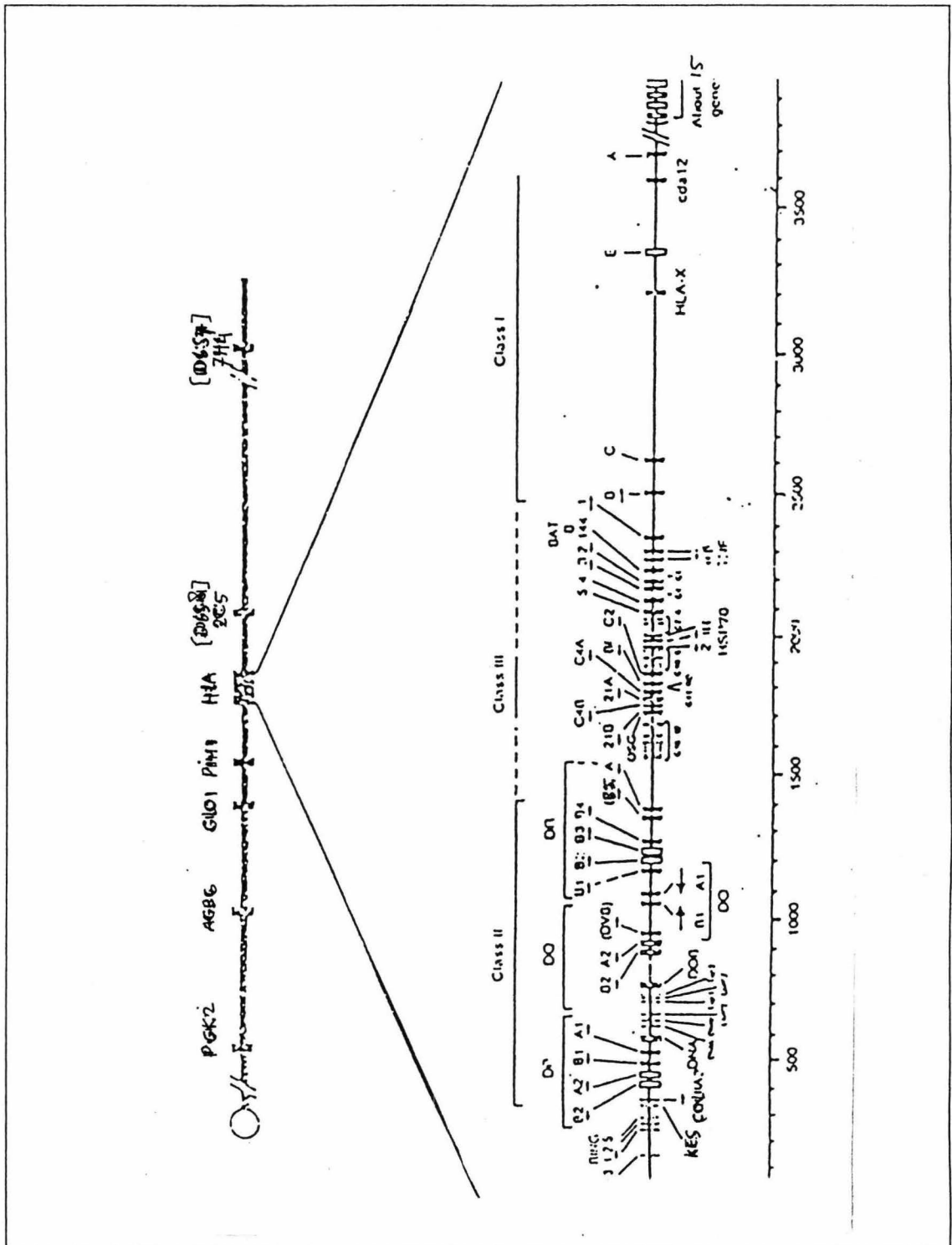


Gambar 2.7 Skema Molekul HLA Klas II (Schwartz, 1994)

a) **Organisasi genom gen HLA klas II**

Dua rantai molekul HLA klas II disandi oleh gen yang terpisah yaitu gen A (menyandi rantai α) dan gen B (menyandi rantai β). Gen A terdiri dari 5 ekson yang masing-masing menyandi: 1) 5' UTR (5' untranslated region) dan urutan sinyal, 2) domain alfa, 3) domain alfa, 4) peptida penghubung, regio transmembran, ekor sitoplasmik dan sebagian 3' UTR (3' untranslated region) serta 5' sisa 3' UTR dari rantai alfa molekul HLA.

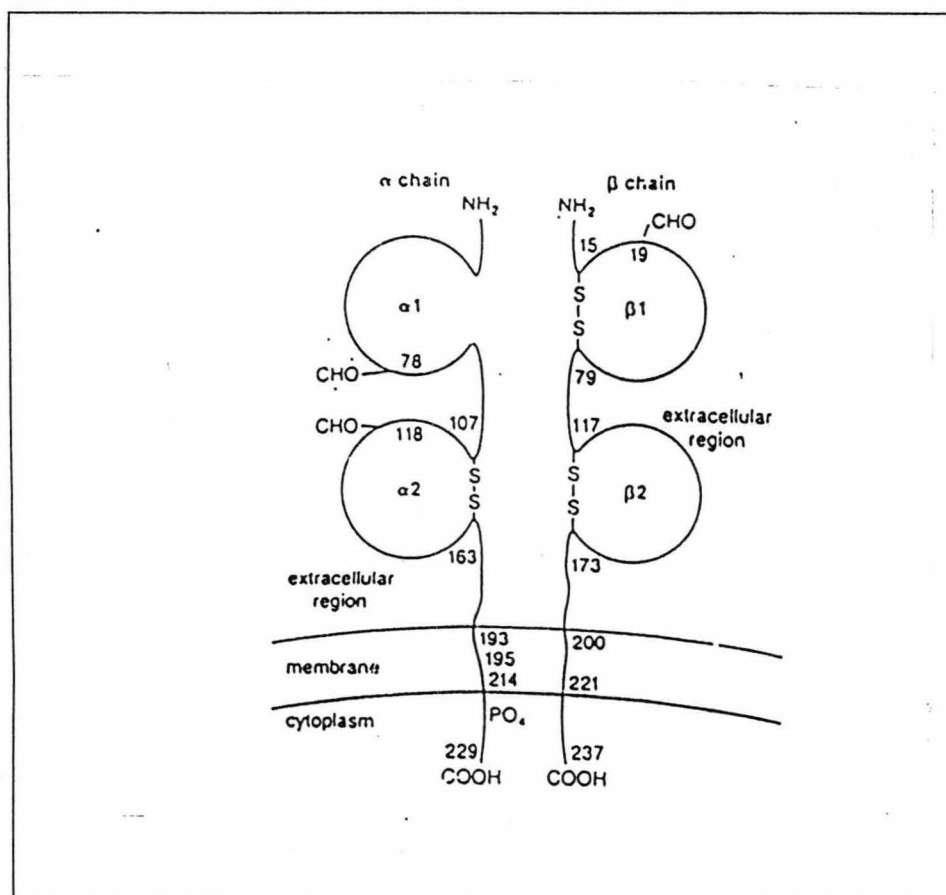
Gen B tersusun sama kecuali untuk ekor sitoplasmik yang sebagian disandi oleh suatu ekor tambahan dan sebagian lagi oleh ekson 3' UTR. Ekson-ekson yang menyandi protein dipisahkan oleh intron. Setiap subregio klas II terdiri paling sedikit satu pasang gen yaitu A dan B, tetapi tidak seluruh gen selalu terekspresi. Lokus HLA-DP mempunyai dua pasang gen A dan B tetapi satu pasang diantaranya tidak terekspresi disebut pseudogen. Lokus HLA-DQ juga mempunyai dua gen A dan B dengan organisasi genom yang sama dengan DP. Lokus HLA-DR berbeda yakni hanya mempunyai satu gen A dan satu sampai lima gen B tergantung haplotipenya dan satu diantaranya pseudogen (Gambar 2.8).



Gambar 2.8 Peta Regio dan Organisasi HLA pada lengan pendek kromosom 6 (Fugger, 1994)

b. Struktur dan fungsi molekul HLA klas II

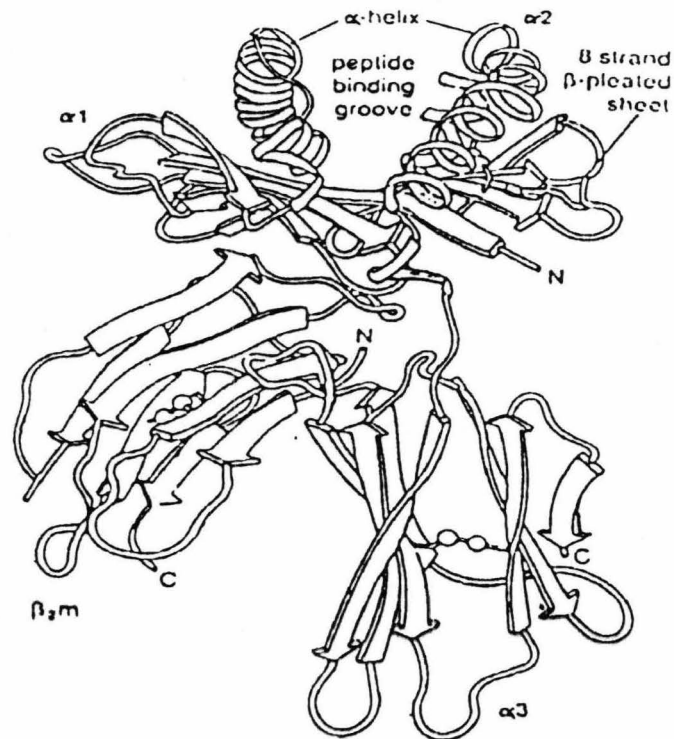
Lokus klas II sistem HLA menyandi paling sedikit 3 bagian glikoprotein transmembran polimorfik yang selalu tereksresi pada permukaan sel limfosit B, makrofag, sel dendrit dan limfosit T yang teraktifasi dan dapat tereksresi pada sebagian besar sel epitel dan endotel oleh rangsangan interferon gama. Molekul klas II yaitu DR, DQ dan DP masing-masing dibentuk oleh dua rantai yang berbeda yaitu alfa dan beta, yang menekuk bersama membentuk molekul heterodimer yang menyajikan antigen eksogen yang diproses intraseluler pada suatu celah yang terbentuk oleh rantai peptida HLA. Didalam celah ini suatu peptida dikenali oleh sel T penolong/CD4' (Gambar 2.8).



Gambar 2.9 Molekul HLA klas II secara skematik (Schwartz, 1994)

Molekul heterodimer tersebut terdiri dari rantai alfa 35 kD dan rantai beta 29 kD yang berikatan secara nonkovalen. Setiap rantai tersusun dari dua domain ekstraseluler, segmen transmembran dan ekor sitoplasmik yang pendek. Domain proksimal kedua membran yaitu alfa 2 dan beta 2 sangat stabil sementara domain distal kedua membran sangat bervariasi dan diduga merupakan bagian yang berinteraksi dengan reseptor sel T dan fragmen peptida antigen (Fugger, 1994).

Struktur tiga dimensi antigen HLA klas I telah dikenal melalui kristalografi sinar-X, sementara struktur molekul HLA klas I belum berhasil ditentukan, maka dibuat suatu model hipotetik tempat ikatan antigen molekul klas I yang serupa dengan molekul klas I. Bagian proksimal molekul klas I, yaitu bagian yang terletak diluar membran, mempunyai celah yang dalam tempat antigen terikat (Gambar 2.10).



Gambar 2.10 Diagram struktur molekul HLA klas I.

Tempat pengikatan peptida pada klas I berupa celah yang dibentuk dari 8 helai lembar β yang berlipat-lipat dan pasangan heliks α dari domain $\alpha 1$ dan $\alpha 2$. Lembar β membentuk dasar dan kedua heliks α membentuk dinding celah (Fuger, 1994; Ilandono, 1998)

Celah ini dibentuk oleh domain alfa1 dan alfa2 molekul HLA dan disini terletak residu asam amino yang hipervariabel. Mutasi asam amino residu pada bagian dasar dan bagian dalam celah ini akan berpengaruh pada pengikatan antigen, sedangkan mutasi sepanjang bagian atas dan luar dari heliks alfa disekitar celah akan berpengaruh pada pengenalan oleh sel T.

Antigen HLA banyak diteliti dalam usaha untuk memahami dasar terjadinya perubahan respons imun sebagai patogenesis penyakit otoimun termasuk LES. Molekul HLA klas I dan klas II

mempunyai peran utama pada respons imun. Pertama, memberi sifat pada sel T melalui seleksi positif dan negatif pada saat perkembangannya dalam timus. Kedua, menyajikan antigen peptida (pada umumnya antigen adalah peptida) pada sel T (Accola, 1995).

Molekul klas II yang terdapat pada permukaan makrofag, sel dendrit dan sel B mengikat pecahan peptida dan menyajikan antigen (terutama antigen eksogen) tersebut pada sel T penolong. Interaksi trimolekuler antara molekul HLA pada permukaan sel penyaji antigen. Pecahan-pecahan peptida dan reseptor sel T (*T Cell Receptor* atau TCR) merupakan syarat minimal bagi antigen bergantung sel T (*T cell dependent antigen*) untuk menghasilkan respons terhadap antigen tersebut. Untuk meningkatkan afinitas kontak antara sel penyaji antigen dan sel T, molekul pelengkap seperti CD4 pada sel T penolong akan berinteraksi dengan molekul HLA klas II terlebih dahulu (Fugger, 1994; Handono, 1998).

c. Antigen HLA Klas III

Komponen komplemen yang sintesisnya diprogram oleh loki komplemen pada regio HLA klas III, juga menunjukkan sifat polimorfisme.

Dikenal ada 4 alleles yang menentukan keempat bentuk alternatif dari properdin faktor B (BF), yang dapat dipisahkan berdasarkan mobilitas elektroforesisnya.

C2 lokus mempunyai 2 common alleles dan satu null allele. Defisiensi C2 terjadi pada individu homozygote terhadap null allele. Ini merupakan defisiensi genetik yang sering dijumpai pada individu kulit putih, dan disertai dengan insidens tinggi penyakit yang menyerupai systemic lupus erythematosus atau SLE (Walker, 1987).

Kedua common alleles C2 lokus S dan F, dan dua alleles frekuensi rendah S1 dan F1, terdapat pada lokus Faktor B (Bf), dan produk genanya berupa : faktor B, berperan penting dalam aktivasi komplemen melalui jalur alternatif.

Pada C4 lokus, sedikitnya terdapat 3 polimorfik C4B alleles dan 6 alleles C4A. Juga ditemukan beberapa varian alleles yang relatif jarang dijumpai pada kedua loki tersebut di atas. Gena null juga bisa terdapat pada kedua loki tersebut, sehingga individu homozygote dengan *double-null haplotype*, akan menderita defisiensi C4 yang lengkap, berupa SLE atau berhubungan dengan SLE.

2.2.5 Fungsi Biologik Molekul MHC

Molekul MHC bersangkutan paut dengan pengaturan respons imun. Untuk pengenalan antigen asing, dibutuhkan pemaparan antigen yang telah diproses, bersama-sama dengan molekul MHC pada permukaan sel, sehingga memungkinkan terjadinya interaksi antar sel.

Limfosit T hanya akan memberikan respin terhadap antigen, bila antigen tersebut berasosiasi dengan molekul MHC klas I atau II.

Sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC), antara lain adalah makrofag, yang akan mencernakan sebagian daripada antigen tersebut, selanjutnya memaparkan fragmen polipeptida pada permukaan sel bersama-sama dengan molekul MHC.

Pada proses pengenalan antigen tersebut di atas, limfosit T sitotoksik (Tc) akan teraktivasi menjadi sel afektor, dan selanjutnya memecah (lisis) sel-sel sasaran spesifik tersebut. Limfosit T sitotoksik, dapat juga menyerang langsung sel-sel sasaran spesifik, dan menimbulkan lisis sel dengan molekul MHC asing pada permukaan. Jadi untuk kerja limfosit T sitotoksik, dibutuhkan adanya molekul non self atau altered self.

Limfosit T pembantu (*Helper T Cell*) yang disingkat dengan Th, hanya akan memberikan respon terhadap pemaparan antigen yang berasosiasi dengan molekul HLA klas II, dan sebagai APC disini adalah limfosit B. Jadi untuk terjadinya interaksi antar sel, limfosit T pembantu harus dijematani oleh sel limfosit B.

Selanjutnya limfosit T pembantu yang terangsang, akan mensekresi berbagai bahan mediator lymphokones, dan mengirimkan signals kepada limfosit B, sehingga limfosit B tersebut akan terangsang, memperbanyak diri dan berdiferensiasi.

Mengingat bahwa untuk terjadinya interaksi antar sel, dibutuhkan kehadiran molekul HLA klas I dan II maka fenomena tersebut dikenal sebagai MHC restriction, yang mungkin ikut berperan penting dalam peristiwa terjadinya fenomena toleransi dan autoimunitas (Walker, 1987).

Molekul HLA klas III diketahui ikut berpartisipasi dalam aktivasi komplemen. Atas pertimbangan fungsi biologis molekul HLA tersebut di atas, serta pula atas dasar hasil pemetaan (*mapping*) dengan teknik genetika yang klasik, yang menunjukkan

bahwa letak gena respons imun (ir), sangat berdekatan dengan gena MHC klas II, maka diduga molekul MHC, ikut serta dalam respons imun terhadap antigen asing.

2.2.6 Pewarisan Keturunan dari Molekul HLA

Akibat adanya '*close linkage*;', maka kombinasi dari alleles pada tiap lokus satu kromosom, akan diwariskan sebagai suatu kesatuan (unit) yang disebut sebagai '*haplotype*'. Oleh karena itu tiap individu mewarisi satu kromosom dari masing-masing orang tuanya, maka setiap individu akan memiliki 2 HLA haplotype.

Gena HLA diketahui adalah co-dominant, sehingga kedua alleles pada lokus HLA tertentu akan ditampilkan bersama, dan dua set lengkap antigen HLA, masing-masing berasal dari kedua orangtuanya, dapat ditemukan pada tiap sel.

Berdasarkan hukum pewarisan Mendel, 25% kemungkinan bahwa 2 saudara kandung, akan memiliki kedua haplotype yang sama, sedangkan kemungkinan 50% mereka akan memiliki satu haplotype yang sama, dan 75% kemungkinan mereka tidak memiliki haplotype yang sama, atau sama sekali HLA-incompatible.

2.2.7 Genetika Populasi

Genetika populasi mempelajari gen yang terdapat di dalam populasi dan menguraikan secara matematik akibat dari keturunan pada tingkat populasi (Klein, 1996).

Informasi yang penting pada studi genetika populasi ini adalah pola genetik yang berupa frekuensi penyebaran gen HLA pada suatu masyarakat / populasi tertentu (Svejgaard, 1980; Tiwari dan Terasaki, 1985; Shields, 1987).

Terdapat tiga golongan besar penduduk dunia ini yang ciri penampilan fisiknya mudah dikenal yaitu : golongan Kaukasoid (Caucasian), Mongoloid dan Negroid (Rusdi, 1992; Bidwell, 1994). Masing-masing ternyata mempunyai kekhususan frekuensi antigen HLA atau frekuensi gene HLA (Histocompatibility Workshop, 1996).

Pemakaian istilah oriental dalam bidang imunogenetik (MHC/HLA) lebih sering digunakan dibandingkan dengan istilah Mongoloid (De Vries, 1992).

Populasi di Indonesia merupakan suatu populasi yang unik, dikarenakan adanya proses pembauran ras akibat migrasi ataupun karena *gene flow* (Rusdi, 1992). Pada tahun 1990, Moeslichan melaporkan hasil studi populasi genetik tentang HLA-A, -B dan -C yang dilakukan di Jakarta dan sekitarnya, bahwa gen HLA pada populasi penelitiannya digolongkan dalam golongan Oriental (Mongoloid).

Ekspresi antigen HLA dalam suatu populasi dinyatakan sebagai frekuensi antigen yaitu suatu angka prosentase antigen yang ditemukan pada pemeriksaan serologi dalam suatu populasi. Istilah tersebut merupakan gambaran frekuensi phenotype, sedangkan gambaran genotype lazim disebut sebagai frekuensi gen korelasi frekuensi antigen HLA dan gen HLA dapat diperhitungkan menurut formula **Matuiz, 1970.**

$$g = 1 - \sqrt{1-f}$$

g = frekuensi gen

f = frekuensi antigen

Di dalam suatu pemeriksaan, apabila diperoleh anti serum yang lengkap akan memudahkan penentuan seluruh alel daru suatu lokus, maka jumlah seluruh frekuensi

gen dari alel tersebut akan berjumlah sama dengan 1,0 atau 100%. Berdasarkan hal tersebut, maka tidak akan ditemukan antigen blank (frekuensi antigen blank = 0). Antigen blank adalah HLA yang masih belum dapat diidentifikasi didalam suatu populasi.

Frekuensi gen tersebut sangat penting dalam memperhitungkan jarak genetika antara satu ras dengan ras lainnya. Jarak genetik atau *genetic distance* adalah terminologi statistik yang dipergunakan untuk menilai keeratan antara kelompok / ras berdasarkan frekuensi gen yang dipunyai masing-masing kelompok tersebut (Kikuchi, 1987).

2.2.8 *Linkage Disequilibrium* (Timpang Rangkai)

Konsep lain yang penting dalam genetika populasi dalam HLA / MHC adalah *linkage disequilibrium* (timpang rangkai) antara alel pada lokus-lokus sistem HLA (Shields, 1987).

Kejadian timpang rangkai lebih sering diartikan ketimpangan antara frekuensi haplotype HLA yang terdapat (diamati) di masyarakat dengan frekuensi yang diperhitungkan / diperkirakan, dengan cara menghitung perbedaan frekuensi antara yang diamati (observasi) dengan frekuensi yang diperhitungkan. Penyebab keadaan belum bisa diterangkan dan mungkin karena adanya seleksi genetik (Tiwari-Terasaki, 1985; Svejgaard, 1994).

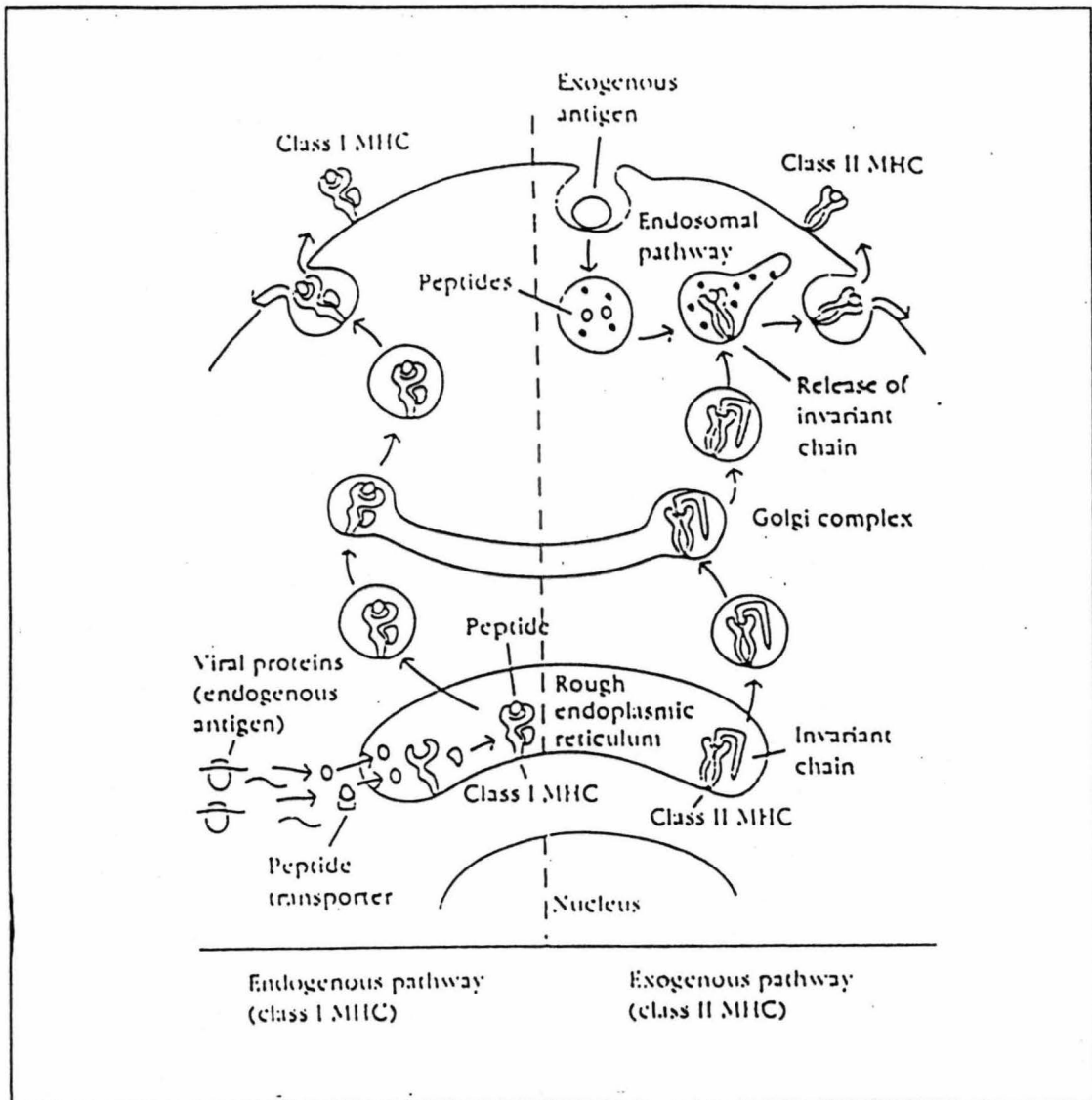
Timpang Rangkai ini sering spesifik untuk suatu populasi, misalnya frekuensi haplotype A1, B8 lebih sering pada populasi Kaukasoid dibandingkan dengan populasi Negroid atau Oriental.

2.2.9 Pemisahan jalur pemrosesan dan penyajian antigen exogen dan endogen oleh molekul MHC klas I dan klas II

Proses dan penyajian antigen exogen maupun endogen oleh molekul MHC klas I dan klas II diduga berbeda jalurnya. Hal ini berdasarkan eksperimen **Morisson dan Braciale dalam Kuby, 1992**, dengan virus influenza. Ternyata asosiasi antigen virus dengan molekul MHC klas I memerlukan replikasi virus dan sintesis protein virus. Sebaliknya dengan molekul MHC klas II tidak memerlukannya.

Adanya pemisahan jalur tersebut secara kompartemen intraseluler memungkinkan penentuan tipe *antigenic peptide* yang akan diikat oleh masing-masing klas molekul MHC. Molekul MHC klas I diduga berinteraksi dengan peptide yang dibawa ke dalam *rough endoplasmic reticulum (RER)* oleh *transporter protein*. Selama proses pengikatan peptide, interaksi antara molekul MHC klas I rantai α dan β_2 -microglobulin dan kompleks pengikatan ini selanjutnya akan menuju ke *apparatus golgi* lalu akhirnya ke plasma membran. Kehadiran rantai *invariant (invariant chain = li)* diduga bertujuan untuk melindungi pengikatan peptide pada MHC klas II di dalam *endoplasmic reticulum (ER)* serta memudahkan jalan ke kompartemen sel, dimana antigen exogen diproses. Terakhir yaitu jalur proses endosom, dimana vesicles yang mengandung molekul MHC klas II dan rantai li akan bergabung / fusi dengan lisosom. Enzim di dalam lisosom lalu memutuskan rantai li, sehingga memungkinkan molekul MHC klas II mengikat peptide. Sebagai kesimpulan akhir, bahwa molekul MHC klas I berfungsi memproses antigen endogen melalui cytoplasma dan menyajikannya kepada T cells / $CD8^+$. Sedangkan molekul MHC

klas II berperan memproses antigen exogen melalui endosom dan meyajikannya kepada T cells / CD4⁺.



Gambar 2.11 Model pemisahan jalur pemrosesan dan penyajian antigen exogen dan endogen oleh molekul MHC klas I dan klas II (Kuby, 1992).

2.2.10 Manfaat Klinis Sistem HLA

a. Transplantasi Jaringan

Keberhasilan transplantasi jaringan sangat ditentukan oleh kecocokan antara antigen HLA donor dengan antigen HLA resipien / penderita. Landasan konsep ini berawal dari penemuan Van Rood dan Belner pada tahun 1966, tentang ketahanan / daya hidup jaringan dari suatu transplantasi kulit pada kembar identik yang sistem dan golongan darah ABO-nya sama, ternyata daya hidup jaringannya lebih lama dibandingkan dengan penderita yang mengalami transplantasi kulit yang berasal dari saudara yang hanya identik pada salah satu dari kedua sistem tersebut.

b. Transfusi Lekosit dan Trombosit

Transfusi darah pada hakekatnya suatu alotransplantasi sel darah dari seseorang ke orang lainnya. Seperti diketahui bahwa antigen HLA terdapat pada semua sel berinti termasuk lekosit dan trombosit, sehingga menyebabkan tubuh resipien akan membentuk antibodi yang akan bereaksi dengan antigen HLA dari darah donor dan berakibat timbulnya reaksi transfusi / penolakan.

c. Studi Keayahan / Paterniti

Sistem HLA dikenal sebagai salah satu petanda genetik (*genetic marker*) pada manusia, sehingga dapat digunakan untuk penelusuran yang

menerangkan kaitan seseorang dengan kedua orangtuanya yang menurunkannya.

d. Asosiasi HLA dan Penyakit

Karena HLA / MHC sebagai petanda genetik sekaligus regulator respon imun dari berbagai penyakit, maka banyak usaha para peneliti untuk mencari asosiasi antara HLA dan kerentanan terhadap suatu penyakit (De Vries, 1978; Svejgard, 1994).

Penelitian-penelitian empirik telah banyak dilakukan pada beberapa penyakit, yang mempunyai aspek imun (autoimune), Infeksi dan kelainan endoktrin / metabolik (De Vries, 1992).

Adanya interaksi molekuler antara molekul HLA / MHC dengan komponen seluler yang non imun, telah mendorong usaha penelitian tentang asosiasi HLA antigen dengan penyakit non imun, untuk mendapatkan pemahaman yang lebih mendalam dan lebih luas tentang fungsi biologi molekul HLA / MHC tersebut.

2.2.11 Perkembangan Metode Reaksi Rantai Polimerasi (*Polymerase Chain Reaction* atau PCR) untuk Pemeriksaan Gen HLA Klas II

Sebagian besar gen HLA klas II yang terekspresi menunjukkan diversitas alel (polimorfisme) yang tinggi kecuali gen HLA-DRA, DPA1 dan DRB4. Oleh karena fungsinya yang amat penting dalam bidang imunogenetika serta diversitasnya yang tinggi tersebut maka diperlukan suatu protokol identifikasi yang baik. Prosedur untuk mengidentifikasi seluruh variasi urutan gen klas II dengan cepat dan tepat akan sangat

membantu penapisan awal suatu sampel yang besar guna keperluan transplantsi atau pada penelitian-penelitian penyakit khususnya autoimun (Busye, 1993; Handono, 1998).

Dalam 5 tahun terakhir telah dicapai suatu perkembangan yang luar biasa pada metode penetapan HLA (*HLA typing*), yaitu penetapan gen HLA berdasarkan PCR. Perkembangan tersebut sejalan dengan penggunaan PCR dalam bidang biologi atau biomedis. Karena polimorfisme yang sangat tinggi, maka hasil penetapan gen HLA sekarang lebih menjadi tolok ukur yang utama untuk setiap metode PCR yang baru (Bidwell, 1994). Ditinjau dari segi pelaksanaannya, penetapan gen HLA berdasarkan PCR dapat dikategorikan dalam 2 cara yaitu teknik berdasarkan hibridisasi pelacak (*probe*) dan teknik berdasarkan elektroforesis.

a. Teknik Berdasarkan Hibridisasi Pelacak

Teknik *PCR Sequence Specific Oligonucleotide* (PCR-SSO) merupakan metoda yang pertama kali digunakan untuk penetapan gen HLA dan merupakan perkembangan dari teknik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Chen, 1994). Metode ini meliputi hibridisasi urutan gen HLA sasaran (*sequence target*) yang telah diamplifikasi dari ekson polimorfik (ekson 2 gen HLA klas II), menggunakan sejumlah pelacak dengan urutan spesifik (*Sequence Specific Oligonucleotide* atau SSO). Setiap pelacak SSO adalah komplementer terhadap motif yang berbeda-beda dalam urutan basa nukleotida gen HLA yang hipervariabel. Pola hibridisasi pelacak yang spesifik dapat digunakan untuk

mengidentifikasi setiap alel HLA maupun kombinasi alel tersebut. PCR-SSO dibedakan dalam 2 bentuk yaitu *PCR-SSO dot blot* dan *PCR-SSO reverse dot blot*. Akhir-akhir ini telah dikembangkan modifikasi cara-cara tersebut untuk lebih mempermudah analisis, diantaranya dengan menggunakan lempeng mikotiter (*microtitre tray*) seperti *oligocapture sandwich assay*, *the dual-phase oligocapture assay* dan *hybridization protection assay*. Seluruh teknik-teknik tersebut tidak menggunakan petanda radioaktif (Miller dan Rodey, 1981; Dyer dan Middleton, 1993; Handono, 1998).

b. Teknik Berdasarkan Elektroforesis

Beberapa teknik yang menggunakan elektroforesis untuk menganalisis produk PCR telah dikembangkan akhir-akhir ini, diantaranya adalah PCR-RFLP. Teknik ini didasarkan pada penggunaan sebuah panel enzim endonuklease restriksi untuk memotong urutan basa nukleotida gen HLA sasaran hasil amplifikasi. Selanjutnya hasil pemotongan tersebut dianalisis dengan menggunakan gel agarosa atau akrilamid. Penentuan spesifitas alel HLA dibedakan berdasarkan pola fragmen endonukleolitik yang dihasilkan dari daerah pemotongan.

PCR-Sequence Specific Primers (PCR-SSP) merupakan metoda yang juga berkembang saat ini. Prinsip dari metoda ini adalah setiap grup alel diamplifikasi dengan pasangan pemicu (*primer*) yang benar-benar cocok terhadap grup tersebut. Dengan mengatur kondisi dengan ketat maka

pasangan pemicu tersebut tidak akan mengamplifikasi alel lain yang urutan basa nukleotidanya sangat mirip (*closely related*). Identifikasi alel didasarkan pada ada atau tidak adanya produk amplifikasi yang diobservasi melalui elektroforesis gel agarosa. Metoda ini banyak digunakan untuk penetapan HLA donor pada transplantasi organ, oleh karena dapat diselesaikan dalam waktu yang cepat (**Bunce, 1993**). Penetapan urutan (*sequencing*) nukleotida produk PCR meskipun mulanya dianggap sebagai cara yang sulit, sekarang telah dapat dilakukan untuk penetapan HLA klas I dan II. Hal ini dimungkinkan dengan dipergunakannya *solid phase sequencing* dari produk PCR yang ditandai biotin pada ujung 5' pada partikel magnetik yang dilapisi streptavidin (Dynabeads) atau *sequence based typing* (PCR-SBT). Pada metode PCR-SBT, salinan (*copy*) cDNA dari ekson polimorfik gen HLA yang diperoleh dari transkripsi terbalik (*reverse transcription*) total RNA diamplifikasi dengan PCR dan ditentukan urutannya dengan menggunakan metode Sanger (**Bidwell, 1994; Handono, 1998**).

Pemilihan metoda PCR di atas akan sangat tergantung pada jumlah sampel, kepentingan klinis, keperluan alat serta biaya. Oleh karena kemampuan untuk menetapkan alel yang lebih sensitif dan spesifik, kontribusi metoda tersebut pada histokompatibilitas dan imunogenetik baik untuk keperluan penelitian maupun klinis sangat dirasakan manfaatnya (**Bidwell, 1994; Handono, 1998**).

2.3 Asosiasi Sistem HLA Dengan Penyakit

2.3.1 HLA Dengan Penyakit

Beberapa penyakit diketahui mempunyai asosiasi dengan antigen HLA tertentu yang spesifik yang sudah jelas, antara lain dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Asosiasi antara antigen HLA dan penyakit

Antigen HLA	Penyakit	Resiko Relatif	Antigen HLA	Penyakit	Resiko Relatif
B27	Spondylitis ankylopoietica	90.1	Dw2	Multiple sclerosis	3.4
	Reiter syndrome	35.9		optic neuritis	2.9
	Yersinia arthritis	17.6	Dw4	rheumatoid arthritis	3.9
	Salmonella arthritis	17.6			
	arthritis psoritica	8.6	B5	Behcet's disease	7.4
	frozen shoulder	6.3		Ulcerative colitis	3.8
	juvenile rheumatoid arthritis	4.5	B7	Pernicious anaemia	1.7
	acute uveitis	9.4	B12	Cryptogenic Fibrosing Alveolitis	9.4
	Psoriasis pustularis	3.7	Bw35	Subacute thyroiditis	16.8
	Asbestosis	3.7	Bw38	Arthritis psoriatica	9.1
Dw3	gluten-sensitive enteropathy	73.0	Cw6**	Psoriasis vulgaris	3.6
	dermatitis herpetiformis	13.5	A2	Rheumatic vitium cordis	1.7
	Addison's disease	8.8	A10	Pemphigus	2.8
	auto-immune chronic thyreotoxicosis	6.8			
	juvenile-onset Diabetes	4.4	Bw16	Paralytic poliomyelitis	4.3
		3.8	A1	Recurrent herpes labialis	3.7
			A10		
B8	Myasthenia gravis	4.4	B18		
	Systemic lupus erythematosus	2.1	Dw2 haplo type	C2 deficiency	?
			B12	Retinoblastoma	0.4
			B5	Polycystic kidney disease	2.6
			A2	Congenital heart malformation	4.9
			Bw16	Manic depressive disorder	2.3
			A28	Schizophrenia	2.3
			A3	Idiopathic haemochromatosis	9.3

'De Vries, 1979'

Faktor yang perlu dipahami dalam asosiasi sistem HLA dengan suatu penyakit adalah:

1. Jumlah kuantitatif variasi molekul HLA
2. Variasi ekspresi molekul HLA
3. Variasi pola sistem HLA pada berbagai populasi yang berbeda. **(De Vries, 1992; Judajana, 1994)**

Umumnya penyakit yang berasosiasi dengan antigen HLA mempunyai beberapa karakteristik **(Spickett, 1962; Fine, 1988)** antara lain:

1. Penyebab penyakit maupun patofisiologi, tidak diketahui.
2. Mempunyai distribusi herediter lemah, sehingga tidak mempunyai asosiasi yang mutlak dengan antigen HLA tertentu.
3. Mempunyai asosiasi dengan kelainan imunologik.
4. Hanya berpengaruh sedikit atau tidak sama sekali terhadap reproduksi.

Besarnya asosiasi penyakit dengan antigen HLA tertentu dinyatakan dengan resiko relatif, yang menunjukkan besarnya kemungkinan individu dengan antigen HLA tertentu, untuk menderita penyakit tertentu, dibanding individu tanpa antigen HLA tersebut.

Mekanisme asosiasi antigen HLA dengan penyakit tertentu, hingga kini belum diketahui dengan jelas, dan masih merupakan hipotesis, antara lain dikemukakan 5 hipotesis **(Schwartz, 1994)** sebagai berikut:

1. Molekul HLA sebagai Reseptor Agen Penyebab

Hipotesis ini didasarkan pada kenyataan bahwa antigen HLA tertentu, dapat bekerja sebagai reseptor untuk agen penyebab penyakit, seperti virus, toksin dan lain

bahan asing. Kenyataan yang mendukung hipotesis tersebut, antara lain bersumber dari hasil observasi, yang menyatakan bahwa molekul pada permukaan sel, dapat bekerja sebagai reseptor terhadap virus. Contohnya adalah CD4 dapat bekerja sebagai reseptor untuk *Human Immunodeficiency Virus* (HIV).

Juga misalnya HLA-B27 adalah reseptor untuk virus penyebab spondilitis ankilosa, maka individu dengan antigen HLA-B27, mempunyai resiko lebih besar untuk menderita spondilitis ankilosa bila terinfeksi virus tersebut, daripada individu tanpa antigen HLA-B27.

2. HLA Merupakan Pilihan Untuk Peptida Antigenik

Hanya celah pengikat antigen molekul HLA tertentu saja yang dapat menerima fragmen peptida dari antigen penyebab penyakit. Jadi bila HLA-B27 merupakan satu-satunya molekul HLA kelas I yang dapat menerima peptida penyakit tersebut dan menyampaikannya kepada CD8 limfosit T, maka individu dengan antigen HLA-B27, mempunyai kecenderungan untuk menderita penyakit tersebut.

3. Reseptor Limfosit T Menentukan Predisposisi Penyakit.

Menurut hipotesis ini reseptor antigen dari limfosit T yang sebenarnya bertanggung jawab terhadap predisposisi seseorang terhadap penyakit. Walaupun demikian, oleh karena proses pengenalan antigen dibatasi oleh molekul HLA, maka asosiasi yang tampak adalah antara antigen HLA dengan penyakit.

Bila diumpamakan bahwa semua individu dengan antigen HLA-B27 dapat membentuk B27-processed antigen complex tertentu, tetapi hanya individu tertentu

saja yang memiliki B27-restricted T lymphocytes dengan reseptor sel T yang bersangkutan, yang dapat mengenal kompleks tersebut.

Bila proses pengenalan kompleks tersebut oleh limfosit T akan menyebabkan terjadinya penyakit spondilitis ankilosa, maka hanya individu dengan limfosit T tersebut yang dapat terkena penyakit tersebut.

4. Agen Penyebab Penyakit Menyerupai Molekul HLA (*Molecular Mimicry Hypothesis*)

Dalam hipotesis ini, antigen HLA yang berasosiasi dengan penyakit mempunyai sifat imunologik yang sama dengan agen penyebab penyakit.

Hipotesis ini meliputi dua alternatif:

1. Oleh karena persamaan sifat imunologik antara agen penyebab penyakit dengan antigen HLA, maka agen penyebab dianggap sebagai diri sendiri (self), sehingga tidak terjadi respons imun, dan dengan agen tersebut menyebabkan terjadinya penyakit tanpa gangguan dari sistem imun tuan rumah (host).
2. Agen penyebab penyakit dianggap sebagai bahan asing, sehingga timbul respons imun. Oleh karena adanya persamaan sifat imunologik antara gen penyebab penyakit dengan antigen HLA, maka respons imun juga ditujukan kepada antigen HLA, sehingga terjadi respons autoimun, dan terjadilah penyakit. Hipotesis tersebut didukung oleh hasil pengamatan sebagai berikut:

Antigen HLA-B27 berasosiasi dengan penyakit Reiter dan spondilitis ankilosa. Penyakit Reiter pada individu dengan antigen HLA-B27 mengikuti penderita disentri yang disebabkan *Shigella Flexneri*. Strain *Shigella* diketahui

mengandung plasmid yang memprogram sintesis suatu protein dengan rentangan 5 asam amino pada antigen HLA-B27. Akibat persamaan struktur dan sifat imunologik dari gen penyebab penyakit dan antigen HLA, maka hanya individu dengan antigen HLA-B27, yang peka terhadap penyakit tersebut.

5. Penampilan Molekul MHC Klas II Yang Menyimpang

Dalam hipotesis ini dikemukakan postulat bahwa induksi penampilan antigen HLA klas II pada permukaan sel (yang dalam keadaan normal tidak terjadi) menjadi penyebab timbulnya penyakit.

Molekul jaringan spesifik pada permukaan sel, secara tetap akan mengalami penggantian dan degradasi. Bila sel tersebut tidak menampilkan molekul HLA klas II, maka degradasi dari molekul jaringan spesifik tersebut tidak terjadi.

Sebaliknya bila sel jaringan spesifik terinduksi untuk menampilkan molekul HLA klas II, maka degradasi jaringan akan mengarah kepada terjadinya antigen processing. Selanjutnya fragmen peptida dari molekul jaringan spesifik akan terikat oleh sisi pengikat antigen dari molekul HLA klas II, sehingga membentuk kompleks imunogenik dan dimulainya respons imun terhadap molekul jaringan spesifik.

Postulat tersebut didukung oleh hasil pengamatan pada penyakit hipertiroid atau penyakit Grave, dimana ada antibodi yang ditujukan kepada reseptor untuk thyroid stimulating hormon yang berasosiasi dengan HLA-DR3.

2.3.2 HLA dengan penyakit lepra

Sejak diketahui bahwa sistem HLA memegang peranan penting dalam regulasi respons imun, maka banyak sudah penelitian yang dilakukan untuk menganalisa distribusi HLA-A dan HLA-B diantara penderita lepra dan kontrol yang sehat pada berbagai populasi.

Thorsby (1973) melaporkan tingginya frekuensi HLA-B21 pada seluruh penderita, kecuali tipe LL. Di Ethiopia, **Escobar (1973)** melaporkan bahwa ke dua HLA-A2 dan HLA-A3 frekuensinya rendah di Mexico, **Reis (1974)** menemukan tingginya frekuensi HLA-B5 dan HLA-B27 pada Tuberculoid dan HLA-Aw23 pada Lepromatous Leprosy. Di Brazilia, **Kreisler (1974)** melaporkan tingginya frekuensi HLA-B14 di Spanyol. Bagi populasi Asia, **Smith (1975)** melaporkan peningkatan HLA-B8 pada Lepromatous dan rendahnya HLA-A9 pada non-lepromatous Leprosy di India. Di Jepang telah pula dilaporkan hasil penelitian **Takata (1978)** yang juga menemukan frekuensi HLA-B8 pada penderita Lepra disana. Di Thailand, **Youngchaiyud (1977)** melaporkan adanya HLA-B40 pada semua penderita, dimana **Greiner (1978)** mendapatkan adanya hubungan yang erat antara HLA-B8 dengan Lepromatous Leprosy dan HLA-B17 dengan Tuberculoid pada etnik yang sama. **Chan (1979)** melaporkan adanya frekuensi yang tinggi HLA-B17 pada penderita Tuberculoid di Cina (seluruh hasil penelitian tersebut di atas dikutip dari **Job, 1980**).

Dengan melihat berbagai data mengenai HLA-A dan HLA-B yang dihubungkan dengan Lepra, maka kesimpulan yang diperoleh dari berbagai studi populasi tersebut adalah bahwa peranan HLA-A dan HLA-B determinants dalam Lepra tidak mengesankan dan lemah. Artinya HLA-A dan HLA-B tidak bertanggung

jawab secara langsung atas perbedaan kerentanan terhadap Lepra, tetapi muncul sebagai linkage disequilibrium dalam beberapa populasi, dengan hipotesis 'gen kerentanan' terhadap lepra (MC Devit and Bodmer, 1974).

Untuk mengatasi hal ini, maka pilihan utama adalah 'studi famili' (= analisis pedigree = analisis garis keturunan) yang kelihatannya dapat menggambarkan keterkaitan kontrol HLA dalam ketiadaan hubungan (= hubungan yang lemah) pada level populasi. De Vries (1979) di Suriname, yaitu peningkatan yang bermakna atas HLA-DR2 pada penderita Tuberculoid dan penurunan yang bermakna pada HLA-DR6. dengan demikian dapat disimpulkan bahwa HLA-DR2 merupakan pertanda genetik ('genetic marker') bagi kerentanan pada tipe Tuberculoid, dan mungkin HLA-DR6 merupakan pertanda genetik bagi resistensi terhadap Leprosy. Tetapi penelitian di Jepang (Izumi, 1982; Serjeantson, 1983) melaporkan bahwa HLA-DR2 mempunyai hubungan dengan Lepromatous Leprosy.

Berdasarkan diskusi data yang ditemukan pada penelitian HLA dan Lepra, maka kontrol keterkaitan HLA pada kerentanan terhadap Lepra Tuberculoid tampaknya mempunyai arti yang bermakna. Selanjutnya prediksi yang berdasarkan latar belakang fungsi HLA, menyatakan bahwa asosiasi yang lebih konsisten terjadi dengan HLA-DR atau dengan produk HLA-klas II (Van Eden, 1980).

Spikett (1962) menunjukkan bahwa bentuk-bentuk lepra ditentukan oleh faktor genetik serta memberi kesan adanya suatu gen tunggal yang irreguler, dominan sebagai pengontrol kerentanan pada seorang individu terhadap lepra. Spikett juga memberi petunjuk bahwa dalam suatu populasi telah terjadi penetrasi gen sebesar 83,3%. Penelitian Aycock, 1941, yang dikutip dari Job, 1980, terhadap family

analisis pedigree atas 2010 anak dari 587 pasangan mendapatkan hasil bahwa bilamana ibu saja yang lepra, maka 14% kelak anaknya cenderung menderita, jikalau bapak yang lepra maka 7% anaknya cenderung jadi lepra, tetapi bilamana ibu dan bapak lepra, maka 26% anak-anaknya kelak cenderung menderita penyakit ini.

Ali dan Ramanujam (1964; 1966) seperti dikutip **Chatterjee, 1978** melakukan penelitian terhadap 35 pasang kembar yang salah satu atau keduanya lepra. 19 diantaranya kembar monozygot (MZ), maka terdapat 82,6% peluang menderita lepra, sementara kembar dizygot (DZ) mempunyai resiko 16,7% menderita lepra kelak. Selanjutnya terhadap 12 kembar monozygot yang menderita lepra, ternyata 100% peluang dipunyai mereka untuk menderita lepra, yaitu 5 pasang mendapat tipe LL dan 7 pasang menderita tipe TT dikemudian harinya. Penelitian terbesar atas pasangan kembar (62 MZ dan 40 DZ) di India, oleh **Chakravarti dan Vogel (1973)**, diperoleh bukti kesesuaian MZ sebesar 59,7% dan DZ sebanyak 20%.

Oleh karena ternyata respon imun dikontrol secara genetik oleh sistem HLA, maka penelitian selanjutnya banyak dititik beratkan pada peran faktor HLA dalam kerentanan terhadap lepra (**Spikett, 1962, 1964; Beiquelman, 1965; Rea 1976, 1980; De Vries, 1976, 1979, 1980, 1986, 1987, 1988, 1989; Youngchaiyud, 1977; Nakajiman, 1977; Fine, 1979, 1981, 1988; Massoud, 1978; Van Eden, 1980, 1985; Izumi, 1982; Serjeantson, 1983; Keyn, 1985; Shauf, 1985; Kikuchi, 1986, 1987; Kim, 1987; Shields, 1987; Told, 1990; George, 1993; Svejgaard, 1994; Mehra, 1995; Dessoukey, 1996; Visentainer, 1997; Soebono, 1997**).

BAB 3

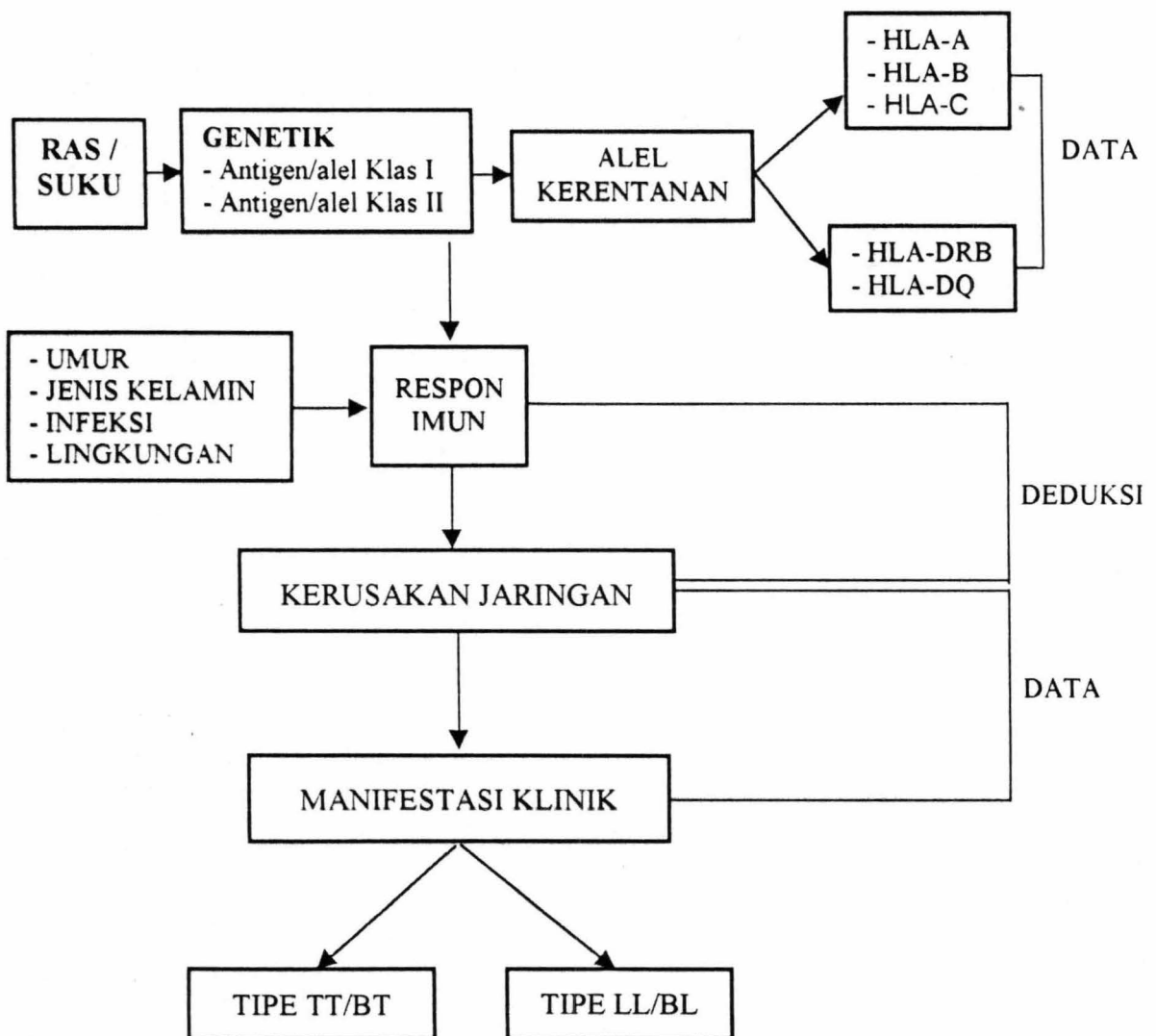
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Landasan konsep yang tercermin pada kerangka konseptual berbagai teori berikut :

1. Dalam suatu daerah endemis lepra tinggi, maka terdapat kelompok yang beresiko tinggi tertular penyakit lepra. Di dalam kelompok ini terdapat group penderita dan bukan penderita. Faktor imunitas seseorang sangat menentukan mudah tidaknya individu tersebut terinfeksi kuman lepra dan faktor genetiklah yang mengendalikan derajat imunitas tersebut. Diantara faktor genetik, maka faktor HLA yang dipandang paling berperan. Untuk mengetahui jenis antigen HLA yang mana yang paling berperan pada kerentanan seseorang terhadap penyakit, maka perlu diukur petanda genetiknya melalui penetapan jenis HLA yang menghasilkan HLA spesifik pada setiap suku / ras, yang pada giliran akhirnya dapat ditentukan resiko relatif bagi kelompok suku tersebut, sehingga usaha pencegahan selektif dapat dilaksanakan.
2. Setiap suku / ras mempunyai latar belakang pola HLA yang unik dan saling berbeda satu sama lainnya, sehingga kerentanan dan faktor resiko terhadap suatu penyakit juga berbeda. Untuk menekan besarnya faktor resiko ini, maka setiap jenis antigen / gen HLA, baik yang klas I maupun yang klas II (HLA-A, -B, -C dan HLA-DR, -DQ) harus ditentukan dulu, sehingga gen kerentanan dapat diketahui. Faktor genetik ini diduga kuat merupakan faktor yang penting untuk

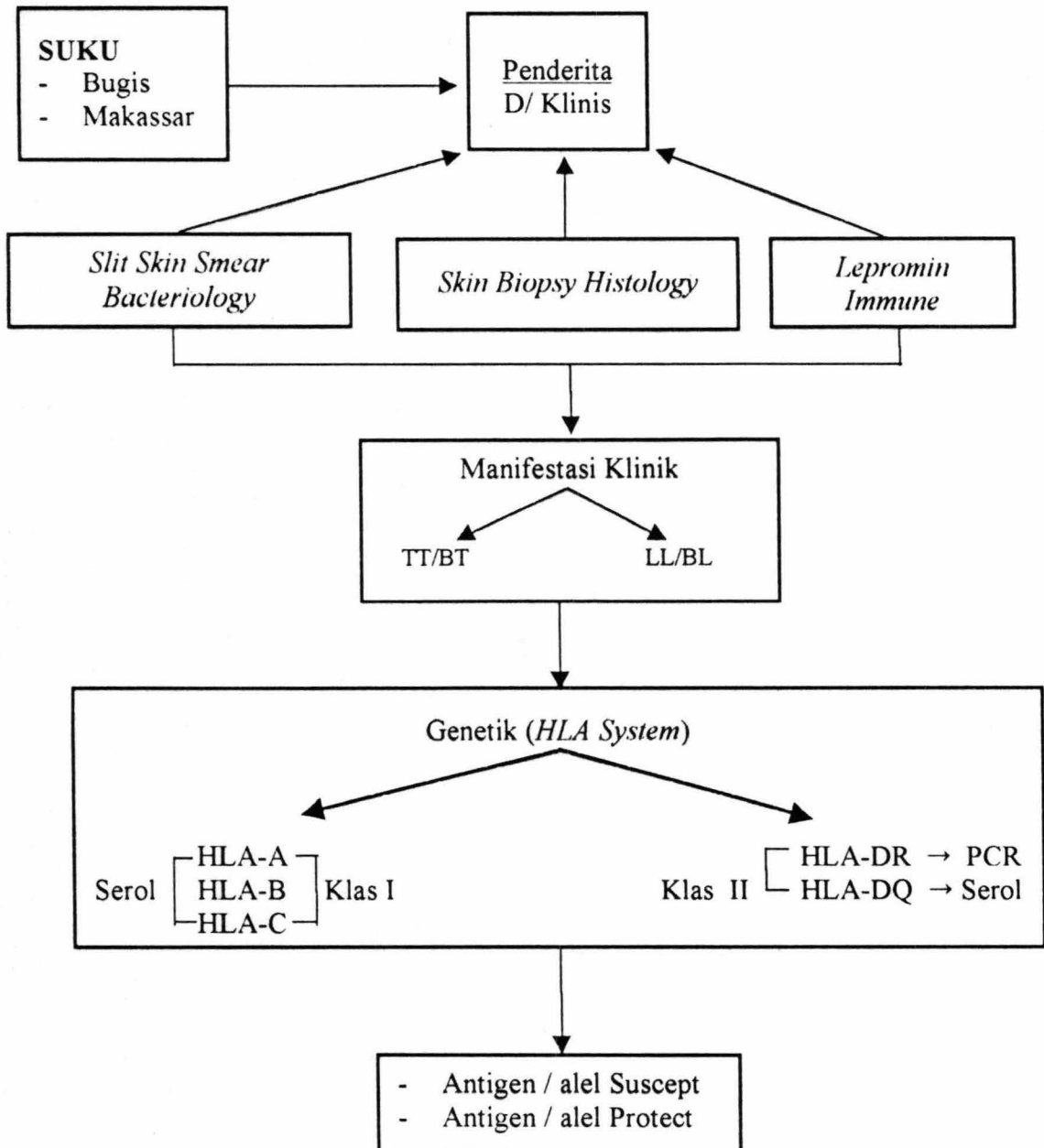
timbulnya manifestasi klinis melalui kerusakan jaringan berbagai organ akibat gangguan respons imun oleh infeksi lepra. Gangguan respons imun tersebut timbul karena adanya interaksi dari berbagai faktor, antara lain, umur, jenis kelamin, infeksi dan lingkungan. Manifestasi klinis lepra dapat berbentuk ringan (tipe TT/BT) dan berat (tipe LL/BL) yang berbeda antara suku yang satu dengan suku lainnya.



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

3.2 Kerangka Operasional

Untuk memudahkan pemahaman terhadap penelitian dapat dilihat pada bagan berikut ini :



Gambar 3.2 Kerangka Operasional Penelitian

3.3 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah :

1. Ada asosiasi antara jenis antigen / gen HLA tertentu dengan penyakit lepra tipe TT pada populasi suku Bugis-Makassar.
2. Ada asosiasi antara jenis antigen / gen HLA tertentu dengan penyakit lepra tipe LL pada populasi suku Bugis-Makassar.
3. Ada perbedaan resiko relatif pada penderita lepra tipe TT dan tipe LL pada populasi suku Bugis-Makassar.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancang Bangun Penelitian

Penelitian ini adalah suatu studi jenis **explorative-observational** yaitu studi asosiasi dengan pendekatan rancangan "**Kasus-Kontrol**" dan berada dalam lingkup penelitian genetik, karena antigen HLA merupakan ekspresi dari gen khromosom nomor 6, sehingga diperlukan pendekatan yang karakteristik berlaku dalam bidang genetik.

Pada penelitian genetik mempunyai suatu asumsi dasar yang perlu dipahami, bahwa resiko sakit yang terletak pada faktor genetik sebenarnya sudah ada atau tercetak sejak **konsepsi** dan terlihat setelah lahir atau beberapa saat setelah lahir (**De Vries, 1979**).

4.2 Populasi Sampel, Besar Sampel dan Kriteria Sampel

4.2.1 Populasi sampel

Populasi yang diteliti adalah penduduk Kotamadya Ujung Pandang (KMUP), Sulawesi Selatan, yaitu daerah dengan insidensi lepra tinggi (7,4/10.000 penduduk, 1994/1995) yang ternyata didiami oleh terbanyak suku Bugis-Makassar. KMUP dipilih sebagai lokasi penelitian sebab mempunyai beberapa kelebihan :

1. Ditemui banyak variasi kasus.
2. Merupakan pusat pelayanan / rujukan medis dan pusat rehabilitasi, terutama bagi wilayah Indonesia Timur.

4.2.2 Lokasi

Cara penemuan kasus lepra yang akan diteliti dikerjakan secara aktif dan pasif dengan melaksanakan kunjungan rumah, kunjungan ke Poliklinik Bagian Penyakit Kulit dan Kelamin RSUP Dr Wahidin Sudirohusodo, RS Kusta Regional-Daya, Balai Pengobatan Kusta - Kalimbu dan perkampungan ex-penderita Kusta - Jongaya. Sedangkan kelompok populasi normal (kontrol) diperoleh dari para donor di PMI Cabang KMUP, Sukarelawan karyawan-karyawati berbagai instansi pemerintah dan swasta, mahasiswa Perguruan Tinggi Negeri dan Swasta serta para siswa Kepolisian RI Batua-Ujung Pandang.

4.2.3 Kriteria Sampel

Kriteria penerimaan sampel (*Inclusion Cirteria*) :

1. Penderita yang didiagnosis secara klinis sesuai dengan tanda, "kardinal" lepra ditunjang dengan pemeriksaan bakteriologis, histopatologis dan imunologis.
2. Wanita atau pria, umur tidak dibatasi.
3. Belum pernah berobat (baru) atau sedang dalam program pengobatan atau yang dinyatakan bebas dari program pengobatan.
4. Berasal dari suku Makassar atau dari suku Bugis.
5. Bersedia secara tertulis mengikuti program penelitian ini sampai selesai (*Informed Consent*). Sebelumnya sampel telah diberi penerangan secukupnya, lalu diminta persetujuannya.

Kriteria Penolakan Sampel (*Exclusion Criteria*) :

1. Ada kesulitan / keraguan dalam pemeriksaan klinis, bakteriologis, histopatologis dan imunologis.
2. Keadaan umum penderita dalam keadaan lemah
3. Ada kesulitan dalam pengambilan darah.
4. Penderita tipe BB sebab status imunologis tidak stabil

Kriteria kelompok populasi sampel normal (sebagai kelompok kontrol) :

1. Subyek serta adalah manusia sehat, tidak menderita lepra dan tidak mempunyai riwayat lepra dalam keluarga.
2. Subyek serta adalah orang Indonesia, berasal dari suku Makassar atau dari suku Bugis.

4.2.4 Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus estimasi proporsi (Browner, 1988 dalam Handono, 1998) dimana akan dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kasus dan kelompok kontrol. Pada penelitian ini ditentukan α sebesar 0,05 dan β sebesar 0,20. Berdasarkan perkiraan bahwa frekuensi HLA tertentu yaitu HLA-DR2 pada kontrol sehat (π_1) sama dengan penelitian sebelumnya yaitu sebesar 30% dan 50% pada kasus lepra (Bothamley, 1989 dalam Soebono, 1996), maka perhitungan jumlah sampel minimal yang diperlukan adalah :

$$n = \frac{[Z_{\alpha}\sqrt{\pi(1-\pi)(1/q_1 + 1/q_2)} + Z_{\beta}\sqrt{\{\pi_1(1-\pi_1)/q_1\} + \{\pi_2(1-\pi_2)/q_2\}}]^2}{(\pi_1 - \pi_2)^2}$$

dimana .

- n = besar sampel total
- α = 0,05 maka $Z_{\alpha} = 1,96$
- β = 0,20 maka $Z_{\beta} = 0,842$
- q = perbandingan dua kelompok sampel
- q_1 = proporsi sampel kontrol adalah 0,5

q_2 = proporsi sampel kasus adalah 0,5

π = $q_1 \cdot \pi_1 + q_2 \cdot \pi_2$

π_1 = HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (= DR2), yang diharapkan pada kontrol sebesar 30%

π_2 = HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (= DR2), yang diharapkan pada kasus lepra sebesar 50%

sehingga didapatkan n total = 162

jumlah kontrol minimal = 81

jumlah kasus lepra minimal = 81

Besarnya sampel didasarkan atas pertimbangan luasnya spesifitas antigen HLA yang ada.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

Dalam menilai hubungan antara antigen / gen HLA klas I dan HLA klas II dengan kerentanan timbulnya penyakit lepra, maka :

1. Variabel tergantung : LEPRA/KLINIS (TT / LL)
2. Variabel bebas : Antigen / gen HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB, HLA-DQ.
3. Variabel penyerta : Suku

4.3.2 Karakteristik Variabel Yang Diteliti

VARIABEL	CARA MENGUKUR	DATA
Variabel tergantung Lepra TT / LL	<ul style="list-style-type: none"> • Klinis • Bakteriologi • Histopatologi • Lepromin 	TT / LL 0 – 6+ TT / LL - - +++
Variabel Bebas Antigen/gen HLA-A Antigen/gen HLA-B Antigen/gen HLA-C Antigen/gen HLA-DQ Allel HLA-DRB	Serologi Serologi Serologi Serologi PCR-SSO	Positif / Negatif Positif / Negatif Positif / Negatif Positif / Negatif Positif / Negatif
Variabel Penyerta Suku	Anamnesis + periksa fisik	Bugis / Makassar

4.3.3 Definisi Operasional Variabel

a. Dasar Diagnosis Lepra

Diagnosis lepra ditegakkan oleh ahli Penyakit Kulit dan Kelamin yang bertugas di poliklinik Bagian Penyakit Kulit dan Kelamin atau ruang rawat inap di rumah sakit tempat penelitian.

Pada pemeriksaan klinis, WHO (1980) menganjurkan penggunaan 4 kriteria untuk mendiagnosis penyakit lepra, sebagai berikut:

1. Ditemukannya lesi kulit yang khas.
2. Adanya gangguan sensasi kulit.
3. Penebalan saran tepi predileksi.
4. BTA positif dari sediaan sayatan kulit.

Diagnosis lepra dapat ditegakkan apabila ditemukan sedikitnya dua dari ketiga kriteria pertama di atas, atau cukup dengan kriteria ke empat saja (Agusni, 1996).

b. Klasifikasi Penyakit Lepra

Klasifikasi didasarkan atas pemeriksaan klinis, bakteriologis, histopatologis dan imunologis (*Lepromin Test*).

Tabel 4.1 Aspek Klinik-Klasifikasi Ridley-Jopling

Observation or test	Type of Leprosy				
	TT	BT	BB	BL	LL
Number of lesions	Single usually	Single or few	Several	Many	Very many
Size of lesions	Variable	Variable	Variable	Variable	Small
Surface of lesions	Very dry, sometimes scaly	Dry	Slightly shiny	Shiny	Shiny
Sensation in lesions (not face)	Absent	Moderately-markedly diminished	Slight-moderately diminished	Slight diminished	Not affected
Hair growth in lesions	Absent	Markedly diminished	Markedly diminished	Slightly diminished	Not affected
AFB in lesions	Nil	Nil or scanty	Moderate numbers	Many	Very many (plus globi)
AFB in Nasal scrapings or in nose	Nil	Nil	Nil	Usually nil	Very many (plus globi)
Lepromin test	Strongly positive (+++)	Weakly positive (+ or ++)	Negative	Negative	Negative

AFB = Acid-fast bacilli; TT = Tuberculoid; BT = Borderline Tuberculoid; BB = Mid-borderline; BL = Borderline lepromatous; LL = Lepromatous

c. **Variabel Bebas : Antigen / Gen HLA Klas I dan HLA Klas II**

HLA klas I yang diteliti adalah HLA-A, HLA-B, HLA-C dan HLA klas II adalah HLA-DR serta HLA-DQ. Penelitian dilakukan secara serologis dengan metode *lymphocytotoxicity*. Hasil pemeriksaannya dinyatakan dengan positif atau negatif, dimana nilainya berdasarkan ketentuan menurut prosedur yang lazim digunakan. Khusus gen HLA-DR (HLA-DRB), keberadaan gen tersebut ditetapkan dengan metoda : *Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide* (PCR-SSO). Hasil pemeriksaan dinyatakan dalam positif atau negatif.

d. **Faktor Penyerta**

Suku bangsa yaitu berdasarkan pernyataan yang bersangkutan dan periksa pandang (fisik), serta dikonfirmasi dengan keluarga terdekatnya.

e. **Pemeriksaan Bacteriologis (BI)**

Untuk menetapkan seseorang dalam klasifikasi type **Pause-Basiler (PB)** : sesuai dengan type TT dan BT pada klasifikasi Ridley-Jopling (1966), atau type **Multibasiler (MB)** : sesuai dengan tipe BB, BL dan LL pada klasifikasi Ridley Jopling (1966), maka penemuan basil tahan asam (BTA) dari sediaan apus irisan kulit merupakan salah satu syarat utama, sesuai program pengobatan MDT (*Multiple Drugs Therapy*) oleh WHO, 1988 (Soebono, 1998).

Tabel 4.2 Sistem Scoring Bacterial Index

Average Number Of Acid-Fast Bacilli	Bacterial Index (BI)
> 1000 / field	6+
100-1000 / field	5+
10-100/field	4+
1-10/field	3+
1-10/10 field	2+
1-10/100 field	1+
0/100 field	0+

The BI for the patient is the average of the BI at the individual sites
(Dharmendra,1985)

f. Pemeriksaan Lepromin (Mitsuda Test)

Test lepromin ini sangat bermanfaat bagi penggolongan / klasifikasi klinis seseorang yang telah didiagnosis lepra. Caranya dengan menyuntikkan basil lepra dengan dosis 0,1 ml intra dermal di daerah volar pada lengan atas persis seperti Tuberculin test. Tersedia 2 macam konsentrasi bacteria yaitu $4,0 \times 10^7$ dan $1,6 \times 10^8$ AFB/ml. Pembacaan hasil test dilakukan menurut Mitsuda type, yaitu pada minggu ke 3 atau ke 4 berupa nodule yang timbul di daerah suntikan. Besarnya nodule lalu diukur dengan penggaris. *Skin test* ini dianggap mewakili kemampuan tubuh membangkitkan respons imun terhadap kuman lepra. Hasil test positif pada tipe Tuberculoid dan negatif pada tipe Lepromatous (Ress and Young, 1994).

Kriteria penilaian *Skin test* secara Mitsuda adalah berdasarkan atas diameter indurasi pada areal reaksi, sebagai berikut :

- Negative (-) : Tidak ada terlihat atau terasa
- Ragu-ragu (\pm) : Sebuah nodule yang berdiameter lebih kecil dari 3 mm
- Positif + : Sebuah nodule dengan diameter 3-5 mm
- Positif ++ : Sebuah nodule dengan diameter 6-10 mm
- Positif +++ : Sebuah nodule dengan diameter lebih besar 10 mm
atau salah satu ukuran diatas yang disertai ulserasi.

g. Pemeriksaan Histopatologis.

Pemeriksaan histopatologis terhadap lesi kulit pada penyakit lepra sangatlah penting artinya (Job, 1994; Kandouw, 1996) untuk :

1. **Diagnosis** : mengklasifikasi penderita ke dalam klasifikasi clinico-pathological spectrum menurut Ridley Jopling (1966).
2. **Pengobatan** : sebagai usaha follow up perjalanan penyakit selama pengobatan.
3. **Kontrol** : utamanya dalam hal terapi uji-coba untuk mendeteksi timbulnya relaps.

Diagnosis histopatologis sesuai standard WHO, 1982 pada lepra yang multibacillair seperti tipe borderline lepramotous leprosy (BL) dan tipe lepramotous leprosy (LL) dengan penemuan BTA tidaklah sulit demikian pula dengan penemuan basil tahan asam (BTA) yang menjadi patokan diagnosis penyakit lepra sesuai Standard WHO, 1982. Tetapi kesulitan yang cukup serius muncul pada kasus lepra paucibacillair seperti tipe Tuberculoid leprosy (TT) dan tipe Borderline Tuberculoid leprosy (BT),

terutama penemuan BTA dalam granuloma, atau di Schwann cells maupun dalam makrofag.

Tabel 4.3 Patokan pemeriksaan histologis sesuai klasifikasi. (WHO, 51,451, 1974).

	TT	BT	BB	BL	LLs	LLp
Epitheloid cell	++	++	++	±/-	-	-
Non-vacuolated giant cells	++/-	+/-	-	-	-	-
Histiocytes/foamy macrophage	-	-	-	++	++	++
Small vesicles	-	-	-	++/-	++/-	++/-
Vacuolated giant cells	-	-	-	-	++/-	±/-
Giant vacuoles	-	-	-	-	+/-	++/-
Lymphocytes	+±/+	+±/±	±	++/++	+/±	±/-
Dermal nerve. maximum diameter (µm)	1000	400	250	200	200	80
Onion-skin perineurium	-	±/-	+/-	++/±	++/-	-
Clear subepidermal zone	±/-	++/-	++	++	++	++
Erosion of epidermis	++/-	±/-	-	-	-	-
Acid-fast bacilli in granuloma (BI)	0/1	0/2½	3/4½	4/5½	5/6½	5½/6½
Acid-fast bacilli in nose	-	-	-	±	++	++
Lepromin (Mitsuda) reaction	3+	2/1+	-	-	-	-
Lymphocyte transformation test (% transformation)	15	6.0	2.8	0.9	0.6	0.4
Leucocyte migration index	0.76	0.83	0.88	0.92	0.92	0.95
Histological index. fall in 6 months (%)	...	100	78	23	14	5.5
Immunological stability	++	±	-	±	+	++
Borderline reactions	-	+	++	+	±	-
Erythema nodosum leprosum	-	-	-	±	++	++
Protection by BCG (7)	-	+	-	-	-	-
Approximate distribution of case (%)	9	24	8	10	31	18

Dalam mengantisipasi kesulitan-kesulitan yang akan terjadi, maka seluruh sampel penelitian lepra khususnya tipe TT dan BT telah dilakukan pewarnaan khusus yaitu **LAM-B (Lipoarabinomannan-B)**, salah satu jenis pewarnaan imunohistokimia terbaru yang telah teruji tingkat sensitivitas maupun spesifitasnya (Kandouw, 1997). Proses pewarnaan khusus ini dilakukan di **Divisi Patologi pada National Institute for**

Leprosy Research, Tokyo, Japan. Prosedur kerja metode **LAM-B** dapat dilihat pada lampiran 5. Sebagai standard diagnosa histopatologis tetap digunakan pewarnaan **Haematoxyllin Eosin (H & E)** serta ditunjang dengan pewarnaan **Fite Farraco (FF)** untuk menemukan BTA pada semua sampel biopsi lesi kulit penderita lepra. Hasilnya dapat dilihat pada lampiran 6A dan 6B.

4.3.4 Cara Pengolahan Data

Dalam menentukan asosiasi HLA dan lepra dilakukan analisis frekuensi antigen HLA dalam populasi (*Population Study*) yang bertujuan untuk mengetahui besarnya penampilan / ekspresi masing-masing spesifitas antigen HLA dalam populasi yang akan diteliti. Frekuensi antigen HLA (frekuensi fenotipe) dihitung dengan cara jumlah antigen HLA tertentu yang tampil dibagi jumlah keseluruhan sampel populasi normal (subyek serta).

Sedangkan frekuensi gen HLA (frekuensi genotip) dapat dihitung dengan cara menurut rumus dari **Matiuz (Matiuz, 1970)**.

$$g = 1 - \sqrt{1-f}$$

g : Frekuensi gen

f : Frekuensi antigen

Penilaian terhadap besarnya peluang adanya asosiasi antara suatu penyakit dengan antigen HLA tertentu dinyatakan dalam nilai **resiko relatif (*relative risk - RR*)**, yaitu suatu nilai yang menyatakan peluang seseorang yang memiliki antigen

HLA tertentu untuk mengindap suatu penyakit, dibandingkan dengan orang lain yang tidak memiliki antigen tersebut.

Untuk menghitung **RR** dan **tes kemaknaan** tersebut dapat menggunakan **tabel asosiasi 2 x 2** sebagai berikut (Albert dalam Tiwari dan Terasaki, 1985):

Bagan perhitungan tabel asosiasi 2x2

		Antigen HLA		
		Positif	Negatif	Total
Penyakit Lepra	Positif	a	b	C
	Negatif	c	d	D
	Total	A	B	N

Rumus Khi Kwadrat Kontingensi (Chi Square Test) :

$$X^2 = \frac{(ad-bc)^2 \times N}{A \times B \times C \times D} \quad (df = 1)$$

Rumus perhitungan Relative Risk (resiko relatif = odds ratio / OR) adalah sebagai berikut :

$$RR / OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Keterangan :

- a : frekuensi jumlah Penderita yang memiliki antigen HLA tertentu.
- d : frekuensi jumlah Penderita yang tidak memiliki antigen HLA tersebut.
- b : frekuensi jumlah kontrol yang tidak memiliki antigen HLA tertentu.
- c : frekuensi jumlah kontrol yang memiliki antigen HLA tersebut.

Catatan :

OR > 1 → rentan

OR < 1 → protektif

Untuk menganalisa hasil pada kotak kosong / bernilai nol, maka ditambahkan angka 0,5 pada setiap kotak yang ada. Rumus ini dikenal sebagai **modifikasi Haldane (Tiwari dan Terasaki, 1985)**.

Tingkat kemaknaan yang digunakan pada penelitian ini adalah $\alpha = 0,05$, karena cara-cara pemeriksaan pada penelitian ini mempunyai akurasi yang tinggi.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi metode konvensional serologis dan metode mutahir biologi molekuler, berupa analisa DNA dengan teknik PCR = Polymerase Chain Reaction, Sequence specific Oligonucleotide (PCR-SSO) reverse dot blot resolusi rendah.

4.4 Cara Pemeriksaan Laboratorium

4.4.1 Bahan pemeriksaan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah penuh (*whole blood*) dari penderita serta dan populasi normal yang sehat. Sampel penelitian ini diolah pada hari pengambilan, tidak pernah disimpan. Ini dimaksudkan untuk mengurangi kemungkinan terjadinya kerusakan limfosit akibat penyimpanan, terutama limfosit B yang relatif lebih labil daripada limfosit T, sehingga dapat menyukarkan penilaian hasil pembacaan. Hal ini sesuai dengan yang tertera pada HLA Typing Manual dari UCLA, USA.

Bagi mereka yang didiagnosis sebagai penderita lepra yang berasal dari RSWS dan Jongaya diambil sediaan apus irisan kulit lalu dikirim ke bagian ilmu penyakit dan kelamin RSWS. Bagi penderita yang berasal dari BP Kusta-Kalimbu dan perkampungan kusta Jongaya, sampel akan tetap diperiksa ditempat yang sama,

demikian pula bila sampel berasal dari RS Kusta Regional-Daya. Pemeriksaan sediaan apus irisan kulit bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya bakteri tahan asam (BTA). Di samping itu diambil pula irisan jaringan kulit (biopsi kulit), yang selanjutnya spesimen ini disatukan pemeriksaannya di bagian Patologi Anatomi RSWS untuk memperoleh hasil histopatologinya. Pemeriksaan ini bertujuan untuk diagnosa pasti lepra sekaligus klasifikasinya. Selain itu terhadap penderita dilakukan test lepromin, yang bertujuan untuk mengetahui respons imun terhadap *Mycobacterium leprae*. Adapun jumlah darah yang diambil dari tiap individu sebanyak 30 ml, yang dipisahkan dalam 3 tabung yang telah mengandung antikoagulan heparin dengan perbandingan 9 : 1 (darah heparin). Tujuan akhirnya agar bisa diperoleh total sel limfosit B yang sesuai standard untuk menentukan antigen HLA.

Penelitian serologi HLA-typing dilaksanakan di laboratorium **Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Ujung Pandang**, bekerja sama dengan bagian **Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung**, sebagian sampel penelitian serologi lainnya dilakukan di **St Marianna University, Yokohama, Japan**. Sedangkan penelitian Biologi - Molekuler (PCR) dilakukan di laboratorium **Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang**. Untuk mendeteksi adanya BTA (hasil tahan asam) pada kasus sulit (lepra type TT/BT), dilaksanakan di **National Institute for Leprosy Research, Tokyo, Japan** yaitu dengan membawa balok parafin biopsi kulit dan dilakukan pewarnaan khusus secara imunohistokimia, yaitu LAM-B.

Antisera HLA diperoleh dari **Academisch Ziekenhuis, Leiden, The Netherlands** dan **St Marianna University, Yokohama, Japan**. Sedangkan untuk

pewarnaan khusus berupa *immunostaining set* diberikan oleh **National Institute for leprosy Research, Tokyo, Japan.**

4.4.2 Cara Pemeriksaan antigen HLA

a. Metode Serologi

Penentuan antigen HLA dikerjakan dengan cara *Microlymphocytotoxicity test* dengan memakai Oriental Terasaki's Trays dari UCLA, USA sesuai standard prosedur yang ditetapkan oleh National Institut of Health (NIH).

Adapun prosedur kerjanya meliputi tahap-tahap sebagai berikut :

a) Isolasi Limfosit

Pemisahan dan isolasi limfosit dikerjakan dengan perantaraan **Ficoll-Hypaque** (*lymphocyte separation medium, specific gravity, 1,077-1,080* pada suhu kamar), sebagai berikut :

Pusingkan 30 ml darah-heparin (bebas phenol) dalam 3 tabung berbeda pada kecepatan 600 g selama 10 menit. Pisahkan lapisan sel darah putih (*buffy coat*) yang berbentuk cincin putih abu-abu diantara ke 2 cairan menggunakan pipet Pasteur ke tabung yang lain untuk dicuci dengan larutan **Hanks**. Campurkan secara merata dan tuangkan dengan pipet Pasteur secara melingkar ke dalam tabung yang masing-masing berisikan 5 ml larutan **Ficoll-Hypaque**. Memindahkan sel pada perbatasan (*interface*) ke dalam tabung **Fisher** dan dipusingkan pada kecepatan tinggi 3000 selama 2 menit.

Supernatan dipisahkan dan ditambahkan larutan **Hanks balanced salt solution (HBSS)** dengan perbandingan volume yang sama. Pusingkan lagi pada kecepatan 1000 g selama 1 menit untuk memisahkan trombosit. Supernatan yang mengandung sel trombosit dipisahkan dan ditambahkan larutan hanks, serta satu tetes thrombin (100 IU/ml, ortho-731200), lalu dicampurkan secara merata. Tabung dipusingkan selama 2 menit sampai terbentuk gumpalan trombosit. Tabung dipusingkan kembali pada kecepatan 1000 g selama 3 menit untuk mengendapkan gumpalan trombosit. Supernatan yang mengandung limfosit dipisahkan kedalam tabung **Fisher**, dan dipusingkan lagi pada kecepatan 1000 g selama 1 menit. Supernatan dipisahkan dan limfosit dicuci 2 x dengan media **RPMI-1640 (GIBCO 04102400 H)** pada kecepatan 1000 g selama 1 menit. Resuspensikan dalam medium **RPMI-1640** dan **5% Fetal Calf Serum (FCS, GIBCO 01306290 H)**. Teteskan suspensi tersebut sebanyak 1 μ l pada kamar hitung leukosit (**Improved Neubauer Cell Counting Chamber**) di bawah mikroskop standard untuk dihitung jumlah limfositnya.

Cara Perhitungan

Hitung jumlah sel dalam 1 kotak yang berukuran 1 mm^2 ($1/10 \text{ mm}^3$) dibagi 50. Jawaban ini setara dengan jumlah sel dalam 1 ml suspensi $\times 10^6$.

Diusahakan agar konsentrasi limfosit (total limfosit T + B) adalah sebesar $1,0 - 2,0 \times 10^6/\text{ml}$ sesuai ketentuan yang berlaku untuk *cytotoxicity test*. Sel suspensi tersebut selanjutnya dibagi dua bagian. Bagian pertama dilanjutkan untuk penentuan antigen HLA, sedangkan bagian kedua, limfosit total ini disimpan dulu pada suhu 4°C (lemari es) selama 1 jam, lalu pindahkan ke freezer, suhu -70°C selama semalam, kemudian keesokan harinya dibekukan / ditidurkan di dalam tanki Nitrogen Cair (*Nitrogen Liquid tank*) dengan suhu $\pm -157^\circ - -180^\circ\text{C}$. Limfosit yang akan dibekukan harus disimpan khusus dalam cryotubes (NUNC 3-68632). Sebelumnya dicampur dengan *freezing mixture* yang terdiri atas : 20% DMSO + 25% FCS + 55% RPMI 1640. Selama proses berlangsung di atas pecahan es batu. Tulis lengkap pada cryotubes identifikasi sampel, tanggal dan jumlah limfosit.

Maksud pembekuan sel ini ialah agar tetap tersedia cadangan limfosit total untuk mengatasi berbagai hal yang terburuk selama penelitian ini berlangsung (pengulangan bisa dilakukan).

Untuk pemeriksaan HLA-A, -B, -C (HLA klas I) digunakan limfosit T dan B, sedangkan untuk pemeriksaan HLA klas II, yaitu HLA,DR dan -DQ hanya menggunakan limfosit B. Untuk mendapatkan limfosit B dilakukan dengan cara memisahkan limfosit T dari limfosit B dengan menggunakan teknik / cara **Nylon wool**. Teknik ini lebih

menguntungkan karena relatif simple, agak cepat dan tidak memerlukan peralatan dan reagens yang spesial (Miller dan Rodey, 1981).

b) Cara kerja Pemisahan limfosit T dan limfosit B

Limfosit B dipisahkan dari limfosit hasil isolasi dengan perantara **Nylon Wool** (Fenwal-Leukopack, Fenwal Division, Baxter-Travenol Laboratories, Deerfield, IL 60015) dan tehnik sedotan (**straw**).

Disiapkan dulu sedotan plastik sepanjang sekitar 12 - 14 cm, salah satu ujung sedotan disegel (seal) dengan sebuah jepitan panas dengan sudut 60°. Lalu masukkan kira-kira 0,1 gr Nylon Wool kedalam sedotan, di mana media RPMI yang dicampur dengan 5% FCS. Wool tidak perlu terlalu padat, mengisi sedotan sepanjang 6 cm. Simpan sedotan dalam lemari es 4°C sampai akan digunakan dalam posisi horizontal agar dapat menahan medium keluar. bila sudah akan digunakan, dengan cepat panaskan sedotan di dalam incubator, suhu 37°C selama 30 menit, letakkan sedotan secara vertikal dalam suatu beakar glass lalu tambahkan 5 ml media RPMI-5 FCS yang hangat, lalu pijat sedotan perlahan. Setelah memotong ujung sedotan yang disegel tadi, kini didapat sel T yang non-adherent. Ulangi penambahan 15 ml media RPMI-5% FCS hangat, lalu pijat sedotan perlahan ke dalam tabung steril yang lain, hindari gelembung udara di dalam wool. Letakkan tetes terakhir pada haemo-cytometer Neubauer dan hitung. Untuk mendapatkan sel B yang melekat pada

wool, maka tambahkan 1,5 ml medium RPMI-5% FCS hangat, lalu pijat sedotan sekuat-kuatnya ke dalam tabung steril lain. Ulangi langkah ini dengan cara tersebut di atas sampai dengan total volume 5 ml media. Pusingkan sel B dalam tube tadi selama 5 menit pada 600 g. Lalu resus-pensi sel ke dalam 0,5 ml medium. Hitung sel dengan haemocytometer Neubaueur. Relative rasio antara sel non-adherent (sel T) dan sel adherent (Sel B) adalah 5 : 1,5 - 2. Bila rasio rendah berarti ada kontaminasi pada populasi sel yang adherent (sel B) dengan sel non-adherent (sel T).

Sel Target

1. Viability - Kelangsungan hidup sel harus sekitar 90% (ditentukan oleh pengeluaran zat warna).
2. Purity - Kebersihan sel harus bebas dari RBC, Platelets, granulocytes, dan monocyte. Sel B harus bersih minimal 85%.
3. Tidak boleh ada kontaminasi baik dengan bakteri ataupun jamur.

c) Penentuan Antigen HLA

Antigen HLA klas I (HLA-A, -B, dan -C) maupun antigen HLA klas II (HLA-DR dan -DQ) ditentukan dengan metode **Complement Dependent Microcytotoxic technique**.

1. Penentuan antigen HLA Klas I (HLA-A, -B, dan -C).

Prinsip dasar pemeriksaan : limfosit hidup diinkubasikan dengan antigen spesifik yang telah diketahui dengan antisera spesifik yang telah diketahui spesifitasnya, kemudian ditambahkan komplemen segar.

Bila antigen HLA-A, -B, dan -C yang sesuai dengan antisera yang spesifik tersebut di atas, maka limfosit akan mengadakan ikatan dengan antisera dan diikuti dengan aktivasi komplemen, sehingga menimbulkan kematian limfosit yang bersangkutan dan akan tampak di bawah inverted phase microscope berbeda dengan limfosit yang masih hidup, yaitu limfosit yang mati akan tampak membengkak dan berwarna kehitam-hitaman.

Cara Kerja

Seperseribu ml suspensi limfosit T yang telah dipisahkan tadi (konsentrasi sel $1,3-2,0 \times 10^6/\text{ml}$) ditambahkan pada tiap sumur Oriental Terasaki's Tray yang telah mengandung 0,001 ml antisera spesifik yang telah diketahui. Inkubasi selama 30 menit pada suhu $20^\circ-25^\circ\text{C}$. Ditambahkan 0,005 ml komplemen kelinci (Rabbit Complement) segar. Inkubasi lagi selama 1 jam pada suhu $20-25^\circ\text{C}$. Tambahkan bahan larutan cat Eosin 5% dalam aquadest sebanyak 2 μl . Hal ini untuk dapat membedakan sel yang beraksi positif dan negatif. Ditunggu sekitar 3-5 menit agar

sel yang lisis / mati dapat menyerap zat warna tersebut. Untuk menghentikan reaksi maka ditambahkan 0,005 ml Formaldehide 40% dengan pH 7,0 -7,3. Tutup tray dengan gelas penutup tray, dan tutup tepi gelas penutup tray dengan petrolatum cair untuk mencegah terjadinya penguapan. Letakkan tray pada suhu kamar sekitar 1 jam agar semua limfosit mengendap, baru kemudian dibaca di bawah inverted phase microscope. Namun dapat pula ditunda pada keesokan harinya, asalkan tray disimpan dalam lemari es, suhu 4°C.

2. Penentuan Antigen HLA klas II (HLA-DR dan HLA-DQ)

Prinsip dasar pemeriksaan : **Complement-Dependent Microcytotoxic Technique**, sama seperti pada penentuan antigen HLA-A, -B dan -C.

Cara Kerja

Beri tanda dengan spidol identifikasi subyek penelitian (nama dan jumlah sel) pada tutup dan sisi tray agar memudahkan pekerjaan selanjutnya. Cuci Hamilton Terasaki dispenser 50 µl, 10 x dengan aquadest sebelum dipakai. Isi Semprit Hamilton dengan suspensi limfosit B yang telah dipisahkan tadi (Konsentrasi $1-2 \times 10^6$ 6/ml), lalu dispense (keluarkan) 1 µl (\pm 2000 sel) dari suspensi sel tersebut secara teliti ke dalam tiap sumur Terasaki tray yang mengandung 0,001 ml (1 µl) antisera

spesifik yang telah diketahui. Campur hati-hati tanpa menyentuh dasar tray. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar (22 - 25°). Lalu tambahkan 0,005 ml (5 µl) komplemen kelinci segar (Rabbit Complement) dengan 250 µl Semprit Hamilton-Terasaki ke dalam setiap sumur dan campur hati-hati. Inkubasi lagi selama 1 jam pada suhu kamar. Tambahkan 5 µl larutan Eosin 5% dalam aquadest, ke dalam setiap sumur dengan 250 µl Semprit Hamilton Terasaki.

Setelah ditunggu sekitar 3 - 5 menit, tambahkan 5 µl Formaldehyde 40%, pH 7,0-7,3 kedalam setiap sumur tray. Lalu campur hati-hati dengan Semprit Hamilton Terasaki, jangan sampai menyentuh dasar tray. Inkubasi tray selama 1 jam pada suhu kamar, agar diharapkan seluruh sel sudah mengendap. Sekarang tray siap dibaca dibawah inverted phase mikroskop.

3. Cara Pembacaan / Penilaian Hasil Test

Pembacaan hasil pemeriksaan antigen HLA-A, -B, -C dan HLA-DR, -DQ dapat menggunakan mikroskop inverted binokuler, phase kontras. Penilaian hasil menggunakan pedoman sebagai berikut, reaksi itu positif bila ditandai dengan limfosit yang membengkak, dindingnya keriput, berwarna gelap kehitaman, karena sel tersebut mengalami lisis / mati karena dinding selnya rusak, dan menyerap warna Eosin. Reaksi negatif bila limfosit

tersebut tampak masih mengkilat, licin serta dindingnya masih utuh, sehingga tidak dapat menyerap warna Eosin.

Nilai tertinggi dimana semua sel mati, diberi nilai positif 8, sedangkan terendah dimana hanya 0 - 10% sel yang mati, diberi nilai 1 (satu) dan diantaranya berturut-turut 6, 4 dan 2.

% sel mati	Nilai
81 - 100	8
31 - 80	6
21 - 30	4
11 - 20	2
0 - 10	1

Catatan : Nilai 6 dan 8 dikelompokkan sebagai nilai positif, sedangkan nilai 1 dan 2 sebagai nilai negatif. Nilai pemeriksaan antigen HLA yang diperoleh selanjutnya dimasukkan ke dalam tabel khusus (lihat lampiran), sehingga tipe antigen HLA-A, -B, -C dan HLA-DR maupun -DQ dapat ditentukan.

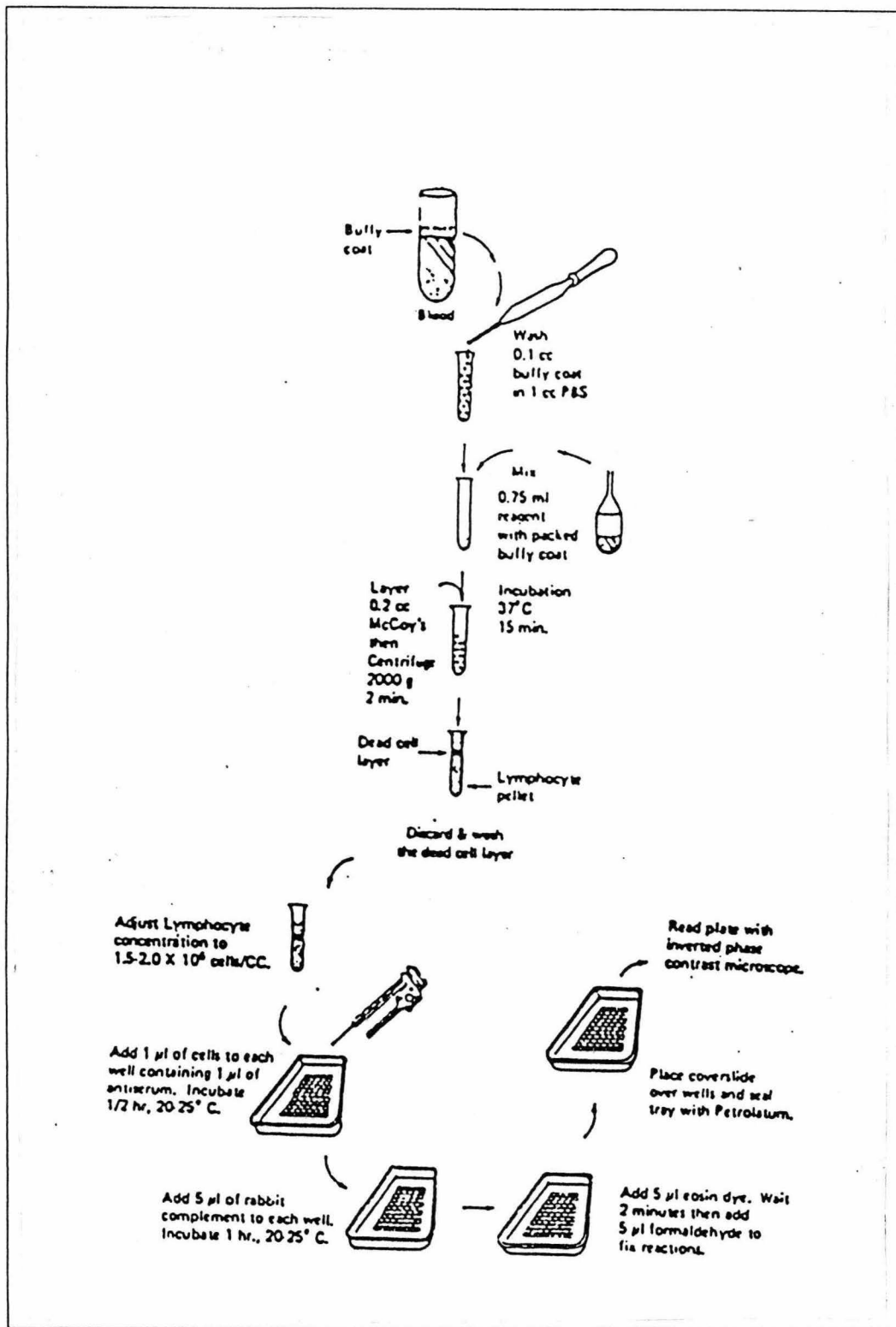
Cara kalkulasi presentase Viability sel suspensi :

$$100 - \frac{\text{Jumlah sel mati} \times 100}{\text{Jumlah sel hidup} + \text{jumlah sel mati}}$$

4. Pemantapan Mutu

Pemantapan mutu pemeriksaan laboratorium pada penentuan antigen HLA dilakukan dengan menggunakan :

1. Serum kontrol positif dan negatif yang telah tersedia pada Terasaki's tray yang digunakan. Sehingga memudahkan pembacaan dan menghilangkan keraguan.
2. Darah individu yang pernah ditentukan antigen HLA klas I dan II di Reference Laboratory.



Gambar 4.1 Pelaksanaan Teknis Penentuan Antigen HLA Cara Mikrolimfositotoksitas (Tiwari & Terasaki, 1985)

5. Sumber-Sumber Kesalahan

Reaksi **false positif** disebabkan oleh :

- Viability limfosit yang buruk.
- Kontaminasi dengan antisera positif (*carry over*).
- Anti species antibody yang kuat didalam rabbit complement.
- Over inkubasi.
- Pengenceran anti serum yang tidak tepat.
- Temperatur inkubasi terlalu tinggi.
- Problem preparasi reagens, seperti PH, isotonisitas, kontaminasi bakteri / jamur.
- Kontaminasi berat oleh granulosit (granulosit biasanya dibunuh oleh rabbit complement, tetapi dapat dibedakan dari limfosit).
- Sensitivitas test yang meningkat akibat kerusakan limfosit (bisa timbul bila menggunakan frozen cells).
- Kehilangan zat fixative.

Reaksi **false negatif** disebabkan oleh :

- Kontaminasi yang berlebihan dari platelet atau granulosit (sel bersaing dengan limfosit terhadap antibodi).
- Temperatur inkubasi terlalu rendah.
- Waktu inkubasi terlalu pendek.
- Kehilangan antiserum atau complement dalam test.

- Pencampuran sel dengan antiserum atau dengan complement yang tidak sempurna (bila terlalu banyak minyak dalam sumuran dapat menimbulkan hal ini).
- Keburukan antiserum (inaktif antibodi atau anti complementarity dan kontaminasi bakteri).
- PH antisera yang rendah disebabkan oleh CO₂ dari dry-ice selama transportasi.
- Konsentrasi sel target yang berlebihan (mengurangi sensitivity test).
- Efek pengobatan penderita.
- Kontaminasi yang tinggi dari sel T terhadap sel B untuk typing HLA-DR dan HLA-DQ.

b. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Merupakan suatu teknik molekuler terbaru bagi tissue typing (penetapan jenis antigen) untuk typing HLA klas I dan II. Teknik DNA Typing ini mampu memberikan informasi yang lebih banyak tentang variasi genetik.

Keuntungan-keuntungan PCR : **(Dyer dan Middleton, 1993)**

1. Viability sel, tipe sel atau ekspresi sel permukaan tidak terlalu penting.
2. DNA proses dapat diperbaharui, bilamana akan melanjutkan screening terhadap antisera dengan serotyping.
3. Dapat mempertegas / memperjelas homozygosity.

4. Sampel DNA dapat dengan mudah ditransportasikan dari satu lokasi ke lokasi yang lain.
5. Dapat mengurangi keterlibatan subyektifitas dalam menginterpretasikan data.

a) **Ekstraksi DNA**

Digunakan metode “**salting-out**”, yaitu dengan menggunakan “phenol” sebagai organic deproteinizer. Metode ini mempunyai beberapa keunggulan dibanding metode lainnya (misalnya : Chelex - DNA extraction), yaitu :

- DNA yang dihasilkan lebih murni, homogenous dan tidak mengalami degradasi serta volume bisa lebih banyak.
- Bila diresuspensi di dalam larutan buffer maka DNA dapat disimpan pada suhu 4°C untuk pemakaian harian dan dapat pula disimpan pada suhu -80°C untuk penggunaan waktu lama.
- Prosesnya lebih cepat dan ekonomis.

b) **Gen HLA Klas II**

Gen HLA klas II meliputi HLA-DRB, -DQA, -DQB dan -DPB adalah gen yang terletak pada lengan kromosom 6 yang menjadi molekul HLA Klas II rantai α dan β . Keberadaan gen tersebut ditetapkan dengan menggunakan metode **Polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotide (PCR SSO) reverse dot blot**. Hasil pemeriksaan dinyatakan dalam positif atau negatif.

c) **Pemeriksaan Gen HLA-DRB**

Dalam penelitian ini pemeriksaan gen HLA Klas II hanya dilakukan terhadap gen HLA-DRB, dengan alasan :

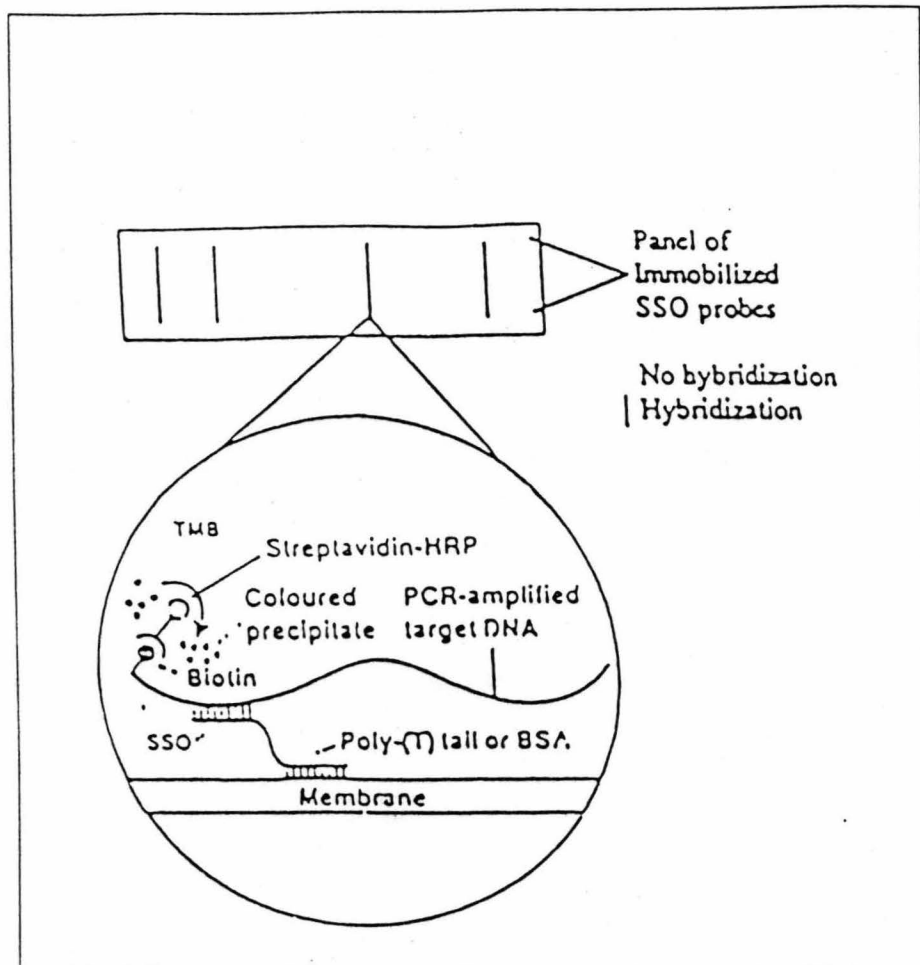
1. Hasil pemeriksaan antigen HLA-DR secara serologi terdahulu, 41,60% untuk kelompok kontrol tidak bisa terlacak (Tabel 5.5).
2. Dari hasil penelitian-penelitian sebelumnya ternyata gen HLA-DRB memainkan peranan penting dalam perkembangan klinis type penyakit lepra.

Pemeriksaan gen HLA-DRB resolusi rendah dilakukan dengan metode **PCR - SSO reverse dot blot** dengan menggunakan **Kit AMPLICOR (ROCHE)**. Pemicu dan pelacak SSO yang digunakan, disintesa di **Academisch Ziekenhuis Leiden, AZL, Laboratorium Immunohematologi**.

Prinsip pemeriksaan gen HLA-DRB resolusi rendah dengan metode PCR - SSO reverse dot blot.

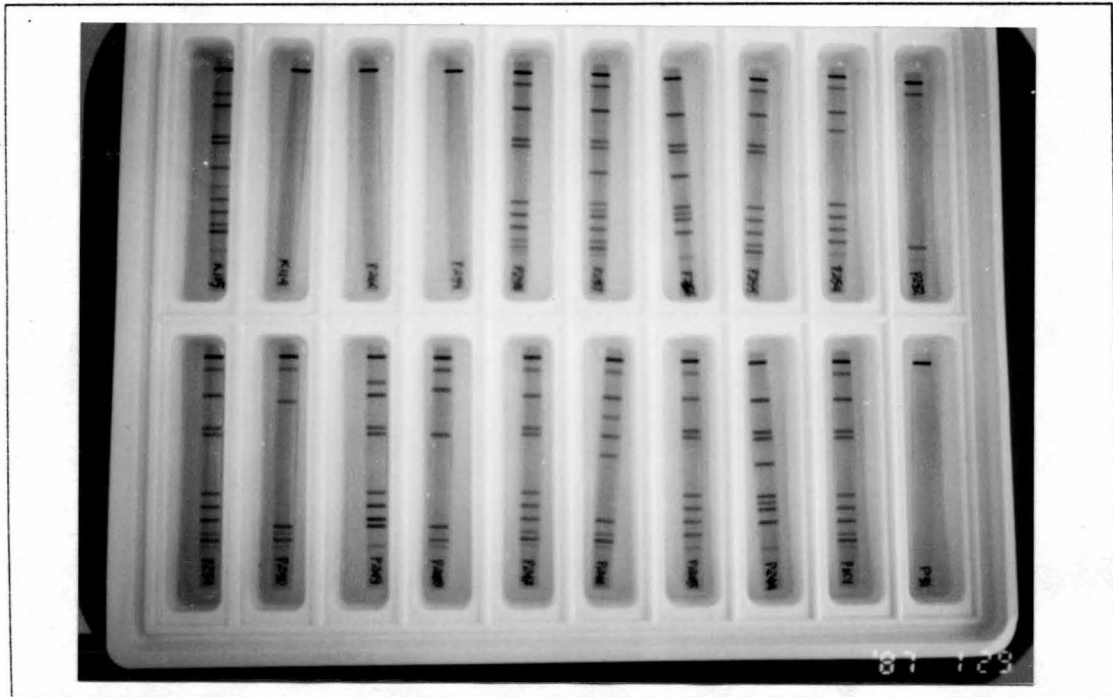
Metode **PCR - SSO reverse dot blot** didasarkan pada 3 proses utama yaitu amplikasi urutan sasaran dengan PCR, hibridisasi produk amplifikasi dengan pelacak oligonucleotida urutan spesifik yang dilekatkan pada membran nilon dan deteksi pelacak yang terikat dengan reaksi pembentukan warna. Pada reaksi amplifikasi, sepasang pemicu yang telah ditandai biotin akan melekat pada regio sasaran dan selanjutnya oleh enzim polimerase akan diperpanjang dari arah 5'

ke arah 3' dengan memanfaatkan kelebihan deoksi nukleosida trifosfat (dNTPs) yang terdapat dalam campuran reaksi. Hasil amplifikasi akan berbentuk urutan komplementer DNA yang tertanda biotin yang disebut **Amplikon**. Sejumlah pelacak oligonukleotide urutan spesifik dilekatkan pada membran nilon untuk mengikat amplikon tertentu. Sistem deteksi pada pemeriksaan ini adalah menggunakan konjugat streptavidin horse radish peroxidase (SA-HRP) yang akan melekat pada ampikon yang terikat pada membran. substrat yang digunakan untuk pembentukan warna adalah hydrogen peroxida (H_2O_2) dan trimethyl benzidine (TMB). Pola pita (bands) dengan warna biru yang berbentuk dibandingkan dengan acuan (template) untuk mengidentifikasi jenis allel pada specimen test.



Gambar 4.2 Prinsip Pemeriksaan gen HLA-DRB dengan metode PCR-SSO Reverse dot blot

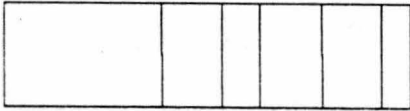
Proses pencairan dan cara isolasi DNA dilampirkan dalam lampiran 1, lampiran 2 dan lampiran 3, sedangkan pemeriksaan gen HLA Klas II (HLA-DRB) resolusi rendah dilampirkan dalam lampiran 4.



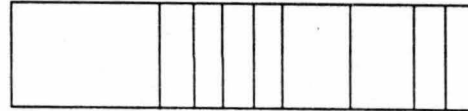
Gambar 4.3 Hasil HLA–DRB typing dengan tehnik “PCR reverse dot blot (resolusi rendah)”

Gambar 4.3 Foto hasil pemeriksaan gen HLA–DRB resolusi rendah dengan menggunakan tehnik PCR-SSO reverse dot blot dari sebagian sampel penelitian, berupa membran nilon yang diletakkan pada suatu nampan dengan cekungan. Garis-garis (pita) pada membran menunjukkan adanya hibridasi yang posisi dengan pelacak tertentu. Selanjutnya setiap membran dibandingkan dengan acuan untuk menetapkan adanya kesesuaian posisi pita. Hal ini akan menjadi dasar untuk menetapkan alel HLA-DRB pada sampel yang diteliti.

Beberapa contoh :

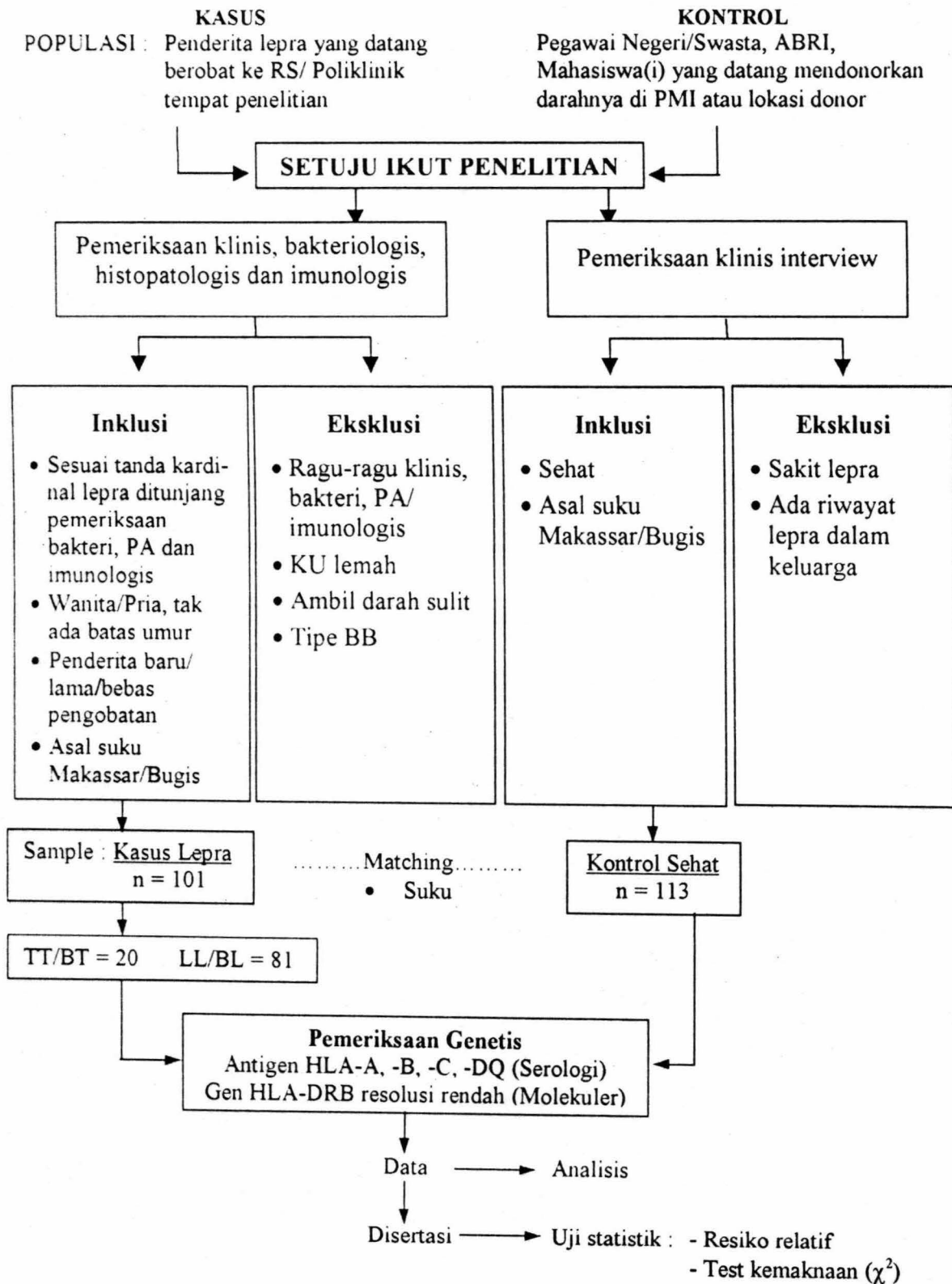


HLA-DRB₁ 1201-1203
HLA-DRB₃ 0301



HLA-DRB₁ 1501-1504, 1601-1603
1605-1606
HLA-DRB₅ 0102, 0201-0203
HLA-DRB₁ 1201-1203
HLA-DRB₃ 0301

4.5 Protokol Penelitian



Gambar 4.4 Protokol Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik Sampel Kasus dan Kontrol Yang Diteliti

Penelitian yang dilakukan selama kurang lebih dua tahun di bagian penyakit kulit dan kelamin RSUP Dr Wahidin Sudirohusudo, RS Kusta - Daya, Balai Pengobatan Penyakit Kulit - Kalimbu, Puskesmas di ex-perkampungan penderita Kusta - Jongaya dan Unit Transfusi Darah Palang Merah Indonesia, Cabang Ujung Pandang, telah berhasil dikumpulkan 214 sampel.

Dari seluruh 214 sampel tersebut yang dapat dianalisis dalam penelitian ini adalah 101 kasus dan 113 kontrol (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Analisis Perbedaan antara Kelompok Kasus dan Kontrol berdasarkan Jenis Kelamin, Umur dan Suku.

KARAKTERISTIK	KASUS n = 101	KONTROL n = 113	P
JENIS KELAMIN			
Perempuan	33 (82,50%)	7 (17,50%)	0,001
Laki-laki	68 (39,10%)	106 (60,90%)	
UMUR			
10 – 20 tahun	13 (28,26%)	33 (71,74%)	0,001
21 – 30 tahun	34 (41,98%)	47 (58,02%)	
31 – 40 tahun	27 (52,94%)	24 (47,06%)	
41 – 50 tahun	19 (79,17%)	5 (20,83%)	
51 – 60 tahun	8 (66,67%)	4 (33,33%)	
Rerata tahun	34,53 ± 12,16	26,93 ± 8,80	
SUKU			
Bugis	65 (46,80%)	74 (53,20%)	0,862
Makassar	36 (48,0%)	39 (52,0%)	

P < 0,05 = Bermakna

Terdapat perbedaan umur, jenis kelamin, dan suku antara kelompok kasus dan kelompok kontrol yang diteliti.

5.1.1 Distribusi Umur

Dari penderita serta tersebut (101 orang) tercatat usia termuda 10 tahun dan tertua 60 tahun. Frekuensi tertinggi didapatkan pada usia 41-50 tahun sebanyak 79,17 (Tabel 5.1).

5.1.2 Jenis Kelamin

Penderita serta laki-laki lebih banyak daripada wanita dengan perbandingan 2 : 1 (Tabel 5.1).

5.1.3 Suku

Suku Bugis ternyata hampir sama banyaknya dengan suku Makassar, yaitu 46,80% berbanding 48,0% (Tabel 5.1).

5.2 Frekuensi Antigen / Gen HLA pada Populasi

Frekuensi antigen HLA pada populasi dilakukan pada kelompok suku Bugis-Makassar untuk mendapatkan karakteristik pola antigen/gen HLA.

Pengukuran frekuensi berdasarkan jumlah tiap antigen HLA tertentu yang tampil dalam populasi tersebut.

Setelah frekuensi antigen HLA dianalisis, maka frekuensi gen dapat dihitung dengan menggunakan rumus Matiuz (Matiuz, 1970).

Dengan mengetahui frekuensi gen dalam populasi normal yang diteliti, maka akan mudah menghitung gen blank pada populasi tersebut.

Cara pengukuran frekuensi antigen blank, yaitu seratus prosen dikurangi jumlah seluruh frekuensi gen induk yang tampil / ada dalam populasi yang diteliti.

Antigen / gen "ABL" adalah antigen / gen HLA-A yang masih belum dapat diidentifikasi di dalam suatu populasi dan lazim disebut antigen / gen blank. Demikian pula istilah antigen / gen "BBL", "CBL", "DRBL" dan "DQBL".

5.2.1 Frekuensi Antigen / Gen HLA-A

Jumlah antisera yang dipakai dalam penelitian ini sebanyak 20 antigen HLA-A dari 26 jenis antigen HLA-A yang diketahui (Lampiran 7).

Tabel 5.2 Hasil Frekuensi Antigen / Gen HLA-A pada Populasi Suku Bugis-Makassar di Ujung Pandang.

JENIS SPESIFITAS ANTIGEN	JUMLAH SAMPEL	POS	NEG	FREKUENSI ANTIGEN (%)	FREKUENSI GEN (%)
A 1	113	3	110	2,65	1,33
A 2	113	66	47	58,40	29,20
A 3	113	7	106	6,19	3,10
A 9	113	39	74	34,51	17,26
A 11	113	12	101	10,62	5,31
A 19	113	47	66	41,60	20,80
A 23 (9)	113	17	96	15,04	7,52
A 24 (9)	113	11	102	9,73	4,67
A 25 (10)	113	51	62	45,13	22,56
A 26 (10)	113	3	110	2,65	1,33
A 28	113	3	110	2,65	1,33
A 29 (19)	113	4	109	3,54	1,77
A 30 (19)	113	2	111	1,77	0,88
A 31 (19)	113	9	104	7,96	3,98
A 32 (19)	113	3	110	2,65	1,33
A 33 (19)	113	1	112	0,88	0,44
A 34 (10)	113	2	111	1,77	0,88
A 36 (10)	113	0	113	0	0
A 66 (10)	113	0	113	0	0
Antigen ABL					13,71

Dapat diperiksa : 8 Antigen induk (A1, A2, A3, A9, A10, A11, A19, A28), 9 Antigen anak (A23, A24, A25, A26, A29, A30, A31, A32, A33). Frekuensi tertinggi Antigen HLA-A2 (58,40%), frekuensi terendah Antigen HLA-A32 (19) = (0,88%). Antigen HLA-A34 (10), HLA-A36, HLA-A 66 (10), tidak ditemukan pada populasi yang diteliti. Frekuensi gen blank : $100 - \text{jumlah seluruh frekuensi gen induk} = 13,71\%$.

5.2.2 Frekuensi Antigen / Gen HLA-B

Antisera yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 34 antisera dari 61 antisera yang diketahui saat ini (Lampiran 7).

Tabel 5.3 Hasil Frekuensi Antigen / Gen HLA-B pada Populasi Suku Bugis - Makassar di Ujung Pandang.

JENIS SPESIFITAS ANTIGEN	JUMLAH SAMPEL	POS	NEG	FREKUENSI ANTIGEN (%)	FREKUENSI GEN (%)
B 5	113	31	82	27,43	13,72
B 7	113	3	110	2,65	1,32
B 8	113	1	112	0,88	0,44
B 12	113	9	104	7,96	3,98
B 13	113	3	110	2,65	1,33
B 14	113	5	108	4,42	2,21
B 15	113	49	64	43,36	21,68
B 16	113	3	110	2,65	1,33
B 17	113	10	103	8,85	4,42
B 18	113	2	111	1,77	0,88
B 21	113	0	113	0	0
B 22	113	15	98	13,27	6,64
B 27	113	5	108	4,42	2,21
B 35	113	24	89	21,23	10,62
B 37	113	6	107	5,30	2,65
B 38 (16)	113	3	110	2,65	1,33
B 39 (16)	113	2	111	1,77	0,88
B 40	113	17	96	15,04	7,52
B 41	113	0	113	0	0

Tabel 5.3 Hasil Frekuensi Antigen / Gen HLA-B pada Populasi Suku Bugis - Makassar di Ujung Pandang (lanjutan).

JENIS SPESIFITAS ANTIGEN	JUMLAH SAMPEL	POS	NEG	FREKUENSI ANTIGEN (%)	FREKUENSI GEN (%)
B 42	113	0	113	0	0
B 44 (12)	113	9	104	7,96	3,99
B 45 (12)	113	2	111	1,76	0,88
B 46	113	0	113	0	0
B 47	113	0	113	0	0
B 48	113	0	113	0	0
B 51 (5)	113	4	109	3,53	1,76
B 53 (5)	113	3	110	2,65	1,32
B 54 (22)	113	2	111	1,76	0,88
B 55 (22)	113	3	110	2,65	1,32
B 56 (22)	113	5	108	4,42	2,21
B 57 (17)	113	3	110	2,65	1,32
B 61 (40)	113	9	104	7,96	3,99
B 75 (15)	113	10	104	8,85	4,42
B 77 (15)	113	0	113	0	0
Antigen BBL					19,05

Frekuensi tertinggi antigen HLA-B15 (43,36%), frekuensi terendah antigen HLA-B8 (0,88%), antigen HLA-B21, -B41, -B42, -B46, -B47, -B48, -B77 (15) tidak ditemukan pada populasi yang diteliti. Frekuensi gen blank : 19,05 %, dapat diperiksa 15 antigen induk (HLA-B5, -B7, -B8, -B12, -B13, -B14, -B15, -B17, -B18, -B21, -B22, -B27, -B35, -B37, -B40), 13 antigen anak (HLA-B 38 (16), -B39 (16), -B44 (12), -B45 (12), -B51 (885), -B53 (5), -B54 (22), -B55 (22), -B56 (22), -B57 (17), -B61 (4), -B75 (15), -B77 (15)).

5.2.3 Frekuensi Antigen / Gen HLA-C

Digunakan 7 antisera dari 10 antigen yang diketahui saat ini (Lampiran 7).

Tabel 5.4 Hasil Frekuensi Antigen / Gen HLA-C pada Populasi Suku Bugis - Makassar di Ujung Pandang.

JENIS SPESIFITAS ANTIGEN	JUMLAH SAMPEL	POS	NEG	FREKUENSI ANTIGEN (%)	FREKUENSI GEN (%)
CW 1	113	47	66	41,59	20,80
CW 2	113	5	108	4,42	2,21
CW 3	113	61	52	53,98	26,99
CW 4	113	32	81	28,32	14,16
CW 5	113	0	113	0	0
CW 6	113	25	88	22,12	11,96
CW 7	113	17	96	15,04	7,52
Antigen CBL					17,26

Frekuensi antigen tertinggi : HLA-CW3 (53,98%), frekuensi antigen terendah : HLA-CW2 (4,42%). Antigen HLA-CW5 tidak ditemukan di dalam populasi yang diteliti.

Antigen HLA-C yang berhasil diperiksa semuanya merupakan antigen induk. Frekuensi gen blank pada HLA-C sebesar 17,26%).

5.2.4 Frekuensi Antigen / Gen HLA-DR

Jumlah antisera yang digunakan untuk memeriksa frekuensi antigen DR adalah sebanyak 21 antisera dari 24 antisera yang diketahui saat ini (Lampiran 9).

Tabel 5.5 Hasil Frekuensi Antigen / Gen HLA-DR pada Populasi Suku Bugis - Makassar di Ujung Pandang.

JENIS SPESIFITAS ANTIGEN	JUMLAH SAMPEL	POS	NEG	FREKUENSI ANTIGEN (%)	FREKUENSI GEN (%)
DR 1	113	2	111	1,77	0,88
DR 2	113	51	62	45,13	22,57
DR 3	113	0	113	0	0
DR 4	113	9	104	7,96	3,98
DR 5	113	0	113	0	0
DR 6	113	0	113	0	0
DR 7	113	7	106	6,19	3,09
DR 8	113	6	107	5,31	2,65
DR 9	113	3	110	2,65	1,33
DR 10	113	0	113	0	0
DR 11 (5)	113	5	108	4,42	2,21
DR 12 (5)	113	40	73	35,40	17,70
DR 13 (6)	113	2	111	1,77	0,88
DR 14 (6)	113	10	103	8,85	4,42
DR 15 (2)	113	15	98	13,27	6,64
DR 16 (2)	113	1	112	0,88	0,44
DR 17 (3)	113	8	105	7,08	3,54
DR 18 (3)	113	0	0	0	0
DR 51	113	10	93	17,70	8,85
DR 52	113	23	90	20,35	10,81
DR 53	113	11	102	9,73	4,87
Antigen DRBL					41,60

Antigen HLA yang diperiksa terdiri dari 13 antigen induk (DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR6, DR7, DR8, DR9, DR10, DR51, DR52, DR53) dan 8 antigen anak (DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16, DR17, DR18).

Hasil analisis tersebut pada tabel 5,2,4, menunjukkan bahwa antigen HLA-DR2 mempunyai frekwensi yang tertinggi (45,13%), sedangkan HLA-DR16(2) merupakan antigen yang terendah frekuensinya (0,88%).

Ternyata DR3, DR5, DR6, DR10 dan DR16(3) tidak terdapat dalam populasi yang diteliti.

Frekuensi gen blank pada HLA-DR sebesar 41,60% menunjukkan hampir separuh dari gen HLA-DR yang belum dapat diidentifikasi dalam populasi ini.

5.2.5 Frekuensi Antigen / Gen HLA-DQ

Jumlah antisera yang digunakan dalam pemeriksaan ini sebanyak 7 antisera dari 9 antisera yang diketahui saat ini (Lampiran 7).

Tabel 5.6 Hasil Frekuensi Antigen / Gen HLA-DQ pada Populasi Suku Bugis - Makassar di Ujung Pandang.

JENIS SPESIFITAS ANTIGEN	JUM. SAMP.	POS	NEG	FREKUENSI ANTIGEN (%)	FREKUENSI GEN (%)
DQ W1	113	41	72	36,28	18,14
DQ W2	113	23	90	20,35	10,17
DQ W3	113	45	68	39,82	19,91
DQ W4	113	0	113	0	0
DQ W5	113	19	94	16,81	8,40
DQ W6	113	2	111	1,77	0,88
DQ W7	113	9	104	7,96	3,98
Antigen DQBL					34,09

Frekuensi antigen tertinggi : HLA-DQW3 (39,82%), frekuensi antigen terendah : HLA-DQW7 (7,96%). Antigen HLA-DQW4 tidak ditemukan di dalam populasi yang diteliti. Frekuensi gen blank : 34,09%.

5.3 Hubungan antara HLA klas I dan HLA klas II dengan kerentanan lepra

Analisis yang dipergunakan untuk menilai hubungan antara antigen / gen HLA dengan penyakit lepra yaitu dengan RR (Resiko Relatif) yang dianggap sama dengan OR (Odds Ratio) serta derajat kemaknaan dengan χ^2 (Chi-kuadrat).

Antisera yang dipergunakan untuk memeriksa antigen HLA pada penderita lepra, jenis dan jumlahnya sama dengan antisera yang dipergunakan untuk memeriksa

frekuensi antigen HLA pada populasi normal. Kecuali HLA-DR, digunakan tehnik "PCR-SSO reverse dot blot" (resolusi rendah) yang mampu menetapkan sebanyak 78 group alel, yang pada penelitian ini dapat mengidentifikasi 28 group alel HLA-DRB.

Jumlah penderita lepra yang berhasil diteliti adalah sebanyak 101 orang, yang terdiri atas 64 kasus suku Bugis dan 37 kasus suku Makassar.

5.3.1 Hubungan antigen HLA-A dengan timbulnya lepra

Dari hasil tabel 5.6 tercatat ada 3 buah antigen yang nyata lebih tinggi didapatkan pada kelompok kasus dibandingkan dengan kelompok kontrol, yaitu HLA-A1, -A32(19) dan -A28. Adapun resiko timbulnya lepra pada masing-masing antigen tersebut adalah berturut-turut 11,428 kali, 8,340 kali dan 5,909 kali (OR) (antigen kerentanan).

Tabel 5.7 Perbedaan frekuensi antigen HLA-A pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing antigen (OR).

Spesifitas antigen	KASUS n = 101	KONTROL n = 113	OR	P
A1	23.80%	2.70%	11.428	0.001 *
A2	21.80%	58.40%	0.198	0.001 *
A3	11.90%	6.20%	2.041	0.144
A9	23.80%	33.60%	0.607	0.168
A10	20.80%	9.70%	2.410	0.051 *
A11	33.70%	41.60%	0.712	0.232
A19	10.90%	15.00%	0.690	0.368
A23 (9)	8.90%	10.60%	0.331	0.674
A24 (9)	21.80%	42.50%	0.377	0.001 *
A25 (10)	0.00%	2.65%	0.123	0.056
A26 (10)	5.00%	2.70%	1.892	0.383
A28	17.80%	3.50%	5.909	0.005 *
A29 (19)	0.00%	1.80%	0.499	0.179
A30 (19)	17.80%	8.00%	2.506	0.030 *
A31 (19)	11.90%	2.70%	4.943	0.083
A32 (19)	6.90%	0.90%	8.340	0.019 *
A33 (19)	5.00%	1.80%	2.890	0.191
A34 (10)	0.00%	0.00%	TD	TD
A36	0.00%	0.00%	TD	TD
A66 (10)	0.00%	0.00%	TD	TD

* (p < 0,05) = bermakna

TD = Tidak Dihitung

Sebaliknya frekuensi antigen HLA-A2, -A24(9) nyata lebih rendah pada kelompok kasus dibandingkan dengan kelompok kontrol (antigen protektif).

Antigen HLA-A34(10), -A36, -A66(10) tidak ditemukan dalam kelompok kasus maupun kontrol.

5.3.2 Hubungan antigen HLA-B dengan timbulnya lepra

Tercatat HLA-B8 sangat tinggi frekuensinya didalam kelompok kasus dibandingkan dengan kelompok kontrol, dengan resiko utnuk timbulnya lepra sebesar

15,101 kali. Demikian pula frekuensi tinggi dalam kelompok kasus dijumpai pada HLA-B18, -B7, -B14, -B38(16), -B39(16), -B45(12), -B54(22), -B51(5), -B53(5), -B27, -B17, -B44, dan -B40 dibandingkan dalam kelompok kontrol dan resiko untuk timbulnya lepra adalah berturut – turut : 8,199 kali, 6,728 kali, 5,429 kali, 5,429 kali, 4,774 kali, 4,774 kali, 4,774 kali, 4,753 kali, 4,481 kali, 3,284 kali, 2,543 kali, 2,339 kali, dan 2,166 kali (antigen kerentanan).

Sebaliknya tidak ada satupun antigen HLA-B yang kedudukan frekuensinya lebih rendah pada kelompok kasus daripada di kelompok kontrol sesuai kemaknaan $p < 0,05$ (tidak ada antigen protektif).

Antigen HLA-B21, -B41, -B42, -B77(15) tidak ditemukan pada kelompok kasus dan kontrol. (Tabel 5.8)

Tabel 5.8 Perbedaan frekuensi antigen HLA-B pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing antigen (OR).

Spesifitas antigen	KASUS n = 101	KONTROL n = 113	OR	P
B5	18.80%	26.50%	0.641	0.179
B7	19.80%	3.50%	6.728	0.001 *
B8	11.90%	0.90%	15.101	0.001 *
B12	7.90%	8.00%	0.994	0.991
B13	7.90%	2.70%	3.154	0.082
B14	8.90%	1.80%	5.429	0.018 *
B15	29.70%	41.60%	0.593	0.070
B16	5.90%	2.70%	2.316	0.232
B17	19.80%	8.80%	2.543	0.021 *
B18	12.90%	1.80%	8.199	0.002 *
B21	0.00%	0.00%	TD	TD
B22	5.90%	13.30%	0.413	0.072
B27	17.80%	6.20%	3.284	0.008 *
B35	23.80%	20.40%	1.220	0.548
B37	6.90%	5.30%	1.328	0.620
B38 (16)	17.80%	1.80%	5.429	0.018 *
B39 (16)	7.90%	1.80%	4.774	0.033 *
B40	27.40%	15.00%	2.166	0.023 *
B41	0.00%	0.00%	TD	TD
B42	0.00%	0.00%	TD	TD
B44 (16)	16.80%	8.00%	2.339	0.047 *
B45 (12)	10.90%	1.80%	6.783	0.005 *
B46	0.00%	0.00%	TD	TD
B48	0.00%	0.00%	TD	TD
B51 (5)	14.90%	3.50%	4.753	0.004 *
B53 (5)	10.90%	2.70%	4.481	0.015 *
B54 (22)	7.90%	1.80%	4.774	0.033 *
B55 (22)	5.90%	2.70%	2.316	0.232
B56 (22)	5.00%	4.40%	1.125	0.856
B57 (17)	2.00%	2.70%	0.741	0.744
B61 (40)	5.90%	8.00%	0.730	0.563
B75 (15)	8.90%	8.80%	1.008	0.987
B77 (15)	0.00%	0.00%	TD	TD

* ($p < 0.05$) = bermakna

TD = Tidak Dihitung

5.3.3 Hubungan antigen HLA-C dengan timbulnya lepra

Dari tabel 5.9 tercatat frekuensi antigen HLA-CW2 dan -CW6 lebih tinggi pada kelompok kasus daripada kelompok kontrol dengan resiko untuk timbulnya lepra adalah 3,476 kali dan 2,610 kali (antigen kerentanan). Antigen HLA-CW5 tidak ditemukan pada kelompok kasus dan kontrol. HLA-CW1 dan -CW4 bersifat sebagai antigen protektif, sebab frekuensinya lebih tinggi pada kontrol daripada kasus.

Tabel 5.9 Perbedaan frekuensi antigen HLA-C pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing antigen (OR).

Spesifitas antigen	KASUS n = 101	KONTROL n = 113	OR	P
CW1	17.80%	41.60%	0.305	0.001 *
CW2	13.90%	4.42%	3.476	0.015 *
CW3	54.50%	54.90%	0.984	0.952
CW4	14.90%	28.30%	0.461	0.025 *
CW5	0.00%	0.00%	TD	TD
CW6	41.60%	21.20%	2.610	0.004 *
CW7	7.90%	15.00%	0.486	0.105

* ($p < 0,05$) = bermakna

TD = Tidak Dihitung

5.3.4 Hubungan alel HLA-DRB dengan timbulnya lepra.

Dari tabel 5.10 tercatat 4 alel HLA-DRB yang mempunyai frekuensi tinggi dalam kelompok kasus dibanding kelompok kontrol, yaitu berturut-turut : HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (= DR2), -DRB1* 1201, 1202 (= DR12(5)), HLA-DRB3* 0301 (DR52) dan -DRB5* 0101 (DR51) dengan resiko timbulnya lepra sebesar 2,891 kali, 1,448 kali, 1,875 kali dan 2,295 kali (alel kerentanan).

Tabel 5.10 Perbedaan frekuensi alel HLA-DRB (dengan PCR) pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing alel (OR).

Alel	KASUS n = 101	KONTROL n = 113	OR	P
DRB1* 1401, 1407, 1408, 1422	1.00%	1.80%	0.555	0.628
1404	5.00%	15.90%	0.275	0.010 *
0801, 0803, 0806, 0810	2.00%	2.70%	0.741	0.744
0802, 0804, 0807, 0811, 0813	1.00%	0.90%	1.120	0.936
0805	1.00%	0.90%	1.120	0.936
0812	4.00%	2.70%	1.512	1.592
0901	4.00%	3.50%	1.124	0.871
1001	2.00%	0.00%	0.222	0.133
0101, 0104	2.00%	1.80%	1.121	0.910
1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606	77.20%	54.00%	2.891	0.001 *
1604	2.00%	1.80%	1.121	0.910
03011, 0305, 0306	5.00%	9.70%	0.483	0.184
0701	5.00%	8.80%	0.536	0.265
0403, 0406, 0407, 0420	2.00%	3.50%	0.551	0.490
0405, 0410	3.00%	12.40%	0.216	0.011 *
0411, 0417	1.00%	1.80%	0.555	0.628
1101, 1103, 1104, 1108, 1111, 1115, 1118, 1119, 1124	3.00%	7.10%	0.402	0.174
1102, 1114	1.00%	0.00%	0.472	0.289
1106	0.90%	0.00%	1.000	0.343
1126	0.00%	1.80%	0.499	0.179
1201, 1202	53.50%	44.20%	1.448	0.038 *
1301, 1302, 1316	3.00%	3.50%	0.834	0.815
DRB3* 0101	6.90%	8.00%	0.861	0.774
0201-0204	11.90%	23.30%	0.341	0.003 *
0205	1.00%	7.10%	0.131	0.027 *
0301	54.50%	38.90%	1.875	0.023 *
DRB4* 0101-0103	15.80%	31.00%	0.420	0.009 *
DRB5* 0101	59.40%	38.90%	2.295	0.003 *
0102, 0103, 0203	19.80%	16.80%	1.222	0.572

* (p < 0,05) = bermakna

TD = Tidak Dihitung

Sebaliknya frekuensi HLA-DRB1* 1404 (=DR14), -DRB1* 0405, 0410 (=DR4), -DRB3* 0201-0204 (=DR52), -DRB3* 0205 (=DR52), -DRB4* 0101-0103 (DR53) lebih rendah pada kelompok kasus daripada kelompok kontrol (alel protektif).

5.3.5 Hubungan antigen HLA-DQ dengan timbulnya lepra

Dari hasil tabel 5.11 tercatat hanya satu antigen yang mempunyai frekuensi yang tidak terlalu tinggi pada kelompok kasus dibanding kelompok kontrol, yaitu HLA-DQW1 dengan resiko untuk timbulnya lepra sebesar 1,152 kali (antigen kerentanan).

Tabel 5.11 Perbedaan frekuensi antigen HLA-DQ pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing antigen (OR).

Spesifitas antigen	KASUS n = 101	KONTROL n = 113	OR	P
DQW1	39.60%	36.28%	1.152	0.047 *
DQW2	9.90%	20.35%	0.430	0.035 *
DQW3	40.60%	47.80%	0.747	0.290
DQW4	0.00%	0.00%	TD	TD
DQW5	6.90%	16.80%	0.368	0.027 *
DQW6	6.90%	1.80%	4.133	0.060
DQW7	9.90%	8.00%	1.270	0.619

* ($p < 0.05$) = bermakna

TD = Tidak Dihitung

Sebaliknya hanya dua antigen yang mempunyai frekuensi tinggi pada kelompok kontrol dibanding kelompok kasus, yaitu HLA-DQW2 dan HLA-DQW5 (antigen protektif). Antigen HLA-DQW4 tidak ditemukan pada kelompok kasus dan kontrol.

5.4 Hubungan antar alel HLA-DRB berdasarkan organisasi genom.

Berdasarkan organisasi genom gen HLA-DRB, dimana ekspresi gen HLA-DRB1* 15-16 akan selalu bersama dengan HLA-DRB5, dan ekspresi gen HLA-DRB1* 12-13 akan selalu bersama dengan HLA-DRB3, maka harus pula dianalisis besarnya resiko timbulnya lepra dengan adanya kombinasi alel tersebut (Tabel 5.12 dan lampiran 12).

Tabel 5.12 Perbedaan frekuensi kombinasi alel HLA-DRB1* 15-DRB5* dan HLA-DRB1* 12-DRB3* pada kelompok kasus dan kontrol serta besarnya resiko timbulnya lepra dari masing-masing kombinasi alel (OR).

Alel HLA	KASUS n = 101	KONTROL n = 113	OR	P
DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 dan DRB5* 0101	72,80%	45,70%	3,181	0,001 *
1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 dan DRB5* 0102, 0103, 0203	46,30%	26,10%	2,447	0,030 *
DRB1* 1201, 1202 dan DRB3* 0101	8,30%	6,50%	1,318	0,706
1201, 1202 dan DRB3* 0201-0204	9,30%	23,70%	0,330	0,050 *
1201, 1202 dan DRB3* 0205	2,10%	11,30%	0,168	0,063
1201, 1202 dan DRB3* 0301	54,40%	40,20%	1,777	0,050 *

* (p<0.05) = bermakna

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi alel DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606, dan DRB5* 0101 serta dengan DRB5* 0102, 0103, 0203 akan lebih meningkatkan resiko timbulnya lepra dibandingkan resiko yang timbul dari masing-masing alel. Keadaan yang serupa juga dijumpai pada kombinasi alel DRB1* 1201, 1202, dan DRB3* 0301 sebaliknya adanya kombinasi DRB1* 1201, 1202, dan DRB3* 0201-0204, dapat menurunkan resiko timbulnya lepra dari masing-masing alel.

5.5 Antigen / gen kerentanan dan protektif untuk timbulnya lepra atau tipe lepra

Sebagai rangkuman dari tabel 5.7, 5.8, 5.9, 5.10 dan 5.11 ditemukan berbagai antigen / gen HLA yang rentan dan protektif terhadap timbulnya lepra atau tipe lepra, dapat dilihat pada tabel 5.13, 5.14, 5.15 dan 5.16.

Tabel 5.13 Daftar antigen / gen HLA yang rentan terhadap lepra.

Spesifitas Antigen / Gen	OR	P
A1	11,428	0,001
A32(19)	8,340	0,019
A28	5,909	0,005
A30(19)	2,506	0,030
B8	15,101	0,001
B18	8,199	0,002
B7	6,728	0,001
B14	5,429	0,018
B38(16)	5,429	0,018
B39(16)	4,774	0,033
B45(12)	4,774	0,005
B54(22)	4,774	0,033
B51(5)	4,753	0,004
B53(5)	4,481	0,015
B27	3,284	0,008
B17	2,543	0,021
B44	2,339	0,047
B40	2,166	0,023
CW2	3,476	0,015
CW6	2,610	0,004
DQW1	1,152	0,047
DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606	2,891	0,001
DRB1* 1201, 1202	1,448	0,038
DRB3* 0301	1,875	0,023
DRB5* 0101	2,295	0,003

P < 0,05

Tabel 5.14 Daftar antigen / gen HLA yang protektif terhadap lepra.

Spesifitas Antigen / Gen	OR	P
A2	0,198	0,001
A24	0,377	0,001
CW1	0,305	0,001
CW4	0,461	0,025
DQW2	0,430	0,035
DQW5	0,368	0,027
DRB1* 1404	0,275	0,010
DRB1* 045, 0410	0,216	0,011
DRB3* 0201-0204	0,341	0,003
DRB3* 0205	0,131	0,027
DRB4* 0101-0103	0,420	0,009

P < 0,05

Pada penelitian ini didapatkan bahwa antigen HLA-A1 dan HLA-B8 mempunyai hubungan kerentanan yang amat tinggi terhadap penyakit lepra (OR; 11,428 dan 15,101), artinya setiap individu yang mempunyai predisposisi genetik dengan HLA-A1 dan HLA-B8 secara sendiri-sendiri, beresiko 11 kali dan 15 kali lebih tinggi memperoleh penyakit lepra (Tabel 5.13). Demikian pula halnya dengan keberadaan HLA-A32(19) dan HLA-B18 (OR; 8,340 dan 8,199), yang berada sedikit di bawah kedua antigen tersebut diatas, dalam hal hubungan kerentanan terhadap lepra secara sendiri-sendiri.

Disamping telah ditemukannya antigen / gen yang meningkatkan resiko timbulnya lepra (antigen / gen kerentanan) pada penelitian ini dijumpai pula antigen / gen yang melindungi timbulnya lepra (antigen / gen protektif). Hal ini bisa dilihat pada tabel 5.14.

Dari daftar tabel 5.14 tersebut, tercatat 11 jenis antigen / gen yang bernilai protektif terhadap lepra, namun diambil tiga antigen yang bernilai protektif paling

tinggi, yaitu HLA-CW4, -DQW2 dan HLA-DRB4* 0101-0103 (DR53) (OR; 0,461; 0,430 dan 0,420).

Tabel 5.15 Frekuensi dan Odd's Ratio antigen / gen HLA klas I dan klas II yang rentan terhadap lepra tipe TT serta kontrol sehat.

Spesifitas antigen / gen	TT/BT n = 20	Kontrol n = 113	OR	P
A2	60,00%	58,40%	1,068	0,893
A3	40,00%	6,20%	10,095	0,001 *
A26(10)	15,00%	2,70%	6,411	0,014 *
A28	35,00%	3,50%	14,673	0,001 *
A31(19)	35,00%	2,70%	19,743	0,001 *
A32(19)	20,00%	0,90%	20,000	0,003 *
B5	70,00%	26,50%	6,455	0,001 *
B7	55,00%	3,50%	13,305	0,001 *
B15	75,00%	41,60%	4,212	0,005 *
B17	87,50%	8,80%	22,700	0,001 *
B27	70,00%	6,20%	11,818	0,001 *
B35	65,00%	20,40%	7,267	0,001 *
B37	15,00%	5,30%	3,147	0,117
B39(16)	25,00%	1,80%	18,500	0,002 *
B40	55,50%	15,00%	6,901	0,005 *
B44(12)	45,00%	8,00%	9,454	0,001 *
B54(22)	25,00%	1,80%	18,500	0,002 *
B56	20,00%	4,40%	5,400	0,010 *
CW1	70,00%	41,60%	3,276	0,018 *
CW2	45,00%	4,40%	17,672	0,001 *
DQW1	45,00%	36,30%	1,436	0,458
DQW3	65,00%	47,80%	2,029	0,155
DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606	80,00%	54,00%	3,409	0,002 *
DRB1* 0701	15,00%	8,80%	1,817	0,393
DRB3* 0301	60,00%	38,90%	1,890	0,193
DRB5* 0101	21,00%	11,90%	1,151	0,110

* $P < 0,05$: bermakna

Dari tabel 5.15, tercatat 25 antigen / gen HLA klas I dan klas II yang frekuensinya lebih tinggi pada kelompok tipe TT daripada kelompok tipe LL serta dari kelompok kontrol. Frekuensi ke 25 antigen tersebut berbeda secara nyata antara lepra TT/BT dan kontrol sehat, sehingga dapat disimpulkan ke 25 antigen tersebut bersifat rentan terhadap tipe TT/BT.

Tabel 5.16 Frekuensi dan Odd's Ratio antigen / gen HLA klas I dan klas II yang rentan terhadap lepra tipe LL serta kontrol sehat.

Spesifitas antigen / gen	LL/BL n = 81	Kontrol n = 113	OR	P
A2	12,30%	58,40%	0,103	0,001 *
A3	4,90%	6,20%	0,786	0,709
A26(10)	2,50%	2,70%	0,919	0,927
A28	13,60%	3,50%	4,282	0,009 *
A31(19)	6,20%	2,70%	2,412	0,224
A32(19)	3,70%	0,90%	4,307	0,173
B5	6,20%	26,50%	0,182	0,002 *
B7	11,11%	3,50%	3,406	0,037 *
B15	18,50%	41,60%	0,319	0,006 *
B17	2,50%	8,80%	0,260	0,068
B27	4,90%	6,20%	0,786	0,709
B35	13,60%	20,40%	0,614	0,221
B37	4,90%	5,30%	0,926	0,908
B39(16)	3,70%	1,80%	2,134	0,401
B40	21,00%	15,00%	1,500	0,282
B44(12)	9,90%	8,00%	1,266	0,642
B54(22)	3,70%	1,80%	2,134	0,401
B56	1,20%	4,40%	0,270	0,205
CW1	4,90%	41,60%	0,729	0,001 *
CW2	6,20%	4,40%	1,421	0,587
DQW1	38,30%	36,30%	1,088	0,777
DQW3	34,60%	47,80%	0,577	0,066
DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606	76,50%	54,00%	2,781	0,001 *
DRB1* 0701	2,50%	8,80%	0,393	0,068
DRB3* 0301	53,10%	38,90%	1,326	0,295
DRB5* 0101	13,10%	11,90%	0,814	0,843

* P < 0,05 : bermakna

Dari tabel 5.16, tercatat ada 3 jenis antigen yang frekuensinya lebih tinggi pada kelompok LL/BL daripada kelompok kontrol yang secara analisa statistik bermakna kerentanan, yaitu masing-masing HLA-A28, -B7, -DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) dengan OR berturut-turut 4,282; 3,406 dan 2,781.

BAB 6

PEMBAHASAN

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah studi asosiasi dengan pendekatan rancangan “kasus-kontrol”. Tujuan dari penelitian ini adalah menetapkan dasar genetik penderita lepra pada populasi Indonesia, yang akan dilakukan dengan menilai hubungan (association) antigen / gen HLA klas I & klas II (sebagai faktor resiko) dengan kerentanan timbulnya lepra. Di dalam kaidah penelitian genetik, kuatnya hubungan tersebut dapat dinyatakan dengan menghitung besarnya resiko timbulnya lepra pada individu-individu dengan antigen / gen HLA klas tertentu (Svejgaard and Ryder, 1994).

Rancangan yang paling tepat dalam mengkaji hubungan antara faktor resiko dengan penyakit sebenarnya adalah rancangan “Kohort”. Keunggulan rancangan Kohort memungkinkan pengaruh faktor resiko terhadap efek (dalam hal ini penyakit) dipelajari dengan lebih cermat dengan pendekatan longitudinal ke depan. Mengingat keunggulan tersebut, rancangan Kohort merupakan rancangan yang paling powerful diantara rancangan survei epidemiologik. Namun demikian, rancangan ini juga tidak terlepas dari keterbatasan antara lain membutuhkan waktu, saran dan subyek penelitian yang cukup besar, sehingga secara ekonomi lebih mahal. Berdasarkan adanya keterbatasan-keterbatasan tersebut maka pada penelitian ini dipilih rancangan kasus-kontrol.

Pada rancangan kohort, angka resiko berupa resiko relatif yang menggambarkan insidensi penyakit dalam populasi sehubungan dengan faktor resiko yang

dipelajari. Sementara pada rancangan kasus-kontrol penetapan resiko relatif tidak secara langsung oleh karena pada rancangan ini tidak dipakai populasi total, sehingga kelompok kasus dan kelompok kontrol tidak representatif menggambarkan populasi. Resiko representatif pada rancangan kasus kontrol dihitung secara tidak langsung yaitu dengan mencari Odds Ratio (OR). Walaupun OR tidak menunjukkan secara tepat resiko relatif (RR) suatu penyakit, tetapi di dalam praktek amat membantu. Pada keadaan-keadaan tertentu misalnya insidens penyakit yang kecil/jarang, maka besar OR dipandang sama dengan RR (Sastroasmoro dan Ismael, 1995).

Pada penelitian-penelitian genetik ada empat macam strategi yang telah lazim digunakan untuk menetapkan hubungan (asosiasi) gen HLA dengan suatu penyakit, yaitu : (1). Analisis keterpautan, (2). Haplotype sharing, (3). Studi Asosiasi, (4). Studi Eksperimental. Keempat strategi ini memberikan hasil yang saling melengkapi (Rowlinson, 1998; Handono, 1998).

Analisis keterpautan yaitu cara statistik yang akan menghitung model pewarisan penyakit. Model ini menentukan lokasi locus yang berkaitan dengan penyakit, frekuensi antigen / gen dan pewarisannya pada anggota keluarga penderita. Haplotype sharing menentukan seberapa sering salinan tertentu regio khromosomal (haplotype) diturunkan secara identik dari orangtuanya kepada anaknya. Hal tersebut dibandingkan dengan kejadian acak yang seharusnya dari kemiripan haplotype (*haplotype sharing*) (Handono, 1998).

Studi asosiasi atau studi kasus-kontrol yaitu membandingkan antigen / gen HLA tertentu pada individu-individu yang tak bertalian keluarga yang terkena dan tidak terkena suatu penyakit pada populasi yang sama. Kemaknaan perbedaan

frekuensi antigen / gen HLA natar penderita dan kontrol ditentukan oleh fischer's exact atau chi-square dengan tabel 2 x 2 dan kuatnya hubungan dapat ditetapkan dengan resiko relatif. Strategi ini dapat digunakan baik untuk meneliti kaitan haplotipe HLA, antigen / gen HLA maupun nukleotida yang spesifik dengan suatu penyakit (Handono, 1998).

Penelitian yang dilakukan saat ini menggunakan strategi studi asosiasi karena kemungkinan tingkat keberhasilannya lebih baik dengan mengingat sulitnya menelusuri keluarga penderita, alamat yang sulit dijangkau dan terbatasnya kemampuan peneliti. Sebagian besar penelitian mengenai asosiasi HLA dengan penyakit, khususnya lepra juga dilakukan dengan cara serupa (Rea, 1980; De Vries, 1980; Izumi, 1982; Serjeantson, 1983; Van Eden, 1985; Kim, 1987; Fine, 1988; George, 1993; Dessoukey, 1996; Langrange, 1996; Soebono, 1997).

Sebagian pemeriksaan antigen / gen HLA pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Microlymphocytotoxicity Test dengan memakai Oriental Terasaki's Trays dari UCLA, USA sesuai standar prosedur yang ditetapkan oleh National Institute of Health (NIH). Teknik ini dipilih karena sampel yang akan diteliti banyak (lebih dari 200 sampel), peralatan laboratorium yang diperlukan sederhana, reagens yang dipakai harganya cukup terjangkau dan tehnik ini sudah umum dilakukan pada penelitian populasi di banyak negara.

Kendala utama tehnik ini adalah viabilitas (hidup) sel limfosit yang akan diperiksa haruslah minimal 90% dan kebersihan sel harus prima, tidak boleh ada kontaminasi oleh jamur atau bakteri.

Hasil akhir penelitian ini memberi dua hal yang berbeda, yaitu identifikasi antigen / gen HLA klas I (HLA A, -B, -C) dalam populasi dapat dilakukan dengan sukses pada lebih 80% sampel sedang kegagalan hanya sekitar kurang dari 20 % yang digambarkan sebagai gen blank. Tetapi pada identifikasi antigen / gen HLA klas II (HLA-DR, -DQ) pada populasi memberikan hasil yang agak mengecewakan. Sebab angka kegagalan dalam mendeteksi antigen / gen HLA-DR adalah 41,60% (Tabel 5.5), yang artinya hampir separuh dari sampel tidak bisa diidentifikasi antigen / gen HLA-DR-nya. Demikian juga keadaannya pada identifikasi antigen / gen HLA-DQ, tercatat keberhasilan mencapai lebih 65%, sedangkan gen blank yang dihasilkan adalah 34,09% (Tabel 5.6). Dengan besarnya prosentase gen blank yang muncul pada HLA klas II ini, membuat tujuan utama penelitian ini yaitu menemukan pola HLA-Lepra khusus bagi populasi Indonesia menjadi kabur. Sebab penelitian dasar genetik seperti ini belum pernah dilakukan di Indonesia. Sedangkan untuk jangkauan jangka panjangnya adalah usaha pengembangan vaksin yang berpijak pada pola dasar HLA yang dipunyai oleh masing-masing suku bangsa (Alessandra, 1997). Kegagalan ini diperkirakan disebabkan oleh sulitnya memperoleh sel limfosit B yang harus tetap hidup, dengan konsentrasi $1 - 2 \times 10^6$ /ml, seperti syarat baku bagi HLA-typing klas II. Disamping adanya *human error* dalam pelaksanaan penelitian ini.

Untuk menyempurnakan penelitian ini, dan agar tercapai tujuan awalnya, maka pemeriksaan antigen / gen HLA-klas II diulangi lagi dengan sampel yang sama dengan menggunakan metode paling mutakhir yaitu secara molekuler; PCR-SSO, yang diawali dengan metode ELISA, yang sudah teruji spesifitas maupun sensitifitasnya. Teknik ini menjadi pilihan utama karena dapat menetapkan diversitas alel (subtipe)

HLA yang sangat penting untuk menilai hubungannya dengan suatu penyakit. Hal ini tidak dapat ditetapkan bilamana kita menggunakan metode serologi - Microlymphocytotoxicity test. Lagi pula dengan metode ini tidak diperlukan sel limfosit hidup dalam jumlah yang banyak, sementara pada penderita lepra acapkali menggunakan obat-obat sejenis Corticosteroid yang menyebabkan jumlah limfosit yang hidup cenderung menurun. Obat-obatan sejenis sitostatika dan immunosupresan juga diketahui dapat mengurangi viabilitas sel limfosit (Dyer, 1993; Lee, 1994; Rafi, 1995; Santos, 1997).

6.1 Karakteristik Penderita Lepra Yang Diteliti

6.1.1 Umur Penderita

Umur sangat bervariasi pada penyakit lepra, dimana angka tertinggi dijumpai pada dewasa muda. Hal ini mungkin karena masa inkubasi yang bervariasi atau karena perbedaan resiko paparan dalam kelompok umur yang berbeda. Angka insidens yang rendah dalam kelompok umur 0-14 tahun mewakili kasus yang terinfeksi dalam kontak serumah dengan masa inkubasi yang pendek. Angka insidens yang lebih tinggi pada usia 15-50 tahun mewakili kasus yang terinfeksi dalam kontak serumah dengan masa inkubasi yang panjang atau kasus terinfeksi dalam populasi (sumber infeksi tidak jelas). Angka insidens yang rendah pada umur lebih 50 tahun mungkin mencerminkan suatu resiko yang menurun terhadap paparan atau dengan masa inkubasi yang sangat panjang (Hastings, 1994; Jopling, 1996; Amiruddin, 1996).

Pada penelitian ini rata-rata umur penderita 34,53 dengan simpangan baku sebesar 12,16. Menurut penelitian **Noordeen, 1995**, kebanyakan penderita berumur 10-14 tahun kemudian menurun pada kelompok umur berikutnya dan akan meningkat kembali pada umur 30-60 tahun. Diperkirakan faktor umur dipengaruhi oleh kontak yang rapat dengan penderita yang kerentanan (susceptibilitas) terhadap penyakit lepra pada umur tertentu, dimana pengaruh kontak yang rapat lebih menonjol pada umur muda dan kerentanan lebih menonjol pada umur dewasa (**Fine, 1979; Amiruddin, 1996**). Yang jelas bahwa anak-anak yang berumur kurang dari 15 tahun dilaporkan lebih rentan dibandingkan orang dewasa. Angka insidensi pada anak sebesar 7,8/1000 dibandingkan 5,9/1000 pada dewasa. Bagaimana hubungan umur dengan kerentanan terhadap infeksi *M Leprae* kiranya masih perlu diteliti (**Soebono, 1996**).

Pada penelitian ini ditemukan penderita dewasa tua lebih banyak daripada dewasa muda, yang kemungkinan besar kesadaran berobatnya lebih tinggi.

6.1.2 Jenis Kelamin

Pada penelitian ini diperoleh data, bahwa penderita laki-laki lebih banyak daripada perempuan (2 : 1) (tabel 5.1). Hal ini sesuai dengan berbagai laporan dari penelitian yang serupa, yang menyatakan bahwa laki-laki mempunyai resiko lebih besar untuk menderita lepra dibanding wanita (**Hasting, 1994**). Hal ini kemungkinan karena situasi budaya setempat dimana laki-laki lebih banyak bekerja di luar, sehingga pemaparan dengan faktor penyakit lepra lebih besar. Adat kebiasaan di belahan dunia bagian timur adalah kaum wanitanya berpakaian lebih banyak yang menutupi tubuhnya, sehingga kontak dengan faktor penyakit lebih sedikit dibanding

pria. Tetapi diduga ada 2 faktor penting yang ikut menunjang hal ini, yaitu faktor lingkungan dan faktor biologis (Hasting, 1994).

Namun apakah perbedaan jenis kelamin ini juga menunjukkan adanya perbedaan kerentanan terhadap infeksi *M Leprae*, sampai saat ini masih belum jelas (Soebono, 1996).

6.1.3 Suku

Jumlah penderita serta baik yang berasal dari suku Bugis maupun dari suku Makassar tampak berimbang 46,80% : 48,0% (tabel 5.1). Hal ini kemungkinan karena penempatan lokasi pengambilan sampel cocok pada jalur lalu lintas kedua suku tersebut saat berobat (Kandouw, 1998).

6.1.4 Penelitian Hasil Analisis Genetika Populasi

Analisis genetika pada populasi merupakan langkah awal yang mendasar untuk mengetahui proporsi gen / alel di dalam suatu populasi.

Pada penelitian genetik secara biologis perhatian awal sebenarnya terpusat pada individu, namun karena tujuan akhir penelitian ini adalah memperbaiki derajat kesehatan masyarakat, maka diperlukan ukuran yang berkaitan dengan populasi.

Alasan mendasar yang lebih luas adalah untuk memahami distribusi gen HLA dalam populasi tertentu yang akan diteliti yaitu berupa frekuensi gen serta ekspresinya (antigen), sekaligus data tersebut dapat dimanfaatkan untuk mempermudah analisis asosiasi dan mendapatkan kemaknaan statistik antara sistem HLA dan lepra.

6.2 Analisis Frekuensi antigen / gen HLA pada populasi Suku Bugis - Makassar di Ujung Pandang.

6.2.1 Frekuensi antigen / gen HLA-A

Hasil analisis frekuensi antigen HLA pada Tabel 5.2. menunjukkan bahwa antigen (fa) HLA-A2 tertinggi (58,40%) dan frekuensi gen (fg) sebesar 29,20% pada populasi Bugis-Makassar di Ujung Pandang.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Moeslichan (1990) pada populasi Indonesia di Jakarta menunjukkan bahwa HLA-A2 menduduki frekuensi kedua tertinggi setelah HLA-A9, yaitu sebesar 53,1%. Sedang pada populasi Jawa di Surabaya oleh Judajana (1994), frekuensi HLA-A2 sebesar 34,2%. Sejalan dengan tingginya frekuensi HLA-A2 ini di dalam negeri, maka sesuai laporan Ishikawa, 1995 yang dikutip dari buku proceeding HLA, 12th Internasional Histocompatibility Workshop and Conference, 1996, ditemukan frekuensi HLA-A2 yang paling tinggi, yaitu > 5% dari seluruh populasi di belahan Asia Timur bagian Utara, yang meliputi 14 ras suku bangsa (Cina-Singapura, Jepang, Korea, Mongol, Turki, Sardinia, Caucasia, Buryat, Nairobi, Uganda, dan Gambia). Menyusul berturut-turut frekuensi HLA-A24 dan HLA-A11 yang cukup tinggi dalam populasi tersebut di atas. Dari data-data tersebut bisa disimpulkan bahwa HLA-A2 adalah antigen/allel yang paling dominan bagi populasi Asia dan Turki. Kesimpulan tersebut sesuai dengan pendapat para ahli antropologi bahwa terdapat pengaruh yang besar dari ras oriental (Cina) terhadap populasi penduduk di Indonesia (Rusdi, 1992).

Frekuensi gen HLA-A blank sebesar 13,71% menandakan adanya spesifitas HLA yang belum dapat dideteksi atau terdapat variant baru yang khas yang belum diketahui pada populasi penelitian ini.

6.2.2 Frekuensi antigen / gen HLA-B

Dari Tabel 5.3 terbukti frekuensi antigen HLA-B15 tertinggi dari 20 antisera yang diteliti, yaitu (fa = 4,36%, fg = 21,68%). Penemuan ini sejalan dengan hasil penelitian Rusdi, 1992, pada populasi Sumatra sebesar 11,3%. Demikian pula laporan Chandanayingyong, 1995, seperti yang dikutip dalam buku HLA, *Proceeding of the 12th Internasional Histocompatibility Workshop and Conference, 1996*, bahwa HLA-B15 frekuensinya tinggi pada semua ras / suku bangsa yang diteliti yaitu Jepang, Korea Thailand dan Cina-Singapore, disekitar 18-20%. Keadaan seperti ini sesuai pula populasi Caucasia, sekitar 13-15%. Tapi sebaliknya frekuensi rendah terdapat pada ras Negroid, yaitu 8,8% (Lester, 1994), seperti yang dikutip dari buku yang sama.

Frekuensi gen blank antigen HLA-B sebesar 19,05% menunjukkan masih adanya spesifitas HLA-B yang baru yang belum diketahui pada populasi yang diteliti.

6.2.3 Frekuensi antigen / gen HLA-C

Dari Tabel 5.4 terbukti bahwa frekuensi HLA-CW3 menduduki tempat tertinggi, yaitu sebesar 53,98% (fa) dan fg = 26,99%. Hasil ini agak berbeda dengan hasil penelitian Rusdi, (1992) yang melaporkan frekuensi HLA-CW3 yang rendah, yaitu 29,9% pada populasi Sumatra yang diteliti. Sebaliknya laporan Moeslichan

(1990), sejalan dengan hasil penelitian ini, yaitu HLA-CW3 frekuensinya tertinggi diantara 5 jenis antigen HLA-C yang diperiksa, yaitu sebesar 32,5%.

Dari hasil penelitian kelompok Allele and Haplotype Societies (AHS) tahun 1994 yang dikutip dari buku HLA : Proceeding 12th International Histocompatibility Workshop and Conference, pada ras oriental, didapat frekuensi HLA-CW3 yang paling tinggi diantara 27 alel yang diperiksa secara kombinasi metode serologis dan molekular, yaitu sebesar 47,1%. Dari hasil data ini bisa disimpulkan bahwa HLA-CW3 spesifik untuk ras oriental. Populasi Indonesia ternyata menunjukkan adanya pengaruh ras oriental yang besar, yang bisa di perkuat dengan hasil penelitian ini. Adanya gen blank HLA-C, sebesar 17,26% menunjukkan adanya spesifitas HLA-C yang belum bisa dideteksi pada populasi ini, dan mungkin pula hal ini disebabkan kurangnya jenis antigen / gen HLA-C yang diperiksa yaitu 7 jenis dari 22 jenis yang diketahui.

6.2.4 Frekuensi antigen / gen HLA-DR

Dari tabel 5.2.4. terbukti bahwa HLA-DR2 mempunyai frekuensi tertinggi diantara 21 jenis spesifitas antigen HLA yang diperiksa, yaitu 45,13% (fa) dan 22,57 (fg). Hasil dari ke-3 peneliti Indonesia terdahulu (**Moeslichan, 1990; Rusdi, 1992; Panigoro, 1995**), sepakat bahwa frekuensi HLA-DR2 untuk populasi Indonesia adalah tertinggi, diantara jenis spesifitas antigen HLA yang ada, masing-masing melaporkan sebesar 47,9% 38,8% dan 85,6%. Pendapat ini juga diperkuat oleh penelitian-penelitian kelompok AHS, yang salah satunya oleh **Maeda, 1995**, melaporkan frekuensi HLA-DR2 yang tinggi, sebesar 13% pada populasi ras oriental

(7 suku bangsa) dan sebesar 6% pada ras Caucasoid (5 suku bangsa) data ini dikutip dari buku **HLA; Proceeding 12th International Histocompatibility Workshop and Conference, 1996.**

Sejalan dengan fenomena pada kelompok HLA-DR yang diteliti, maka bisa disimpulkan bahwa HLA-DR2 merupakan antigen / gen yang spesifik untuk populasi Indonesia. Data dari hasil penelitian ini memperkuat asumsi tersebut.

Besarnya antigen blank pada HLA-DR (serologi), yaitu sebesar 41,60% atau hampir separuh dari antigen / gen HLA-DR yang belum dapat diidentifikasi, menunjukkan bahwa masih banyak spesifitas HLA-DR yang belum bisa ditentukan dalam populasi ini. Hal ini mungkin disebabkan oleh :

1. Sulitnya mendapat limfosit yang harus tetap hidup dengan patokan nilai $1-2 \times 10^6$ /ml untuk standard pemeriksaan HLA-DR.
2. Sedikitnya jenis antigen HLA-DR yang diperiksa yaitu 21 jenis spesifitas dari 78 jenis yang diketahui saat ini.

Untuk mengetahui peranan HLA klas II (HLA-DR, -DQ) pada kerentanan terhadap penyakit lepra sesuai tujuan penelitian semula, maka metode pemeriksaan diganti dengan metode molekuler yang paling mutakhir yaitu Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide (PCR-SSO) reverse dot blot (resolusi rendah). Teknik ini dipilih karena mempunyai banyak keunggulan. yaitu : 1) tidak memerlukan limfosit hidup dalam jumlah banyak, 2) dapat menetapkan diversitas alel (sub-tipe HLA) yang sangat penting untuk menilai hubungannya dengan suatu penyakit.

6.2.5 Frekuensi antigen / gen HLA-DQ

Dari Tabel 5.6 tercatat HLA-DQW3 mempunyai frekuensi tertinggi 48,67% (fa) dan 24,34% (fg). Hal ini tersebut sesuai dengan laporan dari Moeslichan (1990) bahwa HLA-DQW3 menduduki frekuensi yang sangat tinggi (72,9%). Dari hasil tersebut di atas tampak kemiripan pola HLA-DQW yang terdapat pada populasi oriental (HLA-DQW3 = 55,6%).

Frekuensi gen blank pada HLA-DQ sebesar 34,09% yang artinya lebih sepertiga dari spesifitas antigen HLA-DQ belum dapat diidentifikasi pada populasi yang diteliti.

Sesuai kondisinya dengan HLA-DR maka metode pemeriksaan juga sebenarnya akan diganti dengan metode PCR-SSO reverse dot blot. Tetapi karena situasi ekonomi yang tidak mendukung saat ini, maka terpaksa data serologis yang ada, tetap dipakai dalam menganalisa hasil statistik tentang asosiasi kerentanan dengan penyakit lepra.

6.3 Hubungan antigen / gen HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB, HLA-DQ dengan kerentanan lepra.

Adanya hubungan kerentanan antara HLA klas I (HLA-A1, -B8, -CW2) yang lebih menonjol terhadap lepra seperti yang bisa dibuktikan dalam penelitian ini secara bermakna ($OR > \text{klas II}$), amat bertentangan dengan penelitian-penelitian terdahulu (de Vries, 1984, 1988; Fine, 1988; Soebono, 1996). Menurut pendapat para peneliti tersebut bahwa tidak adanya / kurangnya konsistensi hubungan antara HLA klas I dan lepra kemungkinannya disebabkan karena :

1. *Immune response gene* (gen yang merespons reaksi imun) yang disebut "ir-gene", yang diduga berperan penting terhadap terjadinya respons imun berada di regio -D di daerah lokasi HLA klas II (Browning, 1996).
2. HLA klas I bukan merupakan petanda yang tepat untuk gen respons imun atau gen immunosupresi terhadap *M Lepra* (Ottenhoff, 1986; Soebono, 1996).

Data yang lebih meyakinkan dan konsisten justru berhubungan dengan HLA klas II (de Vries, 1981; Izumi, 1982).

Dengan bukti yang diperoleh melalui penelitian ini maka timbul dugaan bahwa antigen / gen HLA-A1, -B8, -CW2, -DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (-DR2), dan -DQW1 (Tabel 5.13), merupakan kelompok locus HLA klas I yang mengontrol kerentanan lebih besar daripada klas II. Hal ini diduga karena proses aktivasi antigen presenting pathways bagi antigen yang endogenous dan exogenous oleh MHC klas I dan klas II berjalan tidak seimbang. Molekul HLA klas I yang berinteraksi / pengikatan dengan *antigenic peptides* yang dibawa ke dalam *endoplasmic reticulum* oleh transporter protein ke arah plasma membran melalui *apparatus golgi* mengalami ketidakstabilan, sehingga mempengaruhi route proses phagolysosome bagi antigen exogen, yang selanjutnya mengganggu proses *endosomal processing pathway* oleh molekul HLA klas II. Sebagai akibatnya terjadilah suatu proses imun yang lebih patogenik, sehingga molekul HLA klas I diduga mampu mencetuskan respons imun yang lebih cepat dengan kecenderungan kerentanan yang lebih besar (Kuby, 1992). Untuk membuktikan hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan studi asosiasi yang melibatkan keluarga penderita.

Dari hasil analisis data (Tabel 5.13) membuktikan bahwa HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (=DR2) (OR = 2,891), sebagai alel yang mempunyai hubungan kerentanan terhadap lepra sangatlah sesuai dengan penelitian-penelitian terdahulu, terutama hubungan DR2 dengan lepra / tipe lepra (Izumi, 1982; Serjeantson, 1983; Van Eden, 1984; de Vries, 1992; Rani 1993; Soebono 1996). Seperti telah dibicarakan pada pembahasan sebelumnya (Tabel 5.5 dan 5.10) bahwa HLA-DR2 merupakan alel yang paling sering frekuensinya baik pada kelompok kasus maupun pada kelompok kontrol sehat. Secara statistik hubungan kerentanan antara HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) baik terhadap tipe TT maupun tipe LL adalah bermakna (OR = 3,409; P < 0,05) (Tabel 5.15 dan 5.16), sehingga dapat disimpulkan bahwa HLA-DR2 benar-benar berhubungan dengan kerentanan terhadap timbulnya lepra secara keseluruhan dan merupakan faktor resiko terhadap lepra tipe TT dan tipe LL. Sedangkan alel lainnya yang juga menunjukkan hubungan kerentanan terhadap timbulnya lepra, seperti HLA-DRB5* 0101 mungkin karena pengaruh *linkage disequilibrium* (ketidakseimbangan keterpautan). Hasil laporan ini sesuai dengan hasil penelitian Soebono, 1996 yang menyatakan HLA-DR2 merupakan faktor resiko untuk timbulnya lepra tipe lepromatosa. Hasil penelitian ini didukung pula oleh penelitian terdahulu atas studi populasi berbagai suku di Indonesia, yang menyimpulkan bahwa HLA-DR2 merupakan antigen / gen yang spesifik untuk populasi Indonesia (Moeslichan, 1990; Rusdi, 1992; Panigoro, 1995).

Sesuai data tabel 5.14, terdapat 11 jenis antigen / gen yang bersifat melindungi terhadap lepra. Menurut penelitian terdahulu, di Thailand (Shauf, 1985) terdapat

hubungan protektif yang tidak konsisten antara antigen HLA-DQW1, -DQW2 dengan lepra. Hasil penelitian ini belum bisa dibandingkan dengan hasil penelitian lain, karena kurangnya penelitian yang melaporkan mengenai hal ini.

Dari kelompok HLA-B, ternyata tidak satupun ditemukan antigennya yang bersifat protektif terhadap lepra, semuanya bersifat rentan. Hal ini harus membuat kita waspada terhadap setiap individu yang mempunyai predisposisi genetik HLA-B tertentu yaitu HLA-B8, -B18, -B7, -B14, -B38(16), -B39(16), -B45(12), -B54(12), -B51(5), -B53(5), -B27, -B17, -B44 dan -B40, yang secara sendiri-sendiri, sangat beresiko tinggi terhadap timbulnya lepra. Dengan dasar ini timbul asumsi bahwa HLA-B yang mayoritas rentan terhadap tipe lepra, adalah merupakan suatu gen yang dominan dengan daya penetrasi tinggi, sehingga manifestasi genetik yang berkaitan dengan kontrol terhadap kerentanan lebih menonjol dibandingkan gen lainnya. Hal ini pernah dibuktikan pada hewan coba oleh **Greiner, 1988**. Melihat besarnya resiko yang bisa diakibatkan, maka perlu analisa khusus tentang HLA-B ini.

Berdasarkan tabel 5.15, terdapat 25 jenis antigen / gen dari kelompok HLA klas I dan klas II yang mempunyai hubungan kerentanan dengan lepra tipe TT.

Ke 25 antigen HLA yang dimaksud adalah HLA-A3, -A2, -A31(19), -A26(10), -A32(19), -A28, -B27, -B17, -B5, -B56, -B15, -B35, -B7, -B39(16), -B54(22), -B44(12), -B40, -B37, -CW1, -CW2, -DQW3, -DQW1, -DRB1* 0701, -DRB3* 0301, -DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606. Tetapi setelah dianalisa lebih lanjut ternyata yang memenuhi persyaratan statistik, hanya 19 jenis antigen / gen yang bermakna kerentanan terhadap lepra tipe TT/BT. Bila diambil satu contoh

antigen yang mewakili HLA klas I, maka terpilih, masing-masing HLA-A32(19), - B17, -CW2 (OR 20,00; 22,70 dan 17,672). Dan sebagai wakil HLA klas II adalah hanya DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) (OR 3,409). Sehingga secara lengkap dapat disimpulkan bahwa HLA-A32(19), - B17, -CW2, -DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) merupakan faktor resiko terhadap lepra tuberculoid. Hasil tersebut mendukung hipotesis pertama penelitian ini.

Dari hasil tabel 5.16, terdapat 3 jenis antigen yang beresiko tinggi terhadap lepra tipe LL/BL, yaitu masing-masing HLA-A28, -B7, -DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) dengan OR berturut-turut 4,282; 3,406 dan 2,781. Antigen / gen tersebut dapat disimpulkan sebagai faktor resiko terhadap lepra lepromatosa, Hasil ini mendukung hipotesis kedua penelitian ini.

Sebaliknya dari data yang sama dijumpai 4 jenis antigen / gen yang frekuensinya lebih rendah dalam kelompok lepra tipe LL/BL dibanding dalam kelompok kontrol, yaitu masing-masing HLA-A2, -B5, -B15 dan -CW1 (OR berturut-turut adalah 0,103; 0,182; 0,319 dan 0,729). Dengan kata lain antigen-antigen tersebut bersifat melindungi timbulnya lepra tipe LL (antigen protektif).

Dari hasil analisis tabel 5.15 dan 5.16, dapat dibuktikan adanya perbedaan resiko relatif (OR) bagi masing-masing jenis antigen HLA baik terhadap lepra tuberculoid maupun lepra lepromatosa pada populasi suku Bugis - Makassar. Maka dengan hasil ini hipotesis ketiga penelitian ini dapat diterima.

Sebagai hasil analisa organisasi genom HLA-DRB (Tabel 5.12) maka apabila terjadi kombinasi antara alel DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) dengan DRB5* 0101 atau dengan DRB5* 0102, 0103, 0203 justru akan lebih

meningkatkan resiko timbulnya lepra, dibandingkan resiko yang timbul dari masing-masing alel. Keadaan yang sama juga timbul pada kombinasi antara alel DRB1* 1201, 1202 dengan DRB3* 0301. Keadaan sebaliknya, berupa penurunan resiko timbulnya lepra dapat terjadi pada kombinasi antara alel DRB1* 1201, 1202 dengan DRB3* 0201-0204. Untuk dapat menjelaskan peran dari masing-masing alel tersebut diperlukan penelitian lebih lanjut.

Berdasarkan semua uraian pembahasan tersebut terdahulu, dapat disarikan temuan pokok yang perlu dikemukakan sebagai berikut:

1. Adanya perbedaan konsep hipotetik tentang peran dari antigen / gen HLA pada patogenesis lepra tipe TT dan tipe LL yang dikemukakan oleh para peneliti terdahulu. Pada penelitian ini terbukti dengan adanya perbedaan hasil jenis antigen / gen HLA yang berasosiasi dengan lepra tipe TT dan tipe LL pada suku Bugis-Makassar.
2. Terbukti HLA klas I memainkan peranan yang lebih penting daripada HLA klas II dalam hal kerentanan terhadap timbulnya lepra atau tipe lepra. Hal ini dibuktikan dengan OR yang dihasilkan oleh kelompok HLA klas I rata-rata lebih besar dibandingkan dengan HLA klas II, yang bermakna secara statistik.
3. Kuatnya daya kerentanan antigen / gen HLA dengan lepra atau tipe lepra terjadi bila antigen / gen tersebut berdiri sendiri-sendiri. Tetapi bila mereka bergabung / berkombinasi antar sesamanya, justru melemahkan kekuatan tersebut.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

Simpulan dari hasil penelitian ini adalah :

1. Berdasarkan OR (Odd's Ratio) yang dimiliki oleh kelompok HLA klas I secara rata – rata lebih besar daripada kelompok HLA klas II, maka diduga bahwa HLA klas I lebih berperan terhadap lepra maupun tipe lepra dibanding HLA klas II pada populasi suku Bugis – Makassar
2. Kerentanan untuk timbulnya lepra pada populasi suku Bugis – Makassar berhubungan dengan HLA-A1, HLA-B8, HLA-CW2, HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) dan HLA-DQW1. Besarnya resiko untuk timbulnya lepra pada individu dengan antigen/gen tersebut masing-masing adalah 11 kali, 15 kali, 3 kali, 2 kali dan 1 kali.
3. Frekuensi HLA-A32(19), HLA-B17, HLA-CW2 dan HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) lebih tinggi pada penderita lepra tuberculoid daripada kontrol sehat, sehingga antigen / gen tersebut diatas merupakan faktor resiko lepra tuberculoid.
4. Frekuensi HLA-A28, HLA-B7, HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) lebih tinggi pada penderita lepra lepromatosa daripada kontrol sehat, sehingga antigen / gen tersebut merupakan faktor resiko lepra lepromatosa.
5. Antigen / gen HLA-A2, HLA-CW1, HLA-DQW2, HLA-DRB1* 1404 mempunyai frekuensi yang lebih tinggi pada kelompok kontrol sehat daripada

kelompok kasus, sehingga antigen / gen tersebut diatas merupakan faktor proteksi lepra pada populasi suku Bugis – Makassar.

6. Kombinasi alel HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (DR2) baik dengan HLA-DRB5* 0102, 0103, 0203 atau dengan HLA-DRB5* 0101 akan meningkatkan resiko timbulnya lepra. Sebaliknya kombinasi alel HLA-DRB1* 1201, 1202 baik dengan HLA-DRB3* 0201-0204 atau dengan HLA-DRB5* 0101 akan menurunkan resiko terjadinya lepra.
7. Data pendahuluan mengenai distribusi frekuensi antigen/gen HLA pada populasi suku Bugis-Makassar, menunjukkan bahwa antigen HLA-A2 mempunyai frekuensi tertinggi di antara antigen HLA klas I dan HLA-A33(19) serta HLA-B8 tampil dengan frekuensi terendah. Sedangkan di kalangan antigen/gen HLA klas II, antigen HLA-DR2 mempunyai frekuensi tertinggi dan HLA-DR16(2) muncul dengan frekuensi yang terendah.

7.2 Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut yang melibatkan keluarga penderita lepra (studi famili) untuk menetapkan pola haplotipe HLA penderita lepra di Indonesia.
2. Hasil penelitian ini perlu ditindak lanjuti dengan pemeriksaan yang lebih tinggi, yaitu PCR-SSO resolusi tinggi untuk menemukan susunan asam amino molekul HLA yang berperan pada penyakit lepra.
3. Perlu diusahakan adanya antisera yang berasal dari suku bangsa Indonesia sendiri, sehingga dapat mengurangi kemungkinan mendapatkan antigen / gen HLA blank yang sering terjadi pada suatu penelitian populasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abel LA, Demenais F, Baule MS, Blanc M, Muller A, Raffoux C, 1989. Genetic susceptibility to leprosy on a Carribean Island: Linkage analysis with five markers. *Int J Lepr*, 57: 465-471.
- Accolla RS, Adorini L, Sartoris S, Sinigaglia F, Guardiola J, 1995. MHC : Orchestrating in immune response. *Immunol Today*, 16 : 8-11.
- Agusni I. 1996. Perubahan pola imunopatologik sebagai indikator untuk penanganan kusta stadium subklinik. Suatu studi observasional longitudinal untuk mendapatkan dasar kebijakan dalam penanganan kusta stadium subklinik. *Disertasi*. Universitas Airlangga.
- Ali MP, 1965. Genetics in Leprosy. Genetic Influence in Leprosy. *Lepr India* 37: 252.
- Allessandra C, Cervino L, Curcow RN, 1997. Testing Candidate genes that may affect susceptibility to leprosy. *Int J Lepr*, 65: 456-460.
- Amiruddin DM, 1996. Penelitian serologis pada penderita kusta dan kontak serumah penderita kusta di Ujung Pandang. *Disertasi*. Universitas Hasanuddin.
- Bechelli LM, 1994. Prospect of global elimination of leprosy as a public health problem by the year 2000. *Int J Lepr*, 62: 284-292.
- Beiguelman LM, 1965. The genetics of resistance to leprosy. *Int J Lepr*, 33: 808-812.
- Beiguelman B, 1972. Leprosy and Genetics. A review of present status and remarks concerning further investigations. *Bull WHO*, 37: 461-476.
- Bellanti JA, 1993. *Imunologi II*. Penerjemah: Prof Dr A Samik Wahab. Gajah Mada University Press.
- Bidwell JG, 1994. Advances in DNA based HLA typing methods. *Immunol Today*, 15(7): 303-306.
- Bodmer JG, Mars SGE, Albert E, 1990. Nomenclature for factors of the HLA systems 1989. *Immunol Today*, 11: 3-10.
- Browning M and McMichael A, 1996. HLA and MHC: genes, molecules and function. BIOS Scientific Publishers Limited, Salisbury, UK, pp. 353-381.

- Bryceson A and Pflatzgraf RE, 1990. The HLA system and antigen presentation in the textbook of medicine in tropics, pp. 96-114. 3rd Ed.
- Bryceson A, 1996. Why was leprosy regarded as a special disease ? in *Leprosy* 4th Ed., pp. 2-5.
- Busye I, Decorte R, Baens M, Cuppens H, Semanan G, 1993. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens*; 41: 1-14.
- Chakravarti MR and Vogel FA, 1973. A twin study of leprosy. *Top Hum Genet*, 1: 1-123.
- Chatterjee BR, 1978. Textbook: A window on leprosy. Gandhi Memorial Leprosy Foundation, Silver Jubilee Commemorative Volume, Wardha-442103, India.
- Choudhuri K, 1995. Editorial. The immunology of leprosy; unraveling an Enigma. *Int J Lepr*, 63: 430-447.
- Colston MJ, 1993. Editorial. The Molecular biology of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*, 64: 289-294.
- Dep Kes RI, 1998. Situasi lepra di Indonesia. Laporan Tahunan.
- Dessoukey MW, el-Shiemy S, Sallam T, 1996. HLA and Leprosy: Segregation and linkage study. *Int J Dermatol*, 35: 257-264.
- De Vries RRP, Neijnhuis LE, Lai A fat RFM, Van Rood JJ, 1976. HLA-linked genetic control of host response to *mycobacterium Leprae*. *Lancet*, Dec. 16: 1328-1330.
- De Vries RRP, 1979. The HLA system and infectious diseases. *Disertasi*. Rijks Universiteit te Leiden, Nederland.
- De Vries RRP, Mehra NK, Vaidya MC, Gupte MD, Khan PM, Van Rood JJ, 1980. HLA-linked control of susceptibility to tuberculoid leprosy and association with HLA-DR types. *Tissue Antigens*, 16: 294-304.
- De Vries RRP, Ottenhoff THM, Shuguang L, Young RA, 1986. HLA class II restricted helper and Suppressor clones reactive with *mycobacterium Leprae*. *Lep Rev Suppl*, 2: 113-121.
- De Vries RRP, Serjeantson SW, Layrisse Z, 1987. Leprosy. *Tissue Antigens*, 29: 362-367.

- De Vries RRP, Ottenhoff THM, Van Schooten WCA, 1988. Human Leucocyte Antigens (HLA) and Mycobacterial Disease. **Springer Semin Immunopathol** 10: 305-318.
- De Vries RRP, 1989. Regulation of T cell responsiveness against mycobacterial antigens by HLA class 2 immune response genes. **Rev Infect Dis**, 11(Suppl. 2): 5400-5403.
- De Vries RRP, 1992. HLA and Disease: from epidemiology to immunotherapy. **Eur J Clin Invest**, 22: 1-8.
- De Vries RRP, 1994. The cellular immune response and its regulation. Dutch Foundation for post graduates courses in Indonesia, Surabaya, Nov 14-17, hal. 13-19.
- De Vries RRP, Ottenhoff THM, Van Schooten WC, 1998. Human Leucocyte Antigens (HLA) and Mycobacterial disease. **Springer Semin Immunopathol** 10: 305-318.
- Dharmendra, 1985. The lepromin test. In testbook of leprosy. **Dharmendra**, Vol. 2, Samant and Company Bombay, India.
- Donegan E, Bossom EL, 1991. Blood banking and immunology in Basic and Clinical Immunology, 7th Edition. Stites DP, Terr, AI Prentice-Hall International Inc., New Jersey, USA, pp. 284-311.
- Doran TJ, 1988. General discussion of the HLA system, A review, NSW Blood Transfusion Service, pp. 7-27.
- Dyer P and Middleton D, 1993. Histocompatibility Testing. A practical approach. IRL Press at Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo.
- Fine FEM, Wolf E, Pritchard J, Watson B, Bradley DJ, Festenstein H, Chacko CJG, 1979. HLA-linked genes and leprosy: A family study in Karigiri, South India. **J Infect Dis**, 140: 152-161.
- Fine PEM, 1981. Immunogenetics of susceptibility to leprosy, tuberculosis and leishmaniasis. An Epidemiological perspective. **Int J Lepr**, 49: 437-454.
- Fine PEM, 1988. Implications of genetics for the epidemiology and control of leprosy. **Trans R Soc Lond B** 321: 365-376.
- Fine PEM, 1996. Editorial. Vaccination against Leprosy. The view from 1996. **Lepr Rev**, 67: 249-252.

- Fine PEM, 1997. Editorial. Leprosy by the year 2000. What is being eliminated? *Lepr Rev*, 68: 201-202.
- Fugger L, 1994. PCR and RFLP studies of inherited susceptibility to autoimmune disorder, with special reference to multiple sclerosis. *Dan Med Bull*, 11: 38-49.
- George R, Rao RSS, Mathai R, Jacob M. 1993. Intrafamilial transmission of Leprosy in Vellore Town, India. *Int J Lepr*, 61: 550-555.
- Gill HK and Godal T, 1986. Deficiency of cell mediated immunity in leprosy. *Prog Allergy*, 37: 377-390.
- Giphart MJ and Van der Poel JJ, 1992. Molecular biology of the HLA system and its relevance for immunohaematology. *Balliere's Clin Haematol*, 4: 975-1010.
- Goodman JW, 1991. The immune response in Basic and Clinical Immunology, 7th Edition. Stites, DP, Terr, AI Prentice-Hall International Inc., New Jersey, USA. pp. 34-44.
- GV J, 1995. In situ PCR and related technology, Eaton Publishing Co. Cambridge, USA.
- Haanen S and Mutis RN, 1991. Leprosy: cause, transmission and a new theory of pathogenesis. *Rev Infect Dis*, 90: 590-594.
- Handono K, 1998. Hubungan gen HLA kals II dengan kerentanan genetik dan ekspresi otoantibodi pada Lupus Eritematosus Sistemik. Studi imunogenetika Lupus Eritematosus Sistemik. *Disertasi*. Universitas Airlangga.
- Harry Harris, 1994. Dasar-dasar genetika biokemis manusia. Edisi ke III yang perbaharui. Penerjemah dr. Abdul Salam, M. Sofro. Ph.D. Gajah Mada University Press.
- Hastings RC, 1994. Leprosy. Second Edition. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York and Tokyo.
- HLA: Genetic diversity of HLA functional and medical implication : Proceedings of the 12th International Histocompatibility, Workshop and Conference, 1996. Vol. I & II, Saint-Malo, France.
- Immunology of Mycobacterial Diseases (IMMYC) Steering Committee, WHO. 1995. Analysis of Vaccines prepared from Armadillo-Derived M. Leprae, Results of an Inter-laboratory study coordinated by the WHO. *Int J Lepr*, 63: 48-55.

- Izumi S, Sugiyama K, Matsumoto Y and Ohkawa, 1982. Analysis of the immunogenetic background of Japanese Leprosy patients by the HLA system. *Vox Sang*, 42: 243-247.
- Job CK, 1980. Genetics and leprosy. *Lepr India*, 52: 353-358.
- Job CK, 1994. Pathology of leprosy in *Leprosy*. 2nd Ed., Hastings RC, Churchill livingstone: Edinburgh, pp. 193-224.
- Jopling WH and McDougall AC, 1996. Handbook of leprosy, 4th edition. CBS Publishers & Distributors, New Delhi-110002, India.
- Judajana FM, 1994. Pola Sistem HLA Penderita Diabetes Mellitus Indonesia. Suatu pendekatan immunogenetik pada populasi di Jawa Timur. **Disertasi**. Universitas Airlangga.
- Kandouw JM, 1991. Diagnosis Morbus Hansen dengan pemeriksaan histopatologik. **Majalah Kedokteran Indonesia**, Vol. 41, No. 9, hal. 515-518. ISSN. 0377-1121.
- Kandouw JM, 1996. The role of histopathologic examination in the treatment of leprosy. Kursus lanjut patologi jaringan lunak dan penyakit tropik, Jakarta, 9-11 April 1996, hal. 1-19.
- Kandouw JM, 1997. Pewarnaan immunohistokimia lipoarabi-nomannan-B (LAM-B) untuk diagnosis penyakit lepra. **J Med Nus**, Vol. 18, No. 6, hal. 17-21.
- Kandouw JM, 1998. Studi tentang pengetahuan, sikap dan perilaku terhadap konsep penyakit lepra di masyarakat Bugis-Makassar. **Majalah Kedokteran Tropis Indonesia**, Vol. 9. No. 1-2, Agustus 1998, hal. 76-83.
- Kaplan G and Cohn Z, 1986. Regulation of cell-mediated immunity in Lepromatous Leprosy. **Lepr Rev**, 57(Suppl. 2): 199-202.
- Kaplan G and Cohn AZ, 1986. The immunobiology of leprosy. **Int Rev Exp Pathol**, 28: 45-78.
- Keyu X, De Vries RRP, Hongming F, Van leeusen A, Renbio C, Ganyun Y, 1985. HLA-linked Control of predisposition to lepromatous leprosy. **Int J Lepr**, 53: 56-63.
- Kim SJ, Choi IH, Dahlberg B, Nispores, Kim JD, Hansen JA, 1987. HLA and leprosy in Koreans, **Tissue Antigens**, 29: 146-153.

- Kikuchi I, Ozawa T, Hirayama K, Sasazuki T, 1986. An HLA-linked gene controls susceptibility to lepromatous leprosy through T cell regulation. **Lepr Rev Suppl**, 2: 139-142.
- Kikuchi I, Ozawa T, Sasazuki T, 1987. Immunogenetic Analysis of Leprosy in Japan. **Tissue Antigens**, 29: 662-663.
- Klatser PR, Janson AM, Thole JER, Buhner S, Bos C, Soebono H, De Vries RRP, 1997. Humoral and cellular reactivity to recombinant M. Leprae antigens in HLA-typed Leprosy patients and healthy controls. **Int J Lepr**, 65: 178-189.
- Kuby J, 1992. Major Histocompatibility Complex in Immunology. 1st Ed., New York: WH Freeman and Company, pp. 209-211.
- Lagrange PH and Abel L, 1996. Human genetic susceptibility to leprosy. **Acta Leprologica**, 10: 11-27.
- Lee KS, Youl OK, Wok RY, 1994. Correspondence, Detection of Mycobacterium leprae in tissue and blood by Polymerase Chain Reaction. **Int J Lepr**, 62: 139-140.
- Levee G, Liu J, Gicquel B, Chanteau S, Schurr E, 1994. Genetic control of susceptibility to leprosy in French Polynesia, no evidence for linkage with marks on telemetric human chromosome 2. **Int J Lepr**, 62(4): 499-511.
- Lucas SB and Ridley DS, 1989. Editorial. The use of histopathology in Leprosy diagnosis and research. **Lepr Rev**, 60: 257-262.
- Mattiuze PI, Ihde D, Piazaa A, Cepellini R, Bodmer W, 1970. New approach to the HLA system In : Histocompatibility, 1970. Edited by Terasaki, published by Munchksgard, Copenhagen, pp. 193-205.
- Massoud A, Nikbin B, Nazari GR, Syadat NA, Ala F, 1978. A Study of cell-mediated immunity and histocompatibility antigens in leprosy patients in Iran. **Int J Lepr**, 46: 149-153.
- Mc Devitt HO and Bodmer WF, 1974. HLA, Immuno-response genes and disease. **Lancet**, June 22, 1269-1274.
- Mehra NK, Rajalingan R, Mitra DK, Tanya V, Giphart MJ, 1995. Variants o HLA-DR 2/DR 51 Group Haplotypes and Susceptibility to Tuberculoid Leprosy and Pulmonary Tuberculosis in Asian Indians. **Int J Lepr**, 63: 241-248.
- Miller WV and Rodey G, 1981. HLA without tears. American Society of Clinical Pathologist. Educational Products Division, Chicago, U.S.A.

- Modlin RL and Rea TH, 1991. New insight to immunopathology of leprosy. *J Am Acad Dermatol*, 17(1): 1-15.
- Moeslichan S Mz, 1990. Penelitian sistem HLA dalam upaya memperoleh sumber antibodinya. **Disertasi**. Universitas Indonesia.
- Munro B, 1986. *Statistical Methods for health and care research*, J.P Lippincott Comp, Philadelphia, pp. 115 - 120.
- Mutis T, Cornelisse YE, Ottenhoff TH, 1993. Mycobacteria induce cd4+ T cells that are cytotoxic and display Th1-like cytokine secretion profile: heterogeneity in cytotoxic activity and cytokine secretion levels. *Eur J Immunol*, 23(9): 2189-2195.
- Nakajima S, Kobayashi M, Nohara, Sato S, 1997. HLA Antigen and Susceptibility to Leprosy. *Int J Lepr*, 45: 273-277.
- Noordeen SK, 1994. Elimination of Leprosy. as a public Health Problem. *Int J Lepr*, 62: 278-283.
- Ottenhoff THM and De Vries RRP, 1987. HLA class II immune response and suppression genes in leprosy. *Int J Lepr*, 55: 521-534.
- Ottenhoff THM, 1994. Editorials. Immunology of Leprosy: Lessons from and for leprosy. *Int J Lepr*, 62: 108-121.
- Panigoro R, Trejaut J, Sullivan J, Dunkley H, 1995. HLA and ABO gene polymorphism's in Indonesian people. Proc. Second. Pacific Conference on medical genetics and Eijkman Symposium on the molecular biology of disease. Jakarta, 19-23 September.
- Rafi A, Donoghue HD, Stanford JL, 1995. Application of Polymerase Chain Reaction for the detection of Mycobacterium Leprae DNA in specimens from treated Leprosy patients. *Int J Lepr*, 63: 42-46
- Rani R, Fernandez-Vina MA, Zaheer SA, Beena KR, Stastny P, 1993. Study of HLA class II alleles by PCR ologtyping in leprosy patients from North India. *Tissue Antigens*, 42:133-137.
- Rawlinson WD, Basten A, Britton WJ, Serjeantson SW, 1988. Leprosy and immunity : Genetics and immune function in multiple case families. *Immunol Cell Biol*, 66: 9-21.
- Rea TH, Levan NE, Terasaki PI, 1976. Histocompatibility Antigens in Patients with Leprosy. *J Infect Dis*, 134: 615-618.

- Rea TH and Terasaki PI, 1980. HLA-DR antigens in tuberculoid and lepromatous leprosy. *Lepr Rev*, 51(2): 117-23.
- Ridley DS and Jopling WH, 1966. Classification of leprosy according to immunity; a five group system, *Int J Lepr*, 34: 253-273.
- Ridley DS, 1976. Skin biopsy in leprosy. Documenta Geigy. Second Edition.
- Ridley DS, 1988. Pathogenesis of leprosy and related diseases. Wright, Butterworth & Co. Ltd. London, Boston, Singapore, Sydney. Toronto, Wellington.
- Rusdi A, 1992. Peranan HLA dalam ilmu kedokteran dan beberapa problematik test HLA pada populasi Indonesia, lokakarya HLA, Bandung.
- Salgame PR and Birdi TJ, 1991. Role of macrophage in defective cell mediated immunity in lepromatous leprosy. *Int J Lepr*, 48: 172-181.
- Santos AR, Nery JC, Nadia C, Maria EN, 1997. Use of The Polymerase Chain Reaction in the diagnosis of Leprosy. *J Med Microbiol*, 46: 170-172.
- Sastroasmoro S dan Ismael S, 1995. Dasar-Dasar metodologi penelitian klinis. Binarupa Aksara Jakarta, 1995.
- Schauf V, Ryan S, Scollard D, Jonasson O, Brown A, Nelson K, Smith T, Vithayasai V, 1985. Leprosy associated with HLA-DR 2 and DQW 1 in the population of northern Thailand, *Tissue Antigens*, 26: 243-247.
- Schwartz BD, 1994. The Human Major Histocompatibility, Human Leucocyte Antigen (HLA) Complex in Basic and Clinical Immunology, 7th Edition. Stites, DP, Terr, AI Prentice-Hall International Inc., New Jersey, USA. pp., 45-60.
- Seckl MJ, 1985. Editorial Monoclonal Antibodies and Recombinant DNA technology: Present and Future uses in Leprosy and Tuberculosis. *Int J Lepr*, 53: 618-640.
- Sehgal A and Sharma RN, 1989. Leprosy: a sero-immunological and histochemical evaluation. *Lepr Rev*, 65: 167-174.
- Serjeantson SW, 1983. HLA and susceptibility to Leprosy. *Immunol Rev*, 70: 89-111.
- Shields ED, Russell DA, Pericak-Vance MA, 1987. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *Am Soc Clin Invest*, 79: 1139-1143.

- Smith DG, 1979. The genetic hypothesis for susceptibility to lepromatous leprosy. **Hum Gen**, 50: 163-177.
- Smith DG, Blumberg BS, Guinto RS, 1978. Genetics in leprosy. In a window on leprosy. Chatterjee, BR Gandhi Memorial Leprosy Foundation, Wardha, India.
- Soebono H, 1996. Infeksi subklinis Mycobacterium leprae dan hubungannya dengan faktor-faktor resiko di Indonesia. Kajian seropidemiologik dan imunogenetik. **Disertasi**. Universitas Gajah Mada.
- Soebono H, Giphart MJ, Schreuder GMT, Klatser PR, De Vries RRP, 1997. Association between HLA-DRB, Alleles and Leprosy in an Indonesian Population. **Int J Lepr**, 65: 190-196.
- Spickett SG, 1962. Genetics and the epidemiology of leprosy. **Lepr Rev**, 33(2): 76-93
- Spickett SG, 1964. Genetic Mechanisms in leprosy in theory and practice. Cochrane, RG and Frank Davey T, Wright, Bristol. The Williams and Wilkins Company, 2nd Edition, pp. 98-124.
- Steinmann JL and Young DB, 1991. Cell mediated immunity in patients with leprosy. **Lancet**, 2: 243-246.
- Stites DP and Terr AI, 1991. Basic and Clinical Immunology, 7th Edition. A large medical book. Prentice-Hall International Inc. pp. 45-60.
- Suryo, 1997. Genetika. Gajah Mada University Press.
- Svejgaard A, Ryder LP, 1994. HLA and disease associations : Detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, 43: 18 - 27.
- Thorsby E, Godal T, Myrvang B, 1973. HLA antigens and susceptibility to disease. II. Leprosy. **Tissue Antigens**, 3(5): 373-7.
- Tiwari JL and Terasaki PI, 1985. HLA and Disease Associations, Springer - Verlag. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
- Todd JR, West BC, McDonald JC, 1990. Human Leucocyte antigen and Leprosy: Study in Northern Louisiana and Review. **Rev Infect Dis**, 12: 63-74.
- Van Eden W, De Vries RRP, Mehra NK, Vaidya MC, D'Amato JD, Van Rood JJ, 1980. HLA Segregation of Tuberculoid leprosy: Confirmation of the DR 2 marker. **J Infect Dis**, 141: 693-701.

- Van Eden W and De Vries RRP, 1984. Occasional Review-HLA and Leprosy's : a re-evaluation. **Lepr Rev**, 55: 89-104.
- Van Eden W, Gouzales NM, De Vries RRP, Corivit J, Van Rood JJ, 1985. HLA-linked control of predisposition to lepromatous Leprosy. **J Infect Dis**, 151: 9-14.
- Visentainer JEL, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PRF, Petzl-Erler ML, 1997. Association of leprosy with HLA-DR 2 in Southern Brazilian population. **Braz J Med Biol Res**, 30: 51-59.
- Walker RH, 1987. The Major Histocompatibility Complex. *Lab. Medica*, pp. 13-17.
- WHO, 1990. Leprosy and genetics. WHO/CDS/LEP/90.1.
- WHO, 1994. World distribution, past and present.
- Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Locker D, Watson JD, 1990. The use of a specific DNA Probe and Polymerase Chain Reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J Infect Dis**, 162: 193-200.
- Youngchaiyud U, Chandanayingyong, Vibhatavanija T, 1977. The incidence of HLA antigens in Leprosy. **Vox Sang**, 32: 342-345.

PROSES PENCAIRAN (THAWING)

Berhubung sampel yang akan diteliti adalah sel limfosit yang telah dibekukan (*Frozen cells*) didalam Nitrogen cair, maka harus dilakukan pencairan lebih dulu, melalui prosedur sebagai berikut :

1. Siapkan media 4 ml 5% FCS dalam RPMI 1640 dalam suatu sentrifus tube. Letakkan tube diatas pecahan es batu, suhu 4°C.
2. Setelah kira-kira 30 menit, ambil cryotube yang berisi sampel dari dalam tanki Nitrogen cair, lalu cairkan sel melalui pengocokkan perlahan-lahan didalam waterbath 37°C, sampai cair seluruhnya. Secepatnya transfer sampel sel limfosit ke dalam sentrifus tube yang berisi media. Lalu pusingkan selama 5 menit dengan kecepatan 400 g.
3. Buang supernatant lalu resuspensi sel ke dalam 0,5 ml FCS 5%. Tambahkan 1 tetes sel pada 1 tetes Trypan blue (BDH 34078), lalu hitung jumlah sel dan viability sel dengan haemocytometer.
4. Setelah dihitung, cuci sel dan dilusi sel dengan 5% FCS, sehingga konsentrasi sel $1-2 \times 10^6$.

**CARA ISOLASI DNA
DENGAN METODE SALTING OUT**

1. Cairkan limfosit beku (*frozen cells*) pada suhu kamar.
2. Transfer sel kedalam 10 ml conical centrifuge tubes, lalu cukupkan volume dengan RPMI + 5% FCS.
3. Putar supernatan dengan kecepatan 1200 rpm.
4. Ambil supernatan dan cuci sel dengan PBS.
5. Ulangi step 3 dan 4.
6. Ambil supernatan.
7. Tambahkan 3 ml SE buffer 1 x, 15 μ l Proteinase K (10 mgr/ml) dan 300 μ l SDS 10%.
8. Kocok, inkubasi 56⁰C, semalam.
9. Dinginkan, tambahkan 1/3 volume NaCL 6 M (\pm 1220 μ l), kocok.
10. Putar 5000 rpm selama 10 menit.
11. Ambil supernatan.
12. Tambahkan 2 x volume Ethanol absolut dingin, bolak balik sampai terlihat gumpalan DNA.

13. Ambil DNA dengan menggunakan spatula, masukkan dalam tabung steril yang telah diisi 1 ml ethanol 70% dingin.
14. Kocok, putar 5000 rpm, 10 menit.
15. Buang supernatan, keringkan tabung.
16. Larutkan endapan dengan 400 μ l aquadestilata.
17. Inkubasi pada 37⁰C selama 30 menit.
18. Beri label dan simpan dalam -20⁰C.

CATATAN :

Bila kita start dengan fresh limfosit (*whole blood*), maka inilah prosedurnya :

- a. 5 ml darah EDTA tambahkan 15 ml Erylysis buffer (EL buffer) 1 x.
- b. Kocok, inkubasi dalam lemari es 4⁰C, 1 jam.
- c. Putar 5000 rpm selama 10 menit, buang supernatan.
- d. Ulangi step a sampai step c, sampai endapan menjadi putih.
- e. Endapan dicuci dengan 10 ml larutan Phosphat buffer (PBS).
- f. Step selanjutnya lihat lampiran protokol. Mulai dengan step 7 sampai selesai.

PENILAIAN KUALITAS DNA

1. Persiapkan agarose gel 2%, timbang 2 gram agarose, tambah 200 ml buffer TAE 1 x, panaskan 5 menit.
2. Dinginkan sampai suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$.
3. Tambahkan 20 μl Ethidium bromida, aduk-aduk hingga rata.
4. Cetak dalam cetakan agar (16 x 20cm) dengan tebal $\frac{1}{2}$ - 1 cm, dinginkan lalu masukkan kedalam Electrophoresis (EP) set.
5. Campur 2 μl loading buffer dan 7 μl isolat DNA.
6. Masukkan campuran dalam lubang cetakan. Masukkan juga kontrol DNA yang telah diketahui kualitas dan kuantitasnya.
7. Nyalakan EP 200 V, 250 mA selama 30 menit.
8. Baca hasilnya dengan transiluminator.
9. Foto dengan kamera polaroid.
10. Bandingkan hasilnya dengan DNA kontrol.

Lampiran 4

**CARA PEMERIKSAAN GEN HLA-DRB
DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION - SEQUENCE*
*SPEKIFIK OLIGONUCLEOTID (PCR-SSO) REVERSE DOT BLOT***

Persiapan

1. Beri tanda sejumlah tabung PCR, taruh dalam lempeng PCR.
2. Masukkan 50 μ l *master mix* (10% glicerol, KCl, < 0.001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, blotinylated pemicu, < 0.001% Amp Erase, 0.01% Tag polymerase, 0.05% (sodium azide) pada setiap tabung.
3. Tambahkan 9 μ l $MgCl_2$ 25 mM.
4. Masukkan isolat DNA 5 μ l.
5. Tambahkan air destilata (d. water) sampai volume 100 μ l..

Amplifikasi

1. Letakkan lempeng dalam *thermal cycler* Perkin Elmer 9600.
2. Program PCR :
Hold program : 2 menit 50°C
Cycle program : 15 detik 95°C, 45 detik 60°C, 15 detik 72°C (35 siklus)
Hold program : 5 menit 72°C
Hold program : 7°C
3. Jalankan program yang akan berlangsung \pm 2 jam.
4. Angkat lempeng dari mesin PCR, buka tutupnya.
5. Tambahkan segera 100 μ l larutan denaturasi.
6. Inkubasi dalam suhu kamar selama 10 menit.

Persiapan buffer untuk deteksi

1. Buatlah buffer hibridisasi (WHB) yaitu 100 ml konsentrat SSPE ditambah 945 ml air destilata dan 5 ml larutan SDS.

2. Bagi *Wash Buffer* menjadi 2 bagian yaitu 300 ml *stringent wash buffer* (SWB) dan 700 ml *ambient wash buffer* (AWB).
3. Buatlah buffer sitrat (WCB) yaitu 30 ml konsentrasi sitrat ditambah 570 ml air destilata.

Deteksi

1. Panaskan WHB dan SWB pada 50°C.
2. Panaskan seluruh reagen pada suhu kamar.
3. Persiapkan *shaking waterbath* pada 50°C.
4. Dengan menggunakan forsep ambil sejumlah HLA-DRB *typing strip*. Beri tanda pensil, letakkan strip dalam sumuran lempeng.
5. Tambahkan 3 ml buffer hibridisasi pada setiap sumur.
6. Tambahkan 70 µl spesimen sampel (DNA yang telah diamplifikasi dan didenaturasi). Tutup lempeng goyang supaya tercampur.
7. Inkubasi lempeng 30 menit 50° C pada *shaking water bath* 60 rpm.
8. Angkat lempeng, buang larutan dan keringkan lempeng.
9. Tambahkan 3 ml AWB. Goyang-goyang beberapa detik, buang larutan.
10. Tambahkan 3 ml SWB pada setiap sumur. Inkubasi 15 menit 50°C pada *shaking water bath*.
11. Siapkan *working conjugate solution* (WCS).
12. Campurkan 3,3 ml AWB dengan 10 µl SA-HRP (*Streptavidin-Horse Radish Peroxidase*) untuk setiap strip yang akan diperiksa. Jangan disiapkan lebih dari 15 menit sebelum digunakan.
13. Angkat lempeng dari *water bath*, buang larutan. Tambahkan 3 ml larutan WCB dan letakkan lempeng pada *orbital shaker* selama 15 menit.
14. Angkat lempeng, buang larutan. Cuci strip dengan 3 ml AWB dua kali selama 5 menit.
15. Angkat lempeng, buang larutan. Tambahkan 3 ml buffer sitrat. Taruh pada orbital shaker selama 5 menit pada suhu kamar.

16. Sipakan *working substrat* (campur substrat A dan substrat B) dengan perhitungan :
Substrat A (2,4 ml x strip) + 2,4 ml. Jangan disiapkan lebih dari 3 jam sebelum dipergunakan. Tutup rapat, hindari sinar.
17. Angkat lempeng, buang larutan. Tambahkan 3 ml *working substrat*. Tutup lempeng letakkan pada *orbital shaker* selama 10-20 menit suhu kamar. Warna biru akan terjadi pada *bands* yang mengikat urutan DNA sasaran yang spesifik.
18. Angkat lempeng dan buang seluruh larutan. Cuci strip dua kali dengan 5 ml air destilata selama 5 menit.
19. Tambahkan 3 ml buffer sitrat.

Interpretasi hasil

Interpretasi hasil pada setiap strip dilakukan secara manual dengan membandingkannya pada tabel HLA-DRB yang telah tersedia atau menggunakan komputer dengan program khusus.

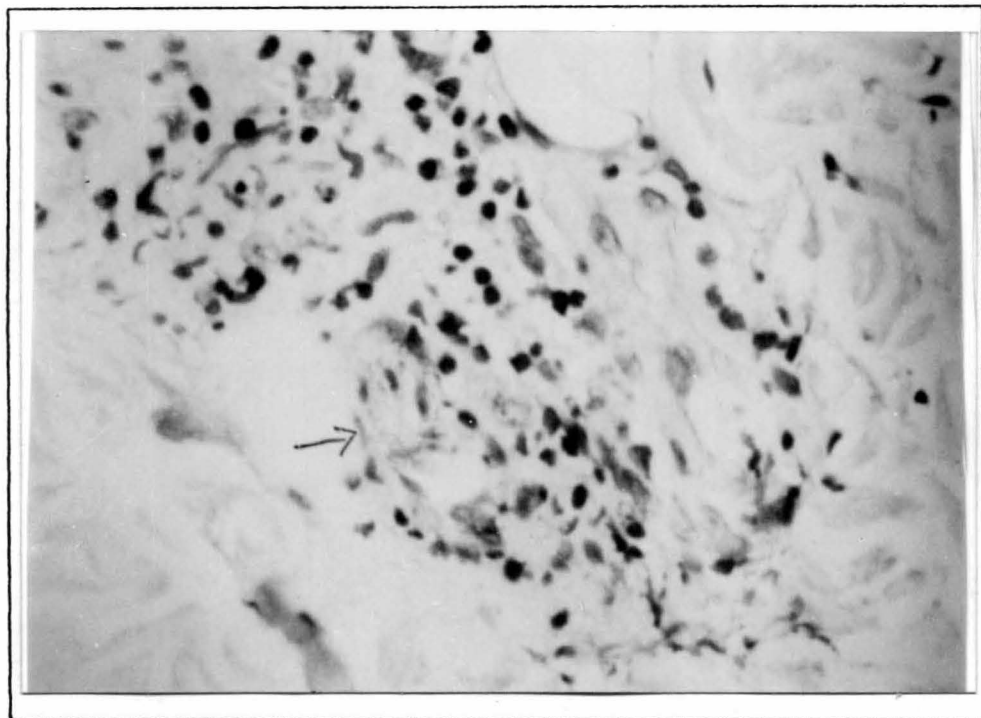
Lampiran 5

PROSEDUR KERJA PEWARNAAN LAM-B

1. Irisan jaringan yang sudah di deparafinisasi, dicuci dengan distilled water 5 menit.
2. Masukkan slide ke dalam moist chamber plastic box (wet box), kemudia tetesi dengan 3% Hydrogen Peroxida (H_2O_2) dalam larutan distillaed water untuk memblokir aktivitas endogenous peroxidase. Inkubasikan selama kira-kira 20 menit.
3. Irisan selanjutnya dicuci 3 x dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 0,01 M, PH=7,4 – 7,5 selama 3 x 5 menit.
4. Dilakukan proses blocking dengan normal serum (mouse) buatan Histofine, Nichirel Crop., Japan, lot. No. H. 302, lalu diinkubasikan selama 15 menit.
5. Kelebihan serum pada jaringan dikeringkan dengan kertas isap.
6. Irisan lalu diinkubasikan selama 30 menit, tetap dalam Moist Chamber, dengan Primary anti serum yang diencerkan dengan PBS. Antisera yang digunakan adalah cow antisera protein (lot No. 026, code z 311, Dakopatts, Denmark) at 1 : 1000 dilution, mouse antisera to glyco-conjugate (NT-P-KLH), yang mempunyai spesifitas yang sama dengan PGL-1 at 1 : 7500 dilution (Fujirebio Inc. Japan) dan untuk pewarnaan LAM-B, dipakai monoclonal antibody to M. Tuberculosis H 37 Ra Strain at 1 : 4000 dilution (Dakopatts, Denmark).
7. Irisan lalu ditetesi 3 x dengan PBS selama waktu kira-kira 10 menit.

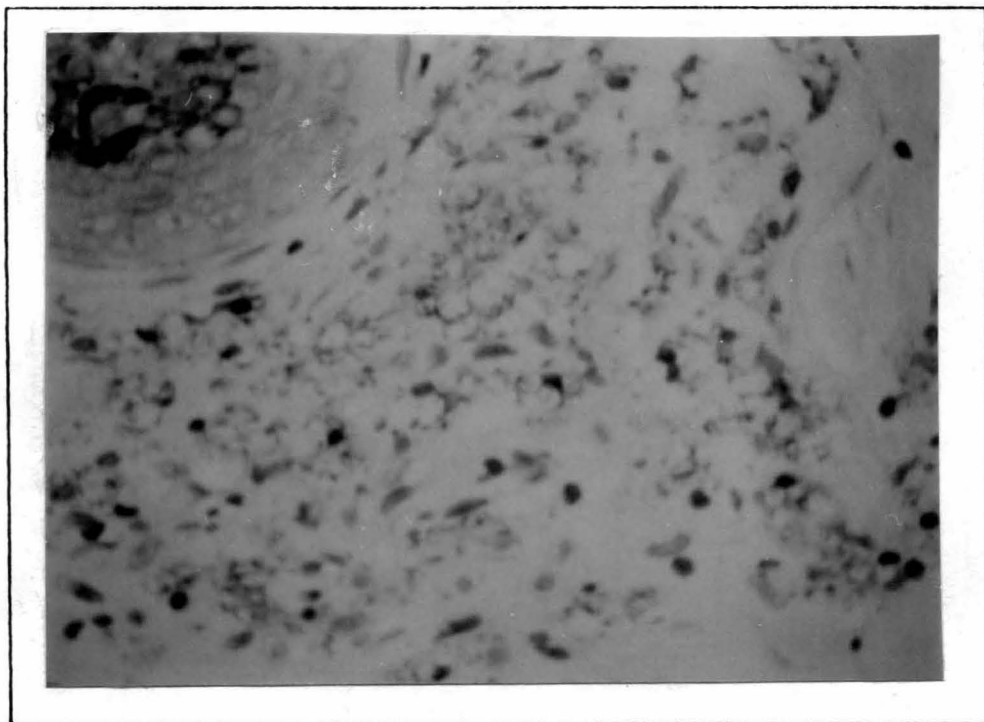
8. Irisan lalu ditetesi dengan 1 tetes diluted biotinylated secondary antibody solution (Histofine, Nichirei Corp., Japan, lot. No. H. 306) lalu dicuci seperti Step 6.
9. Irisan diinkubasikan lagi selama 5 menit dengan Reagens Vactasin Elite ABC, yaitu : SAB-PO (Streptomycin – Avidin – Biotin-Peroxidase), lalu dicuci seperti step 6.
10. Inkubasi irisan selama 5 menit dengan larutan peroxidase yang mengandung Diamino Benzidine Tetra Chloride (DAB), yang baru dibuat (*freshly prepared*), yaitu : DAB 2 ml + 0,03% H₂O₂ 10 ml + Dist. Water 10 ml, sehingga timbul warna coklat sebagai tanda karakteristik aktivitas.
11. Irisan lalu dicuci selama 5 menit di air mengalir, lalu terakhir dibilas dengan aquades.
12. Irisan diwarnai dengan Mayer's Hematoxyllin sebagai Counter-Staining selama 5 menit, lalu dicuci air mengalir seperti step No. 10.
13. Irisan dikeringkan pada suhu 37⁰C, diikuti clearing dalam xylene dan mounting dalam balsam.

LAMPIRAN 6A HASIL PEWARNAAN IMUNOHISTOKIMIA LIPOARABINO-
MANNAN-B (LAM-B) UNTUK DIAGNOSIS PENYAKIT
LEPRA



GAMBAR 1 : Pada Lepra tipe TT terlihat reaksi positif lemah (warna coklat pucat pada cytoplasma sel) dengan antibodi monoklonal Lam-B, Parafin Section, DAB dengan H.E. Counterstain (x 200)

LAMPIRAN 6B



GAMBAR 2 : Reaksi positif kuat berupa warna coklat terang didalam foam sel granuloma, hal ini ditemukan pada lepra tipe LL. Parafin Section, DAB dengan H.E. Conterstain (x 200)



A WORLD OF DIFFERENCE

1996

Broad Specificities: Splits, Associated Antigens and Inclusions

157

LAMPIRAN 8

Original Broad Specificities

A2
A9
A10
A19
A28
B5
B7
B12
B14
B15
B16
B17
B21
B22
B27
B40
B70
Cw3
DR1
DR2
DR3
DR5
DR6
DQ1
DQ3
Dw6
Dw7

Splits and Associated Antigens

A203#, A210#
A23, A24, A2403#
A25, A26, A34, A66
A29, A30, A31, A32, A33, A74
A68, A69
B51, B52, B5102#, B5103#
B703#
B44, B45
B64, B65
B62, B63, B75, B76, B77
B38, B39, B3901#, B3902#
B57, B58
B49, B50, B4005#
B54, B55, B56
B2708#
B60, B61
B71, B72
Cw9, Cw10
DR103#
DR15, DR16
DR17, DR18
DR11, DR12
DR13, DR14, DR1403#, DR1404#
DQ5, DQ6
DQ7, DQ8, DQ9
Dw18, Dw19
Dw11, Dw17

Public Specificities, Inclusions/Associations

Bw4: B5, B13, B17, B27, B37, B38(16), B44(12), B47, B49(21), B51(5), B5102, B5103, B52(5), B53, B57(17), B58(17), B59, B63(15), B77(15)

and A9, A23(9), A24(9), A2403, A25(10), A32(19)

Bw6: B7, B703, B8, B14, B18, B22, B2708, B35, B39(16), B3901, B3902, B40, B4005, B41, B42, B45(12), B46, B48, B50(21), B54(22), B55(22), B56(22), B60(40), B61(40), B62(15), B64(14), B65(14), B67, B70, B71(70), B72(70), B73, B75(15), B76(15), B78, B81

DR51: DR2, DR15(2), DR16(2), DR1(rare)

DR52: DR3, DR5, DR6, DR11(5), DR12(5), DR13(6), DR14(6), DR1403, DR1404, DR17(3), DR18(3)

DR53: DR4, DR7*, DR9

* DR53 is not always expressed with DR7

DR1, DR8, DR10, DR103 are not associated with a public specificity.

Pel-Freez®

CLINICAL SYSTEMS



A WORLD OF DIFFERENCE

158

LAMP IRAN 9

1996 HLA-DR Antigens and DRB* Alleles

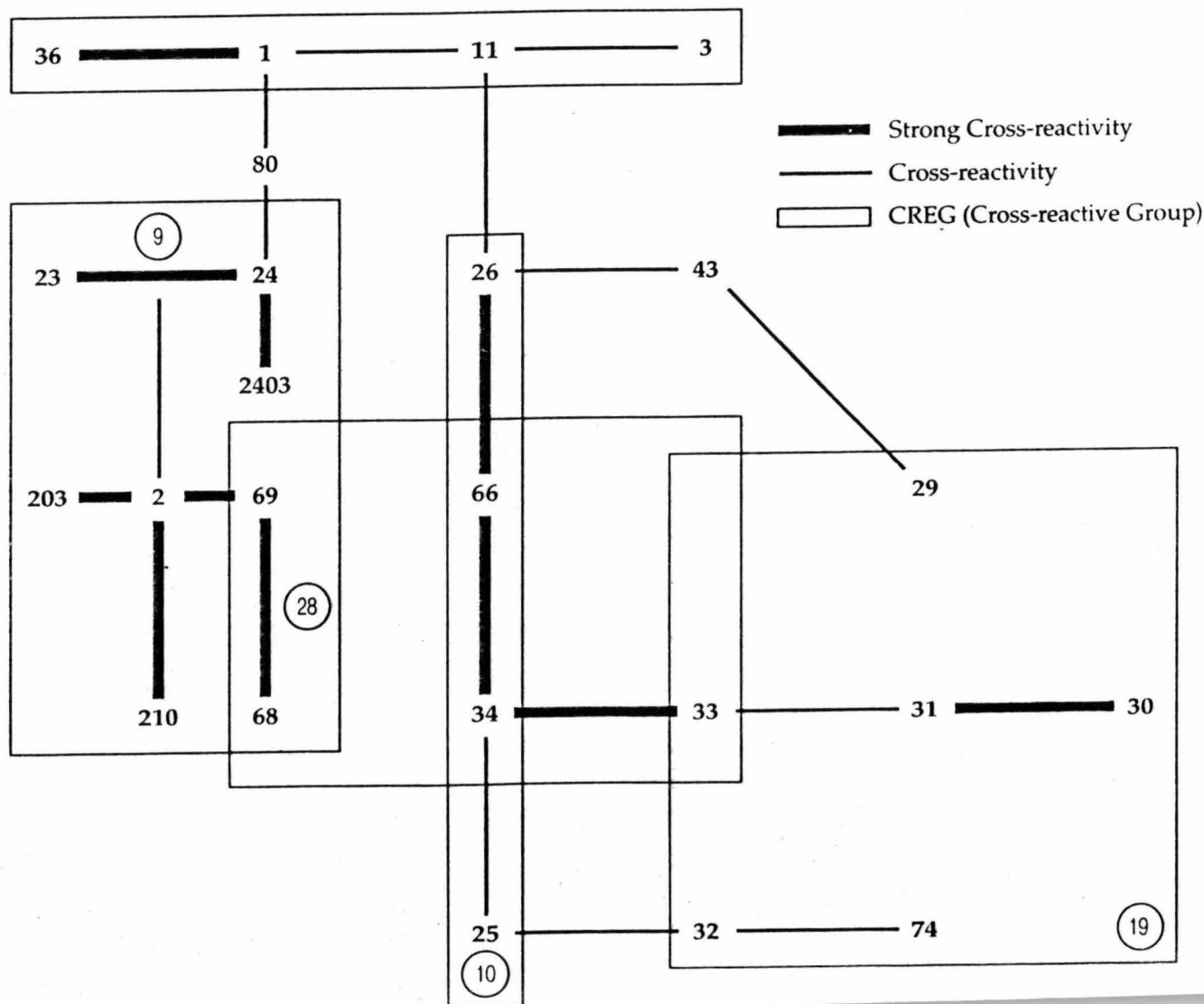
Serology Defined Antigen	Serology Defined Split	DNA Defined DRB1* Allele
DR1 DR103		0101 0102 0104 0103
DR2	DR15 DR16	1501-1505 1601-1605
DR3 DR3(a)	DR17 DR18	0301 0304 0305 0302 0303 0306-0309
DR4		0401-0423
DR5	DR11 DR12	1101-1127 1201-1204
DR6 DR1403 DR1404	DR13 DR14	1301-1312 1314-1324 1401 1402 1405-1425 1403 1404
DR7		0701
DR8		0801-0814
DR9		0901
DR10		1001
DR51	DRB5*	0101-0105 0201-0203
DR52	DRB3*	0101 0201-0205 0301
DR53	DRB4*	0101-0104



Cross-Reactivity HLA-A Locus

159

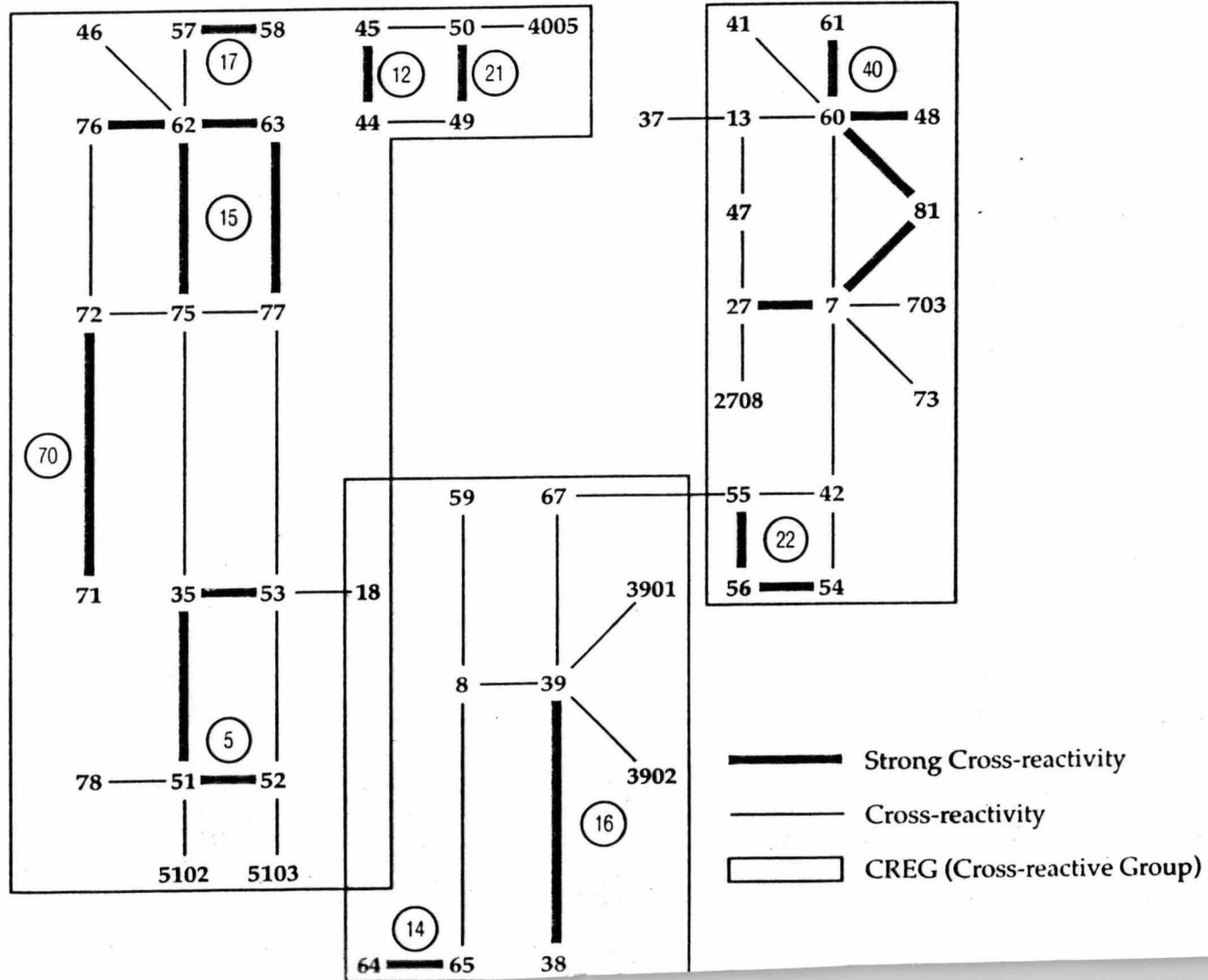
LAMP IRAN 10





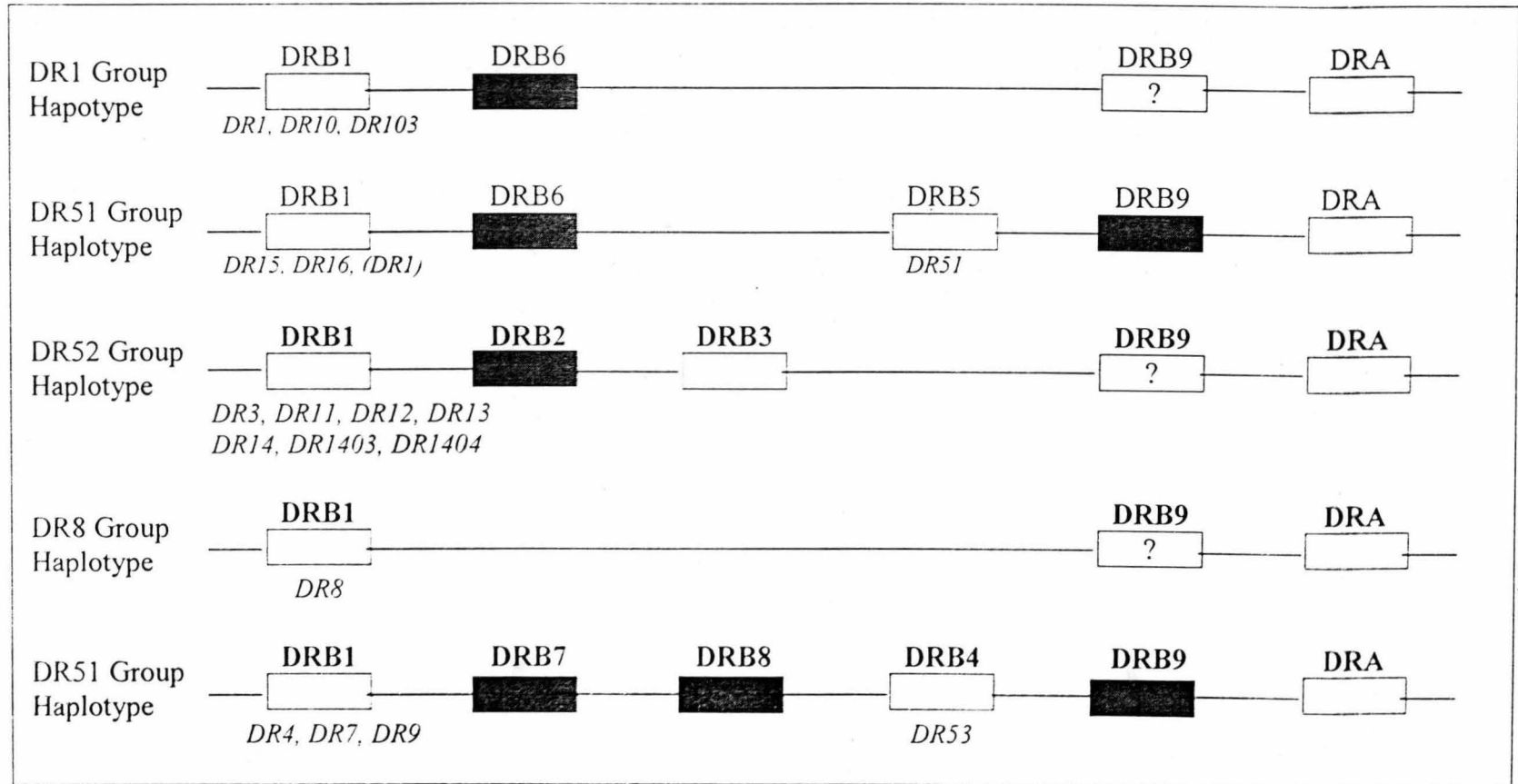
A WORLD OF DIFFERENCE

Cross-Reactivity HLA-B Locus



Lampiran 12

GENOMIC ORGANIZATION OF THE HLA-DR REGION AND ENCODES PRODUCTS (SPECIFICITIES)



Lampiran 13A.

**DAFTAR PEMICU DAN PELACAK HLA-DRB RESOLUSI RENDAH
AMPLICOR HLA-DRB 29 PROBE**

1.	W-L-F@9	—————>	TGG	CAG	CTT	AAG	TTT	
2.	W-P-R@9	—————>	TGG	CAG	CCT	AAG	AGG	
3.	YSTS@9	—————>	TAC	TCT	ACG	TCT		
4.	V-H@9	—————>	TTC	CTG	GAA			
5.	GYK@11	—————>	AAG	GAC	CTC			
6.	YSTG@9	—————>	GAC	ATC	CTG	GAG		
7.	K-D-F@9	—————>	GAA	GAC	AGG	CGC	GCC	
8.	EV@10	—————>	GTG	AGA				
9.	F-E-H@26	—————>	TAG	GGG	GTT	GGT	GAG	
10.	Y-D-Y@26	—————>	GAC	TTC	GTT	GTG	GCG	
11.	F-E-Y@26	—————>	TAC	GGT	GTG	GAG	AGC	
12.	F@37	—————>	AAC					
13.	N@37	—————>	CTA					
14.	E@58	—————>	CCC					
15.	A--H@57	—————>	GGT	TCG	TGT	ACA		
16.	S@57	—————>	GAT					
17.	K-GR@71	—————>	ACT	CTA	CGT	GTC		
18.	I--DE@67	—————>	AAG	TCT	CGG	AGT	GTT	
19.	QRR@70	—————>	TCT	GAG	TGT			
20.	K@70	—————>	GAC					
21.	LL@37	—————>	CCG	CCG				
22.	L@74	—————>	CAG					
23.	AV@86	—————>	TAC	GGG				
24.	LR-S@10	—————>	CTG	GAA	GAC	GAG		
25.	L--S@10	—————>	GGA	CAT	CCT	GGA		
26.	A-YN--L@38	—————>	TAC	GGG	GTT	GTG	GAG	AGC TT
27.	Q-D-Y@9	—————>	GAC	TTC	GTC	GAA	GAC	
28.	D@30	—————>	TCC					
29.	Control							

Lanjutan DRB1* 15-16

SSO	URUTAN BASA 5' ----> 3'	SANDI
1201, 1202 1203 1204	} GAC ATC CTG GAG	YSTG@9
1301, 1302, 1316 1303, 1312, 1321 1304 1305, 1306, 1309, 1310, 1320 1307, 1311, 1314, 1324 1308 1315 1317 1318 1319 1322, 1323	} TAC TCT ACG TCT GAC ATC CTG GAG } TAC TCT ACG TCT	YSTS@9 YSTG@9 YSTS@9
1401, 1407, 1408, 1422 1402, 1406 1403, 1412 1404 1405, 1414, 1423 1409, 1417 1410 1411 1413 1416 1418, 1424, 03022 1419 1420 1421 1425	} TAC TCT ACG TCT GAC ATC CTG GAG } TAC TCT ACG TCT TTC CTG GAA GAC ATC CTG GAG } TAC TCT ACG TCT	YSTS@9 YSTG@9 YSTS@9 V-H@9 YSTG@9 YSTS@9
0701	AAG GAC CTC	GYK@11
0801, 0803, 0806, 0810 0802, 0804, 0807, 0813 0805 0808 0809, 1415 0812 0901	} GAC ATC CTG GAG	YSTG@9

DRB3*

SSO	URUTAN BASA 5'----> 3'	SANDI
1001	GTG AGA	EU@10
0101	GAC TTC GTT GTG GCG	Y-D-Y@26
0201-0204	TAG GGG GTT GGT GAG	F-E-H@26
0205	} TAC GGT GTG GAG AGC	F-E-Y@26
0301		

DRB4*

SSO	URUTAN BASA 5'----> 3'	SANDI
0101-0103	TAC GGG GTT GTG GAG AGC	A-YN--L@38

DRB5*

SSO	URUTAN BASA 5'----> 3'	SANDI
0101	} GAC TTC GTC GAA GAC	Q-D-Y@9
0102, 0103, 0203		
0104		
0201, 0202		

Lampiran 14

FORMULIR PERSETUJUAN

Dengan ini saya

Nama :

Umur : Tahun

Jenis Kelamin :

Suku :

Pekerjaan :

Alamat :

Setelah memperoleh keterangan yang lengkap dan jelas serta menyadari sepenuhnya tentang manfaat dan resiko penelitian yang berjudul : **"Pengaruh Pola HLA Pada Kerentanan Tubuh Terhadap Penyakit Lepra"** dengan suka rela menyetujui diikutsertakan dalam penelitian ini dengan catatan apabila sewaktu-waktu merasa dirugikan dalam bentuk apapun berhak membatalkan persetujuan ini.

Ujung Pandang,

1997

Mengetahui,
Yang memberi keterangan

Yang menyetujui,
Peserta penelitian

Dr. Johanna Mantu Kandouw, Sp.PA _____

Lampiran 15

PENELITIAN HLA-LEPRA**Formulir Penderita**

Lokasi : _____ Tanggal : _____
 No. Panel : _____
 Suku : _____

Identitas

Nama : _____
 Jenis Kelamin : 1. Perempuan 2. Laki-laki
 Pendidikan : 1. Tidak Sekolah 2. Madrasah/Pesantren
 3. SD 4. SMP 5. SMA
 6. Perguruan Tinggi
 Pekerjaan : 1. Petani 2. Wiraswasta
 3. Ibu Rumah Tangga 4. Pegawai Negeri
 5. Pegawai Swasta 6. Tidak Bekerja
 7. Buruh
 Alamat : _____
 Status dalam keluarga : 1. KK 2. Isteri 3. Anak
 4. Orang Tua 5. Orang Lain

Anamnesis**Riwayat Penyakit**

Lamanya sakit : _____ bulan/tahun.
 Pernah dirawat di Rumah Sakit : 1. Ya 2. Tidak Berapa lama : _____
 Jenis Lepra yang diderita : 1. TT 2. BT 3. BB 4. BL
 5. LL 6. Tidak Tahu
 Sumber Kontak : 1. Ada 2. Tidak 3. Tidak Tahu

Pemeriksaan Klinis

- Ditemukan lesi kulit yang khas : 1. Tunggal 2. Multiple 3. Infiltratif
4. Tanda lain jelaskan : _____
- Ada gangguan sensasi kulit : 1. Samar-samar, 2. Jelas
3. Gejala lain dijelaskan : _____
- Penebalan saraf tepi predileksi : 1. Ada 2. Tidak
- Lokasi Sebutkan : _____
- Nyeri tekan : 1. Ada 2. Tidak
- BTA dalam sayatan kulit : 1. Positif 2. Negatif

Pemeriksaan Penunjang

- Tes Lepromin (Mitsuda Test) : 1. Negatif 2. + 3. ++ 4. +++
- Pemeriksaan Histopatologik : 1. Ya 2. Tidak
- Hasil : 1. TT/BT 2. LL/BL 3. Tidak jelas
- Diagnosa Klinis : 1. TT/BT 2. LL/BL 3. Bukan lepra

Lampiran 16

PENELITIAN HLA-LEPRA**Formulir Kontrol**

Lokasi : _____ Tanggal : _____
 No. Panel : _____
 Suku : _____

Identitas

Nama : 1. Perempuan 2. Laki-laki
 Pendidikan : 1. Tidak Sekolah 2. Madrasah/Pesantren
 3. SD 4. SMP 5. SMA
 6. Perguruan Tinggi
 Pekerjaan : 1. Petani 2. Wiraswasta
 3. Ibu Rumah Tangga 4. Pegawai Negeri
 5. Pegawai Swasta 6. Tidak Bekerja
 7. Buruh
 Alamat : _____
 Status dalam keluarga : 1. KK 2. Isteri 3. Anak
 4. Orang Tua 5. Orang Lain

Anamnesis**I. Keluarga**

- Suku kedua orang tua
- Bahasa Ibu dan Bahasa sehari-hari yang dipakai
- Perkawinan campuran suku pada keturunan sebelumnya
 1. Ada
 2. Tidak
 3. Tidak tahu

II. Pribadi

- Kontak dengan penderita lepra: 1. Ya 2. Tidak

Bila Ya, sebutkan :

1. Orang Tua 2. Saudara kandung 3. Anak
4. Saudara lain serumah 5. Bukan keluarga
- Pernah menderita penyakit infeksi yang lain : 1. Ya 2. Tidak

Bila Ya, jelaskan :

1. TBC 2. Malaria 3. Lainnya

TERASAKI DRW (60) WELL TRAY, LOT # 33

(CATALOG # DR 60)

07/90 COMPLIMENT

EXP

171

LAST NAME _____ FIRST _____ CENTER _____ INVESTIGATOR _____

BLEEDING DATE _____ SEX _____ RACE _____ AGE _____ ABO _____ DISEASE _____ ANTIGEN GROUPS OBTAINED _____ REMARKS _____

ROW	1						2						3						4						5					
	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F
COL. NO.																														
REACTION																														
GROUP							DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR
SERUM	H 5	ABS	ALS	AOS	AMS	ATS	Y0780	Y0411	Y1458	Y1284	Y1496	Y1595	Y1813	Y1811	D0275	D0269	D0413	Y1287	Y1789	Y1369	Y1964	Y1635	Y0387	Y1640	Y1459	Y0805	D0384	D0416	Y0338	

ROW	6						7						8						9						10					
	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A
COL. NO.																														
REACTION																														
GROUP	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	
SERUM	Y0920	Y0401	Y1015	Y0934	Y1623	Y0841	D0068	Y0779	Y0375	Y2026	Y1962	Y1961	Y1621	Y0636	Y1054	Y1642	Y1542	Y1634	Y1913	Y0267	Y2027	Y0379	Y1019	Y1633	Y0507	Y1205	Y1653	Y1141	Y0330	

LAMPIRAN 17

RECORDING SCALE

- 1 Negative (same visibility as well 1A)
- 2 Doubtful Negative
- 4 Doubtful Positive
- 6 Positive (visibility is noticeably different from well 1A)

TESTING CONDITIONS

Add 1 lambda of lymphocytes (1,000-2,000 cells) and incubate 60 min. with 1 lambda of pre-dotted antibody at 37C. Add 5 lambda of rabbit complement and test.

NEW DESIGNATIONS

- | | |
|---------------|------------------------|
| DR=15 = (DR2) | 1A = Negative Control |
| DR=16 = (DR2) | 1B = Anti-B Lymphocyte |
| DR=17 = (DR3) | 1C = Anti-Lymphocyte |
| DR=18 = (DR3) | 1D = Anti-Granulocyte |
| DX=5 = (DO=1) | 1E = Anti-Monocyte |
| DX=6 = (DO=1) | 1F = Anti-T Lymphocyte |
| DX=7 = (DO=3) | |
| DX=8 = (DO=3) | |



ONE LAMBDA, INC.

2435 Military Avenue
 Los Angeles, CA 90064
 TEL: (213) 478-1001
 TLX 182051
 FAX: (213) 478-1004
 Mfg. by Monoclonal, Inc.

TERASAKI SECOND ILLA (72) WILL TRAY, LOT # 7

(CATALEX #1272)

06/70

COMPLIMENT

EXP

LAST NAME

FIRST

CENTER

INVESTIGATOR

BLEEDING DATE SEX RACE AGE ABO DISEASE ANTIGEN GROUPS OBTAINED REMARKS

ROW	COL. NO.	REACTION	GROUP	SERUM	1	2	3	4	5	6
	A			ZS						
	B			ALS						
	C			X0316	1					
	D			W9837.@0	1					
	E			W8597.B0	36					
	F			W4488	2					
	F			W5259.T0	3					
	E			W9744.OL	9					
	D			W4684.B0	23					
	C			W6726.B0	24					
	B			X0500	10					
	A			W3390.B0	25					
	A			W7186.C0	26					
	B			X0319	34					
	C			X0613	33					
	D			W9655.B0	11					
	E			W6572.B0	11					
	F			X0614	28					
	F			W5260.W0	2					
	E			X0575	19					
	D			W3346	29					
	C			W9636.J0	29					
	B			W8373	31					
	A			W7416.B0	30					
	A			W6755.BA	31					
	B			W9978	32					
	C			X0317	32					
	D			X0321	5					
	E			W8885.C0	49					
	F			W7932	5					
	F			W9293.B0	51					
	E			X0357	7					
	D			X0322	7					
	C			W8441.B0	41					
	B			W9739	42					
	A			X0326	8					
					59					
					12					

LAMPIRAN 17

T-CELL LYMPHOCYTE TESTING

ROW	COL. NO.	REACTION	GROUP	SERUM	7	8	9	10	11	12
	A			W8533						
	B			W9327						
	C			X0324						
	D			W3142.10						
	E			W6320.B0						
	F			W4032.B0						
	F			W8262.D0	15					
	E			W3527.@0	46					
	D			X0572.@0	15					
	C			X0502	62					
	B			W9154.B0	16					
	A			W9451	39					
	A			W6483	17					
	B			W9977	17					
	C			W9195.C0	18					
	D			W9946.0C	18					
	E			W9163.C0	21					
	F			X0501	49					
	F			W9325.@0	22					
	E			W9251.C0	55					
	D			W9747.A0	56					
	C			X0318	27					
	B			W9257	27					
	A			W8829	35					
	A			X0325	35					
	B			W8413.B0	37					
	C			W7035.B0	37					
	D			W8725	13					
	E			W9250	40					
	F			W6605.B0	40					
	F			X0358	60					
	E			W9393.10	41					
	D			W3077	4					
	C			W9156.B0	BW					
	B			X0320	BW					
	A			W6360	1					
					1					
					11					
					2					
					3					
					4					

RECORDING SCALE

- 1 Negative (same wability as well 1A)
- 2 Doubtful Negative
- 4 Doubtful Positive
- 6 Positive (visibility is noticeably different from well 1A)
- 8 Strong Positive (greater than 50% lilted)

TESTING CONDITIONS

Add 1 lambda of lymphocytes (1,000:2,000 cells) and incubate 30 min with 1 lambda of pre-diluted antibody. Add 5 lambda of rabbit complement and incubate for 30 min. All incubations are at room temperature.

READING DIRECTIONS

are given by the arrows. Read in a serpentine order starting with well 1A. Well 1A is the original control and well 1B is the positive control.

ONE LAMBDA, INC.



2435 Military Avenue
 Los Angeles, CA 90064
 TEL: (713) 678-1001
 TLX 182051
 FAX: (713) 678-1004
 Made by International, Inc.

