

TESIS

KK  
KKA  
THD. 43/11  
Tja  
P

**PERBANDINGAN POSITIFITAS *M.leprae*  
PADA PEMERIKSAAN PCR DARI SPESIMEN  
DARAH TEPI DAN SAYATAN LESI KULIT  
PENDERITA KUSTA BARU**



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**VARIDIANTO YUDO TJAHJONO**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2008**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 11 Feb 2021

Oleh

Pembimbing Ketua

Prof. Dr. Indropo Agusni, dr., SpKK(K)  
NIP. 130.610.751

Pembimbing

Prof. Dr. Kuntaman, dr., MS., SpMK  
NIP. 130.783.547

Mengetahui

KPS

Prof. Retno Handayani, dr., MS., PhD  
NIP. 130.541.984

Telah diuji pada

Tanggal 11 Februari 2008

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Kartuti Debora, dr., MS, SpMK

Anggota : 1. Prof. Dr. Indropo Agusni, dr., SpKK (K).

2. Prof. Dr. Kuntaman, dr., MS., SpMK.

3. Budiono, dr., Mkes.

4. Dr. Cita Rosita P., dr., SpKK.

5. Setio Harsono, dr., MS, SpMK.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya atas selesainya penulisan tesis ini. Tesis ini merupakan bagian akhir dari seluruh rangkaian kegiatan pendidikan Magister di Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Minat Studi Mikrobiologi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Kami sangat menyadari bahwa semua ini dapat terlaksana dengan baik berkat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu kami mengucapkan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

Prof.Dr.Indropo Agusni,dr.,SpKK(K), sebagai pembimbing ketua sekaligus sebagai Ketua Kelompok Studi Kusta di TDC Unair, yang telah penuh perhatian memberikan dorongan, arahan, masukan dan bimbingan sejak penulisan proposal hingga akhir penulisan tesis ini, disamping itu beliau juga memberikan kesempatan seluas-luasnya kepada saya untuk dapat melakukan penelitian di laboratorium kusta TDC Unair.

Prof.Dr.Kuntaman,dr.,MS.,SpMK, sebagai pembimbing yang juga telah membimbing, mendukung, memberikan semangat dan motivasi sehingga saya dapat menyelesaikan tesis dengan sebaik-baiknya.

Rektor Universitas Airlangga Prof.Dr.Med.Puruhito,dr dan Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk dapat mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister ini.

Kepala Laboratorium / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya Prof. Jusuf Barakbah,dr Sp.KK(K) yang telah memberikan kesempatan, bimbingan dan dorongan selama kami mengikuti pendidikan.

Dr. Nasronudin, dr., SpPD, K-PTI selaku pimpinan Tropical Disease Center yang telah memberikan ijin, doa restu dan kesempatan seluas-luasnya kepada saya untuk dapat mengikuti pendidikan pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Shinzo Izumi, MD., PhD., dari JICA Silver Expert Programme dan Leprosy Study Group Tropical Disease Center Universitas Airlangga Surabaya atas bantuan prasarana dan referensi serta arahan yang diberikan untuk kelancaran penelitian ini.

Myrna Adianti, S.Si., selaku teman selama penelitian yang telah ikut membantu, bekerjasama dalam pelaksanaan penelitian sehingga semua dapat berjalan lancar.

Dinar Adriaty, S.Si., Mkes.; Iswahyudi, SKM.; Ratna Wahyuni, S.Si. yang telah memberikan bantuan, ide-ide dan kesempatan sebesar-besarnya kepada saya hingga proses analisa sampel dapat berjalan lancar.

Seluruh pengajar program studi Ilmu Kedokteran Dasar yang telah meluangkan waktu untuk transfer ilmu pengetahuan di sela-sela kesibukan.

Seluruh tenaga medis, paramedis dan nonmedis di Instalasi Rawat Jalan dan Instalasi Rawat Inap Laboratorium / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD Dr.Soetomo Surabaya yang

telah memberikan suasana kerja yang baik sehingga memungkinkan saya untuk menyelesaikan pendidikan.

Pak Supriyanto dan Mbak Ery yang telah membantu menyiapkan prasarana dan sarana untuk kelancaran penelitian ini.

Seluruh penderita yang pernah di rawat di Unit Rawat Jalan Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk menimba ilmu dan pengetahuan.

Semua teman-teman seangkatan Ilmu Kedokteran Dasar yang senantiasa membantu, mengingatkan, mendukung segala aktifitas pendidikan program magister ini.

Istri saya Denik Rustyaningsih, dr., dan kedua putri saya Rr. Mutiara D.S.Q dan Rr. Berlian D.H.Z yang dengan sabar telah memberikan doa restu dan banyak berkorban hingga akhirnya saya dapat menyelesaikan pendidikan Magister ini.

Pada kesempatan ini tidak lupa saya menyampaikan rasa hormat dan bangga serta terima kasih yang sebesar besarnya kepada kedua orang tua saya, kedua mertua saya dan saudara-saudara saya atas segala dorongan dan motivasi kepada saya sehingga tercapai semua yang dicita-citakan.

Seluruh pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu namun tanpa bantuan mereka, penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik.

Akhirul kalam, izinkan saya menyampaikan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas segala sesuatu yang kurang berkenan selama saya menempuh pendidikan Magister ini. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia-Nya bagi kita semua. Amin

Surabaya. 11 Februari 2008

Penulis

## RINGKASAN

### Perbandingan Positifitas *M. Leprae* Pada Pemeriksaan PCR Dari Spesimen Darah Tepi Dan Sayatan Lesi Kulit Penderita Kusta Baru

R.Varidianto Yudo Tjahjono.

Indonesia masih termasuk negara dengan jumlah kasus kusta baru  $\geq$  10.000 sepanjang tahun 2005. Diagnosis penyakit kusta masih tergantung pada penemuan klinis dan bakteriologis, yang sifatnya subyektif dan merupakan mata rantai yang lemah dalam pemberantasan kusta (sensitivitas dan spesifisitas kurang). Untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas untuk mendeteksi *M. leprae*, para peneliti mengembangkan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* / PCR menggunakan sampel dari beberapa macam spesimen (sayatan kulit, hapusan hidung, biopsi kulit, darah, dll) dan beberapa macam *primer* dari gen *M. leprae* (*hsp18*, *ag36*, *groEL1*, *RLEP*, 16S rRNA dll.). Untuk menghindari kerusakan dan terfragmentasinya produk akhir PCR maka telah dikembangkan teknik *Nested PCR*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat apakah ada perbedaan hasil deteksi DNA *M. leprae* dari hapusan sayatan kulit dengan darah penderita kusta baru menggunakan teknik *Nested - Polymerase Chain Reaction (Nested- PCR)*. Dilakukan penelitian terhadap 30 penderita kusta baru yang memenuhi syarat penerimaan sampel. Masing-masing sampel dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisik, penentuan diagnosis klinis, dan pemeriksaan PCR dari sayatan kulit dan darah. Data dan hasil yang didapat dimasukkan dalam lembar pengumpul data dan dilakukan analisis data.

Dari penelitian ini didapatkan bahwa mayoritas pasien kusta tipe MB (12 dari 25 pasien) menunjukkan kombinasi PCR sayatan kulit-PCR darah yang positif-negatif (K/D : +/-). Demikian pula mayoritas pada pasien tipe PB (3 dari 5 pasien) menunjukkan kombinasi yang sama.

Dari 30 orang penderita kusta baru (PB dan MB) dapat diidentifikasi adanya DNA *M. leprae* menggunakan PCR dari sayatan kulit sebanyak 20 orang (66,7%) dan menggunakan PCR dari darah sebanyak 6 orang (20%), sehingga kepositifan PCR sayatan kulit dibandingkan PCR darah adalah sebesar 3,3 : 1. Tehnik PCR menggunakan sampel sayatan kulit terlihat lebih sensitif dibandingkan PCR menggunakan sampel darah dan lebih mudah pengambilan sampelnya.

Tidak ada perbedaan antara tipe PB dengan tipe MB menggunakan tehnik PCR sayatan kulit, dimana hasil PCR dari sampel sayatan kulit cenderung lebih banyak memberikan hasil yang positif. Tidak ada perbedaan antara tipe PB dengan tipe MB menggunakan tehnik PCR darah, dimana hasil PCR dari sampel darah memberikan hasil positif yang kurang dibandingkan PCR sayatan kulit.

## SUMMARY

### ***M.leprae* Positivity Comparison in PCR Assay Using Slit Skin Smear and Blood Specimen from New Case Leprosy Patients**

**R.Varidianto Yudo Tjahjono.**

Indonesia counted as a country which has new case of leprosy  $\geq 10.000$  within 2005. The diagnosis of leprosy is still depend on clinical appearance and bacteriologic findings, which are very subjectif and become a weak chain in effort of eliminating leprosy (less sensitive and specific). To increase sensitivity and specificity on detecting *M.leprae*, many researcher developed *Polymerase Chain Reaction* / PCR technic using sample from many specimen (slit skin smear, nasal mucosa, skin biopsies, blood, etc.) and many primers from *M.leprae* genes (*hsp18*, *ag36*, *groEL1*, *RLEP*, 16S rRNA, etc.). In effort to minimize damaged and fragmented PCR end product, there is extension in PCR technic called Nested-PCR.

The aim of this research is to proof wether there is a difference in detection of *M.leprae* DNA between slit skin smear sample and blood sample using *Nested-PCR*. This research conduct with 30 new case leprosy patiens whose meet the sample criteria. Each sample performed anamnesis, physic diagnostic, clinical diagnosis, slit skin PCR and blood PCR. Collected data is tabulated in data sheath and statistical analysis is performed.

This research reveals the majority of MB type-leprosy patients (12 out from 25 patiens) have combination of slit skin PCR-blood PCR which is positive-negative. And so with the majority of PB type-leprosy patients (3 out from 5 patiens), has the same combination.

From 30 new case patients, *M.leprae* DNA can be identified by slit skin PCR in 20 patients (66,7%) and by blood PCR in 6 patients (20%). This result shows that positivity comparison between slit skin PCR and blood PCR is 3.3:1. PCR technique using slit skin specimens seems to be more sensitive than PCR technique using blood specimens, and so the technique to achieve the sample.

There is no significant difference between PB type and MB type patients by using slit skin PCR, whereas the slit skin PCR show more positivity. There is no significant difference between PB type and MB type patients by using blood PCR, whereas the blood PCR show less positivity.

## ABSTRACT

### ***M.leprae* Positivity Comparison in PCR Assay Using Slit Skin Smear and Blood Specimen from New Case Leprosy Patients**

**R.Varidianto Yudo Tjahjono.**

Leprosy is a disease caused by *Mycobacterium leprae*. This disease can lead to abnormalities or deformities especially on extremities. The diagnosis of leprosy is still based on clinical appearance and bacteriological finding, which are very subjective, less sensitive and less specific. To increase sensitivity and specificity on detecting *M.leprae* many authors developed *Polymerase Chain Reaction (PCR)* technique. This study will explore comparativeness between PCR using slit skin specimen against blood specimen.

This study was performed on a new leprosy patients visited Department of Skin and Venereology, Dr.Soetomo Hospital Surabaya, from October until December 2007, by cross sectional approach. The aim of this study is to find out the difference in PCR technique using slit skin specimen and blood specimen. All included samples were taken as follow : 1) slit skin from lesion in the body surface; and 2) venous blood specimen.

The result from 30 samples, 25 samples were leprosy patients MB type and 5 samples were PB type. Comparison in PCR technique using slit skin specimen against blood specimen in both MB type and PB type show significant difference ( $p=0.001$ ;  $p < 0.05$ ). As many as 66,7% (20 of 30 samples) slit skin specimens and 20% (6 of 30 samples) blood specimens were positive. The positivity comparison between slit skin specimens and blood specimens were 3.3 : 1. This result show that PCR technique using slit skin specimens seems to be more sensitive than PCR technique using blood specimens for diagnosis of leprosy respectively.

**Keywords :** *Mycobacterium leprae*, Polymerase Chain Reaction (PCR), slit skin specimen, blood specimen

# DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia .....	v
Ucapan Terima Kasih .....	vi
Ringkasan .....	ix
Summary .....	x
Abstrak .....	xi
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	5
1.3. Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1. Tujuan Umum .....	5
1.3.2. Tujuan Khusus .....	5
1.4. Manfaat Penelitian .....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1. Definisi .....	7
2.2. Etiologi .....	7
2.3. Patogenesis .....	8
2.4. Immunologi .....	11
2.5. Diagnosis dan Terapi .....	12
2.6. Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	13
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS .....	16
3.1. Kerangka Konseptual .....	16
3.2. Hipotesis .....	17
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN .....	18
4.1. Rancangan Penelitian .....	18
4.2. Populasi, Sampel dan Besar sampel .....	18
4.2.1. Populasi Penelitian .....	18
4.2.2. Sampel Penelitian .....	18
4.2.3. Besar Sampel .....	19
4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	19
4.4. Alur Penelitian .....	20
4.5. Bahan, Alat dan Cara Kerja .....	20
4.5.1. Bahan dan Alat yang diperlukan .....	20

4.5.2.	Cara kerja .....	20
4.6.	Lokasi dan Waktu .....	30
4.6.1.	Lokasi penelitian .....	30
4.6.2.	Waktu penelitian .....	30
4.7.	Pengolahan dan Analisa Data .....	30
<b>BAB 5</b>	<b>HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>31</b>
5.1.	Data Deskriptif .....	31
5.1.1.	Jumlah Sampel dan Distribusi Tipe Kusta Secara Klinis ..	31
5.2.	Hasil Pemeriksaan PCR .....	32
5.2.1.	Kombinasi Positifitas dan Negatifitas PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah Pasien Kusta Baru .....	32
5.2.2.	Perbandingan Hasil PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah .....	33
5.2.2.	Perbandingan Antara Pasien Kusta Baru Tipe PB Dengan MB Menggunakan Teknik PCR .....	36
<b>BAB 6</b>	<b>PEMBAHASAN .....</b>	<b>39</b>
6.1.	Data Deskriptif .....	39
6.1.1.	Jumlah Sampel dan Distribusi Tipe Kusta Secara Klinis ..	39
6.2.	Hasil Pemeriksaan PCR .....	40
6.2.1.	Kombinasi Positifitas dan Negatifitas PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah Pasien Kusta Baru .....	40
6.2.2.	Perbandingan Hasil PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah .....	41
6.2.2.	Perbandingan Antara Pasien Kusta Baru Tipe PB Dengan MB Menggunakan Teknik PCR .....	43
<b>BAB 7</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>45</b>
7.1.	Kesimpulan.....	45
7.2.	Saran .....	46

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
<b>Tabel 5.1.</b> Gambaran kombinasi positifitas dan negatifitas PCR dari spesimen sayatan kulit dan darah pada Penderita Kusta Baru Tipe PB dan MB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.....	31
<b>Tabel 5.2.</b> Hasil pemeriksaan PCR dari spesimen sayatan kulit dan darah pada penderita kusta baru tipe MB dan PB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.....	32
<b>Tabel 5.3.</b> Hasil pemeriksaan PCR dari spesimen sayatan kulit dan darah pada penderita kusta baru tipe MB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.....	33
<b>Tabel 5.4.</b> Hasil Pemeriksaan PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah pada Penderita Kusta Baru Tipe PB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.....	34
<b>Tabel 5.5.</b> Perbandingan antara pasien kusta baru tipe MB dengan PB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007 dari hasil pemeriksaan PCR dengan spesimen sayatan kulit .....	35
<b>Tabel 5.6.</b> Perbandingan antara pasien kusta baru tipe MB dengan PB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007 dari hasil pemeriksaan PCR dengan spesimen darah .....	36

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
<b>Gambar 2.1.</b> Diagram yang menunjukkan potongan melintang dari saraf perifer .....	10
<b>Gambar 2.2.</b> Sebuah proses dari PCR .....	14
<b>Gambar 3.1.</b> Kerangka Konseptual .....	16
<b>Gambar 5.1.</b> Distribusi tipe kusta baru kriteria WHO yang diteliti berdasarkan hasil pemeriksaan klinis di Divisi Morbus Hansen URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.....	32

## BAB 1

## PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang

WHO (2006) menyebutkan bahwa deteksi kasus dini dan pengobatan menggunakan *multidrug therapy (MDT)* masih merupakan langkah yang terbaik dalam mengendalikan penyakit kusta. Deteksi kasus lepra baru secara global menunjukkan penurunan yang tajam (27% antara tahun 2004-2005). Sedangkan penurunan jumlah deteksi kasus baru wilayah Asia Tenggara adalah sebesar 32,5%. Meskipun Indonesia telah mencapai target untuk eliminasi penyakit ini (prevalensi kurang dari 1 per 10.000 penduduk), tetapi Indonesia masih termasuk negara dengan jumlah kasus baru  $\geq 10.000$  sepanjang 2005. Indonesia dengan 16 negara lain memberikan jumlah 94% untuk kasus baru secara global.

Menurut Dinas Informasi dan Komunikasi Jatim (2005), Jawa Timur merupakan daerah dengan prevalensi tertinggi di pulau Jawa (prevalensi 1,67 per 10.000 penduduk). Hingga akhir 2005, 35% penderita kusta nasional berada di Jatim (peringkat ketujuh di Indonesia). Sementara penemuan penderita baru rata-rata 6.000-7.000 penderita pertahun. Jumlah penderita usia anak 13%, yang berarti masih bisa terjadi penularan serta jumlah penderita cacat permanen 11%.

Diagnosis penyakit kusta masih tergantung pada penemuan klinis dan bakteriologis, yang sifatnya subyektif dan merupakan mata rantai yang lemah dalam pemberantasan kusta. (Handayani, 1997) Penderita kusta

adalah seseorang yang menunjukkan gejala klinis kusta dengan atau tanpa pemeriksaan bakteriologis dan memerlukan suatu pengobatan. Ada 3 tanda kardinal, yang kalau salah satunya ada sudah cukup untuk menetapkan diagnosis dari penyakit kusta yakni lesi kulit yang anestesi, penebalan saraf perifer, dan ditemukannya *M. leprae* sebagai bakteriologis positif (Agusni, 1992 ; Amiruddin, 2005). Untuk melakukan diagnosis secara lengkap dilaksanakan hal-hal antara lain anamnesis, pemeriksaan klinis (pemeriksaan kulit dan pemeriksaan syaraf tepi serta fungsinya), bakteriologis, hispatologis, imunologis dan sebagainya. Namun untuk diagnosis kusta di lapangan cukup dengan anamnesis dan pemeriksaan klinis. Prosedur untuk menegakkan diagnosis kusta tetap harus dihubungkan dengan tanda-tanda kardinal dari penyakit, tetapi akurasi dari diagnosis harus dimonitor (WHO, 2006)

Pemeriksaan standar untuk diagnosis penyakit kusta adalah spesimen tebal biopsi kulit yang dilanjutkan dengan pemeriksaan histopatologi, pemeriksaan keterlibatan saraf kulit dan identifikasi keberadaan basil tahan asam. Pemeriksaan *slit-skin smear* dapat digunakan untuk penghitungan semikuantitatif organisme tahan asam pada kulit yang terinfeksi dan berguna untuk *follow-up* pasien selama dan setelah pengobatan. Tidak ada tes serologis yang rutin dilakukan pada laboratorium diagnosis kusta. Pemeriksaan antibodi terhadap *phenolic glycolipid 1* (PGL-1) dari *M.leprae* umumnya digunakan untuk penelitian epidemiologis. Sensitifitas dan spesifisitas pemeriksaan ini masih belum memuaskan untuk aplikasi diagnosis. Hal yang sama berlaku untuk *skin*

*test* (tes lepromin, dll.). *M.leprae* tidak dapat dikultur in vitro dan ketiadaan pertumbuhan pada medium isolasi mycobacterial standar menjadikan bakteri ini berbeda dari kuman *Mycobacterium* lain (Scollard *et al.*, 2006).

Untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas untuk mendeteksi *M.leprae*, beberapa peneliti telah melakukan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* / PCR dengan beberapa metode.(Donoghue *et al.* 2001). Menurut Wichitwechkarn *et al.*(1995) dibandingkan dengan prosedur diagnostik lain, PCR menunjukkan keuntungan yang jelas diatas pemeriksaan mikroskopis dari spesimen *slit-skin smear* dan pemeriksaan serologis dari antibodi *anti-phenolic glycolipid 1* (PGL-1). Keuntungan lain dari PCR yaitu juga dapat digunakan untuk membantu memonitor *bacterial clearance* pada beberapa pasien selama masa terapi dengan obat anti kusta. Chae *et al.*(2002) mendapatkan bahwa PCR lebih efektif dibandingkan dengan dua prosedur lain diatas. Menurut Santos *et al.* (2001) PCR sebaiknya selalu dipergunakan untuk evaluasi klinis dimana alat-alat / metode konvensional untuk konfirmasi diagnosis sangat sulit. Dalam praktek klinik, adalah sangat berguna untuk mendeteksi DNA *M.leprae* dengan menggunakan PCR pada sampel-sampel dengan diagnosis bakteriologis yang negatif secara teratur. Deteksi bakteriologis pada penderita kusta PB awal dan PNL (*Pure Neuritic form of Leprosy*) sangat sulit. Pemeriksaan dengan menggunakan PCR dapat menghilangkan ketidakpastian dari kasus-kasus baru tersebut (Martinez *et al.* 2006).

Pemeriksaan menggunakan PCR dapat menggunakan sampel dari beberapa macam spesimen seperti hapusan kulit, hapusan hidung, biopsi kulit, biopsi kulit yang telah terparafinisasi, darah, lesi saraf dan lesi pada mata (iris) dan lain-lain. Selain itu primer yang dipakai untuk pemeriksaan *M.leprae* dapat menggunakan bermacam-macam gen dari *M.leprae* seperti hsp18, ag36, groEL1, RLEP, 16S rRNA dan lain-lain (Scollard *et al.*, 2006; Arliny, 2004). Donoghue *et al.* (2001) melakukan pemeriksaan PCR menggunakan primer gen 18 kDa dan dari elemen *Mycobacterium leprae* – *specific repetitive element* (RLEP) dengan menggunakan spesimen dari hapusan kulit dan spesimen arkeologis. Plikaytis *et al.*(1990) melakukan penelitian dengan menggunakan spesimen biopsi kulit dengan *nested two-step PCR reaction* yang mengamplifikasi produk luar 578 bp dan produk dalam 347 bp dari gen *M.leprae groEL* (65-kDa antigen) dan dapat mendeteksi sedikitnya 3 fg dari DNA, yang diperhitungkan setara dengan satu basil. Klatser *et al.*(1993) memeriksa spesimen dari hapusan hidung masyarakat pada daerah endemis menggunakan primer fragmen *pragene* 531-bp untuk mengetahui peranan *reservoir* dan transmisi kusta. Untuk memeriksa kuman *M.leprae* yang masih hidup biasanya digunakan *Reverse Transcriptase-PCR* (RT-PCR) menggunakan primer 16S rRNA (Kurabachew *et al.* 1998). Santos *et al.*(2001) melakukan pemeriksaan dengan menggunakan sampel dari darah pasien PB dan menemukan kemungkinan bahwa masih terdapat basil hidup yang bersirkulasi dalam darah. Dikarenakan pemeriksaan yang sangat sensitif ini, maka harus

berhati-hati dalam mengambil hubungan antara hasil pemeriksaan PCR, efikasi dari pengobatan dan status dari penyakit.

*Amplicon* yang besar, yang sering digunakan pada laboratorium umum, mempunyai resiko lebih memiliki kerusakan dan terfragmentasi. Maka dari itu untuk menghindari resiko tersebut digunakan *Nested PCR*. Dengan *Nested-PCR*, dibandingkan dengan primer antigen 36 kDa, gen primer terluar 18 kDa mempunyai sensitifitas seratus kali lebih tinggi dan dengan menggunakan primer terluar RLEP didapatkan hasil seribu kali lebih sensitif (Donoghue *et al.* 1990).

#### **Identifikasi masalah :**

- Indonesia masih termasuk negara dengan jumlah kasus baru  $\geq 10.000$  sepanjang tahun 2005.
- Diagnosis penyakit kusta masih tergantung pada penemuan klinis dan bakteriologis, yang sifatnya subyektif dan merupakan mata rantai yang lemah dalam pemberantasan kusta (sensitivitas dan spesifisitas kurang) .
- Untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas untuk mendeteksi *M.leprae*, para peneliti mengembangkan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction / PCR* menggunakan sampel dari beberapa macam spesimen (sayatan kulit, hapusan hidung, biopsi kulit, darah, dll) dan beberapa macam primer dari gen *M.leprae* (hsp18, ag36, groEL1, RLEP, 16S rRNA dll.)
- Untuk menghindari kerusakan dan terfragmentasinya produk akhir PCR maka telah dikembangkan teknik *Nested PCR*.

## 1.2. Rumusan Masalah

Apakah ada perbedaan hasil deteksi DNA *M.leprae* dari hapusan sayatan kulit dengan darah penderita kusta baru menggunakan teknik *Nested - Polymerase Chain Reaction (Nested- PCR)* ?

## 1.3. Tujuan

### 1.3.1. Tujuan Umum

Membandingkan hasil deteksi kuman *M.leprae* dari hapusan sayatan kulit dan darah penderita kusta baru menggunakan teknik *Nested - PCR*.

### 1.3.2. Tujuan Khusus

(1) Melakukan deteksi kuman *M.leprae* dari hapusan sayatan kulit penderita kusta baru dengan menggunakan teknik *Nested-PCR* ; (2) Melakukan deteksi kuman *M.leprae* dari darah penderita kusta baru dengan menggunakan teknik *Nested-PCR*.

## 1.4. Manfaat

- Mengetahui perbandingan hasil pemeriksaan PCR dari sampel sayatan kulit dengan darah dari penderita kusta baru.
- Perbedaan hasil pemeriksaan PCR dari sampel dapat untuk menentukan sampel terbaik bagi pemeriksaan PCR selanjutnya.
- Memberikan tambahan masukan mengenai manfaat dari PCR sebelum tehnik ini digunakan dalam prosedur standar laboratorium untuk pasien kusta.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Definisi

Penyakit kusta adalah suatu penyakit infeksi kronis pada manusia yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium leprae* yang secara primer menyerang saraf perifer dan sekunder menyerang organ-organ lain pada tubuh manusia. (Talaro *et al.*1996)

#### 2.2. Etiologi

*Mycobacterium leprae* adalah penyebab dari penyakit kusta, merupakan bakteri patogen yang tidak dapat dikultur secara *in vitro*. (Donoghue *et al.*2001).

Kuman *M.leprae* secara taksonomi termasuk Ordo *Actinomycetales*, Family *Mycobacteriaceae*, Genus *Mycobacterium*. Kuman ini berbentuk batang lurus atau melengkung, Gram positif, berkembang biak dengan pembelahan biner, panjang 1-8  $\mu\text{m}$  dan diameter 0,3  $\mu\text{m}$ . (Kayser *et al.*20005). Dengan pewarnaan Ziehl Neelsen termasuk golongan basil tahan asam (BTA), merupakan parasit obligat intraseluler terutama didalam makrofag, dijumpai dalam formasi kelompok (*clumps*) atau membentuk bulatan (*globi*), yang seringkali sangat besar mengandung ratusan kuman. Dalam kelompok yang kecil, organisme tersusun paralel menyerupai bulatan cerutu (*bundles of cigars*). Kuman yang hidup akan tampak utuh (*solid*), kemudian dengan pengobatan anti kusta (MDT) bentuk kuman berubah menjadi terpecah (*segmented / fragmented*) dan akhirnya menjadi seperti butiran (*granuler*). Hingga saat ini *M.leprae* merupakan salah satu jenis

mikobakteria yang belum berhasil dibiakkan dengan media buatan / belum dapat dikultur. (Brooks *et al.*2001)

### 2.3. Patogenesis

Cara transmisi dari kusta masih belum dapat dipastikan. Basil kusta bisa terdapat pada sekret hidung dalam jumlah banyak pada kusta lepromatous dan jumlah sedikit pada kusta borderline atau indeterminant. Jumlah yang diekskresikan perhari dapat mencapai  $10^8$  basil. Basil yang diekskresikan dapat bertahan dari kekeringan dan sengatan matahari, dan tetap viable antara 1 sampai 2 hari. Bilamana terdapat kemungkinan penyebaran melalui angin dan serangga, akan tetapi masih belum jelas apakah pintu masuk bagi basil ini adalah melalui saluran pernapasan.(Freeman B.A.1985)

Sekali *M.leprae* memasuki tubuh, makrofag dengan mudah akan menghancurkan basil ini dan menyebabkan tidak adanya manifestasi dari penyakit. Tetapi dalam prosentase kasus yang kecil, respon makrofag dan sel T yang lemah atau lambat akan menyebabkan patogen ini menjadi bertahan hidup dalam sel. Periode inkubasi yang umum adalah antara 2 sampai 5 tahun, dengan rentang ekstrim 3 bulan sampai 40 tahun. Pada kasus yang tidak diobati, basil kusta tumbuh lambat pada makrofag kulit dan sel Schwann dari saraf perifer, dan penyakit berkembang menjadi satu bentuk dari beberapa bentuk penyakit kusta.(Talaro *et al.*1996).

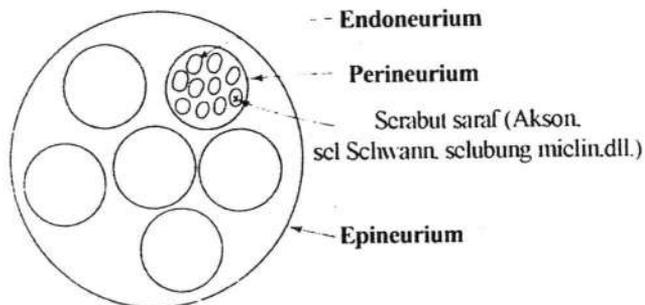
Kuman *M.leprae* dapat menjadi persisten didalam tubuh host. Beberapa peneliti telah menunjukkan adanya basilemia setelah beberapa tahun mendapatkan pengobatan anti kusta. Meskipun tidak menutup kemungkinan adanya reinfeksi,

akan tetapi kuman persisten ini biasanya ditandai dengan adanya resistensi terhadap obat anti kusta. (Santos *et al.*2001)

Meskipun banyak ditemukan fakta tentang faktor yang diperlukan untuk perlekatan *M.leprae* kepada sel host, tetapi kompartemen intraseluler dari organisme ini masih belum dikenali. Setelah organisme ini ditelan oleh sel host, terdapat beberapa kejadian selanjutnya yang secara normal akan menyebabkan kematian dari organisme penyerang. Dalam proses endositik yang normal partikel fagositosis sel host (termasuk mikroorganisme), dan fagosom yang terbentuk, ditransportasikan pada tahap-tahap berikutnya dari jalur fagosomal dan endositik. Fagosom selanjutnya akan menyatu dengan lisosom dan dinamakan fagolisosom. Fagolisosom suasananya sangat asam dan mengandung enzim-enzim degradasi yang berasal dari lisosom. Penyatuan ini biasanya menyebabkan degradasi dari isi fagolisosom. Tetapi infeksi *M.leprae* menyebabkan hambatan dalam penyatuan fagosom dan lisosom, menyebabkan bakteri ini bertahan dalam fagosom (Barker , 2006). Penghancuran *M.leprae* di dalam makrofag terjadi sebagai hasil kerjasama antara makrofag dan limfosit T dimana akan diikuti oleh proses-proses selanjutnya yang sangat rumit (Wilujeng and Agusni, 1999)

Teori patogenesis lama mengajukan bahwa kejadian terpenting terletak pada infeksi sel Schwan dan infeksi langsung pada akson. *M.leprae* memasuki tubuh melalui sisi distal dimana akan mengenai sel Schwan dan berlanjut secara sentripetal diantara saraf-saraf melalui akson atau sel Schwan. (Scollard, 1999) Keterlibatan perineurium terjadi dalam urutan akhir dibandingkan infeksi endoneurium dan inflamasi, dan adanya *M.leprae* dalam perineurium dan epineurium pada saraf kutan pada kusta leromatous biasanya diistilahkan sebagai

keluarnya basil-basil akibat pecahnya bendel saraf dan kemudian akan memasuki makrofag perineurium (Sunderland, 1973).



**Gambar 2.1.** Diagram yang menunjukkan potongan melintang dari saraf perifer (Jopling *et al*, 1988)

Saat ini terdapat kemungkinan bahwa *M.leprae* akan menempatkan diri pertama kali pada epineurium dan perineurium dan secara bertahap akan menginfeksi sel Schwann. *M.leprae* akan memasuki kompartemen endoneurium melalui jaringan pembuluh darah yang ada didaerah tersebut. Selain itu terdapat kemungkinan bahwa *M.leprae* mempengaruhi saraf-saraf melalui pembuluh limfe epineurium, dimana basil dan fagosit yang terinfeksi selanjutnya akan memasuki sirkulasi pembuluh darah (Scollard *et al*, 1999). Awalnya, kolonisasi pada epineurium terjadi saat basil menempatkan dirinya pada sel dan di sekeliling pembuluh darah. Hal ini dimungkinkan dengan adanya pengeluaran basil dari pembuluh limfe yang berhubungan dengan pembuluh darah dari epineurium. Akumulasi basil yang terjadi diantara dan disekitar sel endotel akan benar-benar meningkatkan kemungkinan basil bersirkulasi melalui pembuluh endoneurium yang merupakan salah satu cabang dari pembuluh epineurium. Masuknya *M.leprae* kedalam kompartemen endoneurium berlangsung sepanjang pembuluh

darah dari sebuah titik dan sepanjang perineurium, dan selanjutnya kedalam saraf. Setelah didalam maka basil dapat difagositosis oleh sel Schwann. Keradangan yang terjadi selama proses ini tergantung dari respon imun dari pasien. (Scollard *et al.*, 2006)

#### 2.4. Imunologi

*Mycobacterium leprae* adalah patogen yang hidup didalam makrofag dan biasanya akan dilenyapkan oleh tubuh melalui mekanisme *cell-mediated immunity*. Beberapa individu yang terinfeksi dengan *M.leprae* tidak dapat menghilangkan infeksi dan kemudian berkembang menjadi lesi yang merusak, yang dinamakan *lepromatous leprosy*. Kebalikannya, beberapa individu mengembangkan *cell-mediated immunity* yang kuat dengan sel T teraktivasi dan makrofag disekitar infeksi dan menyebabkan hanya sedikit bakteri yang bertahan hidup. Bentuk penyakit dengan tingkat kerusakan minimal ini dinamakan *tuberculoid leprosy*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bentuk tuberkuloid adalah berhubungan dengan aktivasi dari sel Th1 spesifik *M.leprae*. Sementara itu bentuk lepromatous yang destruktif berhubungan dengan cacat pada aktivasi sel Th1 dan adanya dominasi respon Th2. (Abbas *et al.*2004)

Imunitas sel T, yang diperhitungkan dari proliferasi limfosit, sekresi dari sitokin Th1 seperti IFN $\gamma$ , atau test kulit untuk hipersensitifitas tipe lambat, adalah respon terhadap antigen *M.leprae* pada pasien dengan kusta tuberkuloid. Akan tetapi respon ini hampir tidak ada pada pasien kusta lepromatous. Tingginya stimulasi sel T akan mengarahkan pada aktivasi makrofag. Penghancuran bakteri ini dapat diperlihatkan dengan jelas dari eksperimen dimana lesi kulit pasien kusta

lepromatous diinjeksi dengan IFN $\gamma$ . Hasilnya adalah influks dari sel T dan makrofag ke dalam lesi kulit dan terjadi pengurangan dalam jumlah bakteri. (Mims *et al.* 2004)

## 2.5. Diagnosis dan terapi

Diagnosis dari penyakit kusta didasarkan oleh pemeriksaan klinis dari pasien, histopatologi dan adanya kuman tahan asam dari sampel sayatan kulit atau biopsi. Pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop terbatas hanya bila terdapat kira-kira  $10^4$  basil/g jaringan. Pemeriksaan ini juga tidak spesifik untuk *M.leprae*. Sensitifitas sangat rendah terutama bagi pasien tipe tuberkuloid dimana BTA sangat jarang atau tidak ada. (Donoghue *et al.* 2001(1); Chae *et al.* 2002(2))

Pemeriksaan efektifitas kemoterapi untuk infeksi *M.leprae* adalah sangat sulit. Dan metode yang reliable untuk menentukan viabilitas organisme ini tergantung dari pertumbuhannya pada telapak kaki tikus. Tehnik ini sangat mahal dan menghabiskan banyak waktu. Diperlukan setidaknya 10 bulan bagi organisme ini untuk tumbuh dan lebih dari lima tahun untuk membuktikan resistensi obat low grade. (Chae *et al.* 2002(1))

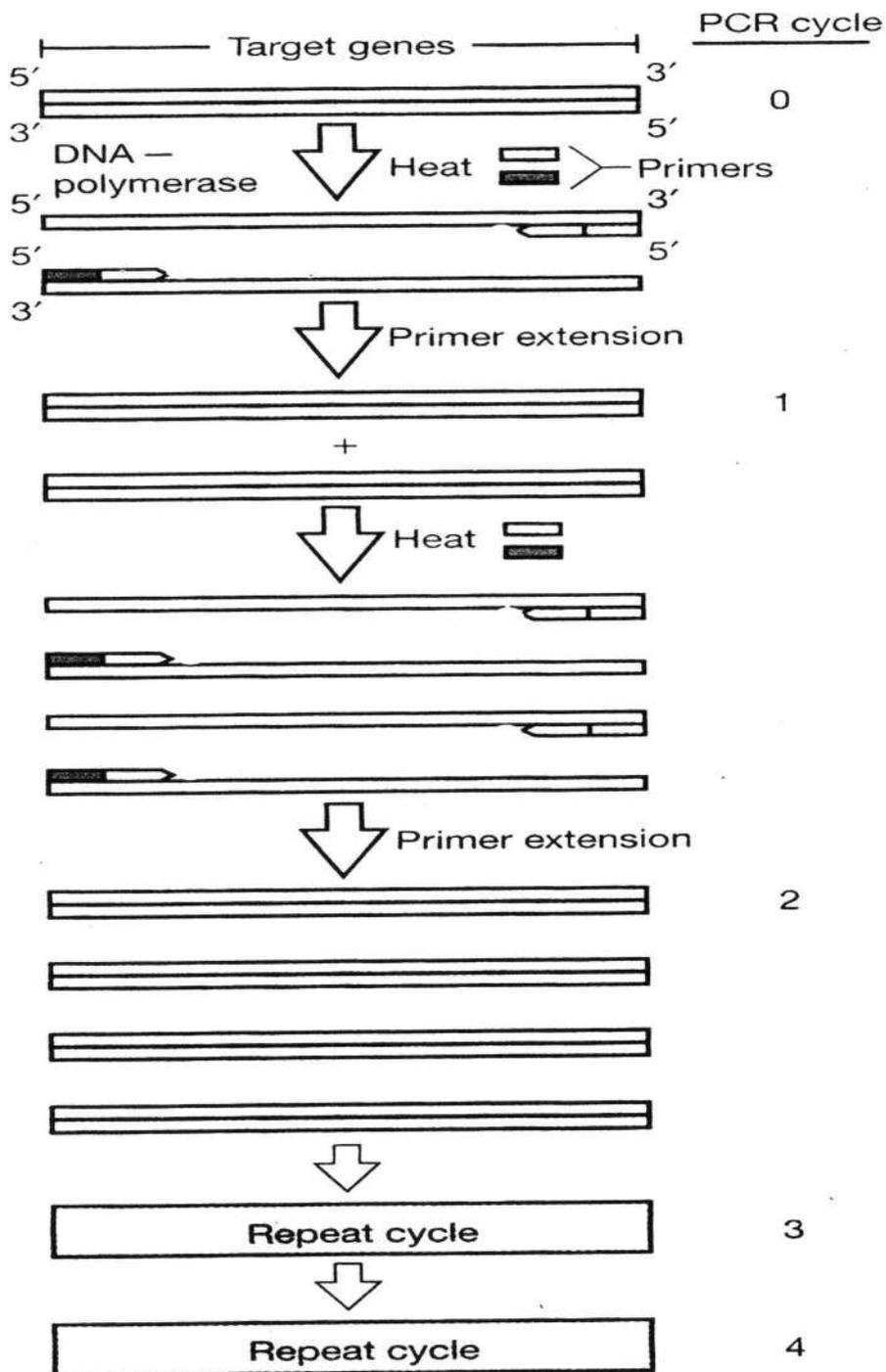
Perhitungan indirek yang digunakan secara luas untuk viabilitas *M.leprae* adalah *morphological index* (MI). Dikarenakan *M.leprae* tidak dapat dikultur *in vitro*, maka MI menjadi pemeriksaan standar laboratorium untuk memonitor aktivitas bakterisidal jangka pendek dari obat anti kusta baru. Pada tehnik ini, integritas dari basil yang dicat dinilai dengan menggunakan mikroskop, dan proporsi dari bakteri yang utuh secara morfologi dilakukan perhitungan. Meskipun prinsip tehnik ini mudah dan dapat digunakan di lapangan, dalam

prakteknya sangat diperlukan personil yang terlatih dan kondisi pengecatan yang tepat. Dikarenakan adanya kekurangan standarisasi yang adekuat dan adanya interpretasi subyektif, maka MI sangat sulit untuk diaplikasikan. (Chae *et al.* 2002(1))

## 2.6. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

*Polymerase Chain Reaction (PCR)* adalah suatu cara untuk mengamplifikasi / memperbanyak bagian dari DNA yang spesifik dengan menggunakan enzim DNA polimerase. Pada tehnik PCR, suatu *primer* digunakan untuk berikatan dengan sekuen DNA yang diinginkan, dan bersama dengan DNA polimerase yang termostabil dan nukleotida-nukelotida bebas akan membuat suatu reaksi yang secara cepat akan membuat salinan dari sekuen DNA yang diinginkan, bahkan dapat mencapai jumlah jutaan.(Madigan *et al.*, 2003)

Komponen yang terlibat pada tehnik PCR yaitu DNA target yang akan diperbanyak dan berfungsi sebagai *template* atau cetakan, dua oligenokleotida pita tunggal yang digunakan sebagai *primer*, enzim DNA polimerase (Taq DNA polimerase dari bakteri tahan panas *Thermophylus aquaticus*), nukleotida-nukleotida bebas *deoxyribonucleaside trifosfat* (dNTPs) yaitu: dATP, dGPT, dCTP, dTTP. dan larutan buffer serta garam dalam hal ini MgCl. Satu tahapan *denaturation*, *annealing*, *extension* disebut satu siklus. (Savitri D., 2005)



Gambar 2.2. Sebuah proses dari PCR (Madigan *et al.*,2003)

Faktor yang paling penting dalam PCR adalah karakteristik *primer* dan ikatan spesifik *primer* dengan target. Berbagai variasi teknik PCR telah dilaporkan, meliputi amplifikasi berbagai rangkaian DNA target yang telah digunakan untuk deteksi *M. leprae*. (Adriaty D., 2005)

Pada penelitian ini digunakan primer yang secara spesifik mengamplifikasi fragmen 129 pasangan basa dari elemen *Mycobacterium leprae-specific repetitive element* (RLEP). Primer ini merupakan *nested primer* yang terdiri dari primer LP<sub>1</sub>-LP<sub>2</sub> dan LP<sub>3</sub>-LP<sub>4</sub>. Urutan primer tersebut adalah :

LP<sub>1</sub> : 5'- TGC ATG TCA TGG CCT TGA GG -3'

LP<sub>2</sub> : 5'-CAC CGA TAC CAG CGG CAG AA-3'

LP<sub>3</sub> : 5'-TGA GGT GTC GGC GTG GTC-3'

LP<sub>4</sub> : 5'-CAG AAA TGG TGC AAG GGA-3'

LP<sub>1</sub>-LP<sub>2</sub> : 129 bp

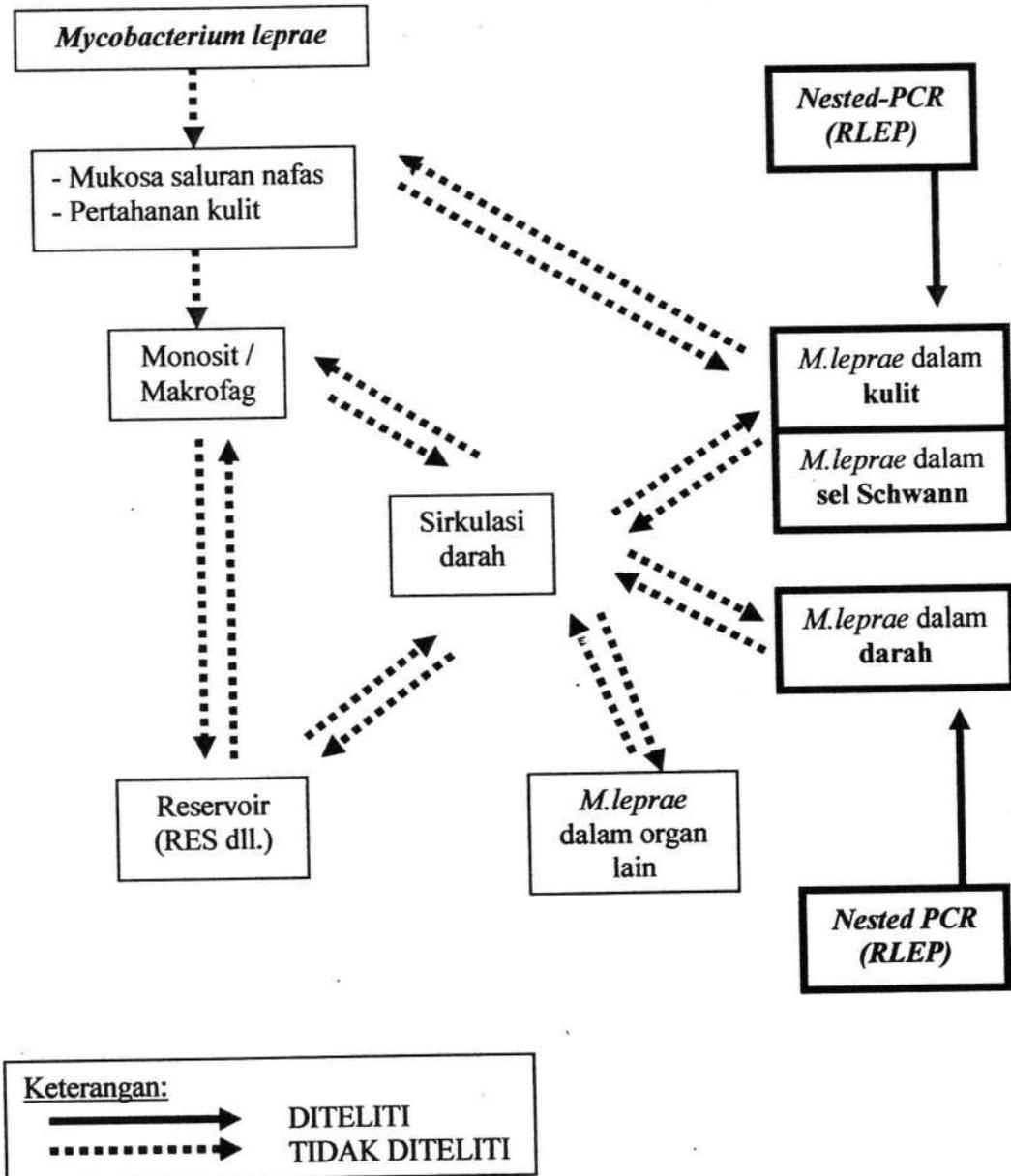
LP<sub>3</sub>-LP<sub>4</sub> : 99 bp

Jamil et.al.(1994) mendapatkan hasil sensitifitas *Nested-PCR* sedikitnya 1 fg DNA (setara kurang dari satu genom) dengan menggunakan target RLEP. Sebagai perbandingan Plikaytis *et al.*(1990) melakukan penelitian *nested two-step PCR reaction* dari gen *M.leprae groEL* (65-kDa antigen) dan dapat mendeteksi sedikitnya 3 fg dari DNA, yang diperhitungkan setara dengan satu basil.

### BAB 3

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

### 3.1. Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual

### Keterangan Kerangka Konseptual

Adanya *M.leprae* di dalam tubuh penderita kusta dapat berasal dari 2 kemungkinan (Sunderland, 1973; Hidayat *et al.*, 1991; Scollard *et al.*, 2006) :

1. *M.leprae* masuk kedalam tubuh melalui filamen-filamen saraf terbuka pada bagian atas dari dermis dan menyebar secara centripetal sepanjang akson. Kemudian basil ini difagositosis oleh sel-sel Schwann pada dermis bagian atas sehingga terlindung dari sistim imun dan berkembang dalam sel Schwann dan menyebar sepanjang saraf melalui sel Schwann yang satu ke sel Schwann yang lain.
2. *M.leprae* masuk ke dalam saraf melalui pembuluh darah (vasa nervorum) . Dari pembuluh darah basil akan memasuki kompartemen endoneurium dimana didalamnya sel-sel Schwann secara aktif memfagositosis *M.leprae* yang masuk. Kemungkinan masuknya basil dapat juga terjadi melalui pembuluh limfe intraneural yang terhubung dengan pembuluh darah saraf.

### 3.2. Hipotesis

1. Terdapat perbedaan antara hasil deteksi sampel sayatan kulit dengan darah penderita kusta baru tipe MB menggunakan teknik *Nested-Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR)*.

## BAB 4

### MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah analitik observasional, dengan rancang bangun potong lintang (*cross sectional*) yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan antara sampel sayatan kulit dengan darah dari penderita kusta baru menggunakan tehnik *Nested - Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR)*.

#### 4.2. Populasi, Sampel dan Besar sampel

##### 4.2.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah semua penderita kusta baru (tipe MB / *Multi Basiler* dan PB / *Pausi Basiler*) yang didiagnosis secara klinis di Divisi Morbus Hansen Unit Rawat Jalan Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Diagnosis kusta ditegakkan secara klinis dan bakteriologis.

##### 4.2.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah semua penderita kusta baru yang didiagnosis secara klinis dan memenuhi kriteria penerimaan sampel penelitian.

#### 4.2.2.1. Kriteria Penerimaan Sampel

- a. Penderita kusta baru tipe MB dan PB yang didiagnosis secara klinis yang sesuai dengan kriteria diagnosis dari WHO
- b. Bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani *informed consent*.

#### 4.2.2.2. Kriteria Penolakan Sampel

- a. Anak-anak berusia kurang dari 14 tahun.
- b. Sedang menderita penyakit tuberkulosa paru ( dari anamnesis)

#### 4.2.3. Besar Sampel

Besar sampel adalah jumlah penderita yang memenuhi kriteria penerimaan sampel yang datang ke Divisi Morbus Hansen Unit Rawat Jalan Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Besar sampel dalam penelitian ini diambil secara total sampling selama 3 bulan.

### 4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### a. Tipe Kusta

Penentuan kusta tipe PB dan MB didasarkan pada kriteria WHO seperti tabel dibawah ini :

## Kriteria untuk tipe PB dan MB

Kelainan kulit dan hasil pemeriksaan Bakteriologis	PB	MB
1. Bercak (Makula)		
a. Jumlah	1 – 5	Banyak
b. Ukuran	Kecil dan besar	Kecil-kecil
c. Distribusi	Unilateral atau bilateral asimetris.	Bilateral, simetris.
d. Konsistensi	Kering dan Kasar	Halus, berkilat.
e. Batas	Tegas	Kurang tegas.
f. Kehilangan rasa pada bercak	Selalu ada dan jelas	Biasanya tidak jelas, jika ada, terjadi pada yang sudah lanjut.
g. Kehilangan kemampuan berkeringat, bulu rontok pada bercak	Bercak tidak berkeringat, ada bulu rontok pada bercak.	Bercak masih berkeringat bulu tidak rontok
2. Infiltrat :		
a. Kulit	Tidak ada	Ada, kadang-kadang tidak ada
b. Membrana mukosa (hidung tersumbat pendarahan di hidung)	Tidak pernah ada.	ada, kadang-kadang tidak ada
3. Ciri-ciri khusus	<b>*Central Healing*</b> Penyembuhan di-Tengah.	1.Punched out lesion **). 2.Madarosis 3.Ginekomastia 4.Hidung Pelana 5.Suara Sengau
4. Nodulus	Tidak ada	Kadang-kadang ada
5. Penebalan syaraf	Lebih sering terjadi dini,asimetris	Terjadi pada yang lanjut biasanya lebih dari satu dan simetris.
6. Deformitas (cacat)	Biasanya asimetris terjadi dini	Terjadi pada Stadium lanjut
7. Apusan	BTA Negatif	BTA Positif.

\*\*). Lesi berbentuk seperti kue donat.

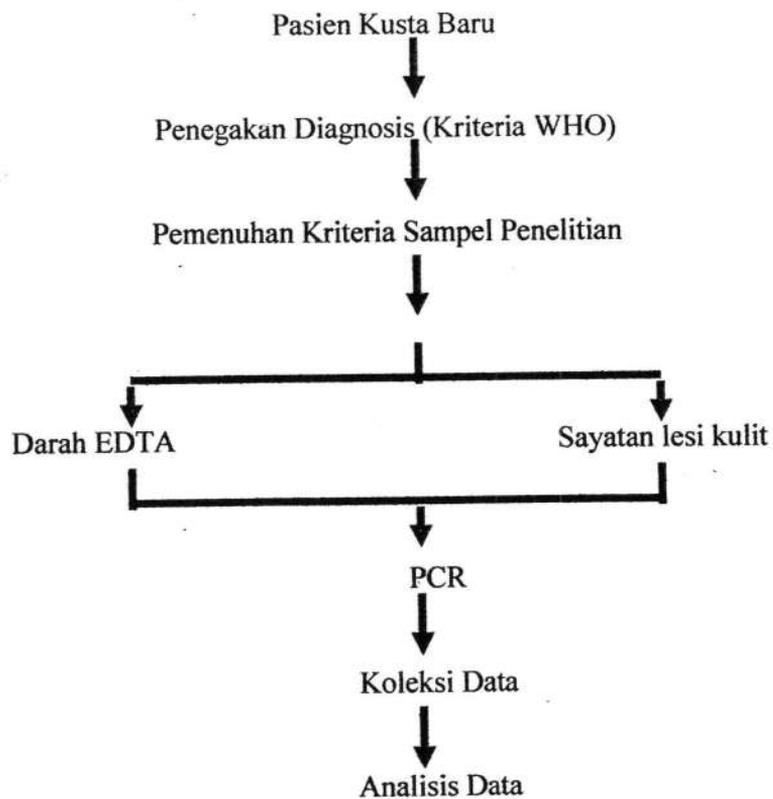
Penentuan tipe tidak boleh berpegang pada hanya salah satu dari kriteria, akan tetapi harus dipertimbangkan dari seluruh kriteria.

### b. Kuman *M.leprae*

Kuman *M.leprae* dapat diidentifikasi menggunakan PCR dengan membandingkan *DNA Marker* dan *DNA* sampel (dikatakan positif bila menghasilkan band setinggi 129 bp dan 99-bp).

#### 4.4. Alur Penelitian

Alur penelitian ini dimulai dengan pemilihan penderita didasarkan pada kriteria penerimaan dan penolakan sampel dengan menanda tangani *informed consent*. Pada penderita yang memenuhi kriteria sampel penelitian dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisik, penentuan diagnosis kiinis, pengambilan sayatan kulit untuk pemeriksaan bakteriologis dan PCR, dan diambil darah dengan cara pungsi vena pada fosa kubiti serta dilakukan pemeriksaan PCR. Data dan hasil yang didapat dimasukkan dalam Lembar Pengumpulan Data dan dilakukan analisa data.



#### 4.5. Bahan, Alat dan Cara Kerja

##### 4.5.1. Bahan dan Alat yang diperlukan

###### Bahan :

- a. Darah penderita kusta yang diambil dari pungsi vena kubiti.
- b. Spesimen biopsi / kerokan lesi penderita kusta
- c. Bahan kimia yang digunakan :
  - Alkohol 70%, Reagen pengecatan Ziehl Neelsen, EDTA
  - Cairan fiksasi, Reagen-reagen PCR,
  - *Primers* :

LP<sub>1</sub> : 5'- TGC ATG TCA TGG CCT TGA GG -3'

LP<sub>2</sub> : 5'-CAC CGA TAC CAG CGG CAG AA-3'

LP<sub>3</sub> : 5'-TGA GGT GTC GGC GTG GTC-3'

LP<sub>4</sub> : 5'-CAG AAA TGG TGC AAG GGA-3'

###### Alat yang diperlukan :

- a. Sarung tangan
- b. Korek api
- c. Kaca obyek
- d. Scalpel
- e. Lampu spiritus
- f. Kapas
- g. Minyak emersi
- h. Mikroskop
- i. Rak pengecatan
- j. Sduit Sc

- k. Tabung + EDTA
- l. Torniquet
- m. Vortex & Flash centrifuge
- n. Pipet Pasteur & pipet mikro
- o. Mesin centrifuge
- p. Tabung Eppendorf
- q. Mesin PCR
- r. Lembar pengumpul data

#### 4.5.2. Cara kerja

##### **Penegakan diagnosis kusta secara klinis (Agusni , 1992)**

Secara klinis, dicari tanda-tanda pokok atau *cardinal signs*, yaitu:

- a. Adanya kelainan kulit / lesi yang hipopigmentasi / kemerahan dengan hilang / mati rasa yang jelas.
- b. Kerusakan dari syaraf tepi, yang berupa hilang /mati rasa dan kelemahan otot tangan, kaki / muka.
- c. Adanya kuman tahan asam di dalam kerokan jaringan kulit (BTA + )

Seseorang dinyatakan sebagai penderita kusta bilamana terdapat sekurang-kurangnya satu dari tanda-tanda pokok diatas.

##### **Cara pengambilan sediaan hapusan sayatan kulit (Agusni , 1987 ;**

WHO, 1987)

- a. Ditentukan lokasi lesi kulit yang akan diambil untuk hapusan sayatan kulit.
- b. Pada bagian tersebut dilakukan tindakan aseptis dengan kapas alkohol.

- c. Bagian tersebut dijepit diantara jari kedua dengan ibu jari tangan kiri sehingga kulit tampak pucat guna menghindari terjadinya perdarahan.
- d. Dengan skalpel steril dibuat sayatan, kurang lebih 0,5 cm sampai mencapai dermis (sedalam kurang lebih 2 mm).
- e. Skalpel diputar 90 derajat, sambil mengerok sisi dan dasar luka hingga didapat bubur jaringan dari epidermis dan dermis.
- f. Dari bahan tersebut dibuat sediaan hapusan pada kaca obyekt secara rata
- g. Luka sayatan ditekan dengan kapas steril yang kering.
- h. Setelah sediaan kering, difiksasi dengan cara melewatkannya di atas nyala api spiritus.

#### **Pengambilan sampel sayatan kulit untuk PCR**

- a. Dari lesi yang sama untuk pemeriksaan hapusan sayatan kulit, diambil jaringan dengan blade no.11 dengan cara yang sama.
- b. Blade dimasukkan kedalam tube yang berisi larutan PBST.
- c. Tube dapat disimpan dalam lemari pendingin sebelum dilakukan pemeriksaan selanjutnya.

#### **Protokol Standar untuk ekstraksi DNA dari sampel sayatan kulit dengan kit *Qiagen miniprep* ( Pembuatan *Template*):**

- a. Tube yang berisi blade dilakukan vortex untuk mencampur kuman sehingga akan terbentuk suatu suspensi DNA.

- b. Setelah itu keluarkan blade, suspensi dalam tube disentrifus pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit dengan kecepatan maksimum (13.000 rpm).
- c. Supernatan yang terbentuk setelah disentrifuse dibuang, sedangkan endapan diperlakukan menurut kit *Qiagen miniprep*, dengan menambahkan larutan P1 yang berisi enzim RNase sebanyak 250  $\mu\text{l}$ .
- d. Ditambahkan Bufer P2 sebanyak 250  $\mu\text{l}$  yang mengandung NaOH untuk memberi suasana Basa, lalu divortex perlahan hingga larutan berubah menjadi sedikit bening.
- e. Ditambahkan 350  $\mu\text{l}$  Bufer N3 berisi guanidine-HCl dan Asam asetat untuk menetralsir suasana Basa pada saat isolasi DNA terjadi, dan digoyang perlahan hingga terbentuk endapan putih.
- f. Disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan maksimum (13.000 rpm) dalam suhu ruangan.
- g. Supernatan yang berisi DNA sampel, dipindahkan dengan cara didekantasi ke dalam tabung steril khusus yang terdapat membran silika didalamnya, kemudian disentrifus 30-60 detik pada kecepatan maksimal.
- h. Filtrat dibuang, selanjutnya DNA yang terperangkap pada membran silika dalam tabung dicuci dengan bufer PB berisi guanidine-HCl dan isopropanol sebanyak 0,5 ml, disentrifus 30-60 detik pada kecepatan maksimal.
- i. Tabung berisi DNA dicuci kembali dengan 0.75 ml Bufer PE berisi etanol 70 % disentrifus 30-60 detik pada kecepatan maksimal. Filtrat

dibuang untuk kemudian tabung disentrifus sekali lagi selama 60 detik untuk menghilangkan residu dari bufer pencuci.

- j. DNA yang telah dipresipitasi dilarutkan dengan Distilled Water Sterile sebanyak 30-50  $\mu$ l, diinkubasi selama 1 menit dan disentrifus selama 1 menit.

#### **Pengambilan darah dari vena kubiti**

- a. Daerah fosa kubiti di desinfeksi dan kapas alkohol
- b. Dipasang torniquet pada daerah lengan atas
- c. Dilakukan pungsi pada vena kubiti dengan memakai spuit 3 cc, kemudian darah dimasukkan kedalam tabung berisi EDTA lalu campur dengan cara mengoyang-goyangkan tabung dan langsung dikirim ke Tropical Disease Center, Universitas Airlangga untuk dilakukan Pemeriksaan dengan metode Reaksi Rantai Polimerase. Luka bekas pungsi ditekan dengan kapas alkohol untuk menghentikan perdarahan.

#### **Protokol Standar untuk ekstraksi DNA dari sampel darah 100 $\mu$ l dengan TaKaRa GenTLE ( Pembuatan *Template*):**

- a. Masukkan 500  $\mu$ l larutan GenTLE I kedalam tabung mikro *centrifuge* ukuran 1,5 ml.
- b. Tambahkan 100  $\mu$ l sampel darah ke dalam larutan I lalu *vortex* secepatnya, 10 detik.
- c. Setelah disimpan pada temperatur ruang selama 10 menit, *centrifuge* pada 13000 rpm selama 5 menit lalu buang semua supernatan

- d. Lalu lakukan *Flash centrifuge* dan buang larutan supernatan yang tersisa.
- e. Tambahkan 1 ml larutan GenTLE II, dan campur dengan cara digoyang-goyangkan secara perlahan beberapa kali. (jangan memakai *vortex* )
- f. *Centrifuge* dengan kecepatan maksimum kurang lebih 2 menit. Buang supernatan.
- g. Tambahkan 500  $\mu$ l larutan GenTLE III dan *vortex* selama 10 detik.
- h. *Centrifuge* pada 13000 rpm selama 5 menit
- i. Buang supernatan, pindahkan sisanya kedalam tabung micro centrifuge yang baru
- j. Tambahkan 500  $\mu$ l Iso-propanolol dan campur secara perlahan. Terlihat material putih kecil (DNA).
- k. *Centrifuge* pada 13000 rpm pada 4°C selama 5 menit. Buang supernatan.
- l. Lakukan flash centrifuge dan buang sisa supernatan.
- m. Tambahkan 1 ml Ethanol 70% campur dengan cara menggoyang-goyangkan tabung beberapa kali dan centrifuge pada 13000 rpm pada 4°C selama 5 menit dan buang supernatan.
- n. Tambahkan 30  $\mu$ l distilled water dan lalu vacuum centrifuge selama 5 menit.
- o. Diberi label, (*template*) siap untuk dilakukan pemeriksaan PCR.

### Pemilihan Primer

Pada penelitian ini digunakan *Primer* yang sensitif yaitu Lp1-Lp2 yang mengamplifikasi 129 pasangan basa (*base pairs, bp*) dan Lp3-Lp4 secara spesifik mengamplifikasi fragmen 99 pasangan basa (*base pairs, bp*)

### PROSEDUR PELAKSANAAN PCR

- a. Ekstraksi DNA (template; sudah dilakukan seperti tersebut diatas)
- b. Amplifikasi DNA target, dengan kondisi mesin PCR yaitu :

PCR mixture untuk Lp1-Lp2 terdiri dari :

➤ <i>distilled water</i>	7,75	μl
➤ 2x Premix G	12,5	μl
➤ Taq	0,25	μl
➤ Lp 1 (5μM)	1	μl
➤ Lp2 (5μM)	1	μl
➤ Subtotal	2,25	μl
➤ Template	2,5	μl
➤ Total Volume	25	μl

Kondisi PCR untuk Lp1-Lp2

- *Pre-heat* : 94°C selama 4 menit
- *Denaturation 2* : 94°C selama 30 detik
- *Annealing* : 56°C selama 30 detik

- *Extension* : 72°C selama 30 detik
- *Denaturation*<sup>2</sup>, *annealing* dan *extension* dilakukan sebanyak 35 kali
- *Prolong extension* : 72°C selama 5 menit
- *Hold* : 4°C dengan waktu tak terhingga

PCR mixture untuk Lp3-Lp4 terdiri dari :

➤ Distilled water	7,75	μl
➤ 2x Premix G	12,5	μl
➤ Taq	0,25	μl
➤ Lp3 (5μM)	1	μl
➤ Lp4 (5μM)	1	μl
➤ Subtotal	22,5	μl
➤ Template	2,5	μl
➤ Total volume	25	μl

Kondisi PCR untuk Lp3-Lp4

- *Pre-heat* : 94°C selama 4 menit
- *Denaturation* 2 : 94°C selama 30 detik
- *Annealing* : 56°C selama 30 detik
- *Extension* : 72°C selama 30 detik
- *Denaturation*<sup>2</sup>, *annealing* dan *extension* dilakukan sebanyak 30 kali
- *Prolong extension* : 72°C selama 5 menit
- *Hold* : 4°C dengan waktu tak terhingga

## **Elektroforesis**

1. Campur 8 $\mu$ l produk PCR dengan 2,5  $\mu$ l *loading buffer* dan dielektroforesis dalam agarose NuSieve gel 3% di dalam buffer TBE pada 100 volt selama 35 menit.
2. Setelah elektroforesis , gel agarose diwarnai dengan Ethidium Bromide selama 20 menit
3. Hasil PCR divisualisasikan di foto dengan menggunakan kamera dalam lampu UV
4. Hasil PCR positif bila didapatkan band pada 99 bp.

## **4.6. Lokasi dan Waktu**

### **4.6.1. Lokasi penelitian**

Penegakan diagnosis kusta secara klinis dan pemeriksaan hapusan sayatan kulit dilaksanakan di Divisi Morbus Hansen Unit Rawat Jalan Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Pemeriksaan PCR dilakukan di *Tropical Diseases Centre*, Kampus C Universitas Airlangga, Surabaya.

### **4.6.2. Waktu penelitian**

Waktu penelitian dimulai pada bulan Juni 2007 sampai selesainya pengambilan sampel penelitian (Oktober-Desember 2007)

#### 4.7. Pengolahan dan Analisa Data

- a. Mengisi data pada Lembar Pengumpul Data
- b. Data dicatat, diolah dan dianalisa
- c. Dilakukan analisa data secara analitik dengan menggunakan uji *Mc.Nemar* dan *kappa*.

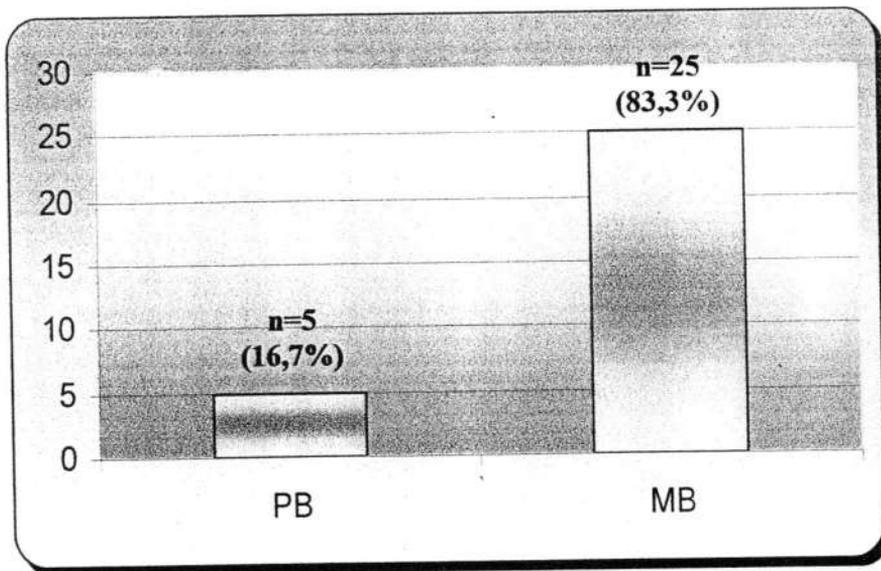
## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1. Data Deskriptif

##### 5.1.1. Jumlah Sampel dan Distribusi Tipe Kusta Secara Klinis

Telah dilakukan penelitian terhadap tiga puluh penderita kusta baru yang telah masuk dalam kriteria penerimaan sampel di Divisi Morbus Hansen URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSU Dr. Soetomo Surabaya pada bulan Oktober - Desember 2007. Masing-masing sampel dilakukan penentuan diagnosis klinis, kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan PCR dari spesimen sayatan kulit dan darah .



**Gambar 5.1.** Distribusi tipe kusta baru kriteria WHO yang diteliti berdasarkan hasil pemeriksaan klinis di Divisi Morbus Hansen URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSU Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.

Dari grafik diatas didapatkan pasien kusta baru tipe MB lebih banyak daripada tipe PB yaitu masing-masing sebesar 83,3% dan 16,6%.

## 5.2. Hasil Pemeriksaan PCR

### 5.2.1. Kombinasi Positifitas dan Negatifitas PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah Pasien Kusta Baru

**Tabel 5.1.** Gambaran kombinasi positifitas dan negatifitas PCR dari spesimen sayatan kulit dan darah pada Penderita Kusta Baru Tipe PB dan MB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSU Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.

Spesimen PCR	Hasil Kombinasi				
	Positif	Positif	Negatif	Negatif	
Sayatan Kulit (K)	Positif	Positif	Negatif	Negatif	
Darah (D)	Positif	Negatif	Positif	Negatif	
<b>Tipe Kusta</b>					
PB	0	3	0	2	<b>5</b>
MB	5	12	1	7	<b>25</b>
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>30</b>

Dari tabel 5.1. terlihat hasil kombinasi antar individu baik tipe PB maupun MB bervariasi. Lima orang dari hasil sayatan kulit dan darah yang positif semuanya (K/D : +/+) merupakan tipe MB. Lima belas orang dari hasil sayatan kulit yang positif dan darah yang negatif (K/D : +/-) tiga orang diantaranya adalah tipe PB, duabelas orang sisanya merupakan tipe

MB. Satu orang dari hasil sayatan kulit yang negatif dan darah yang positif (K/D : -/+) adalah merupakan tipe MB. Sembilan orang dari hasil sayatan kulit yang negatif dan darah yang negatif (K/D : -/-) Dua orang diantaranya adalah tipe PB, tujuh orang sisanya merupakan tipe MB.

### 5.2.2. Perbandingan Hasil PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah

**Tabel 5.2.** Hasil pemeriksaan PCR dari spesimen sayatan kulit dan darah pada penderita kusta baru tipe MB dan PB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.

		PCR KULIT		
		Positif	Negatif	TOTAL
PCR DARAH	Positif	5 (25,0%)	1 (10,0%)	6 (20,0%)
	Negatif	15 (75,0%)	9 (90,0%)	24 (80,0%)
TOTAL		20 (100,0%)	10 (100,0%)	30 (100,0%)

*Uji McNemar; harga  $p=0,001$*

Dari tabel diatas didapatkan pada penderita kusta tipe MB dan PB dengan hasil PCR kulit yang positif (dua puluh orang) didapatkan hasil pemeriksaan PCR darah yang positif adalah sebanyak lima orang (25%) dan negatif sebanyak lima belas orang (75%). Sedangkan pada penderita kusta tipe MB dan PB dengan hasil PCR kulit yang negatif (sepuluh

orang) didapatkan hasil pemeriksaan PCR darah yang positif adalah sebanyak satu orang (10%) dan negatif sebanyak sembilan orang (90%).

Hasil perhitungan uji statistik menggunakan *McNemar* didapatkan harga  $p < 0,05$  yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil pemeriksaan PCR kulit dan PCR darah pada kedua tipe kusta (MB dan PB). Digunakan uji statistik *McNemar* dikarenakan variabel bersifat biner (positif / negatif) dan adanya perubahan antar variabel bila terjadi intervensi atau perubahan perlakuan.

**Tabel 5.3.** Hasil pemeriksaan PCR dari spesimen sayatan kulit dan darah pada penderita kusta baru tipe MB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.

		PCR KULIT		
		Positif	Negatif	TOTAL
PCR DARAH	Positif	5 (29,4%)	1 (12,5%)	6 (24,0%)
	Negatif	12 (70,6%)	7 (87,5%)	19 (76,0%)
TOTAL		17 (100,0%)	8 (100,0%)	25 (100,0%)

*Uji McNemar; harga  $p=0,003$*

Dari tabel diatas didapatkan pada penderita kusta tipe MB dengan hasil PCR kulit yang positif (tujuh belas orang) didapatkan hasil pemeriksaan PCR darah yang positif adalah sebanyak lima orang (29,4%) dan negatif sebanyak satu orang (12,5%). Sedangkan pada penderita kusta

tipe MB dengan hasil PCR kulit yang negatif (delapan orang) didapatkan hasil pemeriksaan PCR darah yang positif adalah sebanyak satu orang (12,5%) dan negatif sebanyak tujuh orang (87,5%).

Hasil perhitungan uji statistik menggunakan *McNemar* didapatkan harga  $p < 0,05$  yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil pemeriksaan PCR kulit dan PCR darah pada penderita kusta tipe MB.

**Tabel 5.4.** Hasil Pemeriksaan PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah pada Penderita Kusta Baru Tipe PB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSU Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007.

		PCR KULIT		
		Positif	Negatif	TOTAL
PCR DARAH	Positif	0 (00,0%)	0 (00,0%)	0 (00,0%)
	Negatif	3 (100,0%)	2 (100,0%)	5 (100,0%)
TOTAL		3 (100,0%)	2 (100,0%)	5 (100,0%)

*Uji McNemar; harga  $p=0,250$*

Dari tabel diatas didapatkan pada penderita kusta tipe PB dengan hasil PCR kulit yang positif (tiga orang), hasil pemeriksaan PCR darahnya ternyata tidak terdapat hasil yang positif (0%) dan hasil yang negatif sebanyak tiga orang (100%). Sedangkan pada penderita kusta tipe MB dengan hasil PCR kulit yang negatif (dua orang) didapatkan pemeriksaan

PCR darahnya tidak terdapat hasil positif (0%) dan hasil yang negatif sebanyak dua orang (100%).

Hasil perhitungan uji statistik menggunakan *McNemar* didapatkan harga  $p > 0,05$  yang berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil pemeriksaan PCR kulit dan PCR darah pada penderita kusta tipe PB.

### 5.2.3. Perbandingan Antara Pasien Kusta Baru Tipe PB Dengan MB Menggunakan Teknik PCR

**Tabel 5.5.** Perbandingan antara pasien kusta baru tipe MB dengan PB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007 dari hasil pemeriksaan PCR dengan spesimen sayatan kulit .

PCR KULIT	TIPE KUSTA		TOTAL
	MB	PB	
Positif	17 (68,0%)	3 (60,0%)	20 (66,7%)
Negatif	8 (32,0%)	2 (40,0%)	10 (33,3%)
TOTAL	25 (100,0%)	5 (100,0%)	30 (100,0%)

*Uji Fisher's exact ; harga  $p=1,000$*

Dari tabel diatas didapatkan penderita kusta tipe MB dengan hasil pemeriksaan PCR dari spesimen hapusan sayatan kulit yang positif sebanyak tujuh belas orang (68%) dan yang negatif sebanyak delapan orang (32%). Sedangkan dari penderita PB didapatkan hasil positif

sebanyak tiga orang (60%) dan hasil negatif sebanyak dua orang (40%). Dengan demikian dari tiga puluh orang pasien kusta tipe PB dan MB didapatkan hasil PCR dari sayatan kulit yang positif adalah sebanyak dua puluh orang (66,7%) dan yang negatif sebanyak sepuluh orang (33,3%).

Hasil perhitungan uji statistik menggunakan *Fisher's Exact* didapatkan harga  $p > 0,05$  yang berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil pemeriksaan PCR hapusan sayatan kulit pada kedua tipe kusta (MB dan PB). Dipergunakan uji statistik menggunakan *Fisher's Exact* dikarenakan terdapat salah satu nilai frekuensi dari tabel 2x2 yang kurang dari atau sama dengan dua atau jika terdapat lebih dari 20% nilai-nilai frekuensi yang kurang dari atau sama dengan lima. Uji statistik *Fisher's Exact* lebih tepat dari pada uji *chi-square* untuk perhitungan nilai frekuensi yang kecil pada tabel 2x2.

**Tabel 5.6.** Perbandingan antara pasien kusta baru tipe MB dengan PB yang diteliti di URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo pada bulan Oktober - Desember 2007 dari hasil pemeriksaan PCR dengan spesimen darah .

PCR DARAH	TIPE KUSTA		TOTAL
	MB	PB	
Positif	6 (24,0%)	0 (00,0%)	6 (20,0%)
Negatif	19 (76,0%)	5 (100,0%)	24 (80,0%)
TOTAL	25 (100,0%)	5 (100,0%)	30 (100,0%)

*Uji Fisher's exact ; harga p=0,553*

Dari tabel diatas didapatkan penderita kusta tipe MB dengan hasil pemeriksaan PCR dari spesimen darah yang positif sebanyak enam orang (24%) dan yang negatif sebanyak sembilan belas orang (76%). Sedangkan dari penderita PB tidak didapatkan adanya hasil positif (0%) dan seluruh sampel, lima orang (100%), memberikan hasil yang negatif. Dengan demikian hasil PCR dari darah yang positif dari kedua tipe kusta (PB dan MB) adalah sebanyak enam orang (20%) dan yang negatif sebanyak dua puluh empat orang (80%).

Hasil perhitungan uji statistik menggunakan *Fisher's Exact* didapatkan harga  $p > 0,05$  yang berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil pemeriksaan PCR darah pada kedua tipe kusta (MB dan PB). Dipergunakan uji statistik menggunakan *Fisher's Exact* dikarenakan terdapat salah satu nilai frekuensi dari tabel 2x2 yang kurang dari atau sama dengan dua atau jika terdapat lebih dari 20% nilai-nilai frekuensi yang kurang dari atau sama dengan lima.

## B A B 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1. Data Deskriptif

##### 6.1.1. Jumlah Sampel dan Distribusi Tipe Kusta secara klinis.

Telah dilakukan penelitian terhadap tiga puluh penderita kusta baru yang memenuhi syarat penerimaan sampel. Masing-masing sampel dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisik, penentuan diagnosis klinis, dan pemeriksaan PCR dari sayatan kulit dan darah. Data dan hasil yang didapat dimasukkan dalam lembar pengumpul data dan dilakukan analisis data.

Dari grafik pada gambar 5.2. didapatkan tipe kusta MB lebih banyak daripada tipe PB yaitu masing-masing sebesar 83,3% dan 16,6%. Hal ini hampir menyerupai proporsi yang terdapat di RSUD Dr. Soetomo tiap tahunnya. Sebagai perbandingan, penelitian Bakker *et.al* (2006) tentang studi epidemiologis di daerah Flores Indonesia mendapatkan jumlah kebalikannya yaitu rasio MB/PB adalah sebesar 1:1,2 dari 94 pasien. Untuk pasien PB memang sulit kecendrungan untuk memeriksakan diri. Hal ini dikarenakan kebanyakan penderita tidak menyangka bahwa lesi yang dideritanya itu, bercak seperti panu pada kulit yang mati rasa, adalah lesi kusta (Dinas Infokom Jatim, 2007). Dengan demikian pada penelitian yang dilakukan pada pusat kesehatan biasanya didapatkan ratio

MB/PB yang lebih tinggi dibandingkan penelitian dengan menggunakan survey ke daerah-daerah.

## **6.2. Hasil Pemeriksaan PCR**

### **6.2.1. Kombinasi Positifitas dan Negatifitas PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah Pasien Kusta Baru**

Dari penelitian ini terlihat bahwa tidak semua individu yang diperiksa memberikan hasil yang sama ketika dilakukan pemeriksaan PCR menggunakan spesimen sayatan kulit dan darah. Kombinasi hasil PCR sayatan kulit-darah yang positif-positif (K/D : +/+) hanya ditemukan pada lima pasien MB, pada pasien PB tidak ditemukan kombinasi ini. Justru mayoritas pasien tipe MB (duabelas dari dua puluh lima pasien) menunjukkan kombinasi PCR sayatan kulit-darah yang positif-negatif (K/D : +/-). Hal ini juga terlihat pada pasien PB (tiga dari lima orang). Satu pasien MB malah menunjukkan kombinasi PCR sayatan kulit-darah yang negatif-positif (K/D : -/+). Tujuh orang pasien MB dan dua orang pasien PB menunjukkan kombinasi PCR sayatan kulit-darah yang negatif-negatif (K/D : -/-). Pada pasien MB ini kemungkinan berada pada kondisi kusta tipe BB (Borderline) dimana imunitas seluler masih cukup kuat sehingga kuman tidak bisa berkembang biak, namun pada pasien tersebut gejala kusta sudah mencapai kriteria untuk MB.

Pada pasien PB dengan pemeriksaan BTA yang hampir selalu hasilnya negatif, tetapi dengan pemeriksaan PCR, terutama PCR dengan

sampel sayatan kulit, positifitas bisa ditingkatkan sekitar 60% yang dapat dilihat dari kombinasi PCR sayatan kulit/darah yang positif/negatif (K/D : +/-). Hal ini memperlihatkan keunggulan teknik PCR sayatan kulit dibandingkan pemeriksaan BTA. Selain itu secara teknis kesulitan pengambilan sampel dan teknik pemeriksaannya relatif sama dengan teknik pemeriksaan BTA. Hanya saja teknik PCR ini membutuhkan biaya yang lebih mahal.

#### 6.2.2. Perbandingan Hasil PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah

Pada penelitian dari Santos *et.al.*(2001) pada pasien yang telah menyelesaikan pengobatan MDT, hasil PCR dari darahnya mempunyai angka kepositifan yang lebih tinggi daripada sampel lain (rambut, sekret hidung, limfe, biopsi kulit), tetapi tidak ada sampel dari sayatan kulit. Dari tabel 5.2. pada penelitian ini terlihat angka kepositifan PCR dari sampel sayatan kulit lebih besar daripada sampel dari darah, dan dengan menggunakan uji *McNemar* didapatkan perbedaan yang bermakna antara pemeriksaan PCR sayatan kulit dengan pemeriksaan PCR darah.

Kepositifan hasil pemeriksaan PCR sayatan kulit terlihat lebih besar daripada kepositifan PCR darah yaitu 3,3 : 1 pada pasien dari kedua tipe (PB dan MB).

Demikian pula pada perbandingan diantara pasien MB (tabel 5.3.) didapatkan perbedaan yang bermakna antara pemeriksaan PCR sayatan kulit dan pemeriksaan PCR darah. Kepositifan hasil pemeriksaan PCR

sayatan kulit terlihat lebih besar daripada kepositifan PCR darah yaitu 2,83 : 1 pada pasien dari tipe MB.

Dari kedua perhitungan diatas terlihat keunggulan teknik PCR sayatan kulit dibandingkan teknik PCR darah dalam hal kepositifannya. Selain itu pengambilan spesimen sayatan kulit secara teknis relatif lebih mudah dilakukan dibandingkan pengambilan spesimen darah. Untuk teknik ekstraksi dan pemeriksaan PCR kedua jenis sampel ini mempunyai kesulitan dan kemudahan yang sama.

Diantara pasien PB (tabel 5.4.) tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara pemeriksaan PCR sayatan kulit dan pemeriksaan PCR darah. Hal ini kemungkinan dikarenakan jumlah sampel tipe PB yang kecil dibandingkan tipe MB (penelitian Santos *et.al.* mempunyai sampel PB lebih besar daripada MB) dan pada penelitian ini (tipe PB) tidak didapatkan hasil pemeriksaan PCR darah yang positif (data tidak dapat dianalisa). Selain itu, tidak dapat dikesampingkan adanya peran inhibitor didalam proses reaksi PCR. Demikian pula bila terdapat kesalahan teknis didalam proses pengerjaan PCR yang tidak disadari.

Kepositifan pasien tipe MB pada pemeriksaan PCR darah belum dapat menjelaskan apakah pada pasien ini terjadi bakteremia atau tidak. Meskipun saat ini penelitian dari Scollard *et.al.*(1999,2000) menunjukkan adanya bakteremia meskipun sebatas didalam pembuluh darah endoneurium, tetapi belum terdapat bukti adanya bakteremia didalam aliran darah di pembuluh darah utama tubuh. Teori sebelumnya hingga kini menyatakan kuman *M.leprae* berada didalam sel monosit/makrofag

dan berkembang biak didalamnya (Jopling *et.al.*, 1988) dan menyebar ke bagian tubuh lain. Kuman *M.leprae* berada didalam sel monosit/makrofag ini sebelumnya berasal dari jaringan saraf kulit yang terlepas saat sel-sel saraf (Sel Schwann dan sel perineurium) hancur. Hal ini mungkin yang dapat menjelaskan mengapa kepositifan PCR sayatan kulit lebih tinggi daripada kepositifan PCR darah. Bagaimanapun *bacterial load* jaringan saraf kulit lebih besar daripada *bacterial load* sel monosit/makrofag, terlepas apakah tehnik pemeriksaan PCR darah betul-betul sanggup membongkar seluruh selubung yang menutupi DNA *M.leprae*.

### **6.2.3. Perbandingan Antara Pasien Kusta Baru Tipe PB Dengan MB Menggunakan Teknik PCR**

Dari tabel 5.5. prosentase pasien MB yang mempunyai hasil PCR kulit yang positif adalah sebesar 68% dan pasien PB sebesar 60%. Pasien MB dengan hasil PCR kulit yang negatif adalah sebesar 32% dan pasien PB sebesar 40%. Dengan perhitungan menggunakan *Fisher's Exact Test* pada tabel 5.5. didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil pemeriksaan PCR hapusan sayatan kulit pada kedua tipe kusta (MB dan PB). Dengan demikian tehnik PCR dengan menggunakan sampel dari sayatan kulit dapat dipakai pada kedua tipe pasien (MB maupun PB) atau tidak ada kekhususan tehnik PCR sayatan kulit harus dipakai pada salah satu tipe. Tehnik PCR dengan menggunakan sampel sayatan kulit ini

cenderung memberikan hasil yang positif baik pada tipe kusta MB maupun PB sesuai dengan hasil pembahasan sebelumnya.

Dari tabel 5.6. prosentase pasien MB dan PB yang mempunyai hasil PCR dari sampel darah yang positif dan negatif sebenarnya tidak dapat dievaluasi dikarenakan pada pasien tipe PB mempunyai hasil yang negatif secara keseluruhan. Hal ini dikarenakan jumlah sampel PB yang kecil. Dengan perhitungan menggunakan *Fisher's Exact Test* pada tabel 5.6. didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil pemeriksaan PCR darah pada kedua tipe kusta (MB dan PB). Dengan demikian tehnik PCR dengan menggunakan sampel dari darah dapat dipakai pada kedua tipe pasien (MB maupun PB) atau tidak ada kekhususan tehnik PCR darah harus dipakai pada salah satu tipe. Hanya Tehnik PCR dengan menggunakan sampel darah ini cenderung memberikan hasil yang negatif baik pada tipe kusta MB maupun PB sesuai dengan hasil pembahasan sebelumnya.

## B A B 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1. Kesimpulan

Dari penelitian terhadap 30 penderita kusta baru yang masuk dalam kriteria penerimaan sampel di Divisi Morbus Hansen URJ Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin pada bulan Oktober - Desember 2007 yang kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan PCR dari spesimen darah dan sayatan kulit didapatkan kesimpulan yaitu :

1. Mayoritas pasien kusta tipe MB (12 dari 25 pasien) menunjukkan kombinasi PCR sayatan kulit-PCR darah yang positif-negatif (K/D : +/-). Demikian pula mayoritas pada pasien tipe PB (3 dari 5 pasien) menunjukkan kombinasi yang sama.
2. Dari 30 orang penderita kusta baru (PB dan MB) dapat diidentifikasi adanya DNA *M.leprae* menggunakan PCR dari sayatan kulit sebanyak 20 orang (66,7%) dan menggunakan PCR dari darah sebanyak 6 orang (20%), sehingga kepositifan PCR sayatan kulit dibandingkan PCR darah adalah sebesar 3,3 : 1.
3. Tehnik PCR menggunakan sampel sayatan kulit terlihat lebih sensitif dibandingkan PCR menggunakan sampel darah dan lebih mudah pengambilan sampelnya.

4. Tidak ada perbedaan antara tipe PB dengan tipe MB menggunakan tehnik PCR sayatan kulit, dimana hasil PCR dari sampel sayatan kulit cenderung lebih banyak memberikan hasil yang positif.
5. Tidak ada perbedaan antara tipe PB dengan tipe MB menggunakan tehnik PCR darah, dimana hasil PCR dari sampel darah memberikan hasil positif yang kurang dibandingkan PCR sayatan kulit..

## 7.2. Saran

1. Untuk para klinisi yang akan melakukan diagnosis laboratorium untuk mengidentifikasi *M.leprae* dengan menggunakan PCR sebaiknya spesimen diambil dari sayatan kulit.
2. Bagi para petugas laboratorium yang menjalankan PCR harus lebih berhati-hati dalam mengerjakan spesimen dari darah

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K., Lichtman A.H., 2004. Basic Immunology (2<sup>nd</sup> ed.). Philadelphia. Elsevier Inc.
- Adriaty D., 2005. Kejadian *Mycobacterium leprae* pada Lingkungan Air di Daerah Endemik dengan Prevalensi Penderita Kusta Tinggi dibanding Daerah dengan Prevalensi Penderita Kusta Rendah. Tesis, Universitas Airlangga Surabaya, Indonesia.
- Agusni I., 1992. Cara Pemeriksaan Penyakit Kusta. Berkala Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin 4 (1) : 4-10.
- Agusni I., Ilias I., 1987. Cara Pemeriksaan dan Diagnosis Penyakit Kusta. In : Bahan Penataran Kusta untuk Dokter dan Mantri Puskesmas. Indonesia. Dinkes Kodya II Surabaya : 1-12.
- Agusni I., 1987. Pemeriksaan Bakteriologis pada *Morbus Hansen*. In : Bahan Penataran Kusta untuk Dokter dan Mantri Puskesmas. Indonesia. Dinkes Kodya II Surabaya : 73-80.
- Almeida E.C., Martinez A.N., Maniero V.C., Sales A.M., Duppre N.C., Sarno E.N., Santos A.R., Moraes M.O., 2004. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood and Nasal Secretion of Brazilian Household Contacts. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 99(5) : 509-512.
- Amiruddin M.D., 2005. Penyakit Kusta Di Indonesia; Masalah Penanggulangannya. Supplement 26 (3) : 1-6.
- Arliny Y., 2004. Deteksi *Mycobacterium leprae* Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Pada Spesimen Hapusan Mukosa Hidung Dan Sayatan Lesi Kulit Penderita Kusta Baru. Tesis, Universitas Airlangga Surabaya, Indonesia.
- Barker L.P., 2006. *Mycobacterium leprae* Interactions With The Host Cell : Recent Advances. Indian J Med Res. 123 : 748-759.
- Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A., 2001. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology (22<sup>nd</sup> ed.). USA. Appleton & Lange.
- Chae G.T., Kim M.J., Kang T.J., Lee S.B., Shin H.K., Kim J.P., Ko Y.H., Kim S.H., Kim N.H., 2002. DNA-PCR and RT-PCR for The 18-kDa Gene of *Mycobacterium leprae* to Assess The Efficacy Of Multi-Drug Therapy for Leprosy. J Med Microbiol 51 : 417-422.

- De Wit M.Y.L., Faber W.R., Krieg S.R., Douglas J.T., Lucas S.B., Montreewasuwat N., Pattyn S.R., Hussain R., Ponnighaus J.M., Hartskeerl R.A., Klatser P.R., 1991. Application of a Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycobacterium leprae* in Skin Tissues. *J Clin Microbiol.* 29 (5) : 906-910.
- Dinas Informasi dan Komunikasi Pemda Jatim. Gubernur Imam Utomo 2008, Jatim Bebas Kusta. d-infokom-jatim.gi.id. 2006-04-28.
- Dinas Informasi dan Komunikasi Pemda Jatim. Penyakit Kusta 35 Persen Ada di Jatim. d-infokom-jatim.gi.id. 2006-08-03.
- Donoghue H.D., Holton J., Spigelman M., 2001. PCR Primers That Can Detect Low Levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol.* 50 : 177-182.
- Freeman B.A., 1985. Burrows Textbook of Microbiology (22<sup>nd</sup> ed.). Philadelphia. W.B.Saunders Company.
- Handayani S., 1997. Eliminasi Penyakit Kusta pada Tahun 2000. *Cermin Dunia Kedokteran* (117): 10-12
- Hastings R.C., Gillis T.P., Krahenbuhl J.L., Franzblau S.G., 1988. Leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 1(3): 330-348.
- Jamil S., Wilson SM., Hacket M., Hussain R., Stoker N.G., 1994. A Colorimetric PCR Method for the Detection of *M.leprae* in Skin Biopsies from Leprosy Patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 62(4) : 512-520.
- Jopling W.H., McDougall A.C., 1988. Handbook of Leprosy (4<sup>th</sup> ed.). UK. Heinemann Professional Publising.
- Kang T.J., Kim S.K., Lee S.B., Chae G.T., Kim J.P., 2003. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. *Clin.Exp.Dermatol.* 28 : 420-424.
- Kartini A., 2004. Deteksi *Mycobacterium leprae* pada Mukosa Hidung dengan Pemeriksaan Reaksi Rantai Polimerase dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi. Karya Akhir, Universitas Diponegoro / RS Dr.Kariadi Semarang, Indonesia.
- Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M., 2005. *Medical Microbiology* (1<sup>st</sup> ed.).German.Thieme.
- Klatser P.R., van Beers S., Madjid B., Day R., de Wit M.Y.L., 1993. Detection of *Mycobacterium leprae* Nasal Carriers in Population for Which Leprosy is Endemic. *J Clin Microbiol.* 31 (11) : 2947-2951.

- Kurabachew M., Wondimu A., Ryon J.J., 1998. Reverse Transcription-PCR Detection of *Mycobacterium leprae* in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 36 (5) : 1353-1356.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., 2003. Brock's Biology of Microorganisms. 10<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, USA. Prentice Hall.
- Martinez A.N., Britto C.F.P.C., Nery J.A.C., Sampaio E.P., Jardim M.R., Sarno E.N., Moraes M.O., 2006. Evaluation of Real-Time and Conventional PCR Targeting Complex 85 Genes for Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Skin Biopsy Samples from Patients Diagnosisd with Leprosy. *J Clin Microbiol.* 36 (5) : 1353-1356.
- Mims C., Dockrell H.M., Goering R.V., Roitt I., Wakelin D., Zuckerman M., 2004. Medical Microbiology (3<sup>rd</sup> ed.). UK. Elsevier Limited.
- Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H., 2003. Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington DC, USA. ASM Press.
- Plykaytis B.B., Gelber R.H., Shinnick T.M., 1990. Rapid and Sensitive Detection of *Mycobacterium leprae* Using a Nested-Primer Gene Amplification Assay. *J.Clin.Microbiol.* 28 (9) : 1913-1917.
- Santos A.R., Balassiano V., Oliveira M.L.W., Pereira M.A.S., Santos P.B., Degraive W.M., Suffys P.N., 2001. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in Blood of Individuals, Eight Years after Completion of Anti-leprosy Therapy. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz.* 96(8) : 1129-1133.
- Santos A.R., Miranda A.B.D., Sarno E.N., Suffys P.N., Degraive W.M., 1993. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol.* 39(4) : 298-304.
- Savitri D., 2005. DNA *Mycobacterium leprae* dalam Darah Penderita Kusta. Tesis, Universitas Airlangga Surabaya, Indonesia.
- Scollard D.M., 2000. Association of *Mycobacterium Leprae* with Human Endothelial Cells in Vitro. *Lab Invest.* 80 (5) : 663-669.
- Scollard D.M., Adams L.B., Gillis T.P., Krahenbuhl J.L., Truman R.W., Williams D. L., 2006. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin Microbiol.* 19 (2) : 338-381.

- Scollard D.M., McCormick G., Allen J.L., 1999. Localization of *Mycobacterium leprae* to Endothelial Cells of Epineurial and Perineurial Blood Vessels and Lymphatics. *Am J Pathol.* 154 (5) : 1611-1620.
- Sunderland S., 1973. The Internal Anatomy of Nerve Trunks in Relation to The Neural Lesion of Leprosy. *Brain.* 96 : 865-888.
- Talaro K., Talaro A., 1996. *Foundations in Microbiology* (2<sup>nd</sup> ed.). USA. Wm.C.Brown Publishers.
- Tunggal B.S., 2005. Perbandingan Seropositif Kusta Pada Narakontak Serumah Penderita Kusta Tipe MB dan PB. Tesis. Universitas Airlangga Surabaya, Indonesia.
- Vissa V.D., Brennan P.J., 2001. The genome of *Mycobacterium leprae* : a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biology.* 2 (8) : 1023.1-1023.8
- Wichitwechkarn J., Karnjan S., Shuntawuttisetee S., Sornprasit C., Kampirapap K., Peerapakorn S. 1995. Detection of *Mycobacterium leprae* Infection by PCR. *J Clin Microbiol.* 33(1) : 45-49.
- World Health Organization. Report Of The Eighth Meeting Of The WHO Technical Advisory Group On Leprosy Control. : 8.
- World Health Organization. Global leprosy situation, 2006. *Weekly Epidemiological Record.* (32): 309-316
- World Health Organization. 2006. Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities.
- World Health Organization. 1987. Laboratory Techniques for Leprosy : 22-23, 24,
- World Health Organization. 2000. Leprosy Elimination Monitoring (LEM) – Guidelines for Monitors.
- Yoon K.H., Cho S.N., Lee M.K., Abalos R.M., Cellona R.V., Fajardo T.T.Jr., Guido L.S., Cruz E.C.D., Walsh G.P., Kim J.D., 1993. Evaluation of Polymerase Chain Reaction Amplification of *Mycobacterium leprae* – Specific Repetitive Sequence in Biopsy Specimens from Leprosy Patients. *J.Clin.Microbiol.* 31(4) : 895-899.

## LAMPIRAN

### **Penjelasan dan informasi penelitian (Inform for informed concent)**

Kuman yang masuk kedalam tubuh seseorang akan menimbulkan reaksi kekebalan. Perbedaan reaksi kekebalan akan mempengaruhi perjalanan suatu penyakit. Ditemukannya kuman penyebab penyakit dapat menentukan keberhasilan dalam pengobatan penderita.

Pada penelitian ini akan dilakukan pencarian kuman penyebab dalam darah penderita dengan teknik pemeriksaan khusus untuk menentukan langkah selanjutnya dalam penanganan penyakit.

Pada penelitian ini, pada setiap penderita akan dilakukan pengambilan sampel dengan cara pengambilan darah vena yang selanjutnya akan diperiksa melalui pemeriksaan laboratorium.

Pengambilan darah ini kemungkinan akan menimbulkan perdarahan bawah kulit yang ringan yang tidak akan membahayakan serta tidak akan mengganggu proses pengobatan yang akan diberikan.

Data penderita bersifat rahasia dan hanya diketahui oleh dokter, yang akan diolah secara ilmiah. Hal-hal yang ingin diketahui oleh penderita dapat langsung ditanyakan pada dokter yang merawat.

**INFORMED CONSENT****PEMERINTAH PROPINSI DAERAH TINGKAT I JAWA TIMUR****RUMAH SAKIT UMUM Dr.SOETOMO**

Jl. Mayjen Prof Dr.Moestopo No 6-9

SURABAYA

**SURAT PERSETUJUAN TINDAKAN KHUSUS**

Saya yang bertandatangan di bawah ini, suami/istri/ayah/ibu/anak/dari penderita  
atau penderita sendiri bernama : .....

Menerangkan bahwa setelah mengetahui tujuan dan tindakan khusus berupa :

**Pengambilan darah untuk memeriksa adanya kuman*****Mycobacterium leprae* pada penderita kusta baru.**

Menyatakan tidak keberatan dilakukan tindakan khusus tersebut diatas, setelah  
mendapat keterangan secukupnya tentang faedah dan juga akibat-akibat yang  
mungkin akan terjadi karenanya dan bersedia ikut dalam penelitian ini.

Surabaya , .....

Peneliti RSU Dr. Soetomo

Yang memberi pernyataan

(dr. R.Varidianto Yudo T.)

( )

## LEMBAR PENGUMPUL DATA

No. Penelitian : .....	Tanggal : .....
No. Reg. Poli MH: .....	No Reg. URJ : .....

<b>IDENTITAS :</b>	
Nama : .....	Umur : .....
Tempat lahir : .....	Suku : .....
Alamat : .....	Jenis kelamin : .....
Pendidikan : .....	Pekerjaan : .....

**ANAMNESIS****KELUHAN UTAMA**

- |                         |                              |                                |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| - Bercak kulit / makula | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| - Penebalan saraf       | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| - Penonjolan kulit      | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| - Gangguan sensasi      | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |

**RIWAYAT PENYAKIT**

- |  |                              |                                |
|--|------------------------------|--------------------------------|
| - Lamanya sakit sejak kelainan kulit pertama diketahui ..... | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| - Anamnesa kontak MH   | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| - Pernah mendapat pengobatan kusta sebelumnya                | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |

**PEMERIKSAAN FISIK**

Lesi kulit yang dicurigai  Ada  Tidak

- |   |                                       |  |
|---|---------------------------------------|--|
| Lokasi lesi kulit: <input type="checkbox"/> wajah | <input type="checkbox"/> lengan atas  | <input type="checkbox"/> perut         |
| <input type="checkbox"/> dada                     | <input type="checkbox"/> tangan       | <input type="checkbox"/> paha          |
| <input type="checkbox"/> punggung                 | <input type="checkbox"/> lengan bawah | <input type="checkbox"/> tungkai bawah |
| <input type="checkbox"/> pantat                   | <input type="checkbox"/> kaki         |  |

Jumlah lesi :  1-5   $\geq 5$   menyeluruh

Distribusi lesi :  simetris  asimetris  menyeluruh

- |                          |                              |                                |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Makula batas tegas       | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| Hipopigmentasi           | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| Hipoanestesi             | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| Makula tanpa batas tegas | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| Infiltrat yang difus     | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| Plaques                  | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| Nodule                   | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| Penebalan saraf          | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| Madarosis                | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| Hidung pelana            | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |

Kontraktur  
 Atrofi otot  
 Drop hand  
 Drop foot  
 Claw hand  
 Parut / sikatrik

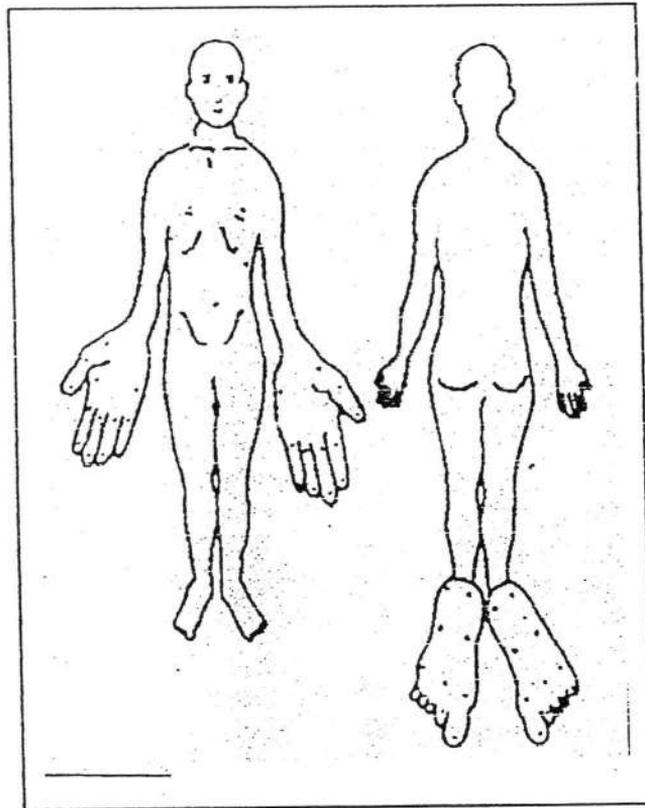
- |                              |                                |
|------------------------------|--------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |

Hasil Pemeriksaan Hapusan Sayatan Kulit : .....

Hasil Klasifikasi Klinik Menurut Ridley & Jopling : .....

Hasil Klasifikasi Menurut Kriteria WHO : .....

Hasil Pemeriksaan Reaksi Rantai Polimerase : .....



Mengetahui  
 Pembimbing

Peneliti

Prof. Dr. Indropo Agusni, dr., SpKK(K)

dr. R.Varidianto Yudo T.

## DATA SAMPEL

NO SAMPEL	TIPE KUSTA	PCR KULIT	PCR DARAH
6	PB/TT	(-) NEGATIF	(-) NEGATIF
7	PB/TT	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
1	PB/BT	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
17	PB/BT	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
3	PB/Neural/BT	(-) NEGATIF	(-) NEGATIF
2	MB/LL	(-) NEGATIF	(+) POSITIF
11	MB/LL	(+) POSITIF	(+) POSITIF
15	MB/LL	(+) POSITIF	(+) POSITIF
16	MB/LL	(+) POSITIF	(+) POSITIF
25	MB/LL	(+) POSITIF	(+) POSITIF
28	MB/LL	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
8	MB/BL	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
9	MB/BL	(-) NEGATIF	(-) NEGATIF
10	MB/BL	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
12	MB/BL	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
18	MB/BL	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
19	MB/BL	(-) NEGATIF	(-) NEGATIF
21	MB/BL	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
26	MB/BL	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
30	MB/BL	(+) POSITIF	(+) POSITIF
4	MB/BB	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
5	MB/BB	(-) NEGATIF	(-) NEGATIF
13	MB/BB	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
14	MB/BB	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
20	MB/BB	(-) NEGATIF	(-) NEGATIF
22	MB/BB	(-) NEGATIF	(-) NEGATIF
23	MB/BB	(+) POSITIF	(-) NEGATIF
24	MB/BB	(-) NEGATIF	(-) NEGATIF
27	MB/BB	(-) NEGATIF	(-) NEGATIF
29	MB/BB	(+) POSITIF	(-) NEGATIF

## HASIL ANALISIS STATISTIK

### Perbandingan Hasil PCR dari Spesimen Sayatan Kulit dan Darah

PCR darah \* PCR kulit Crosstabulation

			PCR kulit		Total
			Pos	Neg	
PCR darah	Pos	Count	5	1	6
		% within PCR kulit	25.0%	10.0%	20.0%
	Neg	Count	15	9	24
		% within PCR kulit	75.0%	90.0%	80.0%
Total		Count	20	10	30
		% within PCR kulit	100.0%	100.0%	100.0%

#### Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.001 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	30	

a. Binomial distribution used.

PCR darah \* PCR kulit \* Tipe kusta Crosstabulation

Tipe kusta				PCR kulit		Total
				Pos	Neg	
MB	PCR darah	Pos	Count	5	1	6
			% within PCR kulit	29.4%	12.5%	24.0%
		Neg	Count	12	7	19
			% within PCR kulit	70.6%	87.5%	76.0%
	Total		Count	17	8	25
			% within PCR kulit	100.0%	100.0%	100.0%
PB	PCR darah	Neg	Count	3	2	5
			% within PCR kulit	100.0%	100.0%	100.0%
	Total		Count	3	2	5
			% within PCR kulit	100.0%	100.0%	100.0%

## PCR darah \* PCR kulit Crosstabulation

			PCR kulit		Total
			Pos	Neg	
PCR darah	Pos	Count	5	1	6
		% within PCR kulit	29.4%	12.5%	24.0%
	Neg	Count	12	7	19
		% within PCR kulit	70.6%	87.5%	76.0%
Total		Count	17	8	25
		% within PCR kulit	100.0%	100.0%	100.0%

## Chi-Square Tests

	Value	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test		.003 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	25	

a. Binomial distribution used.

## NPar Tests

## McNemar Test

## PCR kulit &amp; PCR darah

PCR kulit	PCR darah	
	1	2
1	0	3
2	0	2

Test Statistics<sup>b</sup>

	PCR kulit & PCR darah
N	5
Exact Sig. (2-tailed)	.250 <sup>a</sup>

a. Binomial distribution used.

b. McNemar Test

## Perbandingan Antara Pasien Kusta Baru Tipe PB Dengan MB Menggunakan Teknik PCR

Crosstab

			Tipe kusta		Total
			MB	PB	
PCR kulit	Pos	Count	17	3	20
		% within Tipe kusta	68.0%	60.0%	66.7%
	Neg	Count	8	2	10
		% within Tipe kusta	32.0%	40.0%	33.3%
Total		Count	25	5	30
		% within Tipe kusta	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.120 <sup>b</sup>	1	.729		
Continuity Correction <sup>a</sup>	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.117	1	.732		
Fisher's Exact Test				1.000	.551
Linear-by-Linear Association	.116	1	.733		
N of Valid Cases	30				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.67.

Crosstab

			Tipe kusta		Total
			MB	PB	
PCR darah	Pos	Count	6		6
		% within Tipe kusta	24.0%		20.0%
	Neg	Count	19	5	24
		% within Tipe kusta	76.0%	100.0%	80.0%
Total		Count	25	5	30
		% within Tipe kusta	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.500 <sup>b</sup>	1	.221		
Continuity Correction <sup>a</sup>	.375	1	.540		
Likelihood Ratio	2.470	1	.116		
Fisher's Exact Test				.553	.298
Linear-by-Linear Association	1.450	1	.229		
N of Valid Cases	30				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.00.

**FOTO HASIL PCR**