

MYCOBACTERIUM LEPRAE

KK
TKA 19/04
Arl
d

TESIS

**DETEKSI *Mycobacterium leprae*
MENGUNAKAN TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION
(PCR) PADA SPESIMEN HAPUSAN MUKOSA HIDUNG DAN
SAYATAN LESI KULIT PENDERITA KUSTA BARU**



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

YUNITA ARLINY

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2003

Wifian

TESIS

**DETEKSI *Mycobacterium leprae*
MENGUNAKAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION*
(PCR) PADA SPESIMEN HAPUSAN MUKOSA HIDUNG DAN
SAYATAN LESI KULIT PENDERITA KUSTA BARU**



**YUNITA ARLINY
NIM 090114229 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

**DETEKSI *Mycobacterium leprae*
MENGUNAKAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION*
(PCR) PADA SPESIMEN HAPUSAN MUKOSA HIDUNG DAN
SAYATAN LESI KULIT PENDERITA KUSTA BARU**

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

**YUNITA ARLINY
NIM 090114229 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 13 Agustus 2003

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL: 13 AGUSTUS 2003

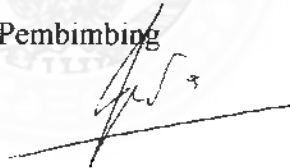
OLEH:

Pembimbing Ketua



Dr. Kuntaman, dr, MS.,SpMK
NIP.130 783 547

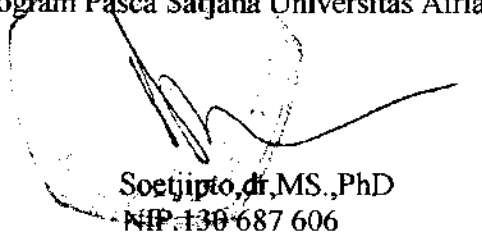
Pembimbing



Prof. DR. Indropo Agusni, dr, SpKK (K)
NIP.130 610 751

Mengetahui:

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga

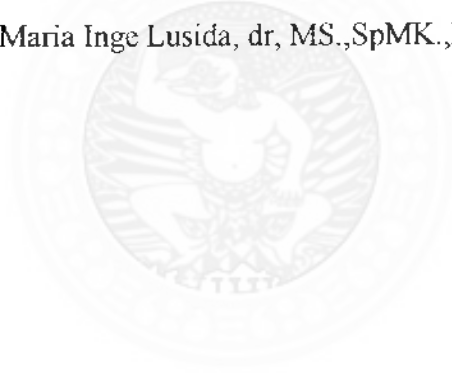


Soetjipto, dr, MS., PhD
NIP.130 687 606

Penetapan Panitia Penguji Tesis

Telah diuji pada
Tanggal 13 Agustus 2003
PANITIA PENGUJI TESIS

- Ketua : Prof. Dr.PH. H. Kuntoro, dr, MPH
- Anggota : 1. Dr. Kuntaman, dr, MS., SpMK
2. Prof. Dr. Indropo Agusni, dr, SpKK (K)
3. Dr. Ni Made Mertaniasih,dr, Mkes.,SpMK
4. Maria Inge Lusida, dr, MS.,SpMK.,Ph.D



UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim

Puji dan syukur yang tak terhingga saya panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini dengan sebaik-baiknya. Tesis ini merupakan bagian akhir dari seluruh kegiatan pendidikan Magister Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati yang paling dalam saya menyampaikan ucapan terima kasih dan apresiasi yang sebesar-besarnya kepada:

Dr. Kuntaman, dr, MS., SpMK, sebagai pembimbing ketua yang telah penuh perhatian mendorong, mengarahkan, memberikan masukan dan bimbingan sejak penulisan proposal hingga akhir penulisan tesis ini.

Prof. DR. Indropo Agusni, dr, SpKK(K), sebagai pembimbing dan Ketua Kelompok Leprosy Study Group-TDC Unair yang selalu memberi masukan, bimbingan, semangat serta dorongan sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini dengan sebaik-baiknya serta memberikan kesempatan seluas-luasnya kepada saya untuk dapat melakukan penelitian di laboratorium kusta TDC Unair.

Pemerintah Republik Indonesia c.q Menteri Pendidikan Nasional yang telah memberikan bantuan finansial dalam bentuk beasiswa BPPS sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan pendidikan Program Magister ini.

Prof.Dr..Med.dr.Puruhito,Rektor Universitas Airlangga dan Prof.Dr.H.Muhammad Amin, dr, Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister ini.

Prof. Dr. Ir. Abdi A. Wahab, M.Sc, Rektor Universitas Syiah Kuala dan Dr. Istanul Badiri, MS, SpPA, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala yang telah memberikan izin dan kesempatan pada saya untuk mengikuti pendidikan pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Drg. Zaki Mubarak, MS, Kepala bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala yang telah memberikan semangat dan dorongan dalam menyelesaikan perkuliahan ini.

Soetjipto, dr, MS., PhD, Ketua Program Studi IKD, Dr. Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK, Ketua Minat Mikrobiologi Kedokteran Program Pascasarjana Unair beserta seluruh staf pengajar yang telah membimbing dan memberikan bekal ilmu kepada saya, semoga amalnya diterima oleh Allah SWT.

Direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan Kepala Lab/SMF Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin yang telah memberikan izin untuk melakukan penelitian dan pengambilan sampel di Divisi Morbus Hansen Unit Rawat Jalan Penyakit Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Seluruh Dokter dan paramedis yang bertugas di Divisi Morbus Hansen URJ Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya atas kerjasamanya yang baik pada saat saya melakukan penelitian dan pengambilan sampel.

Dr. Shinzo Izumi, PhD, sebagai guru dan pembimbing di Laboratorium Kusta TDC Unair yang telah dengan baik dan sabar membimbing, membantu saya dalam melakukan penelitian serta mengajarkan untuk tidak cepat berputus asa dalam menghadapi kesulitan pada saat melakukan penelitian.

Pak Pri di Divisi MH, Dinar dan Yudi di laboratorium kusta TDC Unair yang sangat membantu dan meringankan tugas saya dalam melakukan penelitian ini.

Semua teman-teman seangkatan khususnya pada Minat Studi Mikrobiologi Kedokteran yang telah saling membantu dan memberikan motivasi dalam mengarungi suka dan duka dalam proses perkuliahan sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.

Drs. Mudatsir, M.Kes teman sejawat sekaligus senior saya di Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unsyiah dan Yusni, SKp yang telah memberikan bantuan dan dorongan untuk menyelesaikan perkuliahan ini.

Saudara-saudara saya tercinta, Achyar Zaldy, SH, Novriandy, ST, Sachra Liza A. Meutia beserta seluruh keluarga yang telah memberikan dorongan dan doa yang tulus sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Pada kesempatan ini tidak lupa saya menyampaikan rasa hormat dan bangga serta terima kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua saya tercinta, Bapak Achmad Sayuti, SH dan Ibu Dra. Chairiah yang telah membesarkan dan mendidik saya dengan penuh cinta kasih serta mendoakan saya dengan tak henti-hentinya agar selalu berhasil dalam mendapatkan apa yang saya cita-citakan.

Akhirnya saya menyampaikan mohon maaf atas segala sesuatu yang kurang berkenan selama ini. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia-Nya bagi kita semua. Amin.

Surabaya, Juli 2003

Penulis

RINGKASAN

Deteksi *Mycobacterium leprae* menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) pada Spesimen Hapusan Mukosa Hidung dan Sayatan Lesi Kulit Penderita Kusta Baru

Yunita Arliny

Penyakit kusta atau lepra atau *Morbus Hansen* adalah penyakit kronik yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium leprae* yang pertama menyerang saraf tepi, selanjutnya dapat menyerang kulit, mukosa mulut dan saluran nafas atas, dan organ-organ lain. Sampai saat ini penyakit kusta masih merupakan problema besar terutama di negara-negara berkembang. Jumlah penderita kusta di Indonesia menempati urutan keempat di dunia. Keadaan ini menunjukkan bahwa beberapa provinsi di Indonesia masih merupakan daerah endemi penyakit kusta yang terutama menyebar di kawasan timur Indonesia. Jawa Timur sendiri menempati urutan keenam setelah Irian Jaya, Maluku, Sulawesi Selatan, Aceh dan Kalimantan Selatan.

Guna memperoleh data-data yang dibutuhkan dalam program eliminasi kusta maka diperlukan suatu alat diagnostik yang sensitif, spesifik dan cepat dalam mendeteksi adanya *M. leprae* pada penderita kusta. Selama ini diagnosis pada sebagian besar kasus kusta ditegakkan berdasarkan gejala klinis disertai pemeriksaan bakteriologis BTA Ziehl Neelsen yang ternyata memiliki keterbatasan-keterbatasan dalam menegakkan diagnosis penyakit kusta. Pada saat ini telah dikembangkan teknik biologi molekuler yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mendeteksi DNA basil *M. leprae* dari penderita yang ternyata dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan memberikan hasil yang memuaskan. Metode ini berdasarkan amplifikasi rangkaian DNA dengan menggunakan primer spesifik. Spesimen penderita yang dapat diperiksa dengan teknik ini berupa biopsi lesi, hapusan hidung (nasal swab) dan sayatan lesi kulit. Pengambilan spesimen pada tempat-tempat ini sangat erat kaitannya dengan *port d'entree* dan *port d'exit* basil kusta pada penderita. Pengambilan spesimen pada sayatan lesi kulit merupakan lokasi yang rutin dilakukan, akan tetapi bersifat invasif bagi penderita, oleh karena itu dilakukan pengambilan spesimen pada lokasi alternatif yaitu hapusan mukosa hidung yang memberikan keuntungan bersifat tidak invasif bagi penderita.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menelaah tempat yang lebih tepat sebagai tempat pengambilan spesimen untuk diagnosis laboratorium mikrobiologik pada penderita kusta baru dengan membandingkan hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR antara spesimen hapusan mukosa hidung dengan sayatan lesi kulit.

Jenis penelitian adalah observasional laboratoris, sampel penelitian adalah penderita kusta baru yang datang ke divisi Morbus Hansen Unit Rawat Jalan RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang memenuhi kriteria penerimaan sampel yang diambil secara total sampling selama 3 bulan waktu penelitian yaitu sebanyak 40 penderita yang selanjutnya penderita dibagi dalam dua kelompok yaitu penderita kusta

Multibasilar (MB) dan Pausibasilar (PB) berdasarkan diagnosis klinis dengan kriteria WHO 1988. Masing – masing penderita diambil spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulitnya dan dilakukan deteksi adanya basil *M. leprae* dengan pemeriksaan Basil Tahan Asam (BTA *Ziehl Neelsen*) dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan metode *Nested*. Teknik PCR menggunakan primer spesifik terhadap gen antigen 65 kD (gen *Gro El M. leprae*). Pada metode *Nested* dilakukan amplifikasi dua tahap. Amplifikasi pertama dengan menggunakan primer L1 pada urutan 1236-1253 (5'-GTG GCT CAG ATC CGT ACC 3') dan L2 pada urutan 1813-1792 (5'-ATG CCA CCG GTC GGG TCG CTC G 3') dengan hasil 587 bp. Sedangkan amplifikasi kedua dilakukan dengan primer L3 pada urutan 1458-1476 (CTA CAG GCT GCT CCG GCT C 3') dan L4 pada urutan 1804-1782 (5'-GTC GGG TCG CTC GCC GGA GCT GC 3') dengan produk akhir 347 bp.

Analisa beda hasil deteksi *M. leprae* antara spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit menggunakan uji statistik *Chi Square*. Data hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 19 penderita (47,5%) dari 40 penderita kusta baru yang positif terdeteksi adanya basil *M. leprae* dari spesimen sayatan lesi kulit, dan 14 penderita (35%) dari spesimen hapusan mukosa hidung dengan pemeriksaan BTA. Sedangkan dari hasil deteksi dengan teknik PCR didapatkan hasil, 28 penderita (70%) dari 40 penderita kusta baru terdeteksi adanya basil *M. leprae* dari spesimen sayatan lesi kulit, dan 21 penderita (52,5%) dari spesimen hapusan mukosa hidung. Dengan teknik PCR didapatkan hasil 15 penderita dengan PCR yang positif hanya dari spesimen sayatan lesi kulit (37,5%) dan 8 penderita (20%) PCR positif hanya dari spesimen hapusan mukosa hidung, dan 4 penderita (10%) yang tetap menunjukkan hasil PCR negatif dari kedua spesimen serta 13 penderita (32,5%) yang menunjukkan hasil PCR positif adanya basil *M. leprae* dari kedua spesimen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa : (1) tidak adanya perbedaan hasil yang bermakna ($p = 0,204$) dalam mendeteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR antara spesimen hapusan mukosa hidung dengan sayatan lesi kulit. (2) adanya perbedaan hasil yang bermakna dalam mendeteksi basil *M. leprae* antara pemeriksaan BTA dengan teknik PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung ($p = 0,017$) dan sayatan lesi kulit ($p = 0,000$).

SUMMARY

Detection of *Mycobacterium leprae* Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique from the Nasal Swab and Skin Lesion Section Specimens in the New Leprosy Patients

Yunita Arliny

Leprosy or Leprae or *Morbus Hansen* is a cronic disease resulting from an infection of *Mycobacterium leprae* that firstly infects peripheral nerves and thain it can infect skin, oral mucosa and upper respiratory tract and other organs. Until recent time the leprosy disease constitutes a major problem, particularly in the developing countries. Number of leprosy patients in Indonesia is the fourth largest in the world. This condition actually shows that several provinces becomes areas of endemic leprosy, primarily scattering widely in eastern Indonesia. East java itself is in the six order after Irian Jaya, Maluku, Sulawesi Selatan, Aceh and Kalimantan Selatan.

To collect necessary data in the leprosy elimination program, there must be a sensitive, specific and quick diagnostic method in detecting presence of *M. leprae* in the leprosy patients. Now diagnosis of most leprosy patients is conducted on the basis of clinical symptoms and bacteriological examination (AFB Ziehl Neelsen) that have some limitations in diagnosis of leprosy disease. Recently a molecular biology technique called Polymerase Chain Reaction (PCR) has been developed to detect DNA of patient's *M. leprae* that, from some researches about it, generate satisfactory result. This method relies on the amplification of DNA sequences using specific primers. The specimens of the patients can be examined of this technique through lesion biopsy, nasal swab and skin lesion section. Collection of specimens in this sites is closely correlated with *port d`entree* and *port d`exit* of leprosy bacilli in the patients. Specimen can be collected through skin lesion section, but this may be invasive for the patients. Therefore, the specimen can be taken in alternative sites, such nasal mucous with nasal swab that non-invasive for the patients.

Objective of this study was to determine appropriate location to obtain specimens for microbiological laboratory diagnosis in new leprosy patients by comparing result of *M. leprae* detection using PCR technique in specimens with nasal swab to those taken with skin lesion section.

This is an observasional laboratory study. The samples includes new leprosy patients visiting to the division of Out-Patient Morbus Hansen Unit of RSUD Dr. Soetomo Surabaya who are eligible for inclusion criteria as defined before. Samples were taken by means total sampling takes place for three months in the course of the research. It covers 40 patients who are divided into two groups namely Multibasilar leprosy (MB) patients and Pausibasilar leprosy (PB) patients by virtue of clinical diagnosis with criteria of WHO 1988. Furthermore, specimens are taken through nasal swab and skin lesion section and detected for their presence of *M. leprae* by examining Acid Fast Bacilli (AFB) and using PCR method. Primers used in PCR technique are specific to antigen gene 65 kD (*groEL* *M. leprae* gene). In the Nested PCR method, there is a two-step amplification is done using primer L1 in sequence of

1236-1253 (5'-GTG GCT CAG ATC CGT ACC 3') and primer L2 in sequence of 1813-1792 (5'-ATG CCA CCG GTC GGG TCG CTC G 3') with product 587 bp. The second amplification is undertaken by using primer L3 in sequence of 1458-1476 (CTA CAG GCT GCT CCG GCT C 3') and L4 in sequence of 1804-1782 (5'-GTC GGG TCG CTC GCC GGA GCT GC 3') with final product 347 bp.

The differences detection of *M. leprae* between nasal swab and skin lesion section specimens are analysed using Chi Square test. The result showed that there were 19 patients (47.5%) of 40 new patients who are detected positively for presence of *M. leprae* from the skin lesion section, and there are 14 patients (35%) from nasal swab specimens by examination of AFB. In addition, from detection of PCR technique, there were 28 patients (70%) of 40 new patients detected positively for their presence of *M. leprae* from the skin lesion section, and 21 patients (52.5%) of nasal swab specimens. By PCR technique, there were 15 patients where positive PCR only came from skin lesion section specimen (37.5%) and 8 patients (20%) where positive PCR only derived from the nasal swab specimens, and 4 patients (10%) who indicated negative PCR of both specimens, as well as 13 patients (32.5%) detected positively for presence of *M. leprae* of both specimens. The result suggested that : (1) there were no significant differences ($p = 0.204$) in detection of *M. leprae* with PCR technique between nasal swab and skin lesion section specimens; (2) there were significant differences in detection of *M. leprae* between AFB examination and PCR technique of the nasal swab ($p = 0.017$) and skin lesion section specimens ($p = 0.000$), which is the PCR give higher result than AFB examination.

ABSTRACT

Detection of *Mycobacterium leprae* Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique from the Nasal Swab and Skin Lesion Section Specimens in the New Leprosy Patients

Yunita Arliny

The objective of this study was to determine appropriate location to obtain specimens for microbiological laboratory diagnosis in new leprosy patients by comparing results of *M. leprae* detection using PCR technique in specimens with nasal mucosa swab to those taken with skin lesion section.

This was a laboratory observational study, in which the samples were new leprosy patients admitted at the Division of Morbus Hansen, Outpatient Clinic, Dr. Soetomo Hospital Surabaya, who met the inclusion criteria. Samples, consisting of 40 patients were taken by means total sampling. The patients were divided into two groups namely Multibasilar (MB) and Pausibasilar (PB) by virtue of clinical diagnosis with criteria WHO 1988. From those patients, specimens were obtained using nasal mucosa swab and skin lesion section, and the detection of *M. leprae* was undertaken by means of AFB staining method (Ziehl Neelsen) and Nested PCR that amplified a 587-bp outer product and 347-bp inner product from *M. leprae groEL* (65 kD antigen) gene. Chi Square statistical test was employed to test the difference between the result of detection of *M. leprae* bacilli using nasal mucosa swab and skin lesion incision, and the result of detection of *M. leprae* using AFB staining and PCR method.

The result indicated that (1) no significant difference ($p = 0,204$) in the result of *M. leprae* detection using PCR between specimens obtained from nasal mucosa swab and skin lesion incision, (2) there was a significant difference in the result of *M. leprae* detection between AFB staining and PCR method in specimens obtained from nasal mucosa swab ($p = 0,017$) and skin lesion incision ($p = 0,000$), which the PCR gave higher positive result than AFB staining method.

Keywords : *M. leprae*, location, specimens, PCR, new leprosy patient.

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan panitia penguji	v
Ucapan terima kasih	vi
Ringkasan	viii
Summary	x
Abstract	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx
DAFTAR SINGKATAN	xxi
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Definisi Penyakit Kusta	8
2.2. Sejarah Penyakit Kusta	8
2.3. Epidemiologi Penyakit Kusta	9
2.4. <i>Mycobacterium leprae</i>	11
2.4.1. Taksonomi	11
2.4.2. Morfologi	10
2.4.3. Sifat pertumbuhan	14

2.5. Respon Imun pada Penyakit Kusta	16
2.5.1. Respon Imun Alami	17
2.5.2. Respon Imun Dapatan	18
2.6. Perjalanan Klinis Penyakit Kusta	21
2.7. Gejala Klinis	22
2.7.1. Klasifikasi Kusta	22
2.8. Diagnosis Penyakit Kusta	26
2.8.1. Penggunaan PCR untuk Mendeteksi <i>M. leprae</i>	29
2.8.2. Prinsip Dasar PCR	29
2.8.3. PCR untuk Deteksi <i>M. leprae</i>	31
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
3.1. Kerangka Konseptual	36
3.2. Hipotesis	37
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1. Rancangan Penelitian	38
4.2. Populasi dan Sampel	38
4.2.1. Populasi	38
4.2.2. Sampel	38
4.2.2.1. Besar Sampel	38
4.2.2.2. Teknik pengambilan sampel	39
4.2.2.3. Kriteria Inklusi	39
4.2.2.4. Kriteria Eksklusi	39
4.2.2.5. Prosedur Pengambilan sampel	40
4.3. Definisi Operasional	41
4.4. Bahan Penelitian	43
4.4.1. Bahan untuk Membuat Hapusan Mukosa Hidung dan Sayatan Lesi Kulit	43
4.4.2. Bahan untuk Pengecatan BTA dengan Metode Ziehl Neelsen	43
4.4.3. Bahan untuk Pemeriksaan Spesimen Hapusan Mukosa	

Hidung dan Sayatan Lesi Kulit dengan Metode PCR	43
4.4.3.1. Bahan untuk Ekstraksi DNA <i>M. leprae</i>	43
4.4.3.2. Bahan untuk Amplifikasi DNA <i>M. leprae</i>	43
4.4.3.3. Bahan untuk elektroforesis	44
4.5. Instrumen Penelitian	45
4.5.1. Instrumen untuk Membuat Sediaan Hapusan Mukosa Hidung dan Lesi Kulit	45
4.5.2. Instrumen untuk Pengecatan BTA dengan Metode Ziehl Neelsen	46
4.5.3. Instrumen untuk Mengambil Spesimen Mukosa Hidung Dan Lesi Kulit untuk Pemeriksaan dengan Teknik PCR	45
4.5.4. Instrumen untuk Pemeriksaan Spesimen Hapusan Mukosa Hidung dan Sayatan Lesi Kulit dengan Metode PCR	46
4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian	46
4.6.1. Lokasi Penelitian	46
4.6.2. Waktu Penelitian	46
4.7. Prosedur dan Pengambilan Data	47
4.7.1. Pemeriksaan Mikroskopis	47
4.7.2. Pemeriksaan dengan Teknik PCR	50
4.8. Cara Analisa Data	55
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	
5.1. Karakteristik sampel yang diteliti	56
5.2. Hasil deteksi basil <i>M. leprae</i> dengan pemeriksaan BTA dan PCR Pada penderita kusta baru	58
BAB 6 PEMBAHASAN	67
6.1. Karakteristik sampel	68
6.1.1. Umur	68
6.1.2. Jenis kelamin	79

6.1.3. Klasifikasi kusta berdasarkan pemeriksaan klinis	70
6.2. Hasil deteksi basil <i>M. leprae</i> pada penderita kusta baru	
Dengan pemeriksaan BTA dan teknik PCR	71
6.2.1. Spesimen sayatan lesi kulit	72
6.2.2. Hapusan mukosa hidung	75
6.2.3. Deteksi basil <i>M. leprae</i> dari spesimen sayatan lesi kulit dan hapusan mukosa hidung dengan teknik PCR	79
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1. Kesimpulan	82
7.2. Saran	82
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN-LAMPIRAN	89



DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 4.1	: Hasil Perbandingan Pemeriksaan PCR Dari Spesimen Hapusan Mukosa Hidung Dan Sayatan Lesi kulit pada penderita kusta baru	54
Tabel 5.1	: Sebaran penderita kusta baru berdasarkan Kriteria WHO 1988 menurut jenis kelamin	57
Tabel 5.2	: Sebaran penderita kusta baru berdasarkan Kriteria WHO 1988 menurut kelompok usia	57
Tabel 5.3	: Perbandingan hasil deteksi basil <i>M.leprae</i> dari Spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan Lesi kulit pada penderita kusta baru	61
Tabel 5.4	: Hasil deteksi basil <i>M.leprae</i> dengan teknik pewarnaan BTA dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan Lesi kulit pada penderita kusta baru tipe MB	62
Tabel 5.5	: Hasil deteksi basil <i>M.leprae</i> dengan teknik PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan Lesi kulit pada penderita kusta baru tipe MB	62
Tabel 5.6	: Hasil deteksi basil <i>M.leprae</i> dengan teknik pewarnaan BTA dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan Lesi kulit pada penderita kusta baru tipe PB	63

Tabel 5.7	: Hasil deteksi basil <i>M.leprae</i> dengan teknik PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan Lesi kulit pada penderita kusta baru tipe PB	64
Tabel 5.8	: Hasil deteksi basil <i>M.leprae</i> dengan pemeriksaan BTA Dan PCR dari spesimen sayatan lesi kulit pada penderita Kusta baru	64
Tabel 5.9	: Hasil deteksi basil <i>M.leprae</i> dengan pemeriksaan BTA Dan PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung pada penderita kusta baru	65
Tabel 5.10	: Hasil deteksi basil <i>M.leprae</i> dengan teknik PCR dari Spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi Kulit pada penderita kusta baru	66
Tabel 6.1	: Hasil PCR dari spesimen hapusan mukosa Hidung dengan PCR yang negatif dari spesimen Sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru	80

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Struktur <i>M. leprae</i>	14
Gambar 2.2 : Proses Masuknya <i>M. leprae</i> ke dalam tubuh	17
Gambar 2.3 : Spektrum Penyakit Kusta	26
Gambar 2.4 : Gambar Skematis perbanyakan fragmen DNA Pada amplifikasi menggunakan teknik PCR untuk mendeteksi <i>M. leprae</i>	31
Gambar 2.5 : Gambar skematik perbanyakan fragmen DNA Dengan metode Nested PCR	33
Gambar 5.1 : Hasil deteksi basil <i>M. leprae</i> dengan pemeriksaan BTA Dari spesimen sayatan lesi kulit (kusta tipe MB)	58
Gambar 5.2 : Hasil deteksi basil <i>M. leprae</i> dengan pemeriksaan BTA Dari spesimen hapusan mukosa hidung (kusta tipe MB)	59
Gambar 5.3 : Hasil deteksi basil <i>M. leprae</i> dengan teknik PCR Dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit penderita kusta baru	60

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1: Lembar Pengumpul Data	89
Lampiran 2: Penjelasan dan Informasi Penelitian	91
Lampiran 3: <i>Inform Conssent</i>	92
Lampiran 4: Data Hasil Penelitian	93
Lampiran 5: Hasil uji statistik Chi Square antara pemeriksaan BTA dengan PCR dari spesimen sayatan lesi kulit	94
Lampiran 6: Hasil uji statistik Chi Square antara pemeriksaan BTA dengan PCR Dari spesimen hapusan mukosa hidung	95
Lampiran 7: Hasil uji statistik Chi Square antara spesimen sayatan lesi kulit dengan Hapusan mukosa hidung dengan teknik PCR	96

DAFTAR SINGKATAN

- MDT : Multi Drug Therapy
- BTA : Basil Tahan Asam
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PGL : Phenolic Glycolipid
- MB : Multibasilar
- PB : Pausibasilar
- BI : Bacterial Index
- PDIM : Ptioserol dimicoserosate
- PIM : Phospatydil Inositol Mannoside
- DNA : Deoxyribonucleic Acid
- MHC : Major Histocompability
- LTT : Lymphocyte Transformation Test
- dATP : Deoxyadenosinetriphosphate
- dGTP : Deoxyguanidinetriphosphate
- dCTP : Deoxycytosinetriphosphate
- dTTP : Deoxythyminetriphosphate



BAB I

PENDAHULUAN

BAB 1**PENDAHULUAN****1.1. Latar Belakang**

Penyakit kusta atau lepra atau *Morbus Hansen* adalah penyakit kronik yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium leprae* yang pertama menyerang saraf tepi, selanjutnya dapat menyerang kulit, mukosa mulut, saluran nafas atas, sistem retikulo endotelial, mata, otot, tulang dan testis (Job, 1994). Selain itu penyakit kusta juga dapat mengenai mukosa hidung, konka, nasofaring dan laring (Suaib *et al.*, 1998). Penyakit ini bisa mengakibatkan kecacatan tubuh serta menimbulkan masalah psikososial akibat masih adanya stigma buruk dari penyakit ini di masyarakat

Sampai saat ini penyakit kusta masih merupakan problema besar di beberapa negara di dunia, terutama di negara-negara berkembang. Perkiraan jumlah penderita kusta baru di dunia pada saat ini adalah 841.772 penderita, dan jumlah secara keseluruhan adalah 2 juta penderita dan 4 juta lainnya mengalami kecacatan akibat penyakit ini (Estrada, 2002). Jumlah penderita kusta di Indonesia menempati urutan keempat setelah India, Brazil dan Nepal. Sampai akhir Maret 2001 jumlah penderita kusta di Indonesia tercatat 17.602 penderita. Keadaan ini menunjukkan bahwa beberapa provinsi di Indonesia masih merupakan daerah endemi penyakit kusta yang terutama menyebar di kawasan timur Indonesia. Jawa timur sendiri menempati urutan keenam

setelah Irian Jaya, Maluku, Sulawesi Selatan, Aceh dan Kalimantan Selatan (DepKes, 2001).

Meskipun penggunaan *Multi Drug Therapi (MDT)* diharapkan dapat menurunkan prevalensi penderita kusta, beberapa data seperti sumber infeksi, pengelompokan sumber infeksi, risiko terinfeksi, jumlah infeksi sub klinis, jumlah yang sakit dan efek pengobatan profilaksis dalam populasi, merupakan data-data yang penting yang dibutuhkan dalam program eliminasi penyakit kusta. Untuk memperoleh data-data di atas maka dibutuhkan suatu alat diagnosis yang sensitif, spesifik dan cepat dalam mendeteksi adanya basil *M. leprae* pada penderita kusta (Wirohadidjojo, 1991). Oleh karena itu bila penyakit ini cepat terduga maka kecatatan yang timbul dapat dicegah.

Pada saat ini diagnosis penyakit kusta pada sebagian besar kasus ditegakkan berdasarkan gejala klinis, disertai pemeriksaan bakteriologis. Diagnosis penyakit kusta hanya berdasar gejala klinis memiliki banyak kekurangan, oleh karena penyakit kusta dapat menunjukkan gejala yang mirip dengan penyakit lain seperti *Pityriasis versicolor*, *pityriasis alba*, *psoriasis vulgaris*, *mycosis superficialis*, dan *TB Cutis* (Agusni, 1997). Etnawati dalam penelitiannya menemukan bahwa penyakit kusta biasanya terdiagnosis setelah 2 tahun menderita dan baru terdiagnosis rata-rata dalam waktu 4 atau 5 kali kunjungan (Wirohadidjojo, 1991). Pemeriksaan bakteriologis juga memiliki keterbatasan, dimana sampai pada saat ini basil *M. leprae* belum dapat dibiakkan secara invitro dalam media buatan. Meskipun pembiakan *M. leprae* dapat dilakukan pada hewan armadillo dan telapak kaki mencit tetapi teknik

ini mahal dan membutuhkan waktu yang lama yaitu 6 sampai 12 bulan (Rees and Young, 1994). Pemeriksaan bakteriologis yang sering dilakukan adalah pengecatan Basil Tahan Asam (BTA), tetapi masih memberikan hasil yang tidak spesifik untuk penyakit kusta. Rendahnya densitas BTA dari kulit menyebabkan banyak kasus yang tidak terdeteksi terutama pada kusta dini. Basil pada pemeriksaan mikroskopis memberikan hasil positif apabila jumlah kuman lebih besar dari 10^4 per gram jaringan (Hartskeer *et al.*, 1989). Pemeriksaan serologi untuk mengetahui adanya antigen spesifik dari *M. leprae* seperti *phenolic glycolipid-1*(PGL-1) dapat digunakan untuk mengetahui adanya antibodi dalam tubuh seseorang yang telah terinfeksi. Tapi cara inipun memiliki keterbatasan karena memerlukan jumlah antigen dan antibodi yang cukup banyak untuk dapat terdeteksi secara serologis, dan tidak semua tipe kusta memberikan reaksi antibodi yang jelas. Tes serologi memberikan hasil baik pada tipe Multibasilar (MB), tetapi hanya 6,25% seropositif pada tipe Pausibasilar (PB) (Amiruddin *et al.*, 1994; Wichitwechekarn *et al.*, 1995).

Pada saat ini telah dikembangkan *teknik* biologi molekuler, antara lain *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mendeteksi DNA basil *M. leprae* dari penderita, yang pertama kali dikembangkan oleh Klatser (1989). Beberapa penelitian yang dilakukan ternyata memberikan hasil yang memuaskan yang mana bisa mendeteksi 1 – 100 kuman (Santos *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2003).

Metode ini berdasarkan amplifikasi dari rangkaian DNA yang karakteristik dengan menggunakan primer spesifik. Potongan gen yang diamplifikasi bisa bermacam-macam, seperti 18 kDa, 36 kDa, 65 kDa (Katoch and Sharma, 2000). Pemeriksaan dengan *teknik* ini dapat menggunakan beberapa spesimen yaitu biopsi lesi, hapusan mukosa hidung (*nasal swab*) dan sayatan lesi kulit (*slit skin smear*). Pengambilan spesimen dari tempat tersebut sangat erat kaitannya dengan mekanisme penularan kusta yang diyakini sampai sekarang yaitu melalui droplet saluran pernafasan dan kontak yang lama secara terus menerus (Amiruddin and Noordin, 1995; Noordeen, 1994). Pada kusta tipe *lepromatous*, hidung, sinus paranasal dan nasofaring merupakan tempat keluarnya *M. leprae* yang paling sering dari tubuh (Suaib *et al.*, 1998). Keterlibatan mukosa nasal didapatkan pada lebih dari 95% penderita kusta *lepromatous*. Schaefer (1989) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa pada lesi mukosa nasal penderita kusta *lepromatous* didapatkan bahwa lesi tersebut mengandung kuman dengan jumlah yang bervariasi yaitu antara 10^3 - 10^6 kuman. Pendapat yang senada didapatkan oleh penelitian lain dan melaporkan bahwa sebagian besar kusta tipe *lepromatous* mengandung banyak basil kusta pada sekresi nasal mereka (Suaib *et al.*, 1998). Rizalinda (1999) melaporkan dengan *teknik* PCR berhasil dideteksi adanya *M. leprae* dari spesimen hapusan mukosa hidung pada 34 penderita kusta semua tipe menurut klasifikasi Ridley Jopling dari keseluruhan 36 penderita kusta, sedangkan pengecatan BTA dari lesi kulit hanya mampu memberikan hasil yang positif pada 13 penderita, dengan hasil nol pada kusta

tipe *tuberculoid* (Rizalinda and Hatta, 1999). Sedangkan lesi pada kulit merupakan lokasi yang selama ini paling sering digunakan sebagai tempat pengambilan spesimen untuk pemeriksaan mikroskopis. Pada lokasi ini pengambilan spesimen bersifat traumatis (invasif) bagi penderita. Pada tempat ini jumlah *bacterial index* berkisar dari 0/100 lapang pandang sampai 100/lapang pandang (Amiruddin *et al.*, 1994). Wichitwechkarn *et al.* (1995) melaporkan terdapat perbedaan hasil pemeriksaan PCR pada spesimen dari biopsi lesi dan sayatan lesi kulit, tapi PCR tetap memberikan hasil yang lebih baik dalam mendeteksi *M. leprae* dibanding mikroskopis BTA (Wichitwechakarn *et al.*, 1995).

Identifikasi Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah penelitian ini dapat diidentifikasi suatu permasalahan sebagai berikut :

1. penyakit kusta masih menjadi masalah kesehatan di dunia termasuk di Indonesia dengan angka kejadian yang masih tinggi
2. pada saat ini diagnosis berdasarkan kriteria klinis dan deteksi basil *M. leprae* dengan teknik yang sederhana (pemeriksaan BTA)
3. adanya teknik PCR yang lebih sensitif dan spesifik dalam mendeteksi basil *M. leprae*
4. lokasi rutin yang digunakan sebagai tempat pengambilan spesimen untuk deteksi basil *M. leprae* adalah sayatan lesi kulit yang bersifat invasif bagi penderita

5. adanya lokasi alternatif yaitu mukosa hidung dengan pengambilan spesimen yang tidak invasif
6. apakah ada perbedaan hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik yang lebih sensitif dan spesifik (PCR) dari spesimen hapusan hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru.

1.2. Rumusan Masalah

Atas dasar identifikasi permasalahan tersebut maka dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut :

Apakah ada perbedaan hasil deteksi basil *M. leprae* menggunakan teknik *Polymerase chain reaction* (PCR) antara spesimen hapusan hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru; juga bagaimana jika dibandingkan dengan pemeriksaan konvensional (BTA).

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum :

Menelaah tempat yang tepat untuk pengambilan spesimen pada penderita kusta baru untuk diagnosis laboratorium mikrobiologik.

1.3.2. Tujuan Khusus :

1. Membandingkan hasil pemeriksaan PCR untuk mendeteksi *M. leprae* antara spesimen hapusan mukosa hidung dengan sayatan lesi kulit penderita kusta baru.

2. Membandingkan hasil pemeriksaan BTA dengan PCR pada spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit penderita kusta baru.

1.4. Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu menyumbangkan pengetahuan tentang :

- a) Lokasi yang lebih tepat dan bersifat non traumatis (non invasif) untuk pengambilan spesimen untuk pemeriksaan basil *M. leprae* menggunakan teknik PCR pada penderita kusta baru.
- b) Teknik pemeriksaan basil *M. leprae* yang sensitif, spesifik dan cepat, yang dapat dilakukan pada penderita kusta dan kusta sub klinis. Yang pada akhirnya bertujuan untuk mengurangi angka prevalensi kusta di Indonesia guna mensukseskan program eliminasi kusta tahun 2005.
- c) Keterampilan dalam bidang biologi molekuler (PCR) yang dapat dikembangkan untuk mendeteksi penyakit-penyakit lain.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Definisi Penyakit Kusta

Penyakit kusta atau lepra atau *Morbus Hansen* adalah penyakit kronis yang disebabkan oleh infeksi *M. leprae* yang pertama menyerang saraf tepi, selanjutnya dapat menyerang kulit, mukosa mulut, saluran nafas bagian atas, sistem retikulo endotelial, mata, otot, tulang dan testis. Penyakit ini bisa mengakibatkan kecacatan tubuh serta menimbulkan masalah psikososial akibat masih adanya stigma predikat buruk dari penyakit ini di masyarakat (Job, 1994; Agusni, 1997).

2.2. Sejarah Penyakit Kusta

Penyakit kusta adalah penyakit berumur setua dengan peradaban manusia, karena penyakit ini telah lama diketahui dan ditulis dalam kitab-kitab kuno. Dalam kitab Sushrat Sanmita di Zaman India kuno (1300 SM,) telah tercantum tentang adanya penyakit yang disebut *khust* yang dideskripsikan sesuai dengan penyakit kusta yang dikenal saat ini. Begitu pula dalam kitab-kitab kuno di Tiongkok serta tulisan pada daun papyrus di Mesir telah tercantum mengenai penyakit yang sesuai dengan kusta. Istilah *leprae* sendiri berasal dari bahasa Yunani kuno (Agusni, 1997).

2.3. Epidemiologi Penyakit Kusta

Penyakit kusta banyak ditemukan di daerah tropik. Penyebarannya terutama di benua Afrika, Asia dan Amerika Latin. Pada saat ini jumlah penderita kusta baru di dunia tercatat 841.772 penderita dan Indonesia menempati urutan keempat di dunia dalam hal jumlah penderita kusta setelah India, Brazil dan Nepal (Rees and Young, 1994; Estrada, 2002).

Penyakit kusta menyerang segala umur, namun jarang sekali pada anak dibawah usia 3 tahun. Hal ini diduga berkaitan dengan masa inkubasi yang cukup lama. Namun meskipun sebagian besar penduduk di daerah edemik kusta pernah terinfeksi *M. leprae* tapi tidak semua akan terkena penyakit ini karena adanya kekebalan alamiah terhadap kuman tersebut. Jumlah penderita laki-laki lebih banyak dari perempuan dengan perbandingan 2 : 1 (Iskandar, *et al.*, 1998; Agusni, 1997).

Sampai saat ini cara penularan penyakit kusta masih belum sepenuhnya terungkap. Tapi pada saat ini yang dianut adalah melalui *droplet infection* dengan *port d'entree* mukosa hidung dan kontak yang lama secara terus menerus. Saat ini yang dianggap sebagai tempat keluarnya kuman dari sumber penularan (*port d' exit*) adalah mukosa hidung penderita kusta tipe *lepromatous* yang belum diobati, karena seringkali ditemukan basil kusta dalam jumlah yang banyak pada mukosa hidung. Jumlah basil kusta pada mukosa hidung seperti yang telah diperlihatkan oleh Shepard (1960) adalah berkisar 10.000 – 100.000 (Noordeen, 1994). Penularan melalui mukosa hidung telah dibuktikan dengan percobaan pada tikus dengan penyemprotan basil *M. leprae* berulang-

ulang (inhalasi buatan), ternyata pada pembuluh darah alveoli dari tikus tersebut bisa ditemukan kuman tersebut. Ini berarti bahwa *M. leprae* bisa mencapai sistim sirkulasi darah dan selanjutnya akan bersarang di suatu tempat predileksi untuk kuman tersebut, biasanya di sel Schwann di perinerium (Agusni, 1997; Noordeen, 1994). Membran basal dari epidermis nasal manusia tidak berkembang dengan baik sehingga mudah terserang, baik dalam keadaan sehat maupun dalam keadaan sudah terdapat inflamasi kronik yang sering terdapat pada daerah endemis kusta. Akibat inflamasi epitel mendapat vaskularisasi yang berlebihan, dimana basil kusta tidak dapat dilawan oleh mekanisme imunologis sehingga terjadi multiplikasi bebas pada keadaan imunitas rendah. Pada biopsi konka inferior bagian anterior terdapat basil kusta di dalam berkas otot polos. Otot polos merupakan tempat yang paling disukai oleh *M. leprae*. Pada mukosa nasal banyak terdapat berkas otot polos pada dinding pembuluh darahnya dan basil yang ada pada berkas otot ini dapat masuk kedalam sirkulasi dan menyebar ke bagian tubuh yang lain (Suaib *et al.*, 1998). Sedangkan penularan lainnya juga bisa melalui inokulasi, yaitu melalui luka pada kulit yang terkontaminasi misalnya di *tatoo* dengan alat yang tidak bersih (Noordeen, 1994).

Penyakit ini banyak menyerang golongan masyarakat dengan sosio ekonomi rendah. Hal ini dikaitkan dengan rendahnya daya tahan tubuh secara umum, gizi yang kurang baik dan lingkungan serta hygiene yang tidak baik (Noordeen, 1994).

2.4. *Mycobacterium leprae*

2.4.1. Taksonomi

M. leprae dimasukkan dalam famili *Mycobacteriaceae*, ordo *Actinomycetales*, klas *Schyzomycetes* (Joklik *et al.*, 1992)

2.4.2. Morfologi

M. leprae berbentuk pleomorf lurus, batang ramping dan biasanya berbentuk paralel dengan kedua ujungnya bulat, ukuran panjang 1-8 μm dan lebar 0,3 – 0,5 μm . Basil ini menyerupai kuman berbentuk batang gram positif, tidak bergerak dan tidak berspora (Amiruddin and Noordin, 1995; Brooks *et al.*, 2001).

Dengan mikroskop elektron tampak *M. leprae* mempunyai dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan dan lapisan padat pada bagian dalam yang terdiri dari lipopolisakarida dan lipopolisakarida-protein kompleks. Dinding polisakarida dari *M. leprae* adalah suatu arabinogalaktan yang diesterifikasi oleh asam mikolat (*mycolic acid*) yang membedakan *M. leprae* dari mikobakteria lain (Kandou and Amiruddin, 1998). Dinding sel juga berisi protein yang telah diidentifikasi sebagai target sel T, antara lain protein 17 kDa, 14 kDa, 36 kDa, 65 kDa yang membentuk dinding sel (Rees and Young, 1994). Ketebalan dinding sel ini adalah 20 nm (Amiruddin and Noordin, 1995; Kandou and Amiruddin, 1998).

M. leprae mempunyai kapsul yang disusun oleh bahan lemak yang terdiri dari *ptioserol dimikoserolate* (PDIM) yang berperan utama dalam

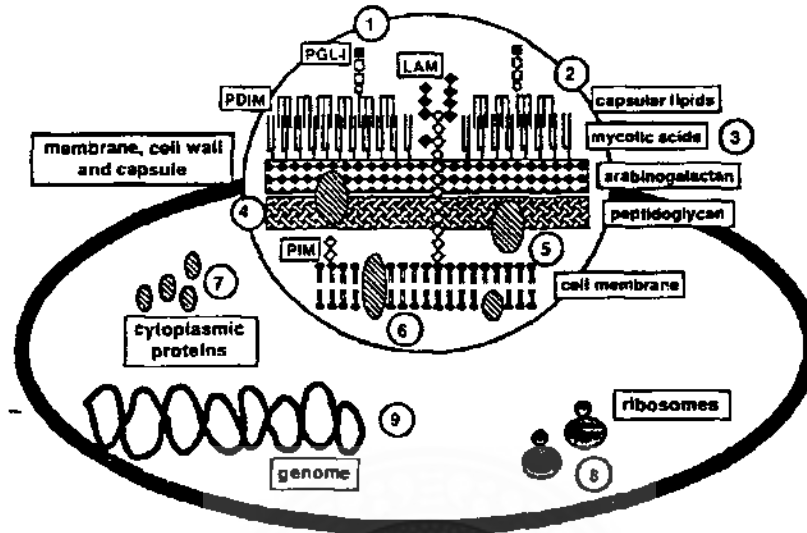
fungsi protektif pasif dan fenolik glikolipid (PGL-1) yang disusun oleh tiga molekul sugar (trisakarida) yang berkaitan dengan 1 molekul fenol dari lemak (*ptioserol*). Fenolikglikolipid (PGL) ada tiga, dimana PGL-II berbeda dari PGL-I dalam hal ketiadaan gugus O-CH₃ pada C-2 rhamnose. PGL-III berbeda dalam hal ketiadaan gugus O-CH₃ dari C-3. PGL-I merupakan produk utama yang disekresi oleh *M. leprae* (Kandou and Amiruddin, 1998). Baik PDIM maupun PGL-I ditemukan pada armadillo dan jaringan manusia yang terinfeksi *M. leprae*. Komponen lemak ini mungkin menetap dalam waktu yang lama setelah bakteri yang utuh menjadi hancur dan dieliminasi. Kapsul dapat melindungi bakteri dari efek toksik enzim lisosom dan metabolit reaktif yang dihasilkan makrofag hospes selama infeksi (Rees and Young, 1994).

M. leprae mempunyai membran yang persis berada di bawah dinding sel dan melengket pada dinding sel, ini berfungsi sebagai transfer dari molekul-molekul di dalam dan di luar basil (Amiruddin and Noordin, 1995). Membran ini dibentuk oleh *phosphatidyl inositol mannoside* (PIM). PIM pada *M. leprae* lebih sedikit daripada yang terlihat pada mikobakterium yang dapat dikultur. Masih perlu ditentukan apakah PIM ini khas untuk *M. leprae* atau merupakan gambaran in vivo mikobakteria yang tumbuh (Rees and Young, 1994).

Basil *M. leprae* merupakan kuman gram positif dimana sitoplasmanya mempunyai struktur yang sama dengan kuman gram positif yang lain yaitu mengandung DNA dan RNA (Drapper, 1994). Terdapat protein yang dominan

dalam sitoplasma yaitu: protein 28 kDa, protein 17 kDa yang berbeda dengan protein pada dinding sel dan *Gro Es heat shock protein*, yang juga ada pada dinding sel. Selain itu juga terdapat protein 65 kDa (*Gro El heat shock protein*) yang umumnya ditemukan pada bentuk *M. leprae* yang telah mengalami degradasi (Rees and Young, 1994).

Semua informasi yang menentukan struktur *M. leprae* terdapat dalam genom. Karena DNA *M. leprae* dapat ditransfer organisme yang dapat dibiakkan, maka *teknik* aplikasi molekular dapat dipelajari. Studi genom *M. leprae* merupakan fokus utama penelitian kusta masa yang akan datang (Rees and Young, 1994). Berat molekul DNA *M. leprae* paling ringan diantara genus Mikobakteria dan hanya sedikit mengandung guanin dan sitosin (Agusni, 2001; Kandou and Amiruddin, 1998). Analisa rantai gen *M. leprae* menunjukkan bahwa perbedaan guanin dan sitosin timbul dari perubahan sistematik pada kodon dengan substitusi adenin dan timin pada posisi basa ketiga. Rangkaian DNA spesifik untuk *M. leprae* telah berhasil dianalisa untuk mendeteksi *M. leprae* dalam jumlah kecil dari sampel klinis menggunakan *teknik* PCR. Selain itu telah dilakukan pemetaan genom untuk keperluan penelitian (Rees and Young, 1994). Struktur selengkapnya bisa dilihat pada gambar 2.1.

Struktur *M. leprae*

Gambar 2.1 Struktur anatomi – mikroskopis *M. leprae* (Rees and Youngs, 1994)

Keterangan :

1. PGL-1
2. Phthiocerol dimycocerosate
3. Mycolid acids
4. Glycine
- 5,6,7. Protein dinding sel
8. Molekul 16S rRNA
9. Genome

2.4.3. Sifat pertumbuhan

M. leprae merupakan parasit obligat intraseluler yang terutama berkembang biak di dalam makrofag dan sel Schwann saraf. Selain itu *M. leprae* juga dapat berkembang biak pada otot bergaris. Basil ini banyak ditemukan pada hidung, mukosa hidung, ulkus, erosi dari penderita lepromatous dan tipe boderline serta lesi-lesi penderita dalam keadaan reaksi. Tempat-tempat ini menunjukkan bahwa *M. leprae* tumbuh lebih baik pada tempat-tempat dengan suhu kurang dari 37°C (optimum 27-30°C) dengan

kata lain tempat yang lebih dingin. Hal ini dibuktikan dengan percobaan Stor (1971) yang menginokulasikan *M. leprae* pada armadillo dimana didapati *M. leprae* berkembang pada hati, limpa dan noduly lymphatici yang memiliki suhu 30-36⁰C (Rees and Young, 1994; Amiruddin and Noordin, 1995).

Hingga saat ini *M. leprae* belum berhasil dibiakkan dalam medium buatan. Pembiakan yang bisa dilakukan saat ini adalah secara in vivo, yaitu dengan menginokulasikan kuman *M. leprae* pada telapak kaki mencit ataupun pada jaringan tubuh hewan Armadillo dari Amerika serta sejenis kera Mangabey dari Afrika (Rees and Young, 1994).

Kuman ini berkembang biak secara perlahan dengan cara *binary fision* dan memerlukan waktu 11 – 13 hari. Lamanya berkembang biak adalah sesuai dengan masa inkubasi dan kronisitas penyakit kusta pada manusia (Amiruddin and Noordin, 1995; Joklik *et al.*, 1992).

M. leprae mempunyai 5 sifat khas yang banyak dikenal sebagai kriteria untuk diagnosis (Agusni, 1997; Amiruddin and Noordin, 1995) yaitu :

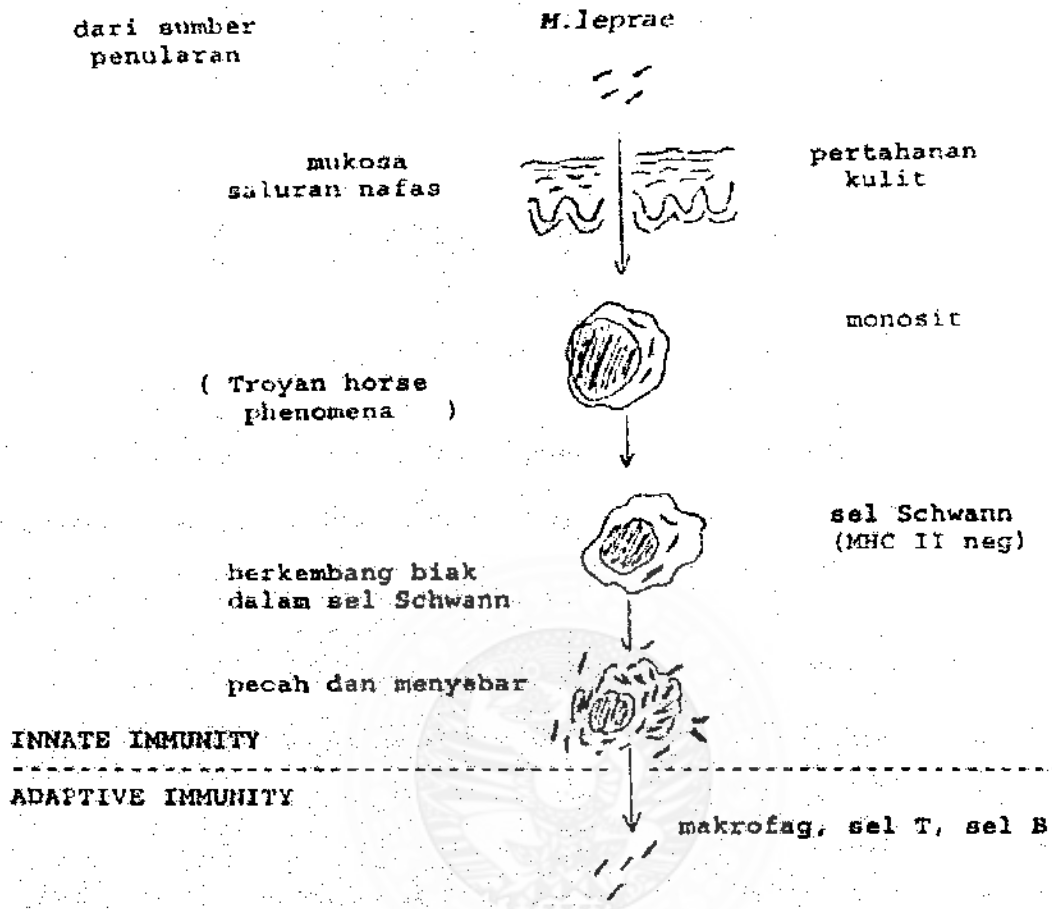
1. Merupakan organisme obligat intraseluler yang tidak bisa dibiakkan dalam media buatan.
2. Sifat mengikat asamnya dapat diekstrasi dengan pyridine, sesuatu yang tidak pernah ditemukan pada mikobakterium lainnya.
3. Merupakan satu-satunya jenis mikobakterium yang mampu mengoksidasi zat *D-dihydroxy phenylalanin* (D-DOPA)
4. Merupakan satu-satunya mikobakteria yang menginvasi serta hidup dalam saraf tepi.

5. Sediaan yang mengandung kuman yang utuh maupun ekstrak terlarutnya mengandung komponen antigenik yang stabil terhadap panas, dengan aktifitas imunologik yang khas, termasuk diantaranya dapat menimbulkan tes kulit yang positif pada penderita kusta tipe *tuberculoid* dan negatif pada tipe *lepramatous*.

2.5. Respons Imun pada Penyakit Kusta

Respons imun setelah terinfeksi dengan *M. leprae* sangat kompleks, yang melibatkan imunitas selular dan humoral. Sebagian besar gejala dan komplikasi penyakit ini disebabkan oleh reaksi imunologi terhadap antigen yang ditimbulkan oleh *M. leprae*. Jika respons imun yang terjadi setelah infeksi cukup baik, maka multiplikasi bakteri dapat dihambat pada stadium awal sehingga dapat mencegah berkembangnya tanda dan gejala klinis selanjutnya (Harboe, 1994).

M. leprae merupakan parasit obligat intraselular, maka respons imun selular lebih memegang peranan penting dalam ketahanan tubuh terhadap infeksi. Respons imun selular merupakan hasil dari aktivasi makrofag dengan meningkatkan kemampuannya dalam menekan multiplikasi atau menghancurkan bakteri (Harboe, 1994). Patofisiologi masuknya *M. leprae* ke dalam tubuh bisa dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Proses masuknya *M. leprae* ke dalam tubuh (Agusni, 1997) pada penyakit kusta.

2.5.1 Respons imun alami

M. leprae masuk ke dalam tubuh dan berhasil melewati sistem pertahanan lapis pertama yang akan memfagosit, kemudian ikut bersama monosit dalam aliran darah. Selama dalam monosit kuman tersebut tidak terbunuh dan bahkan bisa berkembang biak. Keadaan ini disebut dengan *Trojan horse phenomena*, yaitu kuman ikut menumpang dan berkembang dalam salah satu sel tubuh tanpa

dideteksi oleh sistem imunitas yang ada (Agusni, 1998). Suatu saat monosit tersebut akan mati dan pecah sehingga kuman menyebar dan akan mencapai sel Schwann di perinerium saraf tepi yang merupakan predileksi tempat hidupnya *M. leprae*, oleh karena *M. leprae* tahan terhadap lisosim maka kuman tersebut dapat berkembang biak di dalam sel Schwann. Sel ini tidak bisa mengekspresikan molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II sehingga sel Schwann yang terinfeksi tidak bisa berkomunikasi dengan sel limfosit T akibatnya kuman di dalam sel Schwann tidak bisa terdeteksi oleh sistem imun (Agusni, 1998). Selanjutnya bila sel Schwann tersebut mati dan pecah maka *M. leprae* akan keluar dan menyebar. *M. leprae* akan ditangkap kembali oleh sel-sel fagosit lain termasuk sel Schwann. Respons imun seluler akan bekerja bila kuman ditangkap oleh sel fagosit yang profesional khususnya makrofag. Setelah dicerna dan disajikan ke MHC kelas II maka sel limfosit Th / CD4+ akan mengenal dan selanjutnya dimulailah rangkaian proses imun seluler.

2.5.2. Respons imun daptan

Setelah kuman yang masuk dikenal oleh sistem imun tubuh, maka dimulailah proses imunitas yang spesifik. Oleh karena *M. leprae* adalah kuman yang *obligate intraseluler* maka penghancuran kuman yang efektif melalui respons imun seluler. Pada individu yang sehat rangkaian respons ini akan segera berlangsung dengan hasil akhir penghancuran *M. leprae* dalam makrofag maupun penghancuran sel target oleh sel T sitotoksik.

Makrofag yang telah menangkap dan menyajikan antigen akan mengaktifkan sel limfosit CD4+ dan CD8+, menghasilkan proliferasi dan differensiasi menjadi beberapa jenis sel limfosit yang aktif. Terbentuk beberapa jenis sel limfosit T sitotoksik dan sel-sel limfosit CD4+ yang memproduksi sitokin yang memperkuat penghancuran kuman dalam makrofag (Abbas *et al.*, 2000).

Respons imun humoral terhadap *M. leprae* merupakan aktifitas sel limfosit B yang berada dalam jaringan limfoid dan sirkulasi darah. Rangsangan dari komponen antigen kuman tersebut akan merubah sel limfosit B menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi yang akan membantu proses opsonisasi. Tapi ternyata pada penyakit kusta fungsi respons imun humoral ini tidak efektif malahan justru menyebabkan timbulnya beberapa penyulit karena terbentuk secara berlebihan (Harboe, 1994). Hal ini tampak pada penderita kusta *lepromatous* yang mana akibat rangsangan yang cukup lama oleh antigen *M. leprae* maka akan ditemukan antibodi dalam jumlah yang berlebihan dalam sirkulasi darah penderita. Selain antibodi yang spesifik maupaun non spesifik juga ditemukan auto antibodi serta peningkatan komplemen. Keadaan ini dianggap sebagai penyebab terjadinya reaksi *Erythema Nodusum Leprosum* (Sengupta, 2000). Terjadinya produksi yang berlebihan dari antobodi ini diduga akibat lumpuhnya sistim imunitas seluler, sehingga kontrol terhadap sel limfosit menjadi hilang dan akibatnya sel B terus memproduksi antibodi (Harboe, 1994).

Mekanisme Imun pada Kusta *Lepromatous*

Pada kusta *lepromatous* respons imun selular terhadap *M. leprae* tidak dapat dibangun oleh karena defek pada respons sel T. Penderita memberi respons buruk terhadap *Lymphocyte Transformation Test* (LTT) terhadap *M. leprae* dan antigen klonal. Penderita juga gagal memberi respons terhadap tes kulit lepromin. Anergi pada penderita ini menarik perhatian karena hanya spesifik untuk *M. leprae*. Defek makrofag pada penderita *lepromatous* meliputi: tidak sempurnanya presentasi dan pengenalan antigen, tidak sempurnanya produksi interleukin (IL)-1, kegagalan makrofag membunuh *M. leprae* dan supresi makrofag oleh respons sel T (Lockwood and Bryceson, 1998).

Pada awal stadium kusta *lepromatous* terbentuk sel lepra (*Virchowcyte*) yang merupakan modifikasi makrofag yang hanya dapat melisiskan sebagian bakteri sehingga fosfolipid bakteri masih tersisa. Jika sel ini mati atau karena aksi limfosit T CD8+ maka selanjutnya akan difagositosis oleh makrofag lain. Bentuk ini merupakan informasi antigen baru yang lengkap dan dapat berperan sebagai *New Antigen Presenting Cell* (NAPC). Dengan bantuan *Major Histocompatibility* (MHC) kelas II akan dikeluarkan IL-4 yang dapat memacu imunitas humoral melalui stimulasinya terhadap limfosit T CD4+ (Th-2). Selanjutnya limfosit B diaktifkan, merangsang perumbuhan sel plasma sehingga diproduksi serum antibodi anti *M. leprae*, IL-1 dan TNF- α (Abulafia and Vignale, 1999).

Pada kusta *Lepromatous*, NAPC dapat berhubungan dengan MHC-1 dan menstimulasi limfosit T CD8+ yang dapat mempercepat kematian sel. Selain IL-4, sitokin lain seperti IL-5, IL-6 dan IL-10 juga ikut berperan (Abulafia and Vignale, 1999).

Mekanisme Imun pada Kusta *Tuberculoid*

Pada kusta *tuberculoid* makrofag dapat menghancurkan bakteri secara lengkap dan berfungsi sebagai APC normal dengan informasi basil yang lengkap pada permukaannya. Dengan bantuan MHC klas II, makrofag dapat menginduksi sintesa IL-12 yang dapat mendorong CD4+ Th-1 untuk memproduksi IL-2 dan IFN- γ . Makrofag baru kemudian diaktifkan dan ditranformasikan menjadi sel epiteloid (Abulafia and Vignale, 1999).

Kusta *tuberculoid* mempunyai respons imunitas selular yang kuat. Tes LTT menunjukkan bahwa penderita kusta *tuberculoid* memberi respons pada antigen *M. leprae* dan antigen klonal 18 kDa dan 65 kDa. Tes Lepromin memberi reaksi positif kuat pada penderita ini. Hasil akhir dari respons imun yang kuat ini adalah hilangnya antigen pada jaringan lokal yang rusak (Lockwood and Bryceson, 1998).

2.6. Perjalanan klinis penyakit kusta

Perjalanan klinis penyakit kusta merupakan suatu proses yang lambat dan bertahun-tahun, sehingga acapkali penderita tidak menyadari adanya proses penyakit di dalam tubuhnya. Sebagian besar penduduk yang tinggal di daerah

endemis kusta pernah terinfeksi kuman *M. leprae*. Namun karena adanya kekebalan alamiah hanya sekitar 15% dari mereka yang mungkin akan menjadi sakit. Pada mereka yang kekebalan alamiahnya tidak berhasil membunuh kuman yang masuk, maka akan terjadi perkembangbiakan kuman di dalam sel Schwann di perinerium. Proses ini berjalan dengan sangat lambat sehingga munculnya gejala klinis setelah melewati masa inkubasi yang cukup lama (sekitar 2-5 tahun). Tapi gejala yang timbul belum khas, yaitu berupa bercak dengan sedikit gangguan sensasi pada kulit disertai dengan berkurangnya produksi keringat setempat. Keadaan ini disebut fase *Indeterminate* dan dianggap sebagai fase dimana kelainan yang terjadi masih belum dipengaruhi oleh sistem kekebalan tubuh (Agusni, 1997; Amiruddin *et al.*, 1994).

Meskipun tidak semua bentuk *Indeterminate* akan berlanjut menjadi kusta yang manifes (*overt*), dalam beberapa tahun setelah kelainan klinis yang pertama ditemukan, biasanya akan muncul gejala klinik yang karakteristik. Kelainan khas ini bervariasi bisa pada kulit, saraf tepi maupun organ – organ lainnya. Bentuk kelainan yang terjadi tergantung tipe penyakit kusta yang terjadi (Agusni, 1997).

2.7. Gejala klinis

2.7.1. Klasifikasi kusta (Amiruddin, 1997).

1. Klasifikasi Madrid (1953)

- *Indeterminate* (I)
- *Tuberculoid* (T)

- *Borderline* (B)
 - *Lepomatosa* (L)
2. Klasifikasi Ridley-Jopling (1962). Sering digunakan untuk tujuan penelitian :
- *Tuberculoid leprosy* (TT)
 - *Borderline tuberculoid leprosy* (BT)
 - *Mid borderline leprosy* (BB)
 - *Borderline lepromatous leprosy* (BL)
 - *Lepromatous leprosy* (LL)
3. Klasifikasi WHO (1981) dan modifikasi WHO (1988).
- Pausibasilar (PB)
Termasuk kusta tipe TT dan BT menurut kriteria Ridley dan Jopling atau tipe I dan T menurut klasifikasi Madrid dengan BTA negatif.
 - Multibasilar (MB)
Termasuk kusta tipe BB, BL dan LL menurut kriteria Ridley dan Jopling atau B dan L menurut klasifikasi Madrid dan semua tipe kusta dengan BTA positif.

Adapun klasifikasi yang banyak dipakai pada bidang penelitian adalah klasifikasi menurut Ridley dan Jopling yang mengelompokkan penyakit kusta menjadi 5 kelompok berdasarkan gambaran klinis, bakteriologis, histopatologis (Amiruddin *et al.*, 1994; Agusni, 1987);

1. Tipe *Tuberculoid leprosy* (TT)

Lesi mengenai kulit dan saraf, lesi berupa makula atau plakat dengan batas jelas dan pada bagian tengah ditemukan lesi yang regresi atau *central healing*. Jumlah lesi bisa satu atau beberapa. Permukaan lesi dapat bersisik dengan tepi meninggi. Dapat disertai penebalan saraf perifer yang biasanya teraba, kelemahan otot dan sedikit gatal.

2. Tipe *bordeline tuberculoid leprosy* (BT)

Lesinya menyerupai tipe TT, tetapi gambaran hipopigmentasi, kekeringan kulit atau skuama tidak jelas seperti pada tipe *tuberculoid*. Gangguan syaraf tidak seberat pada tipe *tuberculoid*, biasanya asimetris. Lesi satelit biasanya ada dan terletak di dekat saraf perifer yang menebal.

3. Tipe *Mid boderline leprosy* (BB)

Merupakan bentuk yang paling tidak stabil dari semua tipe kusta. Disebut juga sebagai bentuk dimorfik dan jarang dijumpai. Lesi dapat berupa makula infiltratif. Permukaan lesi berkilat batas kurang jelas dengan jumlah lesi yang melebihi tipe BT dan cenderung simetris. Bisa didapatkan lesi *punched out* yaitu hipopigmentasi yang oval pada bagian tengah dengan batas jelas. Ini merupakan ciri khas tipe ini.

4. Tipe *Bordeline lepromatous leprosy* (BL)

Lesi dimulai dengan makula awalnya dalam jumlah sedikit dan dengan cepat menyebar keseluruh badan. Makula lebih jelas dan bervariasi bentuknya. Walaupun masih kecil papul dan nodus lebih tegas dengan distribusi lesi hampir simetris. Lesi bagian lengan sering tampak normal dengan pinggir

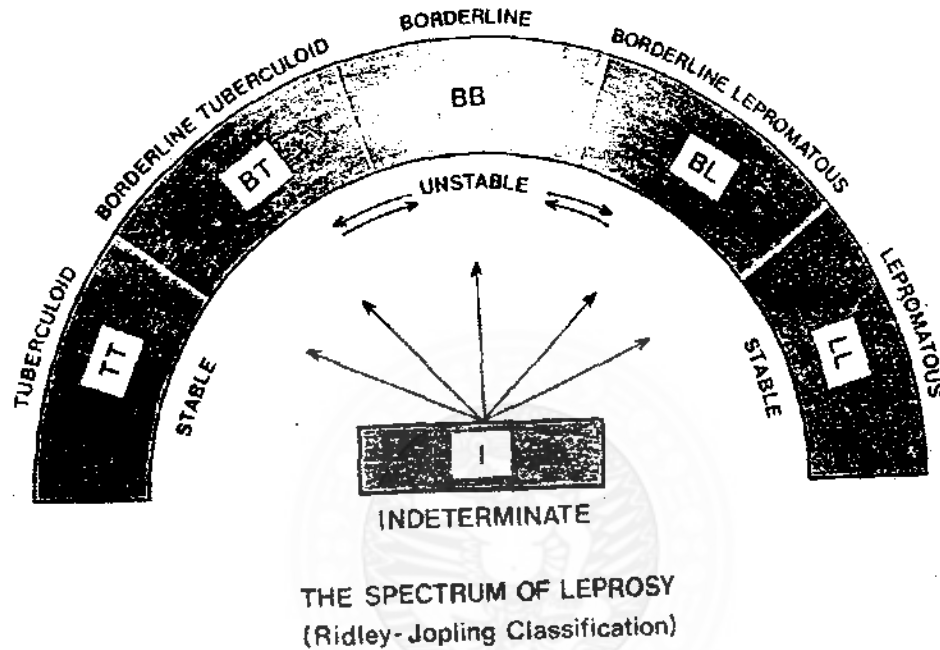
dalam infiltrat lebih jelas dari pinggir luarnya, dan beberapa plak tampak seperti *punched-out*. Tanda kerusakan saraf berupa hilangnya sensasi, hipopigmentasi, berkurangnya keringat dan gugurnya rambut lebih cepat muncul dibanding tipe LL dengan penebalan saraf yang dapat teraba pada tempat predileksi.

5. Tipe *Lepromatous leprosy* (LL)

Jumlah lesi sangat banyak, simetris, permukaan halus, lebih eritematosa berkilat, berbatas tidak tegas dan tidak ditemukan anestesi dan anhidrosis pada stadium dini. Distribusi lesi khas, yakni di dahi, pelipis, dagu, cuping telinga; sedang dibadan mengenai badan yang dingin lengan, punggung tangan dan permukaan ekstensor tungkai bawah. Pada stadium lanjut tampak penebalan kulit, cuping telinga dan garis muka menjadi kasar, dan cekung membentuk fasies leonina yang dapat disertai madarosis, iritis dan keratitis, deformitas pada hidung. Kerusakan saraf yang luas menyebabkan gejala *stocking* dan *glove anesthesia*.

Gambar ilustrasi spektrum tipe penyakit kusta dapat dilihat pada gambar 2.3.

THE SPECTRUM OF LEPROSY (Ridley-Jopling Classification)



Gambar 2.3 Spektrum penyakit kusta (Lieber Nunzi, 1990)

2.8. Diagnosis penyakit kusta

Diagnosis penyakit kusta biasanya ditegakkan dengan ditemukannya gejala klinis yang khas serta ditemukannya BTA dari spesimen hapusan sayatan kulit. Dalam program pemberantasan kusta, WHO menganjurkan penggunaan 4 kriteria untuk diagnosis kusta yaitu :

1. Ditemukannya lesi kulit yang khas.
2. Adanya gangguan sensasi kulit
3. penebalan saraf tepi pada tempat predileksi

4. BTA (+) dari sediaan sayatan kulit.

Diagnosis kusta dapat ditegakkan apabila ditemukan paling sedikit 2 dari 3 kriteria pertama atau cukup dengan kriteria keempat (Amiruddin *et al*, 1994).

Pemeriksaan basil tahan asam (*Acid fastness staining*) tidak memberikan hasil yang spesifik untuk mendeteksi *M. leprae*, oleh karena lebih sering memberikan hasil yang positif palsu dengan mikobakteria lain. Pada kusta tipe *tuberculoid* tidak terdapat infiltrasi yang difus dan jarang terdapat BTA pada lesi sehingga sedikit sekali kemungkinan untuk menemukan BTA dari hapusan sayatan lesi kulit (Sehgal and Joginder, 1990). Dengan pemeriksaan BTA kuman baru terdeteksi apabila berjumlah lebih dari 10^4 per gram jaringan. Dengan pulasan *Ziehl Neelsen* basil ini dapat terlihat soliter, bergerombol atau berbentuk globus. Globus ini dibatasi oleh membran dapat mengandung 50-100 basil *M. leprae*. Pada bundel yang kecil basil ini tersusun paralel menyerupai bundel sigaret (Rees and Young, 1994; Amiruddin *et al.*, 1994).

Indeks Bakteri (IB)

Skala logaritma dari Ridley telah diperkenalkan untuk mengukur densitas bakteri atau Indeks Bakteri (IB) dan dipergunakan secara luas sampai saat ini. IB merupakan ukuran semi kuantitatif kepadatan BTA dalam sediaan hapus. IB berguna untuk membantu menentukan tipe kusta dan menilai hasil pengobatan. Penilaian menurut skala logaritma Ridley tersebut adalah:

(0): tidak ditemukan BTA dalam 100 lapangan pandang.

(1+): 1 – 10 BTA ditemukan dalam 100 lapangan pandang.

(2+): 1- 10 BTA ditemukan dalam 10 lapangan pandang.

(3+): 1- 10 BTA ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang

(4+): 10- 100 BTA ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang.

(5+): 100 – 1000 BTA ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang.

(6+): lebih dari 1000 BTA atau 5 *clumps* dalam rata-rata 1 lapangan pandang.

Jika IB kurang dari 2 maka dikelompokkan pada tipe pausibasiler, jika IB 2 atau lebih dikelompokkan dalam multibasiler. Yang terbaru, WHO memodifikasi strategi untuk tujuan terapi, yaitu semua penderita dengan hapusan negatif adalah pausibasiler, sedangkan penderita dengan hapusan positif atau lesi lebih dari 10 buah walaupun dengan IB negatif, adalah multibasiler.

Selain dengan pemeriksaan klinis dan bakteriologis (*staining*) juga ada pemeriksaan histopatologik dari saraf atau lesi kulit yang dicurigai, tapi pemeriksaan ini bersifat invasif serta membutuhkan waktu agak lama (Wirohadidjojo, 1991).

Kegagalan pembiakan dan isolasi kuman *M. leprae* mengakibatkan diagnosis serologis menjadi alternatif. Beberapa tes serologik telah dikembangkan untuk mendeteksi infeksi basil *M. leprae*, tapi hasilnya belum memuaskan dimana uji serologis hanya bermanfaat untuk diagnosis bila hasilnya dinilai bersama-sama dengan informasi diagnostik lainnya.(Iskandar *et al.*, 1998).

2.8.1. Penggunaan PCR untuk mendeteksi *M. leprae*.

Berdasarkan penelitian biologi molekular akhir-akhir ini, dikembangkanlah suatu teknik memperbanyak asam deoksiribonukleat (DNA) dengan menggunakan enzim polimerase. PCR merupakan suatu cara invitro untuk memperbanyak fragmen DNA suatu organisme dengan menggunakan enzim polimerase yang diarahkan oleh potongan urutan DNA yang spesifik bagi DNA mikroorganisme tersebut yang dikenal sebagai primer (Wirohadidjojo, 1991).

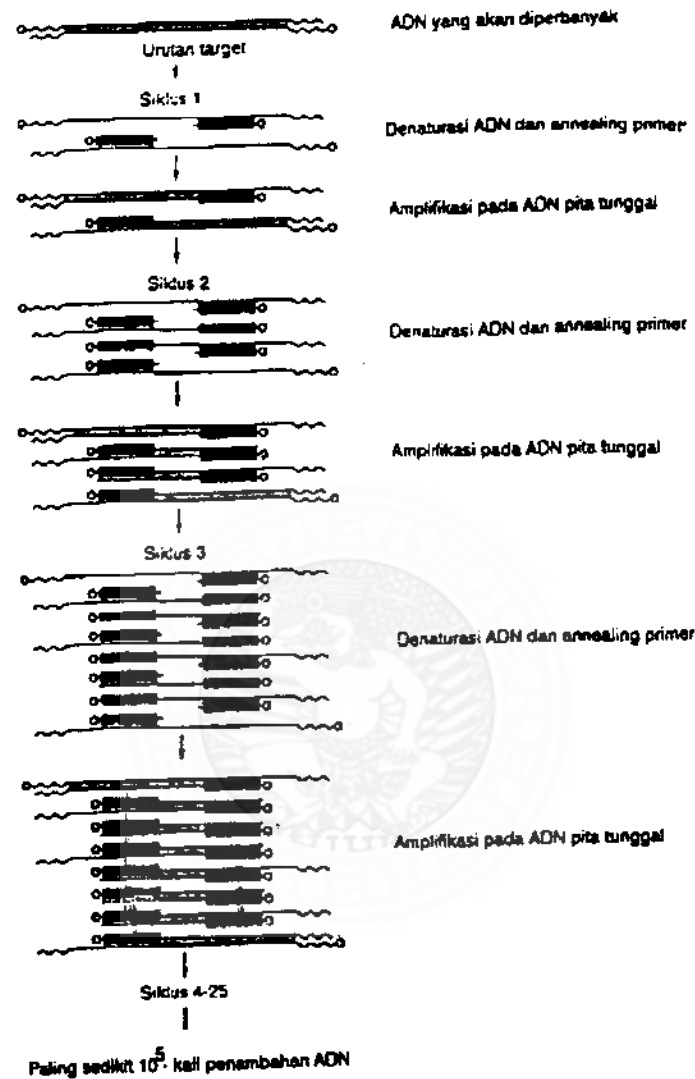
Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, PCR ternyata mempunyai tingkat spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi dalam waktu yang cepat untuk mendeteksi basil *M. leprae* pada penderita kusta yang menunjukkan gejala klinis maupun penderita sub klinis. Amplifikasi dilakukan pada berbagai potongan gen yang berbeda dari *M. leprae*. Termasuk gen yang mengkode berbagai macam protein *M. leprae* (18 kDa, 36 kDa, 65 kDa) serta *leprosy serum reactive* (LSR), rRNA dan *repetitive sequences*. (Hartskeerl *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 1994; Wichitwechekarn *et al.*, 1995; Katoch and Sharma, 2000; Katoch, 2000).

2.8.2. Prinsip Dasar PCR

PCR adalah suatu metode enzimatik in vitro yang digunakan untuk menghasilkan gugus DNA spesifik dalam jumlah besar dan dalam waktu yang singkat melalui tahap denaturasi, *annealing* dan elongasi atau ekstensi (Booth and Watson, 1994). Potongan DNA yang urutannya spesifik bagi DNA

mikroorganisme tersebut dikenal sebagai *primer* karena berperan sebagai penyidik atau *sekuen* yang mengawali dan menuntun perbanyakan DNA tersebut (Wirohadidjojo, 1991). Umumnya *primer* yang digunakan untuk diagnosis berukuran 18 - 24 basa, walaupun PCR masih memberikan hasil baik dengan menggunakan *primer* yang berukuran 32 basa. PCR pertamakali dikembangkan oleh Mullis *et al.* (1986) yang mempergunakan cara memperbanyak DNA dengan menggunakan enzim polimerase. Pita ganda DNA didenaturasikan dengan pemanasan 92⁰C selama 1 menit, kemudian ditambahkan oligonukleotida sintesis sebagai primer untuk memulai amplifikasi pada regio spesifik dari masing-masing pita tunggal DNA yang telah dipisahkan. Untuk proses *annealing* yaitu menempelnya primer pada regio spesifik pada DNA pita tunggal, dibutuhkan pemanasan 60⁰C selama 2 menit. Pada *annaeling* ini berlaku rumus A-T, T-A, dan G-C. Selanjutnya proses elongasi terjadi bila campuran tadi dipanaskan selama 2 menit pada 72⁰C. Elongasi terjadi karena dalam campuran tadi selain enzim polimerase, sebelumnya ditambahkan 4 macam *deoxynucleotide phosphate* yaitu : *deoxyadenosinetriphosphate* (dATP), *deoxyguanidinetriphosphate* (dGTP), *deoxycytosinetriphosphate* (dCTP) dan *deoxythyminetriphosphate* (dTTP). Siklus tersebut dilakukan berulang kali dan pada siklus yang ke-25 didapatkan perbanyakan DNA menjadi 10²⁵ kali dari sebelumnya. Selanjutnya DNA yang telah diperbanyak dideteksi dengan menggunakan teknik elektroforesis gel dengan transiluminasi ultraviolet (Wirohadidjojo, 1991). Proses amplifikasi fragmen DNA dapat dilihat pada gambar 2.4.

Polymerase Chain Reaction



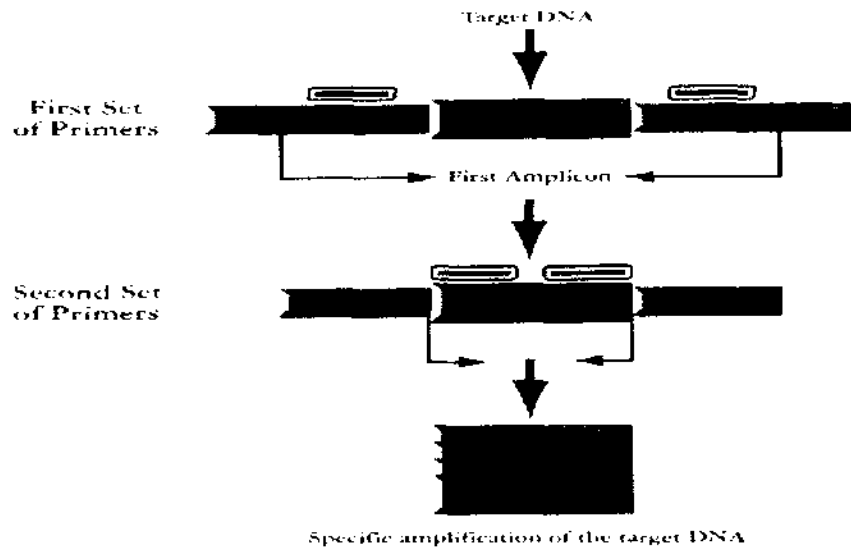
Gambar 2.4 Gambar skematis perbanyakan fragmen DNA pada amplifikasi menggunakan teknik PCR untuk mendeteksi *M. leprae* (Wirohadidjojo, 1991)

2.8.3. PCR untuk deteksi *M. leprae*

PCR merupakan alat yang sangat sensitif dan spesifik yang sangat berguna dalam studi epidemiologi untuk deteksi dan menentukan distribusi *M. leprae* dalam berbagai populasi. Karena satu dari strategi penting dalam

kontrol penyakit kusta adalah deteksi kuman penyebab sehingga metode PCR dapat saling melengkapi dengan gejala klinis dan pemeriksaan lainnya untuk membantu tujuan akhir program kontrol kusta yaitu eliminasi kusta dimasa datang.

Penggunaan teknik PCR dalam mendeteksi DNA *M. leprae* dapat menggunakan beberapa cara, salah satunya adalah dengan *Nested* PCR. *Nested* PCR berarti bahwa digunakannya dua pasang primer untuk satu *locus* DNA. Pasangan primer pertama akan mengamplifikasi *locus* yang sama seperti pada *single* PCR. Sedangkan pasangan primer kedua (*nested primers*) akan melekat pada produk PCR pertama dan akan menghasilkan produk PCR kedua yang akan lebih pendek dari produk PCR pertama. Pemikiran logis dibalik ini adalah bahwa probabilitas untuk mengamplifikasi *locus* yang salah akan kecil oleh karena akan diamplifikasi kedua kalinya oleh pasangan primer kedua sehingga secara teoritis dapat meningkatkan spesifisitas PCR (Hill, 2002; Davidson, 2002), gambar 2.5.



Gambar 5.2 Gambar skematis perbanyak fragmen DNA dengan metode Nested PCR (Hill, 2002)

Nested PCR untuk mendeteksi DNA *M. leprae* menggunakan dua set primer yang mengamplifikasi gen antigen 65 kD atau yang disebut juga dengan gen *groEL* *M. leprae*. Dipilihnya gen ini sebagai target amplifikasi adalah karena urutan nukleotidanya telah dapat ditentukan tidak hanya pada *M. leprae* tapi juga pada *M.tuberculosis*, dan ternyata didapat perbedaan urutan nukleotida diantara kedua spesies tersebut sehingga sangat mungkin diidentifikasi secara spesifik untuk masing – masing spesies. Clark – Curtiss dan Walsh memperkirakan hanya sekitar 0.25% terdapat variasi pada urutan nukleotida dari isolat yang diuji. Hal ini memberi kesan bahwa urutan nukleotida pada gen *groEL* sangat stabil dan karenanya hasil negatif palsu jarang ditemukan. (Plikaytis *et al.*, 1990)

Primer yang digunakan adalah bagian dari urutan gen *groEL* (L1 – L4), dimana urutan yang digunakan adalah urutan yang spesifik untuk *M. leprae* dan tidak ada pada gen *groEL* *M.tuberculosis*. Primer L1 terletak pada urutan ke 1236 – 1253 dari gen *groEL* *M. leprae* (GTG GCT CAG ATC CGT ACC) sedangkan L2 terletak pada urutan ke 1813 – 1792 (ATG CCA CCG GCT GGG TCG CTG G). Kedua primer ini mengamplifikasi gen *groEL* *M. leprae* dengan produk akhir 587 base pair (bp). Sedangkan L3 terletak pada urutan ke 1458 – 1476 (CTA CAG GCT GCT CCG GCT C) dan L4 terletak pada urutan 1804 – 1782 (GTC GGG TCG CTC GCC GGA GCT GC) pasangan primer ini mengamplifikasi produk 578 bp dengan hasil akhir berupa 347 bp. (Plikaytis *et al.*, 1990)

Dengan prosedur yang dijalankan yaitu berupa amplifikasi sebanyak 25 siklus untuk amplifikasi pertama dan 15 siklus untuk amplifikasi kedua ternyata mampu mendeteksi satu target *sekuen* dari sampel yang diperiksa. Spesifisitas primer ini telah diuji pada 41 spesies bakteri dan 25 diantaranya adalah spesies mikobakteria, dan hasilnya ternyata primer ini hanya spesifik untuk *M. leprae*. (Plikaytis *et al.*, 1990)

Selain primer di atas juga telah digunakan beberapa primer oleh peneliti lain yang kesemuanya mengamplifikasi gen *M. leprae* dengan target yang berbeda – beda yaitu primer S-13 dan S-62 yang mengamplifikasi gen 36 kD (*pra gene*) *M. leprae*, primer yang mengamplifikasi gen 18 kD, dan *repetitive sequences* dari *M. leprae*. (Katoch and Sharma, 2000)

Dari penelitian yang dilakukan Rizalinda & Hatta (1999) yang membandingkan hasil pemeriksaan PCR dengan *Acid Fast Bacili* (AFB) *staining* terhadap semua penderita kusta ternyata memberikan hasil PCR positif yang lebih tinggi dalam mendeteksi basil *M. leprae*. Begitu juga penelitian yang dilakukan oleh Wichitwechkarn *et al.*, (1995) yang berhasil mendeteksi adanya *M. leprae* 27 orang dari 31 penderita kusta MB. Klatser *et al.*, (1991) juga menemukan potongan histopatologi yang dengan pulasan Ziehl Neelsen tidak mengandung *M. leprae* ternyata dengan PCR lebih dari 50% terbukti mengandung *M. leprae* (Hartskeerl *et al.*, 1989).

Bahan pemeriksaan yang dapat diambil dari penderita kusta untuk diperiksa dengan teknik PCR adalah hapusan mukosa hidung (*nasal swab*), sayatan lesi kulit, dan biopsi lesi (Amiruddin and Noordin, 1995)

PCR yang berbasis pada DNA memiliki keterbatasan dalam monitoring terapi khususnya membedakan reaksi lambat dan *relapse* pada penderita kusta. Untuk itu telah diperkenalkan teknik *reverse transcriptase* (RT) PCR dan *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA) dengan target pada 16S rRNA (Katoch, 2000).

Selain memiliki keunggulan seperti yang telah diuraikan di atas, PCR juga memiliki beberapa kelemahan, antara lain pemeriksaan ini sangat mudah terkontaminasi sehingga dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan, untuk itu dituntut adanya peralatan laboratorium yang lengkap khususnya dalam persyaratan sterilisasi dari alat-alat yang digunakan. Selain itu belum adanya standarisasi pada pemeriksaan ini.



BAB III

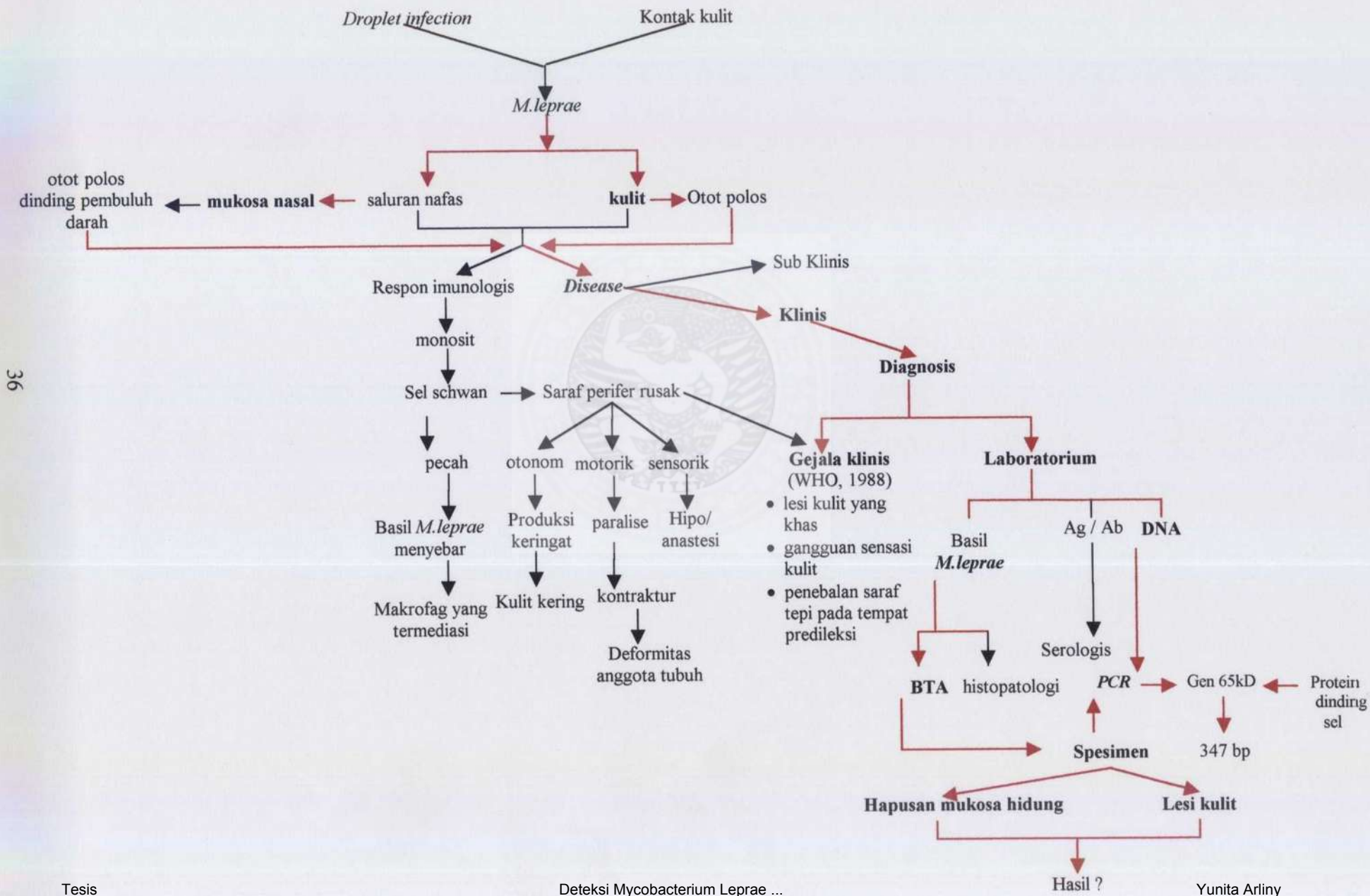
KERANGKA KONSEPTUAL

HIPOTESIS

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konseptual



36

3.2. Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah dan kajian teori yang telah dilakukan maka dapat ditentukan hipotesis penelitian yaitu sebagai berikut :

1. Ada perbedaan hasil deteksi *basil M.leprae* dengan teknik PCR antara spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru.
2. Ada perbedaan hasil deteksi basil *M.leprae* antara pemeriksaan mikroskopis BTA (Ziehl Neelsen) dengan PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru.





BAB IV METODE PENELITIAN

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasional laboratorik.

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah penderita yang datang ke Divisi Morbus Hansen Unit Rawat Jalan di RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang didiagnosis secara klinis sebagai kusta.

4.2.2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah semua penderita kusta baru secara klinis memenuhi kriteria penerimaan sampel penelitian. Secara rutin penderita kusta diambil sampel hapusan mukosa hidung dan sampel dari sayatan lesi kulit. Peneliti memanfaatkan spesimen yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak membuat protokol baru.

4.2.2.1. Besar Sampel

$$n = \frac{(Z_{1/2\alpha}\sqrt{2pq} + Z\beta\sqrt{p_1q_1 + p_2q_2})^2}{p_1 - p_2}$$

Keterangan :

Dari penelitian pendahuluan yang dilakukan didapatkan ;

$P_1 =$ proporsi hasil PCR positif dari spesimen mukosa hidung = 0,3

$P_2 =$ proporsi hasil PCR positif dari spesimen lesi kulit = 0,7

$\alpha = 0,05 \rightarrow Z = 1,96$

$\beta = 0,1 \rightarrow Z = 1,28$

Maka didapat jumlah sampel = 12,2. Dibulatkan menjadi 13 sampel.

4.2.2.2. Teknik pengambilan sampel

Berkenaan dengan jumlah sampel yang tidak terlalu banyak maka dilakukan total sampling untuk penelitian selama 3 bulan.

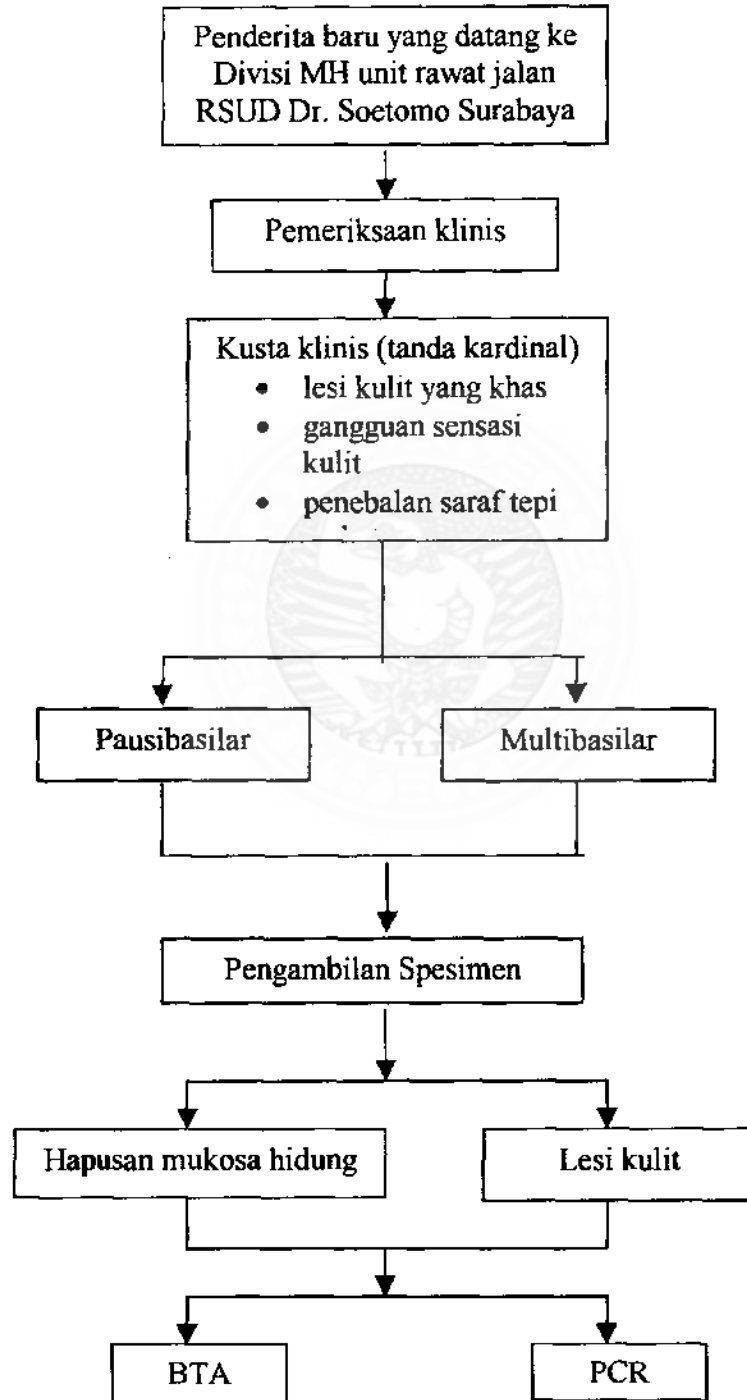
4.2.2.3. Kriteria Inklusi

- a. Penderita kusta baru yang telah didiagnosis sesuai dengan *cardinal sign* dan klasifikasi WHO 1988
- b. Belum pernah mendapat rejimen pengobatan

4.2.2.4. Kriteria Eksklusi

- a. Sedang menderita reaksi kusta

4.2.2.5. Prosedur Pengambilan Sampel



4.3. Definisi Operasional

Penderita kusta baru :

- Penderita kusta baru adalah penderita yang telah didiagnosis secara klinis sebagai kusta dan belum pernah mendapat pengobatan anti kusta sebelumnya.

Diagnosis klinis kusta :

- Diagnosis klinis penyakit kusta adalah penentuan penyakit kusta berdasarkan adanya tanda-tanda pokok atau cardinal signs yaitu : adanya kelainan kulit, berkurang sampai hilang rasa pada kelainan kulit tersebut, penebalan saraf tepi dan ditunjang dengan adanya basil tahan asam di dalam sediaan hapusan.
- Seseorang dinyatakan sebagai penderita kusta bilamana terdapat sekurang-kurangnya dua dari tanda pokok diatas.
- Penderita yang telah didiagnosis secara klinis dikelompokkan dalam klasifikasi WHO yaitu pausibasilar (PB) dan multibasilar (MB).

Pemeriksaan Basil Tahan Asam (BTA)

- Pemeriksaan Basil tahan asam diambil dari hapusan mukosa hidung dan lesi kulit penderita, dilakukan pengecatan *Ziehl Neelsen*, dilakukan pembacaan hasil dengan menentukan IB.
- Hasil pemeriksaan BTA disebut positif bila tampak adanya basil tahan asam berwarna merah berbentuk *solid-fragmented* atau granular.

- BTA berbentuk *solid* adalah basil dengan dinding sel yang tidak putus mengambil zat warna secara merata dan panjang kuman 5 kali lebarnya.
- BTA berbentuk *fragmented* adalah basil dengan dinding sel terputus sebagian atau seluruhnya dan pengambilan zat warna tidak merata.
- BTA berbentuk *granular* adalah basil yang terlihat seperti titik-titik tersusun seperti garis lurus atau berkelompok.
- IB. Penilaian dilakukan menurut skala logaritma Ridley:
 - (0) : tidak ditemukan BTA dalam 100 lapangan pandang
 - (1+) : 1 – 10 BTA ditemukan dalam 100 lapangan pandang
 - (2+) : 1 – 10 BTA ditemukan dalam 10 lapangan pandang
 - (3+) : 1 – 10 BTA ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang
 - (4+) : 10 – 100 BTA ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang
 - (5+) : 100 – 1000 BTA ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang
 - (6+) : lebih dari 1000 BTA atau 5 *clumps* dalam rata-rata 1 lapangan pandang

DNA *M. leprae* :

- Adanya DNA *M. leprae* dapat dideteksi dengan pemeriksaan PCR dengan cara amplifikasi rangkaian DNA template.
- Pada penelitian ini digunakan dua pasang primer yaitu L1, L2 dan L3, L4 yang mengamplifikasi fragmen 347 bp dari gen yang menyandi antigen 65 kDa yang merupakan rangkaian nukleotida yang spesifik terhadap spesies *M. leprae*.

- Hasil pemeriksaan PCR dikatakan positif bila pada marker ketinggian 347 bp terdapat pita dan sejajar dengan kontrol positif yang berisikan DNA dari kuman *M. leprae*.

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Bahan untuk membuat hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit

Alkohol 70%.

4.4.2. Bahan untuk pengecatan BTA dengan metode Ziehl Neelsen dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit

Larutan karbol fuchsin 0,3%

Larutan asam alkohol (HCl alcohol 3%)

Larutan methylen blue 0,3%

4.4.3. Bahan untuk pemeriksaan spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit dengan teknik PCR

4.4.3.1. Bahan untuk ekstraksi DNA *M. leprae* per sampel

Lysis buffer yang mengandung proteinase K(1 mg/ml) dan Tween-20 0,5% + Tris HCl

4.4.3.2 Bahan untuk Amplifikasi DNA *M. leprae*

Primer L1 5`- GTG GCT CAG ATC CGT ACC 3`

L2 5` - ATG CCA CCG GTC GGG TCG CTC G 3`

L3 5' - CTA CAG GCT GCT CCG GCT C 3'

L4 5' - GTC GGG TCG CTC GCC GGA GCT GC 3'

FailSave PCR 2x PreMix yang mengandung :

Tris-HCl 100 mM (pH 8,3 pada suhu 22⁰C)

KCl 100 mM

MgCl₂ 3 mM

Campuran deoxynucleosidetriphosphate (dNTP) masing-masing 400 mM, (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

FailSafe PCR enhancer (betaine atau trimethyl glycine)

Taq DNA polymerase

DNA *template* 100 – 200 ng dari tiap sampel

Air destilasi steril atau *nuclease free water* (Otsuka steril water)

4.4.3.3 Bahan untuk elektroforesis

Agarose *powder* HS 2 %

TBE 0,9 M

Ethidium Bromide 1 µg/ml

Loading buffer yang berisikan Glycerol 30%, EDTA 30mM, Bromphenol blue 0,03% dan Xylene cyanol 0,03%

Marker ΦX 174-Hinc II digest

4.5. Instrumen Penelitian

4.5.1. Instrumen untuk membuat sediaan hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit

Gelas obyek

Lampu spritus

Skapel steril (Aesculap no 15)

Spekulum hidung

Cotton wool swab (*JCB sterilized mentip*)

Kapas steril

4.5.2. Instrumen untuk pengecatan BTA dengan metode Ziehl Neelsen dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit

Rak pengecatan

Pipet

Pinset kecil

Pengukur waktu (*timer*)

Lampu spritus

Air yang mengalir berupa air ledeng atau botol berpipet berisi air

4.5.3. Instrumen untuk mengambil spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit untuk pemeriksaan PCR

Cotton wool swab (*JCB sterilized mentip*)

Skalpel steril (Aesculap no. 15)

Spekulum hidung

Eppendorf tube steril

4.5.4. Instrumen untuk pemeriksaan spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit dengan metode PCR

Mesin PCR

PCR tube

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Divisi Morbus Hansen unit Rawat Jalan Penyakit Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan di *Tropical Disease Center (TDC) UNAIR Surabaya*.

4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 3 bulan antara bulan Maret sampai Mei 2003.

4.7. Prosedur dan Pengambilan Data

4.7.1. Pemeriksaan Mikroskopis (Syahril and Hatta,1999; Amiruddin *et al.*,1994)

1. Prosedur pengambilan sampel spesimen hapusan mukosa hidung
 - a. Spekulum hidung dimasukkan dalam hidung penderita dalam keadaan tertutup, lalu kedua jepitnya dibuka
 - b. Dilakukan penghapusan (swab) pada bagian anterior inferior hidung kanan kiri dengan cotton swab steril yang telah disiapkan
 - c. Dari bahan tersebut kemudian dibuat sediaan hapus yang rata pada gelas obyek
 - d. Setelah sediaan kering lalu difiksasi dengan melewatkan sediaan di atas nyala api spritus sebanyak 3X (selama \pm 5 detik).

2. Prosedur pengambilan sampel spesimen sayatan lesi kulit
 - a. Bagian yang akan diambil lebih dahulu dilakukan tindakan aseptis dengan kapas alkohol.
 - b. Bagian tersebut dijepit diantara jari kedua ibu jari tangan kiri sehingga tampak jaringan kulit menjadi pucat agar kemungkinan perdarahan sedikit sekali.
 - c. Dengan skapel steril dibuat sayatan lebih kurang 0,5 cm sampai dermis (sediaan lebih kurang 2 mm).
 - d. Skapel diputar 90 derajat sambil mengerok sisi dan dasar luka sampai didapat bubur jaringan dari epidermis dan dermis.

- e. Dari bahan tersebut dibuat sediaan hapus yang rata pada gelas obyek.
- f. Luka sayatan ditekan dengan kapas steril yang kering untuk menghentikan perdarahan
- g. Setelah sediaan kering lalu difiksasi dengan melewati sediaan di atas nyala api spritus sebanyak 3X (selama 5 detik).

3. Pengecatan *Ziehl Neelsen*

- a. Kedua sediaan (hapus mukosa hidung dan sayatan lesi kulit) yang telah difiksasi diletakkan pada rak dengan hapusan menghadap keatas).
- b. Larutan karbol fuchsin 0,3 % dituangkan di atas hapusan sampai menutupi seluruh permukaan sediaan hapusan.
- c. Kemudian dipanaskan dengan nyala api spritus sampai keluar uap selama 3-5 menit zat warna tidak boleh mendidih atau kering.
- d. Sediaan disingkirkan dari api spritus, kemudian didiamkan selama 5 menit.
- e. Sediaan dibilas dengan air mengalir pelan sampai zat warna yang bebas terbang.
- f. Sediaan dituangi dengan asam alkohol (HCl alkohol 3%) sampai warna merah fuchsin hilang.
- g. Sediaan dibilas kembali dengan air mengalir
- h. Sediaan dituangi dengan metylen blue 0,3% sampai menutupi seluruh permukaan dibiarkan selama 1-2 menit.

- i. Sediaan dibilas kembali dengan air mengalir.
 - j. Sediaan dikeringkan di atas rak pengering di udara terbuka.
4. Pembacaan sediaan hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit :
- a. Mencari lebih dahulu lapang pandang dengan obyek 10X
 - b. Ditetaskan satu tetes minyak emersi di atas sediaan yang telah diwarnai
 - c. Periksa dengan menggunakan lensa okuler 10X dan obyektif 100X
 - d. Dicari Basil Tahan Asam (BTA) yang berbentuk batang berwarna merah.

5. Pembacaan Hasil

Pembacaan hasil pemeriksaan mikroskopis dari kedua sediaan dilakukan menurut skala logaritma Ridley :

- (0) : tidak ditemukan BTA dalam 100 lapangan pandang
- (1+) : 1 – 10 BTA ditemukan dalam 100 lapangan pandang
- (2+) : 1 – 10 BTA ditemukan dalam 10 lapangan pandang
- (3+) : 1 – 10 BTA ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang
- (4+) : 10 – 100 BTA ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang
- (5+) : 100 – 1000 BTA ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang
- (6+) : lebih dari 1000 BTA atau 5 *clumps* dalam rata-rata 1 lapangan pandang

4.7.2. Pemeriksaan dengan Teknik PCR (Syahril and Hatta,1999; Wichitwechekarn *et al.*,1995; Sambrook *et al.*,1989)

1. Prosedur pengambilan sampel

Untuk mengambil spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit yang akan dilakukan pemeriksaan dengan teknik PCR, maka dilakukan pengambilan kedua spesimen dengan cara yang sama dengan pengambilan spesimen untuk pemeriksaan mikroskopis.

2. Prosedur ekstraksi DNA dari spesimen hapusan hidung

- a. Tiap sample cotton wool yang telah diswab pada mukosa hidung dimasukkan kedalam tabung eppendorf yang berisi 600 µl PBST. Dengan memegang ujung tangkainya, swab diputar – putar sambil ditekan pada dasar tabung. Hal ini dilakukan ± selama 1 menit.
- b. Swab ditarik kembali
- c. Dilakukan sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 20 menit.
- d. Supernatan dibuang, pelet ditambahkan dengan 50 µl lysis buffer dan dipindahkan ke dalam PCR *tube*.
- e. Masukkan PCR tube dalam mesin PCR, inkubasikan pada 60⁰C selama 16 jam dan kemudian dipanaskan pada 94⁰ C selama 10 menit, lalu dilakukan proses *freezing thawing* dengan memanaskan PCR tube pada 100⁰C serta dimasukkan ke dalam freezer dengan

suhu -20°C selama 10 menit. Proses *freezing thawing* ini dilakukan sebanyak 2X secara bergantian.

3. Prosedur ekstraksi DNA dari spesimen sayatan lesi kulit :

- a. Blade yang digunakan untuk pengambilan lesi kulit bersama dengan sediaananya dimasukkan dalam tabung yang berisi alkohol 70%, dilakukan vortexing selama 5 menit dan ambil kembali bladanya.
- b. Tabung disentrifuge 13.000 rpm selama 20 menit.
- c. Supernatan dibuang, pada pelet dilakukan penambahan PBST sebanyak $400\mu\text{l}$, disentrifuge kembali pada 13.000 rpm selama 20 menit.
- d. Supernatan dibuang, dan kemudian pada pelet ditambahkan $50\mu\text{l}$ lysis buffer dan kemudian pindahkan pada PCR tube.
- e. Masukkan PCR tube kedalam mesin PCR, inkubasikan pada 60°C selama 16 jam dan kemudian panaskan pada 94°C selama 10 menit, lalu dilakukan proses *freezing thawing* dengan memanaskan PCR tube pada 100°C serta dimasukkan ke dalam freezer dengan suhu -20°C selama 10 menit. Proses *freezing thawing* ini dilakukan sebanyak 2X secara bergantian.

4. Prosedur amplikasi DNA

- a. Dimasukkan bahan – bahan di bawah ini (master mix) :

- primer L1 1 μ l
- primer L2 1 μ l
- Taq DNA polymerase 0,25 μ l
- Steril destilated water 7,75 μ l

Lalu tambahkan PreMix sebanyak 12,5 μ l dan template (sampel) sebanyak 2,5 μ l. Keseluruh bahan – bahan di atas dimasukkan dalam PCR tube yang volume keseluruhannya adalah 25 μ l.

- b. Dilakukan vortexing selama \pm 1 menit
- c. Masukkan PCR tube dalam mesin PCR
- d. Dilakukan *pre heat* pada 94⁰C selama 2 menit, denaturasi 94⁰C selama 30 detik, *annealing* pada 58⁰C selama 30 detik dan ekstensi pada 72⁰C selama 30 detik, diikuti dengan *prolong* ekstensi pada 72⁰C selama 9 menit. Untuk amplifikasi pertama dilakukan sebanyak 35 siklus.
- e. Diambil produk dari amplifikasi pertama yang digunakan sebagai template sebanyak 2,5 μ l, lalu ditambahkan master mix yaitu :
 - L3 1 μ l
 - L4 1 μ l
 - Taq DNA polymerase 0,25 μ l
 - Destilated water 7,75 μ l

Dan PreMix sebanyak 12,5 μ l. Keseluruh bahan – bahan dimasukkan dalam PCR tube baru yang volume keseluruhannya 25 μ l.

- f. Dilakukan langkah pada point b dan c
- g. Dilakukan 3 langkah amplifikasi yang sama dengan pada point d, akan tetapi dilakukan sebanyak 25 siklus.

Setelah amplifikasi fragmen DNA selesai, maka ukuran panjang ampikon ditentukan dengan agarose gel 2% melalui proses elektroforesis.

5. Prosedur Elektroforesis gel

- a. Agarose ditimbang sesuai kebutuhan, konsentrasi yang digunakan adalah 2%.
- b. 2 g agarose dilarutkan dalam 100 ml TBE, jika cetakan 20 ml berarti dilakukan 1/5 nya.
- c. Campuran dimasukkan dalam microwave sampai cair, ditunggu sampai suhu 50-60⁰C.
- d. Dituang dalam cetakan yang sudah dipasang sisir sebelumnya, setelah ½ jam kemudian sisir diangkat.
- e. Masukkan agar yang sudah mengeras pada alat elektroforesis yang berisi TBE.
- f. Teteskan DNA sampel yang telah diamplifikasi sebanyak 10 µl dicampur dengan 2 µl *loading buffer* pada masing-masing sumur agar yang sudah mengeras, dan jalankan elektroforesis pada 100 Volt selama 30 menit.

- g. Agar dicelupkan kedalam etidium bromide selama ½ jam kemudian dilihat dengan menggunakan trasiluminator dan difoto dengan menggunakan film polaroid hitam putih.
- h. Hasil pemeriksaan PCR dikatakan positif bila pada marker ketinggian 347 bp terdapat pita dan sejajar dengan kontrol kuman *M. leprae*.

6. Pengumpulan data

Data yang dikumpulkan adalah data hasil pemeriksaan BTA dan hasil amplifikasi dengan PCR pada kedua spesimen dari lokasi yang berbeda.

Selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut :

Tabel 4.1. Hasil Perbandingan Pemeriksaan PCR dari Spesimen Hapusan Mukosa Hidung dan Sayatan Lesi Kulit penderita Kusta Baru

Penderita Kusta (Diagnostik Klinis)	Spesimen hapusan mukosa hidung		Spesimen sayatan lesi kulit	
	BTA	PCR	BTA	PCR

4.8. Cara Analisis Data

Adanya perbedaan rata-rata hasil pengecatan BTA *Ziehl Neelsen* dibandingkan dengan rata-rata hasil amplifikasi DNA kuman *M. leprae* dengan teknik PCR serta perbedaan rata-rata hasil pemeriksaan PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit diuji dengan statistik *Chi-square*.





BAB V

ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Karakteristik sampel yang diteliti

Penelitian yang dilakukan selama lebih kurang 3 bulan di Divisi Morbus Hansen Unit Rawat Jalan RSUD Dr. Soetomo Surabaya telah berhasil dikumpulkan 40 penderita kusta baru, yang kemudian dari masing – masing penderita diambil dua spesimen klinis yaitu hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit untuk selanjutnya pada masing – masing spesimen tersebut dilakukan deteksi adanya basil *M. leprae* dengan teknik pewarnaan basil tahan asam (BTA *Ziehl Neelsen*) dan *polymerase chain reaction* (PCR).

Dari 40 penderita kusta baru yang diteliti terdapat 25 (62,5%) penderita kusta tipe Multibasilar (MB) dan sisanya sebanyak 15 (37,5%) penderita kusta tipe Pausibasilar (PB) menurut kriteria WHO 1988.

Dari seluruh penderita kusta yang menjadi sampel penelitian didapat jumlah penderita laki – laki lebih banyak dibandingkan dengan perempuan yaitu masing – masing sebanyak 29 (72,5%) dan 11 (27,5%), tabel 5.1.

Tabel 5.1. Sebaran penderita kusta baru berdasarkan kriteria WHO 1988 menurut jenis kelamin.

Jenis kelamin	Jumlah	Persentase
Laki – laki	29	72,5
Perempuan	11	27,5
Jumlah	40	100

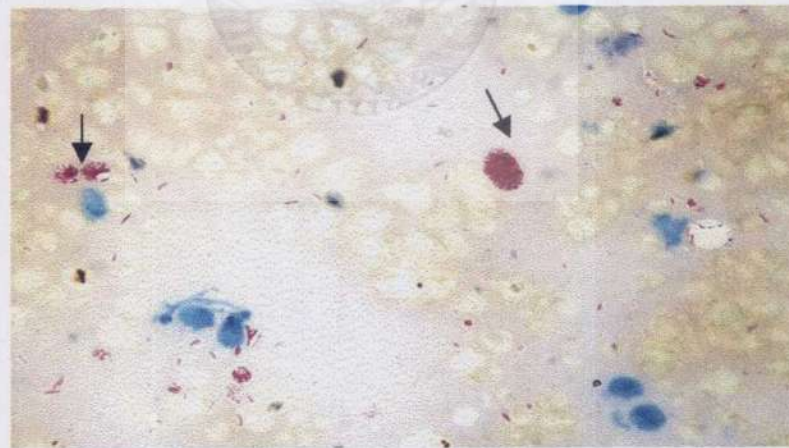
Pada penderita kusta baru yang menjadi sampel penelitian tercatat bahwa penderita yang terbanyak adalah pada usia 15 – 24 tahun (32,5%) kemudian disusul oleh usia 25 – 34 tahun (22,5%) dan yang paling sedikit adalah pada usia 5 – 14 tahun dan 55 – 64 tahun sebanyak masing – masing 2 orang penderita (5%), tabel 5.2.

Tabel 5.2. Sebaran penderita kusta baru berdasarkan kriteria WHO 1988 menurut kelompok usia.

Usia (tahun)	Jumlah	Persentase (%)
5 – 14	2	5
15 – 24	13	32,5
25 – 34	9	22,5
35 – 44	4	10
45 – 54	6	15
55 – 64	2	5
65 - 74	4	10
Jumlah	40	100

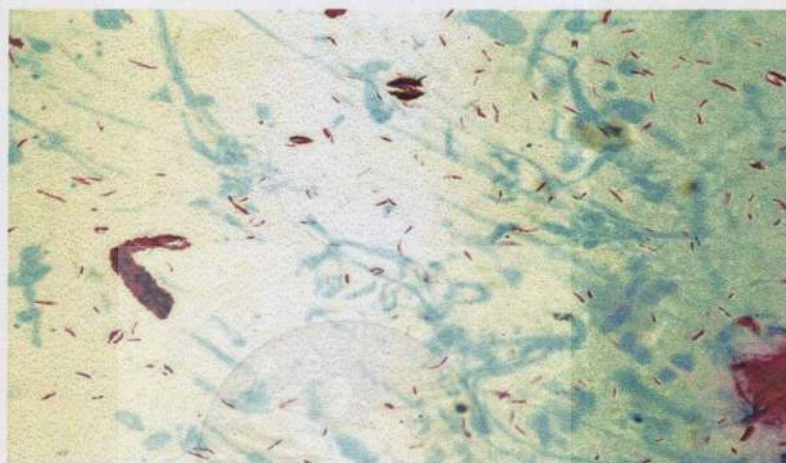
5.2.1 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan pemeriksaan BTA dan PCR pada penderita kusta baru

Pada penelitian ini setiap penderita kusta yang memenuhi kriteria penerimaan sampel dan yang telah diperiksa secara klinis dilakukan pengambilan spesimen pada hapusan mukosa hidung dan lesi kulitnya. Pada masing – masing spesimen ini dilakukan pemeriksaan bakteriologis dengan melakukan pemeriksaan BTA dengan pewarnaan *Ziehl Neelsen*. Pemeriksaan BTA pada sayatan lesi kulit dilakukan terlebih dahulu daripada mukosa hidung oleh karena hasilnya digunakan sebagai salah satu dasar pengklasifikasian penderita dalam kedua kelompok kusta. Selanjutnya hasil pemeriksaan BTA dilakukan penilaian menurut skala Ridley (indeks bakteriologis). Gambar 5.1



Gambar 5.1 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan pemeriksaan BTA dari spesimen sayatan lesi kulit (kusta tipe MB), tampak adanya *bundle of cigarette* (tanda panah)

Sama seperti pada spesimen sayatan lesi kulit, pada hapusan mukosa hidung juga dilakukan pemeriksaan yang sama akan tetapi tidak dilakukan penghitungan indeks bakteriologis seperti yang dilakukan pada spesimen sayatan lesi kulit, jadi hanya ditandai dengan BTA yang positif atau BTA negatif saja. Gambar 5.2.

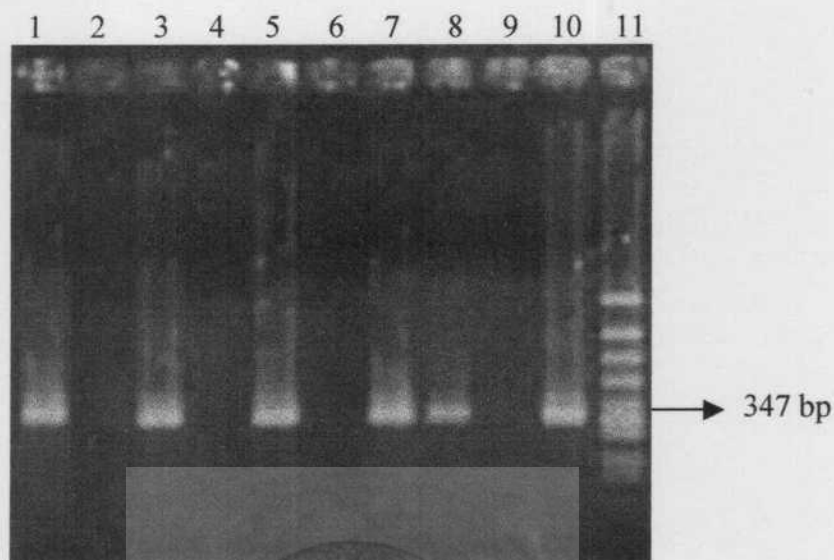


Gambar 5.2 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan pemeriksaan BTA dari spesimen hapusan mukosa hidung (kusta tipe MB)

Selanjutnya pada penderita dilakukan pengambilan spesimen sekali lagi pada tempat dan lokasi yang sama dengan pengambilan spesimen yang pertama untuk selanjutnya akan dilakukan pemeriksaan atau deteksi adanya basil *M. leprae* dengan teknik PCR.

PCR maupun reaksi yang digunakan sudah terlebih dahulu dioptimasi sebelum penelitian dilakukan. Keseluruhan metode yang digunakan dalam tahapan PCR dilakukan sesuai dengan metode dari Plykaytis (1990). Optimasi yang dilakukan oleh peneliti hanya pada jumlah siklus PCR dimana terdapat jumlah kenaikan siklus pertama dan kedua masing – masing 10 siklus.

Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR yang positif ditandai dengan adanya produk fragmen DNA dengan ukuran 347 bp (gambar 5.3).



Gambar 5.3 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR dari spesimen Hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit penderita kusta baru

Keterangan :

Pada hasil PCR di atas tampak produk fragmen DNA dengan ukuran 347 bp

Lane 1, 3, 5, 7 :sampel no.7 – 10 dari spesimen sayatan lesi kulit,

Lane 2, 4, 6, 8 :sampel no.7 – 10 dari spesimen hapusan mukosa hidung, lane 9 : negatif control, lane 10 : DNA *M. leprae* Thai 53 (0.1 ng), lane 11 : marker

Dari keseluruhan hasil deteksi basil *M. leprae* dengan pemeriksaan BTA dan PCR dari kedua spesimen pada penderita kusta baru didapatkan hasil 19 penderita (47,5%) dengan BTA yang positif dari spesimen sayatan lesi kulit (IB +2 – +4) dan 14 penderita (35%) dari spesimen hapusan mukosa hidung. Sedangkan deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR didapatkan

hasil 28 penderita (70%) menunjukkan hasil positif dari spesimen sayatan lesi kulit dan 21 penderita (52,5%) menunjukkan hasil positif dari spesimen hapusan mukosa hidung, dan hanya 4 dari 40 penderita (10%) yang tetap menunjukkan hasil yang negatif dengan pemeriksaan BTA dan PCR dari kedua spesimen (tabel 5.3).

Tabel 5.3 Hasil deteksi basil *M. leprae* dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru

Jenis spesimen	Hasil deteksi BTA		Jumlah	Hasil deteksi PCR		Jumlah
	Positif	Negatif		Positif	Negatif	
Hapusan mukosa hidung	14 (35%)	26 (65%)	40 (100%)	21 (52,5%)	19 (47,5%)	40 (100%)
Sayatan lesi kulit	19 (47,5%)	21 (52,5%)	40 (100%)	28 (70%)	12 (30%)	40 (100%)

Pada 25 orang penderita kusta tipe MB setelah dilakukan pemeriksaan BTA pada pengambilan spesimen sayatan lesi kulit sebanyak 19 penderita (76%) memberikan hasil positif, sedangkan dari pemeriksaan hapusan mukosa hidung sebanyak 12 penderita (48%) menunjukkan hasil positif (tabel 5.4).

Tabel 5.4. Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik pewarnaan BTA (*Ziehl Neelsen*) dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru tipe MB

Jenis spesimen	Hasil deteksi BTA		Jumlah
	Positif	Negatif	
Hapusan mukosa hidung	12 (48%)	13 (52%)	25 (100%)
Sayatan lesi kulit	19 (76%)	6 (24%)	25 (100%)

Deteksi dengan teknik PCR dari kedua spesimen penderita kusta tipe MB didapatkan adanya kenaikan hasil positif dalam mendeteksi adanya basil *M. leprae*. Dari spesimen hapusan mukosa hidung, 13 dari 25 penderita memberikan hasil yang positif atau sebesar 52%, sedangkan pada sayatan lesi kulit 23 dari 25 penderita atau 92% menunjukkan hasil yang positif dan hanya 2 penderita (8%) yang tetap menunjukkan hasil yang negatif (tabel 5.5)

Tabel 5.5 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta tipe MB

Jenis spesimen	Hasil deteksi PCR		Jumlah
	Positif	Negatif	
Hapusan mukosa hidung	13 (52%)	12 (48%)	25 (100%)
Sayatan lesi kulit	23 (92%)	2 (8%)	25 (100%)

Sedangkan pada penderita kusta tipe PB hanya 2 dari 15 penderita saja (13,3%) yang hapusan mukosa hidungnya mengandung BTA sedangkan dari sayatan lesi kulit tidak ada penderita kusta tipe PB (0%) yang memberikan hasil positif dengan pewarnaan BTA (tabel 5.6).

Tabel 5.6 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan pewarnaan BTA dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru tipe PB

Jenis spesimen	Hasil deteksi BTA		Jumlah
	Positif	Negatif	
Hapusan mukosa hidung	2 (13,3%)	13 (80,7%)	15 (100%)
Sayatan lesi kulit	0 (0%)	15 (100%)	15 (100%)

Deteksi basil *M. leprae* dari kedua spesimen klinis dengan teknik PCR pada penderita kusta tipe PB didapatkan hasil adanya kenaikan hasil positif dari masing – masing spesimen. Dari hapusan mukosa hidung didapatkan hasil positif pada 8 dari 15 penderita atau sebesar 58,7%. Sedangkan dari spesimen sayatan lesi kulit hanya didapatkan hasil positif pada 5 dari 15 penderita kusta tipe PB (33,3%), hal ini terlihat pada tabel 5.7.

Tabel 5.7 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR dari hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta tipe PB

Jenis spesimen	Hasil deteksi PCR		Jumlah
	Positif	Negatif	
Hapusan mukosa hidung	8 (53,3%)	7 (46,7%)	15 (100%)
Sayatan lesi kulit	5 (33,3%)	10 (66,7%)	15 (100%)

Pada spesimen sayatan lesi kulit dengan pemeriksaan BTA hanya berhasil mendeteksi adanya basil *M. leprae* pada 19 dari 40 penderita (47,5%), sedangkan dengan teknik PCR bisa terdeteksi 28 dari 40 penderita (70%) dan dari 21 penderita kusta baru yang negatif dengan pemeriksaan BTA terdapat 9 penderita (42,86%) yang positif terdeteksi adanya basil *M. leprae* dengan teknik PCR dan tidak ada penderita dengan BTA yang positif menjadi negatif dengan pemeriksaan PCR (tabel 5.8).

Tabel 5.8 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan pemeriksaan BTA dan teknik PCR dari spesimen sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru

Hasil deteksi BTA	Hasil deteksi PCR		Jumlah
	Negatif	Positif	
Negatif	12	9	21
Positif	0	19	19
Jumlah	12	28	40

Fisher's Exact test $p = 0,000$

Dengan teknik PCR, dari spesimen hapusan mukosa hidung terdapat 12 dari 40 penderita (30%) yang tidak dapat dideteksi adanya basil *M. leprae*. Dari 26 penderita dengan BTA yang negatif dapat terdeteksi adanya basil *M. leprae* dengan teknik PCR sebanyak 10 penderita (38,46%), dan terdapat 3 penderita (21,43%) dengan hasil PCR yang negatif tapi dengan BTA yang positif dari 14 penderita kusta baru dengan hasil BTA yang positif (tabel 5.9).

Tabel 5.9 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan pemeriksaan BTA dan teknik PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung penderita kusta baru

Hasil deteksi BTA	Hasil deteksi PCR		Jumlah
	Negatif	Positif	
Negatif	16	10	26
Positif	3	11	14
Jumlah	12	28	40

Fisher's exact test $p = 0,017$

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan hasil deteksi basil *M. leprae* antara pemeriksaan BTA dengan teknik PCR pada penderita kusta baru maka dilakukan dengan uji statistik *Chi square*. Dari hasil uji statistik tersebut didapatkan adanya perbedaan yang bermakna ($p = 0,000$) antara hasil pemeriksaan BTA dengan teknik PCR dari spesimen sayatan lesi kulit (tabel 5.8) maupun dari spesimen hapusan mukosa hidung ($p = 0.017$) yang dapat dilihat pada tabel 5.9.

Deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR pada kedua spesimen pada penderita kusta baru didapatkan hasil, 28 penderita (70%) dari 40 penderita

positif terdapat basil *M. leprae* dari spesimen sayatan lesi kulit, dan 21 penderita (52,5%) dari spesimen hapusan mukosa hidung. Dari 12 penderita dengan PCR yang negatif dari spesimen sayatan lesi kulit terdapat 8 penderita (66,67%) yang hasil PCR positif dari spesimen hapusan mukosa hidung. Dan terdapat 4 penderita (10%) yang tidak terdeteksi adanya basil *M. leprae* dari kedua spesimennya (tabel 5.10)

Tabel 5.10 Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung dan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru

Hasil pemeriksaan PCR Hapusan mukosa hidung	Hasil pemeriksaan PCR Sayatan lesi kulit		Jumlah
	Negatif	Positif	
Negatif	4	15	19
Positif	8	13	21
Jumlah	12	28	40

Fisher's exact test $p = 0,240$

Untuk melihat apakah terdapat perbedaan hasil pemeriksaan dengan teknik PCR antara spesimen hapusan mukosa hidung dengan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru juga dilakukan uji statistik *Chi square*, ternyata tidak didapatkan adanya perbedaan hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR antara kedua spesimen ($p = 0,204$). Hal ini dilihat pada tabel 5.10.



BAB VI PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

Tujuan dari penelitian ini adalah menelaah tempat yang tepat sebagai tempat pengambilan spesimen untuk pemeriksaan mikrobiologik pada penderita kusta baru. Dalam hal ini deteksi adanya basil *M. leprae* pada penderita kusta dilakukan dengan pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR). Pengambilan spesimen untuk pemeriksaan ini dilakukan pada 2 lokasi yang berbeda, yaitu pada sayatan lesi kulit yang merupakan lokasi yang rutin atau klasik dilakukan untuk deteksi *M. leprae* dan mukosa hidung sebagai lokasi alternatif. Perbandingan dua lokasi ini dilakukan dengan latar belakang alasan bahwa lesi kulit sebagai lokasi yang rutin dilakukan pengambilan spesimen memiliki keterbatasan dimana pada penderita kusta tipe PB jarang sekali terdapat *M. leprae* pada kulitnya sehingga sering kali memberikan hasil negatif pada pemeriksaan BTA, selain itu pengambilan spesimen pada lesi kulit bersifat invasif bagi penderita. Sedangkan mukosa hidung telah lama diketahui merupakan *port d'exit* dan *port d'entry* basil *M. leprae* pada penderita, sehingga sangat potensial sebagai lokasi alternatif tempat pengambilan spesimen untuk mendeteksi *M. leprae* dengan menggunakan pemeriksaan yang lebih sensitif yaitu dengan teknik PCR.

6.1. Karakteristik Sampel

Telah dilakukan penelitian terhadap 40 penderita kusta baru yang memenuhi kriteria penerimaan sampel. Pada masing – masing sampel yang telah diperiksa dan didiagnosis klinis oleh dokter yang memeriksa di Divisi Morbus Hansen URJ Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo sebagai penderita kusta dilakukan pemeriksaan bakteriologis (pewarnaan BTA *Ziehl Neelsen*) dan PCR dari sayatan lesi kulit dan hapusan mukosa hidung. Data dan hasil yang didapat dimasukkan dalam lembar pengumpul data dan selanjutnya dilakukan analisis data.

6.1.1. Umur

Distribusi umur sangat bervariasi pada penyakit kusta, dimana angka tertinggi dijumpai pada dewasa muda. Hal ini mungkin karena masa inkubasi yang bervariasi atau karena perbedaan resiko paparan dari kelompok umur yang berbeda. Angka insiden yang rendah dalam kelompok umur 0 – 14 tahun mewakili kasus yang terinfeksi dalam kontak serumah dengan masa inkubasi yang pendek. Angka ini kemudian meningkat lagi pada umur 15 – 50 tahun yang mewakili kasus terinfeksi dalam kontak serumah dengan masa inkubasi yang panjang atau kasus terinfeksi dalam populasi (sumber infeksi tidak jelas). Dan angka ini kemudian menurun pada usia kurang dari 50 tahun, hal ini mungkin mencerminkan suatu resiko yang menurun terhadap paparan atau dengan masa inkubasi yang pendek (Noordeen, 1994; Kandouw, 1999).

Pada penelitian ini didapatkan umur penderita termuda adalah 5 tahun dan tertua berumur 74 tahun. Pola distribusi umur pada penelitian ini

meningkat pada kelompok umur 15 – 24 tahun dan sedikit berkurang pada kelompok umur 25 – 34 tahun dan berkurang pada kelompok umur 55 – 59 tahun. Menurut Noorden (1994) kebanyakan penderita kusta berumur 10 – 14 tahun kemudian menurun pada kelompok umur berikutnya dan akan meningkat kembali pada umur 20 – 60 tahun. Hal ini dapat terjadi oleh karena masa inkubasi atau periode laten yang sangat panjang menyebabkan manifestasi klinis timbul lebih lambat. Selain itu penyakit kusta pada umur dewasa di daerah endemis sering merupakan hasil dari reinfeksi atau respon imun yang tidak adekuat terhadap kuman kusta dengan bertambahnya umur.

6.1.2. Jenis Kelamin

Pada penelitian ini diperoleh data bahwa penderita laki-laki lebih banyak daripada penderita perempuan, yaitu laki-laki sebanyak 29 orang (72,5%) dan perempuan sebanyak 11 orang (27,5%). Perbandingan jumlah penderita laki-laki dan perempuan adalah 2,2 : 1 (tabel 5.2). Hasil ini sesuai dengan berbagai laporan penelitian yang menyatakan bahwa laki-laki mempunyai resiko lebih besar untuk menderita kusta dibandingkan perempuan dengan rasio 2 : 1 (Noordeen, 1994). Hal ini mungkin disebabkan karena faktor budaya dimana laki-laki lebih banyak bekerja diluar, sehingga pemaparan dengan faktor penyakit kusta 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 laki-laki (Noordeen, 1994; Kandouw, 1999).

6.1.3. Klasifikasi Tipe Kusta berdasarkan Pemeriksaan Klinis

Pada penelitian ini penderita baru yang masuk dalam kriteria penerimaan sampel dilakukan pemeriksaan klinis sesuai dengan tanda – tanda pokok dan klasifikasi WHO 1988. Dengan klasifikasi ini penderita kusta dikelompokkan atas dua kelompok penderita yaitu Pausibasilar (PB) yang mana dalam kelompok ini termasuk kusta tipe TT dan BT menurut kriteria Ridley Jopling atau *Indeterminate* dan *Tuberculoid* menurut kriteria Madrid dengan BTA negatif. Kelompok kedua adalah Multibasilar (MB) yang dalam kelompok ini termasuk kusta tipe BB, BL dan LL menurut kriteria Ridley Jopling atau semua tipe kusta dengan BTA positif (Amiruddin *et al.*, 1994). Oleh karena keterbatasan hasil sayatan lesi kulit maka pengklasifikasian ditambah dengan menghitung jumlah makula anestesi pada kulit dan kerusakan saraf yang terjadi. Jika terdapat lebih dari 5 makula anestesi dengan distribusi simetris dan banyak cabang saraf yang terkena maka penderita dimasukkan dalam tipe MB. Dan jika terdapat 5 atau kurang makula anestesi dengan distribusi asimetris serta hanya satu cabang saraf yang terkena maka penderita dapat dimasukkan dalam tipe PB (WHO, 2000).

Pada penelitian ini didapatkan jumlah penderita tipe MB lebih banyak daripada tipe PB. Jumlah penderita kusta baru tipe MB tercatat sebanyak 25 orang (62,5%) dan penderita kusta tipe PB sebanyak 15 orang (37,5%). Di dunia terdapat variasi dalam jumlah tipe kasus kusta baru. Di Bangladesh dan Thailand terdapat lebih banyak kasus kusta tipe PB dengan persentase masing – masing 83% dan 66%. Sedangkan di Philipina, Brasil dan Indonesia

terdapat kecenderungan lebih banyak kasus kusta tipe MB (Saunderson *et al.*, 2000).

Lebih banyak tipe MB dalam penelitian ini karena secara keseluruhan jumlah penderita MB yang datang berobat ke Divisi Morbus Hansen URJ Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo lebih banyak daripada penderita kusta tipe PB. Penderita biasanya datang atas kehendak sendiri atau rujukan setelah diketahui adanya kelainan kulit yang dengan rasa tebal yang makin lama makin menyebar dan mengganggu secara kosmetis. Sedangkan pada tipe PB perjalanan penyakitnya lebih tenang dibandingkan dengan tipe MB sehingga penderita tidak merasakan adanya keluhan selain bercak putih yang dianggap tidak terlalu mengganggu, sehingga penderita pada kelompok ini datang lebih lambat atau setelah timbul deformitas.

6.2. Hasil deteksi basil *M. leprae* pada penderita kusta baru dengan pemeriksaan BTA dan teknik PCR

Pemeriksaan BTA dari sayatan lesi kulit dilakukan untuk konfirmasi menentukan diagnosis penyakit kusta dan membantu menentukan klasifikasi atau tipe penyakit kusta, serta membantu menilai hasil pengobatan (Amiruddin *et al.*, 1994).

Deteksi BTA dengan teknik pengecatan *Ziehl Neelsen* dari sayatan lesi kulit maupun mukosa hidung kurang memuaskan hasilnya (Pattyn *et al.*, 1993; Donoghue, 2001). Rendahnya densitas *M. leprae* pada kulit menyebabkan banyak kasus yang tidak terdeteksi terutama pada kusta tipe

Pausibasilar (PB) dan kusta dini (Kurabachew *et al.*, 1998). Sedangkan spesimen dari mukosa hidung sering positif palsu dengan mikobakteria yang lain (Amiruddin *et al.*, 1994) Pemeriksaan BTA yang negatif tidak menyingkirkan kemungkinan kusta (Sehgal and Joginder, 1990).

Salah satu teknik biologi molekular yang berguna untuk konfirmasi diagnosis dan mendeteksi basil *M. leprae* adalah pemeriksaan PCR. Spesimen yang diperiksa dengan teknik PCR pada penelitian ini diambil pada lokasi yang sama dengan pengambilan spesimen untuk pemeriksaan BTA yaitu dari sayatan lesi kulit dan hapusan mukosa hidung. Dengan teknik PCR ini spesimen dikatakan memberikan hasil positif bila hasil elektroforesis produk PCR menunjukkan adanya pita pada fragmen 347 bp yang berarti spesimen yang diperiksa mengandung basil *M. leprae* (Plikaytis *et al.*, 1990).

6.2.1 Spesimen sayatan lesi kulit

Pada penelitian ini berdasarkan ada tidaknya BTA pada sediaan hapusan sayatan lesi kulit atau Indeks Bakteri (IB) dari 25 penderita kusta tipe MB didapatkan hasil 19 penderita (76%) dengan IB positif dan sisanya 6 penderita (24%) dengan IB negatif. Hasil yang hampir sama didapatkan oleh penelitian yang dilakukan oleh Torres *et al.* (2003) dimana 75% (15 dari 20) penderita MB yang diperiksa menunjukkan adanya BTA positif dari sayatan lesi kulit. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Rizalinda dan Hatta (1999) yang membandingkan antara pemeriksaan PCR dengan pewarnaan BTA dalam deteksi *M. leprae* pada penderita kusta juga mendapatkan hasil

yang hampir sama yaitu 68,2% atau 13 dari 19 penderita kusta tipe MB menunjukkan hasil positif dengan pemeriksaan BTA. Hasil IB yang negatif juga hampir sama didapatkan oleh Marijke Beck – Bleumink yang melakukan penelitian terhadap 1709 penderita kusta baru sejak tahun 1987 sampai dengan 1990 yang mendapatkan hasil 21,1% BTA negatif pada hapusan sayatan lesi kulit penderita kusta tipe MB (Bleumink, 1991).

Pada penderita kusta tipe *Lepromatous leprosy* (LL) yang termasuk dalam kusta tipe MB terjadi infiltrasi bakteri yang difus bahkan pada daerah dengan temperatur yang tinggi. Karena itu sediaan dari lesi kulit menunjukkan hasil yang positif dengan derajat yang bervariasi (Sehgal and Joginder, 1990). Akan tetapi tidak semua kusta tipe MB memberikan hasil yang positif pada pemeriksaan BTA dari sayatan lesi kulit oleh karena penderita tipe BB seringkali memberikan hasil yang negatif.

Pada penelitian ini tidak didapatkan penderita kusta tipe PB yang memberikan hasil BTA yang positif dari spesimen sayatan lesi kulit. Hasil ini tentu tidak mengejutkan lagi oleh karena jumlah kuman pada penderita kusta tipe PB jauh lebih sedikit dibandingkan dengan penderita kusta tipe MB. Sehingga sangat sukar terdeteksi dengan pemeriksaan mikroskopis apabila kuman kurang dari 10^4 per gram jaringan (Torres, *et al.*, 2003).

Dari 25 penderita kusta baru tipe MB yang diteliti, 23 (92%) penderita menunjukkan hasil positif pada pemeriksaan dengan PCR dari spesimen sayatan lesi kulit, sedangkan dari spesimen hapusan mukosa hidung didapatkan hasil positif sebesar 52% atau 13 dari 35 penderita menunjukkan

hasil positif PCR. Hasil ini tidak terlalu berbeda dengan yang didapatkan oleh Torres, *et al.* (2003), yang mana dari penelitiannya didapatkan hasil 16 dari 20 penderita kusta tipe MB atau 80% penderita kusta tipe MB didapatkan hasil positif dengan pemeriksaan PCR dari spesimen sayatan lesi kulit. Sedangkan studi tentang PCR yang dilakukan oleh De Witt *et al.* (1991) didapatkan hasil 92% lesi kulit dari penderita kusta tipe MB positif dengan pemeriksaan PCR.

Pada penelitian ini dari seluruh penderita kusta tipe MB yang memberikan hasil negatif dengan pemeriksaan BTA (IB negatif) dari spesimen sayatan lesi kulit didapatkan hasil 66,7% (4 penderita) dapat terdeteksi dengan pemeriksaan PCR, sedangkan 2 penderita lainnya (33,3%) tetap memberikan hasil yang negatif. De Witt *et al.* (1991) juga menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda yang mana dari BTA negatif didapatkan 61% positif dengan pemeriksaan PCR. Tidak ada penderita yang dengan IB positif menjadi negatif pada pemeriksaan PCR. Terdapat 2 penderita yang tetap menunjukkan hasil negatif baik dengan pemeriksaan BTA maupun dengan PCR dari spesimen sayatan lesi kulit. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh beberapa hal antara lain karena tidak ada lagi bakteri oleh karena kuatnya respon imun atau hancur karena efek pengobatan yang diberikan yang mana kemoterapi akan menghancurkan bakteri (De Witt *et al.*, 1993). Yang perlu diperhatikan pada keadaan ini adalah kemungkinan penderita telah diobati dengan obat anti kusta atau antibiotik lainnya, karena tidak jarang penderita menyembunyikan informasi tentang pengobatan sebelumnya. Hal lainnya

adalah bisa disebabkan oleh karena ada kemungkinan bahwa lesi pada tempat pengambilan sampel memang tidak terdapat basil di dalamnya atau jikapun ada DNANYa sudah terdegradasi secara komplit sehingga memberikan hasil PCR yang negatif (Jamil *et al.*, 1994). Selain itu sebab lain adalah adanya inhibitor dari spesimen. Wood dan Cole (1989) seperti yang dikutip oleh De Wit (1991) berpendapat bahwa infiltrat seluler dapat mengeluarkan beberapa mediator yang dapat menghambat pemeriksaan PCR.

Pada penelitian ini dari pemeriksaan PCR yang dilakukan pada spesimen sayatan lesi kulit penderita kusta tipe PB didapatkan hasil 5 penderita (33,3%) berhasil dideteksi adanya basil *M. leprae*. Hasil yang dilaporkan oleh peneliti lain adalah oleh Wichitwechkarn *et al.* (1996) yaitu 18,2% dari penderita kusta tipe PB dapat dideteksi adanya basil *M. leprae* dari spesimen sayatan lesi kulit. Hasil deteksi PCR yang lebih rendah pada penderita kusta tipe PB tidak mengherankan oleh karena *bacterial load* yang lebih sedikit dibandingkan tipe MB. Jumlah kuman yang sedikit ini berhubungan dengan kuatnya respon imun pada penderita (Agusni, 1997).

6.2.2 Spesimen hapusan mukosa hidung

Pada penelitian ini pemeriksaan BTA juga dilakukan pada spesimen hapusan mukosa hidung penderita. Dari 25 penderita kusta tipe MB, 12 penderita (48%) didapatkan hasil adanya BTA pada spesimen hapusan mukosa hidungnya. Sedangkan 13 penderita (52%) didapatkan hasil yang negatif. Torres *et al.* (2003) mendapatkan hasil 40% dari penderita kusta tipe

MB memberikan hasil BTA yang positif dari spesimen hapusan mukosa hidung.

Mukosa hidung pada penderita kusta terutama pada penderita kusta tipe MB yang belum mendapat terapi telah lama diketahui mengekskresi *M. leprae*, dimana mukosa hidung diketahui sebagai *port d'exit* dan *entree* dari kuman ini. Akan tetapi pemeriksaan BTA dari spesimen hapusan mukosa hidung seringkali memberikan hasil yang tidak memuaskan oleh karena selain keterbatasan pemeriksaan mikroskopis juga disebabkan oleh sering dikelirukan dengan mikobakterium yang lain. Selain itu tidak adanya BTA pada spesimen hapusan mukosa hidung penderita bukan disebabkan oleh karena tidak terinfeksi penderita tersebut akan tetapi basil *M. leprae* akan cepat sekali menghilang apabila penderita mendapat terapi antibiotik dalam hal ini tidak hanya terapi anti kusta akan tetapi juga oleh antibiotik yang lain seperti *minocycline*, *clarithromycin* dan *fluoroquinolon* (Amiruddin *et al.*, 1994; Wathen, 1999).

Pemeriksaan BTA yang dilakukan pada spesimen hidung dari penderita kusta tipe PB didapatkan hasil 2 penderita (13,3%) memberikan hasil positif, sedangkan 13 lainnya (86,7%) memberikan hasil yang negatif. Di daerah endemik penyakit kusta diketahui bahwa ternyata tidak hanya penderita kusta tipe MB (*lepromatous*) saja yang mengekskresikan kuman kusta dari hidungnya tapi penderita kusta tipe PB juga mengekskresikannya walaupun dalam jumlah yang lebih sedikit. Hal ini diperkuat dengan ditemukannya kasus penderita kusta tipe PB (*boderline tuberculoid*) dengan

lepromatous nodul pada hidungnya yang berarti terdapatnya lesi *baciliferous* yang menetap pada penderita tersebut (Cree and Smith, 1998).

Penelitian yang dilakukan oleh Santos *et al.* (1995) yang melakukan evaluasi PCR terhadap mukosa nasal dan *hair bulb* penderita kusta didapatkan hasil 9 dari 17 (52,9%) penderita kusta tipe MB memberikan hasil positif PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung. Hasil hampir serupa juga dilaporkan oleh De Witt *et al.* (1993) yaitu didapatkan 55% penderita kusta tipe MB terdeteksi dengan PCR dari spesimen hapusan mukosa hidungnya. Sedangkan peneliti lain mendapatkan hasil positif yang sedikit lebih tinggi yaitu 65% atau 13 dari 20 penderita kusta tipe MB yang dari spesimen hapusan mukosa hidungnya bisa terdeteksi basil *M. leprae* dengan pemeriksaan PCR (Tores *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa dari 13 penderita kusta baru tipe MB dengan BTA yang negatif dari spesimen hapusan mukosa hidung didapatkan hasil bahwa 30,8% (4 penderita) memberikan hasil yang positif dengan pemeriksaan PCR. Terdapat 3 penderita yang semula menunjukkan hasil BTA yang positif dari spesimen hidung ternyata menjadi negatif dengan pemeriksaan PCR. Hal ini dimungkinkan oleh karena seperti telah diketahui pada spesimen mukosa hidung ternyata didapatkan beberapa mikobakterium yang lain yaitu *Mycobacterium atypic* (*Mycobacterium avium*, *M. kansasii*) selain *M. leprae* pada penderita kusta. Mikobakterium jenis ini menyebabkan terjadinya penyakit pada paru yang *port de`entreenya* juga melalui saluran pernafasan, sama halnya dengan kusta. Adanya hal di atas

tentu menyebabkan pada saat dilakukan pemeriksaan PCR tidak terjadi amplifikasi oleh karena mungkin tidak adanya basil *M. leprae* pada spesimen tersebut. Selain itu mungkin juga disebabkan adanya inhibitor pada spesimen sehingga menghambat hasil pemeriksaan. Adanya inhibitor ini juga dilaporkan oleh Santos *et al.* (2001), yang melakukan pemeriksaan PCR pada spesimen dari darah, jaringan limfe, rambut dan cairan mukosa hidung penderita kusta untuk melihat adanya inhibitor pada 63 sampel dengan hasil PCR negatif. Ternyata 10 dari 63 sampel (15,9%) yang terdiri dari 5 spesimen darah dan 5 spesimen cairan mukosa hidung terdapat inhibitor PCR. Tidak ada usaha lanjut untuk menghilangkan inhibitor pada sediaan – sediaan ini.

Sedangkan hasil deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR pada penderita kusta tipe PB didapatkan 8 penderita (53,3%) terdeteksi mengandung basil *M. leprae* dari spesimen hidungnya, yang berarti terdapat kenaikan sebesar 40% dalam terdeteksinya basil *M. leprae*. Rizalinda dan Hatta (1999) melaporkan bahwa dari penelitian mereka tentang PCR didapatkan 35% penderita kusta tipe PB dapat terdeteksi dengan PCR.

Dari seluruh penderita kusta tipe PB yang dari spesimen hapusan mukosa hidungnya tidak dapat terdeteksi dengan pemeriksaan BTA, sebanyak 6 penderita (46,2%) menunjukkan hasil positif dengan pemeriksaan PCR. Terdapat 7 penderita (53,8%) yang tetap menunjukkan hasil yang negatif dari spesimen hapusan mukosa hidung dengan dua jenis pemeriksaan yang dilakukan. Hal ini makin memperkuat beberapa studi yang menyatakan bahwa penderita kusta tipe MB yang belum mendapat terapi bukan satu –

satunya yang menjadi sumber penularan dalam penularan penyakit kusta, tapi penderita kusta tipe PB pun dapat walaupun dengan resiko yang lebih kecil dibandingkan dengan tipe MB (Cree and Smith, 1998).

6.2.3 Deteksi basil *M. leprae* dari spesimen sayatan lesi kulit dan hapusan mukosa hidung dengan teknik PCR

Pada penelitian ini didapatkan hasil yang tidak berbeda pada pemeriksaan atau deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR dari kedua spesimen (Fisher's exact test $p = 0,204$) yang berarti bahwa pada penderita kusta baru kita dapat mengambil spesimen untuk deteksi basil *M. leprae* pada lokasi yang rutin sebagai tempat pengambilan spesimen (sayatan lesi kulit) ataupun dengan alternatif lain yaitu dengan hapusan mukosa hidung. Pengambilan spesimen dari mukosa hidung terutama berguna pada penderita baru yang menolak atau takut untuk dilakukan sayatan pada kulitnya atau pada penderita baru yang tidak menunjukkan adanya lesi pada kulitnya .

Dari penelitian ini didapatkan 70% atau 28 dari 40 penderita kusta baru terdeteksi adanya basil *M. leprae* dari spesimen sayatan lesi kulit, sedangkan dari spesimen hidung dapat dideteksi 52% atau 21 dari 40 penderita kusta baru (tabel 5.10). Dari 12 penderita kusta dengan PCR negatif dari sayatan lesi kulit ternyata terdapat 8 penderita atau 66,67% memberikan hasil yang positif dari spesimen hapusan mukosa hidungnya, dan dari 8 penderita ini 6 (75%) diantaranya adalah penderita kusta tipe PB dan 2 (25%) sisanya adalah penderita kusta tipe MB. Sedangkan 4 penderita lagi tetap

memberikan hasil negatif dari spesimen lesi kulit maupun hapusan mukosa hidungnya (tabel 6.1)

Tabel 6.1 Hasil PCR dari hapusan mukosa hidung dengan PCR yang negatif dari lesi sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru

	Hasil PCR kulit (-)	Kusta tipe MB	Kusta tipe PB
Hasil PCR mukosa hidung (-)	4	-	4
Hasil PCR mukosa hidung (+)	8	2	6
Jumlah	12	2	10

Hal ini menunjukkan bahwa spesimen dari hapusan mukosa hidung sangat potensial sekali sebagai tempat pengambilan spesimen untuk deteksi basil *M. leprae*, yang mana pada penderita kusta tipe PB yang jarang sekali bisa terdeteksi basil *M. leprae* dari lesi kulitnya sehingga seringkali memberikan hasil negatif, ternyata dapat terdeteksi dari hapusan mukosa hidungnya dengan teknik PCR. Hal ini juga didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Santos, *et al.* (1995) yang mendapatkan hasil 64% PCR positif dari spesimen hidungnya pada penderita kusta baru termasuk tipe PB.

Pengambilan spesimen dari hapusan mukosa hidung memiliki banyak keuntungan antara lain tidak bersifat invasif bagi penderita, relatif lebih mudah dalam pengambilan dibandingkan dengan sayatan lesi kulit. Tapi selain itu pengambilan spesimen dari mukosa hidung juga memiliki

kekurangan antara lain swab yang digunakan untuk mengambil spesimen hanya bisa menyerap cairan terbatas yaitu sebanyak 20 μ l (De Wit et al., 1993), sehingga jika tidak hati – hati bisa mendapatkan jumlah sampel yang tidak adekuat.

Telah dibuktikan bahwa teknik PCR dapat mendeteksi basil *M. leprae* secara lebih baik daripada pemeriksaan BTA, hasil ini tentu merupakan hal yang sangat menjanjikan dalam menegakkan diagnosis kusta terutama kasus – kasus yang tidak dapat disimpulkan dengan metode konvensional, selain itu PCR juga dapat digunakan untuk menentukan distribusi berbagai kemungkinan sumber penularan *M. leprae* selain manusia seperti hewan, sumber air di lingkungan tempat tinggal penderita di daerah endemis kusta.



BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Atas dasar hasil dan pembahasan penelitian ini dapat ditarik suatu kesimpulan sebagai berikut :

- 7.1.1 Deteksi basil *M. leprae* dengan teknik PCR tidak menunjukkan adanya perbedaan hasil yang bermakna antara spesimen dari hapusan mukosa hidung dengan sayatan lesi kulit pada penderita kusta baru.
- 7.1.2 Adanya perbedaan hasil yang bermakna antara pemeriksaan BTA dengan teknik PCR dalam mendeteksi adanya basil *M. leprae* dari spesimen hapusan mukosa hidung ($p = 0,017$) dan sayatan lesi kulit ($p = 0,000$) pada penderita kusta baru.

7.2 Saran

- 7.2.1 Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih besar, khususnya penderita kusta tipe PB.
- 7.2.2 Perlu penelaahan lebih lanjut tentang deteksi genus mikobakterium yang ada pada mukosa hidung, untuk mengetahui adanya hasil positif dengan pemeriksaan BTA namun negatif dengan pemeriksaan PCR untuk deteksi *M. leprae*, seberapa besar jumlah mikobakterium *non leprae* yang terdeteksi dengan pemeriksaan BTA.



DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abulafia J, Vignale RA, 1999. *Leprosy : Pathogenesis Update*. International Journal of Dermatologi 38: 321 – 334
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 2000. *Cellular and Molecular Immunology*, 4th ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, pp 348-351
- Agusni I, 1987. *Cara Pemeriksaan dan Diagnosa Penyakit Kusta*. Dalam Bahan Penataran Kusta untuk Dokter dan Mantri Puskesmas. Dinkes Tingkat II. Surabaya, hlm 1-10
- Agusni I, 1997. *Perubahan Pola Immunopatologik sebagai Indikator Penanganan Kusta Stadium Subklinik*. Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, hlm 7 – 20, 46 - 53
- Agusni I, 1998. *Perkembangan Terbaru Immunopatogenesis Penyakit Kusta*, MDVI, hlm 32-38
- Amiruddin MD, Noordin C, 1995. *Mycobacterium Leprae*. Berkala Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin 7(1) : 53 – 58
- Amiruddin MD, Hakim Z, Darwis ER, 1994. *Diagnosis Penyakit Kusta*. Dalam Djuanda A, Menaldi SL, Wisesa TW, Ashadi LN, Kusta Diagnostik dan Penatalaksanaan. Balai Penerbit FKUI, Jakarta, hlm 1-15
- Bleumink MB, 1991. *Allocation of Patients to Paucibacillary or Multibacillary Drug Regimen for Treatment of Leprosy. A Comparison of Methods based Mainly on Skin Smear as Opposed to Clinical Methods. Alternative Clinical Methods for Classification of Patients*. International Journal of Leprosy 59 (2) : 292 – 303
- Booth RJ, Watson JD, 1994. *M. leprae Antigen and The Molecular Biology of Leprosy*. In Hasting, RC, ed. *Leprosy 2nd*. Churchill Living Stone, New York, pp 123 – 131

- Brooks GF, Butel JS, Morse SA, eds. 2001. *Jawetz, Melnick, Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran*. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Salemba Medika, Jakarta, hlm 467 – 468
- Cree IA, Smith WC, 1998. *Leprosy transmission and mucosal immunity: towards eradication?*. *Leprosy Review* 69: 112 – 121
- Depkes RI, 2001. Data Subdit Kusta Depkes RI.
- De Wit MYL, Doughlas JT, McFadden J, Klatser PR, 1993. Poymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium leprae* in Nasal Swab Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 31(3): 502 – 506
- De Wit MYL, Faber WR, Krieg, SR, 1991. *Application of Polymerase Chain Reaction for the Detection of Mycobacterium leprae in Skin Tissues*. *Journal of Clinical Microbiology* 29(5): 906 - 910
- Donoghue HD, Holton J, Spigelman M, 2001. *PCR primers that can detect low levels of Mycobacterium leprae DNA*. *Journal Medical Microbiology* 50: 177 – 182
- Drapper P, 1986. *Structure of Mycobacterium Leprae*. *Leprosy Review* 52(1): 15 – 20
- Etnawati K, 1990. *Kewaspadaan Petugas Kesehatan terhadap Lepra*. *Berita Kedokteran Masyarakat* 6(2): 57 – 163
- Estrada B, 2002. *Leprae*, *eMedicine Journal*, pp 1- 10
- Harboe M, 1994. *Overview of Host-Parasite Relation In Hosting RC*. *Leprosy*, 2nd ed. Churchill Livingstone, New York, pp 87 – 112
- Hartskeerl RA, de Witt, M Klatser PR, 1989. *Polymerase Chain Reaction for Detection of Mycobacterium Leprae*. *Journal of General Microbiology* 135: 2357 – 2363

- Hill S, 2002. *Diagnostic Services : Application of the Polymerase Chain Methodologies in Molecular Medicine*, pp 1 – 5
- Iskandar F, Amiruddin MD, Maskur Z, Tjahjadi S, 1998. *Hubungan Antara Pemeriksaan Bakteriologis dan Pemeriksaan Sereologis pada Penderita Kusta*. *Jurnal Medica Nusantara* 19(1): 41 – 45.
- Jamil S, Wilson SM, Hacket M, Hussain R, Stoker NG, 1994. *A Colorimetric PCR Method for the Detection of M.leprae in Skin Biopsies from Leprosy Patient*. *International Journal of Leprosy* 62(4): 512 – 521
- Job CK, 1994. *Pathology of Leprosy*. In Hasting, RC, ed, *Leprosy*. 2nd ed, Churchill Livingstone, New York, pp 193 – 224.
- Joklik JK, Willet, HP, Amos, DB, 1992. *Zinsser Microbiology*. 20th Edition. Appleton and Lange, USA, pp 516 – 522
- Kandouw JM, 1999. *Hubungan tipe HLA dengan Kerentanan Tubuh pada Penyakit Lepra*. Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga hlm 120 – 122
- Kandouw JM, Amiruddin MP, 1998. *Phenolic Glycolipid*. *Jurnal Medica Nusantara* 19(2): 194 – 199
- Katoch VM, Sharma VP, 2000. *Recent Advances in The Microbiology of Leprosy*. *Indian Journal of Leprosy* 72(3): 363-374
- Katoch VM, 2000. *Advances in The Diagnosis and Treatment of Leprosy*. *Expert Review in Molekular Medicine*, pp 1 – 14
- Kurabachew M, Wondimu A, Ryon JJ, 1998. *Reverse Transcription-PCR Detection of Mycobacterium leprae in Clinical Specimens*. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (5): 1352 – 1356
- Noordeen SK, 1994. *The Epidemiology of Leprosy*. In Hasting RC. *Leprosy*, 2nd ed. Churchill Livingstone, New York pp 29 – 43

- Pattyn SR, Ursi D, Ieven M, Grillone S, Raes V, 1993. *Detection of Mycobacterium leprae by the Polymerase Chain Reaction in Nasal Swab of Leprosy Patient and Their Contacts*. International Journal of Leprosy 61(3): 389 – 393
- Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM, 1990. *Rapid and Sensitive Detection of Mycobacterium leprae Using a Nested-Primer Gene Amplification Assay*. Journal of Clinical Microbiology 28(9): 1913 - 1917
- Res RJW, Young DB, 1994. *The Microbiology of Leprosy*. In Hasting RC. Leprosy, 2nd. Churchill Livingstone, New York pp 47 – 98
- Rizalinda S, Hatta M, 1999. *Comparison of Polymerase Chain Reaction (PCR) and Acid Fast Bacillary (AFB) Staining for Detection of Mycobacterium leprae in Leprosy Patient*. Ebers Papyrus. Jurnal kedokteran Universitas Tarumanegara 5(2): 46 – 51
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press vol 1 pp 6.9 –6.19
- Santos AR, De Miranda AB, Sarno En, Suffys PN, Degrave WM, 1994. *Use of PCR Mediated Amplification of Mycobacterium Leparae in Different Type of Clinical Samples for The Diagnosis of Leprosy*. Journal Medical Microbiology 39: 298 – 304.
- Santos AR, Nery, JC, Duppre NC, Gallo ME, Filho JTG, Suffys PN, Degrave WM, 1997. *Use of The Polymerase Chain Reaction in The Diagnosis of Leprosy*. Journal Medical Microbiology 46: 170-172
- Santos AR, Ballasiano V, Oliviera ML, Pereira MA, Santos PB, Degrave WM, Suffys PN, 2001. *Detection of Mycobacterium leprae DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood of Individuals Eight Years after Completion of Anti-leprosy Therapy*. Mem Inst Oswaldo Cruz 98(8): 1129 – 1133
- Santos AR, Filho JTG, Nery AC, Duppre NC., Gallo EN, Degrave, WM., 1995. *Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive*

biological specimens for subclinical detection of Mycobacterium leprae. FEMS Immunology and Medical Microbiology 11: 113 - 120

Saunderson P, Gebre S, Desta K, Byass P, 2000. *The Allert MDT Field Evaluation Study (AMFES): a descriptive study of leprosy in Ethiopia. Patients, methods and baseline characteristic.* Leprosy review 71:273 - 284

Sehgal VN, Joginder, 1990. *Slit-Skin Smear in Leprosy.* International Journal of Dermatologi 29(1): 9 – 15

Sengupta U, 2000. *Immunopathology of Leprosy – Current Status.* Indian Journal of Leprosy 72(3): 381 – 387

Suaib RS, Amiruddin MD, Tabri F, Noordin C, 1999. *Gambaran Radiologis Sinus Paranasal Penderita Kusta Multibasiler di RSUD Dr. Wahidin Sudirohusodo Ujungpandang,* Naskah Ilmiah Konggres Nasional PERDOSKI IX, hlm 147-157

Syahril R, Hatta M, 1999. *Comparison of Polymerase Chain Reaction (PCR) and Acid Fast Bacili (AFB) Staining for Detection of Mycobacterium leprae in Leprosy Patients.* Ebers Papyrus 5(2): 107 – 112

Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Noguera JM, Gimeno V, Navarro JC, Olmos A, 2003. *Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of Mycobacterium leprae in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts.* Leprosy Review 74: 18 – 30

Wathen PI, 1998. *Hansen Disease.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(12): 3334 – 3336

WHO, 2000. *Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem*

Williams DL, Gillis TP, Fiallo P, 1992. *Detection of Mycobacterium leprae and the Potensial for Monitoring Antileprosy Drug Therapy Directly from Skin Biopsies by PCR.* Mol Cell Probes 6(5): 401 – 410

Witchitwechkarn J, Karnjan S, Shuntawuttisetee S, Somprasit C, Kampirapap K, Paerapakorn S, 1996. *Detection of Mycobacterium Leprae Infection by PCR. Journal of Clinical Microbiology* 33(1): 45-49

Wirohadidjojo YW, 1991. *Polymerase Chain Reaction untuk deteksi M. leprae, Berita Kedokteran Masyarakat*, III(3): 141-148





LAMPIRAN

Lampiran 1

LEMBAR PENGUMPULAN DATA

* Case No. : <input type="text" value="03"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		Tanggal :
No. Reg. Poli MH :		No. Reg. URJ :

IDENTITAS :

Nama : Umur : tahun
 Tempat lahir : Suku : 1. Jawa
 2. Madura
 3. lain.....

Alamat : Jenis Kelamin : P / L
 Pendidikan : 1. Tamat SD Pekerjaan :
 2. Tamat SMP
 3. Tamat SMA
 4. Tamat Universitas

KELUHAN UTAMA

- | | | |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 1. Bercak kulit / makula | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 2. Penebalan saraf | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 3. Penonjolan kulit | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 4. Gangguan sensasi | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |

RIWAYAT PENYAKIT

5. Lamanya sakit sejak kelainan kulit pertama diketahui
6. Pernah anamnesa kontak MH Ada Tidak
7. Pernah mendapat pengobatan kusta sebelumnya
 Ada Tidak

PEMERIKSAAN KULIT

8. Lesi kulit yang dicurigai Ada Tidak
9. Lokasi lesi kulit : wajah lengan perut
 Dada tangan paha
 Punggung lengan bawah tungkai bawah
 Pantat kaki
10. Jumlah lesi : 1 – 5 ≥ 5 menyeluruh
 11. Distribusi lesi simetris asimetris menyeluruh
 12. Makula batas tegas Ada Tidak

- | | | |
|---|------------------------------|--------------------------------|
| 13. Hipopigmentasi | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 14. Hipoanestesi | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 15. Makula tanpa batas tegas | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 16. Infiltrat yang difus | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 17. Plaque | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 18. Nodule | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 19. Penebalan syaraf | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 20. Ulkus | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| | Lokasi : | |
| 21. Madarosis | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 22. Hidung pelana | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 23. Kontraktur | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 24. Atrofi otot | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 25. Drop hand | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 26. Drop foot | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 27. Claw hand | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 28. Parut / sikatrik | <input type="checkbox"/> Ada | <input type="checkbox"/> Tidak |
| 29. Hasil Klasifikasi Menurut Kriteria WHO | : | |
| 30. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis (BTA Ziehl Neelsen) | : | |
| - hapusan mukosa hidung | : | |
| - sayatan lesi kulit | : | |
| 31. Hasil Pemeriksaan PCR | : | |

Keterangan :

- Yang bertanda bintang(*) : diisi oleh peneliti
- Identitas, keluhan utama (1-4),riwayat penyakit(5-7) dan pemeriksaan kulit (8-28) serta no. 29 : diisi oleh dokter yang memeriksa
- Hasil pemeriksaan (30-31) : diisi oleh peneliti

Lampiran 2

Penjelasan dan Informasi Penelitian

(Inform for informed consent)

Kuman yang masuk ke dalam tubuh seseorang akan menimbulkan reaksi kekebalan. Perbedaan reaksi kekebalan akan mempengaruhi perjalanan suatu penyakit. Menemukan kuman penyebab penyakit merupakan kunci keberhasilan dalam pengobatan penderita.

Pada penelitian ini akan dilakukan pemeriksaan terhadap penyakit yang diderita dengan mencari kuman penyebab di hapusan sisi dalam hidung dan jaringan kulit untuk menentukan langkah selanjutnya dalam penanganan penyakit.

Pada penelitian ini, pada setiap penderita akan dilakukan pengambilan sampel hapusan sisi dalam hidung (hapusan mukosa hidung) dengan cara mengusapnya dengan cotton swab, dan pengambilan jaringan kulit dengan cara mengambil sedikit jaringan kulit yang selanjutnya akan diperiksa secara khusus di laboratorium.

Pengambilan sedikit jaringan kulit kemungkinan akan menimbulkan perdarahan bawah kulit (hematom) yang ringan dan luka kecil yang tidak membahayakan serta tidak akan membahayakan serta tidak akan mengganggu proses pengobatan yang akan diberikan. Data penderita bersifat rahasia dan akan diolah secara ilmiah.

Lampiran 4

DATA HASIL PENELITIAN

NO	sex	umur	tipe kusta	bta kulit	pcr kulit	bta hidung	pcr hidung
1	laki-laki	17	MB	negatif	positif	negatif	negatif
2	laki-laki	23	PB	negatif	negatif	negatif	negatif
3	laki-laki	20	MB	positif 3	positif	positif	negatif
4	perempuan	70	MB	positif 4	positif	negatif	positif
5	perempuan	27	PB	negatif	negatif	negatif	positif
6	laki-laki	35	MB	positif 2	positif	negatif	negatif
7	perempuan	22	MB	negatif	positif	negatif	negatif
8	laki-laki	21	MB	positif 3	positif	positif	negatif
9	laki-laki	20	MB	negatif	positif	negatif	negatif
10	perempuan	26	MB	positif 4	positif	positif	positif
11	laki-laki	52	PB	negatif	negatif	negatif	positif
12	laki-laki	28	MB	positif 3	positif	negatif	negatif
13	laki-laki	30	PB	negatif	negatif	positif	positif
14	laki-laki	50	MB	positif 2	positif	negatif	negatif
15	laki-laki	50	PB	negatif	positif	negatif	negatif
16	laki-laki	42	PB	negatif	negatif	negatif	negatif
17	laki-laki	14	MB	negatif	positif	negatif	negatif
18	laki-laki	51	PB	negatif	positif	negatif	negatif
19	laki-laki	20	PB	negatif	negatif	negatif	positif
20	perempuan	19	MB	positif 3	positif	negatif	negatif
21	perempuan	50	MB	positif 2	positif	positif	negatif
22	perempuan	42	PB	negatif	positif	positif	positif
23	laki-laki	30	PB	negatif	negatif	negatif	positif
24	laki-laki	24	MB	positif 4	positif	negatif	negatif
25	laki-laki	65	PB	negatif	positif	negatif	positif
26	laki-laki	25	PB	negatif	negatif	negatif	negatif
27	laki-laki	28	MB	positif 3	positif	positif	positif
28	perempuan	5	MB	positif 3	positif	negatif	positif
29	perempuan	60	PB	negatif	positif	negatif	negatif
30	laki-laki	20	MB	negatif	negatif	negatif	positif
31	laki-laki	35	MB	positif 3	positif	positif	positif
32	laki-laki	40	MB	positif 3	positif	positif	positif
33	laki-laki	39	MB	positif 2	positif	negatif	positif
34	laki-laki	66	MB	positif 4	positif	positif	positif
35	laki-laki	30	MB	negatif	negatif	positif	positif
36	perempuan	23	PB	negatif	negatif	negatif	positif
37	perempuan	30	PB	negatif	negatif	negatif	negatif
38	laki-laki	22	MB	positif 2	positif	positif	positif
39	laki-laki	73	MB	positif 4	positif	positif	positif
40	laki-laki	22	MB	positif 4	positif	positif	positif

Lampiran 5

Hasil uji statistik Chi Square
antara pemeriksaan BTA dengan PCR dari spesimen sayatan lesi kulit

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
BTA pada kulit * PCR pada kulit	40	100.0%	0	.0%	40	100.0%

BTA pada kulit * PCR pada kulit Crosstabulation

			PCR pada kulit		Total
			negatif	positif	
BTA pada kulit	negatif	Count	12	9	21
		Expected Count	6.3	14.7	21.0
		% within BTA pada kulit	57.1%	42.9%	100.0%
positif	Count	0	19	19	
	Expected Count	5.7	13.3	19.0	
	% within BTA pada kulit	.0%	100.0%	100.0%	
Total	Count	12	28	40	
	Expected Count	12.0	28.0	40.0	
	% within BTA pada kulit	30.0%	70.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	15.510 ^b	1	.000		
Continuity Correction ^a	12.908	1	.000		
Likelihood Ratio	20.187	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
Linear-by-Linear Association	15.122	1	.000		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5.70.

Lampiran 6

Hasil uji statistik Chi Square

antara pemeriksaan BTA dengan PCR dari spesimen hapusan mukosa hidung

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
BTA pada hidung * PCR pada Hidung	40	100.0%	0	.0%	40	100.0%

BTA pada hidung * PCR pada Hidung Crosstabulation

			PCR pada Hidung		Total
			negatif	positif	
BTA pada hidung	negatif	Count	16	10	26
		Expected Count	12.4	13.7	26.0
		% within BTA pada hidung	61.5%	38.5%	100.0%
	positif	Count	3	11	14
		Expected Count	6.7	7.4	14.0
		% within BTA pada hidung	21.4%	78.6%	100.0%
Total	Count	19	21	40	
	Expected Count	19.0	21.0	40.0	
	% within BTA pada hidung	47.5%	52.5%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5.871 ^b	1	.015		
Continuity Correction ^a	4.372	1	.037		
Likelihood Ratio	6.157	1	.013		
Fisher's Exact Test				.022	.017
Linear-by-Linear Association	5.724	1	.017		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6.65.

Lampiran 7

**Hasil uji statistik Chi Square antara spesimen sayatan lesi kulit
dengan hapusan mukosa hidung dengan teknik PCR**

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PCR pada Hidung * PCR pada kulit	40	100.0%	0	.0%	40	100.0%

PCR pada Hidung * PCR pada kulit Crosstabulation

			PCR pada kulit		Total
			negatif	positif	
PCR pada Hidung	negatif	Count	4	15	19
		Expected Count	5.7	13.3	19.0
		% within PCR pada Hidung	21.1%	78.9%	100.0%
	positif	Count	8	13	21
		Expected Count	6.3	14.7	21.0
		% within PCR pada Hidung	38.1%	61.9%	100.0%
Total	Count	12	28	40	
	Expected Count	12.0	28.0	40.0	
	% within PCR pada Hidung	30.0%	70.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.380 ^b	1	.240		
Continuity Correction ^a	.687	1	.407		
Likelihood Ratio	1.402	1	.236		
Fisher's Exact Test				.311	.204
Linear-by-Linear Association	1.345	1	.246		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5.70.