DETEKSI *MYCOBACTERIUM LEPRAE* DENGAN *REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION* PADA SPESIMEN KEROKAN JARINGAN KULIT DAN JARINGAN BIOPSI KULIT PASIEN KUSTA PAUSIBASILAR DENGAN BASIL TAHAN ASAM NEGATIF

TESIS

ARLEEN DEVITA

1206236205

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS MIKROBIOLOGI KLINIK
JAKARTA
JUNI 2016

DETEKSI *MYCOBACTERIUM LEPRAE* DENGAN *REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION* PADA SPESIMEN KEROKAN JARINGAN KULIT DAN JARINGAN BIOPSI KULIT PASIEN KUSTA PAUSIBASILAR DENGAN BASIL TAHAN ASAM NEGATIF

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik

ARLEEN DEVITA

1206236205

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS MIKROBIOLOGI KLINIK
JAKARTA
JUNI 2016

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama	**: Arleen Devita**
NPM	**: 1206236205**
Tanda Tangan	**:**
Tanggal	**: 14 Juni 2016**

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama	: Arleen Devita
NPM	: 1206236205
Program Studi	: Pendidikan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik
Judul Tesis	: Deteksi *Mycobacterium leprae* dengan *Real-time Polymerase Chain Reaction* pada Spesimen Kerokan Jaringan Kulit dan Jaringan Biopsi Kulit Pasien Kusta Pausibasilar dengan Basil Tahan Asam Negatif

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Spesialis Mikrobiologi Klinik pada Program Studi Dokter Spesialis Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: dr. Fera Ibrahim, MSc, PhD, SpMK(K)	( )
Pembimbing II	: Dr. Andi Yasmon S.Si, M.Biomed	( )
Pembimbing III	: Dr. dr. Sri Linuwih S.W. Menaldi, SpKK(K)	( )
Penguji I	: dr. Hanny Nilasari, SpKK(K)	( )
Penguji II	: Dr. dr. Budiman Bela, Sp.MK(K)	( )
Penguji III	: dr. Anis Karuniawati, PhD, SpMK(K)	( )

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 14 Juni 2016

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama	: Arleen Devita
NPM	: 1206236205
Program Studi	: Pendidikan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik
Departemen	: Mikrobiologi Klinik
Fakultas	: Kedokteran
Jenis Karya	: Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Deteksi *Mycobacterium leprae* dengan *Real-time Polymerase Chain Reaction* pada Spesimen Kerokan Jaringan Kulit dan Jaringan Biopsi Kulit Pasien Kusta Pausibasilar dengan Basil Tahan Asam Negatif

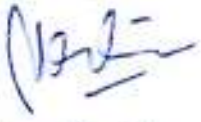
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada Tanggal : 14 Juni 2016

Yang menyatakan



(Arleen Devita)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, tesis yang berjudul "Deteksi *Mycobacterium leprae* dengan *Real-time Polymerase Chain Reaction* pada Spesimen Kerokan Jaringan Kulit dan Jaringan Biopsi Kulit Pasien Kusta Pausibasilar dengan Basil Tahan Asam Negatif" berhasil diselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa segala pencapaian yang penulis lalui tidak lepas dari doa, dukungan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

- **dr. Fera Ibrahim, MSc, PhD, SpMK(K)** selaku pembimbing pertama atas bimbingan, dorongan dan masukan positif yang sangat berharga dalam penyusunan tesis. Terima kasih atas segala kesabaran, arahan yang sangat membuka wawasan berpikir dan waktu yang diberikan disela-sela kesibukan yang padat.
- **Dr. Andi Yasmon S.Si, M.Biomed** selaku pembimbing kedua atas bimbingan, dorongan dan masukkan positif yang sangat berharga dalam penyusunan tesis. Terima kasih atas segala kesabaran, arahan dan motivasi yang diberikan.
- **Dr. dr. Sri Linuwih S.W. Menaldi, SpKK(K)** selaku pembimbing ketiga yang telah banyak memberikan asupan, bimbingan, dorongan sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih setinggi-tingginya sehingga penulis dapat melakukan penelitian di Departemen Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo.
- **Prof. dr. Amin Soebandrio, PhD, SpMK(K)** selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik FKUI saat ini dan **dr. Fera Ibrahim, MSc, PhD, SpMK(K)** selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis sebelumnya yang memberikan kesempatan kepada penulis untuk menimba ilmu mikrobiologi dan dorongan semangat dalam menyelesaikan tesis ini.

- **dr. Fera Ibrahim, MSc, PhD, SpMK(K)** selaku Kepala Departemen Mikrobiologi FKUI saat ini dan. **dr Anis Karuniawati, PhD, SpMK(K)** selaku Kepala Departemen sebelumnya yang telah mengijinkan penulis mempergunakan sarana dan prasarana Departemen dalam kelancaran studi dan penelitian.
- **dr Anis Karuniawati, PhD, SpMK(K)** selaku kepala LMK saat ini dan **Dr. dr. Budiman Bela, SpMK(K)** selaku kepala LMK sebelumnya yang memberikan ijin penggunaan fasilitas laboratorium sebagai wahana belajar dan penelitian.
- **Dr. dr. C.H. Soejono, SpPD-KGer, MEpid, FACP, FINASIM** selaku Direktur Utama RSUPN Cipto Mangunkusumo yang memberikan ijin penelitian di Departemen Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo dan memberikan pembebasan biaya atas pemeriksaan yang dilakukan pada pasien penelitian.
- **dr. Suriptiastuti, DAP&E, MS** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti beserta para wakil dekan, yang memberikan kesempatan untuk menjalankan tugas belajar dan mendukung secara moril maupun materiil sehingga peneliti bisa menyelesaikan tugas belajar dengan baik.
- **dr. Diah Rini Handjari, SpPA(K)** selaku Kepala Departemen Patologi Anatomi FKUI RSUPN Cipto Mangunkusumo yang memberikan ijin penelitian di Departemen Patologi Anatomi dan memberikan pembebasan biaya atas pemeriksaan patologi anatomi pada pasien penelitian.
- Seluruh staf pengajar, **Prof. dr. Agus Sjahrurachman, PhD, SpMK(K), Prof. dr. Amin Soebandrio, PhD, SpMK(K), Prof. dr. Pratiwi P Sudharmono, PhD, SpMK(K), dr. Anis Karuniawati, PhD, SpMK(K), Dr. dr. Budiman Bela, SpMK(K), dr. Fera Ibrahim, MSc, PhD, SpMK(K), dr. Lucky H Moehario, PhD, SpMK(K), Dr. dr. Mardiastuti HW, MSc, SpMK(K), dr. T. Mirawati Sudiro, PhD, Dr. dr. Yeva Rosana, SpMK(K), dr. Yulia Rosa, SpMK, Dr. Andi Yasmon S.Si, M.Biomed, Dra. Betty Ernawati, PhD, Andriansyah, Ssi, MBiomed,**

PhD, Dra. Conny Tjampakasari MBiomed, Dra. Elizabeth Harahap MBiomed, Dra. Ariyani MBiomed, Fithriyah, MBiomed, PhD, Dra. Ika Ningsih MBiomed, dr. Yordan Khaedir, PhD atas segala ilmu dan bimbingannya selama penulis menempuh pendidikan dokter spesialis atas ilmu, pengalaman, keteladanan dan inspirasi bagi penulis untuk menatap masa depan.

- **Mba Tita Rosita**, staf administrasi Program Pendidikan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik yang sudah sangat membantu dan bersedia untuk direpotkan sehingga penulis bisa menyelesaikan tesis ini.
- Staf dan asisten peneliti di staf Laboratorium Mikrobiologi: **mba Nida, mba Indri, mas Alfian, Nurul molekular, Desty, mba Tati, Mba Ais, Nurul LMK, mba Linda, mba Yatmi, mas Toyo, Pak Aan, Mas Syarif**, staf TB (**Ria Ayu, Putri, Nita**) yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
- Staf administrasi lain **mba Henny, mba Wiwik, mba Esti, Mba Ayi admin, Mba Ayi perpus** yang sangat membantu kelancaran proses penelitian**.**
- Kedua orang tua, **(Alm.) papa Anthony Gunawan** dan **mama Maria Susanto** yang selalu memberikan semangat dan doa sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
- Rekan-rekan seperjuangan **Robert, Ida** dan **mba Icha** atas kebersamaannya selama menuntut ilmu di Mikrobiologi Klinik FKUI.
- Kakak-kakak senior, **mba Angky, mas Seto, mba Arum, mba Delly, mba Herna, bang Jul, mba Nita, mba Endang, mba Iin** dan teman-teman Ikatan Residen Mikrobiologi Klinik, **Ade, Erike, Yurika, mba Lisa, Nico, Vero, Mba Nunik, Donna,** atas kebersamaannya, semangat, motivasi dan masukkannya sehingga tesis ini bisa diselesaikan dengan baik.
- Staf Departemem Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo, **Prof. dr. Kusmarinah Bramono, SpKK(K), Dr. dr. Sri Linuwih S.W. Menaldi, SpKK(K), Dr. dr. Tjut Nurul Alam, SpKK(K), dr. Sandra Widaty, SpKK, dr. Melani Marissa, SpKK,**

dr. Eliza Miranda, SpKK, dr. Erdina HDP, SpKK(K), dr. Rahadi Rihatmadja, SpKK, dr. Sondang Marisi Holong Aemilia P. Sirait, SpKK yang membantu peneliti sehingga tesis bisa diselesaikan dengan baik.

- Rekan-rekan PPDS Kulit dan PA FKUI RSCM, **Arini, Martin, Anes, Indah, Fifi, Rika, Ruby, Tari, Safa, Wilson, mba Dewi Jantika**, yang telah membantu dalam memberikan informasi yang dibutuhkan penulis.
- Staf laboratorium dan staf admnistrasi Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo, **mba Waty, mba Nanik, mba Totoh** dan **mba Eli** yang telah membantu peneliti sehingga penelitian bisa berjalan dengan lancar dan baik.
- Serta kepada seluruh pihak yang membantu penulis selama ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu. Semoga Tuhan Yang Maha Esa melimpahkan kasih sayang-Nya dan balasan berlipat ganda atas segala dukungan dan kebaikan.
- Universitas Indonesia, penelitian ini didanai oleh Hibah Riset Awal Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia tahun 2015.

Tesis ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu saran dan masukan sangat penulis harapkan.

Jakarta, 14 Juni 2016

Penulis

ABSTRAK

Nama : Arleen Devita
Program Studi : Pendidikan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik

Judul : Deteksi *Mycobacterium leprae* dengan *Real-time Polymerase Chain Reaction* pada Spesimen Kerokan Jaringan Kulit dan Jaringan Biopsi Kulit Pasien Kusta Pausibasilar dengan Basil Tahan Asam Negatif

Latar Belakang : Penyakit kusta masih menjadi masalah kesehatan di dunia terutama di Indonesia sebagai negara dengan prevalensi tertinggi ketiga di dunia. Gejala klinis dan pemeriksaan penunjang yang ada sulit untuk menegakkan diagnosis definitif kusta pausibasilar (PB) dengan basil tahan asam (BTA) negatif. Diperlukan uji alternatif seperti *real-time polymerase chain reaction* berbasis *probe* TaqMan yang sensitif dan spesifik untuk deteksi *Mycobacterium leprae*.
Tujuan : Mendeteksi *M. leprae* pada pasien kusta PB dengan basil tahan asam negatif, dengan menggunakan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan pada spesimen kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit.
Metode : Penelitian dilakukan dalam 3 tahap. Tahap 1 adalah optimasi konsentrasi *primer, probe*, suhu penempelan, volume elusi akhir dan volume cetakan. Tahap 2 adalah uji sensitivitas (ambang batas deteksi DNA) dan uji spesifisitas (reaksi silang) dari TaqMan *real-time* PCR dan tahap 3 adalah penerapan uji TaqMan *real-time* PCR yang sudah dioptimasi terhadap spesimen kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit.
Hasil : Hasil optimasi TaqMan *real-time* PCR yang didapatkan adalah sebagai berikut : suhu penempelan 55^{o}C, konsentrasi *primer forward*, *primer reverse* dan *probe* masing-masing sebesar 0,2 µM, volume elusi kerokan jaringan kulit cuping telinga dan lesi kulit sebesar 50 µl dan 40 µl dan volume cetakan untuk kerokan jaringan kulit cuping telinga dan lesi kulit sebesar 5 µl dan 6 µl. Ambang batas deteksi DNA terendah adalah 11 sel *M. leprae*. Uji TaqMan *real-time* PCR ini tidak bereaksi silang terhadap *Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus viridans, Candida sp., Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, virus Herpes Simpex dan virus Varicella Zooster. Uji TaqMan *real-time* PCR memberikan positivitas sebesar 20,8%, 25% dan 95,8% pada spesimen kerokan jaringan kulit cuping telinga, lesi kulit dan pada jaringan biopsi kulit. Positivitas hasil pemeriksaan patologi anatomi (PA) yang menunjukkan kusta sebesar 79,2%.
Kesimpulan : *Real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan bersifat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi *M. leprae* pada kusta PB dengan BTA negatif dan dapat meningkatkan kemampuan diagnosis sebesar 16,6% dari pemeriksaan PA yang selama ini menjadi pemeriksaan baku emas kusta. Spesimen yang dianjurkan untuk digunakan adalah jaringan biopsi kulit.

Kata kunci : Kusta PB dengan BTA negatif, TaqMan *real-time* PCR, *M. leprae*, pemeriksaan PA

ABSTRACT

Name : Arleen Devita
Study Programme : Specialist Programme of Clinical Microbiology
Title : Detection of *Mycobacterium leprae* Using Real-time Polymerase Chain Reaction in Slit Skin Smear and Skin Biopsy Specimens of Paucibacillary Patient with Negative Acid-fast Bacilli

Background : Leprosy is still considered as a major health problem worldwide especially in Indonesia as the third highest prevalence in the world. Clinical symptoms which often similar with other skin diseases and the current available laboratory methods to establish definitive diagnosis of paucibacillary leprosy with negative acid-fast bacilli is difficult. Therefore, it is important to apply an alternative assay such as real-time polymerase chain reaction-based TaqMan probe for sensitive and specific detection of *Mycobacterium leprae*.
Objective : Detection of *M. leprae* in paucibacillary leprosy with negative acid-fast bacilli using real-time PCR-based TaqMan probe in slit skin and skin biopsy tissue specimens.
Methods : This study was conducted in three phases. The first is optimization of primers and probe concentrations, annealing temperature, final elution of DNA extraction and volume of PCR template. The second is determination of sensitivity (minimal detection of DNA) and specificity test (cross-reaction) of the optimized TaqMan real-time PCR and the third is application of the TaqMan real-time PCR in slit skin and skin biopsy clinical specimens.
Results : TaqMan real-time PCR assay optimization showed results as follow : annealing temperature at 55^{o}C, concentration of primer both forward and reverse and probe concentration were 0,2 µM, final elution of DNA extraction for slit skin and skin biopsy tissue was 50 µl and 40 µl and volume of PCR templates for slit skin and skin biopsy tissue was 5 µl and 6 µl. Limit detection of the DNA was 11 cells of *M. leprae.* The TaqMan real-time PCR was not cross reacted to *Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus viridans, Candida sp., Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, Herpes Simplex Virus and Varicella Zooster Virus. The TaqMan real-time PCR showed 20,8%, 25% and 95,8% positivity in slit skin of earlobes, slit skin lession and skin biopsy tissue respectively. Histopatology examination result showed 79,2% positivity of leprosy.
Conclusion : Real-time PCR-based TaqMan probe is sensitive and specific for detecting *M. leprae* in paucibacillar leprosy with negative acid-fast bacilli and could improve the diagnosis by 16,6% compared to histopathology which considered as gold standard. Specimen recommended to be used is skin biopsy tissue.

Keywords : Paucibasillary leprosy with negative acid-fast bacilli, the TaqMan real-time PCR, *M. leprae*, Histopathology examination

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....i
HALAMAN JUDUL.....ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....iii
HALAMAN PENGESAHAN..... iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....v
KATA PENGANTAR.....vi
ABSTRAK.....x
DAFTAR ISI.....xii
DAFTAR TABEL.....xv
DAFTAR GAMBAR..... xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....xvii
DAFTAR SINGKATAN..... xviii

1. PENDAHULUAN.....1
1.1 Latar Belakang.....1
1.2 Masalah Penelitian.....5
1.3 Pertanyaan Penelitian.....5
1.4 Tujuan Penelitian..... 5
1.4.1 Tujuan Umum.....5
1.4.2 Tujuan Khusus.....5
1.5 Manfaat Penelitian.....6

2. TINJAUAN PUSTAKA.....7
2.1 Pendahuluan.....7
2.2 Etiologi Kusta.....7
2.3 Patogenesis Kusta.....8
2.4 Diagnosis Kusta..... 9
2.5 Pemeriksaan Molekular.....11
2.5.1 PCR Konvensional.....12
2.5.2 *Nested*-PCR.....13
2.5.3 *Reverse Transcriptase*-PCR (RT-PCR).....14
2.5.4 *Real-time* PCR.....14
2.6 Klasifikasi Kusta.....15
2.7 Kerangka Teori.....18
2.8 Kerangka Konsep.....19

3. METODOLOGI PENELITIAN.....20
3.1 Desain Penelitian.....20
3.2 Waktu dan Pelaksanaan Penelitian.....20
3.3 Tahapan Penelitian.....20
3.4 Subyek Penelitian.....21
3.5 Kriteria Penerimaan dan Penolakan.....21

3.6 Penentuan Besar Sampel....21
3.7 Definisi Operasional....22
3.8 Alur Penelitian....23
3.9 Cara Kerja....24
3.9.1 Pengambilan Sampel untuk Pewarnaan BTA dan Uji TaqMan *Real-Time* PCR dari Kerokan Jaringan Kulit....24
3.9.2 Pewarnaan BTA dengan Ziehl-Neelsen dan Pemeriksaan BTA Secara mikroskopis....25
3.9.3 Pengambilan jaringan kulit dengan biopsi....25
3.9.4 Ekstraksi DNA....26
3.9.4.1 Persiapan Spesimen Kerokan Jaringan Kulit....26
3.9.4.2 Persiapan Spesimen Jaringan Biopsi Kulit....26
3.9.4.3 Ekstraksi DNA....26
3.9.5 *Real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan....27
3.9.5.1 *Primer* dan *Probe*....27
3.9.5.2 Kontrol Positif dan Kontrol Negatif....28
3.9.5.3 Optimasi Kondisi PCR....28
3.9.5.4 Optimasi Suhu Penempelan....29
3.9.5.5 Optimasi Konsentrasi *Primer*....29
3.9.5.6 Optimasi Konsentrasi *Probe*....29
3.9.5.7 Uji Inhibitor....30
3.9.5.8 Uji Sensitivitas Teknik (Ambang Batas Deteksi DNA)....31
3.9.5.9 Uji Spesifisitas Teknik (Uji Reaksi Silang)....32
3.9.5.10Purifikasi DNA....32
3.9.5.11Pengukuran Konsentrasi DNA....32
3.9.6 Uji Sekuensing....33
3.9.7 Aplikasi pada Sampel Klinis....33
3.9.8 Analisis Data....33
3.9.9 Etika Penelitian....33

4. HASIL PENELITIAN....34
4.1 Karakteristik Subyek Penelitian....34
4.1.1 Gejala Klinis....35
4.2 Optimasi Kondisi TaqMan *Real-time* PCR....35
4.2.1 Optimasi Suhu Penempelan....35
4.2.2 Optimasi Konsentrasi *Primer*....36
4.2.3 Optimasi Konsentrasi *Probe*....36
4.2.4 Uji Inhibitor....37
4.2.5 Uji Sensitivitas Teknik (Ambang Batas Deteksi DNA)....40
4.2.6 Uji Spesifisitas Teknik (Uji Reaksi Silang)....41
4.2.7 Hasil Sekuensing....43
4.3 Uji TaqMan *Real-time* PCR pada Spesimen Klinis....43
4.3.1 Perbandingan Hasil Uji TaqMan *Real-time* PCR pada Spesimen Kerokan Jaringan Kulit Cuping Telinga dan Lesi Kulit....43
4.3.2 Perbandingan Hasil Uji TaqMan *Real-time* PCR pada Spesimen Kerokan Jaringan Kulit dan Jaringan Biopsi Kulit....44

4.4 Perbandingan Hasil Uji TaqMan *Real-time* PCR Spesimen Jaringan Biopsi Kulit dan Pemeriksaan PA.....44

5. PEMBAHASAN.....46
5.1 Karakteristik Subyek Penelitian.....46
5.1.1 Gejala Klinis dan Pemeriksaan Mikroskopis BTA.....46
5.2 Optimasi Kondisi TaqMan *Real-time* PCR.....48
5.3 Uji TaqMan *Real-time* PCR pada Spesimen Klinis.....52
5.4 Keterbatasan Penelitian.....55

6. KESIMPULAN DAN SARAN.....57
6.1 Kesimpulan.....57
6.2 Saran..... 58

DAFTAR PUSTAKA..... 59

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Penilaian IB menurut skala logaritma Ridley.....10

Tabel 2.2 Karakteristik kusta berdasarkan Ridley dan Jopling.....16

Tabel 2.3 Klasifikasi kusta berdasarkan WHO beserta tanda utama kusta.....17

Tabel 2.4 Tanda-tanda lain untuk menentukan klasifikasi kusta.....17

Tabel 3.1 Tahapan penelitian..... 20

Tabel 3.2 Sekuens *primer* dan *probe M. leprae* yang digunakan.....28

Tabel 4.1 Karakteristik subyek penelitian..... 34

Tabel 4.2 Perbandingan uji TaqMan *real-time* PCR pada kerokan jaringan kulit cuping telinga dan lesi kulit.....43

Tabel 4.3 Perbandingan uji TaqMan *real-time* PCR pada kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit.....44

Tabel 4.4 Perbandingan antara hasil uji TaqMan *real-time* PCR pada jaringan biopsi kulit dan pemeriksaan PA 45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1 Hasil optimasi suhu penempelan dengan gradien suhu 55-65^{o}C.....35

Gambar 4.2 Hasil optimasi konsentrasi *primer forward* dan *reverse* dengan konsentrasi bervariasi.....36

Gambar 4.3 Hasil optimasi konsentrasi *probe* dengan konsentrasi bervariasi....37

Gambar 4.4 Hasil TaqMan *real-time* PCR pada volume elusi akhir ekstraksi DNA dari kerokan jaringan cuping telinga.....38

Gambar 4.5 Hasil TaqMan *real-time* PCR pada volume elusi akhir ekstraksi DNA dari kerokan jaringan lesi kulit.....38

Gambar 4.6 Hasil TaqMan *real-time* PCR pada volume cetakan DNA dari kerokan jaringan kulit pada cuping telinga.....39

Gambar 4.7 Hasil Taqman *real-time* PCR pada volume cetakan DNA dari kerokan jaringan kulit pada lesi kulit.....40

Gambar 4.8 Penentuan ambang batas deteksi TaqMan *real-time* PCR dengan menggunakan DNA kontrol positif pada beberapa serial pengenceran.....41

Gambar 4.9 Hasil amplifikasi uji spesifisitas TaqMan *real-time* PCR *M. leprae* dengan menggunakan beberapa mikroorganisme.....42

Gambar 4.10 Hasil kesesuaian uji TaqMan *real-time* PCR pada beberapa sampel dengan BTA positif.....42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Gambar hasil TaqMan *real-time* PCR yang diujikan pada sampel
Lampiran 2. Penjelasan penelitian
Lampiran 3. Formulir persetujuan mengikuti penelitian
Lampiran 4. Formulir status pasien
Lampiran 5. Keterangan lolos kaji etik
Lampiran 6. Hasil uji spesifisitas *primer* menggunakan cara BLAST
Lampiran 7. Data klinis pasien
Lampiran 8. Foto lesi kulit pasien MH tipe BT
Lampiran 9. Gambaran histopatologis MH tipe BT
Lampiran 10. Hasil sekuensing pada MH MB tipe LL sebagai kontrol positif
Lampiran 11. Penghitungan ambang batas deteksi DNA (jumlah kopi)

DAFTAR SINGKATAN

µl	mikroliter
µM	mikromolar
BB	*Borderline*
BL	*Borderline lepromatous*
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
bp	*Base pair*
BT	*Borderline tuberculoid*
BTA	Basil tahan asam
cDNA	*complementary DNA*
cm	centimeter
Ct	*cycle threshold*
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
fg	Femtogram
H&E	Hematoksilin-eosin
IB	Indeks bakterial
IgM	Imunoglobulin M
IM	Indeks morfologi
kb	*kilobase*
kDa	kilodalton
kpb	*kilobase pair*
LL	*Lepromatous*
LP	Lapang pandang
M. leprae	*Mycobacterium leprae*
MB	Multibasilar
mg	miligram
MH	Morbus Hansen
ml	mililiter
ng/µl	nanogram/mikroliter
PA	Patologi anatomi
PB	Pausibasilar
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PGL-1	*Phenolic glycolipid-1*
RNA	*Ribonucleic acid*
rpm	*revolutions per minute*
rRNA	Ribosomal RNA
RT-PCR	*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
TT	*Tuberculoid*
WHO	*World Health Organization*
ZN	Ziehl-Neelsen

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kusta atau morbus Hansen (MH) merupakan penyakit kronik yang masih menjadi masalah kesehatan di dunia terutama di negara-negara berkembang. Berdasarkan data *Global Leprosy Update* yang dikeluarkan oleh *World Health Organization* (WHO) tahun 2013, jumlah penderita kusta baru di dunia pada tahun 2013 sebesar 215.656 orang. Dari jumlah tersebut paling banyak terdapat di wilayah Asia Tenggara sebesar 155.385 orang dibanding wilayah lain seperti Amerika, Afrika, Mediterania Timur dan Pasifik Barat. Di wilayah Amerika terdapat 33.084 orang, Afrika 20.911 orang, dan sisanya terdapat di wilayah lain di dunia. Pada tahun 2013, WHO mencatat terdapat 14 negara yang melaporkan 1000 atau lebih kasus baru, dengan kontribusi sebesar 96% dari seluruh kasus baru yang terjadi di dunia. Indonesia menduduki urutan ke tiga setelah India dan Brazil.[1] Jumlah penderita kusta kasus baru di Indonesia pada tahun 2014 tercatat sebanyak 14.540 orang, dengan *rate* 5.77 per 100.000 penduduk. Jumlah ini lebih rendah dibanding tahun sebelumnya, yaitu sebesar 16.825 orang pada tahun 2013. Di Indonesia, distribusi beban penyakit kusta yang tinggi lebih banyak tersebar di wilayah Indonesia bagian tengah dan timur. Distribusi beban penyakit kusta di wilayah Indonesia bagian barat hanya Aceh dan sebagian besar propinsi di pulau Jawa termasuk Jakarta kecuali propinsi Banten dan daerah istimewa Yogyakarta.[2]

Penyakit kusta adalah penyakit infeksi granulomatosa kronik yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium leprae (M. leprae).*[3] Bakteri ini merupakan basil tahan asam (BTA) yang tidak dapat ditumbuhkan secara in vitro. Pada negara-negara dengan angka kejadian kusta yang tinggi, diagnosis ditegakkan berdasarkan gejala dan tanda klinis dan pemeriksaan mikroskopis untuk mencari basil tahan asam.[3,4] Diagnosis kusta secara akurat penting untuk ditegakkan karena melalui pemberian terapi pada seseorang yang menderita kusta dapat mengurangi risiko penularan. Kelainan kulit pada penyakit kusta secara klinis menyerupai banyak penyakit kulit lain.[4] Bahkan ada istilah yang menyebutkan penyakit kusta sebagai peniru terhebat

(*the great imitator*) dalam penyakit kulit, sehingga kadang sulit untuk mendiagnosis hanya berdasarkan gejala dan tanda klinis. Jumlah basil tahan asam yang sedikit seperti pada kusta pausibasilar (PB) juga sulit dideteksi hanya dengan pemeriksaan mikroskopis. Pada kusta PB tersebut, pemeriksaan mikroskopis dengan menghitung jumlah BTA sering memberikan hasil negatif.[4] Sulitnya deteksi kusta PB dengan pemeriksaan mikroskopis ini dikarenakan ambang batas deteksi pemeriksaaan mikroskopis hanya 10.000 basil.[5] Pemeriksaan mikroskopis memiliki sensitivitas yang rendah terutama pada kusta PB yaitu sebesar 10-63%,[6] sedangkan pada kusta MB sensitivitasnya lebih tinggi yaitu sebesar 71,4%.[7] Hasil pemeriksaan mikroskopis dengan BTA yang negatif dan gejala klinis yang sering menyerupai penyakit kulit lainnya menyulitkan untuk penegakkan diagnosis kusta PB. Hasil BTA yang negatif belum dapat menyingkirkan kemungkinan seseorang menderita penyakit kusta terutama tipe PB.

Pemeriksaan laboratorium selain pemeriksaan mikroskopis BTA yang dapat digunakan untuk mendiagnosis kusta adalah pemeriksaan serologis, histopatologis dan molekular.[8-10] Diagnosis kusta menggunakan pemeriksaan serologis adalah mendeteksi antibodi spesifik terhadap komponen protein dari *M. leprae*. Komponen protein yang paling banyak digunakan adalah protein *phenolic glycolipid*-1 (PGL-1).[11,12] Pemeriksaan serologis pada kusta PB seringkali tidak memberikan hasil yang baik karena jumlah basil yang sedikit atau kadar antibodi yang rendah.[9,11,12] Sensitivitas dari pemeriksaan serologis pada pasien kusta PB berkisar antara 15-40%.[13] Sensitivitas pemeriksaan PGL-1 pada kasus awal atau kusta PB yang rendah menyebabkan tidak digunakannya pemeriksaan serologis untuk menegakkan diagnosis kusta.[10]

Pemeriksaan histopatologis dengan melakukan biopsi kulit merupakan pemeriksaan baku emas untuk menegakkan diagnosis kusta.[10] Namun demikian, pemeriksaan secara patologi anatomi (PA) memiliki beberapa keterbatasan yaitu bersifat invasif dan tidak praktis.[14] Sampel yang diperiksa pada pemeriksaan histopatologis juga tidak selalu menunjukkan adanya basil tahan asam bahkan pada pasien dengan gejala yang khas.[8] Pemeriksaan ini hanya memastikan diagnosis kusta PB sebesar 35-45%.[6,14] Hal ini bisa disebabkan karena tidak adanya infiltrasi

ke dalam saraf kulit. Kesesuaian antara diagnosis klinis kusta PB dan klasifikasi histopatologis berdasarkan kriteria Ridley dan Jopling[15] bervariasi dari 27-77.2%.[8] Hasil dari pemeriksaan PA pada penyakit kusta berupa gambaran inflamasi kronik yang tidak spesifik. Gambaran yang mirip dapat juga ditemukan pada kondisi penyakit kulit lainnya.[16]

Sejak berkembangnya era molekular yang berbasiskan amplifikasi asam nukleat, *polymerase chain reaction* (PCR) menjadi alat diagnostik yang sensitif, spesifik dan dapat dipercaya untuk mengidentifikasi patogen pada banyak penyakit infeksi. PCR terbukti dapat membantu menegakkan diagnosis kusta PB pada pasien dengan gejala klinis dan gambaran histopatologis yang tidak khas.[12] Metode ini juga dapat mendeteksi infeksi yang subklinis, memantau pengobatan dan mengetahui ada tidaknya resistensi obat.[11] PCR dapat memperbaiki diagnosis kusta dibandingkan pemeriksaan mikroskopis dan histopatologis.[17] Keterbatasan dari pemeriksaan biopsi-PA yang sulit untuk menunjukkan adanya basil tahan asam pada sampel yang diperiksa dapat diatasi dengan PCR. Metode ini dapat mendeteksi basil pada sampel jaringan meski dalam jumlah yang sedikit.[8] Kelebihan PCR dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskopik adalah kemampuan dalam mendeteksi *M. leprae* pada spesimen biopsi dengan basil tahan asam negatif.[18] Sensitivitas PCR minimal 25 kali lebih baik dibandingkan pemeriksaan mikroskopis.[19]

Metode PCR yang digunakan untuk mendeteksi *M. leprae* selain PCR konvensional diantaranya adalah *real-time* PCR. Ambang batas DNA yang dapat dideteksi dengan *real-time* PCR sampai konsentrasi 8 femtogram (fg) atau setara 240 bakteri.[5] Angka ini lebih baik dibandingkan dengan PCR konvensional dengan sensitivitas hanya sampai 100 fg.[20] Sensitivitas secara klinis dari *real-time* PCR pada pasien kusta PB juga lebih baik dibandingkan dengan PCR konvensional (79,2% berbanding 62,5%)[20] dan pada sampel jaringan pasien kusta dengan hasil pemeriksaan mikroskopik yang negatif (100% berbanding 94,4%),[21] dengan spesifisitas yang sama baik.[20] Studi dari Martinez dkk.[22] menunjukkan sensitivitas *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan yang lebih baik dari studi sebelumnya yaitu sebesar 100% pada pasien kusta multibasilar (MB) dan 84,6% pada pasien kusta PB. Walaupun persentase hasil positif *real-time* PCR untuk kusta PB lebih rendah

dari tipe MB, tetapi karena jumlah basil yang ada juga lebih rendah, kemampuan *real-time* PCR untuk deteksi DNA *M. leprae* pada sampel yang negatif secara bakteriologis dapat membantu membedakan kusta PB dari penyakit lain dengan gejala yang sama. Oleh karena itu uji ini dapat digunakan untuk memastikan diagnosis dengan benar dan dapat menjadi tolak ukur manajemen terapi yang tepat.[11,19] Hasil dari pemeriksaan *real-time* PCR bisa diperoleh dalam waktu yang lebih cepat dibanding PCR konvensional yaitu satu setengah jam sampai dua jam.[5] Karena tahap amplifikasi asam nukleat dan deteksi dilakukan pada sistem tertutup, risiko kontaminasi juga lebih kecil dibanding PCR konvensional.[23]

Pemilihan spesimen untuk deteksi *M. leprae* pada kusta PB dengan BTA negatif menggunakan metode TaqMan *real-time* PCR juga menjadi pertimbangan. Berdasarkan jenis spesimen yang digunakan, sensitivitas PCR dalam mendeteksi kusta PB dengan BTA negatif pada spesimen jaringan biopsi kulit lebih tinggi dibandingkan pada spesimen kerokan jaringan kulit.[24,25] Pada penelitian yang dilakukan Kampirapap dkk.[24] diperoleh sensitivitas PCR dalam mendeteksi kusta PB dengan BTA negatif pada spesimen jaringan biopsi kulit sebesar 44,2% sedangkan pada spesimen kerokan jaringan kulit sebesar 22%. Hasil yang tidak berbeda ditunjukkan oleh Wichitwechkarn dkk.[25] dengan sensitivitas sebesar 36,4% pada spesimen jaringan biopsi kulit dan 18,2% pada spesimen kerokan jaringan kulit. Kedua penelitian tersebut menggunakan metode PCR konvensional.

Terdapat dua metode *real-time* PCR yaitu yang berbasis *probe* dan tidak berbasis *probe*. Metode *real-time* PCR yang tidak berbasis probe adalah dengan menggunakan SYBR *green* untuk mendeteksi DNA. Sedangkan metode *real-time* PCR yang berbasis *probe* salah satunya adalah dengan menggunakan *probe* TaqMan. Metode *real-time* PCR dengan menggunakan SYBR *green* dinilai tidak spesifik, sehingga hanya digunakan untuk uji penapisan saja. Deteksi yang sensitif dan spesifik dimungkinkan sejak menggunakan *real-time* PCR berbasis *probe,* sehingga dapat mengatasi rendahnya spesifisitas pada *real-time* PCR yang menggunakan SYBR *green.*[23]

Berdasarkan data-data tersebut, penelitian ini akan mengembangkan metode *real-time* PCR berbasis probe TaqMan yang dioptimasi untuk mendeteksi *M. leprae*

pada kusta PB dan mengetahui proporsi positif dibandingkan dengan pemeriksaan biopsi-PA. Selain itu, melalui penelitian ini juga akan diketahui proporsi positif pada uji *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan dari sampel dari kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit. Diharapkan uji *real time* PCR berbasis *probe* TaqMan ini dapat digunakan untuk membantu menegakkan kasus kusta PB dengan pemeriksaan mikroskopis yang negatif serta pemeriksaan histopatologis yang meragukan.

1.2 Masalah Penelitian

Sulitnya mendiagnosis kusta PB dengan gejala dan tanda klinis yang tidak jelas serta adanya keterbatasan dari pemeriksaan mikroskopis untuk mendeteksi basil tahan asam *M. leprae*, sehingga diperlukan pemeriksaan penunjang lain yang lebih cepat, sensitif dan spesifik.

1.3 Pertanyaan Penelitian

Apakah pemeriksaan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan yang dioptimasi di laboratorium Departemen Mikrobiologi Klinik FKUI dapat mendeteksi *M. leprae* dari spesimen kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit pasien kusta PB dengan BTA negatif ?

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Mendeteksi *M. leprae* pada pasien kusta PB dengan BTA negatif menggunakan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan.

1.4.2 Tujuan Khusus

a. Mendapatkan metode pemeriksaan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan yang optimal untuk mendeteksi *M. leprae* pada kusta PB dengan BTA negatif.
b. Mendapatkan ambang batas deteksi dan uji reaksi silang (spesifisitas) teknik pemeriksaan kusta PB dengan BTA negatif menggunakan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan.

c. Mengetahui proporsi positif hasil pemeriksaan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan dalam mendeteksi *M. leprae* dengan menggunakan spesimen kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit pasien kusta PB dengan BTA negatif.
d. Mengetahui proporsi positif hasil pemeriksaan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan dan pemeriksaan PA pada spesimen jaringan biopsi kulit pasien kusta PB dengan BTA negatif.

1.5 Manfaat Penelitian

a. Diperoleh metode diagnostik secara molekular yang cepat, sensitif dan spesifik untuk mendeteksi *M. leprae* pada kusta PB dengan BTA negatif.
b. Dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya yaitu pemeriksaan kuantitatif DNA *M. leprae* untuk pemantauan hasil terapi dan resistensi obat.
c. Membantu mendeteksi dan mempercepat penegakkan diagnosis kusta PB yang meragukan dengan BTA negatif dan pemeriksaan histopatologis yang tidak menunjukkan MH.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pendahuluan

Kusta merupakan penyakit inflamasi kronis yang disebabkan oleh bakteri *M. leprae* yang bersifat intraselular obligat. *Mycobacterium leprae* merupakan basil tahan asam yang pertama kali ditemukan pada tahun 1873 oleh Gerhard Henrik Armauer Hansen.[10] Saat ini kusta masih menjadi masalah kesehatan di dunia terutama di negara-negara berkembang. Indonesia sendiri menduduki urutan ke tiga setelah India dan Brazil.[1] Jumlah penderita kusta kasus baru di Indonesia pada tahun 2014 tercatat sebanyak 14.540 orang, dengan *rate* 5.77 per 100.000 penduduk dengan distribusi beban penyakit kusta yang tinggi lebih banyak tersebar di wilayah Indonesia bagian tengah dan timur. Distribusi beban penyakit kusta di wilayah Indonesia bagian barat hanya Aceh dan sebagian besar propinsi di pulau Jawa termasuk Jakarta kecuali propinsi Banten dan daerah istimewa Yogyakarta.[2]

Kusta dapat terjadi pada semua usia dengan puncak insiden terjadi pada 10-19 tahun dan 30 tahun ke atas.[26] Kusta lebih sering terjadi pada laki-laki dengan perbandingan 2:1 terhadap perempuan.[3,27] Penyakit ini berhubungan dengan kemiskinan, walaupun dapat terjadi pada berbagai status sosial ekonomi. Kusta merupakan penyakit menular, namun belum diketahui secara pasti cara penularan kusta. Sebagian besar teori penularan yang dianut adalah melalui saluran napas.[27,28] Cara penularan lain bisa melalui kulit.[28] Pada kasus kusta tipe lepromatosa (LL) menunjukkan adanya sejumlah besar basil pada lapisan dermis, namun apakah basil tersebut dapat mencapai permukaan kulit dalam jumlah yang cukup masih diragukan.

2.2 Etiologi Kusta

Mycobacterium leprae sebagai penyebab kusta merupakan basil tahan asam, gram positif dan intraselular obligat dengan tropisme pada makrofag dan sel Schwann.[3,29] Basil ini menyukai lokasi tubuh yang relatif dingin dengan suhu optimal

pertumbuhan 30^{o}C. Bakteri ini tidak dapat dibiak pada media buatan tetapi dapat dibiakkan pada telapak kaki tikus dan binatang armadilo.[30]

Genom *M. leprae* berukuran 3.3 mega *base pair* (bp), terdiri dari 1605 gen yang mengkode protein. Hanya setengah dari genom *M. leprae* ini yang merupakan *coding sequence.* Lebih dari setengah genom sisanya merupakan gen yang tidak fungsional dan digantikan oleh gen yang tidak aktif atau *pseudogenes*. Delesi dan rusaknya gen ini menjadikan *M. leprae* hanya memiliki beberapa enzim pernapasan yang menjelaskan tidak bisanya *M. leprae* dibiak pada pada media buatan dan bersifat obligat intraselular.[3,28,29] Hilangnya gen termasuk gen yang berperan pada metabolisme energi menyebabkan bakteri ini bergantung pada kondisi intraselular untuk mendapatkan nutrisi yang esensial. Hal inilah yang menjelaskan masa belah diri *M. leprae* yang sangat lama dibandingkan bakteri lain, yaitu 12-14 hari.[30] Karena itu masa tunas dari *M. leprae* lama dengan rerata 3-10 tahun.[28]

Pada dinding sel Mycobacterium terdapat komponen yang menjadi target penting pada respon imun pejamu. Komponen protein yang dikenal dengan PGL-1 menstimulasi respon antibodi imunoglobulin M (IgM) pejamu. Komponen lain yaitu protein yang berperan dalam sintesis dinding sel dan lipoarabinomannan berperan dalam modulasi aktivitas makrofag.[29] Adanya ikatan antara trisakarida pada bagian ujung yang spesifik dari PGL-1 dengan laminin-2 dari lamina basal sel Schwann menjelaskan tropisme penyakit ini pada saraf tepi.[3,29]

2.3 Patogenesis Kusta

Cara masuk *M. leprae* ke dalam tubuh manusia masih belum diketahui dengan pasti. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa yang tersering adalah melalui saluran napas atas dan kulit.[27] Mereka yang tinggal didaerah endemis dengan kondisi yang buruk seperti air yang terkontaminasi, gizi buruk dan kondisi fungsi imun terganggu berisiko tinggi untuk mendapatkan infeksi.[28]

Mycobacterium leprae merupakan parasit obligat intraselular yang terutama terdapat dalam sel makrofag di sekitar pembuluh darah superfisial pada dermis atau sel Schwann di jaringan saraf. Sel Schwann menjadi target utama infeksi oleh *M. leprae*. Ikatan *M. leprae* pada sel Schwann dapat menyebabkan terjadinya

demielinisasi dan hilangnya kemampuan konduksi dari axon.[28] Bakteri ini mampu menyebabkan kerusakan saraf tepi secara langsung tanpa adanya proses inflamasi atau respon imun selular.[10]

Respon imun yang berperan dalam mematikan *M. leprae* adalah imunitas yang diperantarai sel (imunitas selular). Antibodi juga dihasilkan sebagai respon terhadap berbagai antigen *M. leprae* yaitu pada kusta tipe LL, tapi tidak berperan dalam mematikan organisme ini. Imunitas selular menjadi penentu apakah penyakit ini akan berkembang atau sembuh secara spontan. Pada kusta tipe tuberkuloid (TT), fungsi imunitas selular tinggi, sebaliknya pada kusta tipe LL terjadi kelumpuhan sistem imunitas selular sehingga makrofag tidak mampu menghancurkan bakteri dan bakteri dapat bermultiplikasi kemudian merusak jaringan.[27]

2.4 Diagnosis Kusta

Diagnosis kusta ditegakkan terutama berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan fisis.[16] Selain itu dapat ditunjang dengan pemeriksaan bakteriologis, histopatologis, serologis dan molekular.[8-10] Menurut 8th WHO *Expert Committee on Leprosy* tahun 2012, diagnosis kusta didasarkan bila ditemukan salah satu atau lebih tanda kardinal kusta.[31] Tanda kardinal tersebut adalah :

1. Kelainan (lesi) kulit berbentuk bercak putih (hipopigmentasi) atau kemerahan (eritema) yang mati rasa
2. Penebalan atau pembesaran saraf tepi yang disertai dengan hilangnya sensibilitas pada kulit dan/atau kelemahan otot yang dipersarafi saraf tersebut
3. Ditemukannya BTA pada pemeriksaan mikroskopis dari kerokan jaringan kulit (*slit skin smear*)

Pemeriksaan mikroskopis atau bakteriologi dilakukan dengan pewarnaan tahan asam seperti Ziehl-Neelsen untuk mencari BTA. Pemeriksaan dilakukan dengan mengambil sampel dari kerokan jaringan kulit dengan cara melakukan irisan dan kerokan kecil pada kulit. Pemeriksaan ini banyak berguna untuk mempercepat penegakkan diagnosis, karena sekitar 7-10% pasien yang datang dengan lesi PB, merupakan pasien MB yang dini.[4] Oleh karenanya bila terdapat kasus yang meragukan harus dilakukan pemeriksaan kerokan jaringan kulit.[4] Idealnya,

dilakukan pengambilan sampel dari setidaknya enam lokasi, yaitu cuping telinga kanan dan kiri dan 2-4 lesi kulit lain yang aktif. Bila ditemukan basil yang solid, menandakan adanya mikroorganisme yang hidup dan dapat dengan mudah terlihat pada pasien baru yang belum diobati atau pasien relaps. Pada pemeriksaan mikroskopik dinilai indeks bakterial (IB) dan indeks morfologi (IM). IB merupakan ukuran semikuantitatif kepadatan BTA dalam sediaan apus. IB berguna untuk membantu menentukan tipe kusta dan menilai hasil pengobatan. Penilaian IB dilakukan menurut skala logaritma Ridley, yang dapat dilihat pada tabel 2.1. Sedangkan IM merupakan persentase basil kusta, bentuk utuh (solid) terhadap seluruh BTA. IM berguna untuk mengetahui daya penularan kuman, menilai hasil pengobatan dan membantu menentukan resistensi terhadap obat.[4]

Tabel 2.1 Penilaian IB menurut skala logaritma Ridley

	Indeks Bakteri
0	0 BTA dalam 100 LP, hitung 100 lapangan pandang
1+	1-10 BTA dalam 100 LP, hitung 100 lapangan pandang
2+	1-10 BTA dalam 10 LP, hitung 100 lapangan pandang
3+	1-10 BTA dalam rata-rata 1 LP, hitung 25 lapangan pandang
4+	10-100 BTA dalam rata-rata 1 LP, hitung 25 lapangan pandang
5+	100-1000 BTA dalam rata-rata 1 LP, hitung 25 lapangan pandang
6+	>1000 BTA atau 5 clumps ditemukan dalam rata-rata 1 lapangan pandang, hitung 25 lapangan pandang

Dikutip dari Pedoman nasional program pengendalian penyakit kusta. Kementerian Kesehatan RI tahun 2012.[4]

Pemeriksaan lain yang digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis penyakit kusta adalah pemeriksaan histopatologis. Pemeriksaan ini dilakukan dengan mengambil fragmen lesi kulit atau saraf lalu dilakukan pewarnaan hematoksilin-eosin (H&E) dan Faraco-Fite untuk mencari BTA.[11] Fragmen lesi kulit yang diambil adalah bagian yang paling aktif (merah, terdapat infiltrat dan/atau pembesaran), yang biasanya pada bagian tepi. Karakteristik histopatologis ditentukan berdasarkan kriteria dari Ridley dan Jopling.[15] Walaupun pemeriksaan histopatologis ini spesifisitasnya tinggi, tapi sulit membedakan kasus relaps dari

reaksi pada pasien kusta PB atau membedakan kusta dari penyakit granulomatosa lainnya seperti sarkoidosis, tuberkulosis dan penyakit granulomatosa lain yang non infeksi.[16]

Pemeriksaan lain yang dapat digunakan adalah pemeriksaan serologi. Pemeriksaan yang ideal masih terus diteliti sampai sekarang. Yang banyak dipelajari adalah pemeriksaan serologis untuk mendeteksi antibodi terhadap antigen *M. leprae* (PGL-1) dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Metode lain selain ELISA yang bisa digunakan adalah *lateral flow test*, *dipstick* dan tes hemaglutinasi. Adanya antibodi anti PGL-1 dapat menunjukkan adanya bakteri, membantu mengklasifikasikan bentuk klinis dan pemantauan hasil terapi.[11] Pemeriksaan serologis terhadap antibodi anti PGL-1 merupakan pemeriksaan terbaik untuk mendeteksi pasien dengan imunitas selular yang rendah dan pada pasien dengan imunitas humoral yang baik seperti pada kusta MB. Sebaliknya pada kusta PB hasil pemeriksaan serologis sering negatif dan pada daerah endemik kusta terdapat kecenderungan tingkat positivitas dari pemeriksaan serologis yang tinggi.[30] Seropositivitas dari antibodi anti PGL-1 dapat digunakan sebagai penanda pengganti (*surrogate marker*) tingginya jumlah basil (kusta MB) dan untuk menentukan perlu tidaknya diberikan terapi yang lebih lama.[30] Pada pemantauan hasil terapi, penurunan antibodi anti PGL-1 akan disertai dengan antigen *clearance* dan hal ini berhubungan dengan IB. Antibodi anti PGL-1 yang persisten dapat menjadi petanda resistensi terhadap terapi. Sebaliknya jika antibodi anti PGL-1 meningkat pada pasien yang sudah diterapi menunjukkan terjadinya kasus relaps. Pemeriksaan serologis lainnya yang sedang dipelajari adalah berdasarkan respon imun selular, yaitu pengukuran produksi interferon gamma dan indikator tidak langsung lainnya dari imunitas selular.[30]

2.5 Pemeriksaan Molekular

Sejak berkembang metode molekular berbasis amplifikasi asam nukleat, yaitu PCR tahun 1989, pemeriksaan ini sudah digunakan untuk mendeteksi *M. leprae*,[11] dan sangat sensitif dan spesifik.[20,22] Metode molekular ini dapat digunakan untuk mendeteksi, menghitung jumlah basil dan menentukan viabilitas *M. leprae*. Selain itu dapat juga digunakan untuk mengkonfirmasi kasus PB, mendeteksi infeksi

subklinis yang terjadi pada seseorang yang kontak dengan penderita kusta, membantu memantau pengobatan serta mengetahui resistensi obat.[11]

Dasar pemeriksaan ini adalah amplifikasi sekuens tertentu dari genom *M. leprae* dan mengidentifikasi fragmen *deoxyribonucleid acid* (DNA) atau *ribonucleic acid* (RNA) yang diamplifikasi. Sampel dapat diambil dari berbagai tempat misalnya kerokan jaringan kulit, biopsi kulit, saliva, swab atau biopsi mukosa mulut, swab atau biopsi fragmen konka hidung, urin, saraf, darah, sputum, nodus limfatikus dan rambut.[8,11,32] Berbagai metode PCR yang bisa dilakukan adalah PCR konvensional, *nested*-PCR, *reverse transcriptase-PCR* dan *real-time* PCR.[11]

2.5.1 PCR Konvensional

PCR adalah teknik molekular yang menggunakan prosedur enzimatik untuk mengamplifikasi sekuens asam nuklear spesifik secara in vitro, tanpa menggunakan organisme hidup.[33,34] Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1983. Metode ini memungkinkan sejumlah kecil molekul DNA untuk diamplifikasi beberapa kali secara eksponensial dan banyak digunakan dalam penelitian dibidang medis diantaranya dalam hal diagnosis penyakit infeksi.[33] Dengan PCR dapat diisolasi gen apapun dari organisme apapun.[35] PCR memungkinkan identifikasi pada mikroorganisme yang tidak dapat dibiakkan secara in vitro atau mikroorganisme yang tumbuh lambat seperti Mycobacterium. Berbeda dengan organisme yang hidup, proses PCR dapat mengkopi fragmen DNA yang pendek sekalipun sampai 10 kb.[33]

Dibutuhkan beberapa komponen dasar dari metode PCR ini, yaitu cetakan DNA yang mengandung regio fragmen DNA yang akan diamplifikasi, dua primer yang menentukan awal dan akhir regio yang akan diamplifikasi, enzim DNA polymerase yang mengkopi regio yang akan diamplifikasi dan buffer. Metode PCR biasanya dikerjakan dengan volume reaksi 10-50 µl dalam tabung reaksi kecil dan reaksi dijalankan dalam siklus termal. Proses PCR terdiri dari 20-35 siklus termal. Setiap siklus terdiri dari 3 tahap, yaitu denaturasi, *annealing* (penempelan) dan ekstensi.

Tahap denaturasi adalah tahap dimana DNA untai ganda dipisahkan pada suhu 94-96ºC selama 1-2 menit sampai 5 menit. Ikatan hidrogen yang menghubungkan kedua untai DNA dipisahkan. Pada tahap ini enzim DNA polimerase juga mengalami aktivasi.[33] Tahap penempelan adalah tahap dimana sesudah terjadi pemisahan untai ganda DNA, akan terjadi penurunan suhu sehingga *primer* dapat menempel pada untai tunggal DNA. Suhu pada tahap ini biasanya berkisar 45-60ºC dan berlangsung selama 1-2 menit. Suhu yang tidak sesuai akan menyebabkan *primer* tidak bisa berikatan dengan cetakan DNA atau menempel pada tempat lain secara acak. Sesudah tahap penempelan, proses PCR berlanjut dengan tahap ekstensi dimana enzim DNA polimerase akan mengisi bagian untai DNA yang hilang. Waktu untuk tahap ini tergantung pada panjang fragmen DNA yang diamplifikasi, yaitu 1 menit per 1 kbp.[33,34]

Produk PCR dapat diidentifikasi ukurannya dengan menggunakan gel elektroforesis dan dilanjutkan dengan pewarnaan. Selama proses elektroforesis, DNA yang diamplifikasi akan dipisahkan berdasarkan ukuran molekul DNA (untai DNA yang berukuran lebih kecil akan bergerak lebih cepat pada gel dibandingkan yang berukuran lebih besar). Sesudah gel elektroforesis, gel dicuci dalam buffer yang mengandung zat warna yang secara spesifik mewarnai DNA, sehingga bila dilihat dengan sinar ultraviolet akan menunjukkan fluoresensi. Ukuran dari produk PCR dapat ditentukan dengan membandingkan dengan DNA *ladder* yang mengandung fragmen DNA yang sudah diketahui ukurannya.[33,34]

2.5.2 *Nested*-PCR

Nested-PCR berguna untuk mengurangi kontaminasi produk karena amplifikasi dari ikatan *primer* yang tidak diharapkan.[33] Protokol PCR dilakukan 2 kali tahap amplfikasi DNA. Dua set *primer* digunakan pada 2 proses PCR secara berurutan. Sejumlah kecil produk PCR tahap pertama digunakan pada proses PCR tahap kedua dengan menggunakan reagen baru. Amplifikasi pada tahap kedua diharapkan dapat mengatasi uji PCR yang tidak optimal pada tahap pertama, sehingga dapat meningkatkan efisiensi dan kemampuan deteksi dari PCR. *Nested*-PCR mampu membedakan organisme sampai tingkat serovar.[36] Kelebihan dari metode ini adalah reamplifikasi produk non spesifik dari tahap pertama dapat diminimalisir karena

penggunaan *primer* yang berbeda pada tahap kedua. Penggunaan *nested*-PCR masih terbatas pada laboratorium yang berpengalaman dan khusus.

2.5.3 *Reverse transcriptase*-PCR (RT-PCR)

Metode RT-PCR merupakan metode PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi, isolasi dan identifikasi fragmen RNA. Tahap ini diawali dengan proses transkripsi oleh enzim *reverse transcriptase* yang mengubah RNA menjadi cDNA.[33] Metode RT-PCR dikenal sebagai metode yang cepat dan sensitif untuk mendeteksi RNA dari *M. leprae.* Deteksi RNA relatif sulit karena RNA bersifat labil. Hal ini disebabkan karena *turnover rate* dari RNA tinggi.[37] Pemeriksaan berbasis RNA ini menggambarkan asam nukleat hanya dari organisme yang hidup.

2.5.4 *Real-time* PCR

Real-time PCR merupakan modifikasi dari PCR. Prinsip metode *real-time* PCR adalah mengamplifikasi DNA spesifik menggunakan sepasang *primer* spesifik. *Real-time* PCR mengamplifikasi sekuens target dengan menggunakan teknologi fluoresensi.[38] Fluoresensi kemudian dideteksi oleh filter yang terdapat pada alat *real-time* PCR. Sinyal fluoresensi yang terbentuk dikonversi ke dalam grafik amplifikasi DNA di layar monitor. Hasil dinyatakan positif ketika sinyal fluoresen signifikan diatas *baseline*.

Terdapat dua metode *real-time* PCR yaitu yang berbasis *probe* dan tidak berbasis *probe*. Metode *real-time* PCR yang tidak berbasis probe adalah dengan menggunakan pewarna fluoresensi SYBR *green* untuk mendeteksi DNA. Sedangkan metode *real-time* PCR yang berbasis *probe* salah satunya adalah dengan menggunakan *probe* berlabel fluoresen (*probe* TaqMan). Metode *real-time* PCR dengan menggunakan SYBR *green* dinilai tidak spesifik, sehingga hanya digunakan untuk uji penapisan saja. Deteksi yang sensitif dan spesifik dimungkinkan sejak menggunakan *real-time* PCR berbasis *probe,* sehingga dapat mengatasi rendahnya spesifisitas pada *real-time* PCR yang menggunakan SYBR *green.*[23] Hal ini dikarenakan *probe* akan mendeteksi produk PCR yang spesifik saja

sedangkan produk PCR yang tidak spesifik dengan sekuens yang berbeda tidak akan terdeteksi.[34]

Secara umum, *real-time* PCR memiliki kelebihan dibandingkan PCR konvensional yaitu hasil bisa didapatkan lebih cepat karena tidak memerlukan tahap deteksi produk lanjutan sesudah PCR, sensitivitas yang lebih baik karena menggunakan teknologi fluoresensi, bersifat spesifik, lebih mudah untuk dilakukan karena praktis dan risiko kontaminasi yang lebih kecil karena semua dilakukan secara tertutup *(closed vessel)*.[23,38] Dalam mendeteksi *M. leprae*, metode *real-time* PCR dinilai juga memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibanding PCR konvensional (91,3% berbanding 82.6%) dengan spesifisitas yang sama (100%).[20] Ambang batas DNA yang dapat dideteksi dengan *real-time* PCR sampai konsentrasi 8 femtogram (fg) atau setara 240 bakteri.[5] Angka ini lebih baik dibandingkan dengan PCR konvensional dengan sensitivitas hanya sampai 100 fg.[20] Sensitivitas secara klinis dari *real-time* PCR pada pasien kusta PB juga lebih baik dibandingkan dengan PCR konvensional (79.2% berbanding 62.5%)[20] dan pada sampel jaringan pasien kusta dengan hasil pemeriksaan mikroskopik yang negatif (100% berbanding 94.4%).[21] Dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskopis, metode *real-time* PCR memiliki sensitivitas minimal 25 kali lebih baik.[19] Walaupun tingkat kepositifan hasil *real-time* PCR untuk kusta PB lebih rendah dari tipe MB, tetapi karena jumlah basil yang ada juga lebih rendah, kemampuan *real-time* PCR untuk deteksi DNA *M. leprae* pada sampel yang negatif secara bakteriologis dapat membantu membedakan kusta PB dari penyakit lain dengan gejala yang sama. Oleh karena itu uji ini dapat digunakan untuk memastikan diagnosis dengan benar dan dapat menjadi tolak ukur manajemen terapi yang tepat.[11,19]

2.6 Klasifikasi Kusta

Ada beberapa klasifikasi penyakit kusta, yaitu klasifikasi Madrid, klasifikasi Ridley & Jopling, klasifikasi India dan klasifikasi WHO.[4] Penentuan klasifikasi ini didasarkan pada tingkat imunitas dan jumlah kuman. Walaupun klasifikasi Ridley & Jopling digunakan secara global dalam mengevaluasi pasien dalam studi klinis, sistem klasifikasi WHO lebih banyak digunakan. Berdasarkan klasifikasi Ridley & Jopling, kusta dikategorikan menjadi 5 spektrum dan *indeterminate* (I). Kelima

spektrum tersebut yaitu *tuberculoid* (TT), *borderline tuberculoid* (BT), *borderline* (BB), *borderline lepromatous* (BL) dan *lepromatous* (LL).[15] Sedangkan klasifikasi WHO, dibagi atas 2, yaitu multibasilar (MB) dan pausibasilar (PB). Berdasarkan klasifikasi WHO ini, kusta spektrum TT dan BT termasuk dalam PB, sedangkan BB, BL dan LL termasuk dalam kategori MB. Klasifikasi Ridley & Jopling beserta tampilan karakter klinisnya dapat dilihat pada tabel 2.2.[28,39] Sedangkan klasifikasi WHO beserta tanda-tanda utamanya dapat dilihat pada tabel 2.3.[4] Bila salah satu dari tanda utama MB ditemukan, maka pasien diklasifikasikan sebagai kusta tipe MB. Terdapat tanda-tanda lain yang dapat dipertimbangkan dalam penentuan klasifikasi penyakit kusta. Tanda-tanda tersebut dapat dilihat pada tabel 2.4.[4]

Tabel 2.2 Karakteristik kusta berdasarkan klasifikasi Ridley & Jopling

Klasifikasi Ridley & Jopling	**Spektrum Penyakit**				
	TT	**BT**	**BB**	**BL**	**LL**
Tipe	Makula atau bercak eritematosa atau hipopigmentasi berbentuk oval atau bulat, batas tepi lesi dapat sedikit meninggi, batas tegas dari kulit yang normal di sekitarnya	Makula atau bercak eritematosa atau hipopigmentasi lesi ada yang meninggi, batas tegas dari kulit normal disekitarnya	Makula atau plak disertai infiltrat, lesi *punched out*, warna kemerahan atau hipopigmentasi bentuk oval atau bulat, lesi menebal	Lesi bentuknya beragam (multiform) dalam hal ukuran, menebal atau mengalami infiltrasi yang difus, warna kemerahan atau hipopigmentasi batas lesi tidak tegas	Dapat ditemui sejumlah kecil sisa lesi kusta *borderline*
Jumlah lesi	1-3 lesi, asimetris	Beberapa (< 10 lesi), masih asimetris	10-30 lesi, asimetris	Banyak (> 30 lesi), hampir simetris	Banyak sekali, simetris
Ukuran	Variasi, biasanya besar	Variasi, beberapa berukuran besar	Variasi	Kecil, beberapa bisa berukuran besar	Kecil
Permukaan	Kering, bersisik	Kering, bersisik, terlihat cerah, infiltrat	Kusam, sedikit mengkilap	Mengkilap	Mengkilap
Anestesi	Jelas	Jelas	Agak berkurang	Tidak jelas	Biasanya tidak jelas
Skin smear	Negatif	Negatif/ +1	+1 -- +3	+3 -- +5	+6

Dikutip dari Bhat RM, Prakash C. Leprosy : an overview of pathophysiology. Interdiscip Perspect Infect Dis 2012 dan Atlas kusta Kementerian Kesehatan Republik Indonesia 2013.[28,39]

Tabel 2.3 Klasifikasi WHO beserta tanda utama kusta

Tanda Utama	PB	MB
Bercak kusta	Jumlah 1-5	Jumlah >5
Penebalan saraf tepi disertai gangguan fungsi (mati rasa dan atau kelemahan otot, di daerah yang dipersarafi saraf yang bersangkutan	Hanya 1 saraf	Lebih dari 1 saraf
Kerokan jaringan kulit	BTA negatif	BTA positif

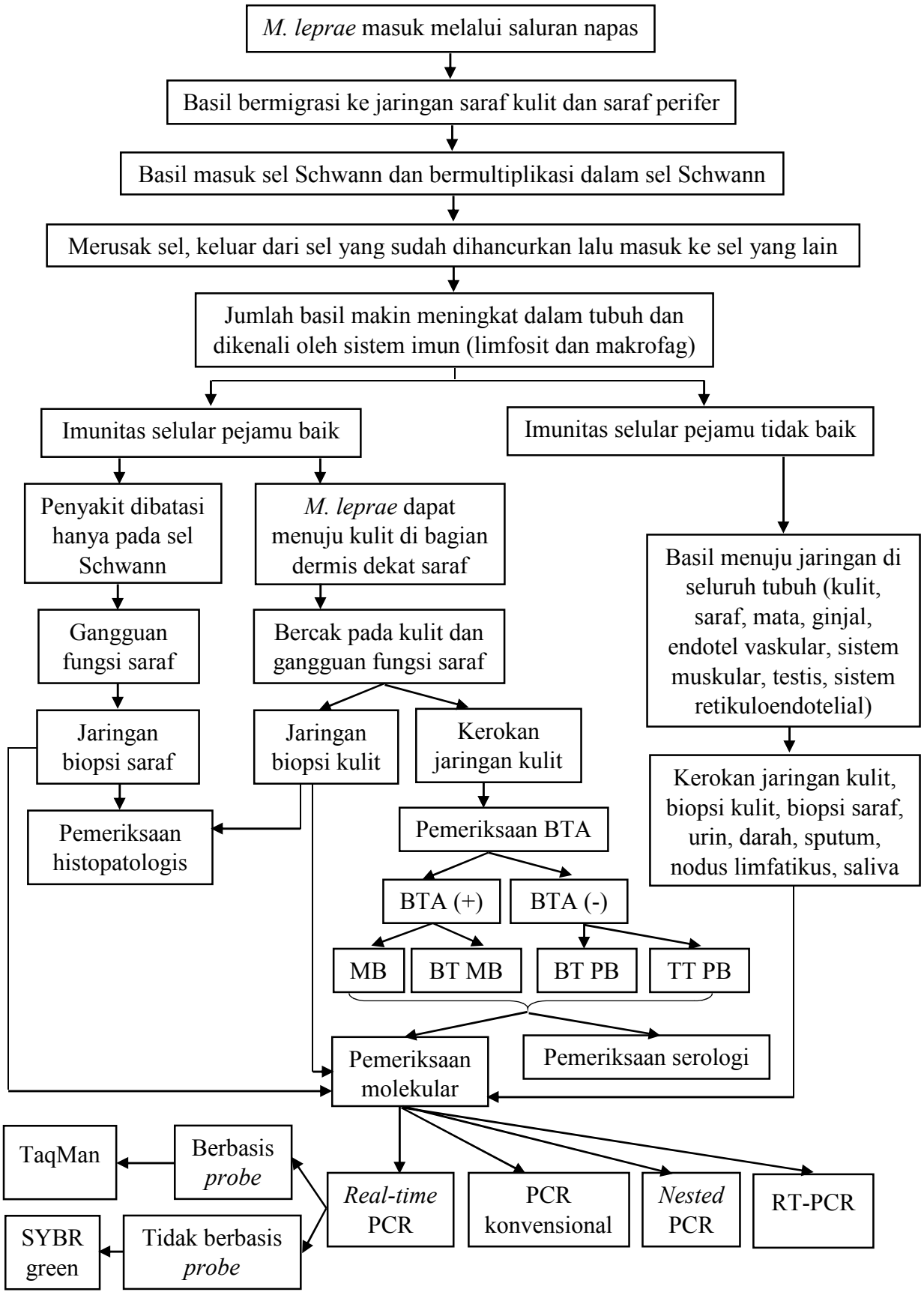
Dikutip dari Pedoman nasional program pengendalian penyakit kusta. Kementerian Kesehatan RI tahun 2012.[4]

Tabel 2.4 Tanda-tanda lain untuk menentukan klasifikasi kusta

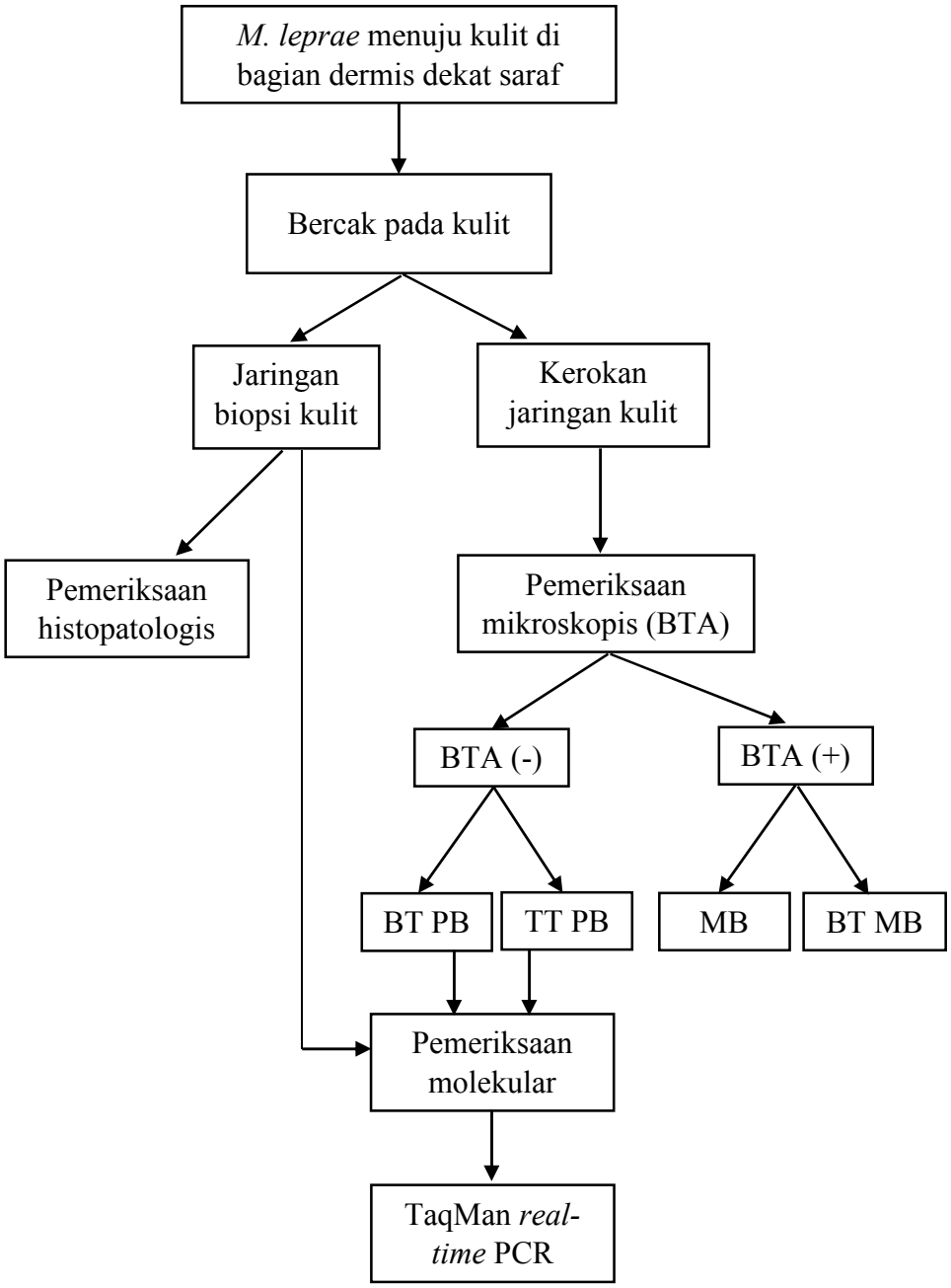
Tanda	PB	MB
Distribusi	Unilateral atau bilateral asimetris	Bilateral simetris
Permukaan bercak	Kering, kasar	Halus mengkilap
Batas bercak	Tegas	Kurang tegas
Mati rasa pada bercak	Jelas	Biasanya kurang jelas
Deformitas	Proses terjadi lebih cepat	Terjadi pada tahap lanjut
Ciri-ciri khas	-	Madarosis, hidung pelana, wajah singa (*facies leonina*), ginekomastia pada laki-laki

Dikutip dari Pedoman nasional program pengendalian penyakit kusta. Kementerian Kesehatan RI tahun 2012.[4]

2.7 Kerangka Teori



2.8 Kerangka Konsep



BAB 3
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif, potong lintang, eksperimental laboratorium

3.2 Waktu dan Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Juni 2015 sampai dengan Maret 2016. Pemeriksaan pasien, pengambilan sampel dilakukan di poliklinik kulit dan kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo. Pemeriksaan mikroskopis BTA dilakukan di laboratorium poliklinik kulit dan kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo. Pengambilan jaringan kulit dengan biopsi dilakukan di ruang tindakan poliklinik kulit dan kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo. Pemeriksaan histopatologis dari jaringan kulit hasil biopsi dilakukan di Divisi Patologi Anatomi (PA) Departemen Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin RSCM. Pemeriksaan TaqMan *real-time* PCR dilakukan di laboratorium mikrobiologi klinik (LMK) FKUI.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yang berurutan. Tahapan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Tahapan Penelitian

Tahap Penelitian	Kegiatan Penelitian	Komponen Kegiatan Penelitian
I	Optimasi kondisi TaqMan *real-time* PCR	Optimasi perlakuan TaqMan *real-time* PCR - Optimasi suhu penempelan - Optimasi *primer forward* dan *reverse* - Optimasi *probe* Optimasi perlakuan pre-*real-time* PCR : Uji inhibitor
II	Uji ambang batas deteksi DNA & uji reaksi silang	
III	Aplikasi pada spesimen klinis	

3.4 Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah pasien kusta pausibasilar yang datang ke poliklinik kulit dan kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo yang didiagnosis secara klinis oleh dokter spesialis kulit dan kelamin dengan pemeriksaan BTA negatif sesuai dengan kriteria inklusi.

Metode yang digunakan adalah pengambilan sampel adalah dengan metode *consecutive sampling*, yaitu semua subyek penelitian yang datang dan memenuhi kriteria inklusi yang dimasukkan dalam penelitian hingga jumlah sampel yang diperlukan terpenuhi.

3.5 Kriteria Penerimaan dan Penolakan

1. Kriteria penerimaan
   - Pasien kusta pausibasilar dengan atau tanpa reaksi reversal yang didiagnosis melalui anamnesis dan pemeriksaan fisis oleh dokter spesialis kulit dan kelamin
   - Hasil pemeriksaan BTA negatif pada semua lokasi pengambilan kerokan jaringan kulit (IB : 0)
   - Pasien baru dan pasien yang masih mendapat pengobatan kusta
   - Usia 18 tahun ke atas
   - Bersedia menjadi responden penelitian dengan mengisi lembar *informed-consent*
2. Kriteria penolakan
   - Pasien dengan gangguan pembekuan darah (penyakit atau minum obat anti koagulan)
   - Pasien dengan anemia

3.6 Penentuan Besar Sampel

Besar sampel ditentukan dengan rumus :

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \, f}{d^2}$$

Beda proporsi positif hasil *real-time* PCR dan hasil PA sebesar 15% dengan tingkat kemaknaan 95%, beda klinis yang dianggap penting ditetapkan 25%.

$$N = \frac{(1{,}96 + 0{,}84)^2 \times 0{,}15}{0{,}25^2}$$

$$= 22$$

Keterangan :
Zα = 1.96
Zβ = 0.84
f = 15% = 0,15
d = 25% = 0,25

Beda proporsi positif hasil *real-time* PCR kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit sebesar 19.2% dengan tingkat kemaknaan 95%, beda klinis yang dianggap penting ditetapkan 25% .

$$N = \frac{(1{,}96 + 0{,}84)^2 \times 0{,}19}{0{,}25^2}$$

$$= 23$$

Keterangan :
Zα = 1.96
Zβ = 0.84
f = 19,2% = 0,19
d = 25% = 0,25

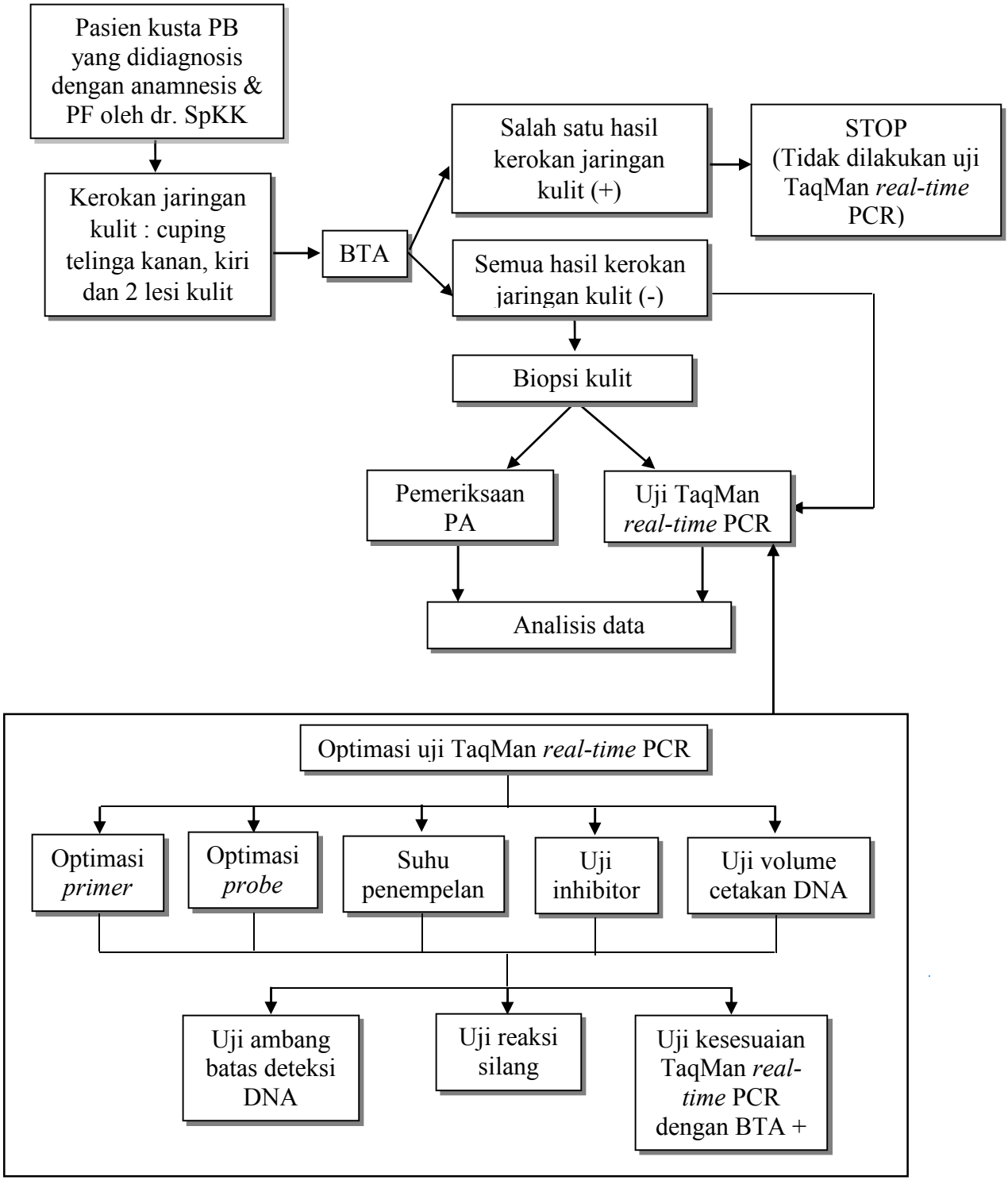
Dengan demikian besar sampel untuk kerokan jaringan kulit sebanyak 46 (23 sampel dari kerokan jaringan dari cuping telinga, 23 sampel dari kerokan jaringan dari lesi kulit) dan sampel untuk jaringan biopsi kulit sebesar 23.

3.7 Definisi Operasional

- **Sensitivitas teknik (ambang batas deteksi)** adalah ambang batas deteksi DNA *M. leprae* pada uji *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan
- **Spesifisitas teknik** adalah tidak terdapatnya reaksi silang uji *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan terhadap DNA selain *M. leprae.*
- **Lesi kulit** adalah lesi pada kulit berupa bercak hipopigmentasi atau eritematosa dengan batas jelas dan disertai adanya anestesi atau hipoestesi.
- **Sampel kerokan jaringan kulit** adalah sampel berupa serpihan dan cairan jaringan hasil kerokan yang diperoleh dengan melakukan sayatan dengan skalpel pada kulit sepanjang sekitar 5 mm dan sedalam sekitar 2 mm.
- **Biopsi jaringan kulit** adalah tindakan operasi kecil yang dilakukan pada tepi lesi kulit aktif dengan bentuk sayatan elips, diameter terpanjang 1 cm dan kedalaman subkutis untuk mengambil jaringan kulit.
- ***Real-time* PCR** adalah metode molekular berdasarkan amplifikasi sekuens DNA tertentu dari gen RLEP *M. leprae* berbasis *probe* TaqMan.

- **Kondisi optimal TaqMan *real-time* PCR** ditentukan bila pada uji TaqMan *real-time* PCR didapatkan kurva sigmoid dengan melihat nilai *cycle threshold* (Ct) terkecil dan banyaknya sinyal fluoresensi yang terbentuk.

3.8 Alur Penelitian



3.9 Cara Kerja

3.9.1 Pengambilan Sampel untuk Pewarnaan BTA dan Uji TaqMan *Real-time* PCR dari Kerokan Jaringan Kulit

Pengambilan sampel dilakukan di laboratorium poliklinik spesialis penyakit kulit RSCM. Pengambilan sampel dikerjakan oleh 1 orang teknisi laboratorium yang sama yang terlatih. Sebelum melakukan pengambilan sampel dari kerokan jaringan kulit dilakukan cuci tangan dengan sabun, mengeringkan tangan lalu memakai sarung tangan. Diambil kaca obyek sediaan yang baru, bersih dan tidak tergores, lalu diberi nomor urut pasien penelitian pada bagian pinggir kaca obyek. Pembakar bunsen dinyalakan. Cuping telinga kanan pada tempat pengambilan kerokan dibersihkan dengan kapas alkohol dan ditunggu sampai kering. Dipersiapkan gagang pisau bedah dan bisturi no 15, lalu bisturi dipasang pada gagang pisau bedah. Kulit tempat pengambilan kerokan dijepit dengan menggunakan jempol dan telunjuk lalu dibuat sayatan sepanjang 5 mm dan dalam 2 mm. Kulit tetap dijepit agar tidak ada darah yang keluar. Jika ada darah yang keluar, darah dibersihkan dengan kapas alkohol. Pisau bedah diputar 90° dan dipertahankan sudut yang tepat pada sayatan kulit, lalu dilakukan pengerokan pada sayatan kulit tadi sebanyak 1 atau 2 kali menggunakan pisau bedah untuk mengumpulkan cairan dan bubur jaringan. Jepitan kulit dilepas lalu dibuat apusan diatas kaca obyek. Sediaan apusan dibuat dengan bentuk lingkaran dengan diameter kurang lebih 1 cm. Dilakukan pengerokan kembali 1 atau 2 kali pada sayatan kulit dari tempat yang sama untuk pengambilan sampel uji TaqMan *real-time* PCR. Bisturi dilepaskan dengan hati-hati lalu dimasukkan ke dalam tabung falkon berukuran 15 ml yang berisi 1,5 ml alkohol 70%. Tempat sayatan dibersihkan dengan kapas alkohol lalu ditutup dengan plester kecil. Demikian dilakukan seterusnya untuk lokasi kerokan lainnya pada cuping telinga kiri, lesi kulit 1 dan lesi kulit 2. Bisturi dari cuping telinga kanan dan kiri dimasukkan dalam satu tabung falkon. Sedangkan bisturi dari lesi kulit aktif 1 dan lesi kulit aktif 2 dijadikan dalam satu tabung falkon. Kaca obyek dibiarkan kering beberapa saat pada suhu ruangan. Setelah kering, dilakukan fiksasi pada apusan dengan melewatkan di atas nyala api bunsen sebanyak 3 kali. Kedua tabung falkon yang masing-masing berisi sampel kerokan jaringan kulit dari cuping telinga dan lesi kulit dibawa le LMK FKUI untuk dilakukan uji TaqMan *real-time* PCR.

3.9.2 Pewarnaan BTA dengan Ziehl-Neelsen dan Pemeriksaan BTA Secara Mikroskopis

Pewarnaan dan pemeriksaan BTA dilakukan di Laboratorium Poliklinik Kulit dan Kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo. Pewarnaan BTA menggunakan kit pewarnaan Ziehl-Neelsen yang diproduksi oleh PT Akurat Intan Madya, Indonesia sesuai dengan yang digunakan oleh Laboratorium Poliklinik Kulit dan Kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo. Cara kerja pewarnaan BTA adalah dengan cara meletakkan sediaan yang sudah dibuat diatas rak pewarnaan lalu diwarnai dengan larutan karbol fuksin 1% sampai menutupi seluruh permukaan sediaan. Sediaan dipanaskan dengan sulut api sampai keluar uap namun tidak sampai mendidih dan dibiarkan selama 5 menit. Setelah 5 menit, larutan karbol fuksin pada sediaan dibuang dan dibilas dengan air mengalir. Dituangkan asam alkohol 3% pada sediaan sampai zat warna karbol fuksin hilang lalu dibilas dengan air mengalir sampai bersih. Sediaan diwarnai dengan larutan biru metilen 0,1% hingga menutupi seluruh sediaan dan dibiarkan selama 2 menit. Setelah 2 menit, larutan biru metilen pada sediaan dibuang lalu dibilas dengan air mengalir. Sediaan dikeringkan pada pada suhu ruangan. Setelah itu dilakukan pemeriksaan BTA dengan menggunakan mikroskop cahaya. Sediaan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x (minyak emersi).

3.9.3 Pengambilan Jaringan Kulit dengan Biopsi

Biopsi dilakukan dengan prosedur standar Divisi Dermatopatologi Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo. Biopsi dilakukan pada lesi kulit aktif di lokasi yang sama dengan pengambilan bahan pemeriksaan kerokan jaringan kulit, dengan bentuk sayatan elips, diameter terpanjang 1 cm dan kedalaman subkutis. Jaringan hasil biopsi dibagi 2 yaitu masing-masing 0,5 cm. Setengah bagian dimasukkan dalam tabung eppendorf berukuran 1,5 ml yang berisi 500 µl alkohol 70%, ditutup rapat dan dibawa ke LMK FKUI untuk dilakukan pemeriksaan TaqMan *real-time* PCR. Sisanya dimasukkan ke dalam tabung plastik berisi formalin 10% untuk dilakukan pemeriksaan PA.

3.9.4 Ekstraksi DNA dari Spesimen Kerokan Jaringan Kulit dan Biopsi Kulit

3.9.4.1 Persiapan Sampel dari Spesimen Kerokan Jaringan Kulit

Sepasang tabung falkon yang berisi bisturi yang mengandung hasil kerokan jaringan kulit masing-masing dari cuping telinga kanan-kiri dan lesi kulit aktif 1-2 divortex selama 2 menit. Lalu dilakukan aliquot sebanyak 700 µl dari tabung falkon yang berisi kerokan jaringan cuping telinga kanan dan kiri ke dalam 2 tabung eppendorf berukuran 2 ml. Tindakan yang sama untuk tabung falkon yang berisi kerokan jaringan lesi kulit aktif 1 dan 2. Keempat tabung eppendorf disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet disisakan. Pelet disimpan pada suhu -20^{o}C sampai dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan DNA *M. leprae*.

3.9.4.2 Persiapan Sampel dari Spesimen Jaringan Biopsi Kulit

Hasil biopsi jaringan ditimbang dan dicatat (berat jaringan tidak melebihi 200 mg sesuai dengan ketentuan kit ekstraksi). Jaringan biopsi kulit dimasukkan dalam tabung eppendorf yang baru berukuran 1,5 ml dan disimpan pada suhu -20^{o}C sampai dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan DNA *M. leprae*.

3.9.4.3 Ekstraksi DNA

Spesimen kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit diekstraksi terpisah dengan menggunakan QIAamp DNA Mini Kit (Qiaqen).

Persiapan

Tabung eppendorf yang berisi pelet dari kerokan jaringan kulit (cuping telinga dan lesi kulit) dan jaringan biopsi kulit dikeluarkan dari lemari pendingin -20^{o}C.

Ekstraksi DNA

Sebanyak 20 µl protease Qiagen (proteinase K) dimasukkan dalam tabung eppendorf yang berisi pelet, ditambahkan carrier RNA sebanyak 6 µl dan buffer ATL sebanyak 180 µl lalu dicampur dengan menggunakan alat *pulse-vortex* selama 15 detik. Inkubasi pada suhu 56^{o}C selama 3 jam (untuk kerokan jaringan) dan 24 jam (untuk jaringan biopsi) untuk melisiskan sel. Setelah inkubasi selesai, dilakukan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 detik untuk menurunkan cairan yang terdapat pada tutup tabung. Sebanyak 200 µl buffer AL ditambahkan ke

dalam sampel lalu dicampur dengan alat *pulse-vortex* selama 15 detik. Dilakukan inkubasi tabung pada suhu 70ºC selama 10 menit. Setelah inkubasi selesai dilakukan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 detik. Ditambahkan etanol absolut sebanyak 200 µl ke dalam sampel dan dicampur dengan alat *pulse vortex* selama 15 detik, lalu dilakukan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 detik. Secara hati-hati, sebanyak 600 µl tersebut dipindahkan ke dalam kolom QIAamp DNA mini dan dilakukan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Setelah itu diletakkan kolom QIAamp DNA mini dalam tabung bersih berukuran 2 ml dan tabung yang mengandung filtrat dibuang. Buka kolom QIAamp DNA mini dan ditambahkan 500 µl buffer AW1 lalu dilakukan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Kolom QIAamp DNA mini dimasukkan dalam tabung bersih berukuran 2 ml dan tabung yang mengandung filtrat dibuang. Buka kolom QIAamp DNA mini dan ditambahkan 500 µl buffer AW2 lalu dilakukan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit. Kolom QIAamp DNA mini dimasukkan dalam tabung bersih berukuran 2 ml dan tabung yang mengandung filtrat dibuang. Dilakukan sentrifugasi pada kolom QIAamp DNA mini yang kosong pada 12.000 rpm selama 1 menit. Kolom QIAamp DNA mini dimasukkan dalam tabung mikro sentrifus ukuran 1,5 ml dan ditambahkan buffer AE (40 µl pada sampel kerokan jaringan kulit dari lesi kulit, 50 µl pada sampel kerokan jaringan kulit dari cuping telinga dan 60 µl pada sampel jaringan biopsi kulit). Dilakukan inkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit. Setelah inkubasi selesai, dilakukan sentrifugasi pada kolom QIAamp DNA mini pada 12.000 rpm selama 2 menit. Kolom QIAamp DNA mini dibuang dan hasil ekstraksi DNA disimpan pada suhu -30ºC.

3.9.5 *Real-time* PCR Berbasis *Probe* TaqMan

3.9.5.1 *Primer* dan *Probe*

Primer dan *probe* yang digunakan dalam penelitian ini sebagaimana dilaporkan oleh Truman dkk.[40] (tabel 3.2). *Primer* untuk uji TaqMan *real-time* PCR ini dipilih dari *common region* dari RLEP (*family of dispersed repeats*). Berdasarkan hasil uji spesifisitas *primer* dengan menggunakan analisis BLAST dari referensi *gene bank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) menunjukkan bahwa *primer* yang digunakan sesuai

dengan beberapa strain *M. leprae* dengan panjang basa 70-bp. Tidak ada reaksi silang *primer* dengan patogen lain selain *M. leprae* (lihat Lampiran 6).

Tabel 3.2 Sekuens *primer* dan *probe M. leprae* yang digunakan

	Nama	Sekuens Oligonukleotida	bp
Forward	MLEPRA-F	5'GCAGTATCGTGTTAGTGAA3'	19
Reverse	MLEPRA-R	5'CGCTAGAAGGTTGCCGTATG3'	20
Probe	TAMRA *Probe* MLEPRA	5'(6-FAM)-TCGATGATCCGGCCGTCGGCG-3'	21

Dikutip dari (40)

3.9.5.2 Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Pada setiap reaksi TaqMan *real-time* PCR disertakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang digunakan diambil dari spesimen jaringan kerokan kulit (cuping telinga dan lesi kulit) pasien kusta MB tipe LL yang datang ke poliklinik kulit dan kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo, sedangkan kontrol negatif digunakan DNA-ase *free water.* Sebanyak 4 orang pasien kusta MB tipe LL yang digunakan sebagai kontrol positif, dengan IB masing-masing 4/6, 5/6, 7/6 dan 15/6. Tahapan pengerjaan spesimen yang digunakan untuk kontrol positif sama dengan pengerjaan spesimen pada sampel.

3.9.5.3 Optimasi Kondisi PCR

Optimasi kondisi PCR dilakukan dengan metode TaqMan *real-time* PCR. Proses amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan mesin IQ^{TM}5, iCycler *multicolor real-time* PCR *detection system* (Bio-Rad). Parameter yang dioptimasi dalam penelitian ini adalah suhu *annealing* (penempelan), konsentrasi *primer*, konsentrasi *probe* dan uji inhibitor. Kondisi optimal ditetapkan berdasarkan nilai *cycle threshold* (Ct). Semakin kecil Ct semakin sensitif hasil uji. Selain nilai Ct, kondisi optimal ditetapkan juga berdasarkan banyaknya sinyal fluoresensi yang terbentuk. Hasil dinyatakan positif ketika sinyal fluoresensi signifikan diatas *baseline*. Selanjutnya pada kondisi TaqMan *real-time* PCR yang sudah dioptimasi ditentukan sensitivitas (ambang batas deteksi) dan spesifisitas (reaksi silang) terhadap mikroorganisme yang berpotensi memberikan hasil positif palsu.

3.9.5.4 Optimasi Suhu Penempelan

Optimasi suhu penempelan dilakukan dengan metode TaqMan *real-time* PCR dengan gradien suhu 55-65ºC, yang terdiri dari 8 reaksi. Sebanyak 1 µl cetakan DNA dari kontrol positif yang sudah diekstraksi direaksikan dalam master mix PCR yang terdiri atas Kapa probe fast qPCR kit, 0,2 µM *primer forward* MLEPRA-F, 0,2 µM *primer reverse* MLEPRA-R, 0,2 µM *probe* MLEPRA dan DNA-ase *free water*. Amplifikasi dilakukan dengan total volume sebesar 10 µl. Suhu penempelan yang optimal dinilai dengan cara membandingkan hasil uji TaqMan *real-time* PCR pada suhu penempelan 55, 55,8, 57,1, 58,9, 61,4, 63,3, 64,5 dan 65ºC. Siklus termal yang digunakan adalah sebagai berikut :

- 95ºC, 3 menit
- 95ºC, 15 detik
- 55-65ºC, 1 menit

} 45 siklus

3.9.5.5 Optimasi Konsentrasi *Primer*

Optimasi *primer* dilakukan dengan membandingkan konsentrasi *primer* pada 0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,4 dan 0,5 µM. Sebanyak 3 µl cetakan DNA dari kontrol positif yang sudah diekstraksi direaksikan dalam master mix PCR terdiri atas Kapa probe fast qPCR kit, 0,2 µM *probe* MLEPRA, DNA-ase *free water, primer forward* MLEPRA-F dan *primer reverse* MLEPRA-R masing-masing dengan konsentrasi 0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,4 dan 0,5 µM. Amplifikasi dilakukan dengan total volume sebesar 20 µl. Siklus termal reaksi TaqMan *real-time* PCR yang digunakan adalah aktivasi enzim pada 95ºC selama 3 menit; 45 siklus pada 95ºC selama 15 detik (denaturasi) dan 55ºC selama 1 menit (penempelan dan pemanjangan).

3.9.5.6 Optimasi Konsentrasi *Probe*

Optimasi *probe* dilakukan dengan membandingkan konsentrasi probe 0,1 , 0,2 dan 0,3 µM. Sebanyak 3 µl cetakan DNA dari kontrol positif yang sudah diekstraksi direaksikan dalam master mix PCR terdiri atas Kapa probe fast qPCR kit, 0,2 µM *primer forward* MLEPRA-F, 0,2 µM *primer reverse* MLEPRA-R, *probe* MLEPRA masing-masing dengan konsentrasi 0,1 , 0,2 dan 0,3 µM dan DNA-ase *free water*. Amplifikasi dilakukan dengan total volume 20 µl. Siklus termal reaksi TaqMan

real-time PCR yang digunakan adalah aktivasi enzim pada 95ºC selama 3 menit; 45 siklus pada 95ºC selama 15 detik (denaturasi) dan 55ºC selama 1 menit (penempelan dan pemanjangan).

3.9.5.7 Uji Inhibitor

a. Volume Elusi

Uji inhibitor dilakukan untuk mengetahui mengetahui kemampuan kit ekstraksi DNA dalam menghilangkan senyawa yang dapat menghambat reaksi TaqMan *real-time* PCR. Uji ini dilakukan dengan menggunakan spesimen kerokan jaringan kulit dari cuping telinga dan lesi kulit aktif yang bertanda kontrol positif. Dimasukkan 800 µl alkohol masing-masing ke dalam 4 buah tabung mikrosentrifus bertanda kontrol positif yang berisi pelet, lalu di campur dengan alat *pulse-vortex* dan dimasukkan ke dalam tabung falkon ukuran 15 ml. Dilakukan aliquot sebanyak 700 µl ke dalam 4 tabung mikrosentrifus yang baru lalu dilakukan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet diektraksi dengan volume elusi akhir yang berbeda masing-masing 40, 50, 60 dan 70 µl, lalu dilakukan uji TaqMan *real-time* PCR secara duplo. Sebanyak 3 µl cetakan DNA dari kontrol positif yang sudah diekstraksi direaksikan dalam master mix PCR yang terdiri atas Kapa probe fast qPCR kit, 0,2 µM *primer forward* MLEPRA-F*,* 0,2 µM *primer reverse* MLEPRA-R, 0,2 µM *probe* MLEPRA dan DNA-ase *free water*. Amplifikasi dilakukan dengan total volume sebesar 20 µl. Siklus termal reaksi TaqMan *real-time* PCR yang digunakan adalah aktivasi enzim pada 95ºC selama 3 menit; 45 siklus pada 95ºC selama 15 detik (denaturasi) dan 55ºC selama 1 menit (penempelan dan pemanjangan).

b. Volume Cetakan DNA *M. leprae*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui volume optimal yang digunakan sebagai cetakan reaksi TaqMan *real-time* PCR pada spesimen kerokan jaringan kulit (cuping telinga dan lesi kulit aktif). Pengujian dilakukan secara duplo. Pada spesimen kerokan jaringan kulit dari cuping telinga dilakukan pengujian dengan volume cetakan 3, 4, 5, 6 dan 7 µl, sedangkan pada spesimen kerokan jaringan kulit

dari lesi kulit aktif dilakukan pengujian dengan volume cetakan 3, 4, 5 dan 6 µl. Master mix PCR terdiri atas Kapa probe fast qPCR kit, 0,2 µM *primer forward* MLEPRA-F, 0,2 µM *primer reverse* MLEPRA-R, 0,2 µM *probe* MLEPRA dan DNA-ase *free water*. Amplifikasi dilakukan dengan total volume sebesar 20 µl. Siklus termal reaksi TaqMan *real-time* PCR yang digunakan adalah aktivasi enzim pada 95^{o}C selama 3 menit; 45 siklus pada 95^{o}C selama 15 detik (denaturasi) dan 55^{o}C selama 1 menit (penempelan dan pemanjangan).

3.9.5.8 Uji Sensitivitas Teknik (Ambang Batas Deteksi DNA)

Uji penentuan ambang batas deteksi DNA dilakukan untuk mendeteksi batas minimal DNA yang masih bisa terdeteksi. Pada uji sensitivitas ini digunakan DNA yang diperoleh dari hasil purifikasi produk PCR dengan label kontrol positif. Dilakukan elektroforesis pada produk PCR tersebut dengan menggunakan gel agarose 2%. Hasil elektroforesis dilihat dengan transiluminator ultraviolet dan difoto menggunakan program Gel Doc XR. Setelah itu dilakukan purifikasi DNA dari gel dengan menggunakan kit *Xprep Gel and PCR Purification* (XPDF) dari Phileo Korea Technology (PKT). Dilakukan elektroforesis kembali pada hasil purifikasi DNA dengan gel agarose 2% untuk memastikan pita DNA yang terbentuk, kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi DNA dengan menggunakan nanodrops. Dilakukan pengenceran berseri terhadap DNA hasil purifikasi tersebut. Setiap pengenceran DNA tersebut diamplifikasi dengan *real-time* PCR. Sebanyak 1 µl cetakan DNA dari serial pengenceran direaksikan dalam master mix PCR yang terdiri atas Kapa probe fast qPCR kit, 0,2 µM *primer forward* MLEPRA-F, 0,2 µM *primer reverse* MLEPRA-R, 0,2 µM *probe* MLEPRA dan DNA-ase *free water*. Amplifikasi dilakukan dengan total volume sebesar 20 µl. Siklus termal reaksi TaqMan *real-time* PCR yang digunakan adalah aktivasi enzim pada 95^{o}C selama 3 menit; 45 siklus pada 95^{o}C selama 15 detik (denaturasi) dan 55^{o}C selama 1 menit (penempelan dan pemanjangan). Sensitivitas (ambang batas deteksi DNA) ditentukan berdasarkan pengenceran terendah yang masih dapat memperlihatkan hasil positif pada uji TaqMan *real-time* PCR.

3.9.5.9 Uji Spesifisitas Teknik (Uji Reaksi Silang)

Uji spesifisitas dilakukan untuk mengetahui reaksi silang *primer* dan *probe* terhadap patogen lain yang berpotensi menyebabkan hasil positif palsu. Dalam penelitian ini uji TaqMan *real-time* PCR dilakukan menggunakan cetakan DNA mikroorganisme patogen lainnya yaitu : *Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus viridans, Candida sp., Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, virus Herpes Simpex dan virus Varicella Zooster. Selain itu dilakukan juga uji TaqMan *real-time* PCR pada pasien kusta dengan BTA positif (BTA +2, +3 dan +4) untuk melihat spesifisitas atau kesesuaian dari uji ini.

3.9.5.10 Purifikasi DNA

Purifikasi DNA dilakukan sebagai tahapan sebelum melakukan pengukuran konsentrasi DNA. Purifikasi DNA yang digunakan adalah dengan metode purifikasi gel. Purifikasi DNA dari gel dilakukan dengan cara memotong gel agarose yang mengandung fragmen DNA dengan menggunakan pisau bersih. Gel dimasukkan ke dalam tabung eppendorf berukuran 1,5 ml, ditambahkan 500 µl buffer XPDF lalu dicampur dengan alat *pulse-vortex.* Dilakukan inkubasi pada suhu 55^{o}C selama 30 menit (dilakukan *vortex* tiap 5 menit) sampai potongan gel terlarut sempurna. Kemudian campuran dipindahkan ke dalam kolum XPDF dan dilakukan sentrifugasi selama 30 detik lalu supernatan dibuang. Kolum kosong tersebut disentrifus selama 3 menit. Sebanyak 40 µl buffer elusi atau ddH2O (pH 7-8,5) dimasukkan ke bagian tengah membran dari kolum XPDF, dibiarkan selama 2 menit lalu dilakukan sentrifugasi selama 2 menit.

3.9.5.11 Pengukuran Konsentrasi DNA

Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan di Pusat Riset berbasis Layanan Kesehatan Virologi dan Kanker Patobiologi (PRVKP) FKUI-RSCM dengan menggunakan alat nanodrops 2000 spektrofotometer dari Thermo Scientific. Pengukuran konsentrasi DNA diawali dengan persiapan blanko dan sampel DNA. Yang digunakan sebagai blanko adalah buffer elusi dan sampel DNA yang digunakan

adalah DNA hasil purifikasi. Hasil pengukuran konsentrasi dicatat dan dinyatakan dalam satuan ng/µl.

3.9.6 Uji Sekuensing

Uji sekuensing dilakukan dengan mengirimkan sampel DNA ke *Eijkman Institute for Molecular Biology*. Sampel DNA yang dikirim berupa produk PCR dari kontrol positif yang sebelumnya dilakukan elektroforesis terlebih dulu pada gel agarose 2% untuk memastikan terdapatnya pita DNA. Hasil sekuensing disejajarkan pada *gene bank* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.9.7 Aplikasi pada Spesimen Klinis

Mycobacterium leprae pada spesimen kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit dideteksi dengan uji TaqMan *real-time* PCR sesuai dengan kondisi yang sudah teroptimasi.

3.9.8 Analisis Data

Dilakukan analisis data berupa distribusi frekuensi karakteristik demografi, data klinis dan proporsi positif uji *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan dibandingkan pemeriksaan PA serta proporsi positif uji TaqMan *real-time* PCR dengan menggunakan sampel kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit. Data diolah dengan menggunakan microsoft excel 2013.

Analisis data terdiri dari data kategorik berupa frekuensi dan proporsi, serta data numerik berupa nilai tengah/median (min-max). Data disajikan dalam bentuk tabel dan narasi.

3.9.9 Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapat ijin etik dari Komite Etik Penelitian Kedokteran FKUI dengan surat keterangan lolos kaji etik nomor : 393/UN2.F1/ETIK/2015.

BAB 4
HASIL PENELITIAN

4.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Sebanyak 24 subyek menandatangani *informed-consent*, sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Dari 24 subyek tersebut kelompok pasien laki-laki lebih banyak menjadi sampel penelitian yaitu sebanyak 13 orang, daripada perempuan yaitu 11 orang. Rentang usia keseluruhan 19 – 67 tahun dengan median usia 37 tahun. Pekerjaan subyek peneliti bervariasi, yang terbanyak adalah ibu rumah tangga dan karyawan. Subyek yang datang sebagai pasien baru yang belum mendapat terapi MH sebanyak 8 orang. Sisanya yaitu sebanyak 16 orang sudah mendapat pengobatan baik dengan regimen PB atau MB. Karakteristik subyek penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Karakteristik subyek penelitian

Karakteristik		Total Pasien N=24
Usia (tahun)	Median (min-maks)	37 (19 – 67)
Jenis Kelamin (n(%))	Laki-laki	13 (54,2)
	Perempuan	11 (45,8)
Tingkat pendidikan (n(%))	SD – SMP	9 (37,5)
	SMA/SMK	9 (37,5)
	Perguruan tinggi	6 (25)
Pekerjaan (n(%))	Ibu rumah tangga	5/11 (45,5)
	Karyawan	5 (20,8)
	Buruh	4 (16,7)
	Wiraswasta	3 (12,5)
	Tidak bekerja	2 (8,3)
	Mahasiswa	1 (4,2)
	Asisten rumah tangga	1 (4,2)
	Guru	1 (4,2)
	Pensiunan	1 (4,2)
	Pedagang	1 (4,2)
Pengobatan MH (n(%))	Sudah mendapat pengobatan	16 (66,7)
	Belum mendapat pengobatan	8 (33,3)
Diagnosis MH (klasifikasi Ridley & Jopling) (n(%))	TT	0 (0)
	BT	20 (83,3)
	BT dengan reaksi reversal	4 (16,7)

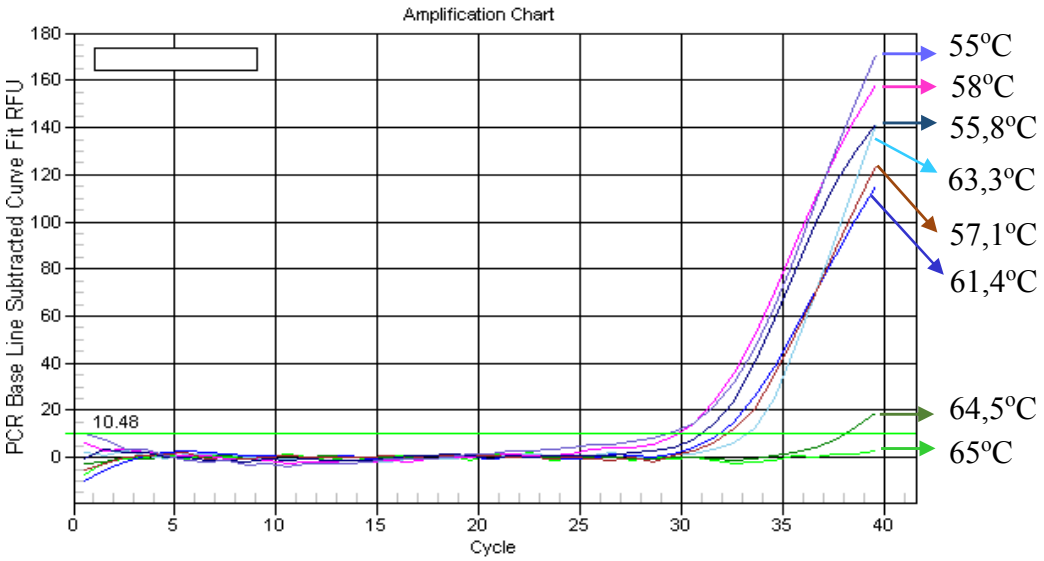
4.1.1 Gejala Klinis

Semua subyek penelitian memiliki gejala klinis berupa lesi kulit hipopigmentasi atau eritematosa dan disertai dengan anestesi. Penebalan atau pembesaran saraf tepi disertai dengan gangguan fungsi saraf terjadi pada 17 dari 24 subyek (70,83%). Semua subyek didiagnosis dengan MH PB tipe BT dengan jumlah lesi kurang dari 5, distribusi lesi bersifat asimetris, permukaan kering dengan terdapat anestesi dan batas yang jelas.

4.2 Optimasi Kondisi TaqMan *Real-time* PCR

4.2.1 Optimasi Suhu Penempelan

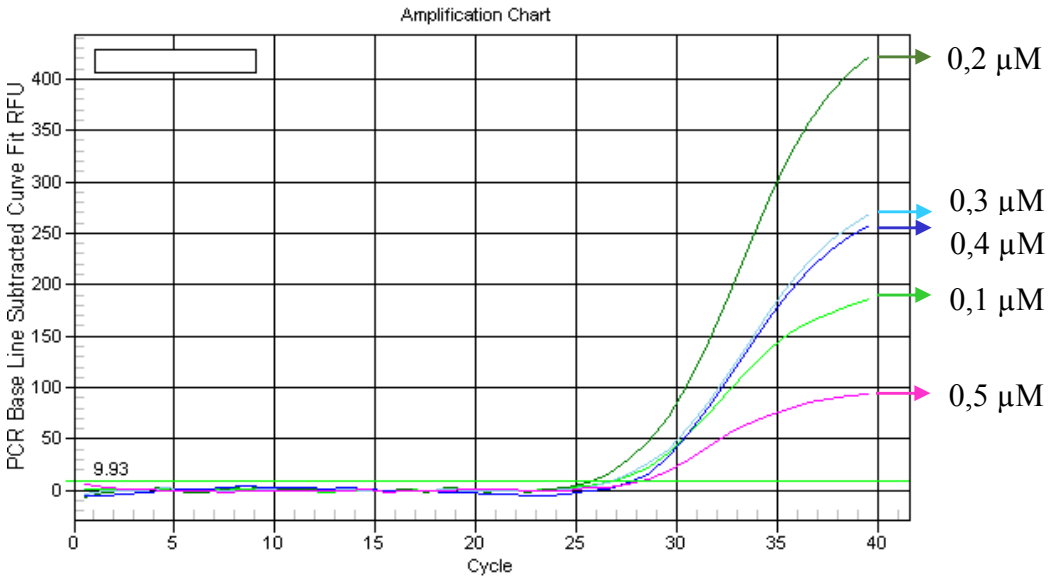
Optimasi suhu penempelan dilakukan dengan gradien suhu 55-65^{o}C, menggunakan bakteri kontrol positif *M. leprae*. Hasil positif ditentukan berdasarkan pada banyaknya sinyal fluoresen yang dibaca oleh filter mesin *real-time* PCR. Gambar 4.1 memperlihatkan suhu penempelan yang paling optimal adalah pada suhu 55^{o}C (ungu), dimana pada suhu tersebut terbentuk kurva sigmoid dengan Ct terkecil dan menunjukkan fluoresensi yang paling optimal.



Gambar 4.1 Hasil optimasi suhu penempelan dengan gradien suhu 55-65^{o}C. Suhu 55^{o}C (ungu), 58^{o}C (merah muda), 55,8^{o}C (biru sangat tua), 63,3^{o}C (biru muda), 57,1^{o}C (coklat), 61,4^{o}C (biru tua), 64,5^{o}C (hijau tua), 65^{o}C (hijau muda).

4.2.2 Optimasi Konsentrasi *Primer*

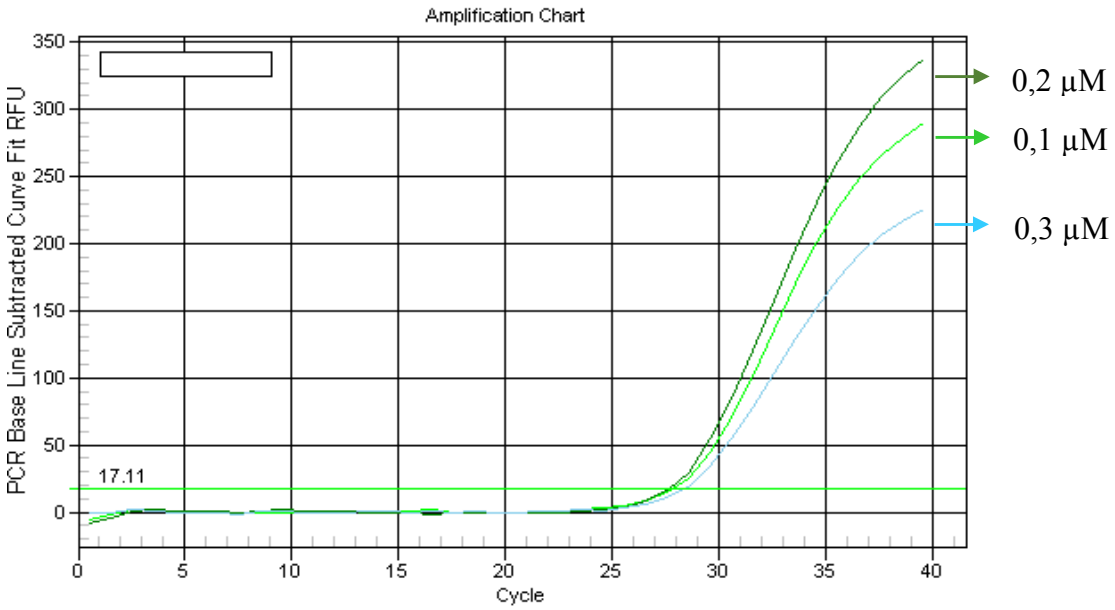
Konsentrasi *primer forward* dan *reverse* yang diuji pada penelitian ini adalah 0,1–0,5 µM. Gambar 4.2 memperlihatkan nilai Ct terkecil dan flouresensi optimal pada konsentrasi *primer forward* dan *reverse* 0,2 µM (hijau tua).



Gambar 4.2 Hasil optimasi konsentrasi *primer forward* dan *reverse* dengan konsentrasi bervariasi : 0,2 µM (hijau tua), 0,3 µM (biru muda), 0,4 µM (biru tua), 0,1 µM (hijau muda), 0,5 µM (merah muda).

4.2.3 Optimasi Konsentrasi *Probe*

Konsentrasi *probe* yang diuji pada penelitian ini adalah 0,1 – 0,3 µM. Gambar 4.3 memperlihatkan hasil amplifikasi yang paling optimal pada konsentrasi *probe* 0,2 µM (hijau tua).



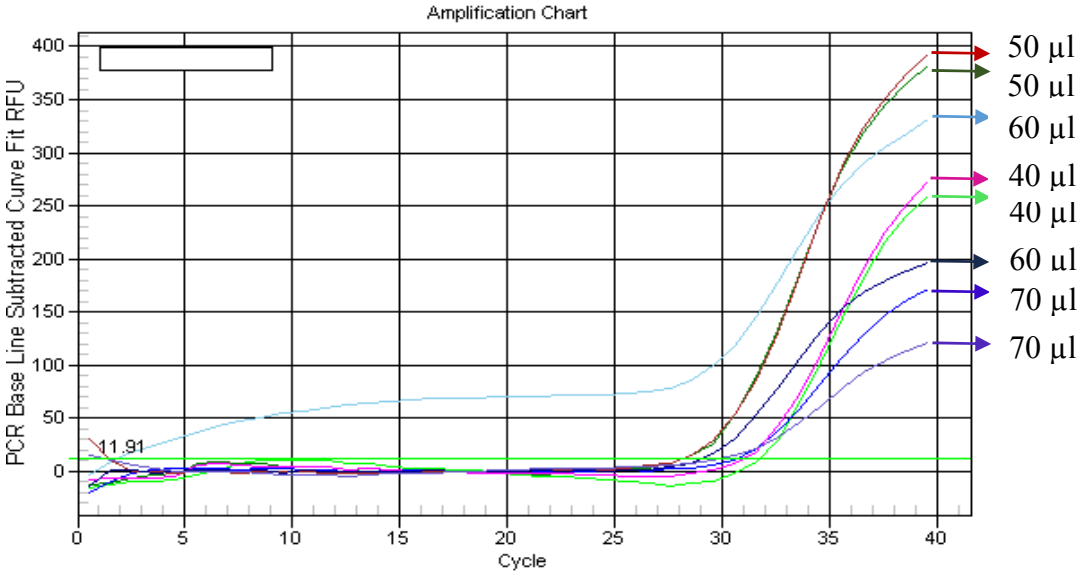
Gambar 4.3 Hasil optimasi konsentrasi *probe* dengan konsentrasi bervariasi : 0,2 µM (hijau tua), 0,1 µM (hijau muda), 0,3 µM (biru muda).

4.2.4 Uji Inhibitor

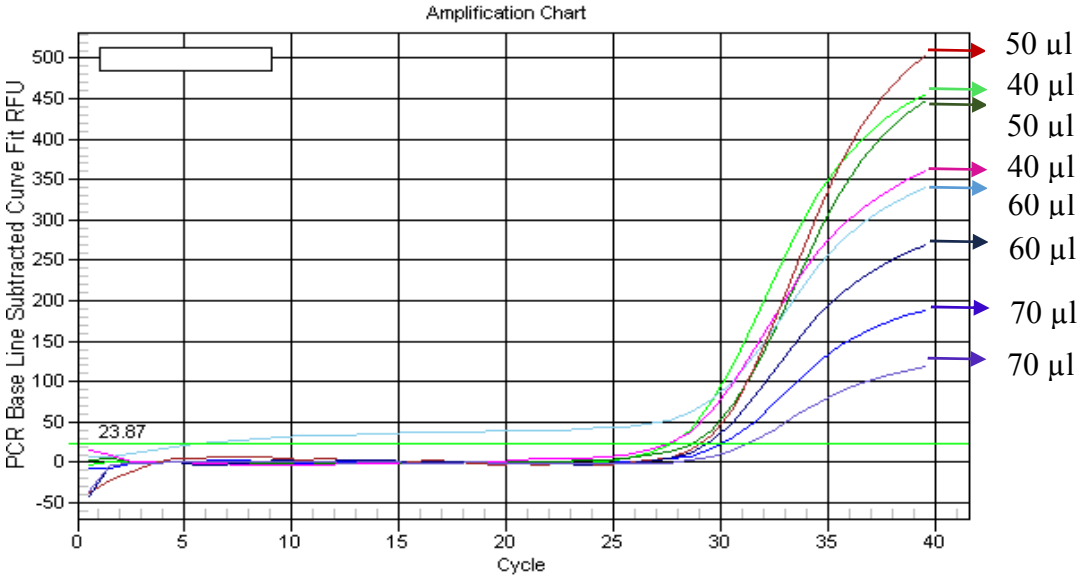
a. Volume Elusi

Uji ini dilakukan untuk mengetahui volume elusi DNA akhir yang paling baik dengan kemungkinan adanya inhibitor yang dapat mempengaruhi produk amplifikasi PCR.

Gambar 4.4 dan 4.5 memperlihatkan nilai Ct terkecil dan flouresensi optimal pada volume elusi akhir 50 µl untuk kerokan jaringan dari cuping telinga dan 40 µl untuk kerokan jaringan dari lesi kulit.



Gambar 4.4 Hasil TaqMan *real-time* PCR pada volume elusi akhir ekstraksi DNA dari kerokan jaringan cuping telinga : volume elusi 40 µl (merah muda dan hijau muda), volume elusi 50 µl (merah tua dan hijau tua), volume elusi 60 µl (biru muda dan biru tua), volume elusi 70 µl (biru dan ungu).

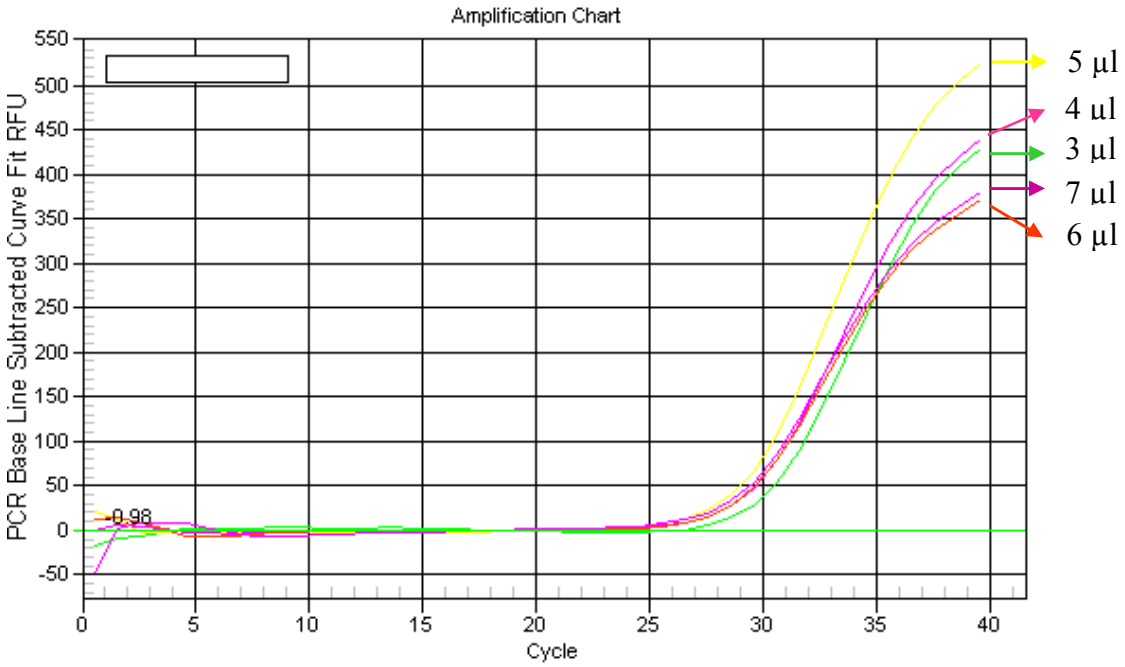


Gambar 4.5 Hasil TaqMan *real-time* PCR pada volume elusi akhir ekstraksi DNA dari kerokan jaringan lesi kulit : volume elusi 40 µl (hijau muda dan merah muda), volume elusi 50 µl (merah tua dan hijau tua), volume elusi 60 µl (biru muda dan biru tua), volume elusi 70 µl (biru dan ungu).

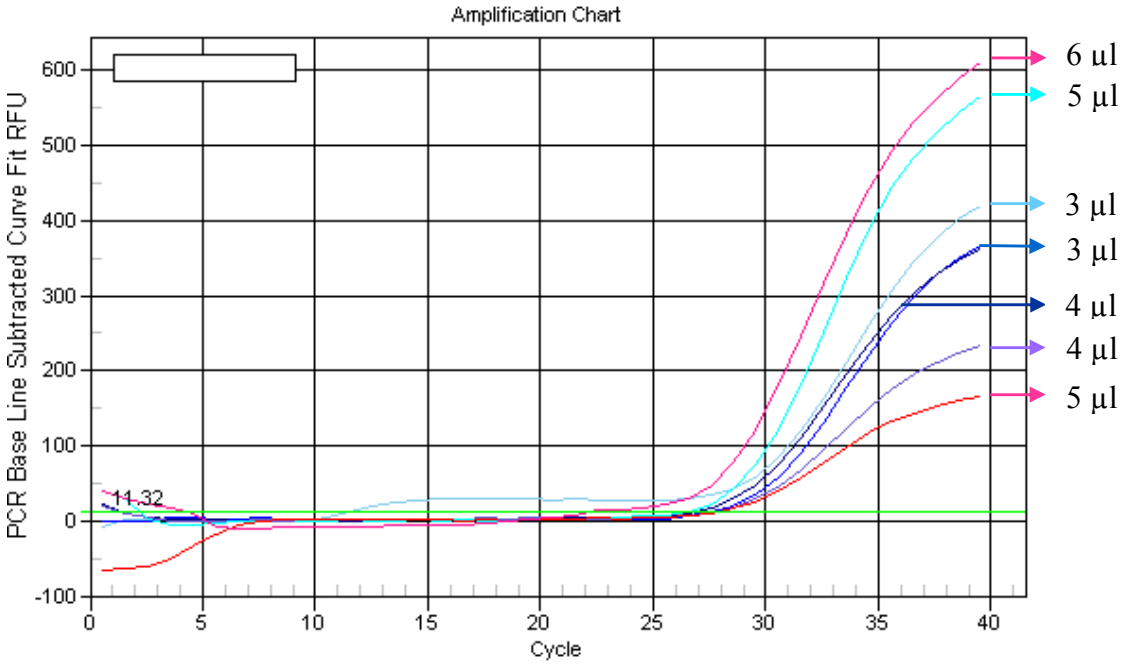
b. Volume Cetakan DNA *M. leprae*

Kondisi optimal volume cetakan DNA ditentukan berdasarkan nilai Ct terkecil dan banyaknya sinyal fluoresensi yang terbentuk. Pada spesimen kerokan jaringan kulit dari cuping telinga dilakukan pengujian dengan volume 3, 4, 5, 6 dan 7 µL. Volume optimal cetakan DNA yang didapatkan dari kerokan jaringan kulit pada cuping telinga adalah 5 µL (Gambar 4.6).

Pada spesimen kerokan jaringan kulit dari lesi kulit aktif dilakukan pengujian dengan volume 3, 4, 5 dan 6 µL. Volume optimal cetakan DNA yang didapatkan dari kerokan jaringan kulit pada lesi kulit adalah 6 µL (Gambar 4.7).



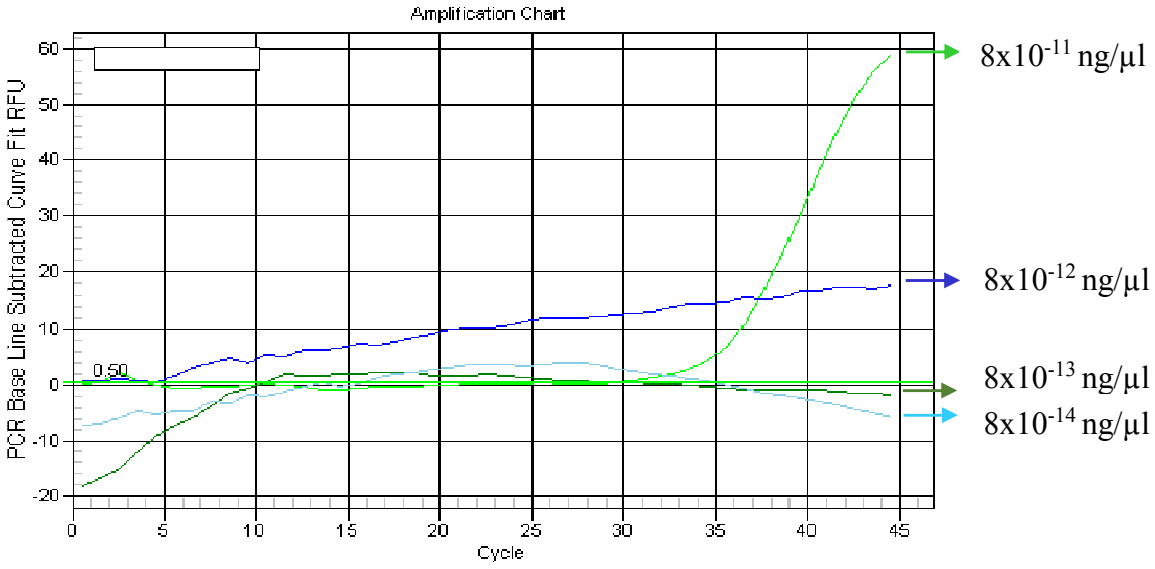
Gambar 4.6 Hasil TaqMan *real-time* PCR pada volume cetakan DNA dari kerokan jaringan kulit pada cuping telinga : volume 3 µl (hijau muda), 4 µl (merah muda), 5 µl (kuning), 6 µl (merah) dan 7 µl (merah keunguan)



Gambar 4.7 Hasil TaqMan *real-time* PCR pada volume cetakan DNA dari kerokan jaringan kulit pada lesi kulit : volume 3 µl (biru muda dan biru tua), 4 µl (biru dongker dan ungu), 5 µl (hijau toska dan merah) dan 6 µl (merah muda)

4.2.5 Uji Sensitivitas Teknik (Ambang Batas Deteksi DNA)

Penentuan ambang batas deteksi DNA dilakukan untuk mengetahui jumlah DNA atau jumlah sel terendah *M. leprae* yang masih dapat dideteksi oleh TaqMan *real-time* PCR. Penentuan ambang batas deteksi DNA ini berdasarkan konsentrasi DNA kontrol positif *M. leprae*. Cetakan DNA yang digunakan merupakan hasil purifikasi metode gel menggunakan kit *Xprep Gel and PCR Purification* (XPDF) dari Phileo Korea Technology (PKT), dengan konsentrasi 8 ng/µl dengan rasio absorbansi A260/280=1,82. Kemudian dilakukan pengenceran berseri sampai uji TaqMan *real-time* PCR menunjukkan hasil negatif.

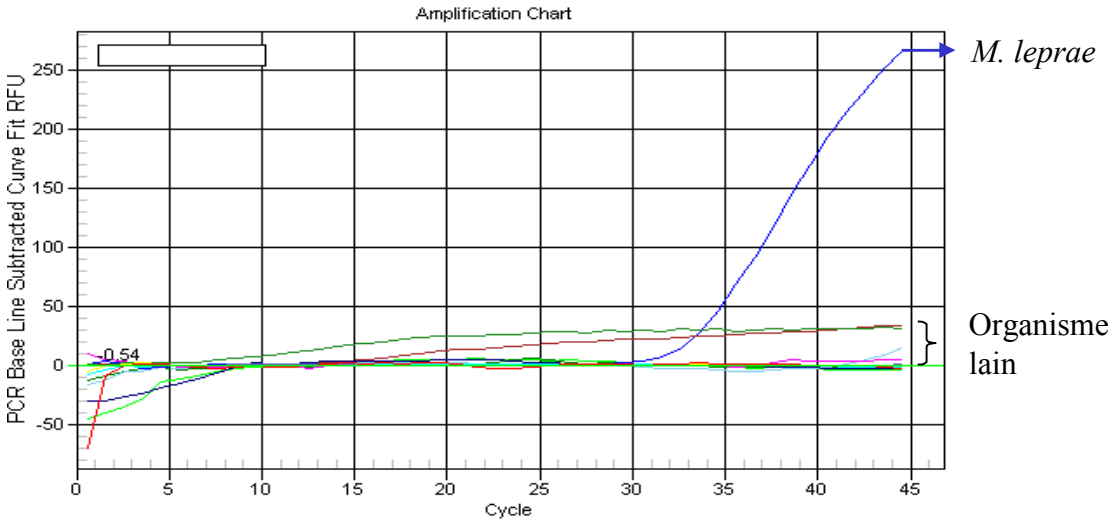


Gambar 4.8 Penentuan ambang batas deteksi TaqMan *real-time* PCR dengan menggunakan DNA kontrol positif *M. leprae* pada beberapa serial pengenceran : $8x10^{-11}$ ng/µl (hijau muda), $8x10^{-12}$ ng/µl (biru tua), $8x10^{-13}$ ng/µl (hijau tua), $8x10^{-14}$ ng/µl (biru muda).

Konsentrasi DNA *M. leprae* terendah yang masih dapat dideteksi dengan uji TaqMan *real-time* PCR adalah $8x10^{-11}$ ng/µl (Gambar 4.8). Konsentrasi ini setara dengan 200 kopi/200 mg jaringan (lihat Lampiran 11). Diketahui bahwa terdapat 19 kopi RLEP pada satu kali amplifikasi dengan menggunakan *primer* tersebut,[40] maka diperoleh ambang batas deteksi DNA dengan pemeriksaan TaqMan *real-time* PCR adalah 11 bakteri *M. leprae*.

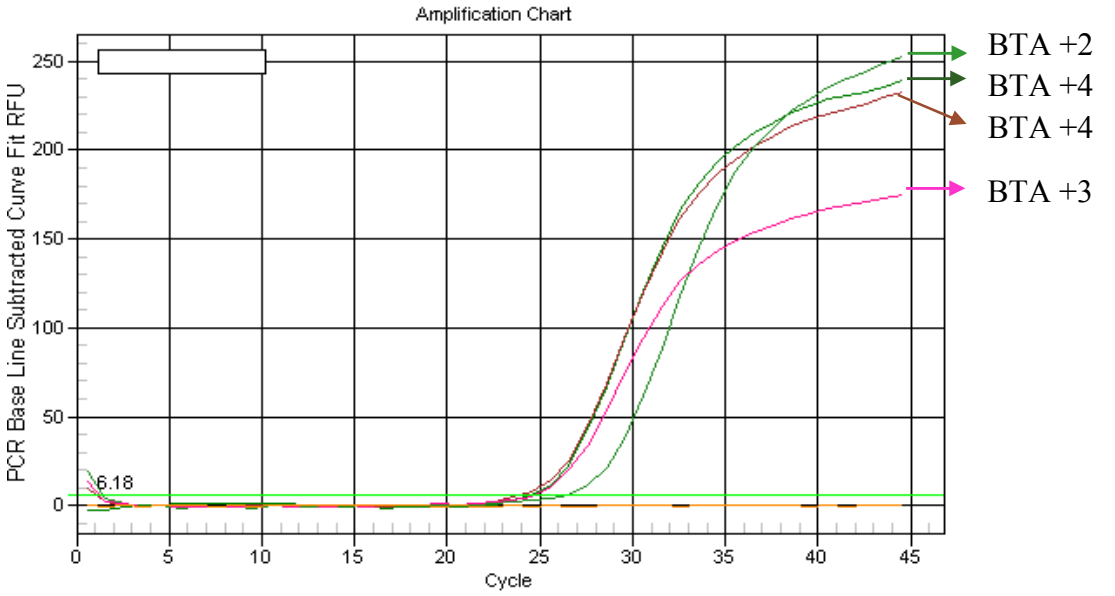
4.2.6 Uji Spesifisitas Teknik (Reaksi Silang)

Uji spesifisitas bertujuan untuk mengetahui apakah *primer* yang digunakan dalam uji TaqMan *real-time* PCR akan memberikan hasil positif jika ditemukan adanya mikroorganisme lain selain bakteri *M. leprae*. Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah *Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus viridans, Candida sp., Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, virus Herpes Simpex dan virus Varicella Zooster. Hasil uji spesifisitas berbagai mikroorganisme lain dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Hasil amplifikasi uji spesifisitas TaqMan *real-time* PCR *M. leprae* dengan menggunakan beberapa mikroorganisme. *M. leprae* (biru tua), *M. tuberculosis* (kuning), *Candida sp*. (biru muda), *Escherichia coli* (hijau sangat tua), *Staphylococcus epidermidis* (merah tua), *Streptococcus viridans* (hijau tua), *Staphylococcus aureus* (merah), *Bacillus subtilis* (biru sangat muda), *Pseudomonas aeruginosa* (biru sangat tua), HSV (hijau), VZV (merah muda).

Beberapa sampel dengan BTA positif juga dilakukan uji TaqMan *real-time* PCR untuk melihat spesifisitas dari uji ini. Sampel yang diujikan adalah sampel dengan BTA +2 – +4. Hasil uji TaqMan *real-time* PCR pada sampel dengan BTA positif dapat dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Hasil kesesuaian uji TaqMan *real-time* PCR pada beberapa sampel dengan BTA positif : BTA +2 (hijau tua), BTA +3 (merah muda), BTA +4 (hijau sangat tua dan coklat)

4.2.7 Hasil Sekuensing

Hasil sekuensing yang dilakukan pada pasien MH MB tipe LL yang digunakan sebagai kontrol positif, dengan gejala klinis berupa lesi eritematosa berjumlah lebih dari 5, permukaan lesi mengkilap, distribusi simetris, berbatas difus, disertai dengan penebalan saraf lebih dari 1 dan BTA +3 (IB 14/6), didapatkan sekuens sebagai berikut CATACGGCAACCTTCTAGCG (lihat Lampiran 10). Hasil amplifikasi yang diperoleh hanya sebagian dari gen target yang digunakan, yaitu yang sesuai dengan sekuens *primer reverse*.

4.3 Uji TaqMan *Real-time* PCR pada Spesimen Klinis

4.3.1 Perbandingan Hasil Uji TaqMan *Real-time* PCR pada Spesimen Kerokan Jaringan Kulit Cuping Telinga dan Lesi Kulit

Hasil uji TaqMan *real-time* PCR spesimen kerokan jaringan kulit pada cuping telinga yang memberikan hasil positif hanya sebesar 20,8%. Sedangkan hasil uji TaqMan *real-time* PCR yang positif dengan menggunakan spesimen lesi kulit sebesar 25%. Terdapat 1 orang subyek dengan hasil TaqMan *real-time* PCR positif pada kedua jenis spesimen kerokan jaringan kulit (dari cuping telinga dan lesi kulit). Perbandingan hasil uji TaqMan *real-time* PCR pada spesimen kerokan jaringan kulit pada cuping telinga dan lesi kulit dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Perbandingan uji TaqMan *real-time* PCR pada kerokan jaringan kulit

Jenis spesimen	**Kerokan jaringan kulit**	
	Cuping telinga	**Lesi kulit**
Uji TaqMan *real-time* PCR		
Positif	5/24 (20,8%)	6/24 (25%)
Negatif	19/24 (79,2%)	18/24 (75%)
Jumlah	24/24 (100%)	24/24 (100%)

4.3.2 Perbandingan Hasil Uji TaqMan *Real-time* PCR pada Spesimen Kerokan Jaringan Kulit (Gabungan Cuping Telinga dan Lesi Kulit) dan Jaringan Biopsi Kulit

Spesimen kerokan jaringan kulit (gabungan dari cuping telinga dan lesi kulit) menunjukkan hasil positif uji TaqMan *real-time* PCR pada 10 subyek (41,7%), sedangkan pada spesimen jaringan biopsi kulit hasil positif mencapai 95,8% (23 dari 24 subyek) dan hanya 1 subyek saja dengan hasil uji TaqMan *real-time* PCR yang negatif. Hasil uji TaqMan *real-time* PCR menunjukkan spesimen jaringan yang diambil dengan biopsi memberikan hasil positif yang lebih tinggi (lebih dari 2 kali lipat) dibandingkan dengan spesimen kerokan jaringan kulit (gabungan cuping telinga dan lesi kulit). Perbandingan hasil uji TaqMan *real-time* PCR spesimen kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Perbandingan uji TaqMan *real-time* PCR pada kerokan jaringan kulit dan jaringan biopsi kulit

Jenis spesimen	Kerokan jaringan kulit (cuping telinga dan/atau lesi kulit)	Jaringan biopsi kulit
Uji TaqMan *real-time* PCR		
Positif	10/24 (41,7%)	23/24 (95,8%)
Negatif	14/24 (58,3%)	1/24 (4,2%)
Jumlah	24/24 (100%)	24/24 (100%)

4.4 Perbandingan Hasil Uji TaqMan *Real-time* PCR Spesimen Jaringan Biopsi Kulit dan Pemeriksaan PA

Dari 23 sampel jaringan biopsi kulit (95,8%) dengan hasil uji TaqMan *real-time* PCR yang positif, sebanyak 19 sampel (79,2%) yang menunjukkan MH pada pemeriksaan PA. Sebanyak 4 sampel (16,6%) dengan hasil uji TaqMan *real-time* PCR yang positif tapi bukan MH pada pemeriksaan PA. Terdapat 1 sampel (4,2%) yang menunjukkan hasil negatif pada uji TaqMan *real-time* PCR dan bukan MH

pada pemeriksaan PA. Perbandingan antara hasil uji TaqMan *real-time* PCR pada spesimen jaringan biopsi kulit dan pemeriksaan PA dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Perbandingan antara hasil uji TaqMan *real-time* PCR pada jaringan biopsi kulit dan pemeriksaan PA

	Pemeriksaan PA		**Jumlah**
	Positif (MH)	**Negatif (Bukan MH)**	
Uji TaqMan *real-time* PCR			
Positif	19/24 (79,2%)	4/24 (16,6%)	23/24 (95,8%)
Negatif	0/24 (0%)	1/24 (4,2%)	1/24 (4,2%)
Jumlah	19/24 (79,2%)	5/24 (20,8%)	24/24 (100%)

BAB 5
PEMBAHASAN

5.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Secara umum gambaran karakteristik sampel pada penelitian ini sesuai dengan epidemiologi pasien kusta. Berdasarkan jenis kelamin, diketahui bahwa jumlah sampel penelitian laki-laki lebih besar dibandingkan dengan perempuan. Hal ini sesuai dengan data yang ada bahwa proporsi pasien laki-laki lebih besar dibandingkan dengan perempuan.[3,27] Dari kategori usia, kusta dapat terjadi pada semua usia dengan puncak insiden bisa terjadi pada usia 30 tahun ke atas.[26] Hal ini sesuai dengan usia sampel penelitian, dengan rentang usia keseluruhan mencapai usia 67 tahun, dengan median usia 37 tahun. Sebanyak 16 orang subyek penelitian sudah mendapatkan pengobatan MH sebelumnya (dengan regimen obat PB atau MB). Penentuan pemberian regimen PB atau MB ditentukan berdasarkan klasifikasi kusta menurut WHO,[4] yaitu berdasarkan jumlah lesi, jumlah penebalan saraf dan ditemukannya BTA pada pemeriksaan mikroskopis.

5.1.1 Gejala Klinis dan Pemeriksaan Mikroskopis BTA

Salah satu kriteria inklusi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pasien MH PB yang didiagnosis dengan anamnesis dan pemeriksaan fisis oleh dokter spesialis kulit dan kelamin dan pemeriksaan BTA negatif (IB = 0). Menurut 8th WHO *Expert Committee on Leprosy* tahun 2012, diagnosis kusta didasarkan bila ditemukan minimal 1 atau lebih dari 3 tanda kardinal kusta. Salah satu tanda kardinal kusta adalah pemeriksaan BTA yang positif. Pada penelitian ini pemeriksaan BTA yang negatif dengan IB 0 menjadi kriteria inklusi, oleh karena itu penegakkan diagnosis didasarkan pada 2 tanda kardinal lainnya. Semua subyek pada penelitian ini memiliki 1 atau lebih tanda kardinal berupa lesi hipopigmentasi atau eritematosa yang mati rasa dan/atau penebalan atau pembesaran saraf tepi yang disertai dengan gangguan fungsi saraf baik berupa hilangnya sensibilitas pada kulit dan/atau kelemahan otot yang dipersarafi. Semua subyek penelitian didiagnosis dengan MH PB tipe BT dengan jumlah lesi kurang dari 5/pasien, distribusi lesi bersifat

asimetris, permukaan kering dengan terdapat anestesi dan batas yang jelas. Hal ini sesuai dengan klasifikasi kusta berdasarkan WHO yang menyatakan bahwa karakteristik pasien MH PB memiliki jumlah lesi kurang dari 5, distribusi lesi umumnya masih bersifat asimetris, permukaan lesi kering bersisik dengan anestesi dan batas yang jelas.[4]

Pada penelitian ini pemeriksaan BTA menggunakan metode pewarnaan Ziehl-Neelsen. Pewarnaan Ziehl-Neelsen yang digunakan adalah kit pewarnaan yang diproduksi oleh PT Akurat Intan Madya, Indonesia dengan komposisi pewarnaan karbol fuksin 1%, asam alkohol 3% dan biru metilen 0,1%. Komposisi pewarnaan tersebut sesuai dengan yang digunakan oleh Laboratorium Poliklinik Kulit dan Kelamin RSUPN Cipto Mangunkusumo. Berdasarkan WHO, konsentrasi asam alkohol yang digunakan pada pewarnaan Ziehl-Neelsen adalah 1%. Hal ini disebabkan karena *M. leprae* relatif kurang tahan asam dibandingkan *Mycobacterium tuberculosis*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fandinho dkk.[41] yang membandingkan pewarnaan BTA dengan metode Kinyoun yang menggunakan asam alkohol 1% dengan metode Ziehl-Neelsen yang menggunakan asam alkohol dengan konsentrasi 3%, diperoleh hasil penelitian yang menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara kedua metode pewarnaan tersebut dalam hal pembacaan IB dan IM pada pemeriksaan mikroskopis. Oleh karena itu penggunaan konsentrasi asam alkohol 3% pada penelitian ini apakah berpengaruh pada pembacaan BTA sehingga dapat menyebabkan terjadinya negatif palsu tidak diketahui pasti.

Risiko kontaminasi yang mungkin terjadi pada tahap pembuatan sediaan BTA sehingga dapat berpengaruh pada pembacaan sediaan (penilaian IB) sudah diminimalisir, karena untuk pemeriksaan mikroskopis BTA selalu menggunakan kaca obyek yang baru. Selain itu pengambilan spesimen untuk pembuatan sediaan BTA dilakukan oleh 1 orang teknisi laboratorium yang sama yang terlatih sehingga kedalaman goresan saat pengambilan spesimen kerokan jaringan kulit sama pada semua subyek penelitian.

5.2 Optimasi Kondisi *Real-time* PCR Berbasis *Probe* TaqMan

Optimasi pada suatu uji merupakan hal yang harus dilakukan sebelum digunakan untuk mendapatkan hasil yang bisa dipercaya. Pada penelitian ini dilakukan optimasi uji TaqMan *real-time* PCR untuk mendapatkan kondisi optimal amplifikasi DNA *M. leprae*. Beberapa kriteria yang dioptimasi adalah suhu penempelan, konsentrasi *primer* dan *probe*, volume elusi, volume cetakan DNA, uji reaksi silang dan batas deteksi DNA. *Primer* dan *probe* yang digunakan memiliki susunan nukleotida sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Truman dkk.[40] *Primer* dan *probe* dirancang berdasarkan sekuens gen RLEP yang spesifik untuk *M. leprae* dengan produk amplifikasi 70 bp.

Penggunaan gen RLEP dinilai mampu mendeteksi DNA *M. leprae* pada pasien dengan IB 0.[5,22,42,43] Penelitian yang dilakukan oleh Martinez dkk.[43] membandingkan uji PCR dengan metode RT-PCR yang mengamplifikasi gen target yang berbeda-beda, yaitu 16s rRNA, *sodA* mRNA dan RLEP pada spesimen jaringan biopsi kulit dan kerokan jaringan kulit. Hasil penelitian menunjukkan RLEP mampu mendeteksi *M. leprae* walaupun hanya terdapat jumlah bakteri yang sedikit. Sedangkan studi yang dilakukan oleh Martinez dkk.[22] membandingkan uji *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan dengan gen target Ag 85B, *sodA*, 16s rRNA dan RLEP dengan menggunakan spesimen jaringan biopsi kulit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji TaqMan *real-time* PCR dengan menggunakan gen target RLEP tetap memberikan sensitivitas yang lebih baik dibandingkan gen target lainnya. Gen RLEP mampu mendeteksi penyakit kusta dengan sensitivitas 100% pada pasien MB dan 84,6% pada pasien PB. Studi dari Turankar dkk.[44] yang mengevaluasi uji PCR dengan metode konvensional yang mengamplifikasi gen target yang berbeda-beda, yaitu RLEP, 16s rRNA, rpoT dan SodA untuk mendeteksi DNA *M. leprae* pada spesimen klinis dan lingkungan. Hasil dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa uji PCR dengan gen target RLEP memberikan positivitas yang tertinggi dalam mendeteksi *M. leprae* baik pada spesimen klinis dan lingkungan. Selain itu, disimpulkan juga bahwa uji PCR dengan menggunakan gen target RLEP mampu mendeteksi kasus awal kusta dan dapat digunakan untuk menilai keberhasilan terapi. Penggunaan RLEP sebagai gen

target PCR memberikan sensitivitas yang lebih tinggi karena RLEP terdapat pada *multiple site* pada genom DNA *M. leprae (repetitive sequence)*.[42] Pada penelitian ini, digunakan gen target RLEP yang mempunyai 19 kopi dalam kromosom *M. leprae*.

Selain pemilihan gen target *primer*, ukuran produk PCR (amplikon) juga mempengaruhi sensitivitas dari uji *real-time* PCR.[45,46] Studi yang dilakukan oleh Goulart dkk.[46] yang mendeteksi DNA *M. leprae* dengan menggunakan 2 ukuran amplikon yaitu 372 bp dan 130 bp menunjukkan sensitivitas uji PCR dengan ukuran amplikon 130 bp meningkatkan sensitivitas sebesar 20,2%. Hasil ini sama dengan studi yang dilakukan oleh Kang dkk.,[47] yang membandingkan uji PCR menggunakan *primer* yang mengamplifikasi fragmen RLEP sebesar 129 bp dan gen protein 18-kDa sebesar 360 bp. Pada penelitian tersebut disimpulkan uji PCR menggunakan *primer* yang mengamplifikasi RLEP dengan amplikon 129 bp lebih sensitif dan spesifik dibandingkan uji PCR yang menggunakan gen target protein 18-kDa dengan amplikon 360 bp. Ukuran amplikon yang pendek (kurang dari 400 bp) akan lebih mudah diamplifikasi karena reaksi PCR menjadi lebih efisien.[45] Pada penelitian ini ukuran amplikon yang digunakan adalah 70 bp.

Salah satu kriteria yang dioptimasi pada uji TaqMan *real-time* PCR ini adalah suhu penempelan. Kondisi suhu penempelan pada reaksi *real-time* PCR mempengaruhi efisiensi penempelan *primer* dan *probe*.[48] Untuk menempel pada target PCR, *primer* dan *probe* membutuhkan suhu yang sesuai. Suhu penempelan antara 55-70^{o}C biasanya memberikan hasil yang terbaik.[49] Pada penelitian ini diperoleh suhu penempelan yang optimal untuk uji TaqMan *real-time* PCR yaitu suhu 55^{o}C. Suhu penempelan 55^{o}C juga digunakan pada penelitian yang dilakukan oleh Kramme dkk.,[50] Lini dkk.,[21] dan Torres dkk.[9] dengan metode PCR yang berbeda. Beberapa studi menunjukkan suhu penempelan yang berbeda dengan penelitian ini yaitu 60^{o}C. Perbedaan suhu penempelan tersebut dikarenakan perbedaan susunan nukleotida *primer* dan *probe*, panjang dan konsentrasi *primer* sehingga suhu penempelan optimal *primer* dan *probe* pada target juga berbeda.[49]

Selain dipengaruhi oleh suhu penempelan, hasil TaqMan *real-time* PCR juga dipengaruhi oleh konsentrasi *primer*. Desain dan konsentrasi *primer* merupakan hal

yang penting dalam keberhasilan amplifikasi uji PCR. *Primer* yang baik harus bersifat spesifik dan memberikan hasil amplifikasi yang efisien. Spesifisitas dari *primer* yang digunakan pada penelitian ini terbukti spesifik terhadap *M. leprae* dan tidak ada reaksi silang dengan patogen lain selain *M. leprae* (lihat Lampiran 6). Ukuran dari *primer* yang dianggap optimal biasanya berukuran antara 18-28 basa.[49] *Primer* yang terlalu pendek bersifat kurang spesifik, sebaliknya jika terlalu panjang maka amplifikasi menjadi kurang efisien.[49] Pada penelitian ini digunakan desain *primer* berdasarkan studi yang dilakukan oleh Truman dkk.,[40] dengan ukuran *primer forward* 19 basa dan panjang *primer reverse* 20 basa. Seperti halnya dengan ukuran *primer*, konsentrasi *primer* yang terlalu tinggi menyebabkan *primer* bersifat tidak spesifik dan dapat terjadi pembentukan *primer-dimers* dan konsentrasi yang terlalu rendah dapat mempengaruhi efisiensi amplifikasi.[49] Pada penelitian ini didapatkan kosentrasi optimal *primer forward* dan *reverse* sebesar 0,2 µM. Konsentrasi ini juga digunakan pada penelitian yang dilakukan oleh Martinez dkk.[22,43] Terdapat perbedaan konsentrasi *primer* yang digunakan pada penelitian yang dilakukan oleh Lini dkk.,[21] Kramme dkk.,[50] dan Martinez dkk.[20] yaitu masing-masing sebesar 0,9 , 0,4 dan 0,3 µM. Perbedaan ini disebabkan karena perbedaan mesin PCR, metode PCR, enzim yang digunakan, total volume reaksi dan kondisi dari *real-time* PCR.

Selain dilakukan optimasi konsentrasi *primer*, penelitian ini juga melakukan optimasi konsentrasi *probe*. Konsentrasi *probe* optimal yang didapatkan adalah sebesar 0,2 µM. Konsentrasi ini berbeda dengan yang digunakan pada penelitian-penelitian sebelumnya.[20,22,43,50] Pada penelitian ini digunakan metode *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan. Terdapat metode *probe* lain yang sering digunakan pada uji *real-time* PCR yaitu *molecular beacon* dan *FRET hybridization probes*.[23] Sama halnya dengan *primer*, *probe* yang baik harus bersifat spesifik. Keunggulan dari uji *real-time* berbasis *probe* adalah bersifat sensitif dan spesifik.[23] Penggunaan *probe* sebagai marker dinilai lebih spesifik dibandingkan dengan *SYBR green*.

Penentuan volume elusi DNA atau uji inhibitor bertujuan untuk meminimalkan pengaruh inhibitor yang dapat mempengaruhi hasil dari *real-time* PCR. Larutan buffer elusi yang digunakan pada tahap akhir ekstraksi DNA berfungsi untuk

menyingkirkan DNA yang terkumpul pada dasar kolom sehingga menghasilkan DNA yang bebas inhibitor. Berdasarkan uji ini, volume optimal elusi dari spesimen kerokan jaringan kulit cuping telinga adalah 50 µl dan lesi kulit adalah 40 µl. Pada volume elusi yang lebih kecil, hasil TaqMan *real-time* PCR menunjukkan hasil amplifikasi yang rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya inhibitor yang terdapat pada hasil ekstraksi. Sedangkan pada volume elusi DNA yang lebih besar dari volume optimal akan menghasilkan uji TaqMan *real-time* PCR yang tidak efisien. Hal ini disebabkan karena konsentrasi DNA yang semakin rendah akibat dari volume elusi yang besar.

Ambang batas minimal deteksi atau sensitivitas berdasarkan konsentrasi DNA pada uji TaqMan *real-time* PCR ini mencapai 11 bakteri *M. leprae*. Penelitian yang dilakukan oleh Kramme dkk.[50] menunjukkan ambang batas minimal deteksi DNA *M. leprae* dengan menggunakan uji *real-time* PCR berbasis *probe* sekitar 194 bakteri *M. leprae* per sampel klinis, dengan gen target yang berbeda yaitu antigen yang kaya akan proline. Yoon dkk.[42] menyatakan uji PCR dengan metode konvensional yang mengamplifikasi gen *groEL* didapatkan ambang batas minimal deteksi DNA sekitar 20 bakteri *M. leprae.* Dari penelitian yang dilakukan oleh Martinez dkk.,[43] yang membandingkan uji RT-PCR menggunakan gen target *sodA* mRNA dan 16s rRNA disimpulkan bahwa sensitivitas RT-PCR dengan menggunakan gen target 16s rRNA lebih baik yaitu 30 bakteri *M. leprae* dibandingkan dengan gen target sodA mRNA dengan ambang batas deteksi sebesar 300 bakteri *M. leprae*. Hasil sensitivitas pada penelitian yang dilakukan oleh Yan dkk.[5] dengan menggunakan metode *nested*-PCR mencapai 3 bakteri *M. leprae*. Penelitian tersebut menggunakan gen target yang sama yaitu RLEP tetapi dengan sekuens *primer* dan *probe* yang berbeda. Hal ini disebabkan metode *nested*-PCR yang digunakan mampu meningkatkan kemampuan deteksi dan efisiensi amplifikasi.[36] Metode *nested*-PCR ini dapat digunakan sebagai uji konfirmasi untuk mendeteksi *M. leprae* pada MH PB yang sensitif dan spesifik, walaupun metode ini rentan untuk terjadinya kontaminasi produk PCR pada amplifikasi tahap berikutnya dari *nested*-PCR.[5]

Kondisi reaksi uji *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan yang dioptimasi dalam penelitian ini diuji spesifisitasnya (reaksi silang) terhadap patogen lain yang berpotensi menyebabkan hasil positif palsu. Mikroorganisme yang diuji adalah *Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus viridans, Candida sp., Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, virus Herpes Simpex dan virus Varicella Zooster. Berdasarkan hasil uji spesifisitas, uji TaqMan *real-time* PCR yang dioptimasi dalam penelitian ini tidak bereaksi silang dengan mikroorganisme tersebut diatas. Selain itu, berdasarkan hasil sekuensing yang dilakukan pada MH MB tipe LL, yang dipakai sebagai kontrol positif, menunjukkan bahwa sekuens DNA yang diperoleh hanya sekuens *primer reverse*. Hal ini dikarenakan produk amplifikasi berukuran sangat kecil yaitu 70 bp, sehingga tidak memungkinkan mendapatkan keseluruhan sekuens gen target. Hasil sekuensing ini menunjukkan produk yang diamplifikasi tersebut merupakan produk amplifikasi *primer* yang digunakan pada penelitian ini. Berdasarkan analisis yang dilakukan pada *gene bank*, *primer* ini tidak bereaksi silang dengan bakteri-bakteri lain (lihat Lampiran 6).

5.3 Uji TaqMan *Real-time* PCR pada Spesimen Klinis

Hasil uji TaqMan *real-time* PCR pada spesimen kerokan jaringan kulit pada cuping telinga hanya memberikan hasil positif sebesar 20,8%. Sedangkan hasil uji TaqMan *real-time* PCR yang positif dengan menggunakan spesimen kerokan jaringan kulit pada lesi kulit sebesar 25%. Positivitas hasil yang sama rendahnya ini bisa disebabkan karena teknik pengambilan kerokan jaringan kulit baik dari cuping telinga dan lesi kulit dilakukan dengan cara insisi sampai kedalaman hanya sekitar 2 mm, sedangkan bakteri *M. leprae* berada pada jaringan dermis dekat saraf. Positivitas hasil TaqMan *real-time* PCR pada spesimen kerokan jaringan kulit dari cuping telinga sedikit lebih rendah dibandingkan dari lesi kulit. Hal ini bisa disebabkan karena kulit cuping telinga yang lebih tipis sehingga pengambilan spesimen kerokan jaringan kulit pada cuping telinga relatif lebih superfisial. Positivitas hasil yang diperoleh pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Turankar dkk.[44] dengan metode PCR konvensional yang membandingkan beberapa gen target, yaitu RLEP, 16s rRNA, *SodA* dan rpoT

pada pasien MH dengan IB negatif. Positivitas uji PCR pada sampel kerokan jaringan kulit dengan menggunakan gen-gen target tersebut secara berturut-turut sebesar 30%, 17%, 7% dan 10%. Penelitian yang dilakukan oleh Wichitwechkarn dkk.[25] juga menunjukkan positivitas hasil PCR yang sama. Penelitian tersebut juga dilakukan pada pasien MH PB dengan BTA negatif dan hasil positif didapatkan sebesar 20%. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Sharma dkk.[51] yang menggunakan metode *real-time* RT-PCR didapatkan hasil positif pada spesimen kerokan jaringan kulit dengan BTA negatif sebesar 32,14%. Metode RT-PCR dikenal sebagai metode yang cepat dan sensitif untuk mendeteksi RNA *M. leprae.* Metode ini hanya mendeteksi organisme yang hidup dengan kemampuan deteksi mencapai 1 sel *M. leprae* per sampel klinis.[51]

Positivitas hasil TaqMan *real-time* PCR pada spesimen kerokan jaringan kulit (gabungan dari cuping telinga dan lesi kulit) sebesar 41,7%. Hasil uji TaqMan *real-time* PCR pada spesimen jaringan biopsi kulit dengan hasil positif mencapai 95,8%. Hasil uji TaqMan *real-time* PCR pada spesimen jaringan biopsi kulit memberikan hasil positif kurang lebih 2 kali lipat lebih tinggi dibandingkan pada spesimen kerokan jaringan kulit (gabungan cuping telinga dan lesi kulit). Pengambilan jaringan kulit dengan cara biopsi akan mencapai semua bagian lapisan kulit sehingga kepadatan basil pada jaringan akan lebih tinggi dibandingkan pada kerokan jaringan kulit yang pengambilannya hanya sampai lapisan dermis. Karena kepadatan basil yang lebih tinggi pada jaringan, jumlah DNA yang diekstraksi juga lebih banyak. Perbedaan positivitas hasil yang mencapai 2 kali lipat ini sama dengan studi-studi sebelumnya oleh Kampirapap dkk.[24] dan Wichitwechkarn dkk.[25] dengan menggunakan metode PCR konvensional. Faktor yang dapat mempengaruhi hasil positif uji TaqMan *real-time* PCR pada spesimen kerokan jaringan kulit seperti kedalaman goresan saat pengambilan spesimen sudah diminimalisir karena pengambilan spesimen kerokan jaringan kulit dilakukan oleh 1 orang teknisi laboratorium yang sama yang terlatih sehingga kedalaman goresan saat pengambilan spesimen sama pada semua subyek penelitian.

Hasil TaqMan *real-time* PCR pada spesimen jaringan biopsi kulit dengan hasil positif sebesar 95,8%. Hanya 1 sampel (4,2%) yang memberikan hasil negatif pada

uji TaqMan *real-time* PCR. Hasil pemeriksaan PA pada 1 sampel tersebut menunjukkan bukan MH. Gejala klinis yang didapatkan pada sampel yang negatif tersebut juga tidak khas MH, yaitu berupa lesi hipopigmentasi dengan anestesi yang tidak begitu jelas tanpa disertai dengan pembesaran atau penebalan saraf tepi dan BTA negatif sesuai dengan kriteria inklusi. Berdasarkan gejala klinis, pemeriksaan mikroskopis, pemeriksaan PA dan TaqMan *real-time* PCR dapat disimpulkan bahwa kelainan kulit pada 1 sampel tersebut bukan disebabkan oleh *M. leprae.* Hasil ini menunjang studi sebelumnya yang menyatakan bahwa spesifisitas dari *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan baik, sehingga mampu menyingkirkan lesi kulit yang tidak disebabkan oleh *M. leprae*. Selain bukan disebabkan oleh infeksi *M. leprae*, hasil pemeriksaan yang negatif pada 1 sampel tersebut bisa disebabkan oleh lokasi pengambilan spesimen jaringan yang tidak tepat, sehingga pada spesimen tersebut tidak mengandung bakteri *M. leprae* atau jumlahnya yang sangat sedikit sehingga tidak terdeteksi pada pemeriksaan PA atau TaqMan *real-time* PCR.

Terdapat 16,6% hasil TaqMan *real-time* PCR yang positif tapi pada pemeriksaan PA menunjukkan hasil bukan MH. Hal ini bisa juga disebabkan karena kelainan kulit pada MH, terutama tipe PB, banyak menyerupai kelainan kulit yang disebabkan oleh penyakit kulit lainnya, sehingga gambaran secara histopatologis pada pemeriksaan PA yang diperoleh juga hampir sama. Hasil ini membuktikan bahwa uji TaqMan *real-time* PCR bersifat spesifik, sehingga mampu menyingkirkan kelainan kulit yang disebabkan oleh penyakit kulit lainnya.

Hasil pemeriksaan PA menunjukkan hasil positif MH sebesar 79,2%. Perbedaan positivitas antara hasil TaqMan *real-time* PCR dan pemeriksaan PA yang diperoleh pada penelitian ini hampir sama dengan yang didapatkan pada penelitian Dayal dkk.[6] Pada penelitian tersebut dilakukan perbandingan positivitas antara pemeriksaan PA dan PCR. Penelitian dilakukan pada pasien MH tipe MB dan PB dengan hasil PA yang tidak spesifik. Hasilnya menunjukkan PCR mampu meningkatkan diagnosis sebesar 15% dibandingkan pemeriksaan PA. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan hasil positif antara pemeriksaan PA dan TaqMan *real-time* PCR sebesar 16,6%. Hal ini menunjukkan pemeriksaan *real-time*

PCR berbasis *probe* TaqMan mampu meningkatkan diagnosis sebesar 16,6% dibandingkan pemeriksaan biopsi-PA.

Perbedaan hasil positif yang diperoleh juga dapat dipengaruhi oleh lama pengobatan yang telah didapatkan pasien. Pengobatan dengan *multidrug therapy* (MDT) akan mendegradasi basil lalu basil tersebut akan mati. Uji PCR yang bersifat sangat sensitif akan mendeteksi organisme yang mati tersebut selain mendeteksi basil yang hidup.

Risiko kontaminasi yang mungkin terjadi pada tahap pengerjaan TaqMan *real-time* PCR sudah diminimalisir. Potensi kontaminasi bisa terjadi mulai dari saat ekstraksi spesimen sampai tahap pengerjaan TaqMan *real-time* PCR. Pada tahap ekstraksi, pengerjaan ekstraksi spesimen dilakukan untuk masing-masing subyek penelitian, maksimal dilakukan dari 2 subyek penelitian yang berbeda pada 1 kali ekstraksi, sehingga potensi kontaminasi DNA pada sampel yang diambil dari subyek penelitian yang satu dengan sampel yang diambil dari subyek penelitian yang lain minimal. Pada tahap pengerjaan TaqMan *real-time* PCR untuk menguji sampel, selalu menggunakan kontrol positif dan kontrol negatif.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, uji TaqMan *real-time* PCR mampu meningkatkan kemampuan diagnosis yang dimiliki oleh pemeriksaan konvensional lain seperti pemeriksaan mikroskopis, histopatologis dan serologis. Oleh karena itu, diharapkan pemeriksaan TaqMan *real-time* PCR dapat menjadi pilihan utama pemeriksaan penunjang diagnosis terutama pada kusta PB dengan gejala klinis yang meragukan dan pemeriksaan BTA yang negatif.

5.4 Keterbatasan Penelitian

- Optimasi dilakukan hanya menggunakan spesimen kerokan jaringan kulit dari pasien yang terdiagnosis MH tipe LL.

  Hal ini disebabkan karena terdapat keterbatasan dalam hal dana penelitian. Pada tahap optimasi dibutuhkan jaringan biopsi yang cukup banyak, sehingga tidak dimungkinkan untuk melakukan optimasi menggunakan spesimen jaringan biopsi kulit.

- Kontrol positif diambil dari sampel klinis pasien MH tipe LL. Sekuens DNA yang diperoleh hanya sekuens *primer reverse* karena produk amplifikasi berukuran sangat kecil (70 bp), sehingga tidak memungkinkan mendapatkan keseluruhan sekuens. Namun demikian hasil sekuens yang diperoleh menunjukkan produk yang diamplifikasi tersebut merupakan produk hasil amplifikasi primer yang digunakan pada penelitian ini. Selain itu sudah dilakukan juga uji spesifisitas baik spesifisitas *primer* yang digunakan dan uji reaksi silang terhadap beberapa mikroorganisme lain yang berpotensi memberikan hasil positif palsu.
- Hampir seluruh spesimen diambil dari pasien yang sudah diobati.

BAB 6
KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Pemeriksaan untuk deteksi *M. leprae* menggunakan uji *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan diperoleh dengan kondisi optimal pada suhu *annealing* 55°C, konsentrasi *primer* 0,2 µM, konsentrasi *probe* 0,2 µM dengan kondisi suhu aktivasi enzim pada 95°C selama 3 menit; 45 siklus pada 95°C selama 15 detik (denaturasi) dan 55°C selama 1 menit (*annealing* dan ekstensi).
2. Ambang batas deteksi *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan untuk mendeteksi jumlah DNA minimal *M. leprae* adalah 11 bakteri *M.leprae*. Hasil uji spesifitas teknik (reaksi silang) dari TaqMan *real-time* PCR ini tidak menunjukkan adanya reaksi silang dengan mikroorganisme *Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus viridans, Candida sp., Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, virus Herpes Simpex dan virus Varicella Zooster.
3. Pada spesimen kerokan jaringan kulit dengan BTA negatif, proporsi positif hasil pemeriksaan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan pada kerokan jaringan kulit cuping telinga sebesar 20,8%, pada kerokan jaringan kulit dari lesi sebesar 25% dan pada gabungan kerokan jaringan kulit sebesar 41,7%. Sedangkan proporsi positif hasil pemeriksaan TaqMan *real-time* PCR dari jaringan biopsi kulit lebih besar dibandingkan dari kerokan jaringan kulit, yaitu sebesar 95,8%.
4. Proporsi positif hasil pemeriksaan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan pada spesimen jaringan biopsi kulit sebesar 95,8% sedangkan proporsi positif pemeriksaan PA dengan hasil MH sebesar 79,2%. Pemeriksaan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan mampu meningkatkan diagnosis sebesar 16,6% dibandingkan pemeriksaan PA.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan sosialisasi pada klinisi sehingga pemeriksaan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan dapat digunakan untuk mendeteksi *M. leprae* terutama pada kasus MH tipe PB dengan BTA negatif dan pemeriksaan PA tidak sesuai dengan gambaran MH. Pengiriman spesimen yang dianjurkan adalah jaringan biopsi kulit.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan uji TaqMan *real-time* PCR secara kuantitatif untuk pemantauan hasil terapi dan resistensi obat dengan metode genotipik.
3. Pemeriksaan TaqMan *real-time* PCR dapat digunakan sebagai alat deteksi yang lebih sensitif untuk mendeteksi *M. leprae* terutama pada kasus MH tipe PB dengan BTA negatif. Walaupun relatif lebih mahal dibandingkan pemeriksaan PA, pemeriksaan *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan ini memiliki sensitivitas yang lebih tinggi secara klinis dan waktu yang dibutuhkan untuk melakukan pemeriksaan yang lebih cepat. Namun demikian perlu dilakukan uji dengan jumlah sampel yang lebih besar, yang membandingkan sensitivitas TaqMan *real-time* PCR pada pasien yang belum dan yang sudah mendapat pengobatan untuk mengetahui apakah juga akan memberikan hasil positif yang sama dengan yang didapat pada penelitian ini.
4. Uji *real-time* PCR berbasis *probe* TaqMan pada spesimen jaringan biopsi kulit memberikan hasil positif lebih dari 2 kali lipat lebih tinggi dibandingkan pada spesimen kerokan jaringan kulit, karena kepadatan basil yang lebih tinggi pada spesimen jaringan biopsi kulit. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang membandingkan kesesuaian hasil positif TaqMan *real-time* PCR antara ukuran spesimen jaringan biopsi kulit dengan kedalaman dan banyaknya kerokan jaringan kulit yang diambil.

DAFTAR PUSTAKA

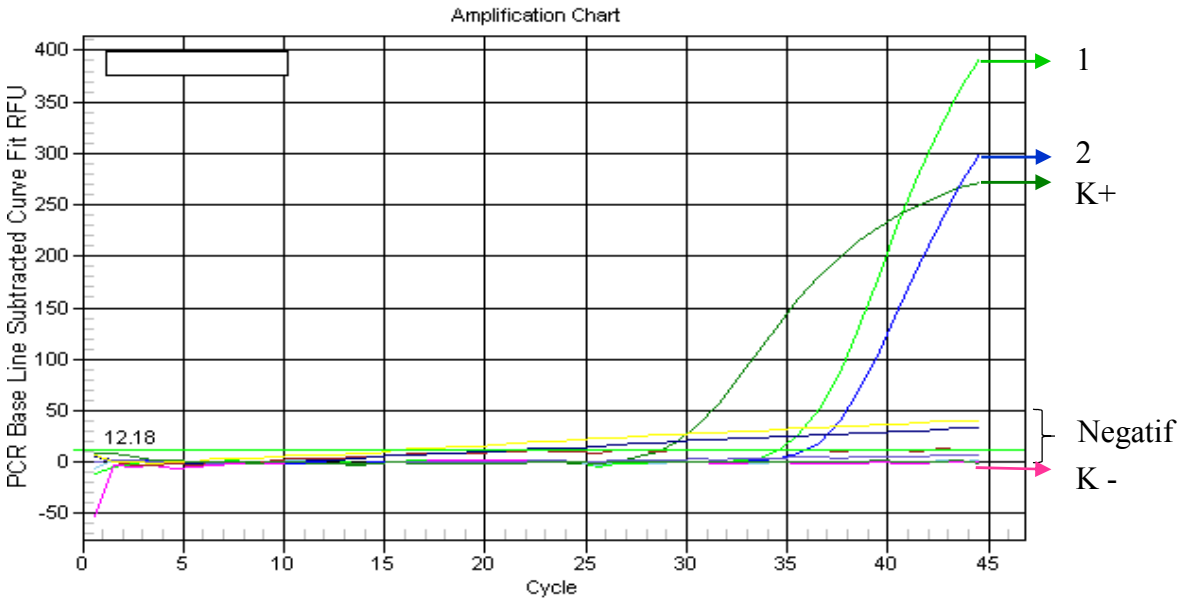
1. Global leprosy update, 2013 : reducing disease burden. Geneva: World Health Organization, 2014.
2. Profil pengendalian penyakit dan penyehatan lingkungan: Direktorat jenderal pengendalian penyakit dan penyehatan lingkungan; 2015.
3. Rea TH, Modlin RL. Leprosy. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 7 ed. New York: the McGraw-Hill companies; 2008. p. 1786-96.
4. Pedoman nasional program pengendalian penyakit kusta. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan 2012.
5. Yan W, Xing Y, Yuan LC, Yang RD, Tan FY, Zhang Y, et al. Application of RLEP real-time PCR for detection of *M. leprae* DNA in paraffin-embedded skin biopsy specimens for diagnosis of paucibacillary leprosy. Am J Trop Med Hyg. 2014;90:524-9.
6. Dayal R, Singh S, Mathur P, Katoch V, Katoch K, Natrajan M. Diagnostic value of in situ polymerase chain reaction in leprosy. Indian J Pediatr. 2005;72:1043-6.
7. Novianto E. Proporsi kepositivan PCR DNA *Mycobacterium leprae* pada permukaan lesi kulit pasien kusta multibasilar yang belum mendapat pengobatan. Jakarta: University of Indonesia; 2008.
8. Goulart IMB, Goulart LR. Leprosy : diagnostic and control challanges for a worldwide disease. Arch Dermatol Res. 2008.
9. Torres P, Camarena J, Gomez J, Nogueira J, Gimeno V, Navarro J, et al. 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. Lepr Rev. 2003;74:18-30.
10. Renault CA, Ernst JD. *Mycobacterium leprae* (leprosy). In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 1. 8 ed: Elsevier Saunders; 2015.
11. Lastoria JC, Abreu MAMMd. Leprosy : a review of laboratory and therapeutic aspects - part 2. An Bras Dernatol. 2014;89:389-403.
12. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis : from laboratory to the clinic. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(4):e2655.
13. Parkash O. Serological detection of leprosy employing *Mycobacterium leprae* derived serine-rich 45 kDa, ESAT-6, CFP-10 and PGL-I : a compilation of data from studies in Indian populations. Lepr Rev. 2011;82:383-8.
14. Kamal R, Natrajan M, Katoch K, Katoch V. Evaluation of diagnostic role of in situ PCR on slit skin smears in pediatric leprosy. Indian J Lepr. 2010;82:195-200.
15. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity a five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1966;34:255-73.

16. Kumar B, Dogra S. Leprosy : a disease with diagnostic and management challanges ! Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2009;75(2):111-5.
17. Dayal R, Agarwal M, Natrajan M, Katoch VM, Katoch K, Singh K, et al. PCR and in-situ hybridization for diagnosis of leprosy. Indian J Pediatr. 2007;74:645-8.
18. Job CK, Jayakumar J, Williams DL, Gillis TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. Int J Lepr. 1997;65:461-4.
19. Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, Sittiwakin T, Likanonsakul S, Pasadorn S, et al. LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;54:263-70.
20. Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of real-time PCR and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. J Clin Microbiol. 2006;44(9):3154-9.
21. Lini N, Shankernarayan NP, Dharmalingam K. Quantitative real-time PCR analysis of *Mycobacterium leprae* DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases. J Med Microbiol. 2009;58:753-9.
22. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(10):e1354.
23. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology : application for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):165-256.
24. Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriyawipart S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. Int J Lepr. 1997;66(1):16-21.
25. Wichitwechkarn J, Karnjan S, Shuntawuttisettee S, Sornprasit C, Kampirapap K, Peerapakorn S. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. J Clin Microbiol. 1995;33(1):45-9.
26. Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. JID. 2006;193:346–53.
27. Walker SL, Withington SG, Lockwood DNJ. Leprosy. In: Farrar J, Hotez P, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ, editors. Manson's Tropical Diseases. 23 ed: Saunders Elsevier; 2014. p. 506-18.
28. Bhat RM, Prakash C. Leprosy : an overview of pathophysiology. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2012.
29. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. The Lancet. 2004;363:1209-19.
30. James WD, Berger T, Dirk, Elston. Hansen's disease. Andrews' Diseases of the Skin clinical dermatology 11 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 334-44.
31. WHO expert committee on leprosy 8th report. Geneva: World Health Organization, 2012.

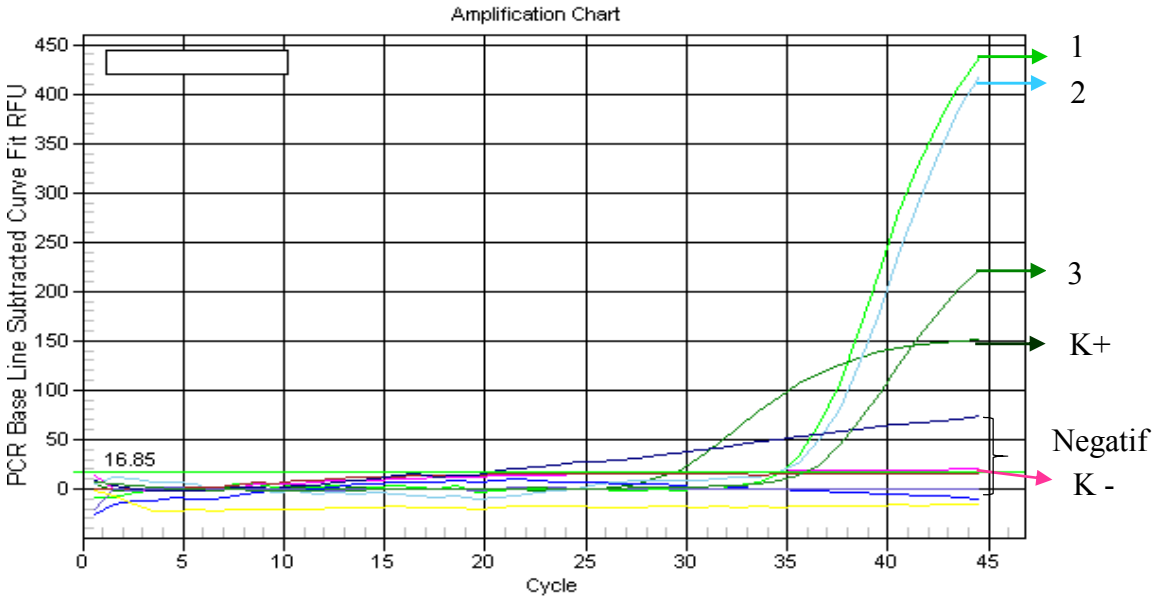
32. Soto A, Munoz PT. Leprosy diagnosis : an update on the use of molecular tools lucrecia. Mol Biol. 2015;4(4):139.
33. Rahman M, Uddin M, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase chain reaction (PCR) : a short review. AKMMC J 2013;4(1):30-6.
34. Pusterla N, Madigan JE, Leutenegger CM. Real-time polymerase chain reaction : a novel molecular diagnostic tool for equine infectious diseases. J Vet Intern Med. 2006;20:3-12.
35. McPherson M, Moller S. PCR. 2 ed. New York: Taylor & Francis Group; 2006.
36. Sachse K. Specificity and performance of diagnostic PCR assays. In: Sachse K, Frey J, editors. PCR detection of microbial pathogens. 216. Totowa New Jersey: Humana Press; 2003.
37. Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Supapkul P, Wachapong S, Mahotarn K, Brennan PJ. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;48:319-28.
38. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-time PCR. In: Gallagher SR, Wiley EA, editors. Current protocols essential laboratory techniques: John Wiley & Sons, Inc.; 2008.
39. Atlas kusta. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia 2013.
40. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhi JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(11):e328.
41. Fandinho FC, Orsi-Souza AT, Salem JI. A comparison of the Ziehl-Neelsen and Kinyoun methods in staining smears from leprosy patients. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1990;58(2):389-91.
42. Han YK, Nae CS, Kyeong LM, Abalos RM, Cellona RV, Jr TTF, et al. Evaluatin of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. J Clin Microbiol. 1993;31(3):895-9.
43. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. J Clin Microbiol. 2009;47(7):2124-30.
44. Turankar RP, Pandey S, Lavania M, Singh I, Nigam A, Darlong J, et al. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16s rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples. Int J Mycobacteriol. 2015;4:54-9.
45. Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. J Clin Lab Anal. 2009;23:145-51.
46. Goulart IMB, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. Arch Dermatol Res. 2007;299:267-71.
47. Kang TJ, Kim SK, Lee SB, Chae GT, Kim JP. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. Clin Exp Dermatol. 2003;28:420-4.

48. Pelt-Verkuil Ev, Belkum Av, Hays JP. Important considerations for typical, quantitative and real-time PCR protocols. In: Pelt-Verkuil Ev, Belkum Av, Hays JP, editors. Principles and technical aspects of PCR amplification. Netherland: Springer Science; 2008. p. 119-39.
49. Grunenwald H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. In: Bartlett JMS, Stirling D, editors. Methods in molecular biology : PCR protocols. 226. 2 ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2003. p. 89-99.
50. Kramme S, Bretzel G, Panning M, Kawuma J, Drosten C. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. Med Microbiol Immunol. 2004;193:189-93.
51. Sharma R, Lavania M, Katoch K, Chauhan D, Gupta A, Gupta U, et al. Development and evaluation of real-time RT-PCR assay for quantitative estimation of viable *Mycobacterium leprae* in clinical samples. Indian J Lepr. 2008;80:315-21.

Lampiran 1. Gambar hasil TaqMan *real-time* PCR yang diujikan pada sampel

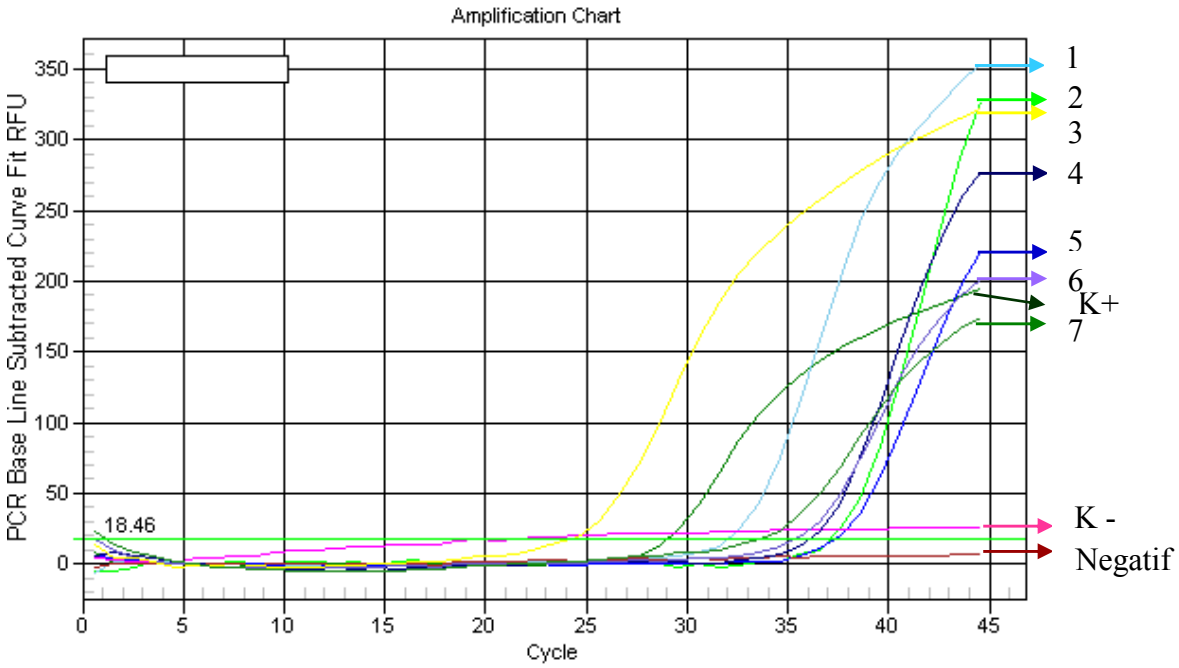


Gambar 1. Hasil TaqMan *real-time* PCR yang diujikan pada 8 sampel kerokan jaringan kulit cuping telinga. Gambaran kurva sigmoid merupakan hasil positif *M. leprae* (1 dan 2). Hasil negatif ditunjukkan pada kurva yang tidak memberikan gambaran sigmoid.



Gambar 2. Hasil TaqMan *real-time* PCR yang diujikan pada 8 sampel kerokan jaringan kulit lesi kulit. Gambaran kurva sigmoid merupakan hasil positif *M. leprae* (1, 2 dan 3). Hasil negatif ditunjukkan pada kurva yang tidak memberikan gambaran sigmoid.

(lanjutan)



Gambar 3. Hasil TaqMan *real-time* PCR yang diujikan pada 8 sampel jaringan biopsi kulit. Gambaran kurva sigmoid merupakan hasil positif *M. leprae* (1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 7). Hasil negatif ditunjukkan pada kurva yang tidak memberikan gambaran sigmoid.

Lampiran 2. Penjelasan penelitian

PENJELASAN MENGENAI PENELITIAN

"Pengembangan Uji *Real-Time* PCR Berbasis Probe TaqMan Untuk Mendeteksi *Mycobacterium leprae* pada Kusta Pausibasilar"

Tim peneliti di bagian Mikrobiologi FKUI/RSCM Jakarta sedang melakukan penelitian untuk mengembangkan uji diagnostik yang akan digunakan untuk pemeriksaan penunjang untuk mendeteksi kuman *Mycobacterium leprae* (kuman penyebab penyakit kusta) pada kasus kusta pausibasilar (kusta tahap awal). Data ini sangat penting untuk penegakkan diagnosis oleh dokter pada kasus kusta pausibasilar tersebut, guna mempercepat pemberian terapi oleh dokter dan mencegah terjadinya kecacatan menetap pada penderita kusta.

Anda menderita penyakit kusta yang dimaksud dan oleh karena itu diminta untuk ikut serta dalam penelitian ini. Hasil pemeriksaan yang dilakukan dapat membantu penegakkan diagnosis penyakit kusta yang tanda alami dan dapat digunakan untuk menentukan pemberian obat yang tepat dan sesuai untuk mengobati penyakit anda.

Bila bersedia ikut, dokter atau teknisi laboratorium dibawah pengawasan dokter akan mengambil kerokan jaringan kulit dan jaringan kulit yang sakit. Pengambilan kerokan jaringan kulit dilakukan pada 4 tempat yaitu cuping telinga kanan dan kiri, dan 2 daerah kulit lain yang terkena. Pada kelainan kulit tersebut akan dilakukan pembedahan kecil dengan bius lokal untuk mengambil sedikit (sebesar biji semangka) jaringan kulit yang sakit dan untuk menutup luka akan dilakukan penjahitan dan pemberian antibiotik.

Pengambilan bahan pemeriksaan ini mempunyai resiko nyeri yang ringan dan infeksi, tetapi karena dikerjakan oleh tenaga yang terlatih kemungkinan tersebut kecil. Bapak/Ibu akan dibebaskan dari biaya pemeriksaan mikrobiologi di laboratorium.

Semua data penelitian ini akan diperlakukan secara rahasia, tidak akan diberitahukan kepada pihak lain (yang tidak berhubungan dengan pelayanan kesehatan).

Keikutsertaan dalam penelitian ini bersifat sukarela, tanpa adanya paksaan. Sekiranya tidak berkenan, Bapak/Ibu dapat menolak tanpa mempengaruhi pelayanan kesehatan yang diberikan.

Bapak/Ibu diberi kesempatan untuk menanyakan semua hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini. Bila sewaktu-waktu Bapak/Ibu membutuhkan penjelasan, dapat menghubungi Dokter Arleen Devita di bagian Mikrobiologi FKUI/RSCM, Jl. Pegangsaan Timur No. 16, Jakarta. No HP 085881285438.

RSPUN Dr. Cipto Mangunkusumo

Jl. Diponegoro No.71 Jakarta 10430
T elp: (021) 3918301 Fax: (021) 3148991

NRM :
Nama :
Jenis Kelamin :
Tanggal Lahir :
(*Mohon diisi atau tempelkan stiker jika ada)*

FORMULIR PERSETUJUAN MENGIKUTI PENELITIAN (FORMULIR INFORMED CONSENT)

Peneliti Utama	: dr. Angky Budianti, SpMK
Pemberi informasi	: dr. Arleen Devita
Penerima informasi Nama Subyek Tanggal Lahir (Umur) Jenis Kelamin Alamat No. Telp (HP)	 : : : : :

	JENIS INFORMASI	ISI INFORMASI	TANDAI
1.	Judul Penelitian	Pengembangan Uji *Real-Time* PCR Berbasis Probe TaqMan Untuk Mendeteksi *Mycobacterium leprae* (kuman penyebab kusta) pada Kusta Pausibasilar (kusta tahap awal)	
2.	Tujuan Penelitian	Mengembangkan pemeriksaan laboratorium secara molekular dengan reaksi rantai polimerase atau lebih umum dikenal sebagai PCR (*Polymerase Chain Reaction*), yang merupakan teknik perbanyakan potongan DNA di laboratorium untuk mendeteksi *Mycobacterium leprae* (kuman penyebab kusta) pada kusta pausibasilar (kusta tahap awal) yang seringkali memberikan hasil negatif pada pemeriksaan BTA (merupakan pemeriksaan penunjang yang dipakai untuk deteksi kusta)	
3.	Cara dan Prosedur Penelitian	Pengambilan sampel penelitian dilakukan pada satu kali pertemuan. Sampel diambil dari semua pasien yang datang ke poliklinik kulit di rumah sakit	

Inisial Subyek _____

RSPUN Dr. Cipto Mangunkusumo

Jl. Diponegoro No.71 Jakarta 10430
T elp: (021) 3918301 Fax: (021) 3148991

NRM :
Nama :
Jenis Kelamin :
Tanggal Lahir :
(*Mohon diisi atau tempelkan stiker jika ada)*

		di Jakarta dan Tangerang yang sesuai dengan kriteria penelitian. Dilakukan pemeriksaan terlebih dulu mulai dari tanya jawab dokter-pasien dan pemeriksaan fisik. Pasien dengan diagnosis kusta pausibasilar akan diambil spesimennya berupa kerokan jaringan kulit dari 4 tempat (dengan cara dilakukan irisan pada kulit sepanjang 5 mm dan kedalaman 2 mm) dan pada kelainan kulit akan dilakukan pembedahan kecil dengan bius lokal untuk mengambil sedikit (sebesar biji semangka) jaringan kulit yang sakit dan untuk menutup luka akan dilakukan penjahitan dan pemberian antibiotik. Spesimen kerokan jaringan kulit tersebut dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Klinik FKUI untuk diperiksa secara mikroskopik dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen untuk melihat bakteri basil tahan asam (BTA). Spesimen dengan hasil BTA yang negatif kemudian akan dilakukan uji *real-time* PCR (*Polymerase Chain Reaction)* berbasis probe TaqMan untuk mendeteksi *Mycobacterium leprae* (kuman penyebab kusta) dan dilakukan pula pemeriksaan terhadap jaringan kulit yang diambil tersebut. Bapak/ibu berhak untuk memutuskan apakah bersedia untuk disertakan dalam penelitian atau menolak apabila tidak bersedia.	
4.	Jumlah subyek	Jumlah subyek yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah 26 orang positif kusta pausibasilar secara klinis dan pemeriksaan mikroskopik. Sampel diambil dari semua pasien yang datang ke poliklinik kulit rumah sakit di Jakarta dan Tangerang yang didiagnosis kusta pausibasilar.	

RSPUN Dr. Cipto Mangunkusumo

Jl. Diponegoro No.71 Jakarta 10430
T elp: (021) 3918301 Fax: (021) 3148991

NRM :
Nama :
Jenis Kelamin :
Tanggal Lahir :
(*Mohon diisi atau tempelkan stiker jika ada)*

5.	Waktu Penelitian	Penelitian dilakukan selama 1 tahun. Bahan pemeriksaan diambil mulai Juni 2015 – Mei 2016	
6.	Manfaat Penelitian termasuk manfaat bagi subyek penelitian	Menemukan metode uji diagnostik baru untuk deteksi dan identifikasi *Mycobacterium leprae* (kuman penyebab kusta) pada kasus kusta pausibasilar, yang bersifat sensitif dan spesifik sehingga mempercepat diagnosis kusta pausibasilar dan diharapkan nantinya dapat mempercepat pemberian terapi dan mencegah terjadinya kecacatan. Terapi yang adekuat dapat memperpendek masa sakit dan mencegah penularan	
7.	Resiko & Efek samping dalam penelitian	Pengambilan sampel dari kerokan jaringan kulit dan jaringan kulit dikerjakan oleh dokter atau tenaga terlatih dibawah pengawasan dokter. Pengambilan kerokan jaringan kulit ini dapat menyebabkan nyeri yang ringan sekali sehingga tidak memerlukan pengobatan. Sedangkan untuk pengambilan jaringan kulit karena sebelumnya sudah diberikan bius lokal dan dilakukan penjahitan sesudahnya serta diberikan antibiotik, maka resiko infeksi dapat dihindarkan.	
8.	Ketidaknyamanan subyek penelitian (*potential discomfort*)	Pengambilan spesimen dari kerokan jaringan kulit dan jaringan kulit terkadang dapat menimbulkan nyeri yang bersifat ringan.	
9.	Kompensasi bila terjadi efek samping	Kompensasi bila timbul efek samping yang parah, dengan memberikan pertolongan sesuai protokol rumah sakit dan pasien bebas dari biaya yang diperlukan	
10.	Alternatif penanganan bila ada	Tidak ada	

Inisial Subyek _____

RSPUN Dr. Cipto Mangunkusumo

Jl. Diponegoro No.71 Jakarta 10430
T elp: (021) 3918301 Fax: (021) 3148991

NRM :
Nama :
Jenis Kelamin :
Tanggal Lahir :
(*Mohon diisi atau tempelkan stiker jika ada)*

11.	Penjagaan kerahasiaan data	Semua informasi tentang Bapak/Ibu akan dijaga kerahasiannya. Catatan medis Bapak/Ibu akan ditelaah dalam kerahasiaan yang ketat oleh mereka yang bekerja dalam penelitian ini, termasuk oleh para pemantau penelitian dan Komite Etik. Semua dokumen riset dan sampel akan diberi label menggunakan nomor studi. Nama Bapak/Ibu tidak akan dicantumkan/digunakan dengan cara apapun baik dalam pelaporan informasi, maupun publikasi apapun terkait penelitian ini.	
12.	Biaya yang ditanggung oleh subyek	Pasien dibebaskan dari biaya pemeriksaan laboratorium mikrobiologi	
13.	Insentif bagi subyek	Subyek diberikan informasi hasil pemeriksaan laboratorium mikrobiologi tanpa dikenai biaya apapun	
14.	Nama dan alamat peneliti serta nomor telepon yang dapat dihubungi	dr. Arleen Devita (HP. 085881285438) Departemen Mikrobiologi FKUI/RSUPNCM (Tel: 0213160491/2) No. Tlp. Komite Etik FKUI/RSUPNCM 081315873649	

Setelah mendengarkan penjelasan mengenai penelitian yang akan dilakukan oleh **dr. Angky Budianti, SpMK** dengan judul : **Pengembangan Uji Real-Time PCR Berbasis Probe TaqMan Untuk Mendeteksi *Mycobacterium leprae* pada Kusta Pausibasilar,** informasi tersebut telah saya pahami dengan baik.

Inisial Subyek _____

RSPUN Dr. Cipto Mangunkusumo

Jl. Diponegoro No.71 Jakarta 10430
T elp: (021) 3918301 Fax: (021) 3148991

NRM :
Nama :
Jenis Kelamin :
Tanggal Lahir :
(*Mohon diisi atau tempelkan stiker jika ada)*

Dengan menandatangani formulir ini, saya menyetujui untuk diikutsertakan dalam penelitian di atas dengan suka rela tanpa paksaan dari pihak manapun. Apabila suatu waktu saya merasa dirugikan dalam bentuk apapun, Saya berhak membatalkan persetujuan ini.

_____ _____
Tanda Tangan Subyek atau Cap Jempol Tanggal

_____
Nama Subyek

_____ _____
Tanda Tangan Saksi/Wali Tanggal

_____
Nama Saksi/Wali

Ket: Tanda tangan saksi/wali diperlukan bila subyek tidak bisa baca tulis, penurunan kesadaran, mengalami gangguan jiwa, dan berusia di bawah 18 tahun.

Saya telah menjelaskan kepada subyek secara benar dan jujur mengenai maksud penelitian, manfaat penelitian, prosedur penelitian, serta resiko dan ketidaknyamanan potensial yang mungkin timbul (penjelasan terperinci sesuai dengan hal yang Saya tandai di atas). Saya juga telah menjawab pertanyaan-pertanyaan terkait penelitian dengan sebaik-baiknya.

_____ _____
Tanda Tangan Peneliti Tanggal

_____
Nama Peneliti

Inisial Subyek _____

Lampiran 4. Formulir status pasien

STATUS PENELITIAN

Tanggal Pemeriksaan : No. Status Penelitian :

Nomor RM :

IDENTITAS

1. Nama lengkap :
2. Jenis kelamin :
3. Tanggal lahir/umur :
4. Agama :
5. Suku :
6. Pendidikan :
7. Pekerjaan :
8. Riwayat Pernikahan :
9. No telepon/HP:

KELUHAN UTAMA

1. Bercak hipopigmentasi/eritematosa, batas tegas, anestesi jelas

2. Pembesaran saraf tepi, dengan gangguan sensibilitas area yang dipersarafi

3. Riwayat penyakit sekarang :

4. Riwayat penyakit penyerta :

5. Riwayat pengobatan (termasuk riwayat terapi antibiotika) :

(lanjutan)

DATA KLINIS

1. Diagnosis kusta menurut klasifikasi WHO :
   MB.....(1)
   PB.....(2)

2. Diagnosis kusta menurut klasifikasi Ridley-Jopling :
   TT.....(1)
   BT.....(2)

3. Reaksi kusta :
   RR.....(1)
   ENL.....(2)
   Tanpa reaksi.....(3)

4. Hasil BTA (kerokan jaringan kulit)
   Cuping telinga kanan :
   Cuping telinga kiri :
   Lesi kulit aktif-1 :
   Lesi kulit aktif-2 :

   Bila terdapat salah satu hasil BTA (+), maka pasien tidak memenuhi kriteria untuk menjadi subyek penelitian.

HASIL PEMERIKSAAN HISTOPATOLOGI

Hasil pemeriksaan histopatologi dari jaringan biopsi lesi kulit
TT.....(1)
BT.....(2)
BB.....(3)
BL.....(4)
LL.....(5)
I.....(6)

HASIL PEMERIKSAAN TaqMan REAL-TIME PCR

Hasil TaqMan real-time PCR pada kerokan jaringan kulit :
Positif.....(1)
Negatif.....(2)
Hasil TaqMan real-time PCR pada jaringan biopsi lesi kulit :
Positif.....(1)
Negatif.....(2)

Komite Etik Penelitian Kesehatan
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo
Health Research Ethics Committee
Faculty of Medicine Universitas Indonesia
Cipto Mangunkusumo Hospital
Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430. Telp. 021-3157008. E-mail: ec_fkui@yahoo.com

Nomor : 393 /UN2.F1/ETIK/2015

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Pengembangan Uji Real-Time PCR Berbasis Probe TaqMan untuk Mendeteksi *Mycrobacterium Leprae* pada Lepra Pausibasilar".

Peneliti Utama : **dr. Angky Budianti, SpMK**
Principal Investigator

Nama Institusi : **Mikrobiologi FKUI**
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
And approved the above-mentioned protocol.

Jakarta 18 MAY 2015
Ketua
Chairman

Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan
**Peneliti berkewajiban
1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila
   a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
   b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP
All procedures of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure

Lampiran 6. Hasil uji spesifisitas *primer* menggunakan cara BLAST

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Mycobacterium leprae Br4923, complete genome sequence	38.2	1373	100%	0.76	100%	FM211192.1
Mycobacterium leprae cosmid B1170	38.2	38.2	100%	0.76	100%	U00010.1
Mycobacterium leprae cosmid L247	38.2	76.3	100%	0.76	100%	U00021.1
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 1/10	38.2	190	100%	0.76	100%	AL583917.1
Mycobacterium leprae cosmid B998 DNA sequence	38.2	38.2	100%	0.76	100%	L78829.1
Mycobacterium leprae cosmid B32 DNA sequence	38.2	38.2	100%	0.76	100%	L78818.1
Mycobacterium leprae cosmid B27 DNA sequence	38.2	76.3	100%	0.76	100%	L78817.1
Mycobacterium leprae cosmid B1723 DNA sequence	38.2	38.2	100%	0.76	100%	L78825.1
Mycobacterium leprae cosmid B13 DNA sequence	38.2	76.3	100%	0.76	100%	L78823.1
Mycobacterium leprae cosmid B1229 DNA sequence	38.2	38.2	100%	0.76	100%	L78812.1
Mycobacterium leprae cosmid L296	38.2	38.2	100%	0.76	100%	U15187.1
Mycobacterium leprae cosmid B1740	38.2	38.2	100%	0.76	100%	U15183.1
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 9/10	38.2	76.3	100%	0.76	100%	AL583925.1
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 10/10	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL583926.1
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 8/10	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL583924.1
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 7/10	38.2	228	100%	0.76	100%	AL583923.1
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 6/10	38.2	152	100%	0.76	100%	AL583922.1
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 5/10	38.2	343	100%	0.76	100%	AL583921.1
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 4/10	38.2	152	100%	0.76	100%	AL583920.1
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 3/10	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL583919.1

(lanjutan)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 2/10	38.2	114	100%	0.76	100%	AL583918.1
Mycobacterium leprae cosmid B1610	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL049913.1
Mycobacterium leprae cosmid L458	38.2	76.3	100%	0.76	100%	AL049478.1
Mycobacterium leprae cosmid B1222	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL049491.1
Mycobacterium leprae cosmid B596	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL035472.1
Mycobacterium leprae cosmid B12	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL035480.1
Mycobacterium leprae cosmid B2533	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL035310.1
Mycobacterium leprae cosmid B1450	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL035159.1
Mycobacterium leprae cosmid B1243	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AL023635.1
Mycobacterium leprae cosmid B2548	38.2	76.3	100%	0.76	100%	AL023093.1
Mycobacterium leprae cosmid B628	38.2	76.3	100%	0.76	100%	Y14967.1
Mycobacterium leprae cosmid B22	38.2	76.3	100%	0.76	100%	Z98741.1
Mycobacterium leprae cosmid L383	38.2	38.2	100%	0.76	100%	Z97179.1
Mycobacterium leprae cosmid B1351	38.2	38.2	100%	0.76	100%	Z95117.1
M.leprae aceA gene for isocitrate lyase	38.2	76.3	100%	0.76	100%	Z46257.1
Mycobacterium leprae cosmid L222 DNA sequence, 27 CDS features	38.2	38.2	100%	0.76	100%	L39923.1
Mycobacterium leprae cosmid B2126	38.2	38.2	100%	0.76	100%	U00017.1
Mycobacterium leprae cosmid B1177	38.2	38.2	100%	0.76	100%	U00011.1
M.leprae 65 kd antigen, complete cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	M14341.1
M. leprae repetitive element, RLEP4	38.2	38.2	100%	0.76	100%	X17152.1
M. leprae repetitive element, RLEP3	38.2	38.2	100%	0.76	100%	X17153.1
M. leprae repetitive element, RLEP2	38.2	38.2	100%	0.76	100%	X17151.1

Lampiran 7. Data klinis pasien

No	No Pasien	Inisial Nama	Umur	Jenis Kelamin	Diagnosis	Baru/Lama (terapi)	BTA				Antomi Lesi Kulit	Hasil PCR			Hasil Biopsi	Klinis
							CT ka	CT ki	LK1	LK2		CT	LK	Jaringan		
1	1	Ny. AS	24	Pr	MH BT (PB)	L, 2 bln terapi	-	-	-	-	tungkai bawah kiri, punggung kaki lateral kiri	-	-	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, Pembesaran saraf tepi (-)
2	2a	Nn. A	25	Pr	MH BT	B	-	-	-	-	pipi kiri, dagu	+	-	+	Sesuai dengan MH tipe TT	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip, Pembesaran saraf tepi (+) N. ulnaris +/+
3	3	Tn. AP	19	Lk	MH BT (PB)	L, 1 bln terapi	-	-	-	-	paha kiri	-	-	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (-)
4	4a	Ny. DC	35	Pr	MH BT	B	-	-	-	-	lengan kanan atas 1, lengan kanan atas 2	-	+	+	Sesuai dengan MH BT	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip, Pembesaran saraf tepi (+) N. ulnaris +/+
5	5	Tn. M	42	Lk	MH BT (MB) + RR	L, 11 bulan terapi	-	-	-	-	lengan kanan, dada	+	+	+	Sesuai dengan MH tipe LL	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, Pembesaran saraf tepi (+) N. ulnaris +/+ dan N. peroneus komunis +/+
6	6a	Tn. SAR	20	Lk	MH BT	B	-	-	-	-	punggung 1, punggung 2	+	-	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (-)
7	7	Ny. S	53	Pr	MH BT	B	-	-	-	-	dahi, pipi kiri	-	-	-	Hipopigmentasi pada inflamasi	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, pembesaran saraf tepi (-)
8	8c	Ny. T	37	Pr	MH BT (MB)	L, 6 bln terapi	-	-	-	-	lengan kanan, telapak tangan kiri	-	-	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, pembesaran saraf tepi (+) N. auricularis magnus sinistra, N. ulnaris +/+ dan N. tibialis posterior sinistra

(lanjutan)

No	No Pasien	Inisial Nama	Umur	Jenis Kelamin	Diagnosis	Baru/Lama (terapi)	BTA				Antomi Lesi Kulit	Hasil PCR			Hasil Biopsi	Klinis
							CT ka	CT ki	LK1	LK2		CT	LK	Jaringan		
9	9	Tn. AP	52	Lk	MH BT	B	-	-	-	-	kaki kiri	-	+	+	Sesuai dengan MH BT dengan gambaran vaskulitis	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (+), N. auricularis magnus sinistra, N. poplitea sinistra
10	10a	Ny. A	22	Pr	MH BT (MB)	L, 5 bulan terapi	-	-	-	-	punggung, bokong	-	-	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (+) N. peroneus komunis dekstra, N. tibialis posterior sinistra
11	11a	Tn. I	19	Lk	MH BT (MB) + RR	B	-	-	-	-	telapak tangan kiri, lengan kiri	+	-	+	Sesuai dengan MH tipe TT	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, pembesaran saraf tepi (+) N. auricularis magnus +/+, N. ulnaris +/+, N. tibialis posterior dekstra
12	12	Tn. MAM	48	Lk	MH BT (MB) + RR	L, 5 bulan terapi	-	-	-	-	paha kiri, punggung kaki kiri	-	+	+	Tidak tampak tanda MH	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (+) N. auricularis magnus +/+, N. peroneus komunis +/+, N. ulnaris dekstra
13	13a	Ny. S	48	Pr	MH BT (MB)	L, 5 bulan terapi	-	-	-	-	lengan kanan, paha kanan	-	+	+	Sesuai dengan MH tipe BL	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (+) N. ulnaris +/+, N. peroneus komunis +/+, N. tibialis posterior dekstra
14	15a	Tn. HG	67	Lk	MH BT (MB)	L, 6 bulan terapi	-	-	-	-	bokong, dada	-	-	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, pembesaran saraf tepi, penebalan saraf tepi + N. ulnaris +/+, N. tibialis posterior sinistra
15	16a	Ny. M	37	Pr	MH BT	L, 11 bulan terapi	-	-	-	-	lengan kiri, punggung	-	-	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, pembesaran saraf tepi (+) N. ulnaris +/+
16	17	Ny. RN	24	Pr	MH BT (MB)	L, 15 bulan terapi	-	-	-	-	dagu kiri	-	-	+	Tidak dapat dinilai	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (+) N. ulnaris +/+

(lanjutan)

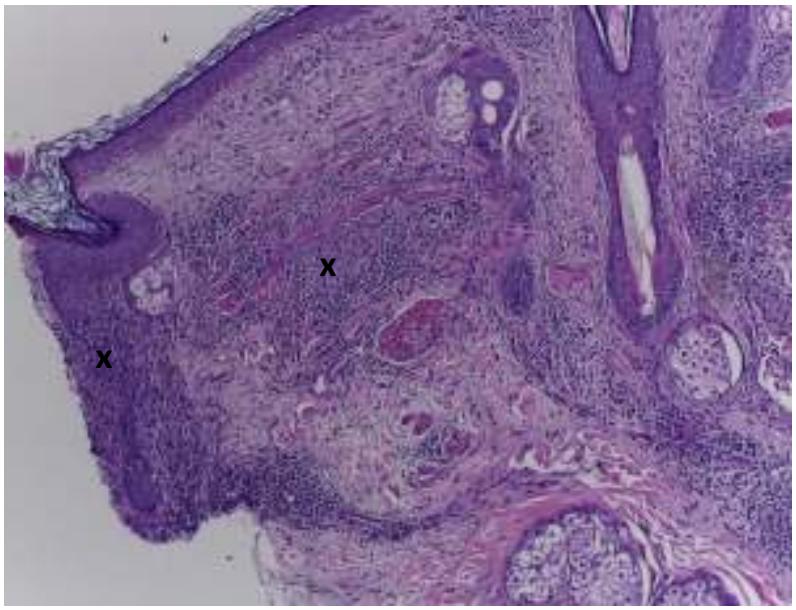
No	No Pasien	Inisial Nama	Umur	Jenis Kelamin	Diagnosis	Baru/Lama (terapi)	BTA				Antomi Lesi Kulit	Hasil PCR			Hasil Biopsi	Klinis
							CT ka	CT ki	LK1	LK2		CT	LK	Jaringan		
17	18	Ny. DR	39	Pr	MH BT (MB)	L, 4 bulan terapi	-	-	-	-	lengan kanan	-	-	+	Tidak tampak gambaran khas untuk MH	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, pembesaran saraf tepi (+) N. ulnaris dekstra
18	19	Ny. Y	37	Pr	MH BT (MB) + RR	B	-	-	-	-	pipi kiri, lengan bawah kanan	-	-	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (+) N. tibialis posterior +/+
19	20	Tn. S	36	Lk	MH BT (MB)	B	-	-	-	-	jari V kaki kiri, jari IV kaki kiri	-	-	+	Sesuai dengan MH BT	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (-)
20	21	Tn. AW	39	Lk	MH BT (MB)	L, 9 bulan terapi	-	-	-	-	wajah pipi kiri	-	-	+	Masih terdapat MH BT yang aktif	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (+) N. auricularis magnus sinistra
21	23	Tn. RS	57	Lk	MH BT (MB)	L, 11 bulan terapi	-	-	-	-	tangan kanan, dada	+	-	+	Tidak sesuai dengan MH	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, pembesaran saraf tepi (+) N. tibialis posterior sinistra
22	24	Tn. SM	49	Lk	MH BT (MB)	L, 18 bulan terapi	-	-	-	-	pipi kanan, kaki kiri	-	-	+	Sesuai dengan MH tipe BL	Lesi eritematosa, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf (+) N. auricularis magnus dekstra, N. ulnaris +/+, N. peroneus komunis sinistra
23	25	TN. DS	40	Lk	MH BT (MB)	L, 5 bulan terapi	-	-	-	-	punggung 1, punggung 2	-	+	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip, pembesaran saraf tepi (-)
24	26	Tn. AK	21	Lk	MH BT (PB)	L, 4 bulan terapi	-	-	-	-	siku kiri	-	-	+	Sesuai dengan MH tipe BT	Lesi hipopigmentasi, anestesi +, batas sirkumskrip-difus, pembesaran saraf tepi (-)

Lampiran 8. Foto lesi kulit pasien MH tipe BT

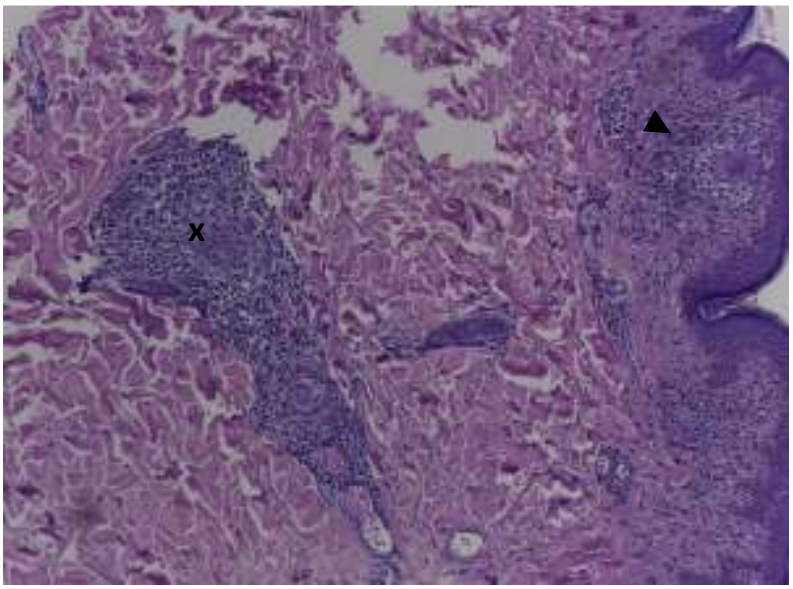
Gambar 1. Foto lesi kulit pasien MH tipe BT berupa lesi eritematosa. Tindakan biopsi dilakukan pada lesi kulit bertanda x dan y. Setengah bagian kulit (bertanda x) sebagai spesimen yang diujikan pada *real-time* PCR, sisanya (bertanda y) sebagai spesimen yang diperiksakan secara histopatologi.

Gambar 2. Foto lesi kulit pasien MH tipe BT berupa lesi hipopigmentasi. Tindakan biopsi dilakukan pada lesi kulit yang ditunjuk dengan mata panah.

Lampiran 9. Gambaran histopatologis MH tipe BT

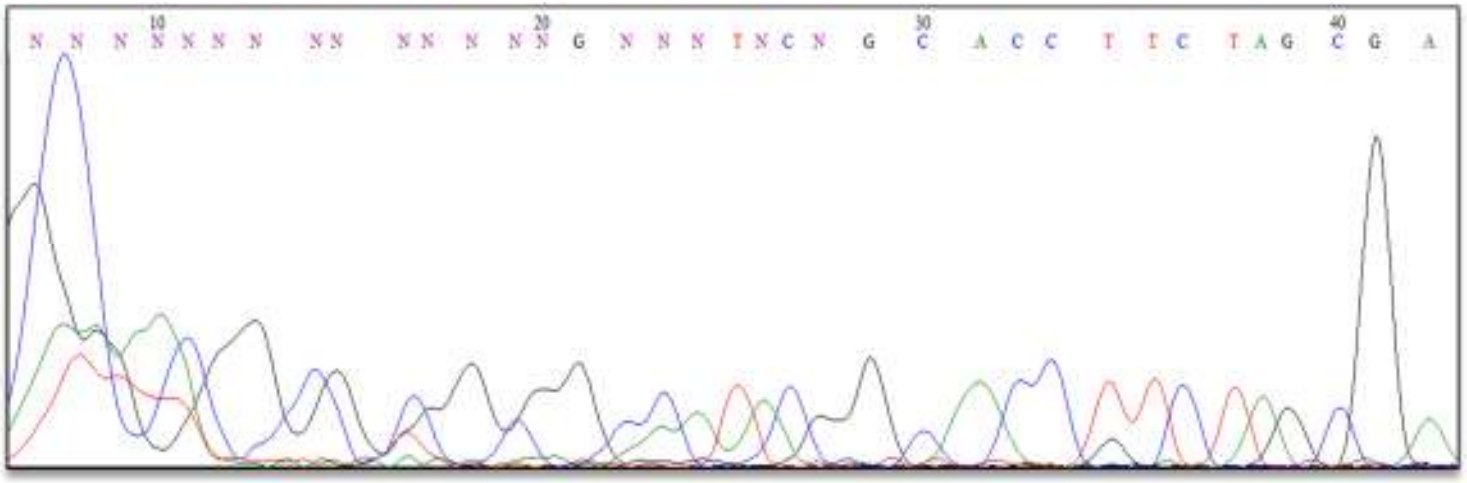


Gambar 3. Gambaran histopatologis MH tipe BT. Gambaran secara mikroskopis terlihat epidermis dengan rete ridges mendatar. Pada lapisan dermis sampai subkutis tampak granuloma berbentuk memanjang (tanda x) pada perineural dan periadneksal tersusun atas sel-sel epiteloid, limfosit dan sel datia langhan. Pulasan basil tahan asam tidak ditemukan.



Gambar 4. Gambaran histopatologis MH tipe BT. Gambaran secara mikroskopis terlihat epidermis relatif atrofik. Pada lapisan dermis tampak struktur granuloma yang memanjang (tanda x), terletak periadneksa dan perivaskular. Granuloma tersusun atas sel-sel epiteloid, dengan limfosit serta beberapa sel datia. Sebagian granuloma tampak menempel pada epidermis (mata panah). Pulasan Fite Faraco menunjukkan hasil negatif.

Lampiran 10. Hasil sekuensing pada MH MB tipe LL sebagai kontrol positif



Gambar 5. Hasil sekuensing yang dilakukan pada MH MB tipe LL yang dipakai sebagai kontrol positif. Hasil sekuensing didapatkan sesuai dengan gen target pada sekuens *primer reverse.*

Lampiran 11. Penghitungan ambang batas deteksi DNA (jumlah kopi)

Ambang sensitivitas DNA yang diperoleh adalah $8x10^{-11}$ ng/µl. Dengan menggunakan bilangan Avogadro untuk menentukan jumlah kopi, maka jumlah ini setara dengan 1 kopi/µl.

Jaringan yang digunakan pada penelitian ini maksimal sebesar 200 mg (sesuai dengan ketentuan kit ekstraksi yang digunakan dari Qiagen). Karena 1 µl setara dengan 1 mg maka :

1 kopi/µl atau 1 kopi/mg dikonversi menjadi 200 kopi/200 mg. Diketahui dalam 1 kali amplifikasi terdapat 19 kopi gen RLEP, maka ambang batas deteksi DNA dengan pemeriksaan TaqMan *real-time* PCR adalah 11 bakteri *M. leprae*.

Sumber : http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html