

616.998
SUL
d e.1

LAPORAN PENELITIAN
KARYA AKHIR

DETEKSI DNA KUMAN LEPRO
DENGAN METODA PCR
PADA PENDERITA KLINIS ARTRITIS LEPRO



Oleh :
HADI SULISTYANTO

Bagian/ SMF Ilmu Penyakit Dalam FK Undip/
RSUP Dr. Kariadi Semarang
2000

LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN PENELITIAN KARYA AKHIR

JUDUL

DETEKSI DNA KUMAN LEPRO
DENGAN METODA PCR
PADA PENDERITA KLINIS ARTRITIS LEPRO

Oleh :

HADI SULISTYANTO

DISETUJUI OLEH :

1. PEMBIMBING PENELITIAN :



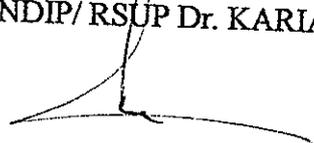
Dr. SUYANTO HADI, SpPD-KR

2. KONSULTAN PENELITIAN :



Prof. Dr. SOENARTO, SpPD-KHOR

3. KETUA PROGRAM STUDI
PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I ILMU PENYAKIT DALAM
FK UNDIP/ RSUP Dr. KARIADI SEMARANG



DR. Dr. DARMONO, SpPD-KE

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil alamin, saya panjatkan kehadiran Allah swt, karena atas berkat rahmat dan karunia Nyalah saya akhirnya dapat menyelesaikan laporan penelitian karya akhir dalam rangka pendidikan dokter spesialis I Ilmu Penyakit Dalam FK Undip/RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan judul : DETEKSI DNA KUMAN LEPRA DENGAN METODA PCR PADA PENDERITA KLINIS ARTRITIS LEPRA.

Laporan penelitian ini terwujud berkat adanya bantuan, bimbingan serta dorongan dari berbagai pihak. Karena itu pada kesempatan ini saya menghaturkan terimakasih dan penghargaan yang tulus kepada yang terhormat :

1. Semua penderita dan responden yang telah berkenan mengikuti penelitian dengan segala pengorbanan yang tulus untuk mau dibiopsi.
2. Dr.Suyanto Hadi, SpPD-KR. Sebagai pembimbing saya dalam penelitian ini, atas segala nasehat, dorongan, bimbingan yang penuh kesabaran dan tanpa mengenal lelah sejak proposal sampai selesainya laporan penelitian ini.
3. Prof.Dr.Soenarto, SpPD-KHOR, konsultan penelitian saya atas segala petunjuk, nasehat, bimbingan dan saran serta dorongan yang penuh perhatian dan kesabaran sejak proposal hingga terwujudnya laporan ini.
4. Prof.DR.Dr.Hardiyanto, SpKK, Ketua Laboratorium Ilmu Hajati/ Ketua seksi biologi molekuler kedokteran tropis/ Ketua seksi penelitian lepra PAU Biotek UGM yang telah berkenan memberi kesempatan saya mengerjakan penelitian ini sekaligus konsultan pemeriksaan PCR Lepra.
5. DR.Drh.Wajan T. Artama dan Ibu Yuli, Bsc supervisor dan penanggung jawab laborat biologi molekuler yang telah mendampingi dan memberikan supervisi pekerjaan saya dalam pemeriksaan PCR.
6. Dr.Sumanto, SpPD-KGEH,MSc ketua tim koordinator seminar proposal beserta seluruh anggota tim, atas bimbingan, koreksi dan saran yang telah diberikan.
7. Dr.H. Abdul Wahab, SpBO FICS dan Dr.Johan Sindunata, konsultan bedah yang telah membantu dalam pelaksanaan biopsi sinovial penderita responden.
8. Dr.Hartono,Sp rad konsultan yang telah membantu pembacaan foto sendi.

9. Dr. Indra Wijaya, SpPA dan Dr. Subakir, SpMK, SpKK yang telah membantu pembacaan preparat cairan sinovial dan biopsi jaringan.
10. DR. Dr. Darmono, SpPD-KE, KPS PPDS I Ilmu Penyakit Dalam atas segala petunjuk, nasehat dan bimbingan dalam rangka pendidikan spesialisasi ini.
11. Dr. Prijanto Poerjoto, SpPD-SpJP, KKV, Ketua bagian/ SMF Ilmu Penyakit Dalam yang memberi bimbingan, nasehat dan dorongan dalam rangka pendidikan spesialisasi ini.
12. Dekan FK Undip Semarang, atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan ini.
13. Direktur RSUP Dr. Kariadi Semarang, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama pendidikan.
14. Direktur RS Kusta Tugu Semarang dan staf atas segala fasilitas dan kemudahan serta bantuan yang diberikan selama penelitian.
15. Akhirnya kepada istri saya tercinta Dr. Sudarti dan anak-anak saya Nurdila Rahmayani, Nurdita Rahmadani dan Nugraha Putra Setyanto yang dengan setia telah mendampingi dan memberikan bantuan, dorongan dan doa.

Semoga Allah Swt senantiasa melimpahkan berkat, rahmat dan karuniaNya kepada kita semua. Amin.

Semarang, Maret 2000

Hadi Sulistyanto

DAFTAR ISI

	Hal
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL DAN GAMBAR	iv
I. PENDAHULUAN	1
Latar belakang penelitian	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
1. Artritis lepra	3
A. Epidemiologi	3
B. Gambaran klinik	3
C. Patogenesis	3
D. Pengobatan Lepra	4
E. Kendala identifikasi kuman lepra	5
2. Metode PCR	5
A. Sejarah PCR	5
B. Pengertian dan prinsip dasar PCR	6
C. Cara kerja PCR	9
3. Kerangka teori	11
4. Kerangka konsep	12
III. MASALAH, TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	13
IV. METODOLOGI PENELITIAN	14
1. Desain penelitian	14
2. Tempat dan waktu penelitian	14
3. Populasi penelitian dan responden	14
4. Pengumpulan data	14
5. Besar sampel	15
6. Bahan dan alat	15
7. Definisi operasional	17
8. Cara kerja	17
V. HASIL PENELITIAN	20
VI. PEMBAHASAN	27
VII. KESIMPULAN DAN SARAN	30
VIII. RINGKASAN	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	35

DAFTAR TABEL DAN GAMBAR

DAFTAR TABEL

	Hal
1. Tabel 1a : Penderita masuk kriteria inklusi	21
2. Tabel 1b : Jenis kelamin dan umur	21
3. Tabel 2 : gambaran klinik artritis lepra dan jenis kelamin	22
4. Tabel 3 : Tipe lepra dan status terapi	22
5. Tabel 4 : Gambaran klinik pengecatan BTA dan PCR	23
6. Tabel 5 : Tipe lepra dan PCR	23
7. Tabel 6 : PCR dan artritis dengan atau tanpa reaksi lepra	24
8. Tabel 7 : Histopatologi dan PCR	24

DAFTAR GAMBAR

1. Gambar 1 : Struktur DNA	8
2. Gambar 2 : Skema cara kerja PCR	10
3. Gambar 3 : Hasil elektroforesis	25

Abstrak

DETEKSI DNA KUMAN LEpra DENGAN METODA PCR PADA PENDERITA KLINIS ARTRITIS LEpra

Latar belakang :

Identifikasi kuman lepra sangat sulit dan sering gagal dengan metoda konvensional. Deteksi DNA kuman lepra dengan metoda PCR pada jaringan sendi penderita klinis artritis lepra belum pernah dilakukan.

Alasan : dengan metoda non konvensional (biologi molekuler) diharapkan dapat meningkatkan diagnosis.

Tujuan :

Mendeteksi DNA kuman lepra pada jaringan sendi penderita dengan klinis artritis lepra.

Metodologi :

Deskriptif berupa kasus serial yang memenuhi kriteria inklusi dan bersedia dilakukan biopsi jaringan sendi (surat pernyataan).

Dilakukan pengecatan langsung BTA cairan sendi, hasil biopsi dilakukan pemeriksaan histopatologi dan amplifikasi DNA dengan metoda PCR.

Hasil :

Penderita yang memenuhi kriteria inklusi 31 orang, yang bersedia dibiopsi 19 orang. Pengecatan BTA cairan sendi tidak menunjukkan adanya kuman mikobakterium lepra. Histopatologi menunjukkan 8 penderita positif mengandung mikobakterium lepra, terdiri dari direk (BTA) 4 penderita (21,02%) dan indirek (sel busa,) 3 penderita (15,78%) serta granuloma makrofag 1 penderita (5,26%).

PCR dengan kadar sampel DNA 2,5 uL positif 13 penderita (68,31%) dan kadar sampel DNA 5 uL positif 16 penderita (84,21%).

Kesimpulan :

Dengan metoda PCR dapat dideteksi adanya DNA kuman lepra pada penderita klinis artritis lepra. Dengan data yang ada dikesankan artritis lepra sebagai artritis infeksi.

BAB I

PENDAHULUAN

LATAR BELAKANG PENELITIAN

Penyakit lepra masih merupakan problem kesehatan pada beberapa bagian dunia termasuk Indonesia. Walaupun telah dilaksanakan beberapa usaha pemberantasan penyakit lepra, namun jumlah penderita yang tercatat seluruh dunia masih tetap tinggi. Diperkirakan penderita lepra di dunia sejumlah 5,5 juta orang. Pada akhir tahun 1993 tercatat prevalensi lepra 6,8 per 10.000 penduduk. ^(1,2)

Jumlah penderita yang tinggi ini sangat merugikan pembangunan, karena kelainan lepra diketahui banyak mengenai usia muda serta menyebabkan kecacatan. ^(1,2,3)

Prevalensi artritis lepra di luar negeri dilaporkan 1% kasus penderita lepra. ^(3,4) Pada RS Kusta Tugu Semarang prevalensi penderita artritis 48% dari semua penderita lepra yang dirawat, sedang prevalensi artritis lepra 2,1 %. Artritis lepra dapat menyebabkan kerusakan pada sendi yang berakibat kecacatan. ^(3,4)

Beberapa laporan menyebutkan bentuk klinis artritis lepra sebagai poli artritis simetris yang mirip dengan artritis reumatoid. Bonvoisin (1983) dan Gibson (1984) melaporkan sendi yang sering terkena adalah sendi-sendi kecil tangan (interfalang proksimal, metakarpofalang), pergelangan tangan, lutut, dan pergelangan kaki. ^(5,6) Pernambuco (1994) melaporkan artritis lepra merupakan oligoartritis atau monoartritis. ⁽⁷⁾

Patogenesis artritis lepra belum diketahui dengan jelas. Bonvoisin (1983) mengatakan sebagai artritis reaktif dengan dasar reaksi imunologik. ⁽⁵⁾ Sedangkan Hola (1983), Soenarto (1994) mengatakan artritis lepra sebagai artritis infeksi karena ditemukan kuman lepra pada jaringan sinovial atau cairan sendi. ^(10,11,12) Atkin (1989) pada biopsi gagal membuktikan adanya kuman lepra tetapi yakin sebagai artritis infeksi dengan bukti membaik dengan obat anti lepra. ⁽¹⁰⁾ Akan tetapi upaya menemukan kuman dalam sendi sangat sulit dan sering menemui kegagalan. ^(12,13,14) Kontroversi patogenesis tersebut karena belum ditemukan cara yang mudah, cepat dan tepat untuk identifikasi mikobakterium leprae. Sampai saat ini pemeriksaan kuman tahan asam di

bawah mikroskop merupakan pemeriksaan yang banyak dilakukan ,akan tetapi dengan prosedur itu sangat sulit mendapatkan kuman lepra. Biakan lepra pada kaki binatang dilaporkan amat sulit dilaksanakan. Pemeriksaan serologi dengan antibodi monoklonal tidak sensitif. ⁽¹⁵⁾

Konsekuensi logis patogenesis tersebut akan membawa konsekuensi pengobatan. Holla (1983) pada penelitian biopsi sinovial 50 penderita lepra dengan artritis menemukan 14 kasus disertai reaksi lepra dan 36 kasus ditemukan adanya sel busa serta 5 kasus terdapat basil tahan asam utuh. ⁽¹¹⁾ Soenarto (1994) menemukan kuman Mikobakterium lepra dengan pengecatan metoda Harada pada 2 kasus biopsi sinovial, keduanya mempunyai gambaran klinik poliartritis simetris. ⁽¹²⁾ Penderita lepra dengan artritis di RS Kusta Tugu Semarang diobati sebagai reaksi lepra, yaitu steroid dan OAINS, sedangkan obat lepra untuk sementara dihentikan.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah metode baru untuk mendeteksi adanya DNA organisme dengan cepat dan tepat. Metode ini dilakukan dengan amplifikasi DNA yang spesies spesifik sampai level yang bisa dideteksi. ^(16,17) Klatser (1986) mengembangkan metode PCR untuk mendeteksi Mikobakterium lepra dengan amplifikasi skuens 531-bp dari pragennya. ^(18,19)

Sepanjang pengetahuan penulis penelitian deteksi DNA kuman lepra dengan metoda PCR pada penderita klinis artritis lepra belum pernah dilaporkan di Indonesia/ di seluruh dunia. Alasan penulis meneliti ini ingin tahu dan mengerti bagaimana identifikasi DNA kuman lepra dengan metoda PCR yang dikatakan sangat sensitif dan spesifik serta cepat. Harapan penulis dengan metoda PCR ini diharapkan dapat meningkatkan diagnosis artritis lepra.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. ARTRITIS LEpra

A. Epidemiologi

Keterlibatan sendi pada penyakit lepra pertama kali dilaporkan di China sejak 600 tahun sebelum masehi. ⁽⁶⁾ Tetapi diskripsi klinis artritis Lepra sebagai poliartritis baru dilaporkan oleh Bechelli dan kawan-kawan (dikutip oleh Pernambuco) pada tahun 1944. ⁽⁷⁾ Manifestasi sendi terjadi pada kira-kira 1% penderita lepra. ^(8,9) Albert dan kawan-kawan (1994) dan Huskisson (1978) melaporkan gejala-gejala artritis pada tiga per empat penderita lepra dirawat, dan merupakan manifestasi ketiga terbanyak setelah kulit dan saraf. ^(8,9)

B. Gambaran Klinik

Manifestasi klinik artritis lepra masih kontroversial. ⁽⁴⁾ Beberapa laporan menyebutkan bentuk klinik artritis lepra berupa poliartritis simetris yang menyerupai dengan artritis reumatoid. Sendi yang sering terkena antara lain: sendi-sendi kecil (interfalang proksimal, metakarpofalang) pergelangan tangan, lutut dan pergelangan kaki. ^(5,6) Laporan lain oleh Pernambuco (1993) menyebutkan artritis lepra berbentuk oligo artritis yaitu menyerang 2 – 4 sendi atau mono artritis. ⁽⁷⁾ Kelainan sendi pada penyakit lepra dapat pula timbul sekunder terhadap penyakit saraf perifer (*neurophatic joint atau Charcot joints*). ^(8,9)

C. Patogenesis

Patogenesis terjadinya artritis lepra masih belum jelas. Sebagian ahli mengatakan manifestasi artritis lepra berupa artritis reaktif yang biasanya timbul mendahului reaksi lepra terutama lepra lepromatosa. Diduga bentuk artritis tersebut mempunyai dasar imunologik. ⁽⁵⁾

Sebagian ahli lain menduga kuman lepra berperan langsung sebagai penyebab artritis, karena ditemukan kuman lepra di jaringan sinovial atau cairan sendi, sehingga dianggap sebagai artritis infeksiif. ^(10,11,12)

Ada juga ahli yang berpendapat bahwa artritis lepra dapat berupa artritis reaktif atau infeksiif. ⁽⁶⁾ Ahli lain tidak dapat menyimpulkan artritis lepra termasuk kelompok artritis reaktif atau infeksiif, dan menggolongkannya ke dalam artritis infeksiif tetapi dalam penelitiannya ternyata tidak menemukan adanya kuman lepra. ⁽⁹⁾

Konsekuensi logis patogenesis akan membawa konsekuensi pengobatan. Pada kasus artritis infeksiif maka obat lepra tentu memegang peran utama. Sebaliknya pada artritis reaktif OAINS yang berperan sangat penting.

D. Pengobatan Lepra

Pengobatan lepra menurut rekomendasi *WHO Expert Committee on Leprosy* Juni 1997 yang juga telah diterapkan dalam program pemberantasan kusta Departemen Kesehatan RI sejak Agustus 1997 adalah sebagai berikut :

D.1. Lepra tipe multi basiler (MB)

Pengobatan bulanan hari pertama : Rifampisin 600 mg, Dapson 100 mg, Klofasimin 300 mg.

Pengobatan harian : hari 2 sampai 28 : Klofasimin 50 mg, Dapson 100 mg.

Kombinasi obat hari pertama diminum dalam supervisi (di depan petugas), pengobatan diberikan selama 12 bulan (1 bulan = 28 hari), dengan toleransi diselesaikan maksimal 18 bulan.

D.2. Lepra tipe pausibasiler (PB) :

Pengobatan bulanan : hari pertama : Rifampisin 600 mg, Dapson 100 mg.

Pengobatan harian : hari 2 sampai 28 : Dapson 100 mg

Kombinasi obat diminum dalam supervisi, pengobatan diberikan selama 6 bulan dengantoleransi maksimal 9 bulan.

D.3. Lepra tipe PB lesi tunggal

Dosis tunggal ROM (Rifampisin 600 mg, Ofloksasin 400 mg, Minosiklin 100 mg) : sekali minum dalam supervisi.

Penderita yang telah selesai minum obat sesuai waktu yang ditentukan dinyatakan sebagai RFT (*Release From Treatment*). RFC (*Release From Controle*) : penderita yang sudah RFT, masuk dalam masa pengawasan (secara pasif : penderita dianjurkan datang kontrol). Untuk PB, sekali setahun selama 2 tahun; untuk MB sekali setahun selama 5 tahun. ^(1,2,3,4)

E. Kendala identifikasi kuman lepra.

Diagnosis penyakit lepra masih tergantung pada penemuan klinis dan bakteriologis yang sifatnya subyektif . Sampai saat ini belum ada kriteria baku arthritis lepra .Kristiana E (1990) menemukan bahwa rata rata penyakit lepra baru terdiagnosis setelah 2 tahun menderita. Keadaan ini menyebabkan pengobatan penderita lepra sangat terlambat. ^(13,14)

Pembiakan dapat dilakukan pada binatang Armadillo dan telapak kaki tikus tidak berbulu ,akan tetapi mengalami kesulitan serta membutuhkan waktu lama. ⁽¹⁴⁾

Teknik serologis untuk diagnosis lepra dengan mengukur kadar antibodi spesifik (PGL 1) sedang diteliti akurasinya . ⁽¹⁵⁾

2. METODE PCR

A. Sejarah PCR.

Pada tahun 1983 Kary B Mullis menemukan suatu teknik membuat dan menggandakan fragmen DNA secara in vitro. Teknik ini dikenal sebagai *Polymerase chain reaction* (PCR). Teknik ini terdiri dari beberapa tahap yang berulang. Setiap tahap terjadi duplikasi jumlah fragmen DNA. Amplifikasi/ penggandaan DNA tersebut menyebabkan PCR dapat digunakan untuk amplifikasi fragmen DNA secara eksponensial dalam waktu singkat. ^(16,17)

Enzim yang pertama-tama digunakan dalam proses PCR yaitu DNA polimerase dari Klenow, dipanen dari bakteri E.coli. Enzim ini digunakan oleh Saiki dan kawan-kawan (1985), Mullis (1986), Falona (1987). Proses PCR dengan enzim ini memerlukan penambahan enzim berulang, hal ini disebabkan enzim ini rusak pada

suhu tinggi. Pada tahun 1988 Saiki menemukan enzim lain yang stabil pada suhu tinggi, yaitu DNA polimerase yang diekstraksi dari bakteri *Thermus aquaticus* yang bersifat termofilik. Enzim ini dikenal dengan sebutan *Taq Polymerase*. Taq polymerase bekerja optimal pada suhu 75 ° C dan masih stabil pada suhu 94 – 95 ° C. Dengan enzim ini proses PCR lebih mudah dan hemat karena tidak diperlukan penambahan enzim polimerase yang berulang. ^(18,19)

B. Pengertian dan prinsip dasar PCR

Struktur DNA *double helix* (gambar. 1)pertama kali dianjurkan oleh Crick dan Watson pada pertengahan 1950. Struktur dasar DNA terdiri dari kerangka grup fosfat dan gula (pentosa) dengan nitrogen basa yaitu purine (guanine dan adenine) dan pirimidine (cytosine dan timine), sedangkan pada RNA posisi timine diganti urasil. ^(23,24,25)

Seperti diketahui bahwa sifat – sifat baka organisme dibawa oleh DNA, jika primer spesifik organisme tersebut dapat ditentukan maka DNA yang diperbanyak adalah DNA mikroorganisme tersebut. Dengan demikian identifikasi suatu DNA berarti identifikasi suatu mikroorganisme. Primer spesifik dari suatu mikroorganisme merupakan spesifikasi dari jenis mikroorganisme , juga spesifikasi dari sifat-sifat mikroorganisme tersebut, misalnya resistensi terhadap antibiotika, patogenitasnya atau sifat lain tergantung pada urutan fragmen DNA spesifik yang digunakan sebagai primer atau probe. ^(24,25)

PCR adalah suatu teknik penggandaan DNA atau fragmen DNA secara invitro, dengan enzim tertentu dalam mesin pengubah suhu *thermo cycler*. Proses tersebut mirip dengan proses replikasi DNA secara invivo.

Primer DNA adalah oligonukleotida sebagai penuntun proses polimerisasi.

Bahan yang dibutuhkan pada proses PCR adalah :

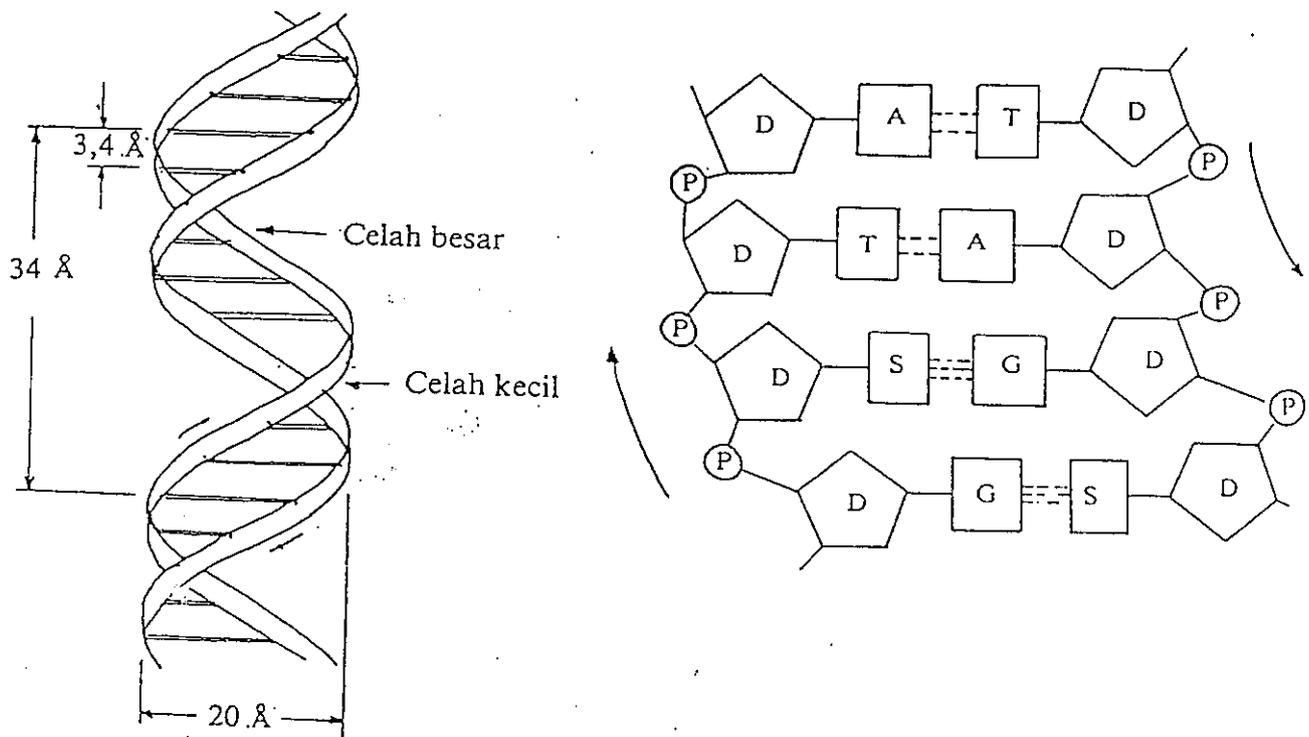
- Template untai ganda yang mengandung DNA yang akan diamplifikasi.
- Enzim DNA polimerase/ taq polymerase
- Nukleotida trifosfat
- Sepasang primer oligonukleotida.

Teknik PCR ini menggunakan prinsip dasar sebagai berikut :

1. Ikatan antara untai DNA dengan pasangan komplementernya adalah sangat kuat dan spesifik
2. Dimungkinkan untuk memisahkan untai tersebut menjadi rantai tunggal dan masing-masing rantai dapat dipakai sebagai cetakan atau template untuk mensintesis rantai pasangannya. Reaksi ini pada prinsipnya melakukan sintesis turunan fragmen DNA tertentu (sequen DNA target) dengan oligonukleotida penuntun/ primer yang menempel dan mengapit fragmen DNA target tersebut dari arah yang berlawanan. Proses pelipatgandaan DNA ini terjadi melalui tiga tahap, yaitu denaturasi, annealing dan ekstensi. ^(23,24,25)

Gambar 1 : Struktur DNA

Model molekul DNA menurut Watson dan Crick ⁽¹⁸⁾



Menurut Watson dan Crick molekul DNA itu berbentuk sebagai 2 pita spiral yang saling berpilin (*double helix*). Di bagian luar terdapat deretan gula fosfat (yang membentuk tulang punggung dari *double helix*). Di bagian dsalam dari *double helix* itu terdapat basa purin dan pirimidin.

C. Cara kerja PCR

Tiga tahap siklus PCR secara berurutan yaitu:

- Denaturasi template
- Annealing
- Ekstensi/ elongasi/ pemanjangan/ polimerisasi. (20,21,22)

Dengan keterangan sebagai berikut :

- Denaturasi
Pita ganda DNA didenaturasi/ dipisahkan pada suhu tinggi (90 – 95 ° C) dimana untaian ganda DNA terpisah menjadi dua untaian DNA tunggal.
- Annealing
Penempelan primer (annealing) pada DNA target terjadi pada suhu rendah.
- Ekstensi
Pemanjangan/ ekstensi dari kedua primer tersebut dengan arah yang berlawanan (dari 5' ke 3'). Terbentuk dua untai ganda DNA baru. Hasil pelipatgandaan DNA ini dapat divisualisasikan dengan berbagai cara :
 - Elektroforesis pada gel argarose (DNA diwarnai dengan ethidium bromida sehingga tampak di bawah sinar ultra violet)
 - Probing
 - Spektrofotometer
 - Cara lain.

Target DNA yang telah dilipatgandakan ini kemudian dilakukan manipulasi lebih lanjut untuk berbagai keperluan misalnya dikarakterisasi sifat-sifatnya, squensing atau dilakukan pemotomngan dengan enzim tertentu dan ditempelkan pada DNA organisme lain untuk membentuk DNA rekombinan. (23,24,25)

Gambar 2 : Skema cara kerja PCR

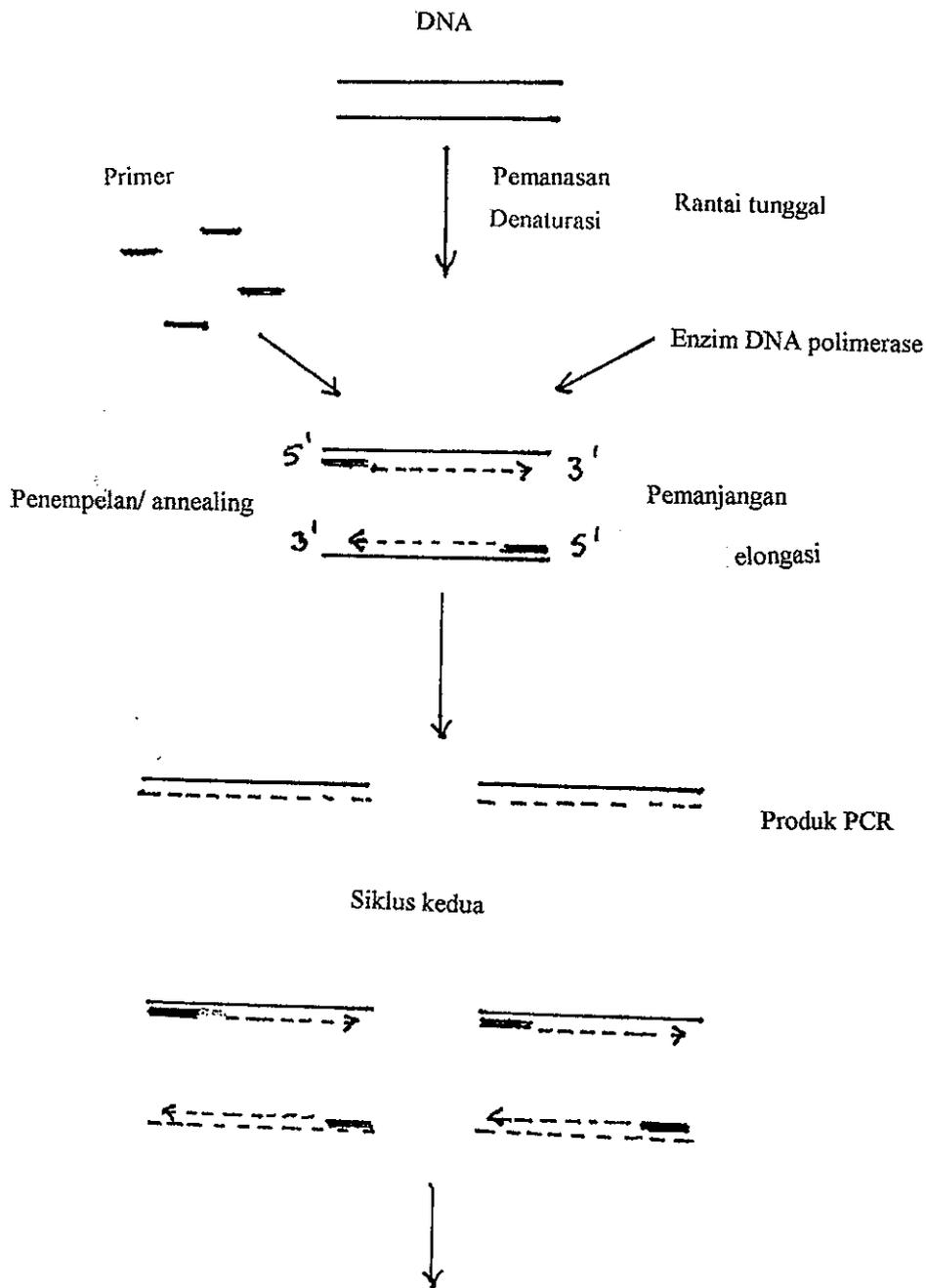
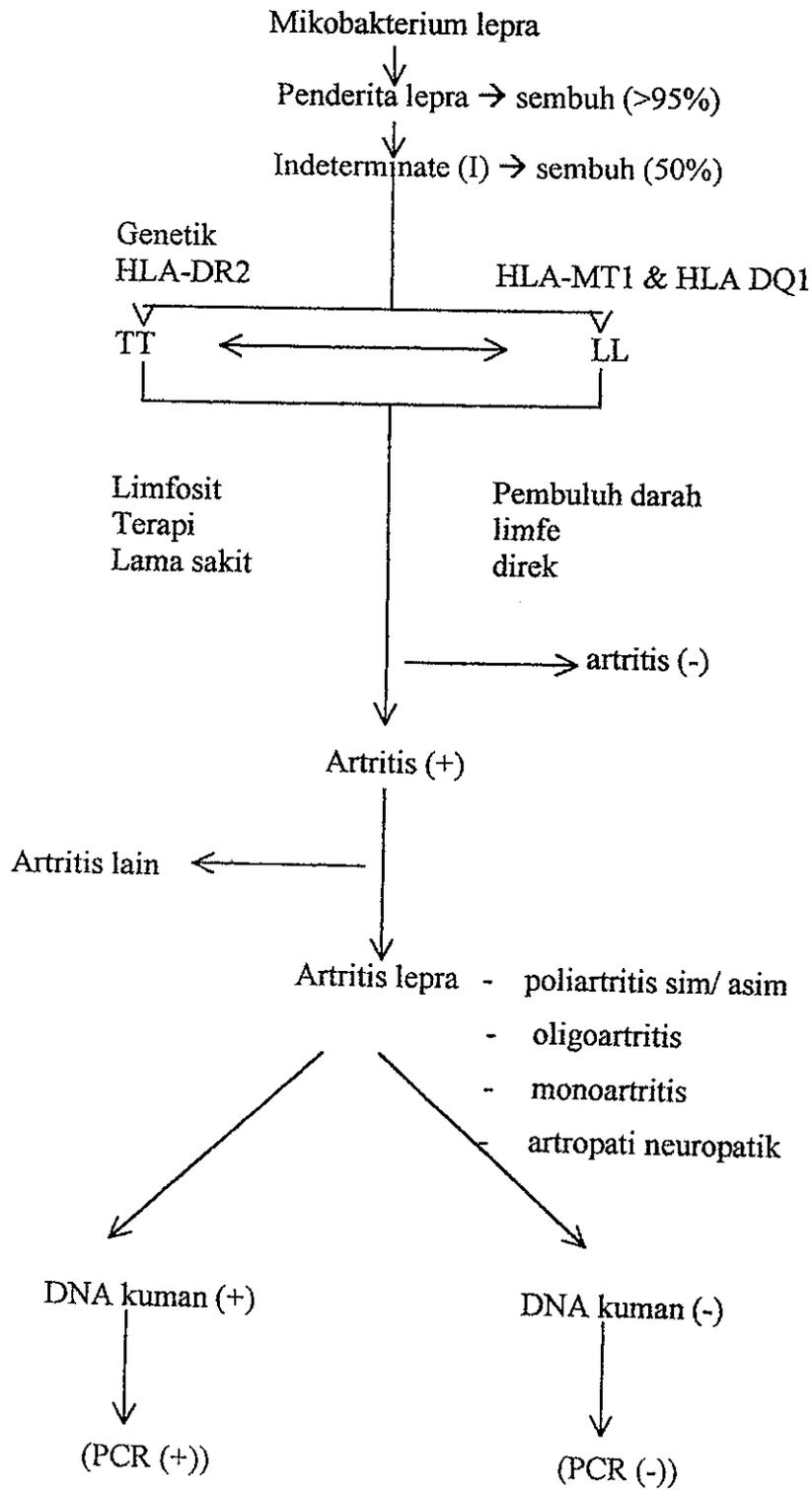


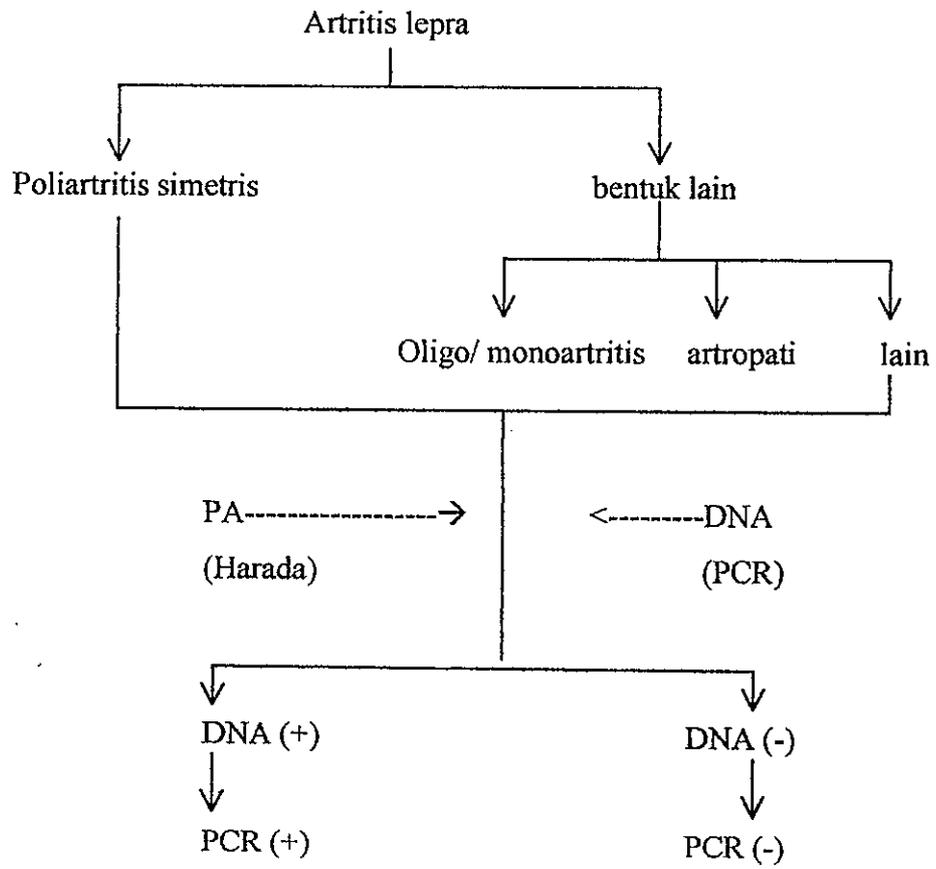
Diagram skema polymerase chain reaction (PCR)

Diambil dari kepustakaan no.23

3. KERANGKA TEORI



4. KERANGKA KONSEP



BAB III

MASALAH ,TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1. MASALAH PENELITIAN

- Apakah terdapat DNA kuman lepra pada jaringan sendi penderita dengan klinis artritis lepra dengan metoda PCR ?

2. TUJUAN PENELITIAN

- mendeteksi DNA kuman lepra pada jaringan sendi penderita dengan klinis artritis lepra.

3. MANFAAT PENELITIAN

A. AKADEMIK: - penambah data

- informasi pemeriksaan secara biologi molekuler

B.PELAYANAN: - untuk diagnosis

- untuk mengetahui patogenesis yang bermanfaat untuk terapi
- untuk mengetahui artritis lepra termasuk infeksi/ reaktif.

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

1. DESAIN PENELITIAN

Desain penelitian ini adalah deskriptif

2. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Rumah Sakit Kusta Tugurejo Semarang ,mulai 1 juli 1998 sampai Februari 2000

3. POPULASI PENELITIAN DAN RESPONDEN

Populasi studi pada penelitian ini adalah semua penderita lepra dewasa (usia >/ 14 tahun) dengan klinis artritis lepra .

Responden penelitian :populasi studi yang memenuhi kriteria inklusi dan setuju untuk ikut penelitian.

4. PENGUMPULAN DATA

Kriteria responden :

Kriteria inklusi :

- a. Penderita lepra klinik dan bakteriologik diseretai artritis (belum pernah, dalam, atau sudah selesai pengobatan)
- b. Usia \geq 14 tahun
- c. Bersedia mengikuti penelitian (dengan surat pernyataan)
- d. Tidak terbukti menderita artritis yang lain.

Kriteria eksklusi :

- a. Terdapat luka terbuka pada daerah artritis.
- b. Memenuhi kriteria diagnosis :
 - Artritis reumatoid (kriteria ACR revisi 1987)
 - Demam reumatik (kriteria Jones 1992 up date)
 - Artritis Gout (kriteria ARA 1977)

- Osteoarthritis (kriteria Altman 1983)
 - Arthritis infeksi (kriteria Schmidt 1983)
 - Spondiloartropati sero negatif (kriteria New York 1984)
- c. Tidak memungkinkan dilakukan tindakan biopsi
 - d. Ada penyakit berat yang tidak memungkinkan ikut dalam penelitian seperti gagal ginjal kronik, gagal jantung, penyakit hati kronik.
 - e. Tidak bersedia mengikuti penelitian.

5. BESAR SAMPEL.

Besar sampel 30 penderita arthritis lepra.

6. BAHAN DAN ALAT.

Bahan :

- a. Sampel dari biopsi jaringan sinovial yang dimasukkan dalam tabung khusus/standart PCR yang dibekukan.
- b. PCR buffer adalah buffer dimana reaksi enzimatik ini terjadi, terdiri dari : 100 mM Tris HCl, 500 mM KCl/ NaCl, 0,1% gelatin untuk menstabilkan enzim.
- c. MgCl₂ 25 mM untuk mengoptimalkan bekerjanya enzim taq polimerase
- d. dNTP (deoksi- nukleosid tri fosfat) : dATP, dCTP, dTTP, dGTP, atau dUTP
- e. Primer (oligonukleotida penuntun) sekitar 50 mer, merupakan fragmen nukleotida yang komplementer dengan ujung-ujung fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. Terdapat primer forward dan primer reverse.
Primer : S13 : CTCCACCTGGACCGGCGAT
S62 : GACTAGCCTGCCAAGTCG
- f. Template adalah DNA target yang akan dilipatgandakan dan merupakan cetakan dari untai DNA yang akan disintesis.
- g. Air suling ultra pure yang telah disterilkan.
- h. Enzim taq polimerase yang bersifat termostabil pada suhu tinggi
- i. Uridin DNA glikosilase (UDG) untuk memfragmentasi amplimer yang mengandung urasil yang mengkontaminasi template DNA.

Alat :

- a. Mesin PCR (thermocycling machine) yang memiliki lempengan atau plate untuk mengubah suhu secara siklis. Tinggi rendahnya suhu, lama pemanasan dalam suhu tertentu serta jumlah ulangan / cycle dapat diprogram sesuai dengan kebutuhan. (Hybode OMN-E limited 1995)
- b. Elektroforesis dengan transiluminator sinar ultra violet
- c. Densitometer spektrofotometri.
- d. Mikropipet
- e. Freezer
- f. Kamera polaroid
- g. Sarung tangan
- h. Tabung-tabung kecil standart untuk PCR

Metoda

Isolasi DNA bakteri lepra dari jaringan sinovial dengan teknik BOOM menurut protokol PCR dari Klatser, karena sampel yang didapat diduga mengandung DNA sedikit. Bila sampel cukup banyak mengandung DNA dapat dilihat secara kasar pita DNA dengan teknik elektroforesis sebelum dilakukan amplifikasi. Karena penelitian ini pada umumnya sampel sedikit mengandung DNA maka hasil isolasi DNA langsung diamplifikasi dengan metode PCR agar dapat terdeteksi dengan jelas menggunakan teknik elektroforesis.

Teknik biopsi terbuka, untuk mencegah kontaminasi dilakukan kompres alkohol 96% selama 10 menit dan dipilih daerah yang tidak menunjukkan lesi lepra.

Keberhasilan hasil PCR / optimalisasi ditentukan oleh :

- panjang pendeknya primer
- konsentrasi DNA template
- Waktu/ temperatur melting
- Temperatur denaturasi, annealing dan ekstensi
- Konsentrasi reagen

Teknik hibridasi/ digesti DNA dapat pula meningkatkan keberhasilan PCR.

7. DEFINISI OPERASIONAL

- a. Arthritis; peradangan sendi subyektif dan obyektif, berupa nyeri, bengkak, merah, panas, dan gangguan fungsi sendi.
- b. Arthritis lepra : arthritis yang timbul disebabkan mikobakterium lepra pada penderita lepra dan tidak terbukti masuk kriteria diagnosis arthritis yang lain.
- c. Poliarthritis : arthritis yang menyerang 5 sendi atau lebih .
- d. Oligoarthritis : arthritis yang menyerang 2-4 sendi
- e. Monoarthritis : arthritis yang hanya menyerang satu sendi.
- f. Arthritis simetris : awitan arthritis terjadi secara bersamaan pada sendi sisi kanan dan kiri.
- g. PCR: Polymerase Chain Reaction; suatu metode diagnostik non konvensional untuk mendeteksi adanya organisme dengan cara amplifikasi atau pelipatgandaan DNA atau fragmen DNA organisme tersebut.

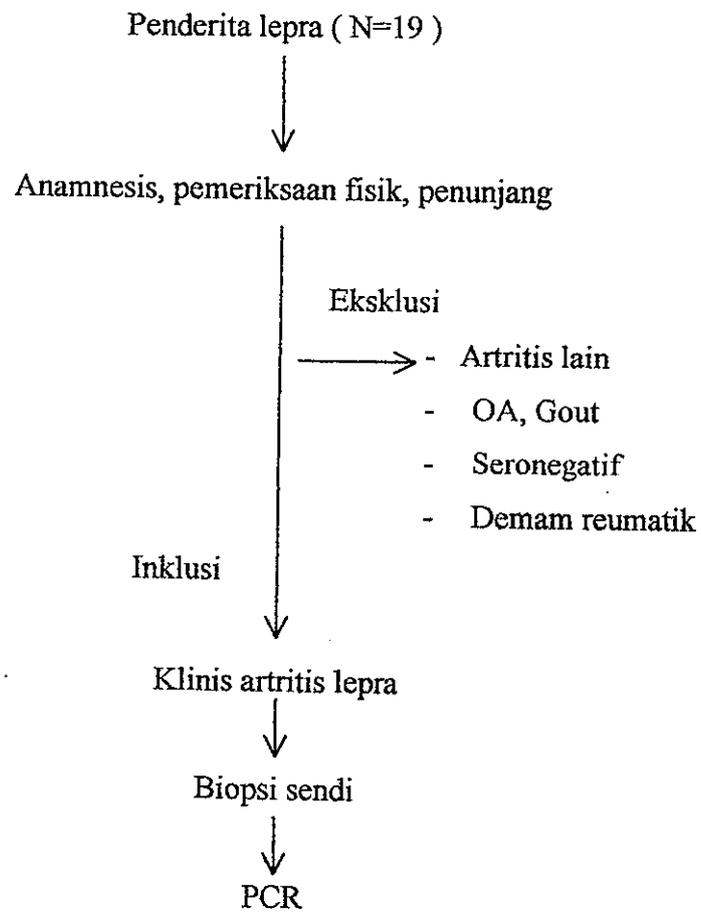
8. CARA KERJA .

Pada setiap responden penelitian dilakukan :

- a. Anamnesis; lokasi sendi yang terlibat, jumlah sendi, lama keluhan, status pengobatan (belum pernah, dalam, atau selesai pengobatan, lama pengobatan, jenis obat)
- b. Pemeriksaan fisik :
 - Umum
 - Khusus : lokasi, jumlah, tanda tanda arthritis, deformitas
- c. Penunjang :
 - laboratorium :
 - darah rutin : Hb, Ht, lekosit, trombosi, LED
 - Kimia darah: gula darah sewaktu, ureum, kreatinin, asam urat, alkali fosfatase, kalsium, faktor reumatoid dengan titer, CRP
 - Cairan sendi : pengecatan langsung, kultur bactec.
 - Foto sendi dilakukan pada sendi yang terlibat.

- Biopsi jaringan sinovium dilakukan pada satu sendi dengan artritis yang jelas. Jaringan hasil biopsi dimasukkan tabung khusus/ standart pemeriksaan PCR untuk dilakukan pemeriksaan PCR.
- d. Pemeriksaan fisik dan sendi dilakukan oleh seorang ahli reumatologi.
- Analisis foto sendi oleh ahli radiologik yang tidak mengetahui keadaan klinis penderita.
 - Biopsi sendi dilakukan oleh ahli bedah tulang.
 - Untuk menghindari kontaminasi dilakukan kompres alkohol 96% selama 10 menit dan dipilih daerah yang tidak menunjukkan lesi lepra.
 - Pemeriksaan cairan sinovial, pengecatan langsung oleh ahli mikrobiologi.
 - Pemeriksaan PCR dilakukan di laboratorium kedokteran tropis UGM dan PAU biotek UGM di Yogyakarta, protokol yang digunakan adalah menurut PR Klatser.
 - Pemeriksaan PCR oleh peneliti sendiri dan disupervisi oleh ahli biologi molekuler dari PAU biotek UGM.
 - Data dikumpulkan oleh peneliti dan pembantu peneliti yang telah dilatih.
 - Kriteria diagnostik artritis reumatoid menggunakan kriteria American College of Rheumatology 1987.
 - Kriteria diagnostik demam rematik akut menggunakan kriteria Jones yang diperbaiki (1992 update)
 - Kriteria diagnostik artritis Gout menggunakan kriteria artritis Gout American Rheumatic Association 1977.
 - OA diagnosis menurut kriteria Altman tahun 1987
 - Artritis infektif : artritis dengan positif kuman direk/ indirek.

e. Bagan urutan kerja



BAB V HASIL PENELITIAN

Sejak 1 juli 1998 sampai akhir Februari 2000, didapatkan 69 (12,3%) penderita arthritis dari 532 penderita kusta yang berobat di RS Kusta Tugurejo Semarang (126 penderita rawat inap), tetapi hanya 31 penderita yang masuk kriteria inklusi (tabel 1a). Di dalam penelitian ini tidak didapatkan jenis arthritis yang lain. Dari 31 penderita yang masuk kriteria inklusi tersebut, 19 penderita yang bersedia menjadi responden dan bersedia dilakukan biopsi sendi, sedangkan sisanya 12 penderita menolak biopsi. Jumlah penderita yang diteliti 19 orang dengan perincian 16 penderita laki-laki dan 3 orang wanita. Umur rata-rata penderita 35,2 tahun (tabel 1b). Penderita yang dieksklusi 38 orang karena : 16 orang luka terbuka, 5 orang umur dibawah 14 tahun, 17 orang tidak mungkin dibiopsi. Lama menderita lepra \pm 6 tahun. Diagnosis penyakit lepra berdasarkan gambaran klinik dan bakteriologik (WHO). Biopsi sendi dapat dilakukan pada semua responden yang bersedia yaitu 19 orang. Dari 19 orang yang bersedia dibiopsi 13 orang dengan reaksi lepra dan 6 orang non reaksi lepra. Gambaran klinis arthritis lepra terdiri dari poliartritis simetris 10 orang penderita, poliartritis asimetris 5 orang, oligoartritis 2 orang dan monoartritis 2 orang. (tabel 2)

Sampel hasil biopsi jaringan sendi 19 orang yang menjadi responden disimpan dalam tabung khusus/ standart dalam keadaan beku. Kemudian dilakukan isolasi DNA jaringan sendi tersebut dengan teknik BOOM dari Klatser karena bahan yang cukup kecil.

Pada penelitian ini dikerjakan 2 kali pemeriksaan dengan kadar sampel DNA yang sudah diisolasi masing- masing sebanyak 2,5 uL dan 5 uL. Hasil amplifikasi/ PCR dengan kadar 2,5 uL dimasukkan dalam sumur gel agarose 2% dengan pengecatan ethidium bromide, tervisualisasi sebanyak 13 sampel yang sangat jelas pada elektroforesis dengan transiluminasi sinar ultra violet (dari 19 sampel DNA). Sedangkan hasil dengan kadar sampel yang lebih besar yaitu 5 uL didapat hasil 16 PCR tervisualisasikan sangat jelas. Hasil PCR positif dengan kadar sampel 2,5 uL sebagai berikut : poliartritis simetris 5 sampel, poliartritis asimetris 4 sampel, oligoartritis 2

sampel dan monoarthritis 2 sampel. Untuk kadar 5 uL didapat hasil : poliarthritis simetris 7 sampel, poliarthritis asimetris 5 sampel, oligoarthritis 2 sampel dan monoarthritis 2 sampel.

Tabel 1a: Penderita yang masuk kriteria inklusi

Umur/ jenis kelamin	laki-laki	wanita	jumlah
< 19 tahun	2	1	3
20 – 29 tahun	9	2	11
30 – 39 tahun	7	1	8
40 – 49 tahun	1	3	4
50 – 59 tahun	2	2	4
> 60 tahun	1	0	1
Jumlah	22	9	31

Tabel 1b : Jenis kelamin dan umur

Umur/ jenis kelamin	laki-laki	wanita	jumlah
< 19 tahun	2	1	3
20 – 29 tahun	7	1	8
30 – 39 tahun	4	-	4
40 – 49 tahun	1	-	1
50 – 59 tahun	1	1	2
> 60 tahun	1	-	1
Jumlah	16	3	19

Dari tabel di atas terlihat umur terbanyak antara 20 – 39 tahun.

Tabel 2 : Gambaran klinik artritis lepra dan jenis kelamin

Gambaran/ jenis kelamin	laki-laki	wanita	jumlah
Poliartritis simetris	9	1	10
Poliartritis asimetris	4	1	5
Oligoartritis	1	1	2
Monoartritis	2	-	2
Jumlah	16	3	19

Dari data/ tabel terbanyak poliartritis simetris.

Tabel 3 : Tipe lepra dan status terapi

Tipe/ status	Belum	Dalam	Selesai	Jumlah
TT	-	1	3	4
BT	-	1	1	2
BL	-	3	1	4
LL	-	2	2	4
LL + ENL	-	3	2	5
Jumlah	-	10	9	19

Dari tabel di atas sedang dalam pengobatan 10 penderita. Sudah selesai terapi 9 orang.

Tabel 4 : Gambaran klinik, pengecatan BTA dan PCR

BTA/ PCR/ Klinik	Pol sim (10)	Pol asim (5)	Oligo (2)	Mono (2)	Jumlah (19)
BTA cairan sendi	-	-	-	-	-
PCR sampel 2,5uL	5	4	2	2	13
PCR sampel 5 uL	7	5	2	2	16

Dari tabel terlihat hasil pengecatan BTA direk pada cairan sendi menunjukkan hasil yang negatif. PCR dengan konsentrasi sampel standart 2,5 uL didapat hasil DNA 13 positif, sedang konsentrasi yang ditingkatkan 2 kali yaitu sebesar 5 uL didapat hasil DNA positif pada 16 sampel.

Tabel 5 : Tipe lepra dan PCR

PCR / tipe lepra	LL (4)	LL + ENL (5)	BL (4)	BT (2)	TT (4)	Jumlah (19)
PCR kons 2,5 uL	4	4	2	1	2	13
PCR kons 5 uL	4	5	4	1	2	16

Dari tabel terlihat lepra dengan multi basiler (BL, LL) sebagian besar PCR positif, sedang pada pauci basiler (BT,TT) PCR positif 50% .

Tabel 6 : PCR dan artritis dengan atau tanpa reaksi lepra

PCR / Artritis	Dg reaksi lepra (13)	tanpa reaksi lepra (6)	Jumlah (19)
PCR kons 2,5 uL	7	6	13
PCR kons 5 uL	10	6	16

Dari tabel terlihat PCR pada artritis tanpa reaksi lepra menunjukkan hasil positif semua baik konsentrasi 2,5 uL maupun 5 uL. Hasil PCR pada artritis dengan reaksi lepra positif 7 dari 13 penderita dengan kadar sampel 2,5 uL. Hasil PCR kadar 5 ul meningkat menjadi 10 dari 16 penderita.

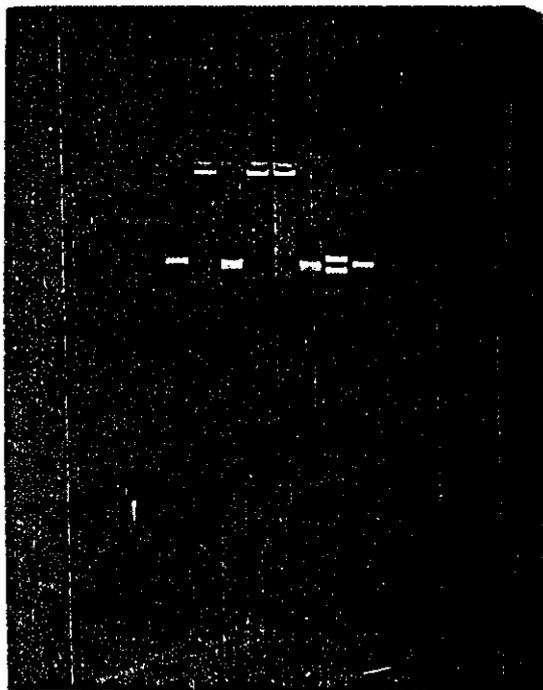
Tabel 7 : Histopatologi dan PCR

Histo – PCR / Klinik	Pol sim (10)	Pol asim (5)	Oligo (2)	Mono (2)	Jumlah (19)
Histo/ PA (BTA, Sel busa, gran)	6	-	2	-	8
PCR 2,5 uL	5	4	2	2	13
PCR 5 uL	7	5	2	2	16

Dari data tabel terlihat secara histopatologik direk (BTA) dan indirek (sel busa, granuloma makrofag) positif pada 8 kasus. Sedang PCR dengan konsentrasi 2,5 uL dapat mendeteksi 13 dari 19 kasus (68,42%) dan pada konsentrasi 5 uL dapat mendeteksi 16 DNA dari 19 kasus (84,21%).

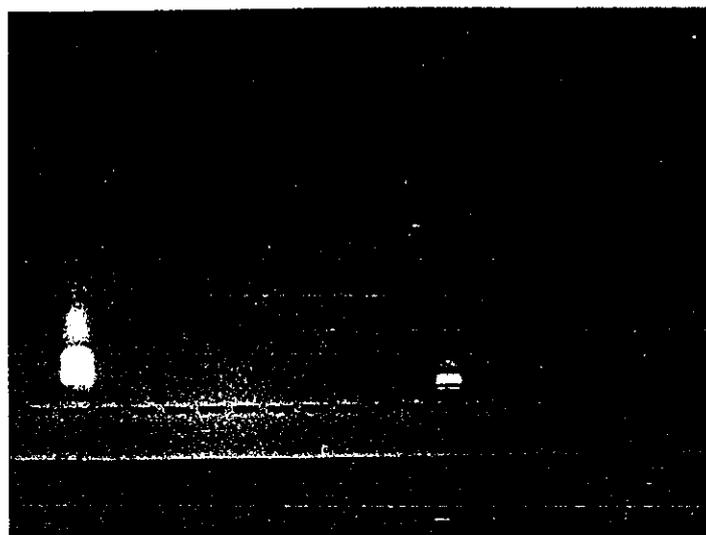
Gambar 3 : Hasil elektroforesis dengan transiluminasi sinar ultra violet pada gel agarosa dengan pengecatan ethidium bromida kemudian difoto dengan kamera polaroid.

A



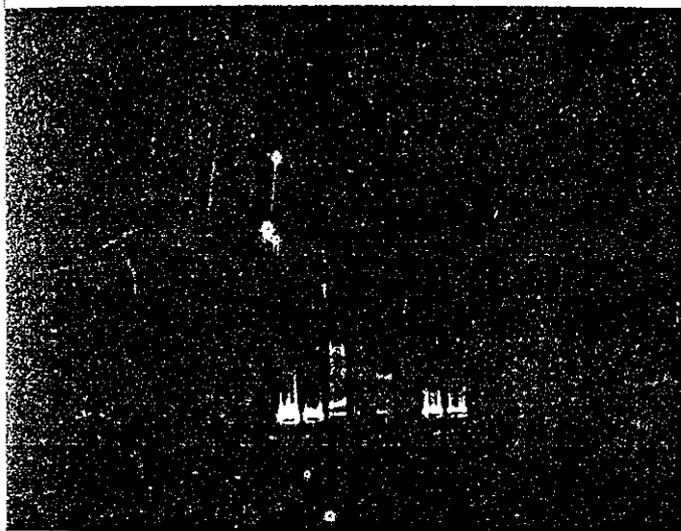
1 2 3 4 5 6 7 8

C



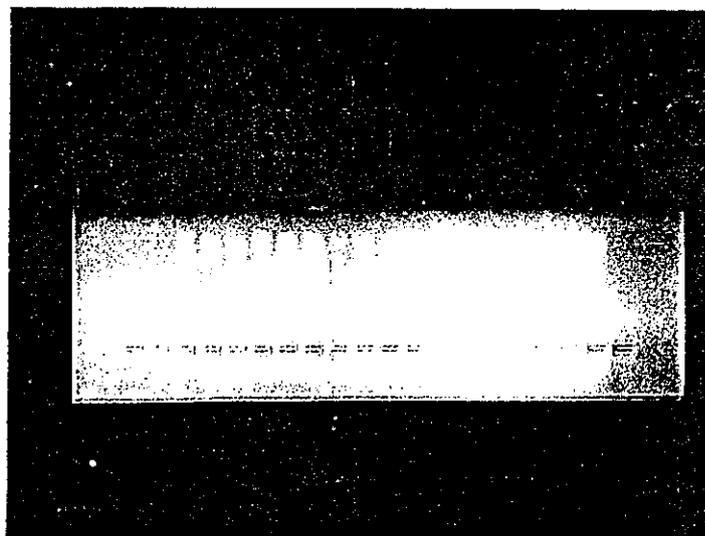
1 16

B



1 9 10 11 12 13 14 15

D



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Keterangan gambar :

- 3A. - Lajur kesatu marker DNA
- Lajur kedua sampai lajur kedelapan DNA positif dari mikobakterium lepra penderit kesatu sampai ketujuh
- 3B. - Lajur kesatu marker DNA
Lajur sembilan dan sepuluh DNA positif dari mikobakterium lepra penderit no 8 dan 9.
Lajur 11 DNA negatif penderit no.10
Lajur 12 DNA positif penderit no.11
Lajur 13 DNA negatif penderit no.12
Lajur 14 dan 15 DNA positif penderit no 13 dan 14
- 3C. - Lajur kesatu marker DNA
Lajur 16 DNA positif penderit no.15
- 3D. Gambar peningkatan konsentrasi DNA template 5 uL
Positif ada 16 penderit

BAB VI PEMBAHASAN

Jenis kelamin dan umur

Pada penelitian ini jumlah penderita yang masuk kriteria inklusi sebanyak 31 orang, yang diteliti sebanyak 19 orang, yang terdiri dari 16 orang pria dan 3 orang wanita. Umur dibawah 40 tahun sebanyak 15 orang (78,94%). Umur penderita terbanyak antara 20 – 39 tahun. Usia rerata 34,7 tahun. Atkin (1989) pada studi 66 penderita lepra terdiri 44 laki-laki, 22 penderita perempuan usia rerata 34,3 tahun, 33 orang dengan artritis . Singh (1994) pada 60 penderita lepra terdiri 40 laki-laki dan 20 perempuan, usia rerata 30,7 tahun, 19 orang dengan artritis. Gibson (1994) pada 48 penderita lepra dengan 20 orang artritis terdiri dari 14 laki-laki dan 6 orang perempuan, usia rerata 33,5 tahun.

Penderita artritis lepra sebagian besar (78,94%) termasuk kelompok usia produktif dan ini sesuai dengan peneliti lain.

Gambaran klinis artritis lepra

Gambaran klinis berupa poliartritis simetris sebanyak 10 orang dari 19 penderita (52,63%), poliartritis asimetris didapat 5 orang (26,31%), oligoartritis 2 orang (10,52%) dan mono artritis sebanyak 2 orang (10,52%). Bentuk poliartritis simetris ini hampir mirip dengan penelitian Atkin (60,6%). Akan tetapi berbeda dengan laporan dari Singh (100%) dan Gibson (100%). Perlu diketahui baik Atkin, Singh dan Gibson tidak melaporkan adanya kuman/ DNA kuman lepra pada laporan penelitiannya.

Pada penelitian ini ditemukan pula bentuk poliartritis asimetris yang belum pernah dilaporkan. Hal ini mungkin disebabkan karena dalam penelitian ini, semua penderita sudah pernah atau sedang dalam pengobatan, dan mungkin pengobatan tersebut mempengaruhi bentuk-bentuk yang ditemukan dan ini memang jarang.

Tipe lepra dan status terapi

Penderita sedang dalam pengobatan lepra sebanyak 10 orang (52,63%) dan sudah selesai pengobatan ada 9 orang (47,36%). Tidak ada satupun yang belum pernah berobat.

Gambaran klinik, pengecatan BTA dan PCR

Tidak ada satu preparatpun pemeriksaan direk BTA yang menunjukkan hasil BTA positif. Hal ini menunjukkan bahwa pemeriksaan direk kuman lepra sangat sulit.

Tipe lepra dan PCR

Tipe lepra yang multibasiler (LL, BL) didapatkan hasil sebagian besar positif (80 – 100%). Sedang tipe yang pausi basiler (TT, BT) didapatkan hasil PCR positif 50%.

Hal ini menunjukkan hubungan adanya banyaknya kuman lepra pada tipe MB dengan kepositipan PCR.

PCR dan artritis dengan atau tanpa reaksi lepra

Pada artritis lepra tanpa reaksi lepra didapat hasil 100 % PCR positif. Sedang pada artritis dengan reaksi lepra didapat hasil lebih sedikit. Pada konsentrasi 2,5 ul dapat tervisualisasi 7 dari 13 penderita (48,84%) pada artritis lepra dengan reaksi lepra. Pada konsentrasi 5 uL tervisualisasi 10 dari 13 penderita (76,92%). Sedang untuk artritis tanpa reaksi lepra tervisualisasi DNA konsentrasi 2,5 uL maupun 5 uL 100%.

Histopatologik dan PCR

Dari hasil pemeriksaan histopatologi didapat 8 sampel menunjukkan kuman mikobakterium lepra baik direk (BTA) maupun indirek (sel busa dan granuloma makrofag) positif dari 19 penderita (42,10%), dengan perincian 6 sampel (31,57%) dengan poliartritis simetris dan 2 sampel (10,52%) dengan

oligoarthritis. Sedang dengan PCR didapat hasil tervisualisasi 13 dari 19 penderita (68,42%) terdiri atas poliarthritis simetris 5 penderita (26,31%), poliarthritis asimetris 4 penderita (21,05%), oligoarthritis 2 penderita (10,52%) dan monoarthritis 2 penderita (10,52%). Konsentrasi sampel DNA 5 uL berhasil meningkatkan PCR positif menjadi 16 dari 19 penderita (84,21%). Sampai saat ini belum ada data dari kepustakaan yang dapat dibandingkan dengan penelitian ini. Temuan pada penelitian ini dapat sedikit menjawab kontroversi patogenesis arthritis lepra yang selalu dipertentangkan.

Dari hasil di atas dapat dikatakan bahwa metoda PCR lebih baik dibanding dengan histopatologik. Dengan PCR dapat meningkatkan diagnosis

Hasil pemeriksaan PCR

Pada konsentrasi sampel DNA template 2,5 uL setelah diamplifikasi sesuai protokol Klatser dapat tervisualisasi 13 sampel penderita (68,42%) sedangkan pada konsentrasi DNA template 5 uL tervisualisasi 16 sampel (84,21%).

1. Keterbatasan penelitian

- a. Jumlah responden terlalu sedikit
- b. Keterbatasan dana, waktu, sarana dan tenaga
- c. Biopsi dilakukan terbuka tidak menggunakan teknik artroskopi.
- d. Tidak dilakukan teknik hibridasi DNA atau *shouthern blot*.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

1. KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

- Terdapat DNA kuman lepra pada jaringan sendi penderita dengan klinis artritis lepra
- Pemeriksaan dengan metode PCR dapat mendeteksi adanya DNA kuman lepra di jaringan sendi penderita dengan klinis artritis lepra.
- Dari data di atas dikesankan artritis lepra termasuk artritis infeksi.

2. SARAN

- a. Perlu dilakukan penelitian lanjut dengan jumlah sampel yang cukup.
- b. Biopsi sendi sebaiknya dilakukan dengan teknik artroskopi untuk meminimalkan kemungkinan kontaminasi mikobakterium dari luar sendi.

BAB VIII

RINGKASAN

- Identifikasi kuman lepra sangat sulit dan seringkali menemui kegagalan dengan metode konvensional.
- Deteksi DNA kuman lepra pada jaringan sendi dengan metode PCR belum pernah dilakukan.
- Pengecatan BTA cairan sendi tidak menunjukkan adanya kuman mikobakterium lepra.
- Histopatologik menunjukkan 8 penderita positif mengandung mikobakterium lepra, terdiri dari direk (BTA) 4 penderita (21,05%) dan indirek (sel busa) 3 penderita (15,78%) dan granuloma makrofag 1 penderita (5,26%).
- PCR dengan konsentrasi DNA template 2,5 uL positif 13 penderita (68,42%) dan konsentrasi 5 uL positif 16 penderita (84, 21%)
- PCR lebih baik dari metoda konvensional dan dapat meningkatkan diagnosis.
- Arthritis lepra dikesankan termasuk arthritis infeksi.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Global strategy for the elimination of leprosy as a public health problem (update 1996). Geneva: WHO, 1996
2. Hasibuan Y. Perkembangan terakhir pemberantasan penyakit kusta di Indonesia. Dalam: Kumpulan naskah pertemuan ilmiah tahunan nasional PERDOSKI 1994: 1-17
3. Direktorat P2ML. Dit.jen PPM dan PLP. Pedoman eliminasi kusta tahun 2000, 1996
4. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Buku pedoman pemberantasan penyakit kusta. Cetakan IX, 1995
5. Bonvoisin B, Martin JM, Bouvier M, Bocquet B, Bouliat J, and Duvion JP. Articular manifestation in leprosy. *Sem-Hop-Paris* 1983; 59 (5) : 302-5
6. Gibson T, Ahsan G, and Hussein K. Arthritis of leprosy. *Br J Rheumatol* 1994; 33 (10): 963-6
7. Pernambuco JCA and Cossermeli- Messina W. Rheumatic manifestations of leprosy: Clinical aspects. *J Rheumatol* 1993; 20 : 897-9
8. Meissner RP. Arthritis due to mycobacteria, fungi, and parasites. In: Mc Carty DJ and Koopman WJ eds. *Arthritis and allied condition, a textbook of rheumatology*. Vol 2. 12th ed. Philadelphia: Lea and Febiger 1993 ; 118: 2035-46
9. Husskison EC and Hart FD. *Joint disease: All the artropathies*. 3rd ed. London: John Wright & sons Ltd 1978: 65
10. Atkir SL, El- Ghobarey A, Kamel M, Owen JP, and Dick WC. Clinical and laboratory studies of arthritis in leprosy. *Br Med J* 1989; 298: 1423-5
11. Holla VV, Kenetkar MV, Kolhatkar MK, and Kulkarin CN. Leprous synovitis: a study of fifty cases. *Int-J-Lep-Other-Mycobact-Dis* 1983; 51(I): 29-32 (abstract)
12. Soenarto, Suyanto Hadi, Agung Dwi. *Arthritis of leprosy*. Applar symposium 1994, Kuala Lumpur, Malaysia
13. Brock TD, Madigan MT, Martinko JM and Parker J. *Biology of microorganisms*. 7th ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, 1994: 12
14. Stokes EJ. *Clinical bacteriology*. 4th ed ; Edward arnold, London 1979: 1-17
15. Male D, Champio B, Cooke A, Owen M. *Advanced immunology*. 13th ed; JP Lippincot Co, London 1991: 14.1-14.13

16. Ausbel FM, Brent RE. Kingstone. Current protocols in molecular biology. Green publishing associates and wileyinterscience 1991: 15.03-15.07
17. De Cresce RP, MS Lifshitz. PCR and the future of molecular testing medical laboratory observe. 1993: 28-33
18. Gao SJ, Moore PS. Molecular approach to the identification of unculturable infectious agents. Emerging infectious dis 1996,2 (3): 159-65
19. Sheeler P, Bianchi D. Cell and molecular biology. 3rd ed; J Wiley and Sons inc, Canada 1987: 153-8
20. Newton CR, Graham A. Introduction to biotechniques PCR. Oxford, Bioscientific publishers, 1994
21. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, and White TJ, eds. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Washington DC, American Society for microbiology. 1993
22. Saiki RK. Amplification of genomic DNA. In: Innis, MA et al, eds. PCR protocols, a guide to methods and application. Sandiego, Academic press, inc. 1990: 13-20
23. Glick B, Pasternack JJ. Molecular biotechnology : Principles and application of recombinant DNA. Washington DC, American society for microbiology. 1994
24. Einstein BI. The polymerase chain reaction, a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. The new England Journal of medicine 1990: 178-82
25. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific America 1990 (4): 36-43
26. Schohhelman G, Jones WK. Polymerase chain reaction. J, Inf. dis. 1994; 158: 154 -6
27. Roy AC, Ratnam SS. The polymerase chain reaction, a new versatile tool for DNA cloning in vitro. J of Med Lab Sc; Dec 1991, 5 (2) : 61-8
28. Haisch CE. The use of polymerase chain reaction in clinical infectious diseases. Infec dis in Clin. Practice: March- April 1996, 5 (3): 180-4
29. Degits K. Detection of microbial DNA in the skin etiologic insights and diagnostic perspectives. Arch dermatol; Jan 1996: 71-5
30. Klatser PR. Molecular biology of mycobacterium tuberculosis. Kursus singkat diagnosis molekuler tuberkulosis dan lepra. UGM, Yogyakarta. 1997

31. Klatser PR. Amplification reaction in mycobacterium. Kursus singkat diagnosis molekuler tuberkulosis dan lepra. UGM, Yogyakarta, 1997
32. Klatser PR, De Wit MYI, Faber WR. Application of polymerase chain reaction for the detection of mycobacterium tuberculosis and leprae in the infected tissues. Proceeding of the mycobacterium research. Italy; 1992: 234-8
33. Wiroharjoyo YW. PCR untuk deteksi mikobakterium leprae. Kursus singkat diagnosis molekuler tuberkulosis dan lepra. Pusat kedokteran tropis UGM; Yogyakarta, 1997
34. Supargiyono. Reaksi berantai polimerase (PCR). Workshop on molecular biology of dengue. Pusat kedokteran tropis UGM, Yogyakarta. 1997
35. Williams DL, Moudgil KD, Gelber RH, Gillis TP. Diagnostic potential of selectively amplifying target regions of the mycobacterium leprae by PCR methodology. Proceedings of the VI leprosy symposium on leprosy research. Italy; 1992: 167-9
36. Fiallo P, William DL, Gillis TP. The detection of mycobacterium leprae from formalin- fixed and parafin-embedded tissues using PCR amplification. Proceedings of the VI leprosy symposium on leprosy research. Italy; 1992: 171-2
37. Klatser PR, De Wit MYI, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Pattyn SR. Application of polymerase chain reaction for the detection of mycobacterium tuberculosis and leprae in the infected tissues. Proceeding of the mycobacterium research. Italy; 1992: 173-4
38. Luesse HG, Kazda J. Detection of M leprae in inviromental resources VIA PCR. Proceedings of the VI leprosy symposium on leprosy research. Italy 1992: 175-7
39. Hatta M. Enhacement of PCR by uracyl-N-Glycosilase on detection of mycobacterium leprae. Jurnal kedokteran YARSI; 1997: 94-101
40. Effendi MH, Matsuoka M, Agusni I. Amplifikasi DNA dari agen penyebab murin leprosy dan human leprosy dengan menggunakan teknik polimerase chain reaction. Acta medica Indonesiana; 1996; 4(28) : 253-6
41. Sastroasmoro S, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. FKUI;1995
42. Lemeshow S, Hosmer DW Jr, Klar J, dan Lwanga SK. Besar sampel dalam penelitian kesehatan. Terjemahan Dibyو Pramono. Yogyakarta: Gadjah Mada university Press, 1997: 1-2.