

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) untuk Mendeteksi Viabilitas *Mycobacterium leprae* pada Pasien Kusta Tipe Multibasiler Pascapengobatan MDT-WHO

(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Detection of Viable *Mycobacterium leprae* in Multibacilar Type Patients after MDT-WHO Treatment)

Lunni Gayatri, M. Yulianto Listiawan, Indropo Agusni

Departemen/Staf Medik Fungsional Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang: Kusta masih menjadi masalah besar di Indonesia. Penatalaksanaan dengan MDT-WHO telah menjadi regimen standar untuk pasien kusta sejak lama. Pada pasien kusta tipe multibasiler (MB), indeks bakteriologis (IB) belum mencapai nilai nol, meskipun telah menyelesaikan terapi 12 regimen. Metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) memiliki sensitivitas tinggi untuk mendeteksi viabilitas *M. leprae*. **Tujuan:** Mengevaluasi viabilitas *M. leprae* dengan metode RT-PCR pada pasien kusta tipe MB yang telah menyelesaikan regimen MDT 12 di RSUD Dr. Soetomo Surabaya. **Metode:** 15 pasien kusta tipe MB yang telah menyelesaikan pengobatan MDT-WHO 12 regimen dengan IB positif dilakukan biopsi kulit untuk pemeriksaan RT-PCR. **Hasil:** Terdapat 13 pasien (86,7%) dengan viabilitas *M. leprae* positif sementara seluruh pasien tersebut (100%) memiliki Indeks Morfologis (IM) 0%. Dua belas pasien (80%) memiliki Indeks Bakteriologis 2+ dan 10 pasien diantaranya adalah pasien kusta tipe *Lepromatous Leprosy* (LL) polar. Delapan pasien yang memiliki viabilitas positif tidak mendapatkan kortikosteroid oral selama siklus MDT. **Simpulan:** Pasien kusta yang telah menyelesaikan terapi MDT dengan MI 0%, didapatkan viabilitas *M. Leprae* positif dengan metode RT-PCR. Spektrum klinis pasien yang ditentukan dari imunitas seluler nampaknya menjadi faktor terpenting dalam viabilitas *M. leprae*.

Kata kunci: viabilitas, *M. leprae*, kusta tipe multibasiler, RT-PCR.

ABSTRACT

Background: Leprosy disease is still a big problem in Indonesia. MDT-WHO treatment has become a standard regiment for leprosy patient since many years ago. In multibacilar (MB) type patient, we found that the bacteriological index (BI) has not reach a zero value yet, even the patient already finish their therapy for 12 regiment. *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) method has a high sensitivity to detect the viability of *M. leprae*. **Purpose:** To evaluate the result of *M. leprae* viability based on RT-PCR method in multibasilar type leprosy patient who has finished the MDT for 12 regiment in Dr. Soetomo General Hospital Surabaya. **Methods:** 15 multibacilar type patients who has finished the 12 regiment MDT with the positive BI were taken the skin biopsy for RT-PCR examination. **Results:** There were 13 patients (86.7%) with positive viability of *M. leprae* while the morphological index (MI) are 0% from all of the 15 patients after therapy (100%). Twelve patients (80%) has +2 of BI and 10 patients of them are polar lepromatous leprosy (LL) type. Eight patients of them who has the positive viability had not received oral corticosteroid while they were in MDT cycle. **Conclusions:** Leprosy patient who has done the MDT treatment that show 0% of MI value, have a positive viability detected by the RT-PCR method. The clinical spectrum of the patient which is show their cellular immunity could be the biggest factor that can affect the viability of *M. leprae*.

Key words : viability, *M. leprae*, multibacilar type of leprosy, RT-PCR.

Alamat korespondensi: Lunni Gayatri, Departemen/Staf Medik Fungsional Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 6-8 Surabaya 60131, Indonesia. Telepon: (031) 5501609, e-mail: lunnigayatri@gmail.com

PENDAHULUAN

Penyakit kusta masih menjadi masalah besar di Indonesia. Tahun 2010 jumlah kasus kusta baru di Indonesia tercatat 10.706, dan jumlah kasus terdaftar sebanyak 20.329 dengan prevalensi 0,86 per 10.000 penduduk, 82,15% diantaranya adalah pasien tipe multibasiler (MB).¹ Angka kejadian kasus kusta pada anak masih terdapat di wilayah Surabaya dan sekitarnya. Dari catatan medik kasus baru kusta di Unit Rawat Jalan (URJ) RSUD Dr. Soetomo pada anak usia 10-14 tahun periode 2009-2011 sebesar 37 anak. Hal ini mengindikasikan transmisi penyakit kusta masih belum dapat diputus, sehingga pasien MB masih merupakan sumber penularan dan tingginya tipe MB ini menjadi masalah epidemiologi.

Terapi MDT pada kusta belum sepenuhnya berhasil di beberapa negara khususnya daerah endemik seperti di Indonesia, jumlah kasus baru terus bertambah, meskipun hal ini bukan sepenuhnya karena faktor pengobatan, namun kajian ulang terhadap metode pengobatan mulai ditingkatkan.² Berdasarkan data catatan medis di Divisi Morbus Hansen URJ Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya di akhir tahun 2012, terdapat 30 pasien yang kontrol ke URJ dan masih memiliki IB yang positif walaupun telah menyelesaikan pengobatan MDT WHO 12 regimen.

Untuk mendeteksi viabilitas *M. leprae* saat ini dapat digunakan teknik *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). RT-PCR adalah suatu metode untuk mendeteksi *ribonucleic acid* (RNA) yang dapat menggambarkan viabilitas lebih baik karena RNA didegradasi beberapa menit setelah sel mati.³ Beberapa penelitian viabilitas *M. leprae* dengan menggunakan RT-PCR telah dilakukan. Chae dan kawan-kawan, tahun 2002 menilai efikasi MDT-WHO terhadap kusta dan ditemukan 14 (63,6%) dari 22 pasien menunjukkan hasil RT-PCR yang positif kuman *viable* setelah pengobatan 12 bulan, dan menurun menjadi 30% setelah 24 bulan. Hehanussa pada tahun 2009 melakukan penelitian tentang viabilitas *M. leprae* dengan metode RT-PCR pada pasien kusta MB yang diobati MDT-WHO selama 4 bulan dari 30 sampel ditemukan kuman *M. leprae* yang *viable* sebanyak 18 orang (60%).⁴

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas *M. leprae* dari jaringan biopsi kulit pada pasien kusta MB yang telah mendapat terapi MDT-WHO 12 regimen dengan pemeriksaan RT-PCR. Selain itu penelitian ini juga bertujuan untuk mengevaluasi faktor-faktor yang

memengaruhi pada pasien kusta tipe MB yang masih terdapat *M. leprae viable* meskipun telah diobati dengan MDT MB – WHO 12 regimen.

Manfaat penelitian ini secara teoritis untuk memberikan informasi tentang faktor yang memengaruhi viabilitas kuman *M. leprae*. Manfaat klinis dari penelitian ini untuk mengevaluasi keberhasilan terapi MDT-WHO pada pasien kusta, juga dapat melakukan penatalaksanaan lebih lanjut terhadap pasien kusta yang masih memiliki *M. leprae viable*, dan menjadi data dasar penelitian selanjutnya untuk mengetahui resistensi *M. leprae* terhadap pengobatan, dan penelitian untuk mengetahui pengaruh terapi kortikosteroid terhadap viabilitas *M. leprae*.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, dengan metode potong lintang untuk mengetahui viabilitas *M. leprae* dari jaringan biopsi kulit pasien kusta tipe MB yang sudah diobati MDT-WHO 12 regimen yang datang di Divisi Morbus Hansen URJ Kesehatan Kulit dan Kelamin. Pengambilan sampel dilakukan secara *consecutive sampling* selama 3 bulan, didapatkan 15 sampel selama penelitian. Uji RT-PCR dilakukan di *Tropical Disease Center* Surabaya.

Kriteria penerimaan sampel adalah pasien kusta tipe MB sesuai kriteria diagnosis dari WHO dengan IB yang positif, yang telah menjalani pengobatan MDT-WHO 12 regimen dalam kurun waktu 12-18 bulan, yang telah bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani *informed consent*. Kriteria penolakan sampel adalah pasien yang dalam masa pengobatan 12 regimen MDTL tersebut mendapat terapi steroid lebih dari 12 minggu dengan dosis prednison lebih dari 40 mg, pernah mengalami reaksi tipe 1 selama masa pengobatan, pasien dengan riwayat penyakit diabetes melitus, dan anak-anak berusia kurang dari 14 tahun.

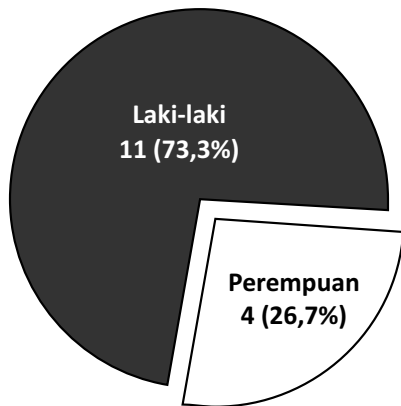
Alur penelitian ini dimulai dengan pemilihan pasien didasarkan pada kriteria penerimaan dan penolakan sampel dengan menandatangani *informed consent*. Pada pasien yang memenuhi kriteria sampel penelitian dilakukan anamnesis tentang keteraturan berobat, lamanya pasien telah dinyatakan selesai pengobatan MDT-WHO 12 regimen, pemeriksaan klinis, pemeriksaan bakteriologis, kemudian dilakukan biopsi kulit di cuping telinga pasien, dari biopsi kulit tersebut dilakukan pemeriksaan RT-PCR. Kemudian dilakukan analisis data terhadap data yang didapatkan.

HASIL

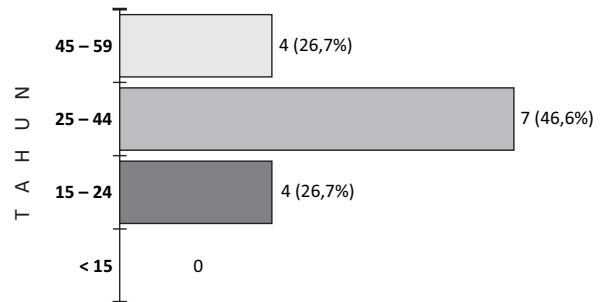
Sebagian besar pasien berjenis kelamin laki-laki yaitu sebanyak 11 pasien (73,3%) dan berjenis kelamin perempuan ada 4 pasien (26,7%) (Gambar 1). Usia pasien kusta tipe MB paling muda 15 tahun dan yang paling tua adalah 59 tahun. Dapat dilihat Gambar 2, kelompok usia 24-44 tahun menunjukkan jumlah terbanyak yaitu 7 pasien (46,6%).

Tipe kusta terbanyak adalah tipe LL sebanyak 13 orang (86,7%). Pada penelitian ini hanya terdapat 2 tipe kusta karena sampel yang dipilih adalah pasien kusta tipe MB dan pemeriksaan BTA yang masih positif (Gambar 3). Berdasarkan pemeriksaan BTA dari

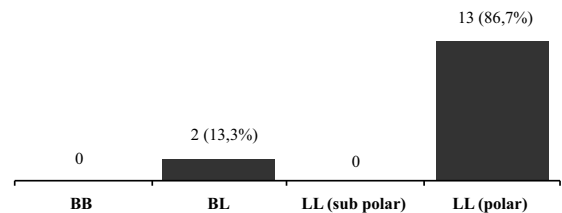
sediaan hapusan sayatan kulit (cuping telinga) maka didapatkan IB dari 15 pasien kusta yang diteliti sesudah pengobatan terdapat 15 orang dengan IB positif (100%) sesuai kriteria penerimaan sampel, yang terdiri atas 3 orang +1 (20%) dan 12 orang +2 (80%) (Gambar 4). Berdasarkan pemeriksaan BTA dari sediaan hapusan sayatan kulit (cuping telinga) maka didapatkan seluruh sampel dengan IM 0% sesudah pengobatan (Gambar 5).



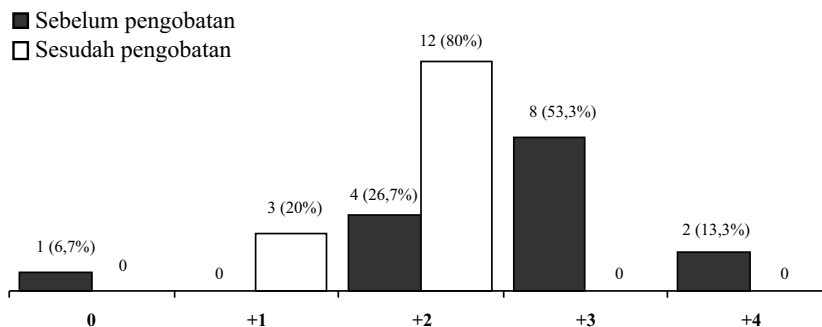
Gambar 1. Distribusi jenis kelamin pasien kusta tipe MB pascapengobatan MDT-WHO.



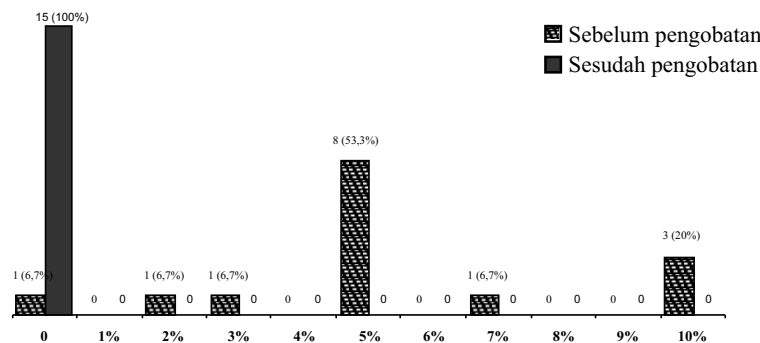
Gambar 2. Distribusi umur pasien kusta tipe MB pasca pengobatan MDT-WHO.



Gambar 3. Distribusi tipe kusta MB pasca pengobatan MDT-WHO.

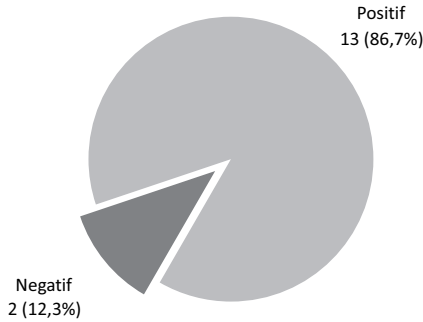


Gambar 4. Distribusi Indeks Bakteriologis sebelum dan sesudah pengobatan.

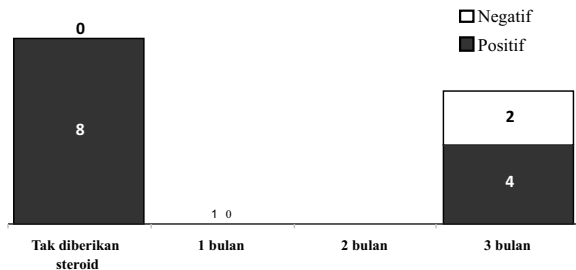


Gambar 5. Distribusi Indeks Morfologi sebelum dan sesudah pengobatan.

Setelah dilakukan pemeriksaan RT-PCR dari biopsi kulit untuk mendeteksi viabilitas *M. leprae* pada 15 pasien kusta tipe MB yang telah diobati MDT MB 12 regimen, didapatkan hasil RNA *M. leprae* positif pada 13 pasien (86,7%) dan RNA *M. leprae* negatif pada 2 pasien (13,3%).



Gambar 6. Distribusi hasil pemeriksaan RT-PCR dari biopsi kulit pasien MB pasca pengobatan MDT-WHO.



Gambar 7. Distribusi penggunaan terapi kortikosteroid selama masa terapi MDT-WHO dihubungkan dengan hasil RT-PCR.

Pada penelitian ini didapatkan 7 pasien yang mendapat terapi kortikosteroid selama masa pengobatan MDT MB – WHO 12 regimen. Dua dari 7 pasien tersebut mempunyai hasil RT-PCR yang negatif. Delapan pasien yang tidak mendapatkan steroid seluruhnya memiliki hasil RT-PCR yang positif (Gambar 7).

PEMBAHASAN

Jumlah pasien kusta yang masuk dalam penelitian ini adalah 15 pasien dari 30 pasien yang mempunyai IB + setelah menyelesaikan regimen MDT-MB WHO. Beberapa diantaranya telah cukup lama menyelesaikan terapi, ada yang lebih dari setahun yang lalu, juga terdapat beberapa pasien yang menderita reaksi ENL dan menjadi steroid-dependent, yaitu pasien yang diterapi steroid lama dan sering diulang, sehingga akan mempengaruhi viabilitas kuman *M. leprae* di akhir masa pengobatan, yang akhirnya dapat menjadi hasil positif palsu.

Gambar 1 menunjukkan jumlah pasien laki-laki sebanyak 11 pasien dan perempuan sebanyak 4 pasien. Hal itu sesuai kepustakaan bahwa penyakit kusta dapat menyerang kedua jenis kelamin, tetapi jumlah laki-laki lebih banyak daripada perempuan dengan rasio 2:1.^{5,6,7} Pada penelitian ini, perbandingan jumlah pasien laki-laki dengan pasien perempuan adalah 3:1. Hal ini disebabkan oleh karena waktu penelitian yang relatif pendek dan jumlah sampel yang tidak banyak. Penelitian Prakoeswa dan kawan-kawan juga didapatkan pasien laki-laki lebih banyak daripada wanita, demikian juga pada penelitian Haroen.^{8,9} Pasien laki-laki lebih banyak daripada perempuan karena laki-laki memiliki mobilitas yang tinggi, sehingga kemungkinan terjadinya kontak dengan sumber penularan kuman kusta lebih besar.^{10,11} Pengaruh faktor lingkungan seperti cara berpakaian juga didapatkan di belahan dunia bagian timur, perempuan memakai pakaian yang lebih tertutup dibandingkan laki-laki, sehingga mengurangi kesempatan untuk terjadinya kontak kulit dengan pasien kusta.

Penyakit kusta dapat terjadi pada semua usia dan sering terjadi dengan bertambahnya usia.^{10,11,12} Usia termuda yang pernah dilaporkan adalah 3 minggu, dan yang paling tua adalah lebih dari 70 tahun.¹⁰ Pada Gambar 2 didapatkan umur pasien kusta termuda 15 tahun dan umur tertua 59 tahun. Kelompok usia 25-44 tahun menunjukkan jumlah terbanyak yaitu sebanyak 7 pasien (46,7%). Data tersebut sesuai dengan data epidemiologis kusta, yaitu rentang usia terbanyak pada kelompok 35-44 tahun.¹⁰ Penelitian Haroen juga menemukan bahwa pasien kusta terbanyak berusia antara 25-44 tahun.⁹ Hasting menyebutkan puncak insidensi pada usia 15-29 tahun. Pada daerah endemis, kusta memiliki kurva distribusi umur dengan dua puncak pada usia 10-14 tahun dan 35-44 tahun.⁷ Kurva bimodal pada daerah endemis yang tinggi menunjukkan adanya 2 masa yang berbeda, pada anak dan dewasa. Hal ini bisa terjadi karena masa inkubasi yang panjang menyebabkan manifestasi klinis timbul lebih lambat. Selain itu penyakit kusta pada usia dewasa di daerah endemis sering sebagai hasil dari reinfeksi atau respons imun yang tidak adekuat terhadap kusta dengan bertambahnya usia.¹³ Data tersebut menunjukkan bahwa pasien kusta usia produktif adalah sumber penularan terbesar yang harus kita waspadai, karena kuman *M. leprae* akan menyebar dari orang tua ke anaknya atau ke saudara dan teman kerja.

Gambar 3 menunjukkan tipe kusta terbanyak dalam penelitian ini adalah tipe LL polar sebanyak 13 pasien (86,7%), tipe BL 2 pasien (13,3%) dan tidak didapatkan pasien kusta tipe BB yang masuk dalam kriteria penerimaan sampel. Pasien kusta tipe LL polar sering terlambat berobat. Hal ini disebabkan karena gangguan saraf minimal dan bercak yang tidak begitu jelas di kulit pada awal tipe kusta ini. Pasien dengan tipe ini biasanya datang dengan reaksi eritema nodosum leprosum (ENL). Sebagian lagi datang dengan deformitas di wajah dan badan seperti *facies leonina*, *madarosis*, penebalan cuping telinga, *glove and stocking anaesthesia*, iktiosis dan lainnya yang merupakan gejala terlambat (*advance*) atau merupakan tanda-tanda infiltratif dari tipe ini.¹⁴ Adanya keterlambatan pengobatan tersebut yang menyebabkan *bacterial load* pada pasien ini menjadi tinggi sehingga pada akhir pengobatan MDT-MB sebanyak 12 regimen, hasil pemeriksaan IB masih positif.

IB adalah ukuran semi kuantitatif kepadatan BTA dalam sediaan apus. Guna IB selain untuk membantu menentukan tipe kusta juga berguna untuk menilai hasil pengobatan. Namun, pemeriksaan bakteriologis ini subyektif dan bisa menghasilkan positif palsu atau negatif palsu karena endapan zat warna, BTA saprofit, serat pada warna, goresan pada *object glass* dan pembacaan yang kurang teliti.¹¹ Pada penelitian ini, kriteria penerimaan sampel adalah pasien kusta yang telah mendapat pengobatan MDT MB 12 regimen dengan hasil IB masih positif, sehingga pada 15 pasien didapatkan IB positif yang nilainya bervariasi. Gambar 4 menunjukkan bahwa di awal terapi, terdapat 4 pasien yang memiliki IB +2, 8 pasien dengan IB +3, dan 2 pasien yang mempunyai IB +4. Jumlah IB yang tinggi menunjukkan bahwa pasien tipe LL di penelitian ini adalah tipe LL polar, dan agak sulit menerapi pasien dengan IB tinggi yang hanya dengan pengobatan MDT selama 1 tahun, karena di akhir masa pengobatan IB tidak bisa mencapai negatif. Di akhir masa pengobatan terdapat 12 pasien yang memiliki IB +2 dan 3 pasien yang IB-nya +1. Bila dilihat dari penurunan IB maka paling tidak terdapat 10 pasien dalam penelitian ini yang mengalami penurunan IB +1 hingga +2 dalam 1 tahun masa pengobatan MDT.

Indeks Morfologis (IM) adalah prosentase basil kusta, bentuk utuh (*solid*) terhadap seluruh BTA. Pemeriksaan IM dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen ini merupakan salah satu pemeriksaan viabilitas *M. leprae* yang sampai sekarang masih rutin dilakukan.^{4,11,15}

Menurut WHO, IM pasien kusta akan menurun dalam 4-8 bulan setelah monoterapi dapson, dan kuman *M. leprae* akan mati sebanyak 99% dalam 1 bulan setelah terapi MDT.^{4,15} Standardisasi pemeriksaan IM ini cukup sulit karena memerlukan teknik pewarnaan BTA yang tepat, tenaga ahli terlatih dan mikroskop berkualitas baik. Deteksi BTA dari pemeriksaan apusan sayatan kulit dengan metode pengecatan Ziehl-Neelsen memiliki sensitivitas rendah karena baru dapat mendeteksi 10^4 *M. leprae* per 1 gram jaringan dan spesifisitas rendah karena didapatkan hasil positif pada mikobakterium lain. Kedua hal ini mempengaruhi kualitas deteksi viabilitas.^{4,8,16} Gambar 5 menunjukkan bahwa dari seluruh pasien kusta yang diikuti dalam penelitian ini, yang mempunyai nilai IM bervariasi, ternyata di akhir terapi MDT selama 12 bulan nilai IM menjadi 0% pada seluruh pasien kusta (100%). Hal ini mendukung teori bahwa dengan pemberian rifampisin yang masuk dalam regimen MDT selama 1 bulan akan membunuh kuman *M. leprae* sebanyak 99%. Pada penelitian Hehanussa, didapatkan setelah 1 bulan terapi IM menjadi 1%, namun setelah terapi bulan ke 2, 3, 4 IM akan menjadi 0%, sehingga disimpulkan bahwa IM akan menurun sesuai lama terapi.⁴

Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa pasien dengan RT-PCR positif, ekstraksi RNA dari biopsi kulit mengandung 16s rRNA *M. leprae*. Gambar 6 menunjukkan bahwa dari 15 pasien kusta tipe klinis LL dan BL yang dilakukan pemeriksaan RT-PCR dari biopsi kulit didapatkan hasil positif pada 13 pasien (86,7%) dan hasil negatif pada 2 orang pasien (13,3%). Selain itu, hasil yang juga diperoleh pada penelitian ini dari seluruh pasien kusta yang IM 0%, yang artinya tidak adanya basil solid (*viable*), ternyata dengan pemeriksaan RT-PCR didapatkan hasil positif pada 13 pasien (86,7%). Sehingga disimpulkan bahwa pemeriksaan RT-PCR lebih sensitif dibandingkan pemeriksaan IM untuk mendeteksi viabilitas *M. leprae*.

Faktor immunosupresi juga merupakan predisposisi adanya viabilitas *M. leprae* setelah pengobatan. Salah satu faktor immunosupresi tersebut adalah adanya pemberian terapi kortikosteroid. Namun, dari literatur didapatkan bahwa penggunaan kortikosteroid 12 minggu yaitu prednisolone 40 mg yang di-*tapering* hingga 5 mg tidak berefek secara signifikan pada pemberantasan *M. leprae*. Tingginya jumlah kuman *M. leprae viable* pada pasien dengan reaksi berulang menunjukkan bahwa tidak disarankan penggunaan steroid jangka panjang tanpa penunjang MDT, selain itu

MDT mungkin perlu diperpanjang pemberiannya pada pasien dengan reaksi dan atau neuritis yang diterapi dengan steroid.¹⁷ Gambar 7 menunjukkan bahwa 8 pasien yang tidak mendapat terapi steroid sama sekali selama 12 regimen MDT-WHO ternyata punya nilai viabilitas yang positif. Sebaliknya, 2 diantara 6 pasien yang mendapat terapi kortikosteroid selama 3 bulan ternyata memiliki viabilitas yang negatif di akhir masa pengobatan. Hal ini sesuai dengan literatur dan dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian terapi kortikosteroid selama MDT tidak mempengaruhi viabilitas kuman jika diberikan dalam waktu yang tidak terlalu panjang. Adanya pemeriksaan pemakaian kortikosteroid pada subjek penelitian ini adalah untuk

menyeragamkan subjek penelitian sehingga hasil penelitian yang didapatkan menjadi hasil yang dapat dipertanggungjawabkan.

Pasien kusta yang telah mendapat MDT MB – WHO selama 12 bulan, dari hasil IB yang masih positif melalui pemeriksaan apusan sayatan kulit cuping telinga didapatkan RNA *M.leprae* biopsi kulit atau pemeriksaan RT PCR biopsi kulit positif (viabel) pada 13 pasien kusta (86,7%). Dengan demikian, pada sebagian besar pasien yang mendapat terapi MDT MB–WHO 12 bulan didapatkan bahwa kuman *M. leprae* masih *viable* sehingga pasien dianggap masih infeksius. Hal ini perlu diperhatikan oleh para pengelola pemberantasan penyakit kusta di Indonesia.

KEPUSTAKAAN

1. Data penyakit dan lingkungan Ditjen PP dan PL. [Disitasi 6 Januari 2009]. Tersedia dari:URL: <http://www.pppl.depkes.go.id>.
2. Naafs B. Treatment of leprosy: science or politics. *Trop Med Int Health* 2006;11:268-78.
3. Agusni I, Menaldi SL. Beberapa prosedur diagnostik baru pada penyakit kusta. Dalam: Daili ES, Menaldi SL, Ismiarto SP, Nilasari H, editor. *Kusta*. Edisi ke-2. Jakarta: Balai Penerbit FKUI;2003.p.59-65.
4. Hehanussa A. Viabilitas *Mycobacterium leprae* dengan pemeriksaan RT-PCR pada pasien kusta multibasilar yang diobati MDT WHO (tesis). Manado: Universitas Sam Ratulangi;2009.
5. Rea TH, Modlin RL. Leprosy. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, editors. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th ed. New York: McGraw Hill;2008.p.1786-96.
6. Bryceson A, Pfaltzgraff RE. *Mycobacterium*. In: *Leprosy*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone, Edinburgh;1990.
7. Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Franzblau SG. *Leprosy*. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:330-48.
8. Prakoeswa CRS. Profil ekspresi Rab5, Rab7, TACO, Lep-LAM dan PGL-1 pada kegagalan fagolisosom makrofag pasien kusta sebagai petanda viabilitas *M. leprae* (disertasi). Surabaya: Program pascasarjana Universitas Airlangga;2007.
9. Haroen MS. Proporsi kepositifan RNA *Mycobacterium leprae* dengan teknik RT-PCR pada permukaan dan jaringan biopsi lesi kulit pasien kusta multibasilar yang belum mendapat pengobatan (Tesis). Jakarta: Universitas Indonesia, 2009.
10. Noordeen SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings RC, editor. *Leprosy*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone;1994.p.29-45.
11. Departemen Kesehatan RI. Buku pedoman nasional pemberantasan penyakit kusta. Cetakan XVIII. Jakarta: DepKes RI;2006.
12. Rees RJW, Young DB. *The Microbiology of leprosy*. Edinburgh: Churchill Livingstone;1994.
13. Manglani PR. Multidrug therapy in leprosy. *J Indian Med Assoc* 2006;104:686-8.
14. Jopling WH, McDougall AC. *Handbook of Leprosy*. New Delhi: CBS Publishers & Distributors;1996.
15. Prakoeswa CRS. Biomolecular aspect of leprosy in daily practice: one day seminar “leprosy in perspective”. Surabaya: Airlangga University Press; 2008. p.18-30.
16. Chae GT, Kim MJ, Kang TJ, Lee SB, Shin HK, Kim JP, et al. DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDa gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy. *J Med microbiol* 2002;51:417-22.
17. Shetty VP, Khambati FA, Ghate SD, Capadia GD, Pai VV, Ganapati R. The effect of corticosteroid usage on bacterial killing, clearance and nerve damage in leprosy; part 3 – study of two comparable groups of 100 multibacillary (MB) patients each, treated with MDT + steroids vs MDT alone, assessed at 6 months post – release from 12 months MDT. *Lepr Rev* 2010;81:41-58.