

# Uji Diagnostik Tinea Kruris dengan *Polymerase Chain Reaction Restriction Fragmented Length Polymorphism*

## (A Diagnostic Test of Tinea Cruris Using *Polymerase Chain Reaction Restriction Fragmented Length Polymorphism*)

Cut Putri Hazlianda, Kamaliah Muis, Isma Aprita Lubis

Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin

Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/Rumah Sakit Umum Haji Adam Malik Medan

### ABSTRAK

**Latar Belakang:** Tinea kruris merupakan dermatofitosis paling sering kedua di seluruh dunia dan terbanyak di Indonesia. Penegakan diagnosis konvensional dengan kultur jamur dirasa lambat dan kurang spesifik, sehingga diperlukan metode diagnostik yang lebih cepat dan tepat. *Polymerase chain reaction* (PCR) merupakan tes yang sangat sensitif dan spesifik untuk mendiagnosis berbagai mikroorganisme termasuk jamur patogen. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) merupakan metode PCR dengan penambahan enzim setelah amplifikasi sehingga memungkinkan hasil yang lebih spesifik. **Tujuan:** Untuk mengetahui nilai diagnostik PCR-RFLP dalam menegakkan diagnosis tinea kruris. **Metode:** Penelitian ini merupakan suatu uji diagnostik tinea kruris dengan PCR-RFLP yang menggunakan kultur jamur sebagai baku emas. Spesimen berupa kerokan kulit dari 31 pasien yang diduga tinea kruris berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan dermatologis. Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah agar Sabaroud dekstroza, primer *Internal Transcribe Sequences* (ITS) 1 dan ITS 4, dan *MvaI*. **Hasil:** Nilai-nilai uji diagnostik yang didapatkan pada penelitian ini adalah nilai sensitivitas 75%, nilai spesifisitas 66,7%, nilai *positive predictive value* 70,6%, nilai *negative predictive value* 71,4%, nilai rasio kemungkinan positif 2,25, nilai rasio kemungkinan negatif 0,38, nilai akurasi 70,97%. **Simpulan:** PCR-RFLP dapat sebagai alat alternatif untuk mendiagnosis tinea kruris.

**Kata kunci:** tinea kruris, kultur, PCR-RFLP, uji diagnostik.

### ABSTRACT

**Background:** Tinea cruris is the second most common dermatophytosis in the world and the most common in Indonesia. The conventional diagnostic method fungal culture is slow and less specific, therefore requiring a more rapid and exact diagnostic methods. Polymerase chain reaction (PCR) is a very sensitive and specific test to diagnose various microorganisms including pathogenic fungi. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) is a PCR method with the addition of enzyme after amplification, therefore enabling for more specific results. **Purpose:** To determine the diagnostic value of PCR-RFLP in the diagnosis of tinea cruris. **Methods:** This study is a diagnostic test tinea cruris with PCR-RFLP by using culture as the gold standard. The specimens were skin scrapings from thirty-one patients suspected of having tinea cruris from history taking and dermatological examination. The tools and materials that were used in this study were Sabaroud's dextrose agar media, *Internal Transcribe Sequences* (ITS) 1 and ITS 4 primer, and *MvaI*. **Results:** The values of the diagnostic test yielded in this study are: the sensitivity value was 75%, the specificity was 66.7%, the positive predictive value was 70.6%, the negative predictive value was 71.4%, the positive likelihood ratio was 2.25, the negative likelihood ratio was 0.38, the accuracy value was 70.9%. **Conclusion:** PCR-RFLP can be used as an alternative tool for the diagnosis of tinea cruris.

**Key words:** tinea cruris, culture, PCR-RFLP, diagnostic test.

Alamat korespondensi: Cut Putri Hazlianda, Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin FK USU, RSUP Haji Adam Malik, Jl Bunga Lau no 17 Medan 20136 Kotak Pos 697. Telepon: +62618365915, email: cutputrihazlianda@yahoo.com

### PENDAHULUAN

Dermatofita merupakan kelompok jamur keratinofilik yang dapat mengenai jaringan keratin manusia dan hewan seperti pada kulit, rambut dan kuku, yang menyebabkan dermatofitosis.<sup>1-4</sup> Tinea kruris adalah dermatofitosis yang dijumpai pada kulit

daerah sela paha, genitalia, daerah pubis, perineal, dan perianal yang merupakan dermatofitosis paling sering kedua di seluruh dunia dan merupakan dermatofitosis terbanyak di Indonesia.<sup>3,5-9</sup>

Pemeriksaan laboratorium konvensional yang dilakukan untuk infeksi dermatofita adalah

pemeriksaan mikroskop langsung dengan kalium hidroksida (KOH) 10% dan kultur jamur. Identifikasi secara mikroskopis kerokan kulit dengan KOH 10% dijumpai elemen jamur yang merupakan metode diagnostik yang cepat dan murah namun kurang spesifik dan sensitif dengan *false negative* lebih dari 15% kasus, sehingga memerlukan kultur jamur yang merupakan pemeriksaan yang lebih spesifik.<sup>1,3,10</sup> Kultur jamur merupakan baku emas untuk diagnosis spesies penyebab infeksi jamur.<sup>11,12</sup> Pemeriksaan kultur jamur dikatakan spesifik tetapi kurang sensitif. Teknik ini memerlukan waktu sekitar 2-4 minggu. Beberapa isolasi yang tidak biasa dan atipikal sering ditemukan sehingga media kultur jamur yang lain diperlukan untuk membantu identifikasi.<sup>10,13,14</sup>

Prosedur laboratorium konvensional untuk identifikasi dermatofita lambat dan kurang spesifik, sehingga diperlukan metode diagnostik yang lebih cepat dan tepat. Aplikasi teknologi amplifikasi asam nukleat dapat dengan cepat dan tepat mengidentifikasi kemungkinan dermatofita.<sup>13,18</sup> Teknologi molekuler seperti *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan tes sangat sensitif dan spesifik, dan dapat digunakan untuk diagnosis berbagai mikroorganisme termasuk jamur patogen.<sup>1,13,15</sup>

PCR merupakan suatu teknik sintesis dan amplifikasi *deoxyribonucleic acid* (DNA) dermatofita secara *in vitro*.<sup>16,17</sup> PCR ini dapat lebih cepat, lebih sensitif, lebih stabil dan memiliki pengaruh faktor eksternal lebih sedikit dibandingkan dengan kultur jamur dalam mendeteksi dermatofita serta spesiesnya.<sup>1,13,15</sup>

*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) merupakan metode PCR dengan penambahan enzim setelah amplifikasi sehingga memungkinkan hasil yang lebih spesifik.<sup>18</sup> Penelitian oleh Dobrowolska dan kawan-kawan pada tahun 2008 mendapati metode PCR-RFLP dengan penggunaan *primer chitin synthase 1* (CHS1) sangat baik digunakan untuk mengidentifikasi dua spesies *Trichophyton* yaitu *T. rubrum* dan *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*).<sup>19</sup> Penelitian oleh Elavarashi, dan kawan-kawan pada tahun 2013 mendapati penggunaan PCR-RFLP dengan *primer Internal Transcribed Spacer* (ITS), enzim *MvaI*, dan *DdeI* memiliki hasil yang baik.<sup>12</sup> Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemeriksaan dengan PCR-RFLP dapat dipertimbangkan untuk

mendiagnosis dermatofitosis dengan hasil yang cepat dan tepat.

## METODE

Penelitian ini merupakan suatu uji diagnostik PCR-RFLP untuk menegakkan diagnosis tinea kruris dengan menggunakan kultur jamur sebagai baku emas yang dilaksanakan mulai bulan September 2013 sampai jumlah sampel terpenuhi di Unit Rawat Jalan Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Divisi Mikologi, Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) H. Adam Malik, Medan. Pemeriksaan kultur jamur dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan PCR-RFLP dilakukan di Laboratorium terpadu, Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

Spesimen berupa kerokan kulit dari 31 pasien yang diduga tinea kruris berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan dermatologis. Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah agar Sabaroud dekstrosa (sebagai baku emas untuk identifikasi spesies jamur) dengan ditambah sikloheksamid (0,5g/l) dan kloramfenikol (0,05g/l), *thermocycler* (*applied biosystem Veriti 96-type well thermal cycler*, Singapura), ekstraksi kit DNA (Promega), kit PCR (Promega), *primer ITS 1 (forward)* and *ITS 4 (reverse)* (1<sup>st</sup> base), dan enzim restriksi *MvaI*. Pada *thermocycler* dilakukan *preheat* (94 °C, 10 menit); denaturasi (94 °C, 1 menit); *annealing* (58 °C, 1 menit); *extention* (72 °C, 1 menit (35 siklus)) dan *final extention* (72 °C, 7 menit). Penelitian ini menggunakan *basepair* yang digunakan oleh penelitian sebelumnya yaitu penelitian Elavarashi E. dan Mirzahoseini H dan kawan-kawan. Tidak terdapat positif kontrol.

Pencatatan data dasar, anamnesis, dan pemeriksaan dermatologis dilakukan sebelum pengambilan spesimen. Pengambilan spesimen dilakukan dengan metode kerokan kulit. Hasil kerokan dibagi dalam 2 bagian spesimen, sebagian untuk kultur jamur dan sebagian untuk PCR-RFLP yang dimasukkan ke dalam amplop. Setelah itu sampel diolah. Data yang terhimpun ditabulasi dalam bentuk tabel distribusi frekuensi. Untuk menilai kemampuan diagnostik PCR-RFLP maka dibuat tabel 2x2 dan dilakukan uji sensitivitas, spesifisitas, *positive predictive value* (PPV), *negative predictive value* (NPV), rasio kemungkinan positif, rasio kemungkinan negatif dan akurasi dengan menggunakan baku emas kultur jamur.

**HASIL**

**Tabel 1.** Karakteristik subjek penelitian berdasarkan jenis kelamin

Jenis kelamin	n	Presentase (%)
Laki- Laki	16	51,6
Perempuan	15	48,4
Total	31	100,0

**Tabel 2.** Karakteristik subjek penelitian berdasarkan kelompok usia

Umur (tahun)	n	Presentase (%)
12-21	12	38,7
22-31	3	9,7
32-41	2	6,5
42-51	4	12,9
52-61	5	16,1
62-71	3	9,7
72-81	2	6,5
Total	31	100

**Tabel 3.** Hasil pemeriksaan kerokan kulit dengan kultur jamur dan PCR-RFLP

No. Sampel	Kultur	Spesies Kultur	PCR-RFLP	Spesies PCR-RFLP
1	Negatif	TAPJ	Negatif	-
2	Negatif	TAPJ	Positif	<i>T. mentagrophytes</i>
3	Negatif	TAPJ	Negatif	-
4	Positif	<i>T. rubrum</i>	Positif	<i>T. rubrum</i>
5	Negatif	TAPJ/ <i>Paecilomyces</i>	Negatif	-
6	Negatif	TAPJ/ <i>Aspergillus flavus</i>	Positif	<i>T. mentagrophytes</i>
7	Positif	<i>T. rubrum</i>	Positif	<i>T. rubrum</i>
8	Positif	<i>T. violaseum</i>	Positif	O
9	Negatif	TAPJ/ <i>Cladosporium</i>	Negatif	-
10	Positif	<i>M. rivalieri</i>	Negatif	-
11	Negatif	TAPJ	Negatif	-
12	Positif	<i>T. tonsuran</i>	Negatif	-
13	Negatif	TAPJ/ <i>Aspergillus flavus</i>	Positif	<i>E. floccosum</i>
14	Positif	<i>M. rivalieri</i>	Positif	O
15	Negatif	TAPJ/ <i>Aspergillus flavus</i>	Negatif	-
16	Negatif	TAPJ/ <i>Aspergillus fumigatus</i>	Negatif	-
17	Negatif	TAPJ/ <i>Aspergillus niger</i>	Negatif	-
18	Negatif	TAPJ/ <i>Aspergillus flavus</i>	Negatif	-
19	Positif	<i>T. rubrum</i>	Positif	O
20	Negatif	TAPJ/ <i>Aspergillus fumigatus</i>	Positif	<i>T. verrucosum</i>
21	Positif	<i>T. tonsuran</i>	Positif	<i>T. tonsuran</i>
22	Positif	<i>T. ericinae</i>	Negatif	-
23	Positif	<i>T. tonsuran</i>	Positif	O
24	Positif	<i>T. rubrum</i>	Positif	<i>T. rubrum</i>
25	Negatif	TAPJ/ <i>Aspergillus flavus</i>	Negatif	-
26	Positif	<i>T. rubrum</i>	Negatif	-
27	Positif	<i>T. rubrum</i>	Positif	<i>T. rubrum</i>
28	Negatif	TAPJ/ <i>Paecilomyces</i>	Positif	<i>T. verrucosum</i>
29	Positif	<i>T. rubrum</i>	Positif	<i>T. rubrum</i>
30	Positif	<i>T. rubrum</i>	Positif	O
31	Positif	<i>T. schoenleinii</i>	Positif	O

Keterangan: TAPJ=tidak ada pertumbuhan jamur

PCR-RFLP=*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*

O: tidak terdeteksi

Berdasarkan Tabel 1 dari total 31 subjek penelitian didapatkan sebanyak 15 orang (48,4%) berjenis kelamin perempuan dan 16 orang (51,6%) berjenis kelamin laki-laki.

Berdasarkan Tabel 2 dari total 31 subjek penelitian menunjukkan bahwa subjek penelitian terbanyak adalah pada kelompok umur 12-21 tahun, yaitu sebanyak 38,7%.

Hasil pemeriksaan kerokan kulit dengan menggunakan kultur jamur dan PCR-RFLP dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 4.** Tabel 2 x 2 hasil penelitian diagnostik

		Kultur		Total
		Positif	Negatif	
PCR-RFLP	Positif	12(a)	5(b)	17
	Negatif	4(c)	10(d)	14
Total		16	15	31

Keterangan: PCR-RFLP=Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

$$\text{Nilai sensitivitas} = \frac{a}{a+c} \times 100\% = 12/12+4 \times 100\% = 12/16 \times 100\% = 75\%$$

$$\text{Nilai spesifisitas} = \frac{d}{b+d} \times 100\% = 10/5+10 \times 100\% = 10/15 \times 100\% = 66,7\%$$

$$\text{Nilai positive predictive value} = \frac{a}{a+b} \times 100\% = 12/12+5 \times 100\% = 12/17 \times 100\% = 70,6\%$$

$$\text{Nilai negative predictive value} = \frac{d}{c+d} \times 100\% = 10/4+10 \times 100\% = 10/14 \times 100\% = 71,4\%$$

$$\text{Nilai rasio kemungkinan positif} = \text{sensitivitas}/(1-\text{spesifisitas}) = 0,75/(1-0,667) = 0,75/0,333 = 2,25$$

$$\text{Nilai rasio kemungkinan negatif} = (1-\text{sensitivitas})/\text{spesifisitas} = (1-0,75)/0,667 = 0,25/0,667 = 0,38$$

$$\text{Nilai akurasi} = \frac{a+d}{N} \times 100\% = 22/31 \times 100\% = 70,97\%$$

## PEMBAHASAN

Pemeriksaan PCR-RFLP untuk mendeteksi tinea kruris dengan metode kerokan kulit mempunyai sensitivitas uji diagnostik sebesar 75%, berarti hanya 75% di antara penderita tinea kruris yang dapat dideteksi oleh alat ini. Hal ini menunjukkan sensitivitas metode diagnostik dengan alat ini tinggi. Uji sensitivitas merupakan pengujian yang menunjukkan kemampuan suatu alat atau metode yang digunakan untuk memberikan gambaran yang positif pada orang yang benar-benar sakit.<sup>20</sup> Berdasarkan hasil pengujian ini, dapat dikatakan alat ini cukup baik untuk mendeteksi penyakit tinea kruris pada orang yang benar-benar menderita tinea kruris sehingga dapat dijadikan sebagai alternatif pemeriksaan untuk mendiagnosis penyakit tinea kruris.

Uji spesifisitas merupakan pengujian yang menunjukkan kemampuan suatu alat atau metode yang digunakan untuk memberikan gambaran yang negatif pada orang yang benar-benar tidak sakit.<sup>20</sup> Berdasarkan nilai spesifisitas yang diperoleh yaitu sebesar 66,7%, berarti besar kemungkinan penyakit tinea kruris yang dapat disingkirkan pada tersangka penderita tinea kruris yang mendapatkan hasil uji PCR-RFLP negatif yaitu sebesar 66,7%. Hal ini menunjukkan bahwa uji PCR-RFLP dalam menyingkirkan tinea kruris tidak cukup tinggi.

Sensitivitas PCR-RFLP pada penelitian ini tinggi karena alat ini dapat mendeteksi genom jamur patogen dan alat ini memiliki pasangan primer yang dapat mendeteksi jamur patogen.<sup>21,22</sup> Spesifisitas alat ini tidak cukup tinggi dipengaruhi oleh kemungkinan adanya kontaminasi dari lingkungan atau pada alat saat pengerjaan di laboratorium.<sup>22</sup>

PPV merupakan gambaran probabilitas subjek dengan penyakit bila hasil tes positif.<sup>20</sup> Dari hasil penelitian ini didapatkan PPV sebesar 70,6%. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan alat ini untuk memperkirakan sakit tinea kruris pada orang dengan hasil tes positif cukup tinggi.

NPV merupakan gambaran probabilitas subjek tidak menderita penyakit bila hasil tes negatif.<sup>20</sup> Dari hasil penelitian ini didapatkan NPV sebesar 71,4%. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan alat ini untuk memperkirakan tidak sakit tinea kruris pada orang dengan hasil tes negatif relatif tinggi sehingga alat ini dapat digunakan untuk skrining penyakit tinea kruris.

Rasio kemungkinan positif pada penelitian ini adalah 2,25 dan rasio kemungkinan negatif adalah 0,38. Hasil uji diagnostik yang positif kuat memberikan nilai rasio kemungkinan yang jauh lebih besar dari 1 dan dianggap penting adalah 10 atau lebih. Hasil uji yang negatif kuat akan memberikan nilai rasio kemungkinan mendekati 0.<sup>20</sup> PCR-RFLP

cukup baik digunakan untuk mendiagnosis penyakit tinea kruris.

Akurasi adalah kemampuan alat uji untuk mendeteksi secara benar dari seluruh subjek yang diuji.<sup>20</sup> Nilai akurasi alat PCR-RFLP pada penelitian ini adalah 70,97% menunjukkan kemampuan alat ini untuk mendeteksi penyakit tinea kruris secara benar dengan cukup akurat.

Penelitian dari Transilvania oleh Irimie dan kawan-kawan pada tahun 2011 meneliti tentang *real time* PCR untuk mengidentifikasi spesies dermatofita. Total sampel sebesar 681 sampel, dan didapatkan sensitivitas sekitar 97,5% dan spesifisitas 100%. *Positive predictive value* dan *negative predictive value* dari *real time* PCR tersebut adalah 100% dan 98,86%.<sup>14</sup>

Penelitian oleh Arabatzis dan kawan-kawan pada tahun 2007 di Belanda yang menggunakan *multiplex real-time* PCR untuk mengidentifikasi dermatofita, didapati selain sensitivitas yang cukup tinggi, nilai PPV adalah 95,7% dan NPV adalah 100%.<sup>23</sup>

Hasil penelitian Mirzahoseini dan kawan-kawan pada tahun 2009 menunjukkan bahwa PCR-RFLP bekerja cepat dan merupakan alat yang dapat dipercaya untuk mengidentifikasi kebanyakan dermatofita patogen.<sup>18</sup> Nagao dan kawan-kawan pada tahun 2005 menyatakan bahwa hasil positif dari PCR harus diinterpretasikan dengan hati-hati. Kultur masih merupakan yang terbaik dalam mendiagnosis dan mengidentifikasi patogen spesifik, namun analisis PCR juga dapat digunakan sebagai metode alternatif apabila didapatkan hasil kultur yang negatif.<sup>24</sup>

Berdasarkan hasil analisis penelitian ini, dapat diambil kesimpulan bahwa PCR-RFLP dikatakan cukup baik untuk mendeteksi penyakit tinea kruris pada orang yang benar-benar menderita tinea kruris sehingga dapat dijadikan sebagai alternatif pemeriksaan untuk mendiagnosis penyakit tinea kruris.

#### KEPUSTAKAAN

- Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati AK, Nath G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. *BMC Res Notes* 2009; 2: 1-6.
- Hay RJ, Moore J. Mycology. In: Burn T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editor. *Rook's text book of dermatology*. 7<sup>th</sup> Ed. United State: Black-Well; 2004. p.1425-7.
- Schieke SM, Garg A. Superficial fungal infection. In: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchesrt BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff Klaus, editor. *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*. 8<sup>th</sup> Ed. New York: McGraw-Hill Companies Inc; 2012. p.2277-97.
- Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008; 51 (suppl.4): 2-15.
- Nadalo D, Montoya C. What is the best way to treat tinea cruris? *J Fam Pract*. 2006; 55(3): 256-8.
- Wiederkehr M, Schwartz RA. Tinea cruris. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/1091806-overview#showall>. Accessed on 28 March 2013.
- Lakshmipathy DT, Kannabiran K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. *NATSCI* 2010; 2(7): 726-31.
- Daili ESS, Menaldi SL, Wisnu IM. Penyakit kulit yang umum di Indonesia sebuah panduan bergambar. Jakarta Pusat: PT Medical Multimedia Indonesia; 2005.p.30.
- Nasution MA. Mikologi dan mikologi kedokteran beberapa pandangan dermatologis. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2005.
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J Med Microbiol* 2000; 49: 493-7.
- Sylvia L, Widya S. Pemeriksaan penunjang laboratorium pada infeksi jamur subkutan. *Acta Dermato-venereologica* 2010; 37(3): 113-22.
- Elavarashi E, Kindo AJ, Kalyani J. Optimization of PCR-RFLP directly from the skin and nails in cases of dermatophytosis, targeting the ITS and the 18 S ribosomal DNA regions. *JCDR* 2013:1-6.
- Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 2004; 53: 1207-14.
- Irimie M, Tătaru A, Oanță A. Evaluation of real time polymerase chain reaction assay for identification of common dermatophyte species. *Bulletin of the Transilvania University of Braşov* 2011; 4(53): 65-72.
- Alexander CL, Shankland GS, Carman W, Williams C. Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland. *Br J Dermatol* 2011; 164: 966-72.
- Handoyono D, Rudiretna A. Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). *Unitas* 2001; 9(1): 17-29.
- Aryani A, Kusumawaty D. Prinsip-prinsip polymerase chain reaction (PCR) dan aplikasinya. *Pelatihan singkat isolasi dan amplifikasi DNA*; 2007: 71-4.

18. Mirzahoseini H, Omidinia E, Shams-Ghahfarokhi M, Sadeghi G, Razzaghi-Abyaneh M. Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. *Irian J Publ Health* 2009; 38(1): 18-24.
19. Dobrowolska A, Dębska J, Stączek P. Molecular identification of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* by PCR-RFLP targeting of the DNA chitin synthase 1 gene. *Mikologia Lekarska* 2008; 15(4): 193-6.
20. Dahlan MS. Penelitian diagnostik, dasar-dasar teoritis dan aplikasi dengan program SPSS dan stata. Jakarta: Salemba medika; 2009. p.19-30.
21. Litz CE, Cavagnolo RZ. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: a large, single-institute study. *Br J Dermatol* 2010; 163: 511-4.
22. Arca E, Saracli MA, Akar A, Yildiran ST, Kurumlu ZZ, Gur AR. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. *Eur J Dermatol* 2004; 14: 52-5.
23. Arabatzis M, Coppensraet LESBV, Kuijper EJ, Hoog GSD, Lavrijsen APM, Templeton K, et al. Diagnosis of common dermatophyte infection by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *Br J Dermatol* 2007; 157: 681-9.
24. Nagao K, Sugita T, Ouchi T, Nishikawa T. Identification of *Trichophyton rubrum* by nested PCR analysis from paraffin embedded specimen in trichophytia profunda acuta of the glabrous skin. *Jpn J Med Mycol* 2005; 46: 129-32.