

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Lepra, yang juga dikenal sebagai penyakit Hansen, adalah penyakit granulomatosa pada zaman kuno yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium leprae* atau *Mycobacterium lepromatosis*, yang terutama menyerang kulit dan saraf tepi, dan bahkan dapat menyebabkan deformitas dan kecacatan pada tahap lanjut. Meskipun telah terjadi perbaikan signifikan dalam pengobatan lepra sejak diperkenalkannya terapi multidrug therapy (MDT) oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) tiga dekade lalu, lebih dari 200.000 kasus baru lepra dari lebih dari 140 negara masih dilaporkan setiap tahun di seluruh dunia, dengan negara-negara seperti Brasil, India, dan Indonesia menjadi yang paling endemik. Lepra tetap menjadi masalah kesehatan masyarakat yang serius secara global, terutama di banyak negara berkembang dan kurang berkembang (Mi et al., 2024).

Kasus baru kusta di Indonesia masih banyak ditemukan, terutama di wilayah Timur, dengan jumlah yang bervariasi. Hingga tahun 2016, tingkat kecacatan level II tercatat 5,27/1.000.000 penduduk, sedangkan tingkat kecacatan level II pada anak adalah 0,24/1.000.000 penduduk. Indonesia menempati posisi ketiga di dunia setelah India dan Brasil, dengan jumlah kasus baru penderita kusta mencapai 15.910 pada tahun 2017 (angka kasus baru 6,07 per 100.000 penduduk). Pada tahun 2023, Indonesia melaporkan 14.376 kasus kusta baru, jumlah terbesar ketiga di dunia. Sebanyak 8,2% di antaranya terjadi pada anak-anak dan 6% melibatkan disabilitas tingkat 2. Hal ini mengindikasikan penyebaran penyakit masih terjadi dan keterlambatan diagnosis. Dan juga tingginya angka ini disebabkan oleh beberapa faktor, seperti stigma sosial terhadap kusta yang kuat di masyarakat, serta kurangnya upaya tenaga kesehatan dalam menemukan dan menangani kasus kusta. Masyarakat juga belum paham tentang gejala awal penyakit ini. Penanganan kusta secara menyeluruh, termasuk pencegahan kecacatan, belum berjalan optimal. Secara klinis, penyakit kusta tampak mirip dengan penyakit kulit lainnya, sehingga perlu pemeriksaan tambahan. Namun, fasilitas untuk pemeriksaan tambahan guna menetapkan diagnosis belum tersedia di semua layanan kesehatan. Selain itu, perjalanan penyakit kusta yang panjang mengakibatkan reaksi pasca pengobatan tidak terpantau dengan baik. (Kemenkes, 2019)(Kemenkes, 2023).

Pada penelitian terbaru ditemukan berbagai peran *Antimicrobial peptides* (AMP) terhadap penyakit kusta. *Antimicrobial peptides* dapat juga mengaktifkan dan mengerahkan sel imun, sehingga mengakibatkan penghancuran mikroba dan/atau mengontrol inflamasi. Karena AMP

diproduksi oleh berbagai sel imun seperti neutrofil dan makrofag, sehingga merupakan molekul pertama menghadapi infeksi antara lain pada infeksi *Mycobacterium leprae* (*M.leprae*). *Antimicrobial peptide* terbukti berperan dalam membunuh mikobakteri tersebut pada lesi kusta dan sehingga dapat dihubungkan dengan bentuk klinis penyakit tersebut, namun mekanisme kerja AMP masih banyak memerlukan penelitian lebih lanjut. (Argentina *et al.*, 2019)

Pada kulit, terdapat 2 jenis *antimicrobial peptide* (AMP) utama, yaitu *Cathelicidin* dan defensin yang berpengaruh terhadap sistem imun manusia. *Cathelicidin* LL-37 merupakan peptida kation dengan variabel struktur antimikroba terletak di bagian *C-terminal*. Manusia hanya memiliki satu gen *Cathelicidin*. Pada manusia satu gen *Cathelicidin* LL-37 ini terletak di kromosom 3 (*cyclic AMP*/ CAMP). *Cyclic AMP* mengkode prekursor protein yang tidak aktif, yang dikenal dengan prekursor *Cathelicidin*, atau human *cationic antimicrobial peptide-18* (hCAP18) dengan total panjang asam amino 170. Prekursor protein hCAP18 manusia diproduksi oleh sel kulit, termasuk keratinosit, sel mast, neutrofil, dan sel kelenjar ekrin. Protease protein (contoh protease 3) akan memproses hCAP18 menjadi molekul efektor LL-37 (nama LL-37 diambil dari asam amino 37 AMP aktif yang dilepaskan protein C-terminal), yang memiliki peran penting dalam mekanisme pertahanan host karena memiliki aktivitas antibakteri, antijamur, dan antivirus. Molekul LL-37 memiliki peran antibakteri luas terhadap Gram-negatif maupun Gram-positif. Molekul ini mampu menetralkan lipopolisakarida, dan memiliki efek antibakteri sinergis dengan defensin, dan merupakan agen kemotaktik netrofil, monosit, dan sel T menggunakan *formyl peptide receptor-like 1* (FPRL-1). (Argentina *et al.*, 2019)

Cathelicidin LL-37 merupakan kelas peptida antimikroba multifungsi yang memainkan peran sentral dalam sistem pertahanan imun bawaan. Peptida ini telah diakui secara luas karena aktivitas antimikroba spektrum luasnya, menunjukkan kemampuannya untuk melawan berbagai patogen, termasuk yang resisten terhadap antibiotik konvensional. Mekanisme kerjanya melibatkan gangguan membran mikroba, modulasi imun, dan peningkatan jalur pertahanan tuan rumah, menyoroti pentingnya dalam menjaga pengawasan imun dan ketahanan terhadap agen infeksi (Krawiec & Pac-Kożuchowska, 2021). Selain aksi antimikrobanya, *Cathelicidin* LL-37 juga terlibat dalam patofisiologi beberapa penyakit inflamasi dan infeksi. Tingkat peptida ini dilaporkan meningkat pada kondisi seperti pneumonitis dan Penyakit Radang Usus (IBD), di mana diyakini berkontribusi pada perkembangan penyakit serta modulasi respons inflamasi (Krawiec & Pac-Kożuchowska, 2021) (Lemieszek *et al.*, 2022).

Dalam konteks lepra, penyakit menular kronis yang disebabkan oleh *Mycobacterium leprae*, ekspresi *Cathelicidin* LL-37 menunjukkan perubahan yang khas. Analisis ekspresi gen menunjukkan bahwa *Cathelicidin* LL-37 secara signifikan meningkat pada lesi kulit pasien lepra dibandingkan dengan kulit normal mereka, dan juga menunjukkan tingkat yang lebih tinggi pada

kontak rumah tangga dan pasien dibandingkan dengan individu sehat yang tidak terpapar (Argentina et al., 2023b),(Argentina et al., 2023a). Polanya peningkatan ekspresi ini menyarankan bahwa *Cathelicidin LL-37* tidak hanya berfungsi sebagai penanda aktivasi imun *host* tetapi juga sebagai biomarker potensial untuk prognosis dan stratifikasi pengobatan. Kemampuan untuk membedakan profil ekspresi antara pasien, kontak, dan kontrol sehat memiliki implikasi yang kuat, terutama di daerah endemik di mana paparan rumah tangga yang dekat merupakan faktor risiko utama. Data epidemiologis menunjukkan bahwa insidensi lepra di kalangan kontak rumah tangga sekitar 1,4 kasus per 1.000 tahun-orang, dengan temuan kumulatif 192 dari 9.024 kontak yang mengembangkan lepra selama periode pemantauan 33 tahun (Hacker et al., 2021). Data ini menyoroti kebutuhan untuk mengidentifikasi biomarker prediktif yang dapat membedakan antara individu yang berisiko mengalami progresivitas penyakit dan mereka yang tetap resisten meskipun terpapar.

Mengingat beban global lepra yang persisten, terutama di wilayah endemik termasuk Indonesia, pengembangan biomarker yang andal seperti *Cathelicidin* semakin penting. Metode diagnostik tradisional, termasuk pemeriksaan *smear* kulit dan pemeriksaan histopatologi, seringkali memiliki keterbatasan dalam sensitivitas dan tidak selalu dapat memprediksi perkembangan penyakit atau risiko terkait paparan. Oleh karena itu, prospek *Cathelicidin* sebagai alat prognosis dapat memfasilitasi diagnosis lebih awal, pengobatan yang lebih terarah, dan pemantauan yang lebih baik terhadap kontak rumah tangga. Potensi integrasinya ke dalam praktik klinis dapat memungkinkan pendekatan terapeutik yang terstratifikasi, pada akhirnya mendukung tujuan mengurangi penularan dan kecacatan yang terkait dengan penyakit (Mostafa et al., 2023),(Wang et al., 2023).

Ketika terjadi infeksi bakteri, *Cathelicidin* diinduksi dengan kuat pada sel keratinosit dan penurunan ekspresinya, seperti yang terlihat pada kasus dermatitis atopik, berhubungan erat dengan peningkatan kerentanan terhadap superinfeksi mikroba, sehingga mampu menunjukkan sifat *Cathelicidin* sebagai antimikroba dengan spektrum yang luas. *Cathelicidin Antimicrobial Peptides* (CAMPs) adalah komponen utama dari kekebalan bawaan yang bertindak langsung terhadap infeksi mikroba. *Cathelicidin* juga diperkirakan memiliki korelasi negatif terhadap indeks bakteri pada pasien kusta tipe multibasiler. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rusyati dkk., di Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar pada tahun 2019 hanya meneliti mengenai korelasi kadar reseptor vitamin D dalam serum terhadap indeks bakteri pada pasien kusta, tipe multibasiler yang berkaitan dengan *cathelicidine*. Sementara itu, terdapat korelasi yang cukup kuat antara *Cathelicidin LL-37* dengan vitamin D dan reseptornya dalam menginduksi fungsi anti-bakteri dari makrofag pada sistem imun dimana kompleks vitamin D dan reseptornya mengatur ekspresi *Cathelicidin LL-37*. Terdapat pula penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa kadar *Cathelicidin LL-37*

cenderung secara signifikan lebih rendah pada penderita kusta dibandingkan dengan orang normal. Penelitian yang dilakukan Hostiadi,dkk melaporkan hasil yang serupa dengan temuan tersebut dimana ditemukan kadar *Cathelicidin LL-37* yang rendah pada kelompok kasus (kusta tipe MB) dibandingkan dengan pasien sehat (Kontrol). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh predileksi penderita kusta untuk menderita hipovitaminosis D. Dalam hubungannya dengan vitamin D, ekspresi *Cathelicidin LL-37* sangat bergantung pada kadar vitamin D yang normal. Seperti yang dilaporkan oleh Grossi de Oliveira, hipovitaminosis D pada penderita kusta menyebabkan menurunnya ekspresi *Cathelicidin LL-37*. Penurunan ekspresi vitamin D paling umum disebabkan oleh kurangnya paparan cahaya matahari, yang umumnya disebabkan oleh perasaan diskriminasi yang dirasakan oleh penderita. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kadar *Cathelicidin LL-37* pada penderita kusta, kontak serumah dan orang sehat. (Hostiadi *et al.*, 2023)

1.2 Teori

1.2.1 Lepra / Morbus Hansen

1. Defenisi

Lepra, yang juga dikenal sebagai penyakit Hansen, adalah penyakit menular kronis yang disebabkan oleh *Mycobacterium leprae*, atau lebih jarang oleh *Mycobacterium lepromatosis*, keduanya menyebabkan perubahan patologis yang serupa. *M leprae* termasuk dalam famili *Mycobacteriaceae* dan genus *Mycobacterium*. Bakteri ini secara preferensial menyerang sel-sel histosit dermal saraf perifer dan sel *Schwann*. *M leprae* tumbuh dengan lambat (sekitar 12–14 hari) dan dapat bertahan hidup di luar tubuh manusia selama 46 hari. Masa inkubasi lepra panjang dan bervariasi, dengan perkiraan 2 hingga 20 tahun. *M leprae* lebih suka tumbuh pada suhu rendah (27–33 °C); oleh karena itu, bakteri ini terutama menyerang area tubuh manusia yang memiliki suhu lebih rendah.

2. Faktor Resiko

Faktor risiko utama untuk penularan lepra meliputi paparan dekat dengan individu yang menderita lepra lepromatosa/multibasiler, paparan terhadap armadillo, imunosupresi/kekurangan sistem kekebalan, dan predisposisi genetik (yang masih belum sepenuhnya dipahami). Sebuah tinjauan terbaru mencatat bahwa program Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) yang bertujuan untuk eliminasi lepra didasarkan sepenuhnya pada eliminasi penularan dari manusia ke manusia dan tidak memperhitungkan potensi penyebaran melalui vektor zoonotic. Publikasi terbaru yang menyarankan peran armadillo dalam penularan zoonotik lepra di AS dan

perluasan wilayah armadillo yang signifikan di AS selama beberapa dekade terakhir akibat perubahan lingkungan yang disebabkan manusia menunjukkan bahwa vektor zoonotik tidak dapat diabaikan dalam menangani penyebaran lepra. Lepra muncul pada pasien yang bermigrasi dari atau menghabiskan waktu yang signifikan di daerah endemik. (Gillmore et al., n.d.)

3. Patogenesis

Lepra atau penyakit Hansen disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium leprae* dan/atau *M. lepromatosis*, basil intraseluler obligat yang menimbulkan infeksi kronik pada kulit dan saraf perifer. Patogenesis penyakit ini dipengaruhi kuat oleh interaksi antara bakteri dan sistem imun pejamu, sehingga derajat kerusakan dan pola klinisnya sangat tergantung pada respons imun individu terhadap infeksi (Silva et al., 2024).

Infeksi dimulai ketika *M. leprae* memasuki tubuh melalui mukosa saluran napas atas atau melalui luka kecil di kulit, kemudian diendosit oleh makrofag dan dapat memasuki sel *Schwann* di saraf perifer. Di sini bakteri bertahan hidup dan bereplikasi, memicu respons inflamasi granulomatosa yang menjadi pusat kerusakan jaringan. Proses ini dipengaruhi oleh berbagai komponen imun bawaan dan adaptif, termasuk aktivasi makrofag, diferensiasi *T-helper* (*Th*), serta pelepasan sitokin pro- dan anti-inflamasi (Silva et al., 2024).

Spektrum klinis lepra mulai dari tuberkuloid (*paucibacillary*) yang didominasi oleh respon imun seluler kuat, hingga lepromatosa (*multibacillary*) yang menunjukkan respon humoral lemah, bercerminan bagaimana imun pejamu mengendalikan atau gagal mengendalikan bakteri. Bentuk tuberkuloid ditandai oleh dominasi sel T CD4⁺ dan sitokin Th1 seperti IFN- γ dan TNF- α , yang mengaktifkan makrofag untuk membentuk granuloma padat guna membatasi penyebaran *M. leprae*. Sebaliknya, bentuk lepromatosa ditandai oleh ekspansi limfosit regulator (Tregs), produksi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan TGF- β , serta penghambatan efektivitas makrofag, sehingga bakteri dapat berkembang pesat (Nath, 2016).

Penelitian sistem imun terbaru juga menunjukkan bahwa selain Th1/Th2 klasik, subset T lainnya seperti Th17 dan Treg memainkan peran penting dalam menentukan jalur imun yang dominan dan memengaruhi progresivitas penyakit. Misalnya, ekspresi IL-17 yang lebih tinggi umumnya ditemukan pada lesi tuberkuloid yang menunjukkan respons seluler kuat, sedangkan peningkatan Treg terkait dengan anergi sel T dan memfasilitasi proliferasi bakteri pada bentuk multibacillary (Mi et al., 2020).

Imunitas bawaan melibatkan makrofag, sel dendritik, dan reseptor pengenalan pola (PRR)—bertindak sebagai garis pertahanan pertama terhadap *M. leprae*. Aktivasi PRR seperti TLR dapat memicu

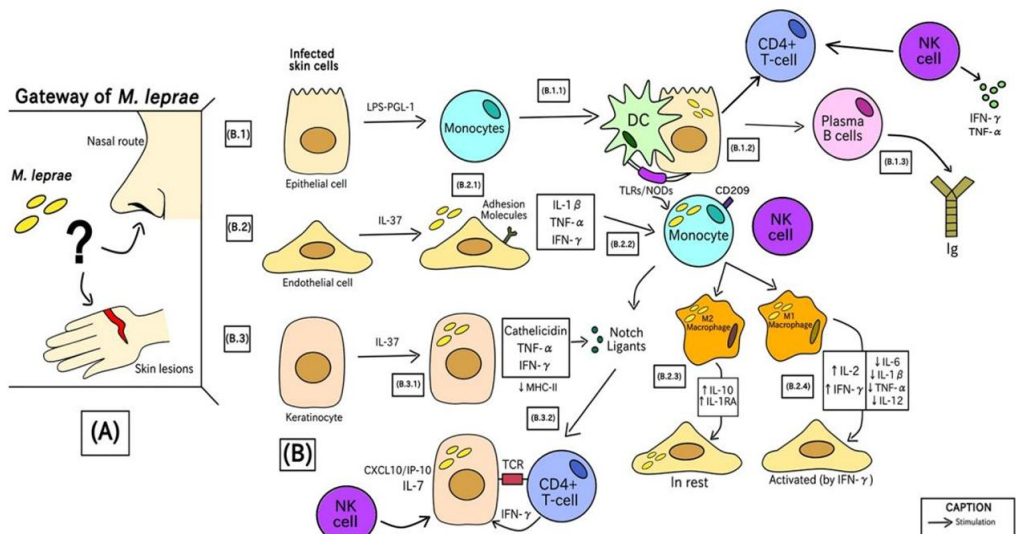
pelepasan mediator inflamasi dan fagositosis, tetapi kemampuan bakteri untuk memodulasi antigen penyaji dan menekan aktivasi T sel memengaruhi jalannya penyakit. Imunitas adaptif kemudian berkembang untuk membentuk respons yang lebih spesifik; kegagalan kedua sistem ini dapat menyebabkan progresi infeksi ke bentuk yang lebih berat dan komplikatif seperti kerusakan saraf dan disabilitas. (Silva et al., 2024)

Dalam mekanisme imun bawaan tersebut, *Cathelicidin LL-37* merupakan salah satu *antimicrobial peptides (AMPs)* penting yang disintesis oleh makrofag, sel epitel, neutrofil, maupun keratinosit sebagai respons terhadap stimulasi bakteri. *Cathelicidin LL-37* memiliki fungsi antimikroba langsung serta dapat memodulasi respon imun, termasuk aktivitas fagositik makrofag, kemotaksis sel imun, serta regulasi sitokin inflamasi. Karena *M. leprae* termasuk patogen intraseluler, keberadaan *Cathelicidin LL-37* yang cukup berkontribusi pada kemampuan pejamu untuk mengendalikan replikasi basil di dalam fagosit jauh sebelum respons imun adaptif berkembang. (Silva et al., 2024)

Peran sel imun bawaan dalam patogenesis lepra tidak dapat diabaikan, tampaknya respon sel T menentukan hasil perkembangan lepra. Dalam model tikus, sel Th1 yang memproduksi IL-2 dan IFN- γ dapat menginduksi makrofag ke keadaan polar M1 yang mikrobisidal dan menghasilkan bentuk penyakit yang terbatas. Sebaliknya, sel Th2 yang memproduksi IL-4 dan IL-5 menghambat fungsi mikrobisidal makrofag, mengakibatkan bentuk progresif penyakit. Pada lesi pasien tuberkuloid, ditemukan bahwa sitokin IL-2 dan IFN- γ menunjukkan ekspresi yang jauh lebih tinggi, sementara IL-4, IL-5, dan IL-10 lebih melimpah pada lesi lepromatous. Polanya sitokin pada lesi lepra sangat mirip dengan model Th1/Th2 pada tikus. Selain itu, profil sitokin sel darah putih mononuklear (PBMCs) dari pasien lepra juga menunjukkan pola polar sesuai dengan tipe lepra. Meskipun setengah dari PBMCs subjek menunjukkan respons Th0 yang tidak diskriminatif setelah stimulasi antigen *M. leprae*, sisanya L-lep menunjukkan respons Th1, sedangkan T-lep menunjukkan respons Th2, sedangkan T-lep menunjukkan respons sitokin Th1. Namun, respons Th1 atau Th2 tidak bersifat irreversibel pada pasien, misalnya, pergeseran dari profil Th2 ke profil Th1 dengan peningkatan produksi IFN- γ dan CXCL10 merupakan karakteristik utama T1R (Mi et al., 2020).

Secara keseluruhan, patogenesis lepra merupakan hasil dari keseimbangan antara respon imun protektif terhadap bakteri dan mekanisme penghindaran imun yang dimiliki *M. leprae*. Kerusakan jaringan yang khas, seperti neuropati perifer dan lesi kulit granulomatosa, merupakan manifestasi dari respons imun pejamu yang gagal menyetop replikasi basil tetapi tetap menghasilkan inflamasi kronik. Pemahaman patogenesis ini menjadi dasar bagi pengembangan diagnosis better molecule-based, terapi imunomodulator, dan strategi pencegahan

komplikasi lepra. (Silva et al., 2024)



Gambar 1. Patogenesis Lepra (Silva et al., 2024)

4. Klasifikasi

Manifestasi histopatologis kusta beragam dan tergantung pada respon imun seluler terhadap kompleks *M. leprae* yang dijelaskan sebagai berikut (Alrehaili, 2023a) :

- Kusta tuberkuloid (TT) dan borderline tuberkuloid (BT): ditandai dengan infiltrasi dermis dan lemak subkutan dengan granuloma epithelioid non-caseating yang terdefinisi dengan baik dan sedikit (Alrehaili, 2023b) atau tidak ada AFB.
- Kusta lepromatosa (LL) dan kusta borderline (BL): Terdiri dari makrofag dengan sitoplasma vacuolar, sel plasma, limfosit, dan banyak AFB.

Klasifikasi tersebut merupakan sistem klasifikasi *Ridley-Jopling* mencakup seluruh kedalaman fitur klinis. Secara keseluruhan, klasifikasi ini diterapkan menggunakan hasil kulit, biopsi, dan neurologis dari tubuh. Klasifikasi WHO didasarkan pada jumlah lesi yang ada. Dalam situasi di mana lima atau lebih sedikit lesi kulit hadir tanpa basil jelas pada smear kulit, itu akan dianggap sebagai paucibacillary (PB) kusta. Di mana jika hanya lesi tunggal yang terlihat, itu diberi label sebagai PB lesi tunggal. Enam atau lebih lesi dengan tes smear kulit positif dianggap sebagai kusta multibasiler (MB) (Bhandari et al., 2021).

5. Pemeriksaan Penunjang

a. *Slit Skin Smear*

Slit Skin Smear adalah alat diagnostik yang umum digunakan di negara-endemik untuk mendiagnosis dan mengklasifikasikan infeksi kusta sesuai dengan pedoman WHO (*paucibacillary vs multibacillary*). *Slit Skin Smear* diambil dari lesi yang tampak paling aktif atau lesi yang telah bertahan lama. Jika lesi tidak ada, situs anatomi tertentu yang sesuai dengan bagian tubuh yang lebih “dingin” akan diuji. Tempat yang memiliki kemungkinan tertinggi menunjukkan AFB positif adalah daun telinga, mukosa hidung, dahi, dagu, permukaan ekstensor dari lengan bawah dan lutut, serta permukaan dorsal jari. Setelah pengambilan sampel, pewarnaan Fite atau pewarnaan *Ziehl-Neelsen* yang dimodifikasi digunakan untuk melihat AFB (*M. leprae* kurang bersifat asam-tahan dibandingkan dengan *M. tuberculosis*) dan skala logaritmik *Ridley* atau indeks bakteri (BI) digunakan untuk menafsirkan hasil. Ketika dilakukan dengan benar, spesifisitas diagnostik *Slit Skin Smear* adalah 100%; namun, studi terbaru menunjukkan sensitivitas rata-rata 34,4% selama 5 tahun. Seiring perkembangan teknologi, penggunaan *Slit Skin Smear* di fasilitas yang memadai perlahan-lahan digantikan oleh tes molekuler yang lebih sensitif.

b. Biopsi kulit dan pemeriksaan histopatologi

Spesimen biopsi kulit diambil dari tepi lesi kulit terbaru dan aktif dengan mencakup seluruh ketebalan dermis dan setidaknya sebagian dari jaringan lemak subkutan. Sampel jaringan diwarnai dengan hematoksilin-eosin dan pewarna jaringan Fite, kemudian diperiksa untuk tipe, luas, dan karakteristik infiltrat, serta keberadaan AFB. Untuk tujuan penelitian, spesimen biopsi dapat dianalisis lebih lanjut untuk fraksi granuloma (proporsi dermis yang ditempati oleh granuloma saat dilihat dengan pembesaran rendah), indeks bakteri granuloma (BIG) untuk penentuan tingkat AFB dalam jaringan, dan indeks histopatologi, yang didefinisikan sebagai jumlah basil dalam volume jaringan tertentu. Fitur histopatologi dapat sangat berguna dalam mengklasifikasikan tipe kusta dan mengidentifikasi adanya reaksi kusta. Spesimen biopsi dari individu dengan TT biasanya menunjukkan granuloma epitelioid, infiltrat limfosit yang mengelilingi adnexa dan saraf, serta sangat sedikit (atau tidak ada) AFB. Pada kutub lepromatosa, terdapat agregat histiositik yang lebih tidak teratur dan menyebar dengan sel *Virchow* (histiosit dengan sitoplasma berbusa) yang mengandung sejumlah besar AFB. Basil sering berkumpul, membentuk globi yang mencolok. Penting untuk dicatat, keberadaan AFB dalam saraf dermis yang terlihat pada spesimen biopsi kulit bersifat patognomonik untuk kusta. Berbeda dengan TT, morfologi saraf dermis pada LL awalnya terjaga dengan baik tetapi

dapat menjadi fibrotik dengan tampilan seperti kulit bawang seiring kemajuan penyakit. Spesimen biopsi kulit dan pemeriksaan histopatologi dilaporkan memiliki spesifisitas diagnostik sebesar 70% hingga 72%, namun sensitivitasnya tetap lebih rendah, berkisar antara 49% hingga 70%. Sebuah studi terbaru mengamati bahwa pengambilan spesimen biopsi kulit mengonfirmasi diagnosis pada 71% pasien studi. Sensitivitas dan spesifisitas klasifikasi WHO yang diuji menggunakan pemeriksaan SSS dan hasil biopsi kulit sebagai standar emas ditemukan masing-masing sebesar 63% dan 85%. Meskipun pengambilan spesimen biopsi kulit tidak dianggap sebagai pemeriksaan wajib oleh WHO, hal ini merupakan alat tambahan yang berharga dalam mendiagnosis dan menilai respons terhadap pengobatan.

c. PCR

Diagnosis lepra didasarkan pada pemeriksaan klinis, pemeriksaan basil dari *smear* kulit dengan teknik *slit-skin*, dan histopatologi biopsi kulit; namun, bentuk paucibacillary (PB) tidak mudah terdeteksi oleh dua metode terakhir tersebut. PCR adalah teknik molekuler yang digunakan untuk memperbanyak DNA *M. leprae* dan *M. lepromatosis*. Pendekatan berbasis molekuler menggunakan PCR konvensional dan PCR kuantitatif (qPCR) telah terbukti memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan sensitivitas yang diamati pada baciloskopi biopsi kulit dan *slit skin smear*. (Marques et al., 2018)

Saluran pernapasan atas pada orang yang rentan dianggap sebagai jalur masuk dan keluar utama *M. leprae*, dan individu dengan penyakit aktif khususnya kasus multibasiler (MB) - merupakan sumber utama infeksi. Selain itu, beberapa studi berbasis amplifikasi asam nukleat telah menunjukkan bahwa rongga hidung terutama bertanggung jawab atas transmisi basil. Oleh karena itu, sampel sekresi hidung dan biopsi kulit telah banyak diteliti baik dengan PCR konvensional maupun qPCR, dengan yang terakhir terbukti lebih sensitif. (Marques et al., 2018)

Kehadiran teknologi reaksi rantai polimerase (PCR) telah memberikan kesempatan untuk mendeteksi sejumlah kecil DNA secara spesifik, dan suatu prosedur yang dapat menunjukkan keberadaan DNA setara dengan hanya 20 sel *Mycobacterium leprae* telah dikembangkan oleh Hartiskeerl et al. Studi yang menggunakan teknik ini telah mendeteksi DNA *Mycobacterium leprae* pada swab yang diambil dari mukosa hidung individu yang secara klinis normal, dalam populasi endemik lepra. Makna dari keberadaan DNA tersebut masih belum terjawab,

tetapi mungkin mewakili bentuk infeksi subklinis atau pembawa sementara *Mycobacterium leprae* yang, pada gilirannya, bisa penting untuk transmisi penyakit ini. Oleh karena itu, mungkin saja teknik PCR seperti itu digunakan untuk menilai beban transmisi lepra dalam suatu populasi. (Arunagiri et al., 2017)

Penelitian yang dilakukan Arunagiri et al, meneliti DNA *Mycobacterium leprae* dari sekresi hidung kontak rumah tangga sehat dan non-kontak dapat dideteksi melalui amplifikasi PCR sebagai metode untuk mendeteksi infeksi subklinis dalam suatu komunitas. Hasil dari penelitiannya menunjukkan bahwa hasil positif di antara kontak adalah indikasi paparan terhadap basil lepra dan *carrier M. leprae* di hidung. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa paparan tersebut terutama terjadi di daerah-daerah yang sebelumnya endemik lepra.

1.2.2. Cathelicidin LL-37

Pada kulit, terdapat 2 jenis *antimicrobial peptide* (AMP) utama, yaitu *Cathelicidin LL-37* dan defensin yang berpengaruh terhadap sistem imun manusia. *Cathelicidin LL-37* merupakan peptida kation dengan variabel struktur antimikroba terletak di bagian C-terminal. Manusia hanya memiliki satu gen *Cathelicidin LL-37*. Pada manusia satu gen *Cathelicidin LL-37* ini terletak di kromosom 3 (*cyclic AMP/CAMP*). *Cyclic AMP* mengkode prekursor protein yang tidak aktif, yang dikenal dengan prekursor *Cathelicidin LL-37*, atau *human cationic antimicrobial peptide-18* (hCAP18) dengan total panjang asam amino 170. Prekursor protein hCAP18 manusia diproduksi oleh sel kulit, termasuk keratinosit, sel mast, neutrofil, dan sel kelenjar ekkrin. Protease protein (contoh protease 3) akan memproses hCAP18 menjadi molekul efektor LL-37 (nama LL-37 diambil dari asam amino 37 AMP aktif yang dilepaskan protein C-terminal), yang memiliki peran penting dalam mekanisme pertahanan host karena memiliki aktivitas antibakteri, antijamur, dan antivirus. Molekul LL-37 memiliki peran antibakteri luas terhadap Gram-negatif maupun Gram-positif. Molekul ini mampu menetralkan lipopolisakarida, dan memiliki efek antibakteri sinergis dengan defensin, dan merupakan agen kemotaktik netrofil, monosit, dan sel T menggunakan *formyl peptide receptor-like 1* (FPRL-1). (Argentina et al., 2019)

Antimicrobial peptide dapat ditemukan pada berbagai jaringan kulit. Pola ekspresi dan regulasi AMP spesifik pada setiap tipe sel pada masing-masing organ. Telah banyak penelitian mengenai AMP pada berbagai kondisi kulit. Pada penelitian mengenai *Cathelicidin LL-37*, diketahui LL-37 diinduksi pada keratinosit manusia pada penyakit psoriasis, lupus eritematosus, dan dermatitis kontak. Produksi *Cathelicidin LL-37* berkurang pada keadaan dermatitis atopik. Pada penyakit kulit *eritema toxicum neonatorum*, produksi LL-37 meningkat, juga pada *verruca vulgaris* dan kondiloma akuminata sebagai respon imun terhadap infeksi virus papilloma. Pada akne vulgaris produksi hBD 1 atau 2 meningkat, menunjukkan adanya keterlibatan AMP pada pathogenesis dan/atau resolusi penyakit acne. Pada kulit normal hBD tidak ada, namun produksinya meningkat pada keratinosit lesi pasien

psoriasis, menunjukkan peran *AMP* pada kondisi kulit yang sedang inflamasi kronik. *Antimicrobial peptides* dapat juga mengaktifkan dan mengerahkan sel imun, sehingga mengakibatkan penghancuran mikroba dan/atau mengontrol inflamasi. Karena *AMP* diproduksi oleh berbagai sel imun seperti netrofil dan makrofag, sehingga merupakan molekul pertama menghadapi serangan mikroba. Pada keadaan infeksi, sangat penting untuk mengaktifkan respon imun guna menarik sel imun lain dan juga mengontrol inflamasi. Beberapa *AMP* dapat menghasilkan respon imun, contohnya: aktivasi, penarikan, dan diferensiasi sel darah putih; stimulasi proses angiogenesis; penurunan inflamasi dengan menurunkan ekspresi kemokin proinflamasi; dan mengontrol ekspresi kemokin dan oksigen reaktif/spesies nitrogen. Pada manusia, *AMP* seperti LL-37 dan HBD memiliki kemampuan untuk menarik (*chemoattract*) sel imun seperti sel mast, leukosit, dan sel dendritik. (Matzner *et al*, 2011)

Cathelicidin LL-37 diproduksi oleh berbagai sel tubuh, termasuk sel epitel, neutrofil, dan makrofag. Peptida ini disintesis sebagai bentuk inaktif yang disebut pro-*Cathelicidin LL-37* dan diaktifkan menjadi bentuk yang lebih kecil dan aktif setelah pemecahan proteolitik. LL-37, sebagai bentuk aktif *Cathelicidin LL-37*, memiliki kemampuan untuk langsung menembus membran sel bakteri dan menghancurkan patogen. Selain itu, *Cathelicidin LL-37* juga berperan dalam proses inflamasi dengan memodulasi aktivitas sel imun, seperti neutrofil, makrofag, dan sel T. (Argentina *et al.*, 2019)

b. Peran *Cathelicidin LL-37* dalam Patogenesis Lepra

Sebagian besar target membran *AMP* pada vertebrata tidak memiliki interaksi spesifik terhadap reseptor. Bagian luar permukaan bakteri Gram positif dan Gram-negatif mengandung *teichoic* dan lipopolisakarida (LPS), masing-masing memberi muatan negatif pada permukaan sehingga menyebabkan hubungan elektrostatis dengan kationik *AMP*. Sebagian besar membran aktif *AMP* bersifat amphipathic, yang artinya memiliki permukaan kationik dan hidrofobik. Sifat tersebut menyebabkan terbentuknya interaksi elektrostatis dengan sel membran bermuatan negatif dan menyebabkan masuknya materi *AMP* ke dalam membran interior. Aksi *AMP* tidak berhenti sampai interaksi awal ini. Setelah interaksi elektrostatis dan hidrofobik awal, *AMP* terakumulasi pada permukaan dan setelah mencapai konsentrasi tertentu *AMP* menyusun diri di membran bakteri. Antimicrobial peptides berinteraksi dengan membran sitoplasmik terlebih dahulu dan terakumulasi di interselular, lalu dapat terjadi hambatan proses selular. Banyak mekanisme baru melibatkan target intraselular, seperti inhibisi protein/sintesis asam nukleat dan kerusakan enzimatis/aktivitas protein. (Argentina *et al.*, 2019)

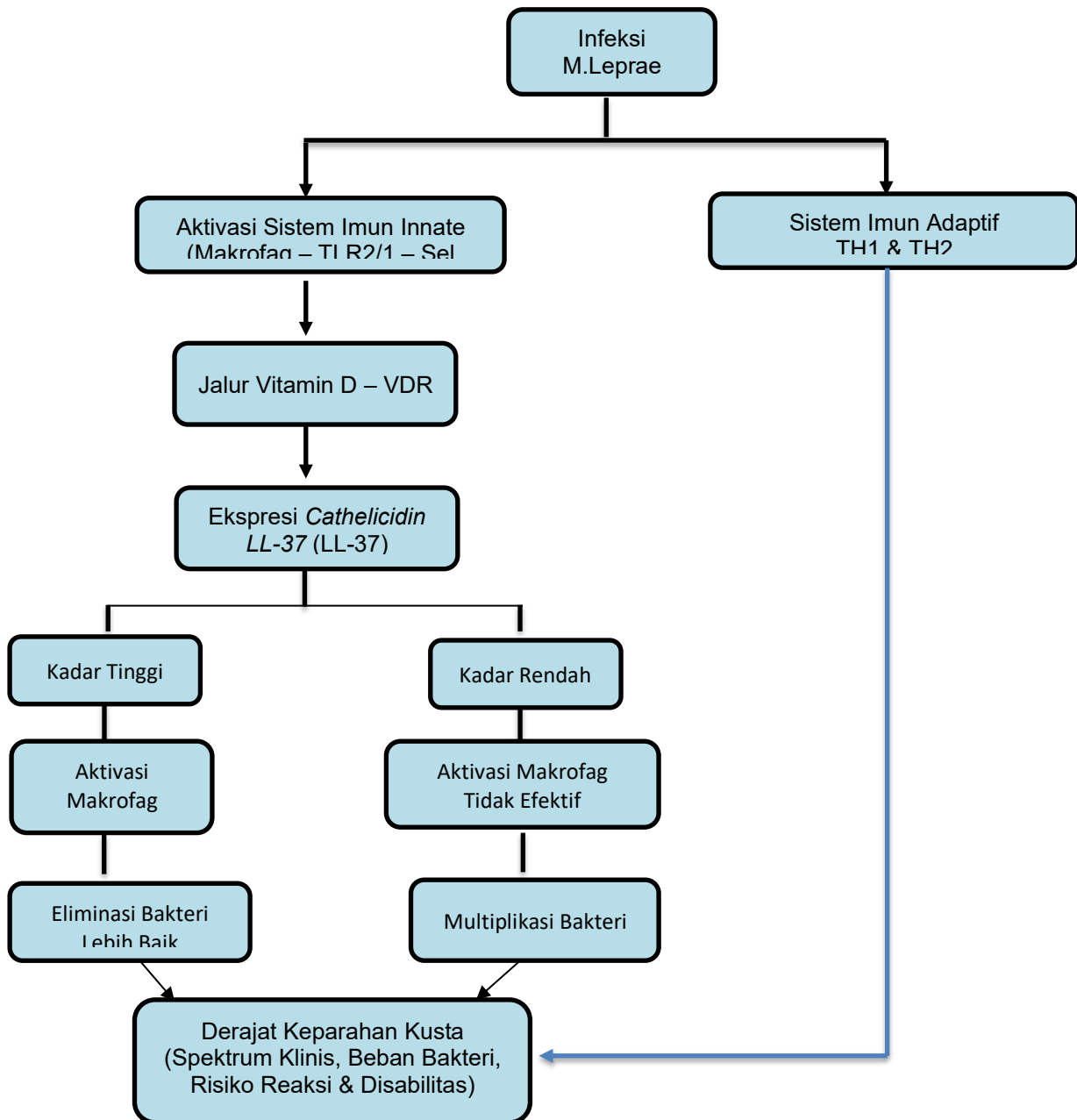
Mikobakterium menghasilkan lipopeptida triasilasi sehingga dapat menginduksi respon imun melalui kompleks *toll-like receptor 2/1* (TLR 2/1). Aktivasi TLR 2/1 menghasilkan pembersihan patogen, seperti patogen *M. leprae*, atau *M. tuberculosis* oleh makrofag, netrofil, dan sel epitel. Beberapa akibat dari aktivasi TLR

2/1 adalah produksi sitokin proinflamasi dan AMP. Khususnya, stimulasi TLR 2 mengarah pada induksi *Cathelicidin LL-37*, dan *human β -defensin 2* dan 3 (hBD 2 dan 3) pada epitel dan makrofag. (Matzner *et al.*, 2011)

Saat terjadi infeksi, *Cathelicidin LL-37* sangat terinduksi dalam keratinosit. Sangat jelas hubungan antara *Cathelicidin LL-37* dengan penyakit kusta dan telah diamati dari berbagai penelitian bahwa terdapat korelasi kuat antara kadar *Cathelicidin LL-37* di kulit dan kejadian infeksi kulit. Sehingga hubungan kurangnya produksi *Cathelicidin LL-37* secara keseluruhan berhubungan dengan kerentanan penyakit infeksi tidak hanya tuberkulosis tapi juga penyakit kusta. Hasil dari berbagai penelitian menunjukkan hubungan antara *Cathelicidin LL-37* dengan infeksi mikobakterium, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk investigasi peran tersebut. (Argentina *et al.*, 2019)

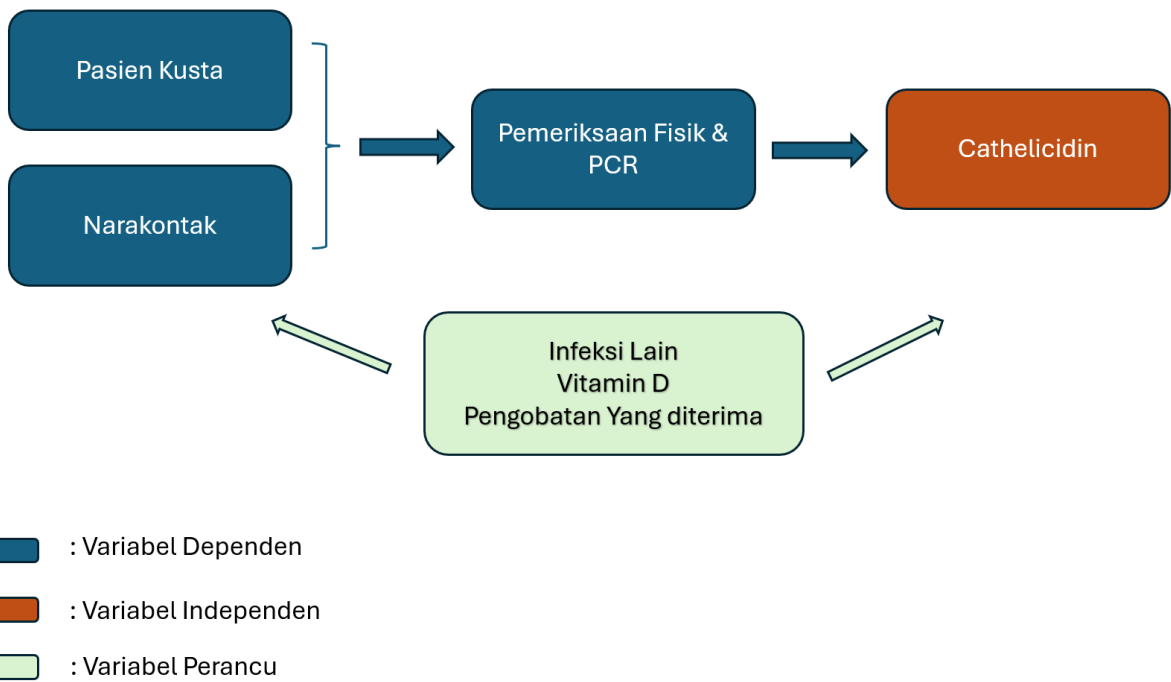
Cathelicidin LL-37 dilaporkan berperan penting dalam sistem imunitas bawaan dengan berinteraksi dengan molekul dinding sel dan melubangi membran sitoplasma yang mengakibatkan kematian sel bakteri. Secara spesifik, *Cathelicidin LL-37* sangat berperan dalam efektivitas fagositosis oleh makrofag M1 yang telah teraktivasi oleh IL-12. Aktivitas antimikroba dari *Cathelicidin* dimediasi oleh adanya interaksi muatan positif pada protein *Cathelicidin LL-37* dengan membrane bakteri mycobacterium yang cenderung negatif. Dalam hal ini, lipopolisakarida pada membrane bakteri kusta berperan sebagai *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) yang dikenali oleh protein anti mikrobial *Cathelicidin*. *Cathelicidin* juga meningkatkan efisiensi fusi lisosom dengan fagosom makrofag yang berisi mikobakterium. Normalnya, mikobakterium dapat hidup dan berkembang biak dalam sel makrofag tanpa terdeteksi ataupun terancam dengan adanya lisosom, sehingga makrofag berperan sebagai medium yang membantu diseminasi bakteri. Namun, *Cathelicidin LL-37* meningkatkan efisiensi fagositosis serta aktivasi sistem imun *innate* berbasis TLR. Aktivasi TLR akan meningkatkan ekspresi sitokin pro-inflamasi jenis Th-1 seperti IFN- α dan IFN- γ serta IL-6. IFN- α dan IFN- γ mengaktivasi makrofag melalui jalur autokrin dan menginduksi fusi lisosom dengan fagosom yang berperan dalam mengeleminasi mikobakterium yang telah difagositosis atau telah berada dan hidup di dalam makrofag. Pentingnya *Cathelicidin LL-37* dalam interaksi sistem imun dengan mikobakterium, termasuk *Mycobacterium leprae*, tercermin dalam beberapa laporan yang menunjukkan bahwa kadar *Cathelicidin* yang rendah meningkatkan risiko lepra. Lebih jauh, telah dilaporkan juga bahwa efek dari *Cathelicidin LL-37* tidak terbatas pada leukosit, namun juga mampu menginduksi ekspresi IL-1 β dan TNF- α oleh keratinosit yang membantu membangun respon imun terhadap bakteri patogen. (Hostiadi *et al.*, 2023)

1.2.1 Kerangka teori



Gambar 2. Kerangka teori

1.2.2 Kerangka konsep



Gambar 3. Kerangka Konsep

1.3 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang dirumuskan pertanyaan sebagai berikut:

1. Apakah terdapat hubungan antara kadar *Cathelicidin LL-37* dengan status pasien kusta dan narakontak?
2. Apakah hasil pemeriksaan PCR berhubungan dengan status pasien kusta dan narakontak yang terhubung?
3. Apakah terdapat hubungan antara kadar *Cathelicidin LL-37* dengan hasil pemeriksaan PCR *Mycobacterium leprae* pada pasien kusta dan narakontak yang terhubung?

1.4 Tujuan penelitian

- a. Tujuan umum
Mengetahui hubungan kadar *Cathelicidin LL-37* penderita Kusta dan narakontak
- b. Tujuan khusus
 1. Menganalisis hubungan antara kadar *Cathelicidin LL-37* dengan status pasien kusta dan narakontak?
 2. Menganalisis hubungan hasil PCR *Mycobacterium leprae* dengan status pasien kusta dan narakontak yang terhubung?
 3. Menganalisis hubungan antara kadar *Cathelicidin LL-37* dengan hasil pemeriksaan PCR *Mycobacterium leprae* pada pasien kusta dan narakontak yang terhubung?

1.5 Hipotesis penelitian

1. Terdapat hubungan antara kadar *Cathelicidin LL-37* dengan status pasien kusta dan narakontak?
2. Terdapat hubungan hasil PCR *Mycobacterium leprae* dengan status pasien kusta dan narakontak yang terhubung?
3. Terdapat hubungan antara kadar *Cathelicidin LL-37* dengan hasil pemeriksaan PCR *Mycobacterium leprae* pada pasien kusta dan narakontak yang terhubung?

1.6 Manfaat penelitian

1. Bagi kalangan akademisi, kadar serum *Cathelicidin LL-37* dapat dijadikan sebagai salah satu biomarker untuk memprediksi terjadinya kusta dan kadar *Cathelicidin LL-37* dapat dijadikan landasan terapi dan preventif, serta dapat menjadi referensi bagi penelitian-penelitian selanjutnya yang berhubungan dengan kadar *Cathelicidin LL-37* pada penderita kusta.
2. Bagi masyarakat, penelitian ini dapat memberikan penjelasan mengenai kadar serum *Cathelicidin LL-37* pada penderita kusta, narakontak dan orang normal.
3. Bagi pemerintah dan praktisi kesehatan, penelitian ini dapat menjadi masukan untuk pembuatan kebijakan dan penyusunan materi promosi kesehatan mengenai penyakit kusta secara khusus terkait kadar serum *Cathelicidin LL-37* untuk skrining pada penderita kusta.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain cross sectional yang dilakukan dengan membandingkan kadar *Cathelicidin LL-37* pada pasien kusta dan narakontak

2.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium HUMRC Lantai 6 RS Pendidikan Universitas Hasanuddin dan Pulau Bonerate, Kabupaten Selayar, Sulawesi Selatan

2.3 Populasi penelitian

Pasien yang terdiagnosis kusta (morbus Hansen) atau memiliki kontak erat (narakontak) dengan pasien yang terkonfirmasi kusta di Pulau Bonerate Selayar.

2.4 Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah serum penderita Kusta yang di diagnosis berdasarkan gejala klinis dan di konfirmasi dengan tes PCR yang diambil dari sampel swab nasal. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dan memenuhi kriteria inklusi dalam kurun waktu tertentu sesuai waktu penelitian sampai besar sampel yang dibutuhkan terpenuhi. Subyek pembanding yaitu serum narakontak. Serum narakontak adalah orang kontak serumah dan tetangga dengan pasien penderita kusta yang diambil dari pulau bonerate selayar yang digunakan sebagai kontrol yang telah memenuhi kriteria inklusi

2.5 Jumlah sampel

Sampel diambil secara *consecutive sampling* hingga jumlah sampel minimum terpenuhi. Jumlah sampel minimum untuk penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus analitik numerik tidak berpasangan berikut: Besar sampel pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta}) SD}{X_1 - X_2} \right]^2$$

Keterangan :

n_1 = jumlah sampel kelompok 1

n_2 = jumlah sampel kelompok 2

Z_{α} = kesalahan tipe 1, untuk $\alpha = 0,05$, sebesar 1,96

Z_{β} = Kesalahan tipe 2, untuk $\beta = 0,10$, sebesar 1,28

SD= standart deviasi dari kadar besi menurut penelitian sebelumnya (Tamara et al., 2018), sebesar 31,42

$X_1 - X_2$ = Perbedaan kadar zat besi sebelum dan sesudah pengobatan

(Tamara et al., 2018), sebesar 62,17-106,1

Besar sampel penelitian ini adalah:

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(1,96 + 1,28) 31,42}{43,93} \right]^2 = 10,74$$

Besar sampel yang dibutuhkan untuk masing-masing kelompok adalah 10,74 dan ditambah dengan perkiraan *drop out* 25% (2,69), maka besar sampel minimal penelitian adalah 13,43 yang dibulatkan menjadi 14 sampel untuk masing-masing kelompok. Namun, untuk meningkatkan ketepatan hasil penelitian ini, kami akan mengumpulkan 30 sampel untuk kelompok kusta di Kepulauan Bonerate, masing-masing 30 sampel dari pasien kusta itu sendiri dan 30 sampel dari orang-orang yang dekat dengan pasien kusta.

2.6 Kriteria sampel

2.6.1 Kriteria inklusi :

1. Sampel serum penderita kusta dan narakontak dan orang normal dengan data lengkap
2. Bersedia untuk berpartisipasi dalam penelitian dengan menandatangani *informed consent*.

2.6.2 Kriteria eksklusi :

1. Serum rusak dengan perubahan warna keruh untuk pemeriksaan ELISA.
2. Pasien hamil
3. Pasien dengan keganasan dan penyakit infeksi lain.
4. Pasien yang tidak bersedia mengikuti penelitian.

2.7 Prosedur Penelitian

2.7.1 Tahapan Pelaksanaan

Tahap-tahap kegiatan yang dilakukan pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut:

1. Dilakukan wawancara / anamnesis langsung pada sampel yang memenuhi syarat penelitian, dengan menggunakan kuisisioner yang telah disiapkan dan dimaksudkan untuk mengumpulkan data tentang identitas, karakteristik dan riwayat dari sampel.
2. Penderita diberikan penjelasan dan diminta kesediannya secara sukarela untuk terlibat dalam penelitian dan menandatangani *informed consent*
3. Pemeriksaan klinis dilakukan untuk menegakkan diagnosis.
4. Dilakukan pengambilan sampel darah vena mediana cubiti sebanyak 5 cc untuk pemeriksaan kadar *Cathelicidin LL-37*.
5. Dilakukan pengambilan sampel swab nasal untuk pemeriksaan PCR.

6. Sampel darah selanjutnya dilakukan pemeriksaan dengan metode ELISA untuk mengukur kadar *Cathelicidin LL-37*.
7. Sampel swab nasal selanjutnya dilakukan pemeriksaan Real Time PCR

2.7.2 Pemeriksaan PCR

A. Ekstreaksi DNA Sampel Swab

1. Buat Larutan S2 dengan Cara Ambil 1 ul Carrier RNA tambahkan 500 ul S2 buffer persampel.
2. Masukkan sampel (Swab) kedalam tabung ependorf 1,5 ml tambahkan 500 ul larutan S1 dan 20 ul Proteinase K (sebelumnya ditambahkan ddH₂O add 1 ml), vortex selama 10 detik. Inkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit. Masukkan ke dalam filter column dan tabung ependorf 1,5 ml kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 – 16.000 (15.000) X g selama 2 menit. Buang Filter dan swab.
3. Tambahkan 500 ul Larutan S2 (point 1). Inkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit, Dimana tiap 5 menit divortex.
4. Tambahkan 500 ul Ethanol Absolut campur selama 10 detik. Transfer 750 ul kedalam GD Column dalam 2 ml collection tube sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 – 16.000 (15.000) X g selama 1 menit proses ini berlangsung selama 2x. buang collection tube, ganti dengan 2 ml collection tube yang baru.
5. Tambahkan 400 ul W1 Buffer kedalam GD column, sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 – 16.000 (15.000) X g selama 30 detik, buang cairan yang Terdapat pada collection tube. Tambahkan 600 ul Wash Buffer (sebelumnya ditambahkan Ethanol add 100 ml) sentrifuge dengan kecepatan 14.000–16.000 (15.000) X g selama 30 detik. Buang cairan yang terdapat pada collection tube sentrifuge dengan kecepatan 14.000 – 16.000 (15.000) X g selama 3 menit.
6. Pindahkan GD column kedalam tabung ependorf 1,5 ml, tambahkan 100 ul Elution Buffer yang sebelumnya telah dipanaskan, diamkan selama 3 menit, tube sentrifuge dengan kecepatan 14.000–16.000 (15.000) X g selama 1 menit. Buang GD column, cairan yang terdapat pada tabung ependorf 1,5 ml merupakan DNA produk dari sampel yang telah diekstraksi dan siap untuk di PCR.

B. Mix qRT- PCR Gen RLEP

- Enzim qRT-PCR Sensifast SBYR : 10,0 ul
- Primer MLRLEPTaq-F : 0,5 ul
- Primer MLRLEPTaq-R : 0,5 ul
- Probe MLRLEPTaq : 0,5 ul
- Nuclesa Free Water : 3,5 ul
- DNA Sampel : 5,0 ul

Total : 20 ul

C. Running PCR

- Cycle 1 sebanyak 1x Suhu 50 °C selama 2 Menit

- Cycle 2 sebanyak 1x Suhu 95 °C selama 10 Menit
- Cycle 3 sebanyak x 40 Siklus
- Step 1 Suhu 95 °C selama 15 detik
- Step 2 Suhu 60 °C selama 30 detik

2.7.3 Pemeriksaan ELISA

A. Persiapan Reagen

1. Bawa semua reagen ke suhu ruangan (18-25°C) sebelum digunakan. Jika kit tidak akan digunakan dalam satu kali pengujian, harap hanya mengambil strip dan reagen yang diperlukan untuk percobaan saat ini, dan simpan strip dan reagen yang tersisa pada kondisi yang dibutuhkan.
2. Larutan Pencuci: Encerkan 30 mL Larutan Pencuci Pekat dengan 720 mL Gunakan air deionisasi atau air suling untuk menyiapkan 750 mL Larutan Pencuci. Catatan: jika kristal terbentuk dalam konsentrat, panaskan dalam penangas air 40°C dan aduk perlahan hingga kristal larut sepenuhnya.
3. Larutan kerja standar: Sentrifugasi standar pada 10.000×g selama 1 menit. Tambahkan 1 mL Larutan Standar Referensi & Pengencer Sampel, diamkan selama 10 menit, dan balikkan perlahan beberapa kali. Setelah larut sepenuhnya, aduk rata dengan pipet. Rekonstitusi ini menghasilkan larutan kerja 100 ng/mL (atau tambahkan 1 mL Larutan Standar Referensi & Pengencer Sampel, diamkan selama 1-2 menit, lalu aduk rata dengan vortex meter kecepatan rendah. Gelembung yang dihasilkan selama pengadukan vortex dapat dihilangkan dengan sentrifugasi pada kecepatan yang relatif rendah). Kemudian lakukan pengenceran serial sesuai kebutuhan. Gradien pengenceran yang direkomendasikan adalah sebagai berikut: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0 ng/mL.

Metode pengenceran: Ambil 7 tabung EP, tambahkan 500 µL Standar Referensi & Pengencer Sampel ke setiap tabung. Pipet 500 µL larutan kerja 100 ng/mL ke tabung pertama dan campur hingga menghasilkan larutan kerja 50 ng/mL. Pipet 500 µL larutan dari tabung pertama ke tabung kedua sesuai langkah ini.

Catatan: tabung terakhir dianggap sebagai tabung kosong. Jangan memipet larutan ke dalamnya dari tabung pertama. Larutan kerja zat standar pada konsentrasi 100 ng/mL setelah rekonstitusi harus dibagi menjadi beberapa alikuot dan disimpan pada suhu -20°C. Larutan tersebut harus digunakan dalam waktu setengah bulan dan pembekuan-pencairan berulang harus dihindari. Larutan kerja standar yang diencerkan secara bertahap harus disiapkan tepat sebelum digunakan.

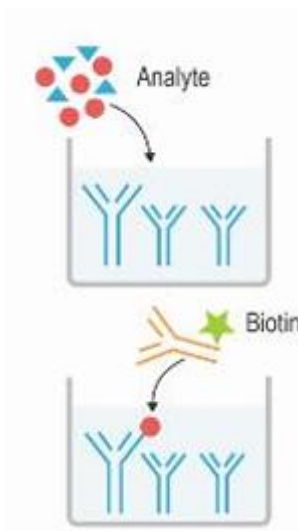
4. Larutan Deteksi Antibodi Berbiotinilasi: Hitung jumlah yang dibutuhkan sebelum percobaan (100 μ L/sumur). Dalam persiapan, siapkan sedikit lebih banyak dari yang dihitung. Sentrifugasi Antibodi Deteksi Berbiotinilasi Terkonsentrasi pada 800 $\times$ g selama 1 menit, kemudian encerkan Antibodi Deteksi Berbiotinilasi Terkonsentrasi 100 $\times$ menjadi larutan kerja 1 $\times$ dengan Pengencer Antibodi Deteksi Berbiotinilasi (Antibodi Deteksi Berbiotinilasi Terkonsentrasi : Pengencer Antibodi Deteksi Berbiotinilasi = 1 : 99). Larutan kerja harus disiapkan tepat sebelum digunakan.

B. Prosedur Pengujian

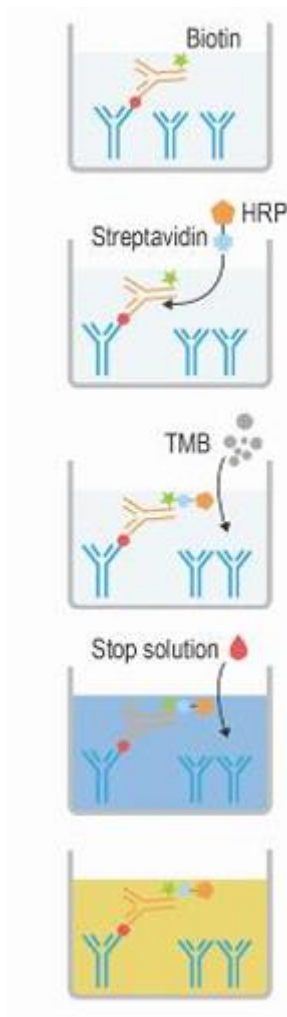
1. Tentukan *wells* untuk standar yang diencerkan, blanko , dan sampel. Tambahkan 100 μ L masing masing pengenceran standar, blanko, dan sampel ke dalam sumur yang sesuai (Disarankan agar semua sampel dan standar diuji secara duplikat. Disarankan untuk menentukan rasio pengenceran sampel melalui percobaan pendahuluan atau rekomendasi dukungan teknis). Tutup pelat dengan penutup yang disediakan dalam kit. Inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C. Catatan: larutan harus ditambahkan ke bagian bawah sumur pelat mikro ELISA, hindari menyentuh dinding bagian dalam dan menyebabkan pembuihan sebisa mungkin.
2. Buang cairan dari setiap sumur, jangan dicuci. Segera tambahkan 100 μ L larutan kerja Antibodi Deteksi Berbiotinilasi ke setiap sumur. Tutup pelat dengan penutup baru. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
3. Tuang larutan dari setiap sumur, tambahkan 350 μ L larutan pencuci ke setiap sumur. Rendam selama 1 menit, lalu sedot atau tuangkan larutan dari setiap sumur dan keringkan dengan menepuk-nepuknya pada kertas penyerap bersih. Ulangi langkah pencucian ini 3 kali. Catatan: alat pencuci mikroplat dapat digunakan pada langkah ini dan langkah pencucian lainnya. Gunakan strip yang telah diuji segera setelah langkah pencucian. Jangan biarkan sumur mengering.
4. Tambahkan 100 μ L larutan kerja Konjugat HRP ke setiap sumur. Tutup pelat. dengan bahan penyegel baru. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
5. Tuangkan larutan dari setiap sumur, ulangi proses pencucian sebanyak 5 kali. dilakukan pada langkah 3.
6. Tambahkan 90 μ L Reagen Substrat ke setiap sumur. Tutup pelat dengan penutup baru. Inkubasi selama kurang lebih 15 menit pada suhu 37°C. Lindungi pelat dari cahaya. Catatan: waktu reaksi dapat dipersingkat atau diperpanjang sesuai dengan

perubahan warna yang sebenarnya, tetapi tidak lebih dari 30 menit. Panaskan Pembaca Mikroplat selama kurang lebih 15 menit sebelum pengukuran OD.

7. Tambahkan 50 μ L Larutan Penghenti ke setiap sumur. Catatan: menambahkan larutan penghenti harus dilakukan dengan urutan yang sama seperti larutan substrat.
8. Tentukan kerapatan optik (nilai OD) dari setiap sumur sekaligus dengan menggunakan pembaca mikroplat yang diatur pada 450 nm



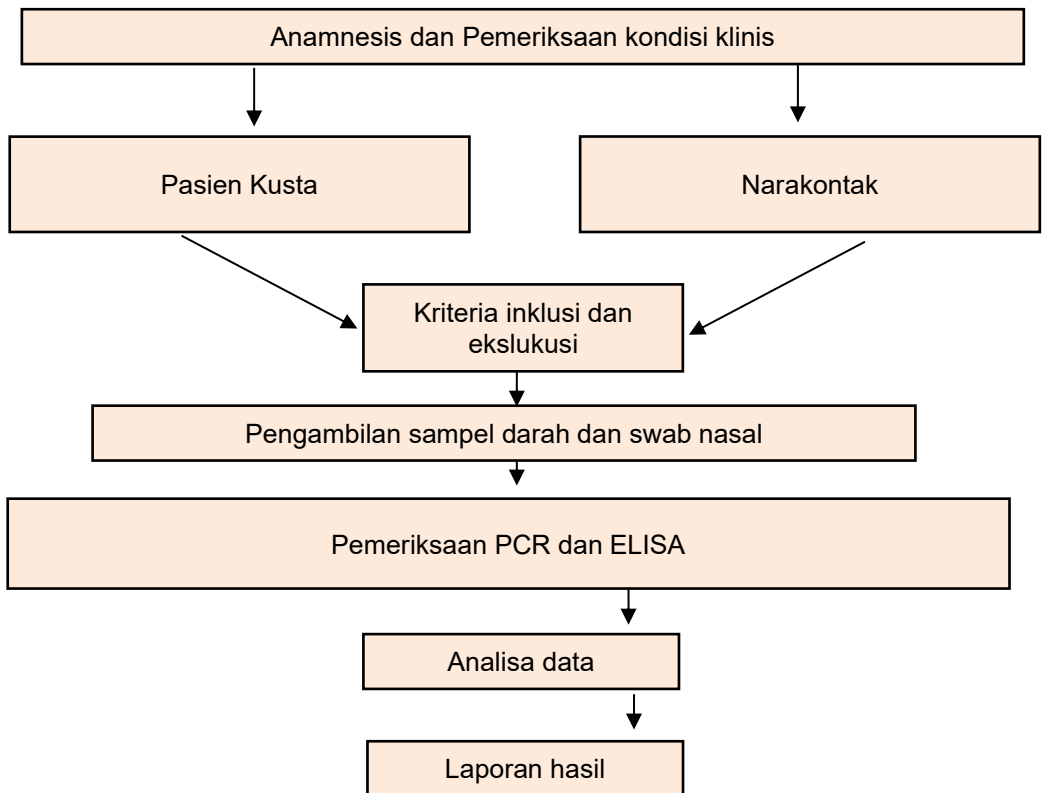
1. Tambahkan 100 μ L standar atau sampel ke dalam sumur. Inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C.
2. Buang cairan, segera tambahkan 100 μ L larutan antibodi deteksi biotinilasi ke setiap sumur. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.



3. Aspirasi dan cuci pelat sebanyak 3 kali.
4. Tambahkan 100 μ L larutan konjugat HRP. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Aspirasi dan cuci pelat sebanyak 5 kali.
5. Tambahkan 90 μ L reagen substrat. Inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C.
6. Tambahkan 50 μ L larutan penghenti.
7. Baca pelat pada 450nm segera. Hitung hasilnya.

Gambar 4. Pemeriksaan ELISA

2.8 Skema Alur Penelitian



Gambar 5. Skema Alur Penelitian

2.9 Identifikasi variabel penelitian

- Variabel bebas : pada penelitian ini adalah penderita kusta dan narakontak
- Variabel tergantung : pada penelitian ini adalah kadar serum *Cathelicidin*

LL-37.

2.10 Definisi Operasional

- a. Penderita kusta adalah subyek penelitian yang setelah dilakukan serangkaian pemeriksaan klinis, bakteriologis, dan PCR. 3 tanda utama (*Cardinal sign*) penyakit kusta yakni kelainan kulit yang mati rasa (anestesi), penebalan saraf tepi, dan ditemukannya kuman BTA dari apus sayatan kulit maupun biopsi kulit; atau jika memenuhi paling sedikit dua dari tiga tanda utama yang disebutkan terdahulu atau yang ketiga.
- b. Narakontak adalah Orang yang kontak erat dengan pasien kusta > 6 bulan termasuk kontak serumah (tinggal dalam satu rumah), kontak tetangga (tinggal di sekitar 10 rumah penderita kusta), dan kontak sosial (bertemu minimal 20 jam seminggu dengan teman sekolah atau rekan kerja).
- c. Kadar serum *Cathelicidin LL-37* yaitu jumlah *Cathelicidin LL-37* yang diperoleh dari serum subyek penelitian yang dihitung menggunakan ELISA.

2.11 Izin penelitian dan kelayakan etik

1. Surat permohonan etik penelitian akan diajukan ke komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
2. Menyertakan surat pengantar yang ditujukan kepada Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin, sebagai permohonan izin untuk melakukan penelitian.
3. Menjaga kerahasiaan identitas pribadi responden, sehingga diharapkan tidak ada pihak yang merasa dirugikan atas penelitian yang dilakukan.
4. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan manfaat kepada semua pihak yang terkait sesuai dengan manfaat penelitian yang telah disebutkan sebelumnya.