

Bidang Ilmu : KESEHATAN

LAPORAN PENELITIAN HIBAH STRATEGIS NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2009



KKA  
KK  
Lp. 103/10  
Pra  
A

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

ANALISIS GENOTYPING *Mycobacterium leprae* pada LINGKUNGAN AIR  
DAERAH ENDEMIS KUSTA di KABUPATEN LAMONGAN JAWA TIMUR  
dan STUDI POLA TRANSMISI NYA SEBAGAI SALAH SATU SUMBER  
PENULARAN NON-MANUSIA

Ketua Peneliti : Dr. CITA ROSITA S.PRAKOESWA, dr., SpKK(K)  
Anggota : Prof. Dr. INDROPO AGUSNI, dr., SpKK(K)  
DINAR ADRIATY, S.Si, M.Kes  
Dr. EDUARDUS BIMO, drh, M.Kes

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Desember 2009

## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1. Judul Penelitian : Analisis Genotyping *Mycobacterium leprae* pada lingkungan daerah Endemis Kusta di Kabupaten Lamongan Jawa Timur sebagai Salah Satu Kemungkinan Sumber Penularan Non Manusia

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Dr. Cita Rosita S. Prakoeswa, dr., SpKK (K)
- b. Jenis Kelamin : ♀ / P
- c. NIP : 140 335 263
- d. Jabatan Struktural : Sekretaris Program Studi PPDS
- e. Jabatan fungsional : Staf Medis Departemen Kesehatan Kulit dan Kelamin, RSUD Dr. Sutomo
- f. Bidang keahlian : Staf Peneliti Lembaga Penyakit Tropis Unair
- g. Fakultas/Jurusan : Kulit dan Kelamin (Kusta)
- h. Pusat Penelitian : Fakultas Kedokteran Unair
- i. Tim Peneliti : Lembaga Penyakit Tropis Unair Surabaya

No.	Nama & Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi	Alokasi Waktu (Jam/Minggu)
1.	Dr. Cita Rosita S. Prakoeswa, dr., SpKK(K)	Kulit dan Kelamin (Kusta)	FK-Unair	15 Jam
2.	Prof. Dr. Indropo Agusni, dr., SpKK	Kulit dan Kelamin (Kusta)	FK-Unair	10 Jam
3.	Dinar Adriaty, S.Si, M.Kes	Biologi Molekuler	LPT Unair	10 jam
4.	Dr. Eduardus Bimo, Drh, M.Kes	Biologi Molekuler	LPT Unair	10 jam

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian:

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : 100.000.000
- c. Biaya yang disetujui : 100.000.000

Surabaya, 9 Desember 2008

Mengetahui,  
Ketua Lembaga Penyakit Tropis  
Universitas Airlangga

Ketua Peneliti,

Dr. Nasronuddin, dr., Sp.PD, K-PTI  
NIP. 140 159 073

Dr. Cita Rosita S. Prakoeswa, dr., SpKK(K)  
NIP. 140 335 263

Menyetujui :

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Airlangga



Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, drh., DEA  
NIP. 131 837 004

## RINGKASAN

Masalah kusta di Indonesia ditunjukkan dengan prevalensi cukup tinggi dan insidens yang tetap tinggi terutama di beberapa kawasan Indonesia Timur sehingga mempersulit penanggulangan. Secara teori sumber penularan basil kusta dapat terjadi melalui kontak langsung dengan sumber infeksi, maupun melalui jalur tidak langsung yaitu melalui lingkungan. Dari berbagai penelitian epidemiologi, timbul kecurigaan bahwa banyak individu yang terinfeksi basil kusta tanpa adanya sumber penularan yang jelas, terjadi antara lain disebabkan oleh penularan secara tidak langsung. Untuk mempelajari alur penularan *M.leprae* di lingkungan daerah endemik kusta adalah penting untuk mendeteksi *M.leprae* yang terdistribusi di lingkungan dan penduduk lingkungan tersebut serta menganalisa pola variasi gen yang terdistribusi di lingkungan juga masyarakat setempat. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa *M.leprae* yang terdeteksi di lingkungan serta mendapatkan profil genotype isolat *M.leprae* di lingkungan.

Penelitian tentang analisis genotipe *M. leprae* di daerah endemik telah dilakukan terhadap 109 sampel yang terdiri dari 24 pasien kusta, 49 sampel hapusan hidung pasien dan nara kontak dan 18 sampel air sumur dan 18 sampel tanah di lingkungan pasien kusta di daerah endemik kusta di Desa Brondong Kecamatan Brondong Kabupaten Lamongan. Pada 24 pasien kusta didapatkan 20 (83.33%) MB dan 4 (16.67%) PB, sedangkan berdasarkan status penderita adalah 12 (24%) RFT dan 12 (24%) sedang dalam pengobatan regimen MDT . Berdasar hasil pemeriksaan PCR terhadap 49 sampel hapusan hidung yang berasal dari 24 penderita kusta dan 25 orang sehat didapat 8 orang (16.33%) positif ditemukan *M. leprae* terdiri 5 hapusan hidung penderita kusta (20.83%) dan 3 hapusan hidung orang sehat (12%). Sedangkan yang negatif 41 orang (83.67%) terdiri dari 19 orang hapusan hidung penderita kusta (79.17%) dan 22 orang hidung orang sehat (88%). Berdasarkan uji statistik tidak ada perbedaan positività *M. leprae* dengan pemeriksaan PCR antara hapusan hidung penderita kusta dengan hapusan hidung orang sehat di daerah endemik kusta ( $p=0,2860$ ). Dari pemeriksaan PCR terhadap 36 sampel lingkungan didapatkan hasil sebagai berikut ini. Dari hasil pemeriksaan PCR terhadap 18 sampel air dari lingkungan didapat 5 sampel (22.78%) positif ditemukan *M. leprae* dari air sumur penderita dan dari 18 sampel tanah didapatkan 1 sampel (5.56%) positif.

Berdasarkan variasi pengulangan sekuen nukleotida TTC *M. leprae* dari sampel sayatan kulit penderita kusta didapatkan 2 strain *M. leprae* dengan variasi antara 10-60 dengan frekuensi terbanyak terdapat pada pengulangan TTC 13 kali sebanyak 1 isolat (20%), diikuti TTC 18 kali 4 isolat (80%), sementara pada apusan hidung sampel kontak pasien kusta didapatkan hasil DNA *M.leprae* positif sebesar 1 dari 25 sampel (4%) yaitu 28 copy. Pada sampel air didapatkan hasil DNA *M.leprae* positif sebesar 3 dari 18 sampel (16.67%) yaitu 11 copy untuk ketiga sampel tersebut, sementara pada sampel tanah tidak didapatkan hasil DNA *M.leprae* positif.

Keberadaan basil ini di air memungkinkan menjadi sumber penyebab kusta karena setiap hari penduduk di daerah tersebut menggunakan untuk keperluan sehari-hari, sehingga transmisi kusta dapat terjadi melalui air yang terkontaminasi basil kusta, sangat memungkinkan terjadi penularan melalui jalur ini.

Pada penelitian ini tidak terbukti adanya kesamaan genotype antara pengulangan TTC sayatan kulit pasien, apusan hidung pasien dan nara kontak maupun sampel dari lingkungan. Hal ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor yang mempengaruhi proses transmisi kusta. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan keterkaitan antara *host agent environment* pada terjadinya transmisi kusta.

## DAFTAR ISI



HALAMAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	ii
PRAKATA .....	ii
DAFTAR ISI .....	iv
DAFTAR TABEL .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR LAMPIRAN .....	vii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	2
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	5
BAB IV. METODE PENELITIAN .....	6
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	11
DAFTAR PUSTAKA .....	37
LAMPIRAN .....	41

## DAFTAR TABEL

Tabel 1	Luas wilayah dan jumlah penduduk di kecamatan Brondong (Puskesmas Brondong, 2007) .....	11
Tabel 2	Angka PR tahun 2006-2008 per desa kecamatan Brondong (Puskesmas Brondong, 2009) .....	13
Tabel 3	Hasil deteksi basil <i>M. leprae</i> dengan pemeriksaan PCR dari spesimen hapusan hidung pasien kdan nara kontak .....	20
Tabel 4	Hasil deteksi basil <i>M. leprae</i> dengan pemeriksaan PCR dari spesimen air dan tanah di lingkungan pasien kusta .....	23
Tabel.5.	Variasi dan frekuensi pengulangan sekuens nukleotida TTC <i>M. leprae</i> dari sampel sayatan kulit penderita kusta .....	28
Tabel 6	Rekapan hasil sekuens pasien, narakontak dan lingkungan .....	33
Tabel.7	Variasi dan frekuensi pengulangan sekuens nukleotida TTC <i>M. leprae</i> dari sampel sayatan kulit penderita kusta, hapusan hidung dan dari air .....	33

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	PR dan CDR kecamatan Brondong tahun 2003-2008 (Puskesmas Brondong, 2009).....	13
Gambar 2	Jumlah penderita terdaftar di desa Sedayu lawas dan Brengkok tahun 2005-2008 (Puskesmas Brondong, 2009). ....	14
Gambar 3	Distribusi tipe kusta .....	15
Gambar 4	Distribusi adanya kontak serumah pada pasien .....	16
Gambar 5	Hasil PCR menggunakan primer Lp1-4 dari sampel sayatan kulit pasien kusta .....	17
Gambar 6	Distribusi kepositivan hasil PCR pasien .... ..	17
Gambar 7	Hasil PCR menggunakan primer Lp1-4 dari hapusan hidung nara kontak .....	20
Gambar 8	Distribusi kepositivan apusan hidung pasien dan nara kontak .....	20
Gambar 9	Distribusi kepositivan sampel air .....	22
Gambar 10	Hasil PCR menggunakan primer Lp1-4 sampel air .....	22
Gambar 11.	Distribusi kepositivan sampel tanah .....	23
Gambar 12	Hasil PCR menggunakan primer Lp1-4 sampel tanah .....	23
Gambar 13	Hasil PCR menggunakan primer TTC .....	27
Gambar 14	Hasil sekuens TTC dengan pengulangan 13 .....	27
Gambar 15	Hasil sekuens TTC dengan pengulangan 18 .....	27
Gambar 16	Hasil sekuens TTC dengan pengulangan 28 .....	30
Gambar 17	Hasil sekuens TTC dengan pengulangan 11 .....	31

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Kualifikasi peneliti dan lokasi penelitian .....41

Lampiran 2 Anggaran dan Realisasi pengeluaran .....42

Lampiran 3 Rekapitulasi data penelitian .....45

## BAB I. PENDAHULUAN

Pada umumnya kusta di Indonesia telah berhasil diatasi sesuai dengan target WHO, namun masalah kusta di Indonesia menurut Depkes disebabkan karena beberapa propinsi di Indonesia masih terdapat daerah endemis kusta yang ternyata adalah daerah sulit dijangkau dan terpencil, menyebar tidak merata (kantong-kantong endemik) dengan prevalensi cukup tinggi terutama di beberapa kawasan Indonesia Timur sehingga mempersulit penanggulangan. Basil *M. leprae* bersifat obligat intraseluler (hanya bisa hidup di dalam sel lain), dengan demikian pengobatan anti kusta menggunakan regimen MDT yang mengandung bakterisidal terhadap *M. leprae* seharusnya dapat memutuskan rantai penularan, namun insidens kusta baru tetap bertahan terutama di daerah endemis (daerah kantong) (Hernani, 2002).

Propinsi Jawa Timur sendiri masih menempati urutan ke delapan sebagai daerah endemik kusta dan kabupaten Lamongan adalah salah satu kabupaten di Jawa Timur yang memiliki angka penemuan kasus baru yang tinggi dan cenderung stabil dalam kurun waktu lima tahun (Dinkes Jatim, 2005). Dari daerah-daerah endemis kusta di Lamongan, penelitian dilakukan di daerah puskesmas Sumberaji yang memiliki prevalensi cukup tinggi yakni 9,40/ 10.000 penduduk (Dinkes Kab Lamongan, 2006).

Secara teori sumber penularan basil kusta dapat terjadi melalui kontak langsung dengan sumber infeksi (manusia/ pasien kusta tipe Multibasilar), maupun melalui jalur tidak langsung yaitu melalui lingkungan (Cree and Smith, 1998). Dari berbagai penelitian epidemiologi, timbul kecurigaan bahwa banyak individu yang terinfeksi basil kusta tanpa adanya sumber penularan yang jelas, terjadi antara lain disebabkan oleh penularan secara tidak langsung ((Desikan and Sreevatsa, 1995). Berawal dari fakta ditemukannya basil *M.leprae* pada tubuh hewan seperti seperti monyet, armadillo dan tikus (Blake *et al*, 1987), berkembang penelitian untuk mencari transmisi penularan kusta di luar manusia (dari lingkungan). Kazda, *et.al* melaporkan ditemukannya *M.leprae* dari tanah dan air di daerah endemik kusta di Bombay, India. Berdasarkan penelitian Kazda tersebut, Matsuoka, *et al* dan Izumi, *et al* melakukan penelitian tentang deteksi *M.leprae* dari sampel air di daerah endemik kusta di India, Swedia, serta Maluku utara dan Sulawesi (Indonesia). Untuk mempelajari alur penularan *M.leprae* di lingkungan daerah endemik kusta adalah penting untuk

mendeteksi *M.leprae* yang terdistribusi di lingkungan dan penduduk lingkungan tersebut serta menganalisa pola variasi gen yang terdistribusi di lingkungan juga masyarakat setempat.

Bakteri *Mycobacterium leprae*, adalah bakteri patogenik yang diketahui tidak dapat di kultur secara in vitro, maka dari itu identifikasi *M.leprae* di lingkungan dilakukan secara biomolekuler. Deteksi dilakukan dengan mengamplifikasi DNA *M.leprae* menggunakan primer yang menyandi daerah *M.leprae-specific repetitive element* (RLEP). Primer ini oleh Yoon et al (1993) dikatakan cukup sensitif untuk mendeteksi DNA *M.leprae* hingga 100 ag ( $10^{-16}$  g) dari DNA target. Untuk studi lebih lanjut dilakukan pemetaan secara molekuler guna mempelajari pola transmisi kusta secara geografis. Penelitian terhadap polimorfisme *M.leprae* dilakukan dengan analisa terhadap daerah variasi pengulangan tandem (Variable Number Tandem Repeats / VNTRs) yakni variasi pengulangan TTC yang terdapat pada regio intergenik dari genom *M.leprae* (Cole et al, 2001).

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

*M. leprae* termasuk dalam famili *Mycobacteriaceae*, ordo *Actinomycetales*, Klas *Schyzomycetes*. Basil ini menyerupai kuman berbentuk batang Gram positif, tidak bergerak dan tidak berspora (Joklik dkk., 1992; Peter AR, 2003). *M. leprae* merupakan parasit obligat intraseluler yang terutama berkembang biak di dalam makrofag dan sel Schwann saraf. Selain itu *M. leprae* juga dapat berkembang biak pada otot bergaris. Basil ini banyak ditemukan pada mukosa hidung, ulkus, erosi dari penderita *lepromatous* dan tipe *bordeline* serta lesi-lesi penderita dalam keadaan reaksi. Tempat-tempat ini menunjukkan bahwa *M. leprae* tumbuh lebih baik pada tempat dengan suhu kurang dari 37°C (optimum 27-30°C) dengan kata lain tempat yang lebih dingin. Hal ini dibuktikan dengan percobaan Stor pada tahun 1971 yang menginokulasikan *M. leprae* pada armadillo dimana *M. leprae* berkembang biak pada hati, limpa, dan *nodul lymphaticus* yang memiliki suhu 30-36°C (Rees dkk., 1994; Amiruddin dkk., 1995). Hingga saat ini *M. leprae* belum berhasil dibiakkan dalam medium buatan. Pemiakan yang bisa dilakukan saat ini adalah secara *in vivo*,

yaitu dengan menginokulasikan *M. leprae* pada telapak kaki mencit atau pun pada jaringan tubuh hewan armadillo dari Amerika serta sejenis kera Mangabey dari Afrika (Rees dkk., 1994). Sampai saat ini cara penularan penyakit kusta belum sepenuhnya terungkap, namun para ahli kusta meyakini bahwa kusta menular melalui *droplet infection* dengan *port d'entr e* mukosa hidung dan kontak yang lama secara terus menerus. Saat ini yang dianggap sebagai tempat keluarnya kuman dari sumber penularan (*port d'exit*) adalah mukosa hidung penderita kusta tipe lepromatous (tipe Multi Basilar) yang belum diobati. Hal ini disebabkan sering ditemukannya basil kusta dalam jumlah yang banyak pada mukosa hidung dan menurut Shepard jumlah basil kusta pada mukosa hidung berkisar 10.000-100.000 (Noordeen, 1994).

Penularan kusta terjadi dapat melalui kontak langsung dengan sumber infeksi (manusia), namun dapat juga melalui jalur tidak langsung yakni melalui lingkungan. Kusta dapat ditemukan pada hewan-hewan yang terinfeksi secara alamiah/natural dari lingkungan dan diduga mampu pula menularkannya pada hewan lain dan juga pada manusia. Hewan tersebut adalah armadillo, simpanse, kera Mangabey, kera *Cyanomolgus*, kerbau dan kucing. Sedangkan infeksi alamiah pada hewan yang lain belum ada yang melaporkannya, walaupun secara eksperimental di laboratorium didapatkan bahwa *M. leprae* juga mampu hidup pada banyak hewan lain (Nurjanti dkk., 2002). Bagaimana cara penularan *M.leprae* dari hewan ke manusia belum banyak diketahui namun anggapan bahwa hanya manusia yang rentan terhadap infeksi *M.leprae* mulai dipertanyakan.

Dari penelitian Chakrabarty, dkk (2001) dilaporkan bahwa *M.leprae* dari percikan ludah penderita bisa bertahan hidup di tanah sampai 40 hari. Chakrabarty dan Dastidar (2002) juga melaporkan adanya korelasi antara peta penyebaran kusta secara geografis dengan peta kondisi geografis tanah yang mengandung *fossil-fuels*, baik di Amerika maupun India. Kazda, *et.al* (1987) melaporkan ditemukannya *M.leprae* dari tanah di daerah endemik kusta di Bombay, India. Leslie, *et.al* (1987) menemukan salah satu sampel tanah di daerah endemik kusta yang diuji dengan Antibodi monoklonal yang spesifik terhadap Antigen PGL-I ternyata hasilnya adalah positif. Bakteri *Mycobacterium leprae*, adalah bakteri patogenik yang diketahui tidak dapat di kultur secara *in vitro*, maka dari itu identifikasi *M.leprae* di lingkungan dilakukan secara biomolekuler. Selama ini deteksi *M.leprae* di lingkungan endemis

kusta dilakukan dengan menganalisa kejadian positif DNA spesifik *M.leprae*. Matsuoka, *et al* (1999) melakukan penelitian dengan teknik PCR dengan sampel dari sumber-sumber air yang digunakan masyarakat di suatu daerah endemik kusta di daerah Sulawesi. Ternyata 21 dari 44 sampel air tersebut menunjukkan adanya DNA dari *M. leprae*. Sedangkan penelitian Izumi, *et al* (2002) dilakukan pada sumur-sumur yang digunakan untuk masyarakat di suatu daerah endemik kusta di daerah Maluku Utara, dengan teknik PCR ternyata 20% dari sampel air yang diteliti menunjukkan uji PCR positif, yang berarti dua dari sepuluh sumur telah tercemar dengan basil kusta. Adriaty (2005) melaporkan dalam penelitian deteksi DNA *M.leprae* pada sumur-sumur penduduk di pulau Talango Kabupaten Sumenep, hasil PCR 19 dari 69 sumber air (27,5%) adalah positif mengandung DNA *M.leprae* dan hasil penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa PCR positif terbanyak berasal dari sumur yang tidak terdapat penderita kusta ( $p=0,045$ ).

Pemetaan secara molekuler adalah penting untuk mempelajari pola transmisi kusta secara geografis antara lain adalah untuk mencari hubungan genotype *M.leprae* terhadap insidens terjadinya kusta di suatu daerah dengan daerah lainnya mengingat terdapat banyak daerah-daerah kantong yang tersebar tidak merata di Indonesia khususnya di bagian timur. Penelitian terhadap polimorfisme *M.leprae* sebelumnya mengalami berbagai kesulitan, karena belum ditemukan lokasi *marker* yang tepat yang memiliki variasi tinggi guna pemetaan molekuler (Shin, 2000) sehingga sepertinya *M.leprae* tidak memiliki perbedaan strain yang bermakna antara isolat satu dengan yang lainnya (Truman and Gillis, 2002). Matsuoka *et al.* (2004) adalah yang pertama yang melaporkan sikuens 6-bp (GACATC) pada dua allele dalam gen *rpoT* dari *M.leprae*. Penelitian ini berlanjut dengan ditemukannya daerah variasi pengulangan tandem (Variable Number Tandem Repeats / VNTRs) pada regio intergenik dari genom *M.leprae* (Cole et al, 2001).

Faktor yang dianggap penting untuk terjadinya penularan kusta adalah : kontak yang lama, intim serta berlangsung terus menerus (Noordeen dalam Hastings, 1994). Faktor lain yang juga berperan penting adalah status gizi dan status ekonomi. Penyakit kusta banyak menyerang masyarakat dengan sosial ekonomi rendah. Hal ini dihubungkan dengan rendahnya daya tahan tubuh, gizi yang kurang baik dan lingkungan serta higiene yang tidak baik. Noordeen (1994) dalam Hastings

menyebutkan faktor etnik, iklim, nutrisi, migrasi dan kondisi sosial ekonomi juga berpengaruh. Dikatakan bahwa sosial ekonomi rendah, kondisi rumah yang buruk dan terlalu padat berpengaruh terhadap penularan penyakit kusta. Jumlah penderita laki-laki lebih banyak dari perempuan dengan perbandingan 2:1 (Agusni, 1997; Iskandar dkk., 1988; Kandouw, 1999). Hal ini dimungkinkan karena laki-laki lebih sering keluar rumah daripada perempuan. Faktor kepadatan penduduk dan kepadatan anggota keluarga yang tinggal dalam satu rumah juga mempengaruhi kesempatan seseorang untuk tertular kusta. Risiko akan lebih besar lagi, jika ditunjang oleh kondisi rumah yang tidak memenuhi syarat, misalnya kelembaban dan pertukaran udara yang kurang. Selain itu endemisitas di suatu daerah juga merupakan faktor penting. Ottenhoff dalam Hastings (1994) menyebutkan faktor genetik juga dapat berpengaruh, hal ini mungkin berkaitan dengan kerentanan individu terhadap infeksi *M.leprae*, virulensi *M.leprae*, serta status imunologik seseorang.

Sebelum penelitian dilakukan di Lamongan, telah dilakukan penelitian terhadap lingkungan air di daerah Gresik yang dilakukan oleh kelompok studi kusta. Dari 14 sampel air yang dikumpulkan 6 Positif PCR (42,8%) dan Uji Basil Tahan Asam Positif sebanyak 9 (64,3%). Dari sampel tanah, Uji Basil Tahan Asam 10 positif (71,4%) dan 10 positif dengan PCR (71,4%). Profil sumber air di lingkungan endemis kusta di Gresik hampir sama dengan di Lamongan yakni menggunakan sumber air berupa danau tadah hujan atau yang bahasa lokal disebut *jublang*.

### **BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **Tujuan:**

##### **Jangka Pendek :**

- Menganalisa *M.leprae* yang terdeteksi di lingkungan
- Mendapatkan profil genotype isolat *M.leprae* di lingkungan

##### **Jangka Panjang :**

- Mempelajari mekanisme *M.leprae* untuk bertahan hidup di lingkungan mengingat bahwa *M.leprae* bersifat *obligate intracellular*.

**Manfaat:** Memutus rantai penularan *M.leprae* selain program pengobatan itu sendiri.

## BAB IV. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dirancang :

- a). Koleksi sampel;
- b). Ekstraksi DNA dari sampel lingkungan dan penduduk;
- c). Pemeriksaan PCR untuk DNA spesifik *M.leprae*;
- d). Sekuensing dan analisa genotype isolat *M.leprae*
- d) Analisa hasil.
- a. Koleksi Sampel

Sampel diambil dari dua dusun di desa Sedayu Lawas dan Brengkok yang memiliki prevalensi tinggi di wilayah puskesmas Sumberaji. Sampel dibagi menjadi tiga kelompok yakni 1) sumber air dan tanah di dekat sumber air di dusun tersebut; 2) hapusan hidung dari kontak serumah dan 3) spesimen jaringan kulit dari pasien kusta aktif di dusun tersebut. Sampel disimpan di suhu dingin (-20°C) hingga dilakukan proses ekstraksi sampel.

b. Ekstraksi DNA dan dari sampel air, tanah, hapusan hidung dan sayatan lesi kulit

**Sampel Air.** Sumber air berasal dari sumber alami bukan dari sistem pengolahan air (PDAM). Sumber air di daerah Lamongan secara umum berasal dari air tadah hujan (*pond/ jublang*) disekitar wilayah dusun. Satu *pond* kecil biasa dipakai oleh beberapa rumah disekitarnya. Untuk ekstraksi, 50ml sampel disentrifus 4000g selama 10 min. Supernatan dibuang dan pellet disuspensi dengan 1.5 ml buffer PBST lalu dipindah ke 1.5 ml tube steril dan disentrifus lagi 10.000g selama 20 min pada 4°C. Supernatan dibuang dan pellet disuspensi dengan 0.25 ml buffer lysis lalu dipindah ke 1.5 ml tube steril dan diekstrak DNA.

**Sampel Tanah.** Sampel tanah berasal dari sekitar tempat sumber air yang diambil. Untuk ekstraksi, tanah ditimbang seberat kurang lebih 2gr, lalu ditambah buffer PBST sebanyak 50 ml dan diforteks selama 15 menit. Suspensi disentrifus selama 100g selama 10 min dan diambil supernatan. Supernatan disentrifus lagi 10.000g selama 25 min pada 4°C. Supernatan dibuang dan pellet disuspensi dengan 0.25ml buffer lysis lalu dipindah ke 1.5 ml tube steril dan diekstrak DNA.

**Spesimen hapusan hidung.** Spesimen hapusan hidung diambil dari orang sehat yang merupakan penduduk dekat dengan sumber air termasuk kontak serumah

dengan pasien. Hapusan hidung diambil dengan cotton bud steril yang dibasahi dulu dengan buffer saline (PBS) dan setelah diambil spesimennya, cotton bud dicelup dan diperas pada 1.5 ml tube steril yang mengandung aquades steril (0.6 ml) dan disentrifus pada 10.000g selama 20 min in 4°C dan diekstrak DNA.

*Spesimen sayatan lesi kulit.* Sampel diambil dari pasien kusta baik tipe MB maupun PB yang masih belum RFT (Release From Treatment) yang tinggal di wilayah tersebut. Spesimen lesi kulit diambil sesuai prosedur rutin untuk pemeriksaan Basil Tahan Asam (BTA). Sampel sayatan lesi kulit dimasukkan pada buffer PBS dan disentrifus pada 10.000g selama 20 min in 4°C dan diekstrak DNA.

Semua isolat diekstraksi DNA sesuai dengan prosedur dari Qiagen.

c. Pemeriksaan PCR untuk DNA spesifik *M.leprae*

*Amplifikasi PCR.* PCR untuk analisa DNA dilakukan dengan menggunakan metode nested PCR yang dua pasang primernya menyandi daerah spesifik *M.leprae* yaitu daerah 18 kDa antigen *M.leprae* pada regio RLEP3 *repetitive element* (X17153) yang mengamplifikasi fragmen DNA sebesar 129 bp untuk produk external (*outer*) dan 99 bp untuk produk internal (*inner*). PCR mempergunakan G mixture dari FailSafe PCR System (EPICENTRE, Madison, WI, USA) dengan menggunakan mesin PCR *Thermal Cycler* dari PERKIN-ELMER (ABI). Primer Lp1 5' TGCATGTCATGGCCTTGAGG 3' dan Lp2 5' CACCGATAACCAGCGGCAGAA 3' .Total master mix tiap sampel sebanyak 20µl dengan templat sebanyak 2 µl. PCR dilakukan dengan kondisi sebagai berikut : 2 min pada 98 °C untuk preheat, 20 sec pada 98 °C untuk denaturasi, 30 sec at 56°C untuk annealing dan, 30 sec pada 72 °C untuk tahap elongasi/extension sebanyak 35 siklus lalu ditambah tahap prolong extention selama 5 min pada 72 °C dan di nonaktifkan pada 4 °C. Amplicon lalu di PCR kembali dengan primer Lp3 5' TGAGGTGTCGGCGTGGTC 3' dan Lp4 5' CAGAAATGGTGCAAGGGA 3' (Donoghue et al, 2000) dengan kondisi sebagai berikut : 2 min pada 98 °C untuk tahap preheat, 20 sec pada 98 °C untuk tahap denaturasi, 30 sec at 56°C untuk tahap annealing dan, 30 sec pada 72 °C untuk tahap elongasi/extension sebanyak 30 siklus lalu ditambah tahap prolong

extention selama 5 min pada 72 °C dan di nonaktifkan pada 4 °C. Produk akhir amplicon divisualisasi dengan electrophoresis ke dalam 3% HS agarose gel (Cambrex Bioscience, Rockland, ME, USA) yang dilarutkan pada TBE (Tris/Boric/EDTA, pH 8.0) buffer pada 100 Volt.

d. Sekuensing dan analisa genotype isolat *M.leprae*

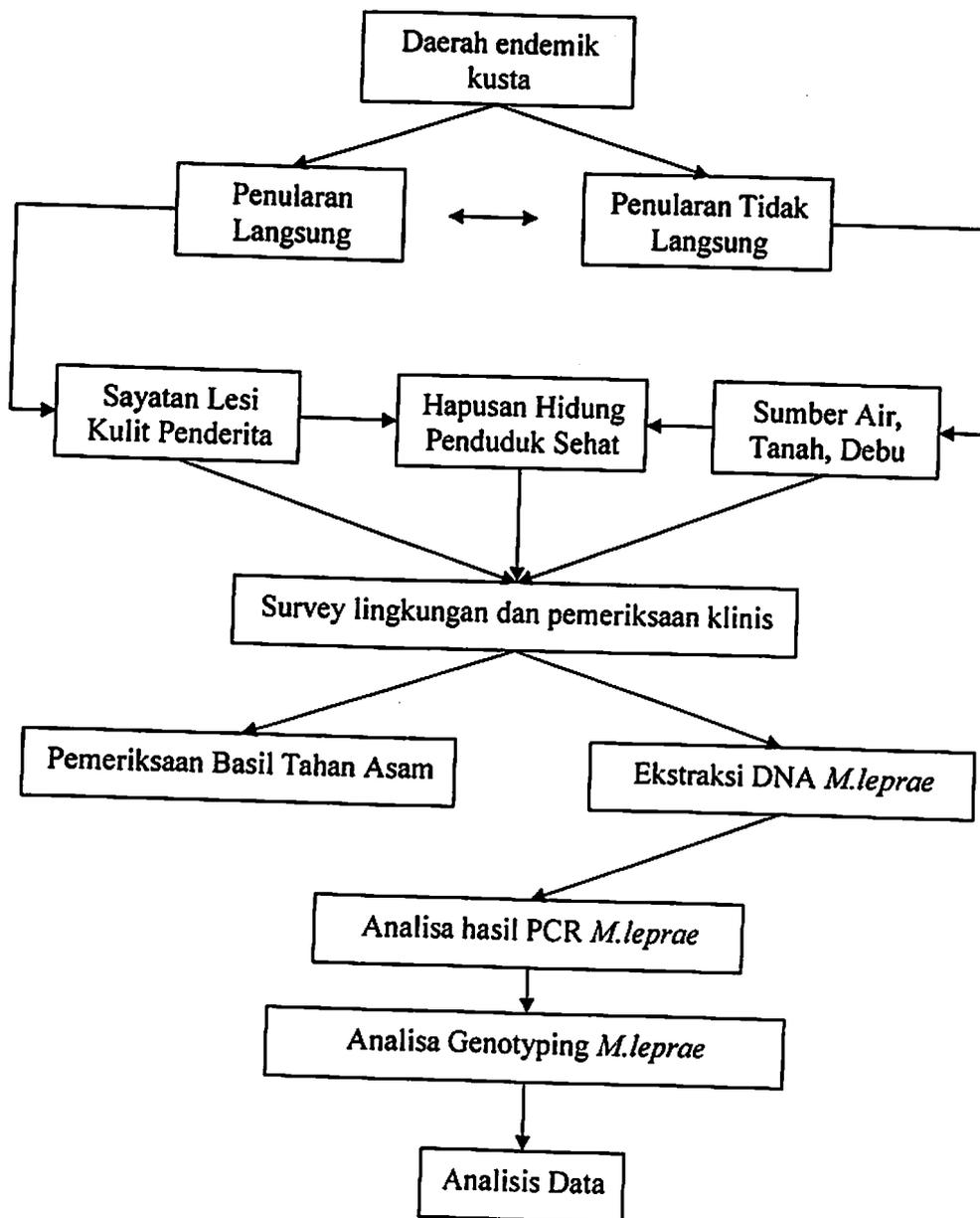
**Amplifikasi PCR.** PCR untuk analisa DNA dilakukan dengan G mixture dari FailSafe PCR System (EPICENTRE, Madison, WI, USA) pada 50 µl master mix yang mengandung paling tidak 0.1 pg of DNA genom pada 5µl DNA templat dan primer sebanyak 2 µl dengan konsentrasi 5 µM. Primer yang digunakan adalah TTC-A (5'GGACCTAAACCATCCCGTTT3') and TTC-B (5'CTACAGGGGGCACTTAGCTC3') (GenBank Accession No. AF274484) yang menghasilkan amplicon PCR sebesar 200bp. Amplifikasi dilakukan pada mesin thermal cycler PERKIN ELMER (ABI) dengan kondisi sebagai berikut : 2 min pada 98 °C untuk tahapan preheating, 20 sec pada 98 °C untuk tahap denaturasi, 30 sec pada 58 °C untuk tahap annealing, 30 sec pada 72 °C untuk tahapan extension/ elongasi dan diulang sebanyak 40 siklus dan dilanjut ke tahap prolong extention selama 5 min pada 72 °C untuk kemudian di nonaktifkan pada 4 °C. Produk amplifikasi dilakukan electrophoresis ke dalam 3% NuSieve GTG agarose gel (Cambrex Bioscience, Rockland, ME, USA) using TAE (Tris/Acetate/EDTA, pH 8.0) buffer pada 100 V.

**Preparasi Sampel Untuk Analisa Sequencing.** Jumlah pengulangan TTC dilihat dengan metode direct sequencing. Sampel hasil PCR dimurnikan dengan *GFX<sup>TM</sup> PCR, DNA and Gel Band Purification kits (Amersham Biosciences)*. DNA hasil purifikasi diperiksa kuantitas dan kualitas kadar DNA dengan UV spectrophotometer. *Dual CyDye<sup>TM</sup> Terminator Sequencing kits (Amersham Biosciences)* digunakan untuk labelling. Dan hasil labeling dipresipitasi dengan ethanol dan dikeringkan untuk kemudian ditambah 2µl loading dye dan dimasukkan dalam mesin sequencer yakni *Long-Read Tower<sup>TM</sup> System (Amersham Biosciences)*.

d. Analisa hasil

Data yang telah terkumpul diolah dan dianalisis menggunakan program komputer spss dan statcal. Adanya perbedaan rata-rata hasil amplifikasi DNA spesifik untuk basil *M.leprae* dari masing masing kelompok sampel diuji dengan uji statistik *Fisher Exact Test* dan dilihat pola distribusinya.

# ALUR PENELITIAN



## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Gambaran umum lokasi penelitian

#### Karakteristik kecamatan Brondong

Kecamatan Brondong merupakan bagian wilayah kabupaten Lamongan yang terletak di bagian utara pada koordinat antara 06°53'30,81''-7°23'6'' Lintang Selatan dan 112°17'01,22''-112°33'12'' Bujur Timur, merupakan daerah pantai utara pulau Jawa, terdiri dari sembilan desa dan satu kelurahan (peta wilayah dapat dilihat pada lampiran 1). Jumlah penduduk yang tercatat pada tahun 2007 sebanyak 59.879 jiwa. Data jumlah penduduk masing-masing desa/kelurahan di kecamatan Brondong dapat dilihat pada tabel 5.1.

**Tabel 1** Luas wilayah dan jumlah penduduk di kecamatan Brondong (Puskesmas Brondong, 2007)

No	Desa/kelurahan	Luas (km <sup>2</sup> )	Jumlah penduduk
1	Brondong	2,34	10.614
2	Sumberagung	4,16	2.592
3	Sedayu lawas	10,64	12.549
4	Sendangharjo	7,44	5.629
5	Lembor	16,07	2.499
6	Tlogoretno	3,48	1.270
7	Brengkok	10,57	10.196
8	Labuhan	6,43	7.365
9	Sidomukti	6,09	4.149
10	Lohgung	2,91	2.818
<b>Jumlah</b>		<b>70,3</b>	<b>59.879</b>

Secara geografis kecamatan Brondong dapat dikategorikan menjadi dua bagian, yaitu daerah pantai dan daerah pertanian. Daerah pantai meliputi kelurahan Brondong, desa Sedayu lawas, desa Labuhan, dan desa Lohgung. Di daerah ini sangat cocok untuk budidaya ikan (tambak udang, ikan kerapu dan bandeng) serta usaha penangkapan ikan di laut. Sehingga mayoritas mata pencaharian penduduk di daerah tersebut adalah sebagai nelayan dan petani tambak. Sedangkan daerah yang

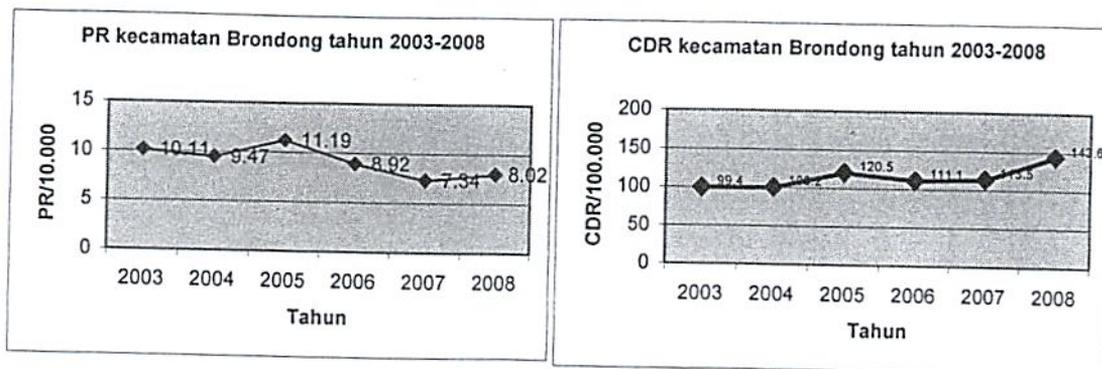
lain adalah daerah kawasan pertanian yang meliputi desa Sumberagung, desa Sendangharjo, desa Lembor, desa Tlogoretno, desa Sidomukti dan desa Brengkok, dengan kondisi pertanian tadah hujan (Puskesmas Brondong, 2007).

Keadaan hidrologi wilayah kecamatan Brondong adalah berupa air permukaan tanah pada kedalaman rata-rata 0-20 meter dari permukaan tanah. Sedangkan pada desa tertentu (Tlogoretno dan Sendangharjo) tidak ditemukan adanya air permukaan tanah, sehingga pada musim kemarau sangat kekurangan air (puskesmas Brondong, 2007). Pada desa Tlogoretno, Sendangharjo, Sumberagung, dan Lembor, sumber air yang digunakan adalah kolam buatan, sedangkan desa-desa lainnya termasuk desa Sedayu lawas dan Brengkok menggunakan air permukaan berupa sumur-sumur.

Penelitian ini dilakukan di dua desa dari wilayah puskesmas Brondong kecamatan Brondong. Dua desa tersebut adalah desa Sedayu lawas yang merupakan representatif daerah pantai dan desa Brengkok yang merupakan representatif daerah pertanian. Dimana daerah Sedayu lawas merupakan daerah pantai yang sebagian besar wilayahnya terletak di tanah datar tepi pantai, sedangkan daerah Brengkok sebagian besar wilayahnya merupakan daerah pertanian yang terletak di dataran yang lebih tinggi. Berdasarkan wawancara dengan penduduk di dua wilayah tersebut dengan disertai observasi, diketahui bahwa sebagian besar wilayah desa Sedayu lawas sumber airnya berupa sumur yang berair payau dan berada di dalam rumah, sedangkan sumber air di wilayah desa Brengkok sendiri sebagian besar merupakan sumur berair tawar dan berada di luar rumah, selain itu tanah di wilayah desa Brengkok sebagian besar berwarna merah.

#### **Situasi penyakit kusta di kecamatan Brondong**

Wilayah puskesmas Brondong kecamatan Brondong merupakan daerah dengan PR kusta tertinggi di kabupaten Lamongan. Data PR dan CDR tahun 2003-2008 dapat dilihat pada gambar 1.



**Gambar 1.**

PR dan CDR kecamatan Brondong tahun 2003-2008 (Puskesmas Brondong, 2009).

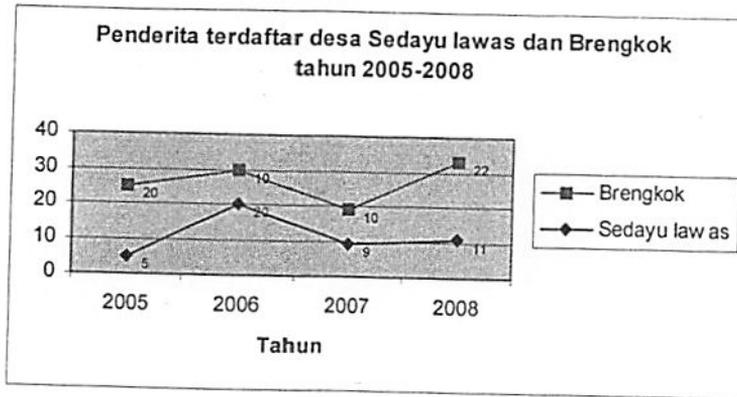
Sedangkan angka PR per desa tahun 2006-2008 dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2** Angka PR tahun 2006-2008 per desa kecamatan Brondong (Puskesmas Brondong, 2009)

No	Desa	tahun 2006	Tahun 2007	Tahun 2008
		PR/10.000	PR/10.000	PR/10.000
1	Brondong	2,9	5,65	0,94
2	Sumberagung	8,1	7,71	7,72
3	Sedayu lawas	11,4	6,37	6,38
4	Sendangharjo	19,7	17,76	17,77
5	Lembor	12,5	8	0,00
6	Brengkok	9,6	5,88	13,73
7	Tlogoretno	30,8	15,74	15,75
8	Sidomukti	15,7	0,00	9,64
9	Labuhan	1,5	4,07	9,50
10	Lohgung	0,00	0,00	0,00

Jumlah penderita terdaftar tahun 2008 sebanyak 52 orang dan tersebar diseluruh wilayah kecamatan Brondong termasuk di desa Sedayu lawas dan desa Brengkok. Gambar 2 menunjukkan jumlah penderita terdaftar di desa Sedayu lawas dan desa Brengkok tahun 2005-2008.





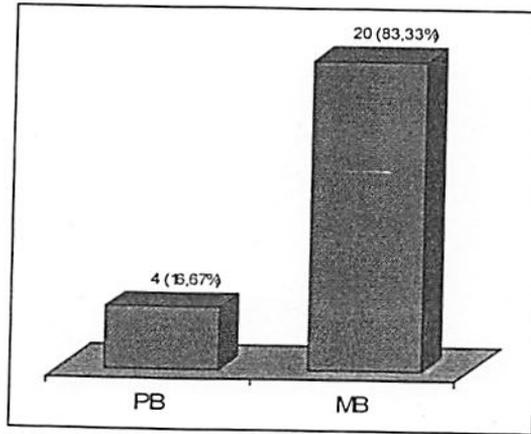
**Gambar 2**

Jumlah penderita terdaftar di desa Sedayu lawas dan Brengkok tahun 2005-2008 (Puskesmas Brondong, 2009).

### Gambaran umum sampel penelitian

Penelitian tentang analisis genotipe *M. leprae* di daerah endemik telah dilakukan terhadap 109 sampel yang terdiri dari 24 pasien kusta, 49 sampel hapusan hidung pasien dan nara kontak dan 18 sampel air sumur dan 18 sampel tanah di lingkungan pasien kusta di daerah endemik kusta di Desa Brondong Kecamatan Brondong Kabupaten Lamongan. Pada pasien kusta telah dilakukan anamnesis, pemeriksaan klinis sebelum diambil sampel. Hapusan hidung berasal dari pasien dan nara kontak. Demikian juga sampel yang diambil dari lingkungan terdiri dari air sumur dan tanah di sekitar tempat tinggal pasien. Semua sampel tersebut dilakukan pemeriksaan PCR dan hasil yang positif dilanjutkan dengan analisis sekuensing. Data hasil yang didapatkan dimasukkan dalam lembar pengumpulan data lalu dilakukan analisis data.

Pada survey di lapangan didapatkan hasil gambaran distribusi sebagai berikut:



**Gambar 3**  
Distribusi tipe kusta

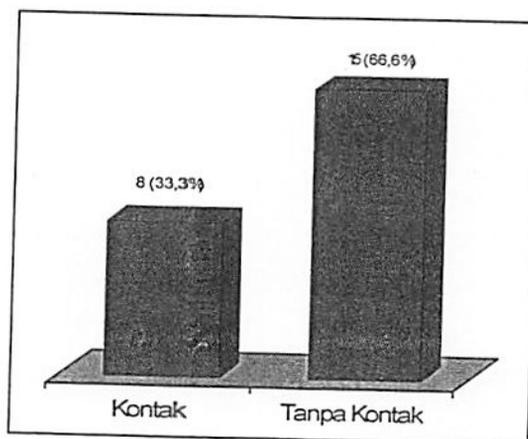
Pada 24 pasien kusta didapatkan 20 (83.33%) MB dan 4 (16.67%) PB, sedangkan berdasarkan status penderita adalah 12 (24%) RFT dan 12 (24%) sedang dalam pengobatan regimen MDT .

Pada penelitian ini pasien kusta yang masuk dalam kriteria penerimaan sampel dilakukan pemeriksaan klinis sesuai dengan tanda-tanda pokok dan klasifikasi WHO 1998. Dengan klasifikasi ini pasien kusta dikelompokkan atas dua kelompok pasien yaitu PB yang mana dalam kelompok ini termasuk tipe TT dan BT menurut kriteria Ridley-Jopling atau *Indeterminate* dan *Tuberculoid* menurut kriteria Madrid dengan BTA negatif. Kelompok kedua adalah MB yang dalam kelompok ini termasuk tipe BB, BL dan LL menurut kriteria Ridley-Jopling atau semua tipe kusta dengan BTA positif (Amiruddin *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini didapatkan penderita kusta yang paling banyak adalah tipe MB 20 orang (83.33%), sedangkan kusta tipe PB hanya 4 orang (16,67%). Di dunia terdapat variasi dalam jumlah tipe kusta baru. Di Bangladesh dan Thailand terdapat lebih banyak kasus kusta tipe PB dengan persentase masing-masing 83% dan 66%. Sedangkan di Philipina, Brazil dan Indonesia terdapat kecenderungan lebih banyak kasus kusta tipe MB (Saunderson dkk, 2000). Hasil yang sama juga diporkan Arliny (2003) di Surabaya jumlah penderita tipe MB lebih banyak daripada tipe PB dengan perbandingan tipe MB 63% dan penderita tipe PB 37%.

Lebih banyak tipe MB dalam penelitian ini secara keseluruhan dibandingkan tipe PB kemungkinan penderita biasanya datang berobat ke Puskesmas Brondong

karena kehendak sendiri karena adanya kelainan kulit yang dengan rasa tebal yang makin lama makin menyebar dan mengganggu secara kosmetik. Sedangkan pada tipe PB perjalanan penyakitnya lebih tenang dibandingkan dengan tipe MB sehingga penderita tidak merasakan adanya keluhan selain bercak putih yang dianggap tidak terlalu mengganggu, sehingga penderita pada kelompok ini datang lebih lambat atau setelah timbul deformitas.



**Gambar 4**  
Distribusi adanya kontak serumah pada pasien

Pada 24 pasien kusta, sebanyak 8 (33.33%) tidak memiliki kontak, sementara sisanya 16 (66.66%) memiliki kontak. Jumlah keseluruhan kontak adalah 25 orang.

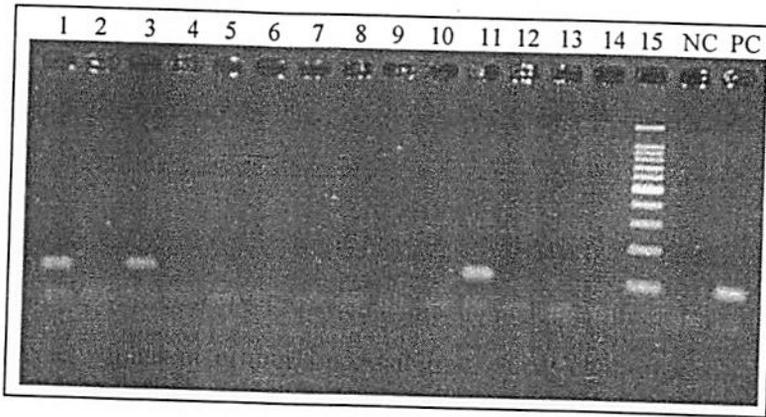
Sampel dari lingkungan didapatkan 36 sampel, terdiri dari 18 sampel air sumur dan sampel tanah disekitar rumah penderita.

#### **Analisis dan Hasil Pemeriksaan PCR**

##### **Hasil Pemeriksaan DNA *M.leprae* dengan menggunakan nested primer LP1-4**

Telah dilakukan pemeriksaan PCR terhadap 109 sampel yang terdiri dari 24 sampel sayatan kulit pasien, 49 hapusan hidung terdiri dari 24 hapusan pasien kusta, dan 25 sampel hapusan hidung nara kontak serta 36 sampel dari lingkungan terdiri dari 18 sampel air sumur dan 18 sampel tanah penduduk di daerah endemik kusta di desa Brondong, Kecamatan Brondong, Kabupaten Lamongan. Pada penelitian ini

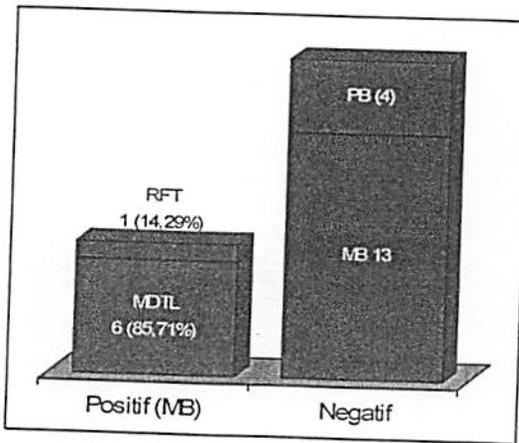
menggunakan *PCR nested*, PCR pertama menggunakan primer Lp1 dan Lp2 dan PCR kedua menggunakan primer Lp3 dan Lp4. Hasil elektroforesis produk PCR dapat dilihat pada berbagai gambar 5 berikut :



**Gambar 5**

Hasil PCR menggunakan primer Lp1-4 dari sampel sayatan kulit pasien kusta  
 Keterangan: Nomor 1 dan 14 sampel pasien dengan hasil positif pada nomor 1,3 dan 11; no 15 marker; no 16 *negative control* dan no 17 *positive control* (Thai 53)

**Deteksi *M.leprae* dari Sampel Sayatan Kulit Pasien Kusta dengan PCR**



**Gambar 6**

Distribusi kepositivan hasil PCR pasien

Hasil PCR sampel pasien kusta didapatkan hasil DNA *M.leprae* positif sebesar 7 dari 24 sampel (29.17%), sementara sisanya sebesar 17 (70.83%) negatif. Seluruh hasil

PCR positif didapatkan dari pasien dengan tipe MB, sebesar 6 (85.71%) berasal dari pasien aktif, sementara sisanya, 1 (14.29 %) berasal dari pasien yang telah RFT. Hasil ini sesuai dengan potensi transmisi yang dimiliki oleh pasien kusta tipe MB, terutama yang belum selesai menjalani pengobatan MDTL.

PCR merupakan metode yang sangat sensitif dan spesifik. Saat ini semakin banyak dilaporkan penggunaan PCR guna mendeteksi *M. leprae* baik dari jaringan biopsi kulit, hapusan mukosa hidung serta jaringan hewan percobaan bahkan dari sumber air di lingkungan sekitar tempat tinggal penderita di daerah endemik kusta (De Wit *et al.*, 1991; Wichitwechkarn *et al.*, 1995 dan Agusni *et al.*, 2004).

Penelitian Rizalinda dan Hatta (1999) mendapatkan hasil 68% menunjukkan hasil positif dengan pemeriksaan PCR pada kusta tipe MB. Penelitian Arliny (2003) pada penderita kusta baru tipe MB menunjukkan 92% penderita menunjukkan hasil positif pada pemeriksaan PCR dari sayatan cuping telinga. Hasil penelitian Torres *et al* (2003) didapatkan 16 dari 20 penderita kusta tipe MB atau 80% hasil positif dengan pemeriksaan PCR dari sampel spesimen sayatan kulit. Sedangkan studi tentang PCR yang dilakukan oleh De Witt *et al* (1991) didapatkan hasil 92% sayatan lesi kulit penderita kusta tipe MB positif dengan pemeriksaan PCR.

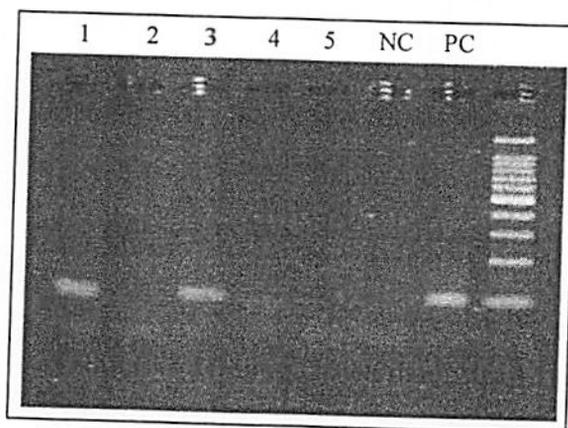
Pada penelitian ini dari keseluruhan penderita kusta tipe MB memberi hasil positif lebih rendah dari peneliti lain. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh beberapa hal antara lain pada penelitian ini penderita kusta yang diteliti sebagian sudah mendapat pengobatan MDT dari Puskesmas atau bukan semua penderita kusta baru ada. Menurut De Witt *et al* (1994) hasil negatif mungkin disebabkan karena tidak ada lagi bakteri dalam tubuh penderita oleh karena kuatnya respon imun atau hancurnya kuman karena efek pengobatan yang diberikan yang mana kemoterapi pada keadaan ini menghancurkan bakteri. Hal lain bisa juga disebabkan oleh karena ada kemungkinan lesi pada tempat pengambilan memang tidak terdapat basil di dalamnya atau jika pun ada DNA-nya sudah terdegradasi secara komplit sehingga memberikan hasil PCR negatif (Jamil *et al.*, 1994). Selain itu kemungkinan lainnya adalah adanya inhibitor dari spesimen dan menurut De Witt *et al* (1991) bahwa infiltrat seluler dapat mengeluarkan beberapa mediator yang dapat menghambat pemeriksaan PCR.

Hasil yang dilaporkan peneliti lain 18,2% dari penderita kusta tipe PB dapat dideteksi adanya basil *M. leprae* dari spesimen sayatan lesi kulit (Wichitwechkarn *et al.*, 1995). Penelitian Arliny (2003) mendapatkan hasil positif lebih tinggi yaitu 33,2% pada kusta tipe PB dengan pemeriksaan PCR. Hasil deteksi PCR yang lebih rendah pada penelitian ini lebih rendah sebagian penderita sudah mendapat pengobatan dan karena *bacterial load*. Jumlah kuman yang sedikit ini berhubungan dengan kuatnya respon imun pada penderita (Agusni, 1997).

Adanya perbedaan hasil dari beberapa penelitian bisa dipahami karena masing-masing peneliti menggunakan primer yang berbeda. Saat ini semakin banyak primer yang dilaporkan spesifik untuk *M. leprae* (Cox *et al.*, 1991 dan Groathouse *et al.*, 2003). Mengingat rantai DNA dari basil kusta tersebut cukup panjang (3,72 mega pasang basa) maka kemungkinan timbulnya bermacam-macam primer bisa dimengerti, karena setiap peneliti menggunakan rangkaian nukleotida yang berbeda (Agusni *et al.*, 2004).

#### Deteksi *M. leprae* dari Hapusan Hidung Pasien dan Nara Kontak dengan PCR

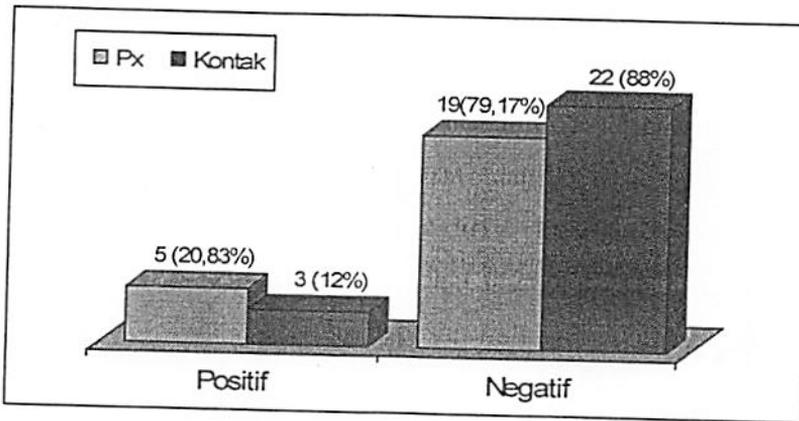
Pada penelitian ini jumlah sampel hapusan hidung didapat sebanyak 49 orang. Terdiri dari 24 hapusan hidung pasien kusta dan 25 hapusan nara kontak, seperti yang terdapat pada gambar 7 berikut ini.



**Gambar 7**

Hasil PCR menggunakan primer Lp1-4 dari hapusan hidung nara kontak  
Keterangan: Nomor 1 dan 5 sampel hapusan hidung nara kontak dengan hasil positif pada nomor 1 dan 3; no 8 marker; no 6 *negative control* dan no 7 *positive control* (Thai 53)

Pada gambar 8 berdasar hasil pemeriksaan PCR terhadap 49 sampel hapusan hidung yang berasal dari 24 penderita kusta dan 25 orang sehat didapat 8 orang (16.33%) positif ditemukan *M. leprae* terdiri 5 hapusan hidung penderita kusta (20.83%) dan 3 hapusan hidung orang sehat (12%). Sedangkan yang negatif 41 orang (83.67%) terdiri dari 19 orang hapusan hidung penderita kusta (79.17%) dan 22 orang hapusan hidung orang sehat (88%). Berdasarkan uji statistik tidak ada perbedaan positivitas *M. leprae* dengan pemeriksaan PCR antara hapusan hidung penderita kusta dengan hapusan hidung orang sehat di daerah endemik kusta ( $p=0,2860$ ) (Tabel 3).



**Gambar 8**  
Distribusi kepositivan pausan hidung pasien dan nara kontak

**Tabel 3** Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan pemeriksaan PCR dari spesimen hapusan hidung pasien kdan nara kontak

Sampel	Hasil pemeriksaan PCR		Jumlah
	Positif	Negatif	
Penderita	5 (20.83%)	19 (79.17%)	24 (100%)
Orang sehat	3 (12%)	22 (88%)	25 (100%)
Total	8 (16.33%)	41 (83.37%)	49 (100%)

Fisher exact test :  $p = 0,3271$

Penularan penyakit kusta belum sepenuhnya terungkap, tapi pada saat ini masih diyakini manusia sebagai sumber penularan *M. leprae* yang utama, khususnya penderita kusta tipe lepromatosa yang sangat infeksius (Noordeen, 1994; Cree *et al.*, 1998 dan Meima *et al.*, 1999). Menurut Davey dan Ress penderita kusta

mampu mengeluarkan 10 juta organisme per hari. *M. leprae* dari sekresi mukosa nasal mampu hidup sampai 9 hari (Noordeen, 1994).

Pada penelitian ini rendahnya hasil positif yang ditemukan pada apusan hidung penderita kusta karena sebagian dari penderita yang menjadi sampel sudah mendapat pengobatan. Menurut Patrocínio *et al* (2005) *M. leprae* akan cepat sekali menghilang apabila penderita mendapat terapi kusta dalam hal ini tidak hanya antibiotik untuk pengobatan kusta akan tetapi juga oleh antibiotik lainnya seperti *minocycline, clarithromycin dan fluoroquinolon*.

Penularan kusta tidak mudah, diperlukan kontak lama, intim dan terus-menerus terjadi terutama pada kotak serumah dan satu tempat tidur (Noordeen, 1994; Cree dkk, 1998). Perbandingan kasus kontak terhadap penderita kusta tipe lepromatosa: tuberkuloid: non kontak = 8:2:1. Kontak serumah dengan penderita terutama penderita kusta tipe lepromatosa mempunyai peluang 5-10 kali lebih besar kemungkinan untuk tertular dibandingkan populasi umum (Rees *et al.*, 1994 dan Cree *et al.*, 1998).

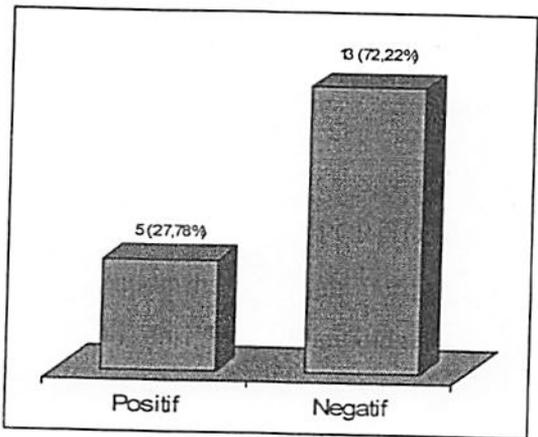
Jumlah basil kusta pada mukosa hidung menurut Shepard berkisar 10.000-100.000 (Noordeen, 1994). Penularan melalui mukosa hidung telah dibuktikan dengan percobaan pada tikus dengan penyemprotan basil *M. leprae* berulang-ulang (inhalasi buatan), ternyata pada pembuluh darah alveoli dari tikus tersebut bisa ditemukan kuman tersebut. Ini berarti *M. leprae* bisa mencapai sistem sirkulasi darah dan selanjutnya bersarang di suatu tempat predileksi untuk kuman tersebut (Noordeen, 1994 dan Agusni, 1997).

Hidung merupakan tempat keluarnya *M. leprae*, karena keadaan hidung yang lembab dan basah, hal ini merupakan tempat yang ideal untuk pertumbuhan basil kusta. Kuman ini mampu hidup di luar tubuh manusia dan dikeluarkan terutama melalui sekret nasal. Jadi bisa dipahami kenapa di daerah endemik kusta dapat ditemukan *M. leprae* pada rongga hidung nara kontak atau orang sehat karena tiap hari mereka terpapar dengan kuman di daerah tersebut.

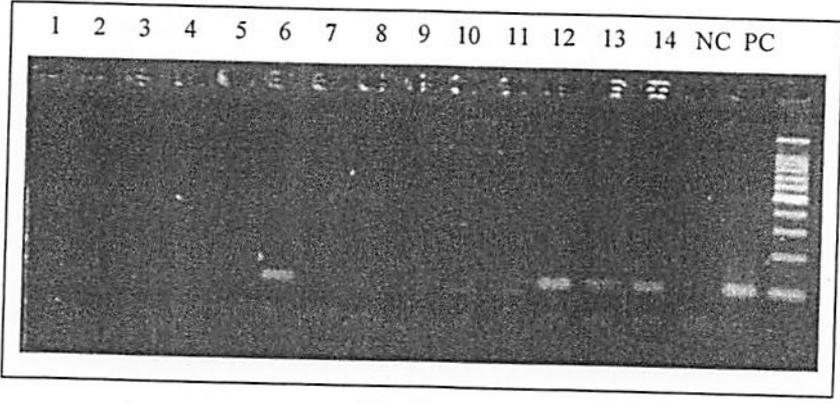
#### **Deteksi *M. leprae* dari Lingkungan Pasien Kusta (sampel air dan tanah) dengan PCR**

Pada penelitian ini jumlah sampel yang berasal dari lingkungan pasien kusta sebanyak 36, terdiri dari 18 sampel air sumur dan 18 sampel tanah. Semua sampel

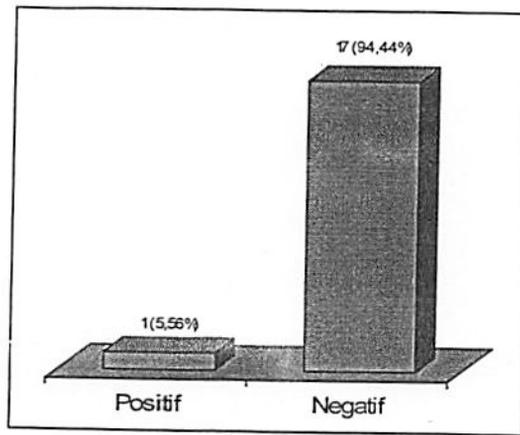
tersebut selanjutnya dilakukan pemeriksaan PCR. Dari pemeriksaan PCR terhadap 36 sampel lingkungan didapatkan hasil sebagai berikut ini. Dari hasil pemeriksaan PCR terhadap 18 sampel air dari lingkungan didapat 5 sampel (27.78%) positif ditemukan *M. leprae* dari air sumur penderita dan dari 18 sampel tanah didapatkan 1 sampel (5.56%) positif. Uji statistik perbedaan positività *M. leprae* dengan pemeriksaan PCR yang ditemukan dari sumur dan tanah tidak dilakukan karena ada cell yang berisi nilai 0.



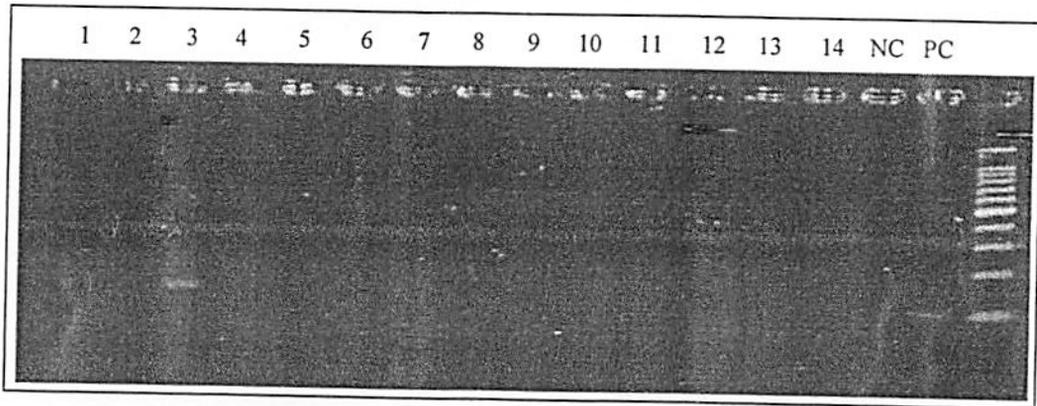
**Gambar 9**  
Distribusi kepositivan sampel air



**Gambar 10**  
Hasil PCR menggunakan primer Lp1-4 sampel air  
Keterangan: Nomor 1 dan 14 sampel air dengan hasil positif pada nomor 6,12,13 dan 14; no 17 marker; no 15 *negative control* dan no 16 *positive control* (Thai 53)



**Gambar 11.**  
Distribusi kepositivan sampel tanah



**Gambar 12**

Hasil PCR menggunakan primer Lp1-4 sampel tanah

Keterangan: Nomor 1 dan 14 sampel tanah dengan hasil positif pada nomor 3; no 17 marker; no 15 *negative control* dan no 16 *positive control* (Thai 53)

**Tabel 4** Hasil deteksi basil *M. leprae* dengan pemeriksaan PCR dari spesimen air dan tanah di lingkungan pasien kusta

Hasil PCR tanah	Hasil pemeriksaan PCR Air		Jumlah
	Positif	Negatif	
Positif	0 (0%)	1 (100 %)	1 (100%)
Negatif	5 (29.41%)	12 (70.59 %)	17 (100%)
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>18(100%)</b>

Ditemukannya basil kusta dari sumber air penduduk telah dilaporkan oleh Izumi *et al* (1999) di beberapa desa di Sulawesi Selatan, namun frekuensinya relatif kecil

(sekitar 10%) dari sampel air yang diteliti. Penelitian lainnya di daerah endemi kusta di Pantai Utara di Jawa Timur ditemukan 42,8% air yang digunakan penduduk positif ditemukan *M. leprae* (Agusni *et al.*, 2004). Laporan terakhir dari sampel air di Malawi (Afrika) ditemukan 13 dari 54 sampel atau 24% positif ditemukan *Mycobacteria* dengan menggunakan primer 16S rRNA (Chilima *et al* (2006).

Pada penelitian ini didapatkan 5 (27,78%) air sumur yang diperiksa positif ditemukannya *M. leprae* dengan pemeriksaan PCR dari sumur penderita kusta. Adryati (2005) juga melaporkan hal yang sama dimana positivitas *M. leprae* yang ditemukan dari sumur penderita kusta dengan bukan penderita kusta tidak berbeda. Dari data tersebut terlihat bahwa eksistensi *M. leprae* pada sumber air penduduk tidak tergantung adanya penderita kusta di daerah tersebut. Dengan kata lain *M. leprae* yang ada di sumber air tersebut memang bukan berasal dari kontaminasi penderita kusta.

Penularan kusta terutama melalui kontak langsung dengan sumber infeksi (manusia), namun dapat juga melalui jalur tidak langsung, yaitu melalui lingkungan. Hal ini diperkuat dengan adanya kenyataan bahwa adanya penurunan prevalensi kusta ternyata tidak diikuti dengan penurunan insiden, dan masih tetap adanya penderita baru yang ditemukan walaupun kasus aktif sebagai sumber infeksi telah diobati (Cree *et al.*, 1998). Di samping itu juga diperkuat dengan adanya kenyataan bahwa lebih banyak kasus baru yang ditemukan tanpa adanya riwayat kontak dengan penderita kusta yang terbukti mengeluarkan *M. leprae*. Bakteri ini mampu hidup di luar tubuh manusia dan keluar terutama dari sekret nasal. Basil kusta dilaporkan ditemukan pada tanah di sekitar lingkungan penderita dan hal ini dibuktikan dengan salah satu studi menggunakan telapak kaki mencit sebagai media kultur (ILA Report, 2002).

Penelitian lain juga membuktikan bahwa *M. leprae* mampu hidup untuk beberapa waktu di lingkungan. *M. leprae* juga ditemukan pada debu rumah penderita, dan dapat menjadi sumber infeksi, juga ditemukan pada air untuk mandi dan mencuci (Sreevatsa *et al.*, 1997 dan ILA Report, 2002). Akibat penularan melalui kontak dengan tanah atau binatang yang terinfeksi secara alami sangat mungkin.

Kemungkinan infeksi melalui lingkungan ini diperkuat dengan banyaknya penemuan kasus baru kusta tanpa adanya riwayat kontak langsung dengan penderita. Meskipun terjadi penurunan jumlah atau prevalensi kusta penderita setelah program MDT, namun jumlah penderita baru yang ditemukan tampaknya belum menunjukkan perbedaan yang nyata dari tahun ke tahun, bahkan cenderung mengalami kenaikan. Hal ini kemungkinan ada hubungannya dengan peningkatan jumlah penderita kusta baru yang belum jelas sumber penularannya (Hardyanto, 1996).

Dengan ditemukannya *M. leprae* di air semakin memperkuat dugaan bahwa adanya sumber non manusia dari basil kusta yang menjadi sumber infeksi (Chakrabarty *et al.*, 2001 dan Agusni *et al.*, 2004) telah mengemukakan bahwa tampaknya ada korelasi antara penyebaran kusta secara geografis dengan distribusi geografis dari tanah yang mengandung fosil minyak (*fossil-fuel soils*), baik di daerah Amerika maupun India. Begitu juga Kazda *et al* (1986) melaporkan ditemukannya *M. leprae* dari tanah di daerah endemik kusta di Bombay. Menurut Puhler *et al.*, (2004) kemampuan suatu bakteri bertahan di lingkungan air karena bakteri itu mampu berinteraksi dengan organisme lain yang ada di lingkungan tersebut.

Telah lama diketahui bahwa *M. leprae* yang berasal dari percikan lendir hidung penderita kusta tipe lepromatosa yang belum diobati bisa bertahan hidup sekitar 40 hari di tanah dan bisa dikultivasi pada telapak kaki mencit percobaan. Maka dapat dimengerti bahwa basil kusta bisa ditemukan di alam lingkungan sekitar rumah penderita kusta. Namun untuk menganggap ini sebagai sumber penularan masih dipertanyakan, karena jumlah basil kusta yang berasal dari penderita kusta akan terus berkurang dengan berjalannya waktu. Di samping itu juga kemungkinan kecil untuk basil kusta bisa berkembang biak di tanah, karena sifatnya yang obligat intraseluler, berarti harus menumpang di dalam sel lain.

Sampel penelitian adalah sampel air sumur yang biasa digunakan oleh pasien untuk keperluan sehari-hari, sehingga dapat dimengerti apabila air sumur mereka tersebut tercemar oleh basil kusta, apabila pengidap penyakit kusta yang belum diobati ikut mencemari air sumur tersebut. Dengan ditemukan *M. leprae* yang masih menjadi pertanyaan bagaimana *M. leprae* bisa bertahan hidup pada air sumur tersebut, mengingat basil ini baru membelah setiap 2 minggu sekali dan hanya bisa bertahan selama 40 hari di lingkungan. Tampaknya akan sulit bagi kuman ini untuk

bertahan hidup apabila basil kusta ini tidak ikut menumpang pada organisme lain karena sifatnya obligat intraseluler. Apabila memang basil kusta bisa berkembang biak dalam suasana ekologis air sumur tersebut, maka para penduduk yang mandi di situ akan terpapar setiap hari dan hal itu memenuhi persyaratan terjadinya penularan kusta yaitu *prolonged, intimate and continuously*. Fakta ini mungkin bisa menjadi penjelasan, mengapa insidensi kusta di daerah endemik tidak menurun, padahal pemberantasan dan pengobatan sumber infeksi yaitu penderita kusta telah dilaksanakan dengan seksama.

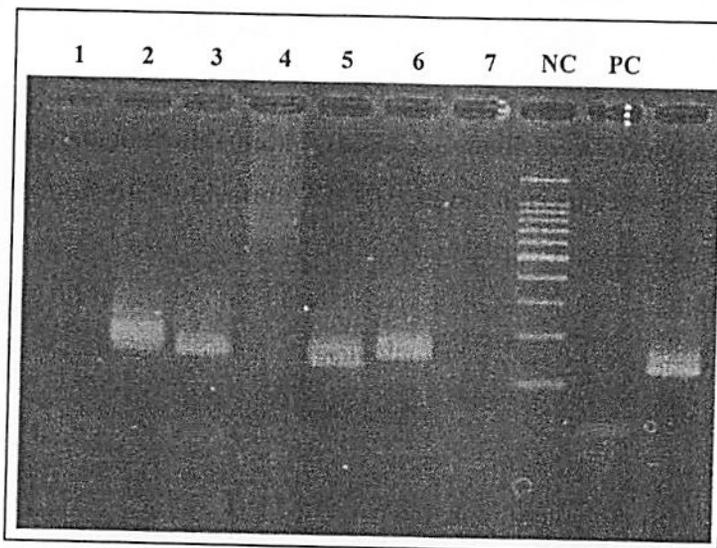
#### Variasi Pengulangan Nukleotida TTC *M. leprae* di Desa Brengkok-Lamongan.

#### Variasi Pengulangan Nukleotida TTC *M. leprae* dari smear kulit Pasien Kusta

Hasil sekuensing dapat dilihat pada gambar berikut ini. Dari hasil sekuensing terhadap hasil positif PCR yang berasal dari sampel sayatan lesi kulit penderita kusta didapatkan variasi dan frekuensi pengulangan sekuens nukleotida TTC seperti terdapat pada tabel 5 berikut ini.

#### Hasil Pemeriksaan sekuens DNA *M. leprae* dengan menggunakan primer TTC

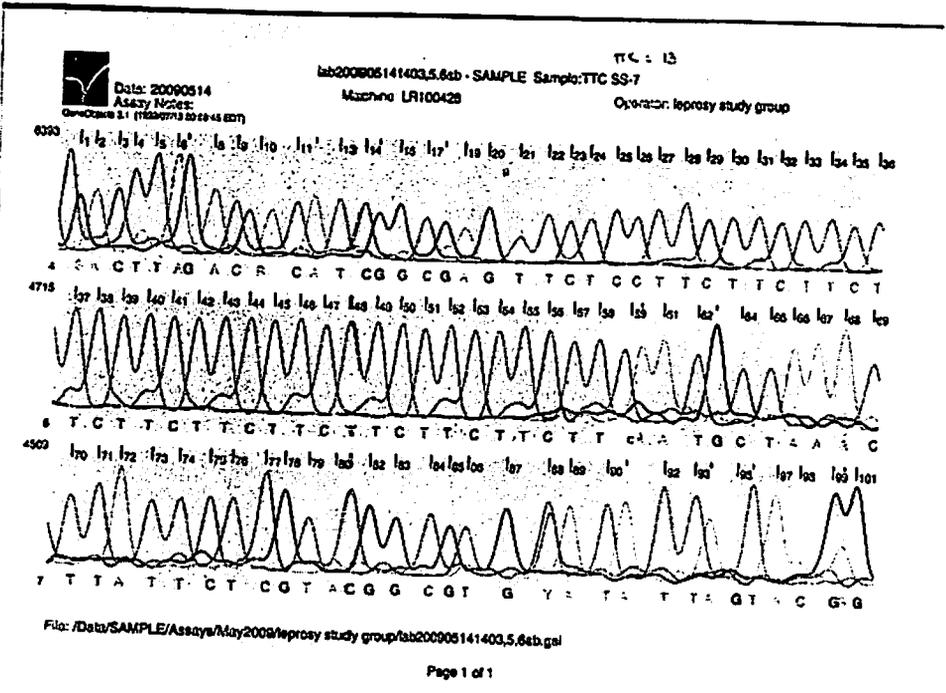
Secara keseluruhan dari semua sampel didapatkan hasil sebagai berikut:



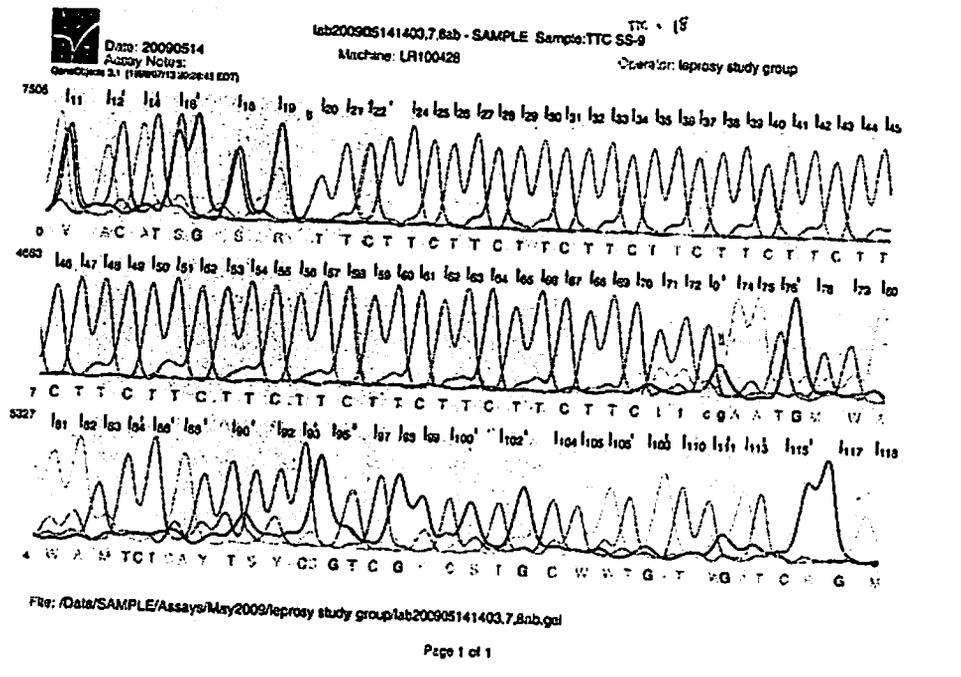
**Gambar 13**

Hasil PCR menggunakan primer TTC

Keterangan: Nomor 1 dan 7 sampel pasien dengan hasil positif pada nomor 2,3,5 dan 6; no 8 marker; no 9 *negative control* dan no 10 *positive control* (Thai 53)



Gambar 14  
 Hasil sekuens TTC dengan pengulangan 13



Gambar 15  
 Hasil sekuens TTC dengan pengulangan 18

**Tabel.5.** Variasi dan frekuensi pengulangan sekuens nukleotida TTC *M. leprae* dari sampel sayatan kulit penderita kusta

No	Variasi Pengulangan Sekuens Nukleotida TTC	Frekuensi
1.	TTC-13	1 (20%)
2.	TTC-18	4 (80%)
Jumlah		5 (100%)

Berdasarkan variasi pengulangan sekuens nukleotida TTC *M. leprae* dari sampel sayatan kulit penderita kusta pada tabel 5 di atas didapatkan 2 strain *M. leprae* dengan variasi antara 10-60 dengan frekuensi terbanyak terdapat pada pengulangan TTC 13 kali sebanyak 1 isolat (20%), diikuti TTC 18 kali 4 isolat (80%)

Pemeriksaan sekuensing DNA dari genus *Mycobacteria* telah banyak dilakukan untuk berbagai keperluan, salah satu diantaranya adalah untuk pemetaan genom (*genomic mapping*) genus kuman tersebut. Tidak seperti golongan *Mycobacteria* lainnya, *M. leprae* tidak bisa dibedakan dengan MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*) karena tidak ada lokus MIRU pada *M. leprae* yang bisa membedakan strain kuman ini (Cole *et al.*, 2001a; Soini *et al.*, 2001 dan Monot *et al.*, 2005). Salah satu cara untuk membedakan strain dari *M. leprae* diperkenalkan oleh Chin *et al* (2000) adalah dengan cara menghitung jumlah pengulangan nukleotida TTC.

Berbagai studi sebelumnya melaporkan bahwa variasi yang pernah ditemukan dari pengulangan nukleotida TTC. Laporan pengulangan sekuens nukleotida TTC sebanyak 46 kali pernah dilaporkan di Surabaya (Agusni *et al.*, 2005). Pengulangan sekuens nukleotida TTC tersebut merupakan jumlah yang sangat tinggi untuk DNA *M. leprae*, jauh di atas jumlah yang pernah dilaporkan oleh peneliti lain pada saat itu (Agusni *et al.*, 2005; Mudatsir *et al.*, 2005a). Penelitian lainnya terhadap 30 isolat yang berasal dari sayatan lesi kulit isolat klinik yang berasal dari Surabaya didapatkan variasi pengulangan sekuens TTC antara 10-46 kali, dengan puncak frekuensi pada pengulangan 10 kali, 12 dan 33 kali (Mudatsir *et al.*, 2005a). Penelitian lain dengan jumlah sampel yang lebih banyak menunjukkan variasi pengulangan sekuens nukleotida TTC antara 10-33 kali dengan puncak

frekuensi pengulangan sekuens nukleotida TTC 10, 18 dan 21 kali (Mudatsir *et al.*, 2005b).

Studi di luar negeri yang dilakukan oleh Shin *et al* (2000) sampel asal Philipina menunjukkan variasi pengulangan sekuens nukleotida antara 10-37 kali. Zhang *et al* (2005) pada penelitian sayatan kulit penderita kusta pada dua keluarga didapatkan variasi pengulangan sekuens nukleotida TTC 8-13 kali. Hasil penelitian Young *et al* (2004) terhadap 33 sayatan lesi penderita kusta di India mendapatkan variasi pengulangan 10-25 kali dengan puncak frekuensi 13 kali. Studi yang dilakukan Truman *et al* (2004b) dengan menggunakan sampel dari beberapa negara antara lain dari AS, Philipina, Afrika, Brazil dan Thailand didapatkan variasi pengulangan TTC antara 10-16 kali dengan puncak frekuensi 12 dan 15 kali. Matsuoka *et al* (2004) melaporkan isolat dari Jepang dan Korea menunjukkan variasi pengulangan sekuens nukleotida TTC antara 9-16 kali. Hal yang sama juga dilaporkan Chae *et al* (2002) terdapat persamaan strain antara *M. leprae* yang ditemukan di Korea dengan Jepang dan strain dari Cina dan Mongolia. Menurut Enersen *et al.*, (2006) penyebaran strain atau tipe suatu mikroba berhubungan erat dengan letak geografik dari suatu daerah atau negara. Fenomena ini diduga berkaitan dengan letak geografis antara dua Negara (Jepang dan Korea) yang letaknya berdekatan.

Dari laporan di Negara lain pengulangannya paling tinggi hanya 37 kali yang ditemukan di Philipina (Truman *et al.*, 2004b). Hal ini menunjukkan bahwa isolat ini sangat berbeda dengan yang biasa ditemukan di negara yang pernah dilaporkan. Namun apakah ada implikasi variasi strain *M. leprae* dalam kaitannya dengan gambaran klinik dalam pemberantasan penyakit kusta, perlu studi lebih lanjut dan mendalam secara komperhensif.

#### **Variasi Pengulangan Nukleotida TTC *M. leprae* dari Hapusan Hidung Pasien dan Nara kontak**

Sampel yang berasal dari pasien tidak ada yang menunjukkan hasil positif, sementara sampel kontak pasien kusta didapatkan hasil DNA *M. leprae* positif sebesar 1 dari 25 sampel (4%) yaitu 28 copy.





ditemukannya *M. leprae* dari lingkungan air di sekitar endemik kusta dengan pemeriksaan PCR. Ditemukannya basil kusta dari sumber air penduduk telah dilaporkan oleh Izumi *et al* (1999) di beberapa desa di Sulawesi Selatan, namun frekuensinya relatif kecil (sekitar 10%) dari sampel air yang diteliti. Matsuoka *et al* (1999) menemukan 21 dari 44 sampel air positif mengandung basil kusta. Penelitian lainnya di daerah endemik kusta di Pantai Utara di Jawa Timur ditemukan 42,8% air yang digunakan penduduk positif ditemukan *M. leprae* (Agusni *et al.*, 2004).

Pada penelitian ini dari sampel air di daerah endemik kusta didapatkan 1 strain *M. leprae* berdasarkan pengulangan sekuens nukleotida TTC yaitu TTC-11 pada 3 sumur (Tabel 6).

Bila dilihat lebih lanjut, hasil penelitian ini tidak menunjukkan bahwa strain *M. leprae* yang ditemukan dari air mempunyai kesamaan dengan strain *M. leprae* yang ditemukan dari sayatan kulit pasien maupun apusan rongga hidung pasien dan nara kontak di daerah tersebut.

Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Mudatsir (2006) yang menunjukkan bahwa strain *M. leprae* yang ditemukan dari air mempunyai kesamaan dengan strain *M. leprae* yang ditemukan dari sayatan kulit pasien maupun apusan rongga hidung pasien dan orang sehat di daerah tersebut. Secara genotipe kuman tersebut strainnya sama. Keberadaan basil ini di air memungkinkan menjadi sumber penyebab kusta karena setiap hari penduduk di daerah tersebut menggunakan untuk keperluan sehari-hari. Menurut Matsuoka *et al* (1999) transmisi kusta melalui air yang terkontaminasi basil kusta sangat memungkinkan terjadi penularan melalui jalur ini. Perbedaan hasil ini dapat dianalisis lebih lanjut berdasarkan factor lingkungan yang berbeda dan membutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengungkapkan peran lingkungan pada transmisi kusta.

#### **Analisis Variasi Genetik Pengulangan TTC Sekuens Nukleotida *M. leprae* dari Sayatan kulit, Hapusan Hidung dan Air Sumur**

Dari hasil sekuensing terhadap hasil PCR yang positif dari sampel sayatan cuping telinga, hapusan hidung dan air didapatkan variasi dan frekuensi pengulangan sekuens nukleotida TTC seperti terdapat pada tabel 6 berikut ini.

**Tabel 6** Rekapitan hasil sekuens pasien, narakontak dan lingkungan

No.	Pasien	Kontak	Lingkungan (air)
1.			11 copy
2.	13 copy		
3.	18 copy		
4.	18 copy		11 copy
5.	18 copy		11 copy
6.		28 copy	
7.	18 copy		

**Tabel.7** Variasi dan frekuensi pengulangan sekuens nukleotida TTC *M. leprae* dari sampel sayatan kulit penderita kusta, hapusan hidung dan dari air

No	Pengulangan sekuens TTC	Sayatan kulit	Hapusan Hidung	Air	Tanah	Frekuensi
1.	TTC-11	0	0	3	0	3 (33.33%)
2.	TTC-13	1	0	0	0	1 (11.11%)
3.	TTC-18	4	0	0	0	4 (44.45%)
4.	TTC-28	0	1	0	0	1 (11.11%)
<b>Jumlah</b>		<b>5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>9 ( 100% )</b>

Berdasarkan variasi pengulangan sekuens nukleotida TTC *M. leprae* dari sampel air pada tabel 7 di atas didapatkan 4 strain *M. leprae* dari sampel sayatan kulit, hapusan hidung, air dan tanah dengan variasi antara 11-28 dengan frekuensi terbanyak terdapat pada pengulangan TTC 18 kali sebanyak 4 isolat (44.45%), diikuti TTC 11 kali sebanyak 3 isolat (33,33%), TTC 13 dan TTC 28 sebanyak 1 isolat (11.11%)

Dari hasil rekapitulasi *M. leprae* pada tabel 8 di atas dapat disimpulkan bahwa pada penelitian ini ditemukan 4 strain *M. leprae* dari ke empat sampel dengan pengulangan sekuens nukleotida TTC antara 11-28 kali. Pada sampel sayatan kulit ditemukan 2 strain *M. leprae* dengan pengulangan sekuens nukleotida TTC antara 13-18 kali dengan frekuensi pengulangan TTC terbanyak pada TTC 18 (44.45%) dari 5 sampel yang positif. Pada sampel hapusan hidung ditemukan 1 strain dengan

pengulangan sekuens nukleotida TTC 28 kali. Dari sampel air ditemukan 1 strain dengan pengulangan sekuens nukleotida TTC 11 kali dengan frekuensi pengulangan TTC pada seluruh sampel yang positif TTC.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Mudatsir (2006), berdasarkan analisis variasi pengulangan sekuens nukleotida TTC ditemukan 18 strain *M. leprae* dari sayatan cuping telinga, hapusan hidung dan sumur penderita kusta di Kecamatan Talango, Sumenep. Variasi pengulangan sekuens nukleotida TTC antara 9-65 kali dengan frekuensi terbanyak terdapat pada pengulangan 12 kali (36,3%). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa 18 strain *M. leprae* tersebut menunjukkan genotipe yang sama dengan strain dari sayatan cuping telinga, hapusan hidung dan air sumur. Hanya 1 strain (strain TTC-10) yang menunjukkan perbedaan antara sampel dari sayatan kulit, hapusan hidung dan air sumur  $p = 0,0171$ .

Persamaan variasi genetik antara ketiga sumber tersebut menunjukkan bahwa strain *M. leprae* dari penderita kusta dan dari lingkungan yaitu dari apusan hidung dan air merupakan strain yang sama. Hingga saat ini penularan penyakit kusta masih dianggap dari manusia ke manusia. Sumber penularan adalah penderita kusta tipe lepromatosa atau multibasiler yang belum diobati dan menginfeksi manusia lain lewat proses infeksi droplet. Meskipun demikian, para ahli telah lama mencurigai adanya sumber infeksi nonmanusia untuk *M. leprae*, mengingat banyaknya fakta ke arah pendapat tersebut.

Menurut Cree *et al* (1998) penularan kusta terutama dapat melalui kontak langsung dengan sumber infeksi (manusia atau hewan), namun dapat juga melalui jalur tidak langsung yaitu melalui lingkungan. Adanya persamaan strain *M. leprae* dari penderita kusta dengan dari lingkungan (apusan hidung dan air) di daerah tersebut menunjukkan strain di daerah tersebut sama. Hal ini diperkuat adanya kenyataan bahwa adanya penurunan prevalensi kusta ternyata tidak diikuti dengan penurunan insiden dan masih tetap adanya penderita baru yang ditemukan walaupun kasus aktif sebagai sumber infeksi sudah diobati. Disamping itu juga diperkuat dengan adanya kenyataan bahwa lebih banyak kasus baru yang ditemukan tanpa adanya riwayat kontak dengan penderita kusta yang terbukti mengeluarkan *M. leprae*. *M. leprae* mampu hidup di luar tubuh manusia dan keluar terutama keluar dari sekret nasal (Noordeen, 1994). Pada penelitian ini tidak terbukti adanya

kesamaan genotype antara pengulangan TTC sayatan kulit pasien, apusan hidung pasien dan nara kontak maupun sampel dari lingkungan. Hal ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor yang mempengaruhi proses transmisi kusta. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan keterkaitan antara *host agent environment* pada terjadinya transmisi kusta.

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Adriaty, D. 2005. Kejadian *Mycobacterium leprae* pada Lingkungan Air di Daerah Endemik Kusta dengan Prevalensi Penderita Kusta Tinggi Dibandingkan Daerah dengan Prevalensi Penderita Rendah. *Tesis*. Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Agusni, I. 1997. Perubahan Pola Imunopatologik sebagai Indikator Untuk Penanganan Kusta Subklinik: Suatu Studi Observasional Longitudinal untuk Mendapatkan Dasar Kebijakan dalam Penanganan Kusta Stadium Subklinik. *Disertasi*. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Agusni, I; Izumi, S; Adriaty, D; Iswahyudy. 2004. Studi *Mycobacterium leprae* dari Alam Lingkungan di Daerah Endemik Kusta. *Maj Kedokt Indon*. 58(8): 319-324.
- Arliny Y. 2003. Deteksi *Mycobacterium leprae* Menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) pada Spesimen Hapusan Mukosa Hidung dan Sayatan Lesi Kulit Penderita Kusta Baru. *Tesis*. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Chae, GT; Lee, SB; Kabg, TJ; Shin, HK; Kim, JP; Ko, YH; Kim, SH. and Kim, NH. 2002. Typing of Clinical Isolates of *Mycobacterium leprae* and Their Distribution in Korea. *Lepr. Rev.* 73: 41-46.
- Chakrabarty, AN; Destidar, BA. 2001 Is Soil an Alternative Source of Leprosy Infection. *Acta Leprologica* . 12: 79-84.
- Chilima BZ; Clark IM; Floyd S; Fine PEM and Hirsch PR. 2006. Distribution of Environmental Mycobacteria in Karonga District, Northern Malawi. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2343-2350.
- Cree, IA dan Smit WC. 1998. Leprosy Transmission and Mucosal Immunity: Towards Eradication?. *Lepr Rev.* 69: 112-121.
- Cole, ST; Brosch, R; Parkhil, J. 2001a. Deciphering the Biology *Mycobacterium tuberculosis* from Genome Sequence. *Nature*. 393: 537-544.
- Cole, ST; Eigmeier, G and R; Parkhil. 2001b. Massive Gene Decay in the Leprosy Bacillus. *Nature*. 409: 1007-1011.
- Cox RA; Kempell K; dan Fairclough L. 1991. The 16S Ribosomal RNA of *M. leprae* Contains a Unique Sequence which Can be Used for Identification by the PCR. *J. Med. Microbiol.* 35: 384-390.

- De Wit, MYL; Feber, WR; Krieg, SR. 1991. Application of Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycobacterium leprae* in Skin Tissue. *J Clin Microbiol.* 29 (5): 906-910.
- De Wit, MYL and Klatser, PR. 1994. *Mycobacterium leprae* Isolates from Different Source have Identical Sequences of Spacer Region between the 16S and 23S Ribosomal RNA Genes. *J. Clin. Microbiol* 140: 1983-1987.
- Enersen dkk (2006) Multilocus Sequence Typing of *Porphyromonas gingivalis* Strains from Different Geographic origins. *J. Clin. Microbiol.* 44: 35-41.
- Groathouse NA; Rivoire B and Nae S. 2003. Polymorphism in Shoert Tandem Repeat Sequences of *M. leprae* Allow for the Epidemiological Characterization of Strain. *Proseeding of US-Japanese Meating on Leprosy and Tuberculosis.*
- Hardyanto. 1996. Infeksi Subklinis *Mycobacterium leprae* dan Hubungannya dengan Faktor-Faktor Risiko di Indonesia: kajian Seroepidemiologik dan Immunogenetik. *Disertasi.* Universitas Gajah Mada Yogyakarta.
- International Leprosy Association (ILA). 2002. Report of the International Leprosy Association Technical Forum: Epidemiology and Control. *Lepr. Rev.* 73: 46-48.
- Izumi, S; Budiawan T; Saeki, K ;Matsuoka, M; Kawatzu, K. 1999. An Epidemiological Study on *Mycobacterium leprae* Infection and Prevalence of Leprosy in Endemik Villages by Molecular Biological Technique. *Indian J. Lepr.* 7: 37-43.
- Jamil S; Wilson SM; Hacket M; Hussain R; Stoker NG. 1994. A Colorimetric PCR Method for the Detection of *Mycobacterium leprae* in Skin Biosies from Leprosy Patient. *Int. J. Lepr.* 62: 512-521.
- Kazda, J; Ganapati, R; Revankar, C; Buchanan, TM; Young, DB and Irgens, LM. 1986. Isolation of Environment-derived *Mycobacterium leprae* from Soil in Bombay. *Lepr. Rev.* 57S(3): 201-208.
- Matsuoka, M; Izumi, S; Budiawan T; Nakata, N. and Saeki, K. 1999, *Mycobacterium leprae* DNA ini Daily Using as a Possible Source of Leprosy Infection. *Indian Joursy of Leprosy.* 71 (1) 61-67.
- Matsuoka, M; Zhang, L; Budiawan, T; Saeki, K and Izumi, S. 2004. Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the Basis of the Polymorphism of TTC Repeats for Analysis of Transmission. *J. Clin. Microbiol.* 42(2): 741-745.
- Meima A; Gupte MD; Oortmerssen GJV dan Habbema JFD. 1999. Simulation Model for Leprosy Transmission and Control. *Int. J. Lepr.* 67: 215-230.

- Monot, H; Honore, N; Garnier, T; Araoz, R; Coppee, JY; Lacroix, C; Sow, S; Spencer, JS; Truman, RW; Williams, DL; Gelber, R; Virmond, M; Flageul, B; Cho, SN; Ji, B; Mondolfi, AP; Convit, J; Young, S; Fine, PE; Rasolofo, V; Brennan, PJ. and Cole, ST. 2005. On the Origin of Leprosy. *Science*. 308: 1040-1042.
- Mudatsir; Mubarak, Z; Susary, NP; Rosita, C; Listiawan, MY Agusni, I. dan Izumi (2005a) TTC Variation in the DNA *Mycobacterium leprae* in some Clinical Isolates Collected from Leprosy Patients in Surabaya: Preliminary Study Genomic Mapping of Leprosy in Indonesia. *Buku Abstrak Disampaikan pada Kongres Nasional Perhimpunan Dokter Spesialis Kulit dan Kelamin (PERDOSKI)* di Jakarta, 12-15 Juni 2005.
- Mudatsir; Mubarak, M; Agusni, I; Izumi, S (2005b) Analysis variable number of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* from leprosy patients in Surabaya. Abstract Book. Presented on: 9th Nasional Congress *Indonesian Society for Microbiology and 3rd Asian Conference for Lactic Acid Bacteria*, Bali, Indonesia, 24-27 Agustus 2005.
- Mudatsir (2006). Disertasi. Analisis Genotipe Isolat *Mycobacterium leprae* dari Penderita Kusta dan Air di Lingkungan Endemik Kusta (Suatu Penelitian Observasional dengan Teknik Biologi Molekuler di Kabupaten Sumenep, Jawa Timur)
- Muttaqin I. 2005. Faktor yang Berhubungan dengan Terjadinya Kusta Subklinis pada Narakontak Serumah dan Tidak Serumah Penderita Kusta. *Tesis*. Program Pascasarjana Unair. Surabaya.
- Noordeen, SK. 1994. The Epidemiology of Leprosy. In: Hastings, RC. *Leprosy*. Churchill Livingstone. Edinburg. p 29-43
- Patrocinio, LG; Goulart, IMB; Goulart, LR; Petracinio, JA; Ferreira, FR. And Fleury, RN. 2005. Detection of *Mycobacterium leprae* in Nasal Mucosa Biopsies by the Polymerase Chain Reaction. *FEMS Immun. and Med. Microbiol.* 44: 311-316.
- Primm, TP; Lucero, CA and Falkinham III, JO. 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 98-106.
- Puhler, A; Arlat, M; Becker, A; Gottfert, M; Morrissey, JP and Gara, FF 2004. What Can Bacterial Genome Research Teach us About bacteri-plant interactions? *Curr Opin in Plant Biol.* 7:137-147.
- Rees, RJW; Young, DB. 1994. The Microbiology of Leprosy. In: Hastings, RC. *Leprosy*. Churchill Livingstone. Edinburg. p 47-98.

- Shin, Yc; Lee, H; Lee, HY; Walsh, GP; Kim, JD. and Cho, JD. 2000. Variable Numbers of TTC Repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from Leprosy Patients and Use Strain Differentiation. *J. Clin. Microbiol.* 38 (12): 4535-4538.
- Soini, H and Musser, JM. 2001. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clin. Chemistry.* 47(5): 809-814.
- Sreevatsa and Katoch, K. 1997. Viability of *Mycobacterium leprae* while Undergoing Laboratory Procedures. *Indian J. Lepr.* 69(4) 353-359.
- Suaib RS; Amiruddin MD; Tabri F dan Noordin C. 1999. Gambaran Radiologis Sinus Paranasal Penderita Kusta Multibasiler di RSUD Dr. Wahidin Sudirohusodo Ujung Pandang. *Naskah Ilmiah Kongres Nasional PERDOSKI IX.* Hal: 147-157.
- Torres P; Camerana JJ; Gomez JR Noguera JM; Gimeno V; Navarro JC dan Olmos A. 2003. Comparisson of PCR Mediated Amplification of DNA and the Classical Methods for Detection of *Mycobacterium leprae* in Differen Types of Clinical Samples in Leprosy Patients and Contacts. *Lepr. Rev.* 74: 18-30.
- Truman, R; Fontes, AB; Miranda, AB; Suffys, P. and Gillis, T. 2004b. Genotypic Variation and Stability of Four Variable-Number Tandem Repeats and Their Suitability for Discriminating Strain of *Mycobacterium leprae*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2558-2565.
- Wichitwechkarn, J; Karnjan, S; Shuntawuttisetete, S; Kampirapap, K; Parrapakorn, S.1995. Detection of *Mycobacterium leprae* Infection by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33 (1): 45-49.
- Young, SK; Taylor, GM; Jain, S; Suneetha, LM; Sunetha, S; Lockwood, DNJ and Young, DB. 2004. Microsatellite Mapping *Mycobacterium leprae* Population in Infected Humans. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4931-4936.
- Zhang, L; Budiawan, T. and Matsuoka, M. 2005. Diversity of Potensial Short Tandem Repeats in *Mycobacterium leprae* and Aplication for Molecular Typing. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5221-5220.

No.	Nama	Asal Fakultas/ Kelembagaan Penelitian	Tugas
1.	Dr. Cita Rosita S. Prakoewa, dr., SpKK	FK-Unair	Survey lapangan, pemeriksaan klinis, analisa PCR dan analisa sequencing, analisa data secara statistik
2.	Prof.Dr.Indropo Agusni, dr., SpKK	FK-Unair	Survey lapangan, pemeriksaan klinis, analisa PCR dan analisa sequencing, analisa data secara statistik
3.	Dinar Adriaty, S.Si, M.Kes	LPT Unair	Survey lapangan
4.	Dr. Eduardus Bimo, drh, M.Kes	LPT Unair	Survey lapangan
5.	Ratna Wahyuni, S.Si (Analisis Laboratorium)	LPT Unair	Membantu seluruh aktivitas di laboratorium
6.	Iswahyudi, SKM (Teknisi)	LPT Unair	Membantu seluruh aktivitas di lapangan

**6. Lokasi Penelitian :**

Laboratorium	Alamat	Pengelola
Laboratorium Leprosy	Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115	Lembaga Penyakit Tropis - UNAIR

**Dan :**

Kecamatan	Kabupaten	Propinsi
Brondong	Lamongan	Jawa Timur

## ANGGARAN DAN REALISASI PENGELUARAN

### 1. JUSTIFIKASI ANGGARAN

#### 1.1. Anggaran Untuk Pelaksana.....Rp. 15.000.000

No.	Nama	Peran/Kegiatan	Jumlah (XRp.1000)
1.	Dr. Cita Rosita S. Prakoeswa, dr., SpKK	Survey lapangan, pemeriksaan klinis, analisa PCR dan analisa sequencing, analisa data secara statistik.	4.200
2.	Prof . Dr. Indropo Agusni, dr., SpKK(K)	Survey lapangan, pemeriksaan klinis, analisa PCR dan analisa sequencing	3.100
3.	Dr. Eduardus Bimo, drh, M.Kes	Survey lapangan, analisa PCR dan analisa sequencing.	3.100
4.	Dinar Adriaty, S.Si, M.Kes	Survey lapangan, analisa PCR dan analisa sequencing.	3.100
5.	Analisis Laboratorium	Membantu seluruh aktivitas di laboratorium	750
6.	Teknisi	Membantu seluruh aktivitas di lapangan	750
<b>T o t a l</b>			<b>15.000</b>

Belum direalisasikan

1.2. Anggaran Untuk Bahan Habis Pakai ..... Rp. 81.000.000,-

No.	Nama Bahan	Kegunaan	Biaya (X Rp. 1000)
1.	Botol steril kualitas p.a, Petri dish steril disposable kualitas p.a,sterilized Surgery Blade, tube Sterilized, tip steril untuk mikropipet, cotton bud sterilized, reagen untuk ekstraksi DNA (Qiagen DNAeasy kit)	Pengambilan Sampel dan ekstraksi DNA dan	19.000
2.	Agarose Powder, Ethidium Bromide, Buffer TBE, Buffer TAE, Buffer PBS, Buffer PBST, Tween 20	Elektroforesis	18.000
3.	Primers, Enzym Taq, dNTP, G mixture dari FailSafe PCR System (EPICENTRE, Madison, WI, USA), <i>GFX<sup>TM</sup> PCR, DNA and Gel Band Purification kits (Amersham Biosciences), Dual CyDye<sup>TM</sup> Terminator Sequencing kits (Amersham Biosciences)</i>	PCR dan Sequencing	44.000
<b>Total</b>			<b>81.000</b>

Belum selesai dilakukan rekapitulasi biaya yang telah dikeluarkan

**1.3. Anggaran Untuk Perjalanan .....Rp. 2.000.000,-**

No.	Tujuan	Kegunaan	Biaya (X Rp.1000)
1.	Surabaya-Jakarta (PP)	Seminar Hasil	1.000
2.	Surabaya-Lamongan (PP)	Survey lapangan	1.000
<b>T o t a l</b>			<b>2.000</b>

**Biaya survey yang telah dilakukan total :**

<b>Pengeluaran</b>	
Honorarium petugas Puskesmas	750.000
Honorarium pak toha (juru kusta)	350.000
Biaya operasional Puskesmas	1.500.000
Uang transport pasien dan kontak @20.000,- sebanyak 49 orang yang datang	980.000
Uang fotokopi dan pulsa	200.000
Kue-kue	100.000
Minuman	80.000
Map, amplop	22.000
Sewa mobil (2X 750.000)	1.500.000
Pengemudi (2x 100.000)	200.000
Bensin (2x200.000)	400.000
Ethical Clearance	500000
Konsumsi Etik	150000
Institution fee	2.000.000
<b>Total</b>	<b>8.732.000</b>

**1.4. Anggaran Lain-lain ..... Rp. 2.000.000,-**

No.	Nama Pengeluaran	Biaya (X Rp.1000)
1.	Pemeliharaan dan perbaikan kerusakan alat	1.000
2.	Penyusunan laporan dan administrasi	600
3.	Publikasi	400
<b>T o t a l</b>		<b>2.000</b>

**Belum ada pengeluaran**

No	Dusun	Coordinate	Patient Name	Umur	Leprosy Type	Contact	No. Water	PCR Water	No. Soil	PCR Soil	No. serum	IgM	IgG	No. Smear	PCR smear	No. FTA	PCR FTA	No. Swab	PCR Swab	TTC repeats smear	TTC repeats swab	TTC repeats environment
1	Pambon	S 06°53'42,3"E 112°14'25,0"	Kuslan	50	MB /MDTL 5	(no contact)	BW-1	BS-1			LS-380	310	109	LSS-01	+			LN-301				11 copy
2	Pambon	S 06°53'46,3"E 112°14'20,3"	Mas'udi	40	MB/RFT 3th	husband	BW-5	BS-5			LS-337	2239	1530					LN-343	+			
3			Rustimah	40	household contact	wife			BW-9		LS-339	832	1067					LN-344				
4	Pambon	S 06°53'43,8"E 112°14'25,5"	Anwar	56	MB/RFT 3th	husband	BW-9				LS-336	266	1438					LN-342				
5			Katimah	54	household contact	wife					LS-340	604	1339					LN-345				
6	Brengkok	S 06°53'26"E 112°13'06"	Karsiatun	50	MB/ MDTL 10	(no contact)	BW-12	BS-12			LS-333	X	X	LSS-09		FSS-07	+	LN-339				13 copy
7	Brengkok	S 06°53'34,1"E 112°13'09,3"	Miftahul utum	13	PB	son	BW-14	BS-14			LS-328	343	1369	LSS-06		FSS-04		LN-333				
8			Sumiyati	37	household contact	mother					LS-325	2313	1288					LN-331				
9	Brengkok		Dwi Fentanto	14	MB/RFT	son					LS-324	210	138					LN-334	+			
10			Gunawi	50	household contact	father					LS-330	1102	1336					LS-330				
11	Brengkok		Suto	50	MB/RFT	(no contact)					LS-390	138	385					LN-300	+			
12	Cumpleng	S 06°52'42,7"E 112°14'16,3"	Shofan	39	MB/RFT 2th	uncle	BW-21	BS-21			LS-344	over	4994	LSS-11	+	FSS-09		LN-348				18 copy
13			Mu'bah	65	household contact	mother					LS-321	184	250					LN-327				
14			Lina Nuraini	17	household contact	niece					LS-323	674	211					LN-329				
15			Simatul Faizah	13	household contact	niece					LS-322	116	316					LN-328				
16			Nurcanggeh Seja Budi	5	household contact	niece					LS-326	375	1276					LN-326				
17	Cumpleng	S 06°52'55,7"E 112°14'13,5"	Amin	37	MB (MDTL 9)		BW-16	BS-16			LS-316	3148	4117	LSS-05	+	FSS-03		LN-322				18 copy
18			Kfayah	25	household contact	sister					LS-318	1012	133					LN-323				
19	Cumpleng	S 06°52'51,2"E 112°14'29,9"	Sailuddin Fuadah kunasri	25	MB/RFT 5th	son	BW-26	BS-26			LS-314	125	921					LN-321				
20				50	household contact	mother					LS-315	253	64					LN-320				

No	Dusun	Coordinate	Patient Name	Umur	Leprosy Type	Contact	No. Water	PCR Water	No. Soil	PCR Soil	No. serum	IgM	IgG	No. Smear	PCR smear	No. FTA	PCR FTA	No. Swab	PCR Swab	TTC repeats smear	TTC repeats swab	TTC repeats environment
21	Cumpleng	S 06°52'50.4"E 112°14'23.4"	Anim	30	PB household contact	father	BW- 24		BS- 24		LS-319	1616	424					LN-325				
22			Amel	5	household contact	daughter					LS-320	258	231					LN-324				
23	Cumpleng	S 06°52'45.6"E 112°14'26.8"	Sudarmo	45	MB/RFT household contact	husband	BW- 34		BS- 34		LS-309	411	716	LSS-04		FSS- 02		LN-311				
24			Tamah	30	household contact	wife					LS-311	1006	0					LN-311				
25			Masturah	53	household contact	mother in law					LS-307	385	1462					LN-313				
26			Ah. Fathori	11	household contact	son					LS-308	629	500					LN-316				
27			Sholikhul Murthin	2.5	household contact	son						X	X					LN-312				
28			Imam Abu Khanifah	12	PB	nephew					LS-306	360	321					LN-315				
29	Cumpleng	S 06°52'53.8"E 112°14'40.7"	Amin Nasikin	29	PB/RFT	(no contact)					LS-329	966	1513					LN-336				
30	Cumpleng		Muninggar	45	MB/RFT household contact	husband	BW- 36		BS- 36		LS-370	1404	310	LSS-02				LN-302				
31			Zulkah	31	household contact	wife					LS-303	418	548					LN-303				
32			M. Rokik Hamdani	5	household contact	son					LS-301	152	698					LN-305				
33			Zurrah Nofani	9	household contact	daughter					LS-300	649	341					LN-304				
34	Cumpleng	S 06°52'59.4"E 112°14'15.4"	Lugotiah	17	MB/RFT household contact	mother	BW- 18		BS- 18		LS-304	1314	1877					LN-307				
35			Sumanggem Moh. Nugraha	43	household contact	grandmother					LS-305	702	493					LN-308				
36			Moh. Nugraha Indazna	6 month	household contact	son						X	X					LN-309				
37	Ngesong	S 06°52'59.6"E 112°14'43.6"	Mulasam	70	MB (MDTL 10)	grandfather	SW- 33		SS- 33		LS-310	over	over	LSS-03		FSS- 01	+	LN-310		+	18 copy	
38			Alanfi	23	household contact	grandson					LS-302	296	0					LN-306				
39	Wedung	S 06°52'59.9"E 112°15'53.3"	Malasri	46	MB/RFT 2th	(no contact)	SW- 16		SS- 16		LS-327	223	1207					LN-332				

No	Dusun	Coordinate	Patient Name	Umur	Leprosy Type	Contact	No. Water	PCR Water	No. Soil	PCR Soil	No. serum	Igm	Igg	No. Smear	PCR smear	No. FTA	PCR FTA	No. Swab	PCR Swab	TTC repeats smear	TTC repeats swab	TTC repeats environment	
40	Sedayu lawas	S 06°52'52,7"E 112°16'29,0"	Lina Angraini	16	MB/MDTL 7	daughter	SW-5		SS-5		LS-331	1025	1327	LSS-08		FSS-06		LN-337					
41			Falkhur	60	household contact	father					LS-388	X	X					LN-338					
42	Sedayu lawas	S 06°53'12,8"E 112°16'26,8"	Muslimin	44	MB/MDTL 7	(no contact)	SW-11		SS-11		LS-341	139	1423					LN-346					
43	Sedayu lawas	S 06°52'39,8"E 112°16'30,9"	Mukhid	45	MB/MDTL 5	(no contact)	SW-4		SS-4		LS-332	301	2187	LSS-07		FSS-05		LN-335					
44	Sedayu lawas	S 06°52'59,1"E 112°16'25,7"	Roziqin	18	MB/RFT 6bn	brother	SW-29		SS-29		LS-335	1235	1778	LSS-10		FSS-08		LN-341					
45			Rozag	17	household contact	brother					LS-342	609	1850					LN-347					
46	Sendang harjo		Joyo Mu'ailiman	30	MB/RFT 2lh	(no contact)					LS-334	5196	over					LN-340			28 copy		
47	Mencorek		Rifaturrohmah Aulia	10	MB/MDTL 7	son					LS-317	264	18					LN-317					
48			M.Sulton	35	household contact	father					LS-313	775	0					LN-319					
49			Wanimah	30	household contact	mother					LS-312	199	96					LN-318					