

Hubungan Tingkat Positivitas *Mycobacterium leprae* dari Narakontak Kusta Serumah Menurut Tipe Kusta dengan Teknik Biologi Molekuler

Mudatsir

Abstrak. Salah satu kelompok yang paling berisiko terinfeksi kusta adalah narakontak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat positivitas *M. leprae* dari narakontak dan hubungan antara *M. leprae* dari narakontak serumah menurut tipe kusta dengan teknik biomolekuler. Pemeriksaan dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk memastikan adanya *M. leprae* dengan menggunakan nested primer TTC untuk mengamplifikasi region TTC. Hasil pemeriksaan PCR terhadap 42 sampel hapusan hidung narakontak menunjukkan 26 isolat positif *Mycobacterium leprae* dari hapusan hidung narakontak (61,9%) terdiri dari narakontak MB 20 orang (66,7%) dan narakontak tipe PB 6 orang (50%). Sedangkan hasil PCR yang negatif 16 orang hapusan hidung narakontak (36,1%) terdiri dari narakontak tipe MB 10 orang (33,3%) dan narakontak tipe PB 6 orang (50%). Secara statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan tingkat antara positivitas *Mycobacterium leprae* dengan pemeriksaan PCR antara hapusan hidung narakontak tipe MB dengan hapusan hidung narakontak tipe PB di daerah endemik kusta ($p=0,483$). (JKS 2007; 2:63-68)

Kata Kunci: Kusta, Narakontak, *M. leprae*, *Polymerase Chain Reaction*

Abstract. One of the groups most at risk of leprosy is naracontact. This study intends to determine the level of positivity *M. leprae* from naracontact and the relationship between *M. leprae* naracontact of household by type of leprosy with biomolecular technique. Examination was done by using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) to confirm the existence of *M. leprae* by using nested primers TTC to amplify regions TTC. PCR results of 42 samples of nasal swabs naracontact shows that 26 positive isolates of *Mycobacterium leprae* nasal swabs narakontak (61.9%) consists of naracontact MB 20 people (66.7%) and naracontact type PB 6 people (50%). While the negative PCR result 16 people naracontact nasal swabs (36.1%) consists of naracontact type MB 10 people (33.3%) and naracontact type PB 6 people (50%). There were no statistically significant difference between the positivity rates of *Mycobacterium leprae* by PCR examination of nasal swabs naracontact MB type with nasal swabs naracontact PB type in leprosy endemic areas ($p = 0.483$). (JKS 2007; 2:63-68)

Key words: Leprosy, Narakontak, *M. leprae*, *Polymerase Chain Reaction*

Pendahuluan

Penyakit kusta masih menjadi masalah kesehatan yang memerlukan perhatian khususnya di negara-negara berkembang, seperti di Indonesia. Walaupun era eliminasi kusta sebagai

masalah kesehatan masyarakat pada tahun 2000? telah terlewat, *World Health Organization* (WHO) mengharapkan dengan dikeluarkannya resolusi tersebut terjadi penurunan prevalensi kusta menjadi kurang dari 1 per 10.000 penduduk. Berbagai usaha

*Mudatsir adalah Dosen Bagian
Mikrobiologi Fakultas Kedokteran
Universitas Syiah Kuala*

telah dilakukan di Indonesia dengan program pengobatan MDT (*Multi Drug Therapy*) tetapi kenyataannya insidens kusta masih sulit diturunkan dan masih selalu ditemukan kasus-kasus baru.¹ Hal ini karena yang diobati hanya penderita saja sedangkan narakontak dan kusta subklinis belum diobati sehingga akan menjadi klinis.² Indonesia masih menduduki peringkat tiga di dunia setelah India dan Brazil dengan jumlah penderita kusta terdaftar sebanyak 17.250 orang, *Prevalence Rate* (PR) 0,8/10.000 dan *Case Detection Rate* (CDR) 0,62/10.000.³

Dari laporan hasil pelaksanaan program kusta di Indonesia tercatat sebanyak 17.620 orang penderita dengan prevalensi tidak merata, yaitu sebesar 0,87/10.000 penduduk.⁴ Prevalensi yang tinggi di wilayah Indonesia bagian timur, seperti Irian Jaya, Maluku, Sulawesi Selatan, Aceh, Kalimantan Selatan dan Maluku, serta terkecil di Yogyakarta. Berdasarkan data yang diperoleh dari Sub Dinas P2 kusta Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur tahun 2004, jumlah penderita di Jawa Timur adalah 6.061 dengan *prevalence rate* 1,67 per 10.000 penduduk, sedangkan penderita baru berjumlah 5.628 penderita, atau sekitar 1,55 per 10.000 penduduk. Sedangkan peta penyebaran untuk Jawa Timur dengan *prevalence rate* (per 10.000 penduduk) tertinggi adalah kabupaten Sumenep, diikuti Sampang, Lumajang, Lamongan, Pamekasan, Situbondo dan Probolinggo.⁵

Salah satu kelompok yang paling berisiko terinfeksi kusta adalah narakontak. Narakontak adalah orang yang tinggal di daerah endemik kusta. Lama kontak mereka dengan penderita kusta merupakan faktor yang penting dalam penularan penyakit kusta. Semakin lama atau sering kontak dengan penderita semakin berisiko tertular kusta. Anggota keluarga yang

tinggal serumah dengan penderita kusta tipe Multi Basiler (MB) mempunyai risiko tertular sekitar 4-10 kali lebih besar dibandingkan dengan yang tidak serumah. Sedangkan untuk tipe PB berisiko tertular 2 kali dari yang tidak serumah. Penderita kusta umumnya ditemukan pada narakontak serumah penderita kusta tipe MB.⁶

Ada beberapa metode untuk mendeteksi paparan *Mycobacterium leprae* pada narakontak seperti pemeriksaan serologis dan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Pemeriksaan serologi dapat pula membuktikan adanya infeksi subklinis yang dianggap sebagai fase awal atau fase peralihan dari sehat menuju ke keadaan sakit, dimana suatu individu yang tampak sehat pada pemeriksaan luar atau klinis, namun hasil pemeriksaan serologis didapatkan antibodi spesifik *M. leprae* dalam titer yang cukup tinggi, dan ini menunjukkan adanya infeksi kuman tersebut.⁷ Salah satu cara lain yang perkembangannya cukup pesat sekarang ini dalam mendeteksi adanya adalah dengan teknik pemeriksaan PCR. Sejak tahun 1990-an kemajuan dibidang biologi molekuler ini untuk mendeteksi berbagai jenis mikroba baik dari penderita maupun dari lingkungan sekitar berkembang cukup pesat. Metode yang telah dikembangkan antara lain ekstraksi DNA dan RNA untuk penelitian molekuler mikroba yang berasal dari lingkungan.⁸ Menurut Rochelle⁸ dan Hugenholtz *et al*⁹ salah satu metode yang berkembang sangat pesat untuk penelitian molekuler adalah dengan teknik Reaksi Rantai Polimerasi /RRP atau *Polymerase Chain Reaction* /PCR. Teknik biologi molekuler ini pada dekade terakhir telah banyak juga digunakan untuk mendeteksi adanya

Mycobacterium leprae dari berbagai sampel. Pada penelitian ini ingin mengetahui apakah ada perbedaan tingkat positivitas *Mycobacterium leprae* dari narakontak berdasarkan tipe kusta.

Metode Penelitian

Bahan Penelitian

Bahan dalam penelitian ini adalah hapusan hidung narakontak di daerah endemik kusta di Kecamatan Talango Kabupaten Sumenep, Jawa Timur. Isolasi dan identifikasi dilakukan di Laboratorium Leprosy, *Institute Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya.

Cara Pengambilan dan Pengolahan Sediaan hapusan mukosa hidung

Dilakukan penghapusan (*swab*) pada bagian anterior rongga hidung kanan dan kiri dengan *cotton bud* steril yang telah disiapkan. Bahan tersebut kemudian dibawa ke laboratorium. Ekstraksi DNA dari *cotton bud* yang telah diapuskan pada mukosa hidung dimasukkan dalam tabung eppendorf yang berisi 600 ul PBST. Ujung tungkai *swab* diputar-putar sambil ditekan pada dasar tabung selama 3 ± menit. *Swab* ditarik kembali dan dilakukan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 13000 rpm pada suhu 4 °C. Setelah itu supernatan dibuang dan selanjutnya ekstraksi dilakukan dengan *Qiagen Kit*.

Bahan untuk PCR

Primer yang digunakan adalah *nested primer* TTC yang digunakan berdasarkan laporan Young, dkk., (2004), dengan urutan nukleotida TTC-F1 5' -GGA CCT AAA CCA TCC CGT TT 3', TTC-R1 5' -CTA CAG GGG GCA CTT AGC TC 3', TTC-F2 5'- CGT TGG GTT CGA TCG AAT CGA 3' dan TTC-R2 5'- GCA CGC

CGA CGG GAA TAA GC3'. Bahan lain untuk PCR adalah FailSafe PCR Enzim Mix (*taq*), 2 x Premix G, *Template DNA* dan *Distilled water*

Prosedur Amplifikasi DNA dan Elektroforesis

Master mix yang terdiri dari primer TTC-F1 (5 uM) 0,8 ul dan Primer TTC-R1 (5 uM) 0,8 ul, *taq* DNA polimerase 0,2 ul, PreMix 10 ul dan *distilled water* 6,2 ul dimasukkan dalam *micro tube* PCR dengan total volume 20 ul. Kemudian divorteks dan mikro tube PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR. Dilakukan *pre heat* pada suhu 98°C selama 2 menit, *denaturasi* 98°C selama 20 detik, *annealing* pada suhu 58°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama 30 detik Untuk amplifikasi dilakukan sebanyak 25 siklus, diikuti *prolong* ekstensi 72°C selama 7 menit. Setelah selesai PCR pertama kemudian dilakukan PCR kedua (*nested PCR*) seperti langkah di atas hanya primer yang berbeda yaitu primer TTC-F2/R2. Kondisi PCR *pre heat* pada suhu 98°C selama 2 menit, *denaturasi* 98°C selama 20 detik, *annealing* pada suhu 54°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama 30 detik. Untuk amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus diikuti *prolong* ekstensi 72°C selama 7 menit. Setelah amplifikasi DNA dengan mesin PCR selesai, dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarose 3% dan dicat dengan cara merendam dalam *Ethidium Bromide*. Hasil elektroforesis difoto dengan menggunakan kamera digital (Kodak EDAS 290) yang dihubungkan langsung dengan komputer. Hasil amplifikasi dalam bentuk amplikon dapat dilihat pada monitor komputer.

Hasil dan Pembahasan

Hasil pemeriksaan *Mycobacterium leprae* dengan pemeriksaan PCR

Telah dilakukan pemeriksaan PCR 42 hapusan hidung narakontak di daerah endemik kusta di Kecamatan Talango Kabupaten Sumenep, Jawa Ti mur. Hapusan hidung narakontak kusta

serumah tersebut terdiri dari narakontak tipe *Multibasilar* (MB) 30 orang dan narakontak tipe *Pausibasilar* (PB) 12 orang.

Hasil pemeriksaan *Mycobacterium leprae* dengan pemeriksaan PCR dari spesimen hapusan hidung narakontak menurut tipe kusta penderita pada tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. Hasil pemeriksaan *Mycobacterium leprae* dengan pemeriksaan PCR dari spesimen hapusan hidung narakontak menurut tipe kusta penderita

Narakontak	Hasil pemeriksaan PCR		Jumlah
	Positif	Negatif	
Tipe MB	20 (66,7%)	10 (33,3%)	30 (100%)
Tipe PB	6 (50,0%)	6 (50,0%)	12 (100%)
Total	26 (61,9%)	16 (36,1%)	42 (100%)

Chi-square $p = 0,483$

Dari hasil pemeriksaan PCR terhadap 42 sampel hapusan hidung narakontak di daerah endemik kusta Pulau Talango, Sumenep ditemukan 26 isolat positif *Mycobacterium leprae* dari hapusan hidung narakontak (61,9%) terdiri dari narakontak MB 20 orang (66,7%) dan narakontak tipe PB 6 orang (50%). Sedangkan hasil PCR yang negatif 16 orang hapusan hidung narakontak (36,1%) terdiri dari narakontak tipe MB 10 orang (33,3%) dan narakontak tipe PB 6 orang (50%). Tingginya *Mycobacterium leprae* yang ditemukan pada rongga hidung narakontak disebabkan daerah penelitian Kecamatan Talango, Sumenep merupakan Kabupaten endemik kusta yang paling tinggi prevalensi kusta di Jawa Timur setelah

Kabupaten Sampang. Prevalensi di daerah penelitian mencapai 24,1 per 10.000 penduduk. Hasil penelitian Muttaqin (2005) di tempat yang sama dengan teknik ELISA (*Enzyme-Linked Imuno-Sorbent Assay*) menunjukkan bahwa 28% narakontak positif sebagai kusta subklinik. Menurut Iswahyudi *et al*¹⁰ tidak ada perbedaan positivitas ELISA antara narakontak serumah dengan narakontak bukan serumah.

Penularan kusta tidak mudah, diperlukan kontak lama, intim dan terus-menerus terjadi terutama pada kotak serumah dan satu tempat tidur.^{11,12} Perbandingan kasus kontak terhadap penderita kusta tipe lepromatosa: tuberkuloid: non

*Mudatsir, Hubungan Tingkat Positivitas Mycobacterium leprae
dari Narakontak Kusta Serumah Menurut Tipe Kusta
dengan Teknik Biologi Molekuler*

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.¹²⁻¹⁴

Jumlah basil kusta pada mukosa hidung menurut Shepard berkisar 10.000-100.000.¹¹ Penularan melalui mukosa hidung telah dibuktikan dengan percobaan pada tikus dengan penyemprotan basil *Mycobacterium leprae* berulang-ulang (inhalasi buatan), ternyata pada pembuluh darah alveoli dari tikus tersebut bisa ditemukan kuman tersebut. Ini berarti *Mycobacterium leprae* bisa mencapai sistem sirkulasi darah dan selanjutnya bersarang di suatu tempat predileksi untuk kuman tersebut.^{2,11}

**Hubungan Positivitas *M. lepra*
Hapusan Hidung Nara Kontak
Menurut Tipe Kusta**

Berdasarkan uji statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara positivitas *Mycobacterium leprae* dengan pemeriksaan PCR antara hapusan hidung narakontak tipe MB dengan hapusan hidung narakontak tipe PB di daerah endemik kusta ($p=0,483$). Hasil penelitian yang dilaporkan Rahimah (2004) bahwa tidak ada hubungan antara hasil PCR pada penderita kusta dan hasil pemeriksaan PCR pada narakontak. Penularan penyakit kusta belum sepenuhnya terungkap, tapi pada saat ini masih diyakini manusia sebagai sumber penularan *Mycobacterium leprae* yang utama, khususnya penderita kusta tipe lepromatosa yang sangat infeksius.^{11,12,14} Menurut Davey dan Ress¹³ penderita kusta mampu mengeluarkan 10 juta organisme per hari. *Mycobacterium leprae* dari sekresi mukosa nasal mampu hidup sampai 9 hari.¹¹

Hidung merupakan tempat keluarnya *Mycobacterium 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 banyak ditemukan *Mycobacterium leprae* pada rongga hidung nara kontak atau orang sehat karena tiap hari mereka terpapar dengan kuman di daerah tersebut.

Daftar Pustaka

1. Departemen Kesehatan RI.. *Pelaksanaan Program Leprosy Elimination Campaign di Indonesia*. Direktorat Jenderal PPM dan PPLP. Jakarta. 1999
2. Agusni, I.. 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. 1997
3. Hernani CH.. Situasi Kusta di Indonesia. *Symposium Kusta. Konas X PERDOSKI*. Subdit P2 Kusta Depkes RI. Medan. 2002
4. Departemen Kesehatan RI.. *Data Subdit Kusta*. Direktorat Jenderal PPM dan PPLP. Jakarta. 2001
5. Dinas Kesehatan Jawa Timur. *Laporan Kusta Tahun 2004*. Dinkes Jatim. Surabaya. 2005
6. Izumi, S; Budiawan T; Sacki, K ;Matsuoka, M; Kawatsu, K.. An Epidemiological Study on *Mycobacterium leprae* Infection and Prevalence of Leprosy in Endemic Villages by Molecular Biological Technique. *Indian J. Lepr*. 1999; 7: 37-43.
7. Agusni, I, . Penyakit Kusta Penyakit Tua dengan Segudang Misteri. *Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar* dalam Bidang Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, 2003
8. Tsai, YL. and Rochelle, PA. Extraction of Nucleid Acid from Environmental Samples.

9. In: Rochelle, PA (eds). *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Application*. California: Hirizon, Scientific Press.. 2001: 15-30.
10. Hugenholtz, P and Goebel, BM. The Polymerase Chain Reaction as a Toll investigate Microbiol Diversity in Environmental Sample. In Rochelle, PA (eds). *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Application* California: Horizon Scientific Press. 2001: 31-41.
11. Iswahyudi; Adriaty, D; Wahyuni, R; Widayati, E; Mudatsir; Agusni, Izumi, S. The profile of subclinical leprosy among household contacts a sero-epidemiological study in correlation with the family relationship. *Buku Abstrak. Disampaikan pada Kongres Nasional Perhimpunan Dokter Spesialis Kulit dan Kelamin (PERDOSKI)* di Jakarta. 2005
12. Noordeen, SK.. The Epidemiology of Leprosy. In: Hastings,RC. *Leprosy*. Churchil Livingstone. Edinburg. 1994: 29-43
13. Cree, IA dan Smit WC. Leprosy Transmission and Mucosal Immunity: Towards Eradication?. *Lepr Rev.* 1998: 69: 112-121.
14. Rees, RJW; Young, DB. The Microbiology of Leprosy. In: Hastings,RC. *Leprosy*. ChurchilLivingstone. Edinburg. 1994: 47-98.
15. Meima A; Gupte MD; Oortmerssen GJV dan Habbema JFD.. Simulation Model for Leprosy Transmission and Control. *Int. J. Lepr.* 1999: 67: 215-230.