

**DETEKSI LEPTOSPIRA PATOGEN DENGAN METODE  
POLYMERASE CHAIN REACTION PADA URIN ORANG RISIKO  
TINGGI INFEKSI LEPTOSPIRA DI MAKASSAR**

***PATHOGENIC LEPTOSPIRA DETECTION USING  
POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD IN URINE  
SAMPLES OF LEPTOSPIRAL HIGHLY-RISK-INFECTED  
PEOPLE IN MAKASSAR***

**LISA TENRIESA M.**



**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI KLINIK  
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**DETEKSI LEPTOSPIRA PATOGEN DENGAN METODE  
POLYMERASE CHAIN REACTION PADA URIN ORANG RISIKO  
TINGGI INFEKSI LEPTOSPIRA DI MAKASSAR**

**Tesis**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar  
Spesialis Mikrobiologi Klinik**

**Program Studi**

**Pendidikan Dokter Spesialis-1 Mikrobiologi Klinik**

**Disusun dan diajukan oleh**

**Lisa Tenriesa M.**

**Kepada**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

TESIS

DETEKSI LEPTOSPIRA PATOGEN DENGAN METODE POLYMERASE  
CHAIN REACTION PADA URIN ORANG RISIKO TINGGI INFEKSI  
LEPTOSPIRA DI MAKASSAR

Disusun dan diajukan oleh

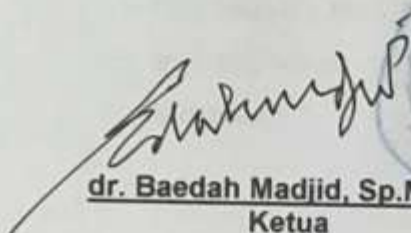
LISA TENRIESA M.  
Nomor Pokok C119216201

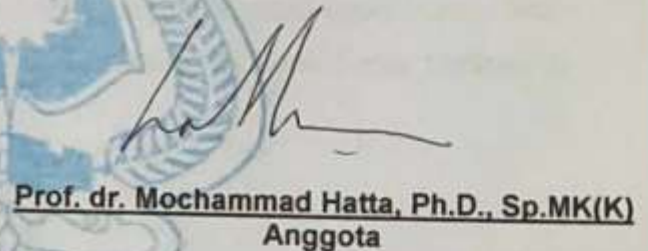
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Spesialis Program Studi Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 16 Juni 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan



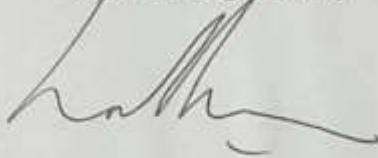
Menyetujui,

Komisi Penasihat,

  
dr. Baedah Madjid, Sp.MK(K)  
Ketua

  
Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK(K)  
Anggota

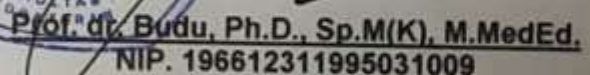
Ketua Program Studi  
Mikrobiologi Klinik,



Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK(K)  
NIP. 19570416 198503 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin,



  
Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.MedEd.  
NIP. 196612311995031009

## PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Lisa Tenriesa  
No. Stambuk : C119216201  
Program Studi : Mikrobiologi Klinik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 03 Agustus 2021

Yang menyatakan,



Lisa Tenriesa

## **PRAKATA**

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa dengan selesainya tesis ini.

Penelitian ini diawali dengan minat penulis terhadap penelitian mengenai bakteri zoonotik terutama leptospira patogen dan setelah mengamati masih minimnya informasi kasus khususnya pada komunitas yang rentan untuk terinfeksi oleh bakteri tersebut di Makassar. Komunitas yang rentan ini, ditambah dengan tingkat sosioekonominya yang rendah menyebabkan minimnya akses terhadap fasilitas pelayanan kesehatan. Untuk itu, deteksi kasus zoonotik ini diharapkan dapat memberi informasi kepada pihak-pihak terkait dalam hal pencegahan, penegakan diagnosis dan penanganannya.

Banyak kendala yang dihadapi oleh penulis dalam rangka penyusunan tesis ini, namun oleh bantuan berbagai pihak maka tesis ini dapat penulis selesaikan. Untuk itu, penulis ingin menyampaikan banyak terima kasih kepada dr. Baedah Madjid, Sp.MK(K) sebagai Ketua Komisi Penasihat dan Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D., Sp.MK(K) sebagai Anggota Komisi Penasihat atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan mulai dari pengembangan minat terhadap penelitian ini, pelaksanaan hingga penulisan tesis ini. Terima kasih juga kami sampaikan kepada seluruh Camat sekota Makassar atas izin dan kerjasama yang diberikan pada saat penelitian di lapangan.

Rasa terima kasih penulis sampaikan kepada orang tua, suami dan anak-anak tercinta yang telah sabar dan memberikan dukungan penuh selama menjalani pendidikan hingga akhirnya dapat menyelesaikan tesis ini. Tak lupa pula terima kasih penulis kepada berbagai pihak yang tidak tercantum namanya namun turut memberikan bantuan dan dukungan dalam menyelesaikan tesis ini.

Makassar, 16 Juni 2021

Lisa Tenriesa M.

## ABSTRAK

**LISA TENRIESA.** *Deteksi Leptospira Patogen Dengan Metode Polymerase Chain Reaction Pada Urin Orang Risiko Tinggi Infeksi Leptospira di Makassar* (dibimbing oleh Baedah Madjid dan Mochammad Hatta)

Sulawesi Selatan merupakan salah satu pulau di Indonesia dengan iklim penghujan dan dapat mengalami banjir setiap tahunnya. Selama bencana tahunan ini, leptospirosis sebagai salah satu penyakit infeksi tropis dapat mengalami peningkatan di wilayah perkotaan dengan sanitasi lingkungan yang minim. Meskipun kasus ini dapat ditemukan setiap tahun, belum ada data terpublikasi mengenai agen patogen dan sumber transmisinya di wilayah ini. Untuk itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan gambaran mengenai transmisi *Leptospira* patogenik pada populasi sehat yang rentan di Makassar.

Peneliti melakukan uji deteksi molekuler pada 86 sampel urin dengan mendeteksi gen *flaB* dari *Leptospira*. Partisipan dikelompokkan berdasarkan usia, tingkat pendidikan dan lama bekerja sebagai petugas drainase. Hasil positif didapatkan pada satu sampel yang telah bekerja selama 6 tahun dan menyatakan tidak ada gejala sakit ataupun dalam perawatan selama kurun waktu 1 tahun terakhir. Penelitian ini menggambarkan kasus pertama dari karier asimtomatik dengan varian flagelin baru dari *Leptospira interrogans* pada orang sehat dengan risiko tinggi.

Kata kunci: *Leptospira interrogans*, leptospirosis asimtomatik, flagellin

## ABSTRACT

**LISA TENRIESA.** *Pathogenic Leptospira Detection Using Polymerase Chain Reaction Method In Urine Samples Of Leptospiral Highly-Risk-Infected People In Makassar* (Supervised by Baedah Madjid and Mochammad Hatta)

South Sulawesi is part of island in Indonesia with yearly rainy season and flood. This gave an impact to the increasing of leptospirosis as one of the tropical infection related to the environment especially those with minimal sanitary installation. Eventhough leptospirosis may occur annually, data related to pathogen and transmission source in this area has not yet been published. Thus, in this study we described pathogenic leptospira transmission among healthy group with high risk of infection in Makassar.

We conducted molecular detection in 86 urine samples to detect *flaB* gene. Participants were grouped based on age, education and working span. Positif result was found on one sampel of participant with 6 years of working span and stated no symptoms of leptospirosis and hospitalization within the last one year. This study described a first case of asymptomatic case with a new flagellin variant of *Leptospira interrogans* in healthy person with high risk vocation.

Keywords: *Leptospira interrogans*, asymptomatic leptospirosis, flagellin

# DAFTAR ISI

<b>PRAKATA</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>VI</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>X</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>XI</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>XII</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>XIII</b>
<b>BAB I</b> .....	<b>1</b>
PENDAHULUAN .....	1
A. <i>LATAR BELAKANG</i> .....	1
B. <i>RUMUSAN MASALAH/ PERTANYAAN PENELITIAN</i> .....	3
C. <i>TUJUAN PENELITIAN</i> .....	4
D. <i>MANFAAT PENELITIAN</i> .....	4
<b>BAB II</b> .....	<b>5</b>
TINJAUAN PUSTAKA .....	5
A. <i>EPIDEMIOLOGI</i> .....	5
B. <i>LEPTOSPIRA PENYEBAB LEPTOSPIROSIS</i> .....	7
C. <i>PATOGENESIS LEPTOSPIROSIS</i> .....	12
D. <i>GAMBARAN KLINIS INFEKSI LEPTOSPIRA</i> .....	15
E. <i>METODE DETEKSI LEPTOSPIRA</i> .....	16
F. <i>KERANGKA TEORI</i> .....	22
G. <i>KERANGKA KONSEP</i> .....	22
<b>BAB III</b> .....	<b>23</b>



METODE PENELITIAN .....	23
A. RANCANGAN PENELITIAN.....	23
B. WAKTU DAN LOKASI PENELITIAN .....	23
C. POPULASI DAN SAMPEL .....	23
D. TEKNIK PENGUMPULAN DATA .....	24
E. DEFINISI OPERASIONAL.....	29
F. IZIN PENELITIAN DAN ETHICAL CLEARANCE .....	29
G. TEKNIK ANALISIS .....	30
H. ALUR PENELITIAN.....	31
<b>BAB IV .....</b>	<b>32</b>
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	32
A. HASIL PENELITIAN.....	32
a. <i>Distribusi partisipan</i> .....	32
b. <i>Deteksi gen flaB dari Leptospira interrogans pada sampel urin</i> .....	33
c. <i>Sekuensing gen flagelin</i> .....	33
B. PEMBAHASAN.....	36
<b>BAB VI .....</b>	<b>43</b>
KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>44</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>58</b>
LAMPIRAN 1. REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK .....	58
LAMPIRAN 2. NASKAH PENJELASAN PADA SUBJEK .....	59
LAMPIRAN 3. FORMULIR PERSETUJUAN MENGIKUTI PENELITIAN .....	60
LAMPIRAN 4. FORMULIR PENELITIAN.....	61
LAMPIRAN 5. DATA .....	64

## DAFTAR TABEL

<b>Nomor</b>		<b>Halaman</b>
1.	Klasifikasi dari spesies <i>Leptospira</i>	12
2.	Serovar pada hewan reservoir	13
3.	Distribusi partisipan	33

## DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Pola siklus transmisi leptospira pada hewan reservoir, manusia dan lingkungan	6
2.	Identifikasi gen <i>flaB</i> pada PCR	34
3.	<i>Phylogenetic tree</i> dari sampel PCR positif	35
4.	Perbedaan hasil urutan nukleotida	35

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Nomor</b>		<b>Halaman</b>
1.	Rekomendasi persetujuan etik	59
2.	Naskah penjelasan pada subjek	60
3.	Formulir persetujuan	61
4.	Formulir penelitian	62
5.	Curriculum Vitae	65

## DAFTAR SINGKATAN

AKI	Acute Kidney Injury
BSA	Bovine Serum Albumin
C4BP	C4 Binding Protein
DNA	Dioxyribonucleic Acid
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbant Assay
FUO	Fever of Unknown Origin
IM	Inner Membrane
LPS	Lipopolisakarida
MAT	Microscopic Agglutination Test
OM	Outer Membrane
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polimorfism
TBE	Tris/Borate/EDTA
WHO	World Health Organization

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. LATAR BELAKANG**

Leptospirosis merupakan penyakit infeksi bakteri yang dikenal secara awam sebagai penyakit “kencing tikus”. Hal ini disebabkan oleh kemampuan bakteri ini untuk menetap dalam ginjal tikus dan terekskresi bersama urin dan mencemari lingkungan. Penelitian terhadap tikus yang diinfeksi dengan bakteri ini menunjukkan bahwa infeksi yang terjadi tidak menimbulkan gejala namun tikus tersebut mampu untuk mengekskresikannya di dalam urin hingga sejumlah  $10^7$  leptospira/ mL. Penyebaran bakteri *Leptospira* melalui urin tikus dan hewan reservoir lainnya memudahkan bakteri ini untuk dapat menginfeksi mamalia termasuk manusia. Selain pada hewan, penelitian sebelumnya (Ganoza et al., 2010) juga menemukan bahwa *Leptospira* mampu berkolonisasi dalam ginjal manusia tanpa menimbulkan gejala sehingga bakteri ini akan terus berada dalam lingkungan dan menyebar pada pejamu lainnya.

Hingga saat ini terdapat lebih dari 300 serovar dari 25 serogroup leptospira patogen yang berbeda. Selain dapat disebarkan oleh tikus, juga dapat disebarkan oleh hewan peliharaan seperti anjing, kucing dan ternak. Bahkan penelitian lain juga menemukan adanya leptospira patogen pada katak, penyu dan kelelawar.

Menurut WHO terdapat orang-orang dengan risiko tinggi terinfeksi leptospira terkait luasnya paparan terhadap bakteri ini oleh karena pekerjaan atau profesi tertentu. Karena leptospirosis diketahui sebagai penyakit infeksi oleh leptospira dengan perantara hewan (zoonosis), umumnya mereka yang memiliki risiko tinggi terinfeksi adalah mereka yang memiliki kontak langsung maupun tak langsung dengan urin

hewan yang terinfeksi maupun melalui lingkungan yang tercemar oleh bakteri ini. Para petugas drainase, peternak, pekerja jagal hewan, petani, bahkan dokter hewan memiliki risiko tinggi untuk terinfeksi leptospira.

Selain dikenal sebagai penyakit zoonosis, leptospirosis juga diyakini sebagai penyakit yang berkaitan dengan rekreasi yang berkontak dengan air tercemar. Kasus seperti ini pernah ditemukan di Jepang tahun 2005. Saat itu, sebanyak 14 orang didiagnosis dengan Leptospirosis dan memerlukan perawatan di rumah sakit.

Wilayah Asia Tenggara merupakan daerah endemik leptospirosis. Data *WHO South-East Asia Region* menunjukkan sebanyak 0.1-1 kasus leptospirosis per 100.000 penduduk setiap tahunnya di daerah beriklim panas dan meningkat hingga 10-100 kasus per 100.000 penduduk di daerah dengan kelembaban tinggi. Bahkan insidensi ini dapat meningkat hingga lebih dari 100 per 100.000 penduduk pada saat outbreak dan pada kelompok dengan paparan tinggi.

Di Indonesia, pada Januari 2002 terjadi outbreak yang disebabkan oleh terjadinya banjir besar di Jakarta. Di tahun 2007, 93% dari 667 kasus leptospirosis pada manusia dapat dikonfirmasi secara laboratorik dimana tingkat kematian penderita mencapai 8%. Selain itu, pada 3 bulan pertama di tahun 2008 ditemukan leptospirosis sebanyak 269 kasus. (Kemenkes RI, 2017; Victoriano et al., 2009)

Walaupun angka insidensi leptospirosis cukup tinggi, penyakit ini justru dikenal sebagai *emerging neglected disease*, yang berarti bahwa penyakit ini kurang mendapat perhatian meskipun dampak yang ditimbulkan terhadap kesehatan baik individu maupun masyarakat cukup besar. Kasus leptospirosis yang masuk dalam penanganan di rumah sakit umumnya adalah pasien dengan Weil's disease yakni kondisi dimana pasien sudah mengalami gangguan berat pada hati, paru dan ginjal.

Bahkan, terdapat laporan kasus di India yang menunjukkan adanya infeksi bakteri ini pada otak.

Kementerian Kesehatan melaporkan sebanyak 895 kasus di Indonesia yang terjadi sepanjang tahun 2018 dengan *case fatality rate* mencapai 17,8%. Hal ini disinyalir karena masih banyaknya dokter yang tidak familiar dengan gejala klinis dari leptospirosis yang bersifat tidak spesifik ditambah dengan kecurigaan umum terhadap dengue dan demam tifoid yang lebih umum terjadi di Indonesia.

Penelitian mengenai leptospira saat ini lebih banyak dilakukan di pulau Jawa. Semarang mencatat angka kejadian sebesar 1,2 dari 100.000 penduduk dan dilaporkan pada pertemuan *International Leptospirosis Society* tahun 2000. Kurangnya penelitian mengenai bakteri ini maupun penelitian mengenai besarnya angka kejadian leptospirosis pada manusia khususnya di Makassar menjadi perhatian peneliti untuk mengetahui lebih lanjut mengenai insidensi penyakit ini, utamanya peran orang-orang dengan risiko tinggi terinfeksi leptospira yang asimtomatik dalam hal penyebaran bakteri ini ke lingkungan. Oleh karena itu, penelitian ini akan menjadi data awal mengenai adanya infeksi bakteri *Leptospira* asimtomatik pada orang-orang di wilayah Makassar yang memiliki risiko tinggi terinfeksi.

## **B. RUMUSAN MASALAH/ PERTANYAAN PENELITIAN**

Penelitian ini bertujuan untuk menjawab pertanyaan apakah terdapat leptospira patogenik yang diekskresikan melalui urin pada orang yang berisiko tinggi terinfeksi leptospira di Kota Makassar.



## **C. TUJUAN PENELITIAN**

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mendeteksi adanya leptospira patogenik dalam urin orang berisiko tinggi terinfeksi leptospira di Kota Makassar.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Mendeteksi gen *flaB* sebagai salah satu penanda molekuler leptospira patogen dari urin pekerja drainase di Kota Makassar

## **D. MANFAAT PENELITIAN**

### 1.4.1 Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan data mengenai insidensi leptospirosis asimtomatik pada orang berisiko tinggi terinfeksi leptospira dari kalangan pekerja drainase di Kota Makassar.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat menjadi dasar dilakukannya skrining pada kelompok dengan risiko tinggi terinfeksi leptospira.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

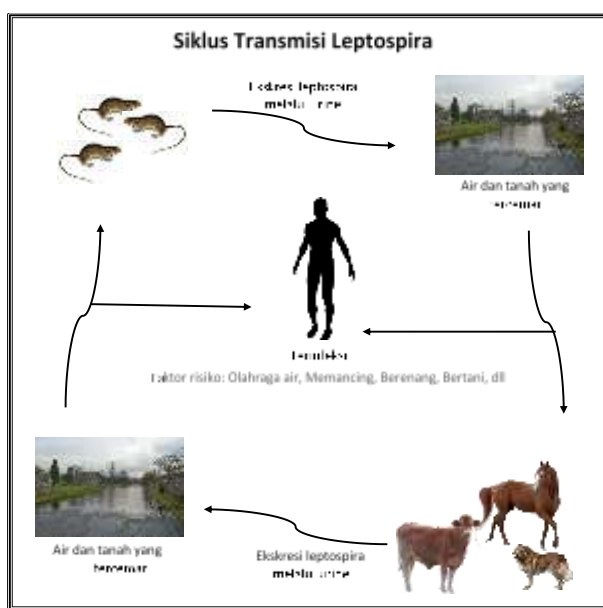
#### **A. EPIDEMIOLOGI**

Leptospirosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Leptospira* patogenik. Secara primer merupakan penyakit zoonosis dan manusia merupakan pejamu insidental. Penyakit ini dapat menjangkiti siapa saja yang memiliki kontak dengan hewan terinfeksi atau lingkungan yang tercemar oleh bakteri tersebut. (Haake and Levett, 2015; Levett and Levett, 2001)

Leptospirosis menyebabkan lebih dari 1 juta kasus dengan mencapai 60.000 kematian per tahunnya. Penyakit ini diketahui sebagai *emerging neglected disease* karena di negara-negara berkembang sistem surveilans mengenai penyakit ini sangat terbatas. Di beberapa negara Afrika, jumlah kasus leptospirosis meningkat secara signifikan pada proporsi penyakit non malaria. (Picardeau, 2015)

Untuk mencegah outbreak, sistem surveilans merupakan metode yang efektif dari segi kesehatan masyarakat. Akan tetapi, sistem ini justru lebih banyak dilaksanakan oleh negara-negara maju yang ditunjang dengan fasilitas laboratorium yang memadai dimana kasus leptospirosis jarang ditemukan. Sementara itu, negara berkembang memiliki kelemahan berupa kurangnya data secara klinis, epidemiologis maupun laboratoris yang berdampak pada sulitnya menegakkan kasus leptospirosis. (Victoriano et al., 2009) Padahal, WHO *South-East Asia Region* menggambarkan bahwa peningkatan insidensi dapat mencapai 100 kali pada orang yang berisiko tinggi. (World Health Organization, 2009)

Tinjauan beberapa publikasi di tahun 1970 sampai 2008 (Mwachui et al., 2015) menggambarkan bahwa Asia dan daerah kepulauan mengalami peningkatan risiko terjadinya leptospirosis pada musim penghujan dan banjir. Selain itu, data ini juga mengungkap bahwa di negara berkembang aktivitas rekreasi yang berhubungan dengan air memiliki keterkaitan dengan tingginya kasus tersebut. Bahkan penelitian tersebut menyatakan lokasi dengan paparan terhadap tikus dan hewan ternak



merupakan faktor risiko penting yang menandakan perlunya intervensi. (Mwachui et al., 2015) Pola transmisi bakteri ini pada hewan reservoir, manusia dan lingkungan dapat dilihat pada gambar 1.

**Gambar 1.** Pola siklus transmisi leptospira pada hewan reservoir,

manusia dan lingkungan.

Laporan di Indonesia mengenai tingkat kecacatan yang ditimbulkan oleh leptospirosis tercatat mencapai 39,2 per 100.000 penduduk per tahun (Costa et al., 2015). Bahkan pada tahun 2018, Kementerian Kesehatan mencatat *case fatality rate* sebesar 17,8% pada 895 kasus infeksi ini pada manusia. (Gasem et al., 2020; Primadi and Budijanto, 2018) Angka ini lebih tinggi dibandingkan kasus pada tahun 2011 (766 kasus) dengan 72 kasus kematian. (Suryani et al., 2016)

Ambekar, dkk (2004) melakukan uji Microscopic Agglutination Test (MAT) pada 78 orang pekerja drainase dan mendapatkan hasil seroprevalence positif sebesar 16,6% (n = 13) dan yang paling umum adalah dari serovar Autumnalis. (Ambekar et

al., 2004) Serovar ini merupakan bagian dari spesies *L. interrogans* yang menunjukkan manifestasi gambaran klinis berupa ikterus, perdarahan subkutan dan perdarahan pulmoner tanpa gangguan lesi pada ginjal. (Xia et al., 2017)

## **B. LEPTOSPIRA PENYEBAB LEPTOSPIROSIS**

Leptospira merupakan bakteri bentuk spiral, *spirocheta*, yang memiliki ukuran lebar 0,1 – 0,2  $\mu\text{m}$  dan panjang 5 – 15  $\mu\text{m}$  serta bagian ujung yang menyerupai kail (C. Carroll et al., 2016; Fraga et al., 2015). Bentuknya yang ramping dan berulir menyebabkan bakteri ini tidak dapat diwarnai dengan pewarnaan yang umum digunakan pada pemeriksaan laboratorium rutin (Patricia et al., 2014) walaupun secara struktural dinding selnya menyerupai bakteri Gram-negatif (Picardeau, 2017). Oleh karena itu, bakteri ini hanya mampu diamati di bawah mikroskop khusus, yaitu *darkfield microscope*, untuk observasi langsung (Bharti et al., 2003; World Health Organization, 2003). Namun, pemeriksaan ini bukan merupakan pemeriksaan yang rutin dilakukan karena dianggap hasilnya masih meragukan walaupun dikerjakan oleh pakar sekalipun (World Health Organization, 2003).

### 2.2.1 Struktur Leptospira patogen

Struktur bakteri ini dari lapisan paling luar ke bagian dalam terdiri atas *outer membrane/* membran luar (OM), ruang periplasmik, peptidoglikan dan *inner membrane/* membran sitoplasma (IM). Membran luar (OM) tersusun atas fosfolipid, lipopolisakarida (LPS), protein permukaan/ lipoprotein (LigA, LigB, LenA, LenB, Loa22) dan protein *transmembrane* (Outer membrane protein, Omp) (OmpL1). Selain itu juga terdapat protein *subsurface* LipL (LipL32, LipL21, LipL45, LipL31, LipL36, LipL41, LipL71) (Cameron, 2015; Fraga et al., 2015; Levett, 2015; Nally et al., 2007). Komponen protein tersebut telah banyak digunakan dalam metode diagnostik

serologis dengan perannya masing-masing pada pathogenesis infeksi (Veerapandian and Natarajaseenivasan, 2013).

Komponen dinding sel LPS memiliki aktifitas endotoksik yang lebih rendah. Variasi yang terdapat pada antigen-O dari komponen inilah yang menyebabkan perbedaan antigenik di antara serovar yang ada (Faisal et al., 2012). LPS merupakan komponen utama dari OM yang berkontribusi terhadap integritasnya (Fraga et al., 2015).

OMP memiliki peran dalam perlekatan (OmpL37 terikat pada matriks ekstraseluler), reseptor untuk bakteriofag, induksi jalur transduksi sinyal, menginduksi imunitas dan berperan dalam resistensi antimikroba. (Veerapandian and Natarajaseenivasan, 2013) Lipoprotein terbanyak, 75% dari protein OM, adalah LipL32. Diketahui bahwa protein ini berperan sebagai *hemolysis-associated protein* (*Hap-1*), bertumpu pada OM melalui asam lemak yang terikat pada residu sistein, terikat pada matriks ekstraseluler, dan dominasinya pada leptospira patogen. (Haake et al., 2000) Peningkatan stabilitas terhadap suhu dan modulasi ikatan dengan fibronektin terjadi apabila protein ini terikat dengan kalsium. (Veerapandian and Natarajaseenivasan, 2013)

Leptospira patogen diketahui memiliki perbedaan dengan leptospira saprofit berdasarkan kerentanannya terhadap komplemen di dalam serum. Pada leptospira pathogen, terdapat faktor *H-binding protein* berukuran 25- dan 50-kDa dan juga *laminin binding adhesin* (*Lsa24/ leptospiral surface adhesin* 24-kDa). Faktor *H-binding protein* berukuran 25-kDa disebut juga LfhA (*leptospiral factor H-binding protein*) (Haake and Zuckert, 2014) Kedua faktor tersebut dikenal sebagai LenA karena strukturnya serupa dengan endostatin. Komponen protein ini membantu leptospira lepas atau berpenetrasi pada bekuan fibrin.

Motilitas bakteri leptospira dibantu oleh adanya struktur flagella dengan struktur yang unik. Tidak seperti pada bakteri lainnya, flagella leptospira dalam periplasmik sehingga dinamakan endoflagella. Fungsinya penting untuk meningkatkan kemampuan bakteri ini bertahan dalam lingkungan dengan viskositas yang tinggi. Struktur ini juga membantu dalam invasi bakteri ke dalam jaringan. (Cameron, 2015)

Struktur flagella dari golongan spirocheta terdiri atas FlaB pada bagian inti dan FlaA sebagai protein pembungkus pada bagian luarnya. Gen yang menentukan kedua protein tersebut berupa gen *flaB* dan gen *flaA*. Pada leptospira terdapat 4 gen *flaB* dan 2 gen *flaA*. (Lambert et al., 2012) Berdasarkan penelitian menggunakan analisis PCR-RFLP, gen *flaB* hanya dapat dideteksi pada *Leptospira* patogenik dan tidak pada *Leptospira* non patogenik. (Krishna et al., 2008) Ini juga dibuktikan oleh penelitian di India yang membandingkannya dengan primer lain untuk mendeteksi *Leptospira* patogenik dari sampel darah dan urin manusia, ginjal tikus, urin sapi, darah anjing dan sampel air. (Natarajaseenivasan et al., 2010)

### 2.2.2 Klasifikasi Leptospira

*Leptospira* terbagi atas 3 kelompok (saprofitik, intermedit dan patogenik) Kelompok saprofit yang dapat ditemukan di lingkungan dan kelompok patogen yang akan menginfeksi hewan maupun manusia. Beban penyakit yang diakibatkan oleh kelompok intermedit masih belum jelas sedangkan kelompok patogenik sudah jelas menyebabkan variasi gambaran penyakit ringan hingga berat.

Sirkulasi leptospira patogenik di lingkungan oleh karena tercemar dari urin hewan terutama hewan reservoir atau pejamu. Hewan yang paling sering menjadi pejamu tikus terutama species *Rattus norvegicus*. (World Health Organization, 2003) Spesies ini bahkan digunakan sebagai hewan coba untuk meneliti infeksi kronik.

(Cordonin et al., 2020) Penelitian lain juga mendapatkan adanya leptospira yang menginfeksi hewan peliharaan seperti anjing dan kucing serta pada ternak. (Llewellyn et al., 2016; Loureiro et al., 2016; Rodriguez et al., 2014) Selain itu, bakteri ini juga terbukti menginfeksi katak, penyu dan kelelawar.(Gomard et al., 2016; Martel et al., 2013; Silva et al., 2016)

Cakupan klasifikasi dari spesies *Leptospira* dapat dilihat pada tabel 1. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=171>, n.d.; Levett and Haake, 2010; Marquez et al., 2017; Morey et al., 2006; Picardeau, 2017)

<b>Kelompok</b>	<b>Spesies</b>	<b>Serovar</b>
Leptospira patogenik		
Subgroup I	<i>L. interrogans</i>	<i>autumnalis*</i> , <i>balico</i> , <i>ballum*</i> , <i>bangkinang</i> , <i>bangkok</i> , <i>bataviae</i> , <i>benjamini</i> , <i>biggis</i> , <i>bim</i> , <i>bindjei</i> , <i>birkini</i> , <i>bratislava</i> , <i>broomi</i> , <i>budapest</i> , <i>buenos aires</i> , <i>bulgarica</i> , <i>camlo</i> , <i>canicola</i> , <i>carlos</i> , <i>celledoni</i> , <i>copenhageni</i> , <i>copenhageni/icterohaemorrhagiae</i> , <i>djasiman</i> , <i>fortbragg</i> , <i>fugis</i> , <i>gem</i> , <i>geyaweera</i> , <i>grippotyphosa*</i> , <i>gurungi</i> , <i>haemolytica</i> , <i>hardjo*</i> , <i>hawain</i> , <i>hebdomadis*</i> , <i>ictero</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>ih cfl</i> , <i>jalna</i> , <i>javanica</i> , <i>jonsis</i> , <i>kennewicki</i> , <i>kirikkale</i> , <i>kremastos</i> , <i>kuwait</i> , <i>lai</i> , <i>lin</i> , <i>linhai</i> , <i>lora</i> , <i>malaya*</i> , <i>manhao2*</i> , <i>manilae</i> , <i>mankarso</i> , <i>medanensis</i> , <i>mini</i> , <i>monjakov</i> , <i>montevalerio</i> , <i>mooris</i> , <i>muelleri</i> , <i>muenchen</i> , <i>mujunkunmi</i> , <i>naam</i> , <i>nanla</i> , <i>new</i> , <i>paidjan</i> , <i>panama*</i> , <i>perameles</i> , <i>pomona*</i> , <i>portlandvere</i> , <i>pyrogenes</i> , <i>rachmati</i> , <i>ranarum*</i> , <i>ricardi</i> , <i>robinsoni</i> , <i>roumanica</i> , <i>saxkoebing</i> , <i>schueffneri</i> , <i>sejroe*</i> , <i>sentot</i> , <i>serjoe hardjo</i> , <i>szwajizak</i> , <i>tarassovi</i> , <i>valbuzzi</i> , <i>weerasinghe</i> , <i>wolffi*</i> , <i>zanoni</i>
	<i>L. kirschneri</i>	<i>agogo</i> , <i>altodouro</i> , <i>bafani</i> , <i>bim</i> , <i>bogvere</i> , <i>bulgarica</i> , <i>butembo</i> , <i>cynopteri</i> , <i>djatzi</i> , <i>erinaceiauriti</i> , <i>galtoni</i> , <i>grippotyphosa*</i> , <i>kabura</i> , <i>kambale</i> , <i>kamituga</i> , <i>kunming</i> , <i>lambwe</i> , <i>mozdok</i> , <i>mwogolo</i> ,

		<i>ndahambukuje, ndambari, pomona*, ramisi, ratnapura, sokoine, tsaratsovo, valbuzzi, vanderhoedeni, wumalasena</i>
	<i>L. noguchii</i>	<i>argentiniensis, australis, autumnalis*, carimagua, claytoni, cristobali, fortbragg, huallaga, louisiana, nicaragua, orleans, panama*, pomona*, proechymis, pyrogenes, saigon</i>
Subgroup II	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>arborea, balcanica, ballum*, castellonis, ceylonica, dikkeni, hardjo*, hardjovovis, istrica, javanica, jules, kenya, kisuba, kwale, mini, moldaviae, nero, nyanza, pina, piyanesa, poi, polonica, pomona*, saxkoebing, sejroe*, sorexjalna, srebarna, tarassovi, tunis, whitticombi, wolffi*, worsfoldi,</i>
	<i>L. santarosai</i>	<i>alexi, alice, arenal, athafalaya, atlantae, badudieri, bagua, bakeri, balboa, bananal, beye, borincana, brasiliensis, canalzonae, cenepa, darien, fluminense, gatuni, georgia, golano, gorgas, grippotyphosa*, guaricura, kobbe, maru, naparuca, navet, princestoewn, rama, recreo, rio, rioja, ruparupae, sanmartini, sarmin, sejroe*, shermani, szwajizak, tabaquite, trinidad, tropica, varela, vargonicas, weaver</i>
	<i>L. mayottensis</i>	
	<i>L. alexanderi</i>	<i>hebdomadis*, javanica, lichuan, manhao3, manzhuang, mengla, nanding</i>
	<i>L. weilii</i>	<i>celledoni, coxi, hebdomadis*, hekou, heyan, langati, manhao2*, menglian, mengma, mengrum, mogden, qingshui, ranarum*, sarmin, topaz, vughia</i>
Subgroup III	<i>L. alstonii</i>	<i>pingchang, sichuan</i>
Subgroup IV	<i>L. kmetyi</i>	<i>malaya*</i>
<i>Leptospira intermediate</i>		
	<i>L. inadai</i>	<i>aguaruna, kaup, lyme, malaya*</i>
	<i>L. broomi</i>	<i>hurstbridge*</i>
	<i>L. fainei</i>	<i>hurtsbridge*</i>
	<i>L. licerasiae</i>	<i>varillal</i>
	<i>L. wolffii</i>	<i>khorat</i>
<i>Leptospira saprofitik</i>		
	<i>L. biflexa</i>	<i>ancona, andamana, canela, jequitaia, monteralerio, patoc</i>
	<i>L. yanagawae</i>	<i>saopaulo</i>
	<i>L. wolbachii</i>	<i>codice, gent</i>
	<i>L. terpstrae</i>	
	<i>L. vanthielii</i>	<i>holland</i>



<i>L. meyeri</i>	<i>hardjo*</i> , <i>ranarum*</i> , <i>semaranga</i> , <i>sofia</i>
<i>L. idonii</i>	

**Tabel 1.** Klasifikasi dari spesies *Leptospira*. \*serovar yang dapat ditemukan lintas spesies

Hewan yang menjadi pejamu utama serovar tertentu dari *Leptospira* adalah sebagai berikut: (Bharti et al., 2003)

**Tabel 2.** Serovar pada hewan reservoir.

<b>Hewan Reservoir</b>	<b>Serovar</b>
Tikus	<i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>copenhageni</i>
Ternak	<i>hardjo</i> , <i>Pomona</i>
Kuda	<i>bratislava</i>
Domba	<i>hardjo</i>
Mencit	<i>ballum</i> , <i>arborea</i> , <i>bim</i>
Anjing	<i>canicola</i>
Babi	<i>pomona</i> , <i>tarassovi</i>
Rakun	<i>grippotyphosa</i>
Marsupilami	<i>grippotyphosa</i>
Kelelawar	<i>cynopteri</i> , <i>wolffi</i>

### C. PATOGENESIS LEPTOSPIROSIS

Di dalam tubuh pejamu, patogenesis *leptospira* meliputi beberapa tahap berupa diseminasi (perlekatan, luput dari fagositosis dan jalur pengaktifan komplemen), kolonisasi persisten, manifestasi penyakit dan kerusakan jaringan. (Fraga et al., 2016; Veerapandian and Natarajaseenivasan, 2013)

*Port d'entry* dari bakteri *leptospira* adalah membran mukosa (konjungtiva atau cavum oris) ataupun melalui abrasi kulit maupun luka. (Arber, 2015; Picardeau, 2017) Namun terdapat pula kasus dimana jalur masuk bakteri tersebut melalui kontak seksual, laktasi maupun transplasenta meskipun kejadiannya sangat jarang. (Haake and Levett, 2015)

*Leptospira* masuk ke dalam tubuh pejamu dengan melakukan perlekatan dan membentuk pori. Perlekatannya dimediasi oleh protein permukaan pada bakteri yang berikatan dengan fibroblast, sel mikroglia, endotel dan epitel. (Cinco et al., 2006)

Beberapa protein adhesin membantu dalam perlekatan dengan matriks ekstraseluler baik secara spesifik pada komponen matriks tertentu seperti laminin (contohnya Lsa24/LfhA/LenA) maupun secara luas berikatan dengan matriks ekstraseluler lainnya. (Vieira et al., 2014)

Setelah melewati barrier mukosa, bakteri ini kemudian akan masuk ke dalam aliran darah dan menuju ke organ-organ vital. Periode inkubasi membutuhkan sekitar 5 – 14 hari dengan rentang yang dapat mencapai 2 – 30 hari. (Levett and Levett, 2001)

Demam merupakan gejala awal yang dapat timbul pada saat leptospira masuk ke dalam aliran darah dengan jumlah bakteri mencapai  $10^6$ / ml darah. Gejala awal dapat pula disertai dengan sakit kepala dan sembuh dengan sendirinya. (Arber, 2015; Chin et al., 2020) Meskipun jumlah bakteri  $> 10^4$ / ml memiliki kaitan dengan beratnya luaran penyakit, Agampodi dkk menyatakan bahwa rendahnya virulensi bakteri justru menyebabkan jumlahnya dapat meningkat dalam darah tanpa menyebabkan komplikasi yang lebih berat. (Agampodi et al., 2012; Merien et al., 2001; Segura et al., 2005) Menurut penelitian oleh Nair dkk, 2020, perbedaan dari rute infeksi juga mempengaruhi kemampuan kinetik dari bakteri untuk menyebar ke dalam tubuh dan berkolonisasi dan menyebabkan inflamasi pada ginjal. (Nair et al., 2020) Kolonisasi pada ginjal berlangsung pada minggu kedua sekitar 7 – 9 hari pasca infeksi.

*Leptospira* saprofitik sangat rentan terhadap aktivitas bakterisidal dari serum, berbeda dengan *Leptospira* patogenik. Salah satu mekanisme yang telah dipaparkan adalah melalui pengelakan terhadap mekanisme kerja komplemen. Di antara mekanisme tersebut yaitu pemanfaatan protein regulator yang digunakan untuk mekanisme aktivasi *complement pathway* (Faktor H pada jalur alternative, C4BP pada

jalur klasik, dan vitronectin pada aktivasi Membrane Attack Complex), penggunaan protease milik pejamu untuk memecah komplemen yang terikat pada permukaan leptospira, mensekresi protease yang langsung bekerja dalam menginaktivasi komplemen. (Fraga et al., 2016)

Infeksi leptospira dalam bentuk Weil's disease memiliki karakteristik perdarahan dan manifestasi kerusakan hepar dan ginjal. (Bharti et al., 2003) Ikterus merupakan manifestasi yang sangat penting walaupun mekanismenya belum begitu jelas. (Brito et al., 2018) Akan tetapi, Miyahara, dkk (2014) mengajukan kemungkinan kerusakan dari ikatan interseluler dari hepatosit oleh migrasi interseluler dari leptospira yang bertanggung jawab terhadap timbulnya gejala tersebut. (Miyahara et al., 2014)

Kerusakan pada paru-paru dan hepar, disebabkan oleh berkurangnya ekspresi dari cadherin. Ini berdampak pada kerusakan ikatan interseluler. Bahkan, pengikatan leptospira terhadap VE-cadherin pada sel endotel berakibat gangguan ikatan dari lapisan endotel dan menimbulkan manifestasi perdarahan. Pada paru-paru, terjadi peningkatan permeabilitas yang berakibat pada timbulnya edema selain perdarahan. (Brito et al., 2018)

Ginjal, terutama tubulus, yang merupakan organ *immune-privileged* menjadi organ target utama dari leptospira selama infeksi akut maupun kronik. Selain resistennya terhadap aktivasi komplemen melalui ikatan dan regulasi oleh protein permukaan (Len dan LcpA), perbedaan dalam ekspresi protein dan kemampuan down-regulasi antigen spesifik memfasilitasi bakteri ini untuk berkolonisasi dan persisten pada ginjal dan mampu menghindar dari kerja sistem imun. (Faisal et al., 2012; Xue et al., 2010) Melalui analisis eksosom urine pada tikus, terjadi peningkatan ekskresi aminopeptidase-N yang terdapat pada *brush border* dari tubulus proksimalis.

Selain itu, uromodulin yang terdapat pada loop of Henle asendens dan tubulus distalis mengalami penurunan. Hal ini mengasumsikan adanya kerusakan pada bagian tersebut. (Brito et al., 2018)

Sebesar 2,3 – 52,7% dari populasi berisiko akan mengalami perkembangan menjadi leptospirosis kronik apabila leptospira menetap pada lumen tubulus dan interstitium akibat *acute kidney injury* (AKI) atau kolonisasi asimtomatik. (Yang, 2018) Glycocalyx, komponen penting pada sel endotel dan bersifat antiadhesive dan antikoagulan, mengalami kerusakan pada AKI. (Brito et al., 2018)

#### **D. GAMBARAN KLINIS INFEKSI LEPTOSPIRA**

Pada saat onset gejala dari leptospirosis, kesalahan diagnosis yang sering timbul adalah meningitis aseptik, influenza, penyakit hepatik dan *fever of unknown origin* (FOU). (Budihal and Perwez, 2014) Hal ini disebabkan oleh variasi gejala yang sangat luas. Pada serial kasus yang sudah diteliti di berbagai negara dengan tingkat insidensi yang tinggi, variasi gejala dapat berupa ikterus, anoreksia, sakit kepala, suffusi konjungtiva, mual, muntah, nyeri perut, nyeri otot, nyeri sendi, dehidrasi, batuk, hemoptysis, hepatomegaly, limfadenopati, diare dan rash. (Levett and Haake, 2010) Walaupun leptospirosis merupakan kasus yang umum terjadi, diagnosis ini baru ditegakkan apabila terdapat gambaran klinis yang klasik mengarah pada *Weil's disease*, dengan gejala demam disertai ikterus, gagal ginjal dan perdarahan pulmoner . (Budihal and Perwez, 2014)

Gambaran klinis leptospira terdiri atas fase akut dan fase imun. Fase akut (fase septikemia) berlangsung selama seminggu. Pada fase ini leptospira dapat ditemukan dalam darah (leptospiremia) (Agampodi et al., 2012) sampai pejamu mengalami peningkatan respon imun dan mulai memasuki fase imun di minggu kedua. Keluhan yang sering didapatkan pada pasien selama fase akut adalah demam. Sekitar 5 – 15%

pasien akan mengalami fase dengan gejala yang memberat. Pada kondisi ini, Weil's disease menjadi gambaran yang akan tampak berupa icterus, gagal ginjal akut dan perdarahan organ. (Ko et al., 2009; Levett and Levett, 2001)

Gainger, dkk (2010) melaporkan adanya kasus leptospirosis berat pada wanita hamil dengan riwayat demam, nyeri perut, muntah, perdarahan gusi dan perdarahan subkonjungtiva sejak 2 hari sebelum dirawat di rumah sakit. Uji ELISA menunjukkan adanya IgM terhadap *Leptospira*. (Gainger et al., 2010)

Perkembangan dan progresivitas leptospirosis dipengaruhi oleh faktor kerentanan seseorang, dosis infeksi dan karakteristik virulensi dari strain penyebabnya. (Ko et al., 2009; Picardeau, 2017)

Variabilitas gejala yang tidak spesifik pada leptospirosis ditambah dengan kurangnya kewaspadaan klinisi serta penggunaan tes diagnostik yang kurang reliabel menyebabkan kasus ini sering salah diidentifikasi. Laporan mengenai infeksi asimtomatik umumnya ditemukan pada area endemik. Di Amazon, dilaporkan ada sekitar 4,1% dari 314 partisipan mengekskresikan leptospira pada urinnya yang dideteksi melalui penanda DNA meski mereka tidak memiliki gejala. (Ganoza et al., 2010)

## **E. METODE DETEKSI LEPTOSPIRA**

Ada beberapa metode yang dapat digunakan dalam mendeteksi infeksi leptospira. (Waggoner and Pinsky, 2016) Metode dapat berupa deteksi serologis, molekuler, maupun cara konvensional yaitu kultur bakteri.

### **2.5.1 Metode serologis**

Pemeriksaan serologis terhadap leptospira yang menjadi "*gold standard*" adalah pemeriksaan MAT. Hasil yang positif dapat ditemukan pada hari ke-5 sampai hari ke-10 setelah onset gejala. Pemeriksaan ini dilakukan

menggunakan mikroskop lapangan pandang gelap atau *dark field microscope* dengan mengamati reaksi antigen-antibodi yang memberikan gambaran aglutinasi putih. Namun pemeriksaan ini membutuhkan keterampilan dan dilakukan oleh orang yang berpengalaman atau terlatih. Selain itu, pemeriksaan ini perlu dilakukan dengan memperhatikan tehnik yang digunakan, serogroup yang dipakai, kronologis pengambilan sampel, hingga terapi antibiotik yang digunakan. (Goris and Hartskeerl, 2014; World Health Organization, 2003)

Beberapa strain telah digunakan dalam pemeriksaan MAT berdasarkan rekomendasi yang diberikan oleh WHO.(Goris and Hartskeerl, 2014) Diagnosis leptospirosis berdasarkan pemeriksaan ini akan ditegakkan apabila ditemukan adanya serokonversi atau peningkatan titer  $\geq 4$  kali lipat dari pemeriksaan 1 atau 2 minggu sebelumnya.(Goris and Hartskeerl, 2014; World Health Organization, 2003)

Metode serologis lainnya adalah *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Keuntungan pemeriksaan ini adalah dapat mendeteksi IgM pada fase awal infeksi. Reagen komersial juga tersedia untuk pemeriksaannya. Akan tetapi, pemeriksaan ini kurang spesifik sehingga perlu dikonfirmasi dengan menggunakan MAT. (World Health Organization, 2003)

Pemeriksaan *point-of-care* difasilitasi oleh adanya pemeriksaan *rapid test* berupa *dipstick assay* salah satunya pernah ditemukan oleh Hatta, dkk (2000). Secara keseluruhan, sensitivitas memiliki rentang antara 63% pada onset awal penyakit hingga mencapai 85,7% pada sampel antara 10 – 30 hari onset gejala. Spesifisitasnya sendiri lebih tinggi yaitu 99,2%.

### 2.5.2 Metode kultur

Pemeriksaan kultur leptospira dapat dilakukan pada sampel yang diperoleh dari darah, urin maupun organ. Untuk mengisolasi bakteri ini dari dalam darah, pengambilan sampel harus dilakukan pada fase leptospiremia yakni pada minggu pertama onset gejala. Sementara untuk isolasi bakteri ini dari organ biasanya hanya dilakukan pada hewan percobaan. Pada eksperimen menggunakan tikus, *Leptospira* dapat ditemukan dalam darah, organ hati, limpa, paru-paru, ginjal maupun organ lainnya pada masa 9 hari setelah infeksi dan hanya akan ada di ginjal setelah melewati waktu tersebut. (Athanzio et al., 2008)

Pemeriksaan kultur urin yang positif menunjukkan adanya bakteri leptospira yang diekskresikan dari ginjal. Penelitian oleh A. E. Bal, dkk (1994) mendeteksi adanya fragmentasi DNA pada urin dari pasien yang pernah menderita leptospira 1 tahun sebelumnya. (Bal et al., 1994)

Kemampuan leptospira untuk menetap dalam ginjal dan dikeluarkan bersama urin masih perlu diteliti lebih lanjut. A. M. Monahan dkk, menyebutkan bahwa hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan distribusi genetik dari masing-masing individu. (Monahan et al., 2009)

Medium kultur dasar yang dapat digunakan yaitu Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), BSA Tween<sup>TM</sup> 80 Agar/ Broth, Fletcher's Medium, Korthof's Medium, dan *Leptospira Protein-Free Medium*. Medium ini dapat dimodifikasi dengan penambahan rabbit sera atau *Leptospira enrichment* dan fluorouracil (FU) untuk menyuburkan pertumbuhan *Leptospira* dan mencegah kontaminasi. (Atlas, 2010)

### 2.5.3 Metode Molekuler

Salah satu metode molekuler yang banyak digunakan dan akurat dalam mendeteksi antigen leptospira adalah *Polymerase Chain Reaction* yang mampu menilai sampel dari spesimen darah, urine, cairan serebrospinal dan jaringan (hidup maupun post mortem). (World Health Organization, 2003)

Untuk deteksi leptospira, gen yang menjadi target antara lain *LipL32*, *lfb1*, *16S rrs*, *secY* dan *gyrB*. Akan tetapi, *LipL32* dan *lfb1* lebih khusus dalam mendeteksi leptospira patogen sedangkan *16S rrs*, *secY* dan *gyrB* mendeteksi seluruh spesies termasuk leptospira saprofit. (Waggoner and Pinsky, 2016) Selain itu, gen lain yang dapat digunakan untuk mendeteksi *Leptospira* patogenik adalah *flaB*. Gen ini merupakan gen pengkode kemampuan motilitas bakteri dan membantu invasinya ke dalam jaringan. (Cameron, 2015) Gen ini dapat digunakan sebagai primer dan hanya teramplifikasi pada isolat leptospira patogenik. (Kawabata et al., 2001; Natarajaseenivasan et al., 2010)

#### A. Prinsip *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

*Polymerase Chain Reaction* merupakan metode biologi molekuler yang pertama kali ditemukan pada tahun 1983 oleh Kary Mullis dimana prinsip pemeriksaan ini adalah penggandaan bagian tertentu dari materi genetic DNA secara in vitro. (Hill et al., 2013)

PCR berlangsung dengan pencampuran dari DNA template, Taq polymerase, primers dan deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP). Tube yang mengandung campuran ini kemudian dikondisikan pada variasi suhu yang bersiklus secara berulang hingga beberapa puluh kali secara cepat dan tepat. (Kadri, 2019; Pelt-Verkuil et al., 2008)

Langkah-langkah dalam metode ini dibagi atas tiga tahap, yaitu:



### 1. Denaturasi

Pada tahap ini terjadi pemisahan dari dua strand DNA yang dicapai dengan peningkatan suhu. Suhu denaturasi berlangsung pada 90 – 98°C. Ketika suhu mulai mencapai lebih dari 80°C, ikatan hidrogen dari matriks DNA akan terlepas dan DNA akan menjadi *single-stranded*.

### 2. Annealing/ hibridisasi

Tahap selanjutnya adalah annealing. Suhu yang digunakan pada tahap ini berada antara 40°C dan 70°C yang merupakan suhu hibridisasi primer. Pada kondisi ini, primer akan berikatan dengan sekuens pendek dari single-stranded DNA. Semakin tinggi suhu hibridisasi, maka hibridisasi akan semakin selektif dan spesifik.

### 3. Ekstensi/ elongasi

Tahap ketiga adalah elongasi yang berlangsung pada suhu 72°C. Tahap ini merupakan tahap sintesis dari strand komplementer. Taq polymerase akan terikat dengan single-stranded DNA yang sudah berikatan dengan primer dan kemudian mengkatalisis replikasi menggunakan dNTP yang terdapat dalam campuran reagenya dimulai dari 5' ke 3' dari primer. (Hill et al., 2013; Pelt-Verkuil et al., 2008)

Ketiga tahap dari PCR tersebut akan berulang 20 – 40 siklus dan akan menghasilkan DNA yang dapat dianalisis. Penggandaan DNA dari siklus sebelumnya akan terjadi pada setiap siklus lanjutannya. Reaksi PCR ini sangat cepat dan hanya membutuhkan waktu beberapa jam saja (2 – 3 jam untuk 30 siklus PCR). (Hill et al., 2013; Pelt-Verkuil et al., 2008)

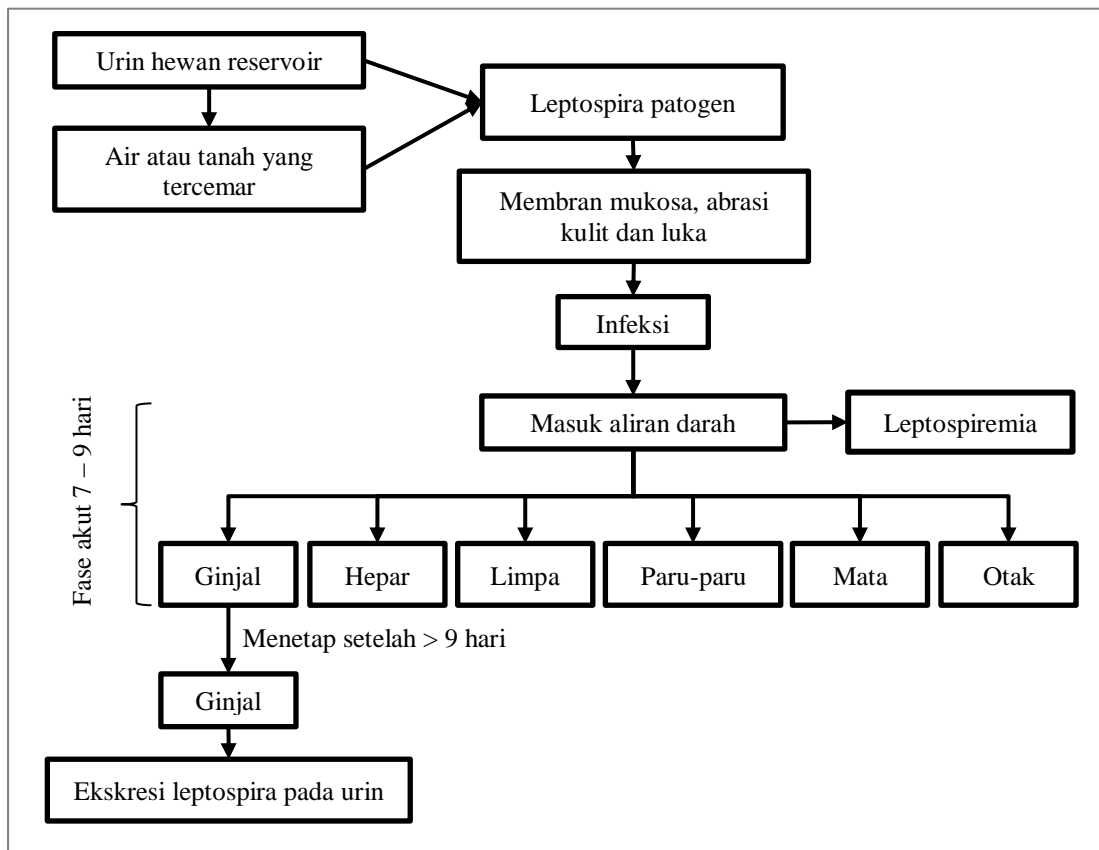
### *B. Kondisi reaksi PCR dan penggunaan gen primer*

Volume yang dibutuhkan untuk reaksi PCR yaitu 10 – 100 µl. Formula yang digunakan perlu distandarisasi untuk menyesuaikan dengan reaksi polimerisasi yang dibutuhkan.

Untuk penggunaan teknik PCR pada pemeriksaan leptospira patogenik, gen yang dapat digunakan sebagai primer adalah *lipL21* (561 bp), *lipL32* (756 bp), *flaB* (793 bp), *secY* (245 bp), *hap1* (262 bp) sebagai primer. (Ahmed et al., 2014; Cheema et al., 2007; Léon et al., 2006; Natarajaseenivasan et al., 2010; Widiyanti et al., 2013)

Pada metode PCR konvensional, DNA yang telah teramplifikasi kemudian ditempatkan ke dalam agarose gel untuk gel elektroforesis. Agarose gel merupakan gel polisakarida yang tersusun atas galactose dan 3,6-anhydrogalactose. Konsentrasi yang digunakan bervariasi antara 0,7% sampai 1,5%. Konsentrasi 0,7% paling baik dalam memisahkan fragmen yang lebih besar sedangkan konsentrasi 1,5% baik untuk memisahkan fragmen yang lebih kecil. Untuk pewarnaan pada gel elektroforesis, maka digunakan Ethidium Bromida untuk mendeteksi fragmen DNA. (Reddy and Raju, 2012)

## F. KERANGKA TEORI



## G. KERANGKA KONSEP

