

**OPTIMASI UJI *REAL-TIME* PCR
UNTUK DETEKSI LEPTOSPIRA SPP PATOGEN
PADA SPESIMEN URIN DAN DARAH MANUSIA**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Magister Biomedik

IKA NINGSIH

NPM: 0806419541



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber, baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Ika Ningsih

NPM : 0806419541

Tanda Tangan :



Tanggal : 23 Juni 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Ika Ningsih
NPM : 0806419541
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Mikrobiologi
Judul Tesis : Optimasi uji *real-time* PCR untuk deteksi *Leptospira* spp
patogen pada spesimen urin dan darah manusia

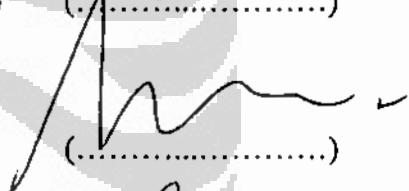
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Anis Karuniawati, PhD, SpMK(K)

(
.....)

Pembimbing II : Dr. Andi Yasmon, SPi, MBiomed

(
.....)

Penguji I : Dr. dr. Budiman Bela, SpMK(K)

(
.....)

Penguji II : dr. Novi Silvia, MBiomed

(
.....)

Penguji III : dr. Silvia Werdhy Lestari, MBiomed

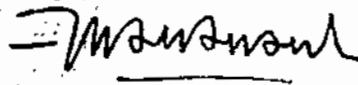
(
.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Panggal : 23 Juni 2011

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik





Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ika Ningsih
NPM : 0806419541
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Mikrobiologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Optimasi uji *real-time* PCR untuk deteksi *Leptospira* spp patogen pada spesimen urin dan darah manusia.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 23 Juni 2011

Yang menyatakan



(Ika Ningsih)

ABSTRAK

Nama : Ika Ningsih
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul : Optimasi uji *real-time* PCR untuk deteksi *Leptospira* spp patogen pada spesimen urin dan darah manusia

Leptospirosis adalah penyakit infeksi akut yang dapat menyerang manusia maupun hewan yang disebabkan bakteri *Leptospira* spp dan digolongkan sebagai zoonosis. Gejala klinis leptospirosis yang tidak spesifik dan sulitnya uji laboratorium untuk konfirmasi diagnosis mengakibatkan penyakit ini seringkali tidak terdiagnosis. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan optimasi uji diagnostik molekuler menggunakan *real-time* PCR sebagai deteksi cepat, sensitif dan spesifik untuk *Leptospira* patogen pada manusia. DNA bakteri di dalam spesimen darah diekstraksi menggunakan QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen dan spesimen urin diekstraksi menggunakan QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen dengan prosedur sesuai dengan petunjuk manualnya. Primer dan probe yang digunakan berdasarkan publikasi penelitian oleh Smythe dkk, 2002. Dari hasil uji optimasi kondisi optimal *real-time* PCR didapat suhu annealing 60°C, konsentrasi primer 0,9 µM dan konsentrasi probe 0,2 µM. Spesifisitas primer diuji menggunakan DNA bakteri patogen lain. Hasil uji sensitifitas *real-time* PCR untuk mendeteksi konsentrasi DNA terendah bakteri *Leptospira* spp adalah 0,75 fg/µl, hasil uji spesifisitas *real-time* PCR menunjukkan bahwa primer yang digunakan untuk deteksi bakteri *Leptospira* spp tidak beraksi silang dengan genom bakteri-bakteri uji, konsentrasi minimal DNA bakteri yang masih terdeteksi dalam darah mencapai 150 fg/µl, sedangkan dalam urin mencapai 1470 fg/µl yang masih dapat dideteksi dengan pemeriksaan *real-time* PCR. Metode *real-time* PCR ini dapat digunakan sebagai alternatif pemeriksaan mikrobiologi yang cepat dan tepat untuk mendiagnosis leptospirosis.

Keywords: *leptospirosis, leptospira, real-time PCR, optimasi, sensitifitas, spesifisitas*

ABSTRACT

Name : Ika Ningsih
Study Program : Biomedical Science
Title : Optimization of real-time PCR method for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in human urine and blood specimens

Leptospirosis is an emerging infectious disease in human and animals caused by *Leptospira* spp. and considered endemic in Indonesia due to its tropical climate. The International Leptospirosis Society (2001) declared Indonesia has high incidence of leptospirosis and ranked the third in the world for mortality (16.7%). The clinical features are not specific and may result in a missed or delayed diagnosis. The microbiology diagnostic method e.g. culture and microscopic agglutination test (MAT) are sensitive and specific but time-consuming and high cost. The other method to detect the antibody result false positive reactions and need confirmation by the MAT. Therefore in this study we optimized the real-time PCR assay, which has been used to detect a large number of microbes. It has high sensitivity and specificity, thus making it ideal as a rapid and accurate method to detect pathogen *Leptospira* spp. in human specimens. The amplification of the DNA control was performed optimally with the following conditions: annealing temperature is 60°C, primer volume is 0.5µl (final concentration: 0.9 µM); probe volume is 0.2 µl (final concentration 0.2 µM). This method may detect the DNA in the Mastermix Mix with the concentration of 0.75 fg/µl, however in blood specimen the limit of detection of the DNA 150 fg/µl and in urine is 1470 fg/µl. The primer used in this assay is not complementary with the DNA of other pathogenic *Leptospira* spp. The real-time PCR assay is a rapid and accurate method to detect pathogenic *Leptospira* in human specimens. Further studies are needed to know the sensitivity and specificity of the real-time PCR assay compared to other diagnostic methods in clinical settings.

Keyword: *leptospirosis, leptospira, real-time PCR, optimization, sensitivity, specificity*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil'alamin. Segala puji hanya bagi ALLAH SWT, karena atas segala rahmat, kasih sayang, petunjuk serta hidayah-Nya akhirnya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan kepada Dr. dr. Ratna Sitompul, SpM(K) dan Prof. dr. Pratiwi Pujilestari Sudarmono, PhD, SpMK(K) selaku Dekan dan Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan program S2 ini.

Rasa hormat dan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi dan Dr. rer. nat. Dra. Asmarinah, MS selaku Ketua dan Sekretaris Program Studi S2 Ilmu Biomedik FKUI atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Biomedik dan memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan pendidikan S2 ini

Penulis mengucapkan rasa terima kasih dan penghargaan kepada pembimbing I dan selaku Ketua Departemen Mikrobiologi FKUI dr. Anis Karuniawati, PhD, SpMK(K) dan pembimbing II Dr. Andi Yasmon, SPi, MBiomed, atas segala kesediaannya dalam membimbing, memberikan dorongan, kepercayaan, pengertian, kesabaran dan nasehat-nasehat yang diberikan dari awal hingga tahap akhir untuk menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.

Kepada Ketua Kekhususan Mikrobiologi, Dr. dr. Budiman Bela, SpMK (K), saya mengucapkan terima kasih atas perhatian dan masukannya. Rasa terima kasih yang mendalam juga penulis sampaikan kepada Staf Pengajar Departemen Mikrobiologi dan Karyawan Laboratorium Mikrobiologi FKUI atas

dukungan dan kerjasama yang telah diberikan selama saya menjalani pendidikan S2.

Ucapan terima kasih saya sampaikan juga kepada Dra. Beti Ernawati Dewi, PhD dan teman-teman di ruang 23 dan ruang 26 Lab. Biologi Molekuler (Hilda, mbak Tati, Alfian, Lolita, Nila dkk) atas bantuan, dukungan dan kerjasamanya selama ini.

Rasa hormat dan terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya kepada orang tua dan keluarga saya tercinta atas doa, perhatian dan dukungan yang telah menjadi sumber kekuatan dalam menjalani dan menyelesaikan pendidikan ini.

Akhirnya saya ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu menyelesaikan pendidikan S2 ini.

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan Bapak, Ibu, dan Saudara semua dengan pahala yang berlipat ganda. Amin.

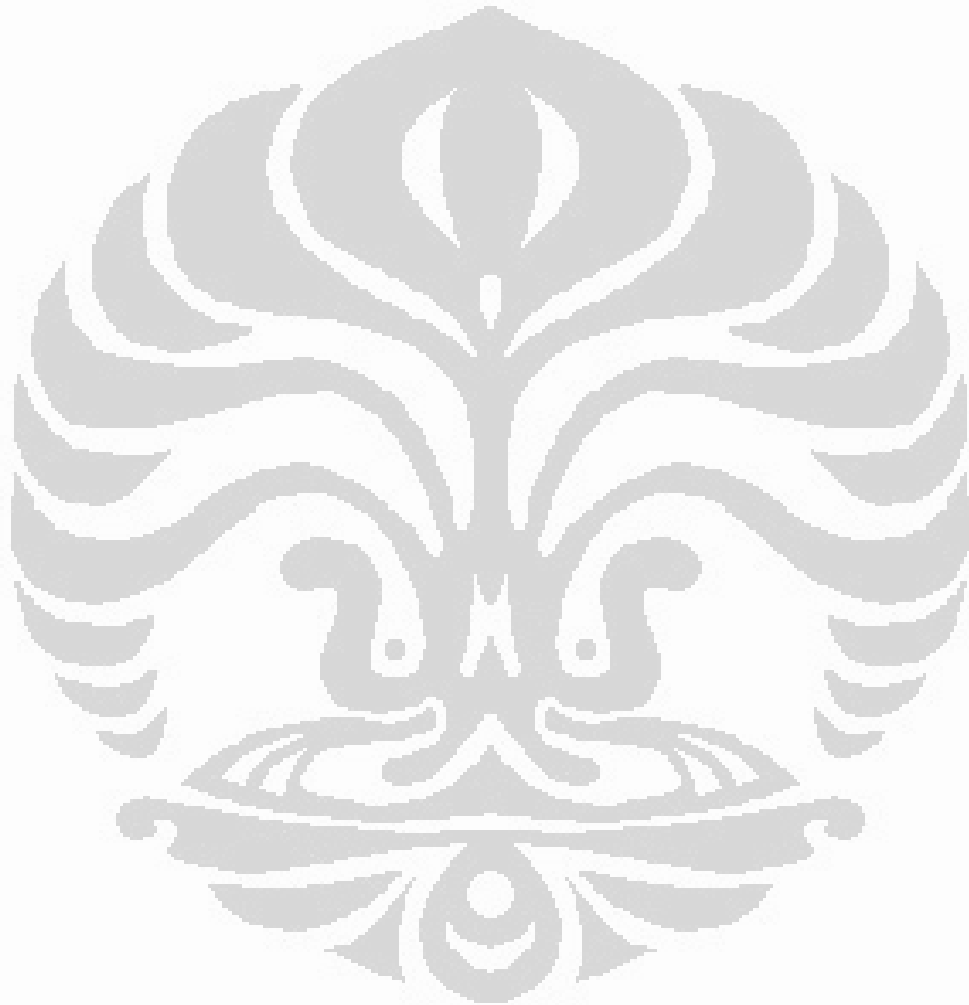
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN UNTUK PUBLIKASI KARYA ILMIAH	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
DAFTAR LAMBANG	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. LATAR BELAKANG	1
1.2. TUJUAN PENELITIAN	3
1.3. MANFAAT PENELITIAN	4
1.4. DEFINISI OPERASIONAL	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. LEPTOSPIROSIS	5
2.2. LEPTOSPIRA	6
2.2.1. Etiologi	6
2.2.2. Transmisi	8
2.2.3. Patogenesis	10
2.2.4. Manifestasi Klinis	12
2.2.5. Epidemiologi	13
2.3. Spesimen untuk pemeriksaan mikrobiologi	15
2.4. Pemeriksaan laboratorium	16
2.4.1. Pemeriksaan tidak langsung/serologi	17
2.4.1.1. <i>Microscopic Agglutination Test/MAT</i>	17

2.4.1.4. <i>Leptotek Dri Dot</i>	20
2.4.1.5. <i>Indirect Hemagglutination Assay (IHA)</i>	21
2.4.2. Pemeriksaan langsung	21
2.4.2.1. Kultur/Biakan	21
2.4.2.2. Mikroskopik	22
2.4.2.3. <i>Polimerase Chain Reaction/PCR</i>	22
BAB III. METODOLOGI	25
3.1. Disain Penelitian	25
3.2. Alur Penelitian	25
3.3. Tempat dan Waktu Penelitian	26
3.4. Bahan dan Cara kerja	26
3.4.1. DNA bakteri standar	26
3.4.2. Primer dan Probe	26
3.4.3. Ekstraksi DNA dan reagen <i>real-time PCR</i> (rPCR)	26
3.4.3.1. Ekstraksi DNA bakteri dari kultur	26
3.4.3.2. Ekstraksi DNA dari darah	27
3.4.3.3. Ekstraksi DNA dari urin	28
3.4.4. Pengukuran konsentrasi DNA	28
3.5. Optimasi kondisi <i>real-time PCR</i>	28
3.5.1. Optimasi Suhu Annealing	28
3.5.2. Optimasi Konsentrasi Primer	29
3.5.3. Optimasi konsentrasi Probe	29
3.6. Sensitifitas <i>real-time PCR</i>	29
3.7. Spesifisitas <i>real-time PCR</i>	30
3.8. Uji Simulasi	30
3.9. Analisis dan Penyajian data	31
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Optimasi <i>real-time PCR</i> (rPCR)	32
4.1.1. Optimasi Suhu Annealing	33
4.1.2. Optimasi Konsentrasi Primer	35
4.1.3. Optimasi Konsentrasi Probe	36
4.2. Uji Sensitifitas berdasarkan konsentrasi DNA	37
4.3. Uji Spesifisitas <i>real-time PCR</i>	38
4.4. Uji Simulasi	39
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	44
5.1. Kesimpulan.....	44
5.2. Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	49

RIWAYAT HIDUP

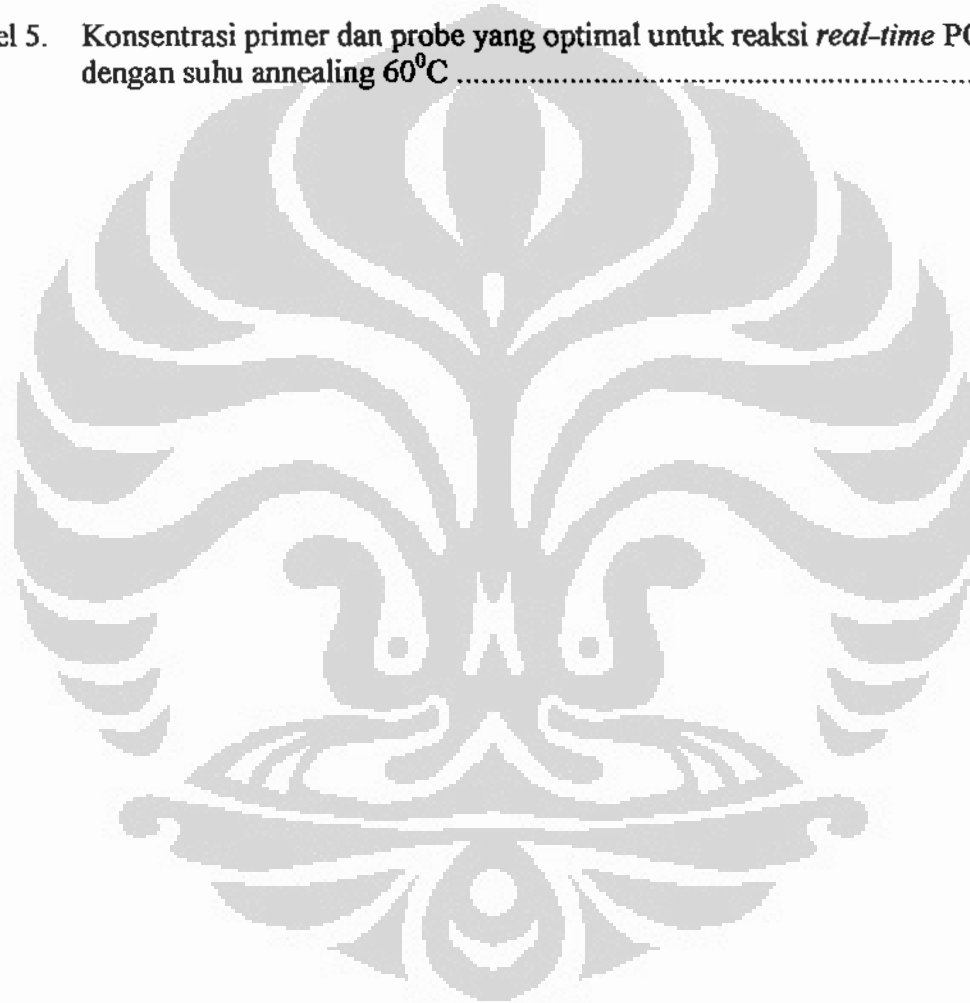


DAFTAR GAMBAR

1.	Bakteri <i>Leptospira</i>	6
2.	Siklus penularan leptospirosis	9
3.	Patogenesis leptospirosis	11
4.	Uji IgM Dipstick Assay (LDS/Lepto Dipstick Assay)	20
5.	Uji Leptotek Dri Dot	20
6.	Hasil optimasi suhu annealing	34
7.	Hasil optimasi konsentrasi primer	35
8.	Hasil optimasi konsentrasi probe	36
9.	Hasil uji sensitifitas berdasarkan konsentrasi DNA	37
10.	Hasil uji spesifisitas <i>real-time</i> PCR	39
11a.	Hasil uji simulasi urin yang tidak mengandung DNA <i>Leptospira</i> spp	40
11b.	Hasil uji simulasi darah yang tidak mengandung DNA <i>Leptospira</i> spp.....	40
12.	Hasil uji volume optimal elusi <i>real-time</i> PCR pada spesimen urin	40
13.	Hasil uji volume optimal elusi <i>real-time</i> PCR pada spesimen darah	41
14.	Hasil uji <i>real-time</i> PCR untuk deteksi DNA <i>Leptospira</i> spp pada spesimen darah orang sehat dengan beberapa konsentrasi DNA standar	42
15.	Hasil uji <i>real-time</i> PCR untuk deteksi DNA <i>Leptospira</i> spp pada spesimen urin orang sehat dengan beberapa konsentrasi DNA standar	42

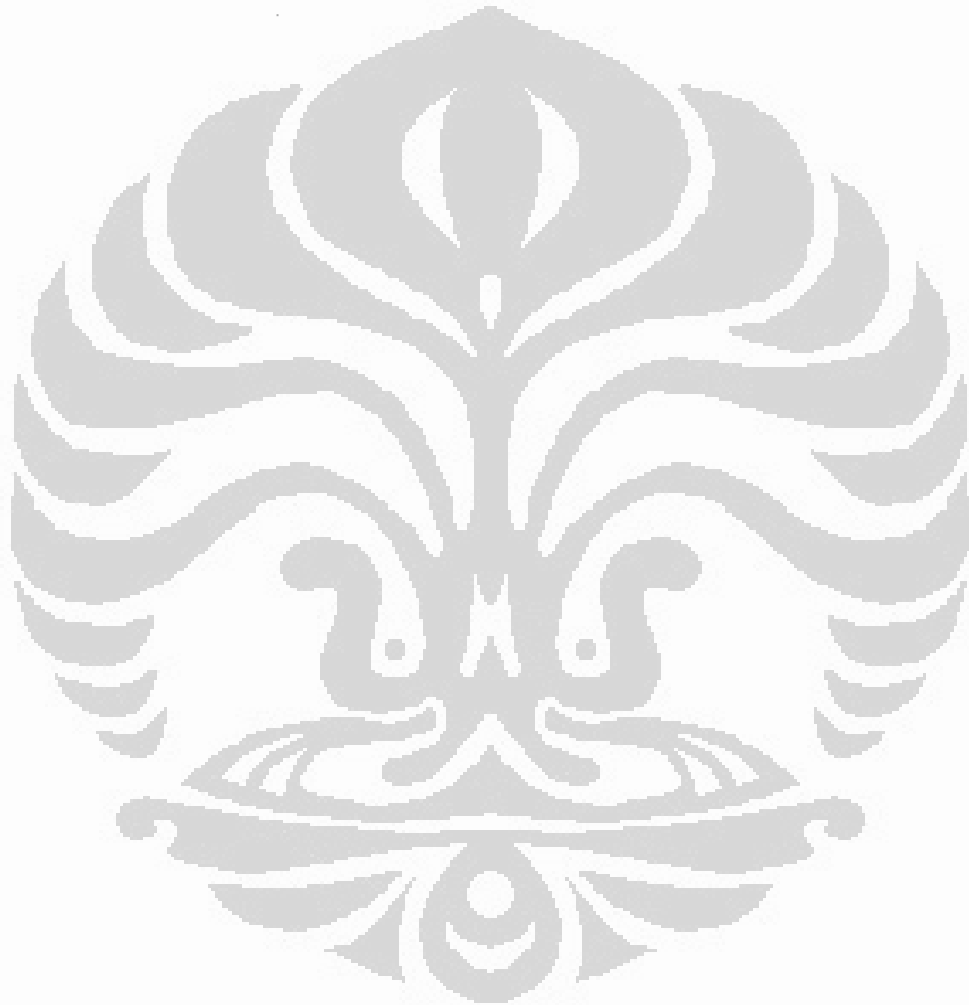
DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Serogrup dan beberapa serovar <i>Leptospira interrogans</i> sensu lato	7
Tabel 2.	Manifestasi klinis leptospirosis sesuai serovar	12
Tabel 3.	Perbedaan gambaran klinis leptospirosis anikterik dan ikterik	13
Tabel 4.	Sekuen primer dan probe	26
Tabel 5.	Konsentrasi primer dan probe yang optimal untuk reaksi <i>real-time</i> PCR dengan suhu annealing 60°C	37

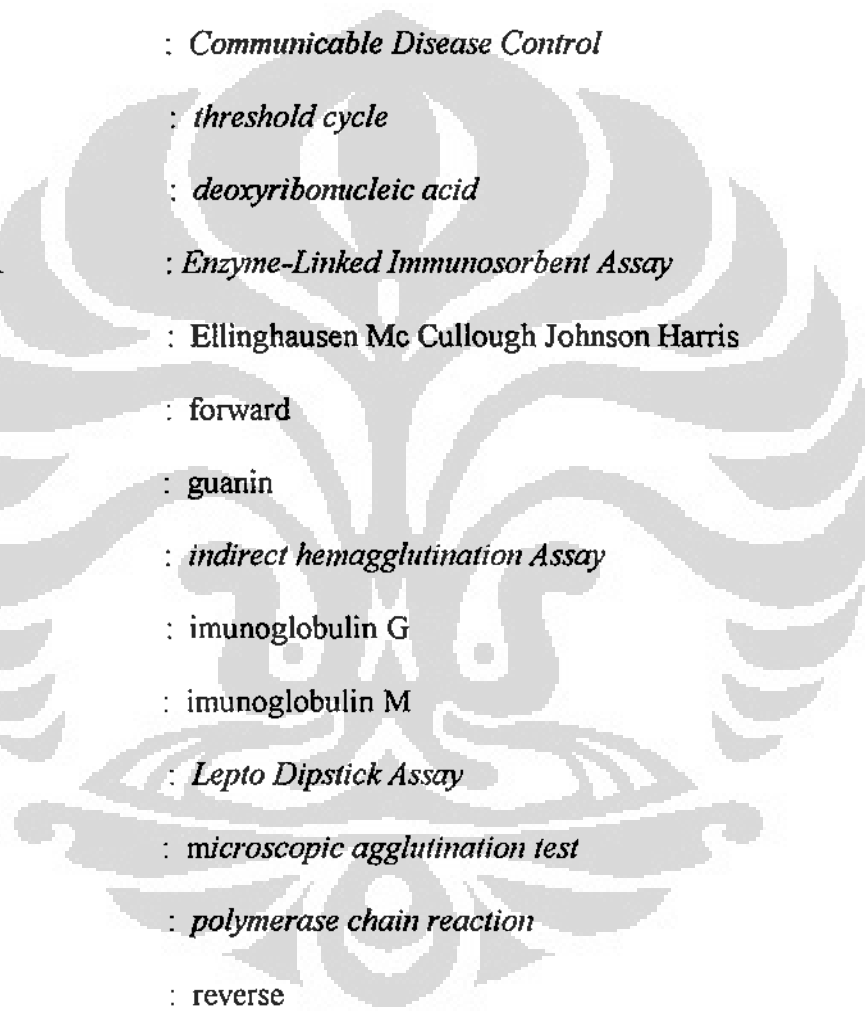


DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Bahan dan Alat yang digunakan	49
---	----



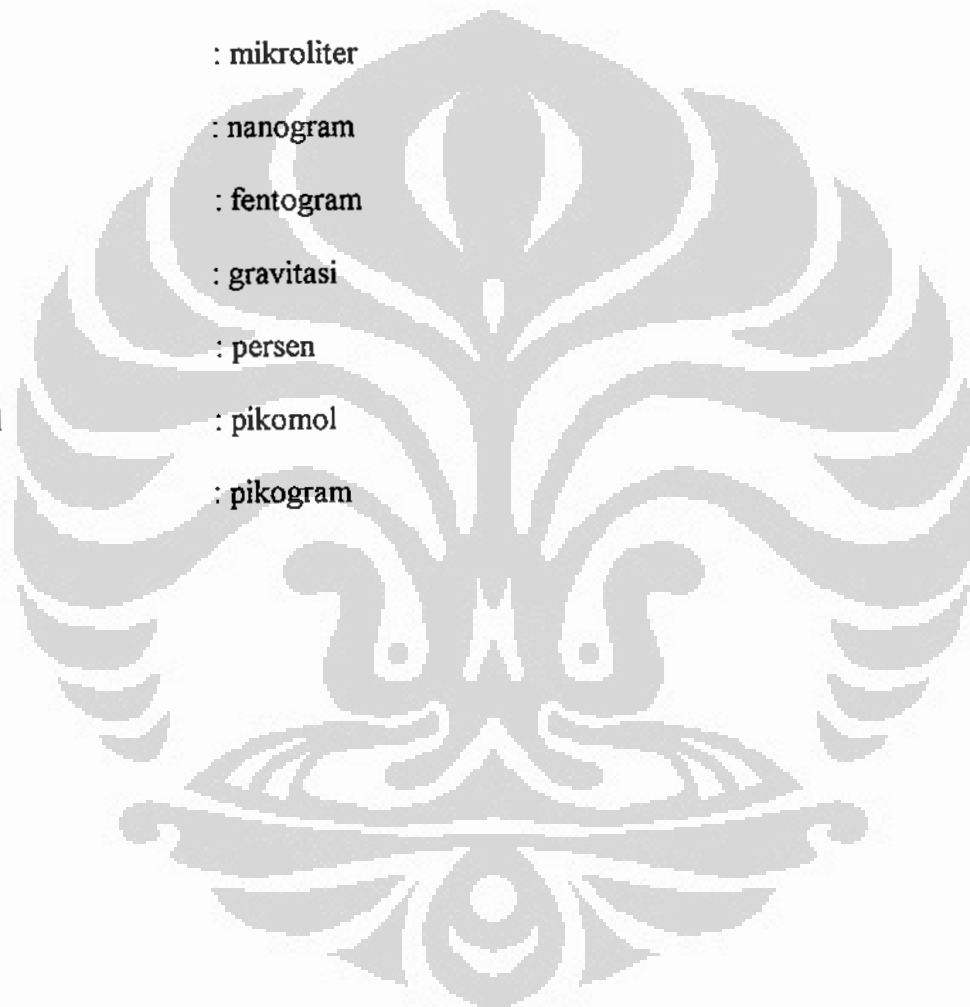
DAFTAR SINGKATAN



A	: adenin
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
bp	: base pair/pasang basa
C	: sitosin
CDC	: <i>Communicable Disease Control</i>
Ct	: <i>threshold cycle</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMJH	: Ellinghausen Mc Cullough Johnson Harris
F	: forward
G	: guanin
IHA	: <i>indirect hemagglutination Assay</i>
IgG	: imunoglobulin G
IgM	: imunoglobulin M
LDS	: <i>Lepto Dipstick Assay</i>
MAT	: <i>microscopic agglutination test</i>
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
R	: reverse
RNA	: <i>ribonucleid acid</i>
T	: timin
WHO	: <i>World Health Organization</i>

DAFTAR LAMBANG

$^{\circ}\text{C}$: celcius
ml	: milliliter
μM	: mikromolar
rpm	: <i>rotation per minute</i>
μl	: mikroliter
ng	: nanogram
fg	: fentogram
g	: gravitasi
%	: persen
pmol	: pikomol
pg	: pikogram



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Leptospirosis adalah penyakit infeksi akut yang disebabkan bakteri *Leptospira* patogen dan dapat menyerang manusia maupun hewan sehingga digolongkan sebagai zoonosis. Penyakit ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat, terutama di daerah beriklim tropis dan sub tropis dengan curah hujan tinggi, khususnya di negara berkembang dengan kesehatan lingkungan yang kurang diperhatikan seperti Indonesia. Leptospirosis merupakan suatu ancaman bagi para petani, peternak, pekerja saluran pembuangan, dokter hewan, pekerja industri perikanan dan personel militer serta diakui sebagai bahaya rekreasi di antara para pekemah dan atlet yang terpapar air yang terkontaminasi oleh *Leptospira*.¹

Leptospirosis kerap disebut penyakit tikus walaupun pada kenyataannya dapat menginfeksi anjing, kucing, harimau, musang, tupai, sapi kambing dan mamalia laut (anjing laut, singa laut). Bakteri ini menyerang hati dan ginjal hewan-hewan tersebut kemudian keluar bersama urin. Sedangkan manusia dapat terinfeksi *Leptospira* melalui kontak langsung dengan urin, darah atau jaringan dari hewan menderita leptospirosis maupun *carrier* leptospirosis. Bakteri masuk ke dalam tubuh manusia melalui kulit yang terluka, selaput lendir (mukosa) mulut, mata, hidung. Penularan juga dapat terjadi jika kontak langsung dengan air, tanah, tanaman dan makanan yang terkontaminasi oleh urin hewan terinfeksi *Leptospira*. Masa inkubasi infeksi *Leptospira* selama 4-19 hari.^{2,3,4}

Secara garis besar *Leptospira* terbagi menjadi dua spesies, yaitu *Leptospira interrogans* yang bersifat patogen dan *Leptospira biflexa* yang jarang ada kaitannya dengan infeksi pada mamalia. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Levett P.N tahun 2005 telah ditemukan bermacam-macam *Leptospira* yang patogen pada manusia seperti *Leptospira alexanderi*, *Leptospira borgpetersenii*,

Leptospira interrogans, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira santarosai* dan *Leptospira weilii*.⁵

Terdapat beberapa pilihan metode pemeriksaan mikrobiologi untuk mendukung diagnosis leptospirosis yaitu kultur, MAT (*Microscopic Agglutination Test*) dan deteksi antigen. Kultur untuk *Leptospira* menggunakan spesimen urin dapat dijadikan baku emas pemeriksaan tetapi sulit dalam pelaksanaannya sehingga cara ini tidak rutin dilakukan untuk menegakkan diagnosis. Baku emas yang lainnya yaitu pemeriksaan serologi dengan menggunakan metode MAT (*Microscopic Agglutination Test*) yaitu suatu pemeriksaan aglutinasi secara mikroskopis untuk mendeteksi titer antibodi pada serum penderita. Selain menentukan titer antibodi, MAT juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis serovar. Uji MAT ini walaupun mudah dilakukan tetapi untuk mendukung diagnosis dibutuhkan sepasang serum, yaitu serum yang diambil pada masa akut dan konvalesen. Selain itu pembacaan hasil aglutinasi pada uji MAT menggunakan mikroskop lapang gelap sehingga dibutuhkan tenaga terampil untuk melakukannya.^{1,6,7,8}

Diagnosis leptospirosis juga dapat dilakukan dengan cara mendeteksi DNA spesifik *Leptospira* menggunakan metode PCR baik konvensional maupun *real-time* PCR yang merupakan metode yang sensitif dan spesifik serta dapat memberikan hasil yang cepat dan akurat. Berbeda dengan PCR konvensional, pada *real-time* PCR tahap penggandaan materi genetik dan tahap deteksi dilakukan secara bersamaan (*simultan*), sehingga kita dapat melihat hasil PCR secara cepat. Selain itu deteksi dilakukan menggunakan pelacak bertanda fluoresen yang memberikan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi karena hasil penentuan kandungan DNA di dalam spesimen menjadi sangat akurat.^{9,10}

Pada tahun 2002, Smythe et al, telah mengembangkan sistem deteksi DNA *Leptospira* spp dengan menggunakan metode *real-time* PCR. Metode yang telah dikembangkan ini dapat diaplikasikan pada sampel darah dan urin tanpa harus melakukan kultur bakteri. Kestabilan hasil metode *real-time* ini sangat dipengaruhi oleh kualitas DNA (kemurnian, inhibitor) yang akan digunakan sebagai cetakan. Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas DNA adalah

metode ekstraksi DNA yang dipakai. Pada penelitian yang dipakai oleh Smythe et al, 2002 metode ekstraksi DNA yang digunakan adalah metode konvensional (fenol chloroform), kelemahan metode ini adalah dibutuhkan ketrampilan khusus untuk melakukannya.¹¹ Saat ini sudah tersedia beberapa kit untuk ekstraksi DNA yang praktis dan efisien untuk digunakan.

Pada penelitian ini dilakukan optimasi *real-time* PCR untuk deteksi dini, sensitif, spesifik dan cepat pada infeksi yang disebabkan oleh *Leptospira* yang bersifat patogen pada manusia dengan menggunakan universal primer. Meskipun uji ini telah dilakukan dan dipublikasi namun optimasi perlu dilakukan untuk penyesuaian metode dengan kondisi dan ketersediaan alat serta bahan di laboratorium mikrobiologi FKUI. Diharapkan uji ini dapat dimanfaatkan oleh klinisi untuk mendukung diagnosis leptospirosis sehingga dapat menjadi dasar tatalaksana terapi yang tepat.

1.2. TUJUAN PENELITIAN

1.2.1. Tujuan Umum

Mengembangkan sistem uji berbasis DNA untuk deteksi *Leptospira* spp patogen pada manusia sebagai uji alternatif yang sensitif, spesifik dan cepat.

1.2.2. Tujuan Khusus

1. Melakukan optimasi suhu annealing, konsentrasi primer dan konsentrasi probe untuk mendapatkan kondisi optimal pada uji *real-time* PCR
2. Mengetahui sensitifitas dan spesifisitas primer universal yang digunakan pada metode *real-time* PCR
3. Mengetahui limit deteksi kadar DNA *Leptospira* spp pada spesimen urin dan darah

1.3. MANFAAT PENELITIAN

Penelitian: Sebagai penelitian awal yang hasilnya dapat digunakan untuk studi berikutnya seperti epidemiologi, prevalensi dan perkembangan uji deteksi dengan kualitas yang lebih baik.

Pendidikan: Teknologi ini dapat digunakan sebagai bahan pembelajaran praktik.

Pelayanan masyarakat: Memperoleh metode alternatif untuk mendukung diagnosis leptospirosis dalam waktu singkat dan tepat.

1.4. DEFINISI OPERASIONAL

1. Sensitifitas

adalah kemampuan metode *real-time* PCR yang sudah dioptimasi untuk mendeteksi kadar DNA terkecil pada spesimen uji (urin dan darah).

2. Spesifisitas

adalah kemampuan primer dan probe yang digunakan pada *real-time* PCR menunjukkan spesifik komplementer dengan DNA *Leptospira* spp dan tidak komplementer dengan bakteri patogen lain yang mungkin dapat dideteksi pada spesimen uji (urin dan darah).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 LEPTOSPIROSIS

Leptospirosis merupakan penyakit demam akut dengan manifestasi klinik bervariasi yang disebabkan oleh mikroorganisme *Leptospira*. Leptospirosis dapat menyerang manusia atau hewan dan digolongkan sebagai penyakit zoonosis yang dikenal dengan nama seperti *mud fever*, *slime fever*, *swamp fever*, *autumnal fever*, *infectious jaundice*, *field fever* dan *cane cutter fever*.^{1,2}

Leptospirosis dikenal pertamakali sebagai penyakit akibat kerja pada tahun 1883. Penyakit ini pertama kali dilaporkan pada tahun 1886 oleh Adolf Weil yang mengungkapkan manifestasi klinis yang terjadi pada 4 penderita yang mengalami penyakit kuning yang berat, disertai demam, perdarahan dan gangguan ginjal. Penyakit dengan gejala tersebut di atas oleh Goldsmith tahun 1887 disebut sebagai “*Weil's Disease*”.^{13,14} Mikroba penyebab penyakit Weil's yaitu *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, diisolasi untuk pertama kalinya pada tahun 1915 oleh Inada di Jepang. Kemudian, pada tahun 1918, penyebab spesifik Nanukayami atau tujuh hari demam yaitu *Spirochaeta hebdomadis* ditemukan oleh Ido dkk. Sebelum Perang Dunia II laboratorium khusus untuk identifikasi strain *Leptospira* didirikan di laboratorium Schuffner, Amsterdam dan di Laboratorium Mochtar, Batavia untuk melakukan penelitian serologi dengan *Absorption Test*.¹⁵ Penyakit ini telah tersebar ke seluruh dunia dengan risiko tinggi adalah Kepulauan Karibia, Amerika Tengah dan Selatan, Asia Tenggara dan Kepulauan Pasifik. Penyakit ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat, terutama di daerah beriklim tropis dan sub tropis dengan curah hujan yang tinggi khususnya di negara berkembang dengan higiene yang kurang diperhatikan. *International Leptospirosis Society* menyatakan Indonesia sebagai negara insiden leptospirosis tinggi dan peringkat tiga di dunia untuk mortalitas (16,7%).^{5,6,12}

2.2. LEPTOSPIRA

2.2.1. Etiologi

Leptospirosis disebabkan bakteri Gram negatif dari genus *Leptospira*, famili *Leptospiraceae* dan ordo *Spirochaetales* yang berbentuk spiral, tipis, lentur dengan panjang 10-20 μm dan tebal 0,1 μm serta mempunyai kait berupa flagellum periplasmik, bergerak maju mundur dengan gerakan memutar sepanjang sumbunya. Gerakannya dapat dilihat dengan mikroskop lapang gelap atau mikroskop fase kontras (Gambar 1).¹⁴



Gambar 1. Bakteri *Leptospira* (Sumber: DepKes, 2003)

Bakteri *Leptospira* juga dapat dilihat dengan mikroskop cahaya dengan terlebih dahulu dilakukan pewarnaan Gram yang menggunakan karbol fukhsin sebagai pulasan. Selain itu dapat dipakai pewarnaan Romanowsky dan pewarnaan perak yang hasilnya lebih baik bila dibandingkan dengan pewarnaan Gram.¹⁴

Bakteri *Leptospira* bersifat aerob obligat dan tumbuh pada suhu pertumbuhan antara 28-30⁰C. dapat tumbuh di dalam media dasar yang diperkaya dengan vitamin, asam lemak rantai panjang sebagai sumber karbon dan garam amonium. Famili *Leptospiraceae* hanya terdiri dari tiga genera yaitu : *Leptonema*, *Turmeria* dan *Leptospira*. Genus *Leptospira* terdiri dari 2 spesies yaitu *Leptospira interrogans* yang merupakan bakteri patogen dan *Leptospira biflexa* adalah saprofitik. *Leptospira interrogans* dibagi menjadi serogrup dan serovar berdasarkan klasifikasi secara serologi (Tabel 1).^{4,17}

Tabel 1. Serogrup dan beberapa serovar *Leptospira interrogans* sensu lato (Sumber: Kusmiyati dkk, 2005)

Serogrup	Serovar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, Zimbabwe
Hebdomadis	hebdomadis, jules, krematos
Autumnalis	autumnalis, fortbragg, bbim, weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	grippotyphosa, canalzonae, ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	australis, bratislava, lord
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	sejroe, saxcoebing, hardjo
Panama	panama, mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	mini, Georgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	ballum, aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

Pada klasifikasi terbaru *L. interrogans* dibagi menjadi 7 spesies yaitu *L. interrogans*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L.*

kirschneri dan 5 spesies yang tidak bertitel yaitu spesies 1, 2, 3, 4, dan 5 sedangkan *L. biflexa* dibagi menjadi 5 spesies baru.^{4,5,17}

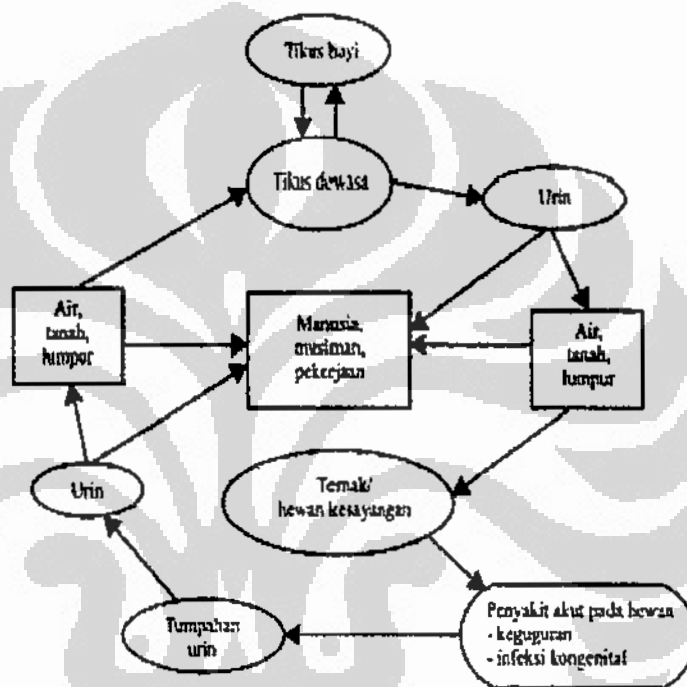
Dalam beberapa penelitian terdahulu berdasarkan susunan DNANYa dikelompokkan menjadi 7 spesies patogen yang terdiri dari lebih 250 varian serologi (serovar). *Leptospira* dapat menginfeksi sekurangnya 160 spesies mamalia diantaranya adalah tikus, babi, anjing, kucing, rakun, lembu dan mamalia lainnya.^{3,4} Reservoir paling utama ditemukan di seluruh dunia adalah binatang pengerat dan tikus. Di Amerika yang paling utama adalah anjing, ternak, tikus, binatang buas dan kucing. Beberapa serovar dikaitkan dengan beberapa binatang, misalnya *L. pomona* dan *L. interrogans* terdapat pada lembu dan babi, *L. grippityphosa* pada lembu, domba, kambing, dan tikus, *L. ballum* dan *L. icterohaemorrhagiae* pada tikus dan *L. canicola* pada anjing. Beberapa serotipe yang penting lainnya adalah *L. autumnalis*, *L. hebdomidis*, dan *L. australis*.^{10,18}

2.2.2. Transmisi

Penularan penyakit ini melalui tikus, babi, sapi, kambing, kuda, anjing, serangga, burung, landak, kelelawar, tupai, dll. Di Indonesia, penularan paling sering terjadi melalui tikus pada kondisi banjir. Keadaan banjir menyebabkan adanya perubahan lingkungan seperti banyaknya genangan air, lingkungan menjadi becek, berlumpur, serta banyak timbunan sampah yang menyebabkan mudahnya bakteri *Leptospira* berkembang biak. Urin tikus terbawa banjir kemudian masuk ke tubuh manusia melalui permukaan kulit yang terluka, selaput lendir mata dan hidung. Tikus merupakan reservoir dan sekaligus penyebar utama leptospirosis karena bertindak sebagai inang alami dan memiliki daya reproduksi tinggi. Beberapa hewan lain seperti sapi, kambing, domba, kuda, babi, anjing dapat terserang leptospirosis, tetapi potensi menularkan ke manusia tidak sebesar tikus.^{17,19}

Leptospirosis kerap disebut penyakit tikus walaupun pada kenyataannya tidak hanya tikus yang membawa bakteri *Leptospira* tetapi juga anjing, kucing, harimau, musang, tupai, sapi, kambing, mamalia laut (anjing laut dan singa laut). Bakteri ini menyerang liver dan ginjal hewan-hewan tersebut kemudian keluar bersama urin.^{1,13,21}

Manusia dapat terinfeksi *Leptospira* melalui kontak langsung dengan urin, darah atau jaringan dari hewan karier leptospirosis. Bakteri masuk ke dalam tubuh manusia melalui kulit yang terluka, selaput lendir (mukosa) mulut, mata, hidung. Penularan juga dapat terjadi jika kontak langsung dengan air, tanah, lumpur, tanaman atau makanan yang terkontaminasi oleh urin hewan terinfeksi *Leptospira*. Masa inkubasi infeksi *Leptospira* selama 4-19 hari. Siklus penularan leptospirosis dilukiskan pada (Gambar 2).^{6,16,17,18,20,30}

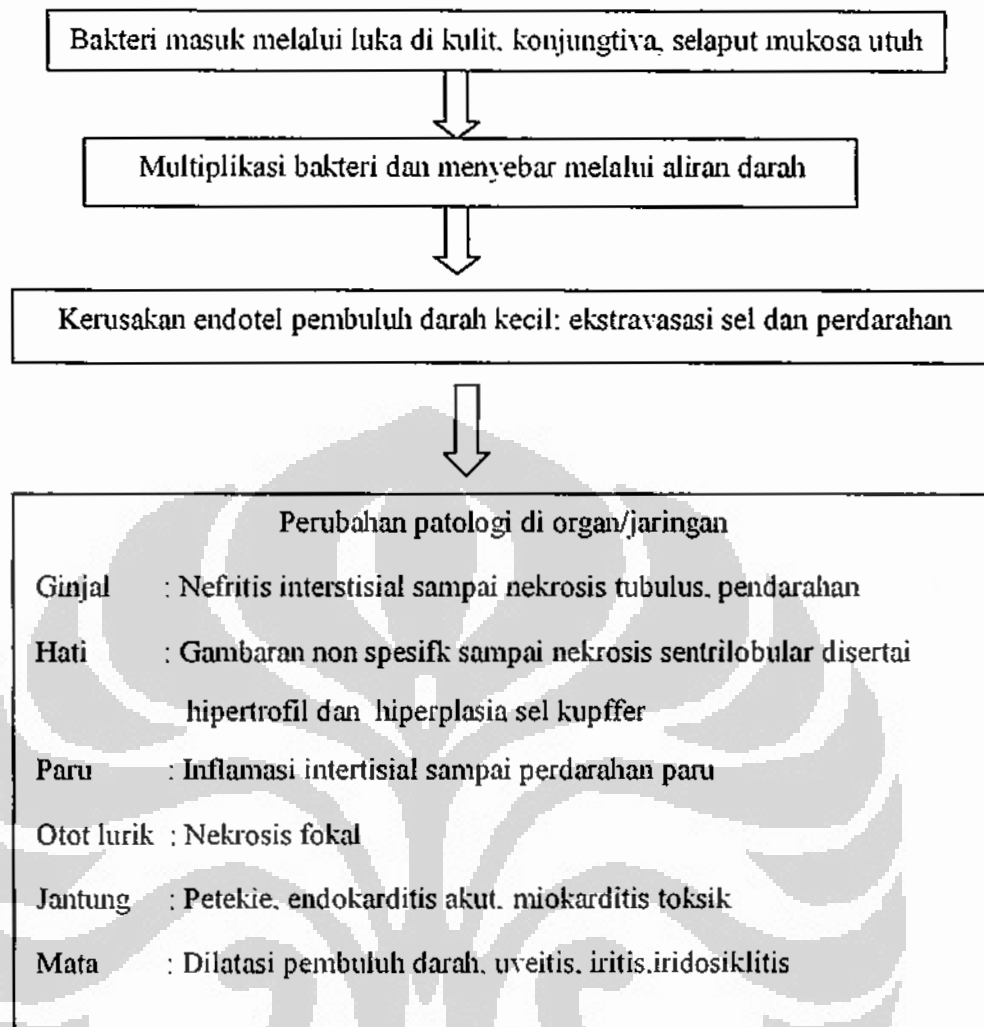


Gambar 2. Siklus penularan leptospirosis (Sumber: Kusmiyati et al, 2005)

Gejala klinis leptospirosis yang tidak spesifik dan sulitnya uji laboratorium untuk konfirmasi diagnosis mengakibatkan penyakit ini seringkali tidak terdiagnosis karena gejala klinisnya sangat menyerupai malaria, demam berdarah, hepatitis, meningitis, demam enterik dan banyak penyakit lainnya yang bercirikan demam, sakit kepala dan mialgia. Hal ini akan berakibat pada keterlambatan penatalaksanaan penderita yang dapat memperburuk prognosis.^{2,6,17,30}

2.2.3. Patogenesis

Di Indonesia, penularan paling sering melalui tikus. Air kencing tikus terbawa banjir kemudian masuk ke tubuh manusia melalui permukaan kulit yang terluka, selaput lendir mata dan hidung. Bisa juga melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi urine tikus yang terinfeksi *Leptospira*. Sejauh ini tikus merupakan reservoir dan sekaligus penyebar utama leptospirosis. Beberapa hewan lain seperti sapi, kambing, domba, kuda, babi, anjing dapat terserang leptospirosis, tetapi potensi menularkan ke manusia tidak sebesar tikus. Leptospirosis tidak menular langsung dari pasien ke pasien. Masa inkubasi leptospirosis 2 - 26 hari. Sekali berada di aliran darah, bakteri ini bisa menyebar ke seluruh tubuh dan mengakibatkan gangguan khususnya hati dan ginjal. Di ginjal bakteri akan migrasi ke interstitium, tubulus renal, dan tubular lumen menyebabkan nefritis interstitial dan nekrosis tubular. Gagal ginjal biasanya karena kerusakan tubulus, hipovolemia karena dehidrasi dan peningkatan permeabilitas kapiler. Gangguan hati berupa nekrosis sentrilobular dengan proliferasi sel Kupffer menyebabkan ikterus. *Leptospira* juga dapat menginvasi otot skeletal menyebabkan edema, vakuolisasi miofibril dan nekrosis fokal. Gangguan sirkulasi mikro muskular dan peningkatan permeabilitas kapiler dapat menyebabkan kebocoran cairan dan hipovolemi sirkulasi. Pada kasus berat seperti pada *disseminated vasculitic syndrome* dapat terjadi kerusakan endotelium kapiler. Pada paru dapat terjadi kerusakan alveolar dan interstitial vaskular yang mengakibatkan hemoptu. *Leptospira* juga dapat menginvasi akuos humor mata dan menetap dalam beberapa bulan, sering mengakibatkan uveitis kronis dan berulang. Meskipun komplikasi berat dapat terjadi, lebih sering dijumpai *self limiting disease*. Respon imun sistemik dapat mengeliminasi bakteri, tetapi dapat memicu reaksi inflamasi yang dapat mengakibatkan *secondary end-organ injury*. Untuk lebih jelasnya patogenesis *Leptospira* dapat dilihat pada Gambar 3.^{1,2,6,7,22}



Gambar 3. Patogenesis Leptospirosis (Sumber: Depkes, 2003)

Infeksi ginjal pada berbagai spesies hewan bersifat kronis dimana terjadi pembuangan sejumlah besar *Leptospira* di dalam urin yang menyebabkan transmisi pada manusia. Manifestasi klinis leptospirosis bermacam-macam seperti terlihat pada Tabel 2.^{4,23}

Tabel 2. Manifestasi klinis leptospirosis sesuai serovar (Sumber: Melnick J et al, 2007)

<i>Leptospira interrogans</i> Serovar	Sumber Infeksi	Penyakit pada manusia	Temuan klinis	Distribusi
autumnalis	Tidak diketahui	Demam pretibial atau demam Foot Bragg	Demam, ruam pada tibia	Amerika Serikat, Jepang
ballum	Kutu	-	Demam, ruam jaundice	Amerika Serikat, Erop, Israel
bovis	Sapi, Voles	-	Demam, prostasi	Amerika Serikat, Israel, Australia
canicola	Urin, Anjing	Infeksi pada jaundice	Sakit seperti flu, meningitis aseptik	Seluruh dunia
grippotyphosa	Tikus, Air	Demam Marsh	Demam, prostasi, aseptik meningitis	Eropa, Amerika Serikat, Afrika
hebdomadis	Tikus, Kutu	Demam tujuh hari	Demam, Ikterus	Jepang, Eropa
icterohaemorrhagiae	Urin tikus, Air	Penyakit Weil's	Ikterus, aseptik meningitis, hemorragik	Seluruh dunia
mitis	Babi	Penyakit Swineherd's	aseptik meningitis	Australia
pomona	Babi, Sapi	Penyakit Swineherd's	Demam, prostasi, aseptik meningitis	Eropa, Amerika Serikat, Australia

2.2.4. Manifestasi Klinis

Manifestasi klinis infeksi leptospirosis sangat bervariasi dan kadang asimtomatis, sehingga sering terjadi salah dalam mendiagnosis. Hampir 15-40% penderita yang terpapar infeksi tidak mengalami gejala tetapi menunjukkan hasil pemeriksaan serologi positif. Masa inkubasinya 2 sampai 26 hari dengan rerata

10 hari. Menurut keparahan penyakit, leptospirosis dibagi menjadi ringan dan berat tetapi untuk pendekatan diagnosis klinis dan penanganannya beberapa ahli membagi penyakit menjadi leptospirosis anikterik dan ikterik. Perjalanan penyakit leptospirosis anikterik maupun ikterik umumnya bifasik karena mempunyai 2 fase/stadium yaitu fase leptospiremia/fase septikemia dan fase imun yang dipisahkan oleh periode asimtomatik (Tabel 3).^{6,20}

Tabel 3. Perbedaan gambaran klinis Leptospirosis anikterik dan ikterik (Sumber:Depkes, 2003)

Sindrome, Fase	Gambaran klinis	Spesimen laboratorium
Leptospirosis anikterik		
Fase leptospiremia (3-7 hari)	Demam tinggi, nyeri kepala, mialgia, nyeri perut, mual, muntah, conjunctival suffusion	Darah, Cairan serebrospinal
Fase imun (3-30 hari)	Demam ringan, nyeri kepala, muntah, meningitis aseptik	Urin
Leptospirosis ikterik		
Fase leptospiremia dan fase imun (sering menjadi satu atau tumpang tindih)	Demam, nyeri kepala, mialgia, ikterik, gagal ginjal, hipotensi, manifestasi perdarahan, leukositosis, pneumonitis hemoragik	Darah, Cairan serebrospinal, Urin

2.2.5. Epidemiologi

Penyakit ini dapat menyerang semua usia, tetapi sebagian besar berusia antara 10-39 tahun. Sebagian besar kasus terjadi pada laki-laki usia produktif, kemungkinan karena golongan tersebut memiliki faktor risiko tinggi tertular penyakit ini.²¹

Kasus leptospirosis pada umumnya adalah *underdiagnosed*, *unreported* dan *underreported* karena beberapa laporan menunjukkan gejala asimtomatis dan gejala ringan, *self limited*, dan diagnosis yang salah. Di Amerika Serikat (AS) tercatat sebanyak 50 sampai 150 kasus leptospirosis setiap tahun sebagian besar atau sekitar 50% terjadi di Hawaii. Di Indonesia penyakit demam akibat banjir sudah sering dilaporkan di daerah Jawa Tengah seperti Klaten, Demak atau Boyolali. Beberapa tahun terakhir di daerah banjir seperti Jakarta dan Tangerang juga dilaporkan terjadinya penyakit ini. Jumlah kasus leptospirosis di DKI Jakarta akibat banjir besar yang terjadi tahun 2002 mencapai 113 kasus leptospirosis dan 20 orang diantaranya meninggal. Pada tahun 2003 berdasarkan data Dinas Kesehatan DKI Jakarta tercatat ada 49 kasus. Setahun kemudian ditemukan 44 kasus, sedangkan untuk tahun 2005 dan 2006 dilaporkan masing-masing 59 kasus dan 9 kasus. Bakteri *Leptospira* juga banyak berkembang biak di daerah pesisir pasang surut seperti Riau, Jambi dan Kalimantan. Pada tahun 2006 diketahui bahwa lima kabupaten/kota di provinsi Nangro Aceh Darussalam yaitu Aceh Tamiang, Aceh Timur, Langsa, Lhokseumawe dan Aceh Utara telah ditemukan 49 orang yang terdeteksi oleh penyakit leptospirosis. Berdasarkan data dinas kesehatan Bantul, kasus leptospirosis tahun 2009 tercatat 9 kasus, satu orang diantaranya meninggal. Pada tahun 2010 sebanyak 45 warga Bantul di Yogyakarta terkena leptospirosis, lima diantaranya meninggal dunia. Angka kematian akibat leptospirosis tergolong tinggi mencapai 5-40%.^{20,24} Leptospirosis yang terjadi pada anak balita, orang lanjut usia dan penderita *immunocompromised* mempunyai resiko tinggi terjadinya kematian. Penderita yang berusia di atas 50 tahun memiliki resiko kematian lebih besar yaitu bisa mencapai 56 persen. Pada penderita yang sudah mengalami kerusakan hati yang ditandai selaput mata berwarna kuning, resiko kematiannya lebih tinggi lagi.¹⁹

Paparan terhadap pekerja diperkirakan terjadi pada 30-50% kasus. Kelompok yang berisiko utama adalah para pekerja pertanian, peternakan, penjual binatang, bidang agrikultur, rumah jagal, tukang ledeng, militer, dan lain-lain. Ancaman berlaku juga bagi yang mempunyai hobi melakukan aktivitas di danau atau sungai seperti berenang atau rafting. Meskipun penyakit ini sering terjadi pada para pekerja, ternyata dilaporkan peningkatan sebagai penyakit saat rekreasi.

Aktifitas yang berisiko meliputi perjalanan rekreasi ke daerah tropis seperti berperahu kano, mendaki, memancing, selancar air, berenang, ski air, berkendara roda dua melalui genangan, dan kegiatan olahraga lain yang berhubungan dengan air yang tercemar. Berkemah dan bepergian ke daerah endemik juga menambahkan risiko.²⁰

Iklim yang sesuai untuk perkembangan *Leptospira* adalah udara yang hangat, tanah yang basah dan pH alkalis, kondisi ini banyak ditemukan di negara beriklim tropis. Oleh sebab itu, kasus leptospirosis 1000 kali lebih banyak ditemukan di negara beriklim tropis dibandingkan dengan negara subtropis dengan risiko penyakit yang lebih berat. Angka kejadian leptospirosis di negara tropis basah 5-20/100.000 penduduk per tahun. Organisasi Kesehatan Dunia (*World Health Organization/WHO*) mencatat, kasus leptospirosis di daerah beriklim subtropis diperkirakan berjumlah 0.1-1 per 100.000 orang setiap tahun, sedangkan di daerah beriklim tropis kasus ini meningkat menjadi lebih dari 10 per 100.000 orang setiap tahun. Pada saat wabah, sebanyak lebih dari 100 orang dari kelompok berisiko tinggi di antara 100.000 orang dapat terinfeksi.²⁰

2.3. SPESIMEN UNTUK PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGI

Saat pengambilan sampel sangat tergantung pada fase infeksi penyakit. *Leptospira* biasanya berada di dalam peredaran darah penderita kira-kira 10 hari setelah terjadi infeksi, *Leptospira* juga ditemukan pada cairan tubuh yang lain seperti, urin, cairan serebrospinal beberapa hari sesudah serangan penyakit dan pada saat yang bersamaan juga bakteri ini masuk ke organ dalam penderita. Titer antibodi yang dapat dideteksi kira-kira 5-10 hari sesudah serangan penyakit, kadang-kadang lebih lama bila penderita sudah mendapat pengobatan antibiotika.¹⁴

Jenis sampel yang sering digunakan adalah¹⁴:

1. Darah yang diambil 10 hari pertama sakit yang dicampur heparin digunakan untuk pemeriksaan biakan. Darah untuk biakan sebaiknya diambil tidak lebih 10 hari sesudah serangan penyakit karena *Leptospira* sudah menghilang dari peredaran darah.

2. Darah beku atau serum untuk pemeriksaan serologi. Sampel ini sebaiknya diambil dua kali dengan selang waktu beberapa hari yaitu saat serangan penyakit dan masa konvalesen.
3. Urin untuk biakan. Urin diinokulasi ke dalam media biakan dalam waktu tidak lebih dari 2 jam sesudah pengambilan.
4. Sampel postmortem (sesudah meninggal). Pengambilan sampel ini adalah sangat penting dan diusahakan untuk mengambil dari berbagai organ dalam termasuk otak, cairan serebrospinal, cairan mata, paru, ginjal, hati, jantung dan darah yang berada di dalam jantung untuk pemeriksaan serologis.
5. Sampel cairan serebrospinal dan dialisat digunakan untuk biakan.

2.4. PEMERIKSAAN LABORATORIUM

Pemeriksaan mikrobiologi sangat perlu untuk menegakkan diagnosis penyakit leptospirosis secara dini dengan cepat dan tepat. Manfaat pemeriksaan laboratorium adalah untuk memastikan diagnosis leptospirosis karena penyakit ini secara klinis sangat sulit dibedakan dengan penyakit lain dan dapat menentukan jenis serogrup-serovar penyebab infeksi yang dapat digunakan untuk mengetahui sumber penularan.^{7,8,14}

Terdapat banyak pilihan metode pemeriksaan mikrobiologi untuk mendukung diagnosis leptospirosis yaitu terdiri dari pemeriksaan secara langsung untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Leptospira* atau antigennya seperti kultur, mikroskopik, PCR (*polimerase chain reaction*) dan pemeriksaan secara tidak langsung melalui pemeriksaan antibodi terhadap bakteri *Leptospira* seperti *Microscopic Agglutination Test (MAT)*, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, Uji penyaring).^{6,7} Diagnosis leptospirosis dapat dibagi dalam tiga klasifikasi yaitu :

1. Suspek, bila ada gejala klinis tanpa dukungan uji laboratorium
2. *Probable*, bila gejala klinis sesuai leptospirosis dan hasil uji serologi penyaring positif
3. Definitif, bila hasil pemeriksaan laboratorium langsung positif atau gejala klinis

sesuai dengan leptospirosis dan hasil uji MAT/ELISA menunjukkan adanya serokonversi.

2.4.1. Pemeriksaan tidak langsung/serologi

Sebagian besar kasus leptospirosis didiagnosis dengan uji serologi. Antibodi dapat dideteksi di dalam darah 5-7 hari sesudah munculnya gejala. Ada beberapa metode serologis yang dapat digunakan antara lain:

2.4.1.1. *Microscopic Agglutination Test* (MAT)

Pendekatan diagnostik yang paling sering digunakan untuk leptospirosis adalah pendekatan diagnostik serologi. *Microscopic Agglutination Test* (MAT) merupakan baku emas uji serologis yang digunakan di laboratorium rujukan karena derajat sensitifitas dan spesifisitasnya yang tinggi dan dapat mengidentifikasi jenis serovar. Uji MAT merupakan sebuah uji yang rumit yang membutuhkan panel besar yang terdiri atas suspensi sel hidup untuk memberikan cakupan yang memadai dari keragaman antigenik yang terdapat dalam wilayah pengujian tertentu. Sampel untuk pemeriksaan MAT sebaiknya diambil secara serial dengan rentang waktu 1-2 minggu dan sampel pertama diambil saat pasien datang berobat. Pemeriksaan sampel harus dilakukan di laboratorium yang sama dan sisa spesimen pertama diperiksa lagi bersama spesimen kedua agar dapat dilakukan perbandingan titer antara spesimen pertama dan kedua. Pengujian MAT ini membutuhkan sepasang serum untuk dapat membedakan infeksi akut dan infeksi kronik. Adanya peningkatan titer empat kali dari sepasang serum menandakan infeksi leptospirosis akut. Selain membutuhkan sepasang serum, aglutinasi pada uji MAT harus dilihat dibawah mikroskop lapang gelap sehingga membutuhkan tenaga terampil untuk melakukannya. Oleh karena itu interpretasi hasilnya masih sangat sulit tanpa spesimen berpasangan yang dikumpulkan pada waktu yang tepat dan hasilnya biasanya tidak tersedia cukup cepat untuk bisa berguna bagi penatalaksanaan pasien.^{6,7,8,22}

Microscopic Agglutination Test (MAT) adalah pemeriksaan aglutinasi mikroskopik untuk mendeteksi titer antibodi aglutinasi yang terdiri dari IgM atau IgG. Prinsip uji MAT adalah serum penderita diencerkan secara serial kemudian

dicampur dengan suspensi bakteri *Leptospira* hidup lalu di inkubasi pada suhu ruangan selama 1,5 jam. Setelah diinkubasi reaksi antigen dan antibodi diperiksa di bawah mikroskop lapangan gelap untuk melihat aglutinasi dengan pembesaran x100. Titer yang dilaporkan dihitung sebagai kebalikan dari pengenceran tertinggi serum yang mengaglutinasi paling sedikit 50% sel-sel untuk masing-masing serovar yang digunakan. Untuk evaluasi ini titer spesimen sebesar ≥ 200 dianggap positif.

Metode ini dipakai sebagai metode referensi untuk mengembangkan tehnik lain dengan membandingkan sensitifitas, spesifisitas dan akurasi. MAT sering mengalami beberapa kendala terutama di negara yang sedang berkembang karena memerlukan banyak jenis serovar, tenaga ahli yang berpengalaman dan memerlukan fasilitas biakan untuk memelihara bakteri *Leptospira*. Sampai saat ini serovar *Leptospira* yang beredar di Indonesia belum seluruhnya diketahui secara pasti. Oleh karena itu diperlukan penelitian untuk mengetahui seluruh serovar yang beredar di Indonesia sehingga antigen yang digunakan sesuai dengan serovar yang beredar untuk memperoleh hasil MAT yang lebih tepat dan menghindari hasil negatif palsu. Kelemahan MAT adalah memerlukan fasilitas biakan untuk memelihara bakteri *Leptospira*, pemeriksaannya sulit dan lama. Keuntungan MAT adalah dapat memberikan gambaran umum tentang serovar yang ada di dalam populasi dan merupakan uji yang cukup baik untuk serosurvei epidemiologi.^{6,7,8,12,22}

Pemeriksaan MAT sangat kompleks sehingga perlu dikembangkan sistem pemeriksaan antibodi *Leptospira* yang lebih mudah dan cepat. Saat ini telah dikembangkan beberapa alternatif untuk pengujian MAT yang tersedia di pasaran seperti *IgM-ELISA*, *IgM-Dipstick assay (LDS)* dan *Indirect Hemagglutination Assay (IHA)*. Evaluasi uji serologis untuk diagnosis leptospirosis yang tersedia di pasaran telah dilakukan oleh Bajani MD et al., 2003. Evaluasi ini menunjukkan bahwa pengujian tersebut memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang berbeda. Hasil studi tersebut tentunya dapat membantu laboratorium, khususnya yang tidak memiliki kapasitas menyimpan MAT dan harus memilih pengujian yang cocok bagi penyaringan sampel serum dari dugaan kasus leptospirosis.²⁵

2.4.1.2. *IgM-ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)*

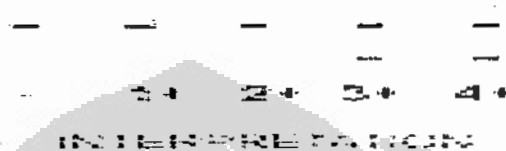
Uji ELISA sangat populer dan uji ini dapat mendeteksi antibodi IgM dan kadang-kadang juga digunakan untuk mendeteksi antibodi IgG. Adanya antibodi IgM merupakan pertanda adanya infeksi baru *Leptospira* atau infeksi yang terjadi beberapa minggu terakhir sedangkan antibodi IgG untuk infeksi terdahulu.

Uji ELISA cukup sensitif untuk mendeteksi infeksi oleh *Leptospira* dengan cepat pada fase akut dan uji ini dapat mendeteksi antibodi IgM yang muncul pada minggu pertama sakit sehingga cukup efektif untuk mendiagnosis penyakit. Uji ELISA dilakukan sesuai prosedur standar pabrik pembuatnya dengan menggunakan lempeng mikrotiter bersumur 96 yang dilapisi antigen bakteri *Leptospira*. Ikatan konjugasi dideteksi menggunakan tetramethylbenzine sebagai substrat dan perubahan warna dibaca menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm. Sampel serum dinyatakan positif jika mempunyai angka indeks lebih dari 11, *equivocal* bila angka indeks diantara 9 dan 11 dan negatif jika angka indeks kurang dari 9. Kelemahan uji ELISA adalah kurang spesifik bila dibandingkan dengan uji MAT karena dapat terjadi reaksi silang pada penyakit lain dan tidak dapat menentukan jenis serovar sehingga harus dikonfirmasi dengan uji MAT.^{6,7}

2.4.1.3. *IgM Dipstick assay (LDS)/Lepto Dipstick Assay*

Lepto Dipstick Assay dapat mendeteksi bakteri *Leptospira* spesifik imunoglobulin M dalam serum. Metode ini sederhana, relatif praktis dan cepat karena hanya memerlukan waktu antara 2,5 sampai 3 jam. Peralatannya terdiri dari tabung reaksi, reagen, pita celup dipstick dan pemusing untuk memproses serum pasien. Pemeriksaan ini tidak memerlukan tempat khusus seperti MAT dan relatif aman karena menggunakan antigen bakteri *Leptospira* yang telah difiksasi dan dilekatkan pada pita celup. Pemeriksaan dilakukan dengan mencampur 5 µl serum dan 250 µl antigen. Pita celup direndam dalam cairan dipstick selama satu menit dan diinkubasi selama tiga jam pada suhu kamar, kemudian dibilas dengan air, dikeringkan dan dibaca hasilnya. Intensitas pewarnaan pita reaksi dibaca secara visual dan dinilai dari 1 hingga 4 dengan diagram rujukan berwarna.

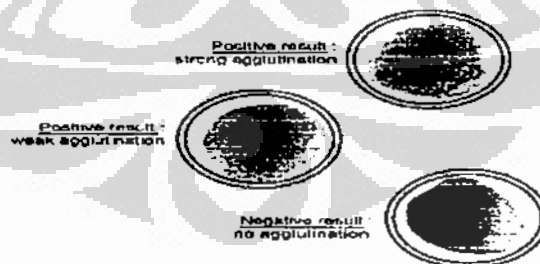
Intensitas pewarnaan senilai 2 atau lebih diinterpretasikan positif. Hasil evaluasi *Lepto Dipstick Assay* di 22 negara termasuk Indonesia menunjukkan sensitivitas 84,5%, spesifisitas 87,5%. Uji ini tersedia secara komersial.^{6,7,14}



Gambar 4: Uji *IgM Dipstick assay (LDS)/Lepto Dipstick Assay* (Sumber:Depkes,2003)

2.4.1.4. *Leptotek Dri Dot*

Leptotek Dri Dot berdasarkan aglutinasi partikel lateks, harganya lebih murah pengerjaannya praktis dan cepat karena hasil dapat dilihat dalam 30 detik. Uji ini merupakan reaksi aglutinasi untuk mendeteksi antibodi aglutinasi seperti MAT. Pemeriksaan dilakukan dengan meneteskan 10 µl serum menggunakan pipet pada kertas aglutinasi dan dicampur dengan reagen. Hasil dibaca setelah 30 detik dan dinyatakan positif bila ada aglutinasi.^{6,7}



Gambar 5: Uji *Leptotek Dri Dot* (Sumber: Depkes,2003)

2.4.1.5. Indirect Hemagglutination Assay (IHA)

Pemeriksaan *Indirect Hemagglutination Assay* dikembangkan oleh *Communicable Disease Control (CDC)*. Metode ini tersedia secara komersial. Serum pasien sebanyak 50 µl diencerkan kemudian dicampur dengan 25 µl antigen pada sumur mikrotiter selanjutnya diinkubasi pada suhu 25°C selama 1 hari. Reaksi agglutinasinya dibaca pada skala +1 sampai +4. Kontrol positif dan negatif juga diuji. Titer dicatat sebagai angka kebalikan dari pengenceran tertinggi serum yang menunjukkan agglutinasinya +2. Hasilnya diinterpretasi sesuai dengan rekomendasi pabrik. Titer sebesar ≥ 50 dianggap positif. Pemeriksaan ini mempunyai sensitivitas 79% dan spesifisitasnya 95,8%.²⁵

2.4.2. Pemeriksaan Langsung

2.4.2.1. Kultur/Biakan

Spesimen dari penderita dibiakkan pada media pertumbuhan seperti Vervoort, Noguchi, Fletcher, Ellinghausen, McCullough, Johnson dan Harris (EMJH) untuk memperbanyak bakteri. Hasil optimal bila spesimen seperti darah, urin, cairan serebrospinal segera ditanam ke media dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 28-30°C, pertumbuhan koloni bakteri dapat dilihat secara berkala selama ± 13 minggu. Metode ini membutuhkan waktu cukup lama, mahal, memerlukan tenaga ahli yang berpengalaman dan sensitivitasnya rendah. Biakan bakteri memerlukan media yang kompleks dan rumit serta harus mengandung perangsang pertumbuhan dan antibiotika untuk menekan pertumbuhan kontaminan. Masa pertumbuhan bakteri ini cukup panjang yaitu 6-8 jam/siklus sehingga tidak mungkin dipakai mendiagnosis leptospirosis secara dini.²⁶

Infeksi *Leptospira* pada hewan dan manusia diperkirakan terjadi sangat singkat. Biasanya bakteri ditemukan di dalam darah selama 8 hari dari pertama sakit. Oleh karena itu darah diambil secepat mungkin. Pemberian antibiotik dapat mempengaruhi keberhasilan isolasi bakteri. Cairan serebrospinal untuk biakan harus diambil pada minggu pertama sakit. Sampel urin diambil pada minggu kedua sakit. Masa hidup *Leptospira* dalam urin sangat terbatas. Urin harus cepat diproses dengan sentrifugasi, sedimen yang diperoleh diresuspensi ke

dalam *phosphate buffer saline*/PBS (untuk menetralkan pH), kemudian diinokulasi ke dalam medium dan diinkubasi pada temperatur 28°C-30°C diamati setiap minggu.²⁶

2.4.2.2. Mikroskopik

Pemeriksaan bakteri secara langsung dengan mikroskop dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis leptospirosis secara pasti. *Leptospira* dari spesimen klinik dapat dilihat secara langsung menggunakan mikroskop lapangan gelap atau menggunakan mikroskop cahaya setelah preparat bakteri diwarnai dengan pewarnaan yang sesuai. Dari hasil penelitian, sensitifitas pemeriksaan mikroskopis lapangan gelap 40,2% dan spesifisitasnya 61,5%. Keuntungan pemeriksaan ini adalah dapat digunakan untuk mengamati *Leptospira* dalam biakan terutama bila bakteri dalam jumlah banyak dan untuk mengamati aglutinasi pada pemeriksaan *Microscopic Agglutination Test* (MAT). Kelemahan pemeriksaan mikroskopik adalah sulitnya membedakan bakteri *Leptospira* dengan artefak, bila jumlah bakteri sedikit *Leptospira* sulit ditemukan, pemeriksaan ini seringkali memberikan hasil yang keliru karena adanya fibrin atau protein yang kelihatan bergerak dan berwarna coklat (*Brownian motion*) menyerupai bakteri *Leptospira* dan pemeriksaan ini juga memerlukan tenaga ahli berpengalaman. Walaupun pemeriksaan ini merupakan uji yang cepat tetapi tidak disarankan digunakan sebagai prosedur tunggal untuk mendiagnosis leptospirosis.⁷

2.4.2.3. Polimerase Chain Reaction (PCR)

Pemeriksaan molekuler dengan PCR untuk mendeteksi DNA bakteri *Leptospira* spesifik dapat dilakukan dengan memakai primer khusus seperti Lepto F (5' ¹⁷¹ CCCGCGTCCGATTAG 3'), Lepto R (5' ²⁵⁸ TCCATTGTGGCCGR ^{AG} ACAC 3') yang dapat mengenali semua strain patogen. Metode ini sangat berguna untuk mendiagnosis leptospirosis terutama pada fase awal penyakit. Alat ini dapat mendeteksi *Leptospira* beberapa hari setelah munculnya gejala penyakit. Metode PCR bermanfaat untuk meningkatkan akurasi survei epidemiologi untuk mencari angka insiden penyakit khususnya di daerah tropis. Keuntungan pemeriksaan ini adalah lebih sensitif, spesifik dan cepat serta baik bila

dibandingkan dengan uji serologi dan biakan/kultur. Kelemahannya adalah bahwa uji ini memerlukan peralatan yang relatif mahal dan tenaga ahli, disamping itu PCR dapat memberikan hasil positif palsu apabila terkontaminasi oleh DNA dari luar spesimen atau dapat memberikan hasil negatif palsu karena spesimen klinik yang diperiksa sering mengandung inhibitor seperti heparin dan saponin.^{7,14}

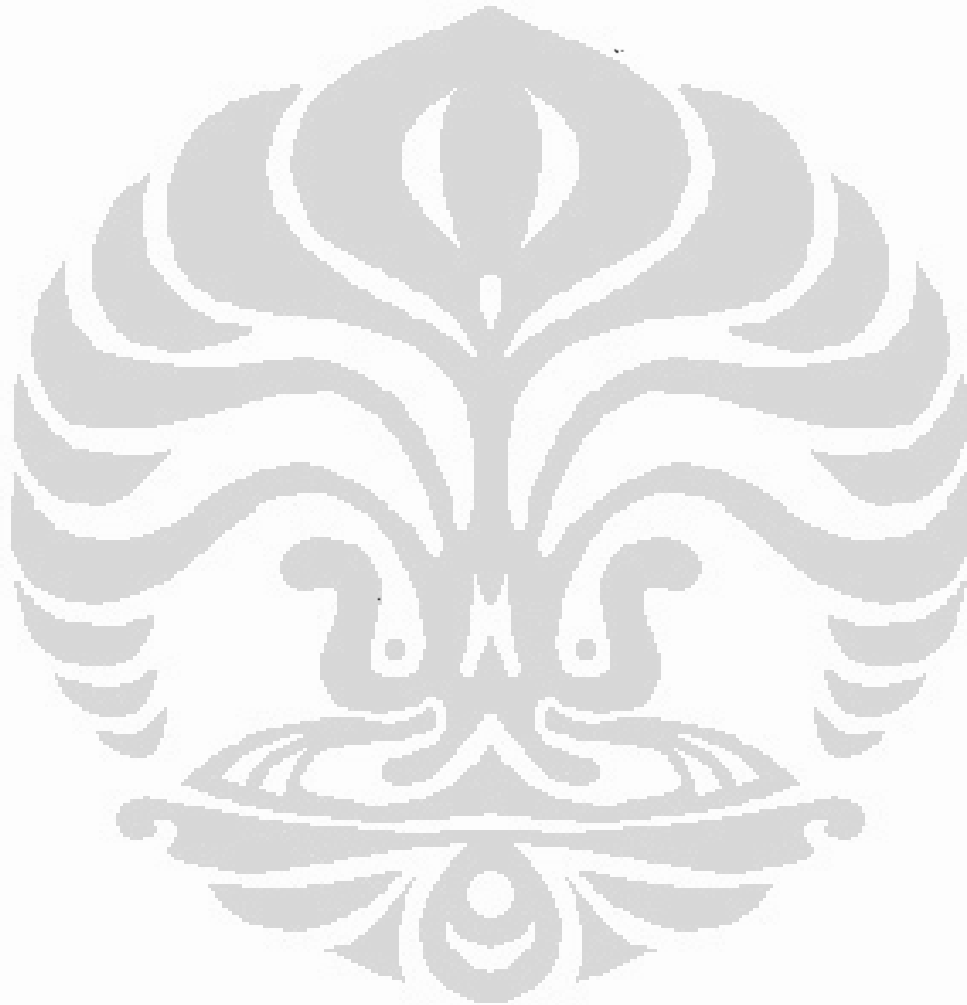
Real-time PCR adalah suatu metode analisa yang dikembangkan dari reaksi PCR. Dalam ilmu biologi molekuler, *real-time* PCR juga dikenal sebagai *quantitative real time polymerase chain reaction* (Q-PCR/qPCR/rPCR) atau *kinetic polymerase chain* adalah suatu tehnik pengerjaan PCR di laboratorium untuk mengamplifikasi sekaligus menghitung (kuantifikasi) jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi tersebut. *Real-time* PCR memungkinkan dilakukannya deteksi dan kuantifikasi sekaligus terhadap sekuens spesifik dari sampel DNA yang dianalisa.²⁰ Keunggulan *real-time* PCR dibandingkan dengan tehnik PCR konvensional antara lain sensitifitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dan waktu analisa yang lebih singkat karena tidak perlu dilakukan elektroforesis.²⁷

Real-time PCR merupakan suatu perangkat platform instrumentasi yang terdiri atas satu buah *thermal cycler*, satu buah komputer, lensa untuk eksitasi fluoresen dan pengumpul emisi serta perangkat lunak untuk analisis data. Setiap perusahaan memproduksi *real-time* PCR dengan standar perangkat platform yang sama, namun berbeda dalam hal kapasitas sampel, metode eksitasi dan tingkat sensitifitas.^{28,29}

Prinsip kerja *real-time* PCR adalah mendeteksi dan mekuantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR dalam reaksi. Dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus, reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau. Makin tinggi tingkat produk DNA target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi.^{28,29}

Berbeda dengan PCR konvensional, pada *real-time* PCR tahap deteksi dan tahap penggandaan materi genetik dilakukan secara bersamaan (simultan), Hal ini menawarkan beberapa keunggulan yaitu: deteksi produk PCR dilakukan pada fase eksponensial sehingga hasil yang diperoleh berada pada rentang daerah dengan

presisi tinggi. Selain itu deteksi dilakukan menggunakan pelacak bertanda fluoresen. Pelacak adalah reagen yang menentukan kespesifikan hasil. Penggunaan fluoresen dalam tahap deteksi menawarkan sensitifitas yang tinggi. Dengan demikian *real-time* PCR menawarkan sensitifitas yang tinggi dan rentang linearitas yang cukup luas sehingga hasil penentuan kandungan DNA atau RNA di dalam spesimen menjadi sangat akurat.⁹

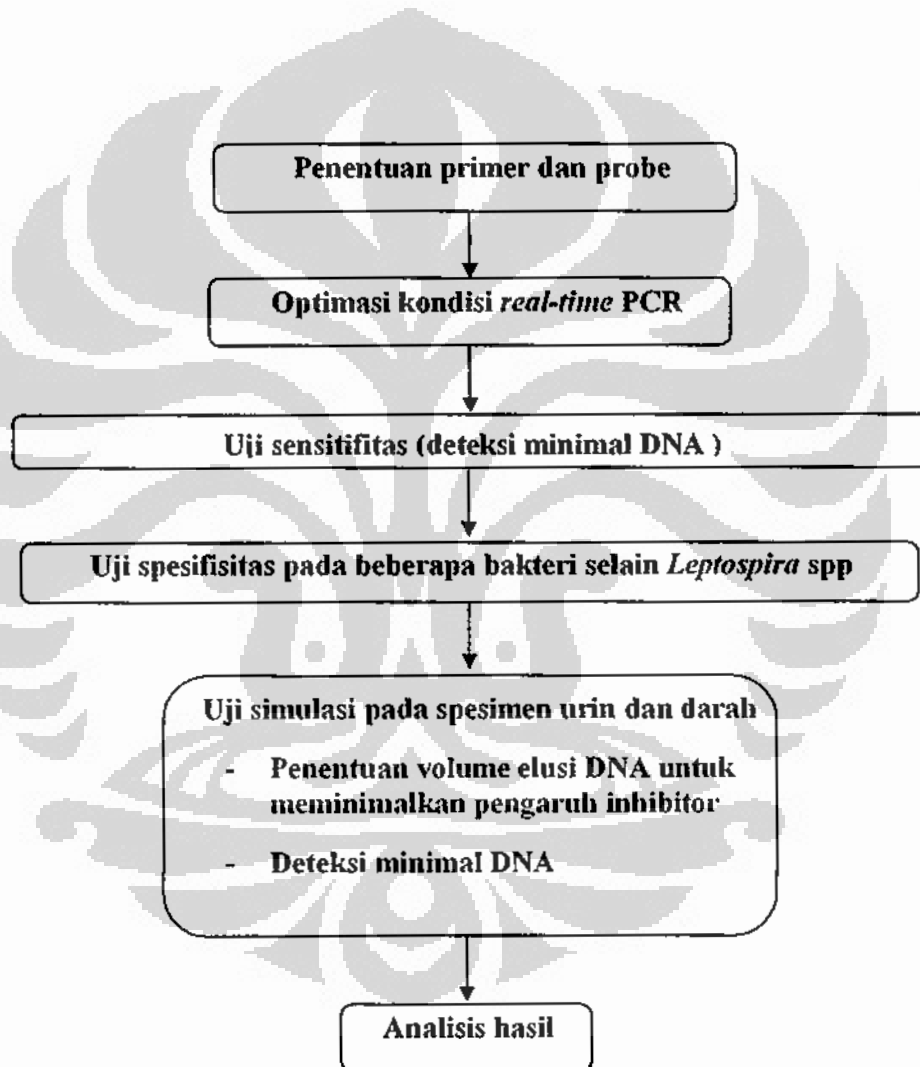


BAB III METODOLOGI

3.1. Disain Penelitian

Disain yang digunakan dalam penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium yang bersifat analisis deskriptif.

3.2. Alur Penelitian



3.3. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) pada Oktober 2010-Juni 2011.

3.4. Bahan dan Cara kerja

3.4.1. DNA bakteri standar

DNA bakteri standar *Leptospira* spp patogen diperoleh dari Rudy A Haartkeel, MD, PhD, Slotevart University, Amsterdam.

3.4.2. Primer dan Probe

Primer dan probe yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Smythe et al.¹¹ Sekuen primer dan probe dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Sekuen primer dan probe¹¹

No	Nama	Sekuens	bp
1.	Lep-patF primer	5' ¹⁷¹ CCCGCGTCCGATTAG 3'	15
2.	Lep-patR primer	5' ²⁵⁸ TCCATTGTGGCCGR ^{AG} ACAC 3'	18
3.	Lep-patP Probe	5' ²⁰⁵ (FAM) CTCACCAAGGCGACGA TCGGTAGC ²²⁸ 3' (TAMRA)	24

3.4.3. Ekstraksi DNA dan reagen *real-time* PCR (rPCR)

3.4.3.1. Ekstraksi DNA bakteri dari kultur

Ekstraksi DNA pada penelitian ini menggunakan kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)* dengan cara sebagai berikut: sebanyak 1 ml suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam tabung ependorf 1,5 ml dan disentrifugasi selama 5 menit pada 12.000 rpm. Kemudian supernatan dibuang, pelet ditambahkan dengan 20 µl proteinase K dan selanjutnya ditambahkan buffer ATL 180 µl. Campuran di vortex selama 15 detik lalu diinkubasi pada suhu 56°C selama 3 jam. Campuran lalu disentrifus selama 15 detik kemudian ditambahkan 200 µl buffer AL. Campuran divortex selama 15 detik, kemudian diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit, dan selanjutnya disentrifugasi selama 15 detik. Campuran lalu

ditambahkan 200 µl ethanol (96-100%), divortex selama 15 detik, dan disentrifugasi selama 15 detik. Selanjutnya campuran dimasukkan ke dalam *QIAamp spin column*, lalu tabung ditutup dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. *QIAamp DNA spin column* ditempatkan kedalam tabung pengumpul yang baru (tabung ependorf 1,5 ml), selanjutnya ditambahkan 500 µl buffer AW1, lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Setelah selesai, *QIAamp DNA spin column* ditempatkan kedalam tabung pengumpul baru (tabung ependorf 1,5 ml), kemudian ditambahkan 500 µl buffer AW2, lalu dilanjutkan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya tabung pengumpul dibuang dan *spin column* ditempatkan kedalam tabung ependorf 1,5 ml steril. Kemudian ditambahkan buffer AE sebanyak 40 µl, inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit dan disentrifugasi kembali pada 12.000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya hasil elusi yang mengandung DNA disimpan pada suhu -20°C sampai saat digunakan.

3.4.3.2. Ekstraksi DNA dari darah

Dua ratus mikroliter darah ditambah dengan 20 µl proteinase K dan 200 µl buffer AL. Campuran divortex selama 15 detik lalu diinkubasi pada suhu 56°C selama 15 menit. Campuran ditambah dengan DNA bakteri standar, lalu disentrifugasi selama 15 detik, selanjutnya ditambahkan 200 µl ethanol (96-100%). Campuran divortex selama 15 detik, lalu dimasukkan ke dalam *QIAamp spin column*, dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 1 menit. *QIAamp DNA spin column* ditempatkan kedalam tabung pengumpul yang baru (tabung ependorf 1,5 ml), selanjutnya ditambahkan 500 µl buffer AW1, lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Setelah selesai, *QIAamp DNA spin column* ditempatkan kedalam tabung pengumpul baru (tabung ependorf 1,5 ml), kemudian ditambahkan 500 µl buffer AW2, lalu dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya tabung pengumpul dibuang dan *spin column* ditempatkan kedalam tabung ependorf 1,5 ml steril. Kemudian ditambahkan buffer AE sebanyak 40 µl, inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit dan disentrifugasi kembali pada 12.000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya hasil elusi yang mengandung DNA disimpan pada suhu -20°C sampai saat digunakan.

3.4.3.3. Ekstraksi DNA dari urin

Sebanyak 190 µl urin ditambah dengan 1 ml buffer ASL, lalu vortex selama 1 menit dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 5 menit. Selanjutnya campuran ditambah dengan DNA bakteri standar. Campuran lalu divortex selama 15 detik dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya, supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung ependorf, kemudian ditambah dengan satu tablet inhibitEX. Campuran divortex selama 15 detik, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Selanjutnya, campuran disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan dalam tabung baru, lalu disentrifugasi 12.000 rpm selama 3 menit. Dua ratus mikroliter supernatan dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung 15 µl proteinase K. Campuran ditambah dengan 200 µl buffer AL, divortex 15 detik lalu inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Campuran kemudian ditambah dengan 200 µl ethanol (96-100%) lalu vortex selama 15 detk. Campuran dipindahkan kedalam tabung *QIAamp DNA spin column*, disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. *QIAamp DNA spin column* ditempatkan kedalam tabung pengumpul yang baru (tabung ependorf 1,5 ml), selanjutnya ditambahkan 500 µl buffer AW1, lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Setelah selesai, *QIAamp DNA spin column* ditempatkan kedalam tabung pengumpul baru (tabung ependorf 1,5 ml), kemudian ditambahkan 500 µl buffer AW2, lalu dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya tabung pengumpul dibuang dan *spin column* ditempatkan kedalam tabung ependorf 1,5 ml steril. Kemudian ditambahkan buffer AE sebanyak 40 µl, inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit dan disentrifugasi kembali pada 12.000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya hasil elusi yang mengandung DNA disimpan pada suhu -20°C sampai saat digunakan.

3.4.4. Pengukuran konsentrasi DNA

Alat *ThermoScientific NanoDrop spectrophotometer* digunakan untuk mengukur konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA hasil ekstraksi.

3.5. Optimasi kondisi *real-time* PCR (rPCR)

3.5.1. Optimasi Suhu Annealing

Optimasi suhu annealing dilakukan dengan teknik rPCR bergradien pada kisaran suhu 56°C-66°C. Amplifikasi dilakukan dalam 25 µl reaksi PCR yang terdiri dari *FastStart TaqMan Probe Master* 12.5 µl, 0.9 µM setiap primer forward dan reverse, 0,2 µM probe, 2 µl cetakan DNA bakteri standar, dan ditambah *distilled water* sampai total volume 25 µl.

Proses amplifikasi menggunakan mesin *PCR-IQTM5, icycler Multicolor real-time PCR detection system* (Bio-Rad). Tahapan reaksi amplifikasi terdiri dari denaturasi awal dan aktivasi enzim pada suhu 95°C selama 10 menit; 45 siklus: denaturasi pada 95°C selama 15 detik, annealing dan elongasi pada 56°C – 66°C (gradien) selama 1 menit. Kondisi optimum ditentukan berdasarkan nilai *ct* (*threshold cycle*) dan *substracted signal* (kumpulan sinyal fluoresen). Semakin rendah nilai *ct* dan *substracted signal* yang tinggi menunjukkan efisiensi amplifikasi yang semakin baik.

3.5.2. Optimasi Konsentrasi Primer

Optimasi dilakukan pada konsentrasi yang berbeda yaitu 0,45 µM, 0,9 µM, 1,35 µM, 1,8 µM, 2,25 µM, dan 2,7 µM. Amplifikasi dilakukan pada volume reaksi 25 µl dengan kondisi reaksi sama dengan kondisi optimasi suhu annealing kecuali untuk konsentrasi primer. Untuk suhu annealing pada tahap ini menggunakan suhu optimum annealing yang sudah didapat. Reaksi dilakukan secara duplo.

3.5.3. Optimasi Konsentrasi Probe

Optimasi konsentrasi probe dilakukan pada konsentrasi akhir 0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM, 0,4 µM, 0,5 µM. Amplifikasi dilakukan pada volume reaksi 25 µl dengan kondisi campuran reaksi sama dengan campuran reaksi dengan konsentrasi primer optimal 0,9 µM. Reaksi dibuat secara duplo.

3.6. Sensitifitas *real-time* PCR (rPCR)

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan uji rPCR dalam mendeteksi jumlah minimal DNA. DNA bakteri standar diencerkan secara berseri (10^{-1} - 10^{-8}) dengan jumlah masing-masing sebanyak 15×10^{-3} - 15×10^{-10} ng/µl.

Sebanyak 5 µl digunakan sebagai cetakan sehingga total konsentrasi DNA untuk masing-masing pengenceran adalah 75×10^{-3} - 75×10^{-10} ng per reaksi.

Reaksi rPCR dilakukan dengan komposisi sebagai berikut: *FastStart TaqMan Probe Master* 12,5 µl, 0,9 µM setiap primer forward dan reverse, 0,2 µM probe, 5 µl cetakan DNA dari pengenceran berseri, dan ditambah *distilled water* sampai total volume 25 µl. Kondisi rPCR dilakukan pada kondisi sebagai berikut: 95°C selama 10 menit (aktivasi enzim), 45 siklus dari 95°C selama 15 detik dan 60°C selama 1 menit. Reaksi dilakukan duplo.

3.7. Spesifisitas *real-time* PCR (rPCR)

Spesifisitas rPCR diuji terhadap berbagai bakteri patogen lain yang dapat diisolasi dari spesimen urin dan darah. Bakteri yang digunakan untuk uji spesifisitas adalah *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* dan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

DNA bakteri diisolasi dari kultur menggunakan kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) dengan prosedur sebagaimana dijelaskan pada Sub Bab 3.4.3.1. Reaksi rPCR dilakukan dengan komposisi sebagai berikut: *FastStart TaqMan Probe Master* 12,5 µl, 0,9 µM setiap primer forward dan reverse, 0,2 µM probe, 5 µl cetakan DNA (2,5 ng DNA), dan ditambah *distilled water* sampai total volume 25 µl. Kondisi rPCR dilakukan pada kondisi sebagai berikut: 95°C selama 10 menit (aktivasi enzim), 45 siklus dari 95°C selama 15 detik dan 60°C selama 1 menit. Reaksi dilakukan duplo.

3.8. Uji Simulasi

Pada uji simulasi ini digunakan urin dan darah manusia yang tidak mengandung *Leptospira*. Sebelum sampel tersebut dijadikan untuk uji simulasi terlebih dahulu dilakukan reaksi rPCR deteksi *Leptospira* spp patogen. Selanjutnya, urin dan darah negatif *Leptospira* spp patogen ditambah dengan DNA *Leptospira* standar. Ekstraksi DNA dari darah dan urin dilakukan masing-masing menggunakan kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) dan *QIAamp*

DNA Stool Mini Kit (Qiagen) dengan prosedur sebagaimana dijelaskan pada Sub Bab 3.4.3.2 dan 3.4.3.3.

Untuk sampel urin dan darah, beberapa parameter dioptimasi termasuk deteksi minimal DNA, volume cetakan optimal, dan analisis kemungkinan adanya inhibitor pada sampel tersebut.

3.9. Analisis dan Penyajian data

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bersifat analisis deskriptif. Data hasil optimasi laboratorium disajikan sebagai data primer dan dianalisis secara deskriptif secara kepustakaan.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Optimasi *real-time Polymerase Chain Reaction* (rPCR)

Pada penelitian ini, optimasi *real-time* PCR dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan kondisi optimal amplifikasi DNA. rPCR dilakukan menggunakan sepasang primer dengan susunan nukleotida sesuai dengan penelitian yang dilaporkan oleh Smythe et al.¹¹ Primer dan probe dirancang berdasarkan sekuens gen *rrs* (16S). Target primer pada posisi antara 171 dan 258 dengan produk amplifikasi 87 bp. Primer dan probe telah dirancang spesifik untuk mendeteksi seluruh *Leptospira* spp patogen.

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan optimasi sistem uji diagnostik molekuler menggunakan rPCR sebagai deteksi cepat, sensitif dan spesifik untuk deteksi *Leptospira* spp patogen pada manusia. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan optimasi beberapa parameter yang dapat mempengaruhi validitas hasil uji rPCR. PCR konvensional dan rPCR telah banyak dikembangkan dan digunakan untuk mendeteksi *Leptospira*. Jika dibandingkan antara PCR konvensional dan rPCR, PCR konvensional memiliki kelemahan, diantaranya sensitif dan spesifisitas yang rendah, hasil uji lebih lama dikeluarkan, dan berpotensi mengkontaminasi lingkungan kerja.

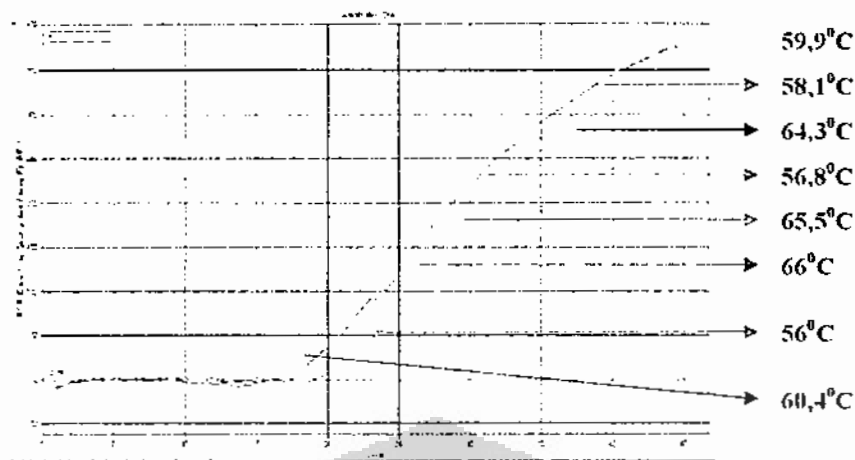
Beberapa uji berbasis PCR telah banyak dikembangkan diantaranya oleh beberapa peneliti.^{11,31,32,33,34,35} Levett et al, telah mengembangkan rPCR untuk deteksi *Leptospira* dengan menggunakan penanda Sybr Green.¹⁹ Sybr Green mempunyai kelebihan karena harga lebih murah dibandingkan dengan rPCR berbasis probe. Akan tetapi Sybr Green kurang spesifik karena dapat berikatan dengan semua DNA untai ganda sehingga mungkin akan memberikan hasil positif palsu bila dibandingkan dengan menggunakan probe. Saat ini rPCR juga banyak dikembangkan untuk mendeteksi *Leptospira* baik dari sampel lingkungan oleh Smythe et al, maupun dari ginjal hewan yang terinfeksi oleh Fearnley et al.^{11,37} Kedua peneliti tersebut menggunakan rPCR berbasis probe. Seperti halnya Smythe et al, mereka menggunakan rPCR berbasis probe untuk meningkatkan spesifisitas uji. Fearnley et al, mengembangkan rPCR yang juga berbasis probe

yang mampu mendeteksi semua *Leptospira* termasuk *Leptospira inadai*, akan tetapi tidak mampu mendeteksi dua strain non patogen yaitu *Leptospira biflexa* serovar patoc dan *Leptospira meyeri* serovar semarang.³⁷

Primer dan probe yang digunakan dalam penelitian yang dilakukan smythe et al, mampu mendeteksi semua *Leptospira* patogen seperti *L.weilii* serovar celloni, *L.interrogans* serovar bataviae, *L.interrogans* serovar canicola, *L.interrogans* serovar copenhageni, *L.borgpeterseni* serovar javanica, *L.borgpeterseni* serovar ballum, *L.interrogans* serovar kremastos, *L.borgpeterseni* serovar hardjo, *L.interrogans* serovar grippotyphosa, *L.interrogans* serovar djasiman, *L.borgpeterseni* serovar tarassovi, *L.interrogans* serovar australis, *L.interrogans* serovar medanensis, *L.noguchi* serovar panama, *L.interrogans* serovar robinsoni, *L.kirschneri* serovar bulgarica, *L.interrogans* serovar szwajizak, *L.interrogans* pomona, *L.fainei* serovar hurstbridge, *L.interrogans* serovar zanoni, *L.kirschneri* serovar cynopteri, *L.santarosai* serovar shermani.¹¹ Untuk studi awal, sistem uji yang dioptimasi dalam penelitian ini juga mampu mendeteksi beberapa *Leptospira* spp patogen yang digunakan sebagai kontrol positif seperti *L.interrogans ichterohaemorrhagic* serovar copenhagen M 20, *L.interrogans autumnalis* serovar autumnalis strain akiyami A, *Leptospira pyrogenes salinem*, *Leptospira grippotyphosa* serovar grippotyposa strain duyster, *Leptospira ranarum* serovar ranarum ICF, *Leptospira bataviae* serovar batavia van tienem, *Leptospira borgpetersenii* ballum serovar ballum strain MUS 127. DNA *Leptospira* spp tersebut merupakan koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI yang didapat dari Slotteart University, Amsterdam.

4.1.1. Optimasi Suhu Annealing

DNA bakteri *Leptospira* spp digunakan untuk mengoptimasi kondisi reaksi *real-time* PCR (rPCR) dengan gradien suhu annealing berkisar 56°C, 56,8°C, 58,1°C, 59,9°C, 60,4°C, 64,3°, 65,5°C, 66°C (*PCR-IQ™5*, *icycler Multicolor real-time PCR detection system* [Bio-Rad]). Hasil gradien rPCR pada suhu tersebut memperlihatkan bahwa suhu annealing pada 59,9°C (\approx 60°C) memberikan kondisi amplifikasi yang optimal (Gambar 6).



Gambar 6. Hasil uji deteksi DNA *Leptospira* spp menggunakan *real-time* PCR dengan berbagai suhu annealing . Suhu annealing dengan hasil amplifikasi DNA terbaik adalah suhu 59,9°C (\approx 60°C). Keterangan gambar: 1. Kuning : suhu 59,9°C; 2. Hijau muda : suhu 58,1°C; 3. Biru tua : suhu 60,4°C; 4. Orange : suhu 56,8°C; 5. Merah : suhu 64,3°C; 6. Biru muda : suhu 65,5°C; 7. Hijau tua : suhu 66°C; 8. Merah muda : suhu 56°C.

Dasar pemilihan suhu annealing tersebut berdasarkan pada nilai ct yang terendah dan *substracted signal* yang terbentuk. Nilai ct (*threshold cycle*) rendah adalah titik dimana signal fluoresen muncul dan di atas nilai *cut off*, sedangkan *substracted signal* menunjukkan tingginya atau banyaknya signal fluoresen dibaca oleh filter mesin rPCR dan stabilitas dari kurva yang terbentuk (Gambar 6). Kedua parameter tersebut menunjukkan efisiensi amplifikasi oleh reaksi rPCR. Pada Gambar 6 terlihat bahwa suhu annealing 59,9°C (\approx 60°C) menunjukkan nilai ct terendah dan *substracted signal* yang tinggi dibandingkan suhu annealing lainnya. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa suhu anealing 59,9°C (\approx 60°C) memberikan hasil amplifikasi signal yang lebih baik dibandingkan suhu annealing lainnya.

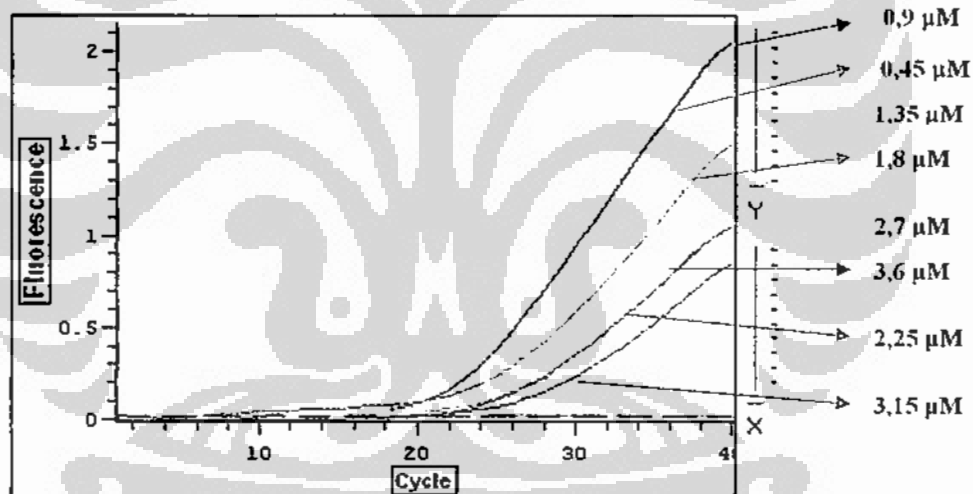
Kondisi suhu annealing pada reaksi rPCR mempengaruhi efisiensi penempelan primer dan probe. Primer berfungsi sebagai penginisiasi reaksi polimerase DNA secara invitro. Selain itu primer juga berfungsi untuk membatasi daerah yang akan diamplifikasi pada reaksi PCR. Untuk menempel pada target PCR, maka primer dan probe membutuhkan suhu yang sesuai. Dari penelitian ini didapat bahwa suhu 59,9°C (\approx 60°C) dengan waktu 1 menit merupakan suhu yang paling optimum untuk annealing. Hasil yang didapatkan ini sama seperti yang digunakan pada penelitian yang dilakukan oleh Smythe et al.¹¹ Sementara dengan menggunakan metode yang sama, Fearnley et al, menggunakan suhu annealing

55°C selama 15 detik.³⁷ Perbedaan suhu annealing tersebut dikarenakan susunan nukleotida primer dan probe yang berbeda memiliki penempelan optimal pada target dengan suhu berbeda pula.

Secara teknis, pada proses amplifikasi yang efisien dibutuhkan pengaturan suhu untuk penempelan primer yang spesifik. Apabila suhu yang digunakan terlalu tinggi, dapat menyebabkan kegagalan penempelan primer dan probe pada cetakan DNA. Jika terlalu rendah, primer dan probe dapat menempel pada tempat yang salah. Kedua kondisi ini akan menghasilkan amplifikasi signal yang rendah (*ct/threshold cycle yang tinggi dan/atau subtracted signal yang rendah*).^{11, 34,37}

4.1.2. Optimasi Konsentrasi Primer

Hasil optimasi primer yang digunakan dalam *real-time* PCR (rPCR) menunjukkan bahwa pada primer dengan konsentrasi 0,9 μM memperlihatkan hasil amplifikasi signal terbaik dibandingkan dengan konsentrasi lainnya (Gambar 7).



Gambar 7. Hasil uji deteksi DNA *Leptospira* spp menggunakan beberapa macam konsentrasi primer. Terlihat bahwa kondisi optimal konsentrasi primer yang didapat adalah pada konsentrasi 0,9 μM .

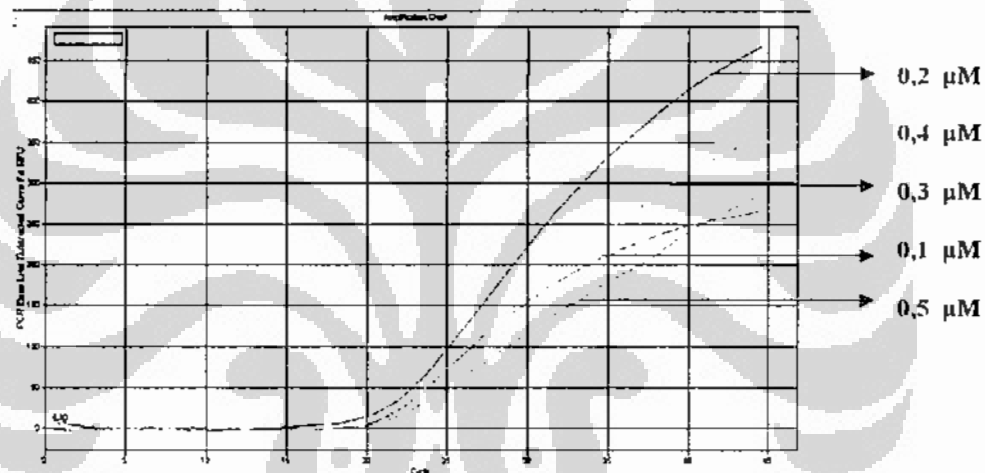
Selain dipengaruhi oleh suhu annealing, hasil reaksi PCR juga dipengaruhi oleh konsentrasi primer. Pada penelitian yang dilakukan oleh Smythe et al, konsentrasi primer optimal yang digunakan adalah 3 $\text{pmol}/\mu\text{l}$.¹¹ Adapun penelitian lain menggunakan konsentrasi primer 0,3 μM dan 0,5 μM .^{19,37} Perbedaan konsentrasi primer tersebut disebabkan oleh sistem uji yang digunakan

termasuk enzim yang digunakan, volume total reaksi, konsentrasi probe, metode sintesis primer, dan sekuen DNA primer yang menentukan berat molekul primer.

Dalam uji PCR, primer berperan dalam inisiasi reaksi polimerasi DNA secara *in vitro*, karena tanpa primer, reaksi polimerasi tidak akan terjadi meskipun enzim dan komponen lainnya sudah tersedia. Selain itu primer juga berfungsi untuk membatasi daerah mana yang akan diamplifikasi pada reaksi PCR.³⁴

4.1.3. Optimasi konsentrasi probe

Beberapa konsentrasi probe dioptimasi dalam penelitian ini, yaitu 0,1 μM , 0,2 μM , 0,3 μM , 0,4 μM , dan 0,5 μM . Hasil uji ini memperlihatkan bahwa kondisi optimal konsentrasi probe yang didapat adalah konsentrasi 0,2 μM (Gambar. 8).



Gambar 8. Hasil uji *real-time* PCR untuk deteksi DNA *Leptospira* spp menggunakan beberapa konsentrasi probe. Terlihat bahwa kondisi optimal konsentrasi probe yang didapat adalah pada konsentrasi 0,2 μM .

Pada penelitian ini digunakan metode rPCR berbasis probe. Probe merupakan suatu fragmen DNA yang dilabel dan mempunyai urutan nukleotida yang berkomplementer dengan produk amplifikasi PCR spesifik. Penggunaan probe akan lebih spesifik dibandingkan penggunaan Syber green sebagai penanda pada rPCR. Selain urutan nukleotida yang sesuai dengan target, efisiensi penempelan probe juga dipengaruhi oleh suhu annealing dan konsentrasi probe. Pada penelitian ini didapatkan bahwa konsentrasi akhir yang paling optimum adalah 0,2 μM . Sama dengan penelitian lainnya, konsentrasi probe yang digunakan adalah 0,2 μM .^{11,19}

Tabel 5. Konsentrasi primer dan probe yang memberikan hasil reaksi *real-time* PCR paling optimal pada suhu annealing 60°C.

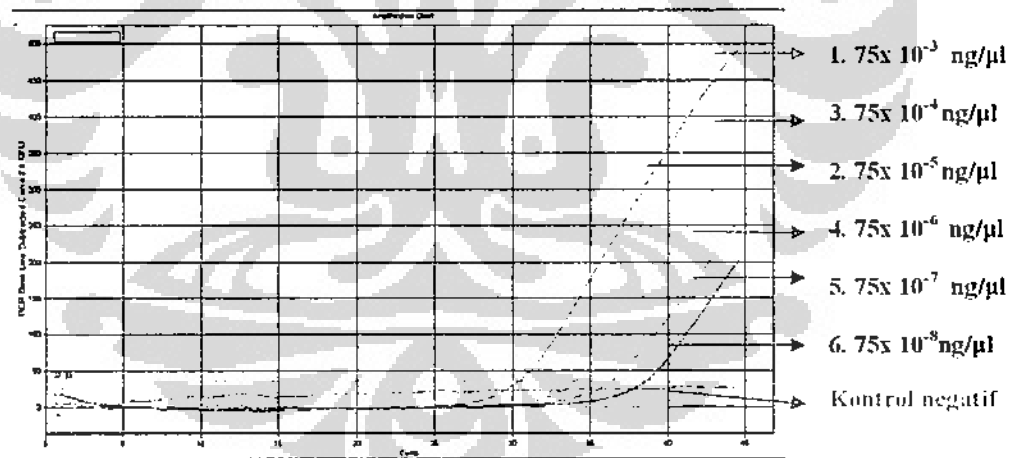
Primer dan Probe	Konsentrasi (μM)
Lep-patF primer	0,9
Lep-patR primer	0,9
Lep-patP probe	0,2

Komposisi dan kondisi optimal reaksi *real-time* PCR (rPCR)

Dari ketiga optimasi yang telah dilakukan, yaitu optimasi suhu annealing, konsentrasi primer dan probe, diperoleh komposisi dan kondisi optimal reaksi rPCR sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 5.

4.2. Sensitifitas berdasarkan konsentrasi DNA

Sensitifitas pengujian *real-time* PCR (rPCR) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi DNA bakteri standar terendah yang masih dapat dideteksi oleh rPCR. Batas minimal DNA yang masih terdeteksi rPCR ini mencapai 75×10^{-8} per reaksi atau 0,75 fg/ μl per reaksi (Gambar 9).



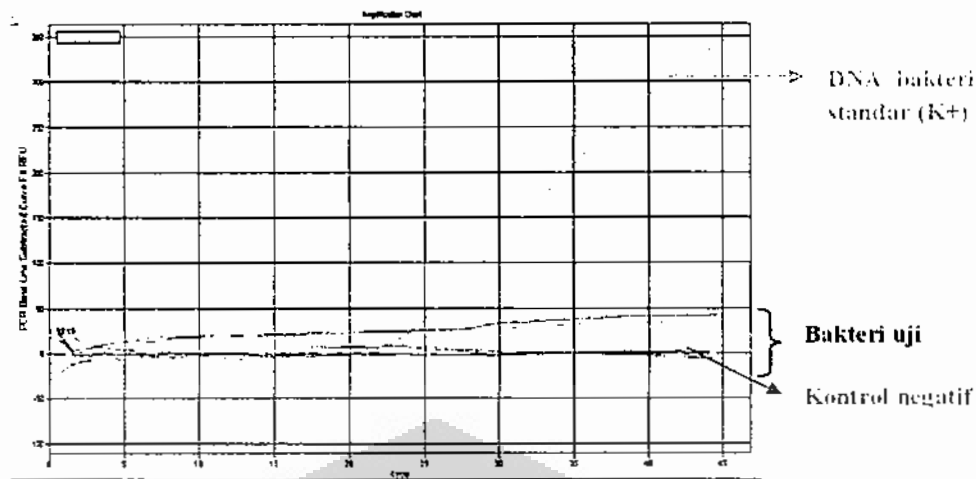
Gambar 9. Hasil *real-time* PCR (rPCR) dengan beberapa macam konsentrasi DNA standar. Terlihat bahwa konsentrasi DNA terendah yang memberikan hasil amplifikasi paling optimal adalah 0,75 fg/ μl . Keterangan gambar 1. Hijau: 75×10^{-3} ng/ μl ; 2. Biru muda: 75×10^{-4} ng/ μl ; 3. Biru tua: 75×10^{-5} ng/ μl ; 4. Merah muda: 75×10^{-6} ng/ μl ; Merah: 75×10^{-7} ng/ μl ; 6. Ungu: 75×10^{-8} ng/ μl (0,75 fg/ μl); Hijau: Kontrol negatif

Penelitian yang dilakukan oleh Levett et al, menunjukkan bahwa sensitifitas rPCR dengan menggunakan primer dan probe yang sama dengan penelitian ini adalah 3 genom per reaksi. Sementara penelitian yang dilakukan oleh Fonseca et al, sensitifitas deteksi *Leptospira* dengan menggunakan metode PCR konvensional menunjukkan konsentrasi terendah sekitar 10^{-5} ng DNA. Fearnley et al, menggunakan primer daerah yang lestari dari 16S rRNA gen *Leptospira* menunjukkan konsentrasi terendah yang dapat dideteksi adalah 10 molekul DNA.^{19,36,37}

4.3. Spesifisitas *real-time* PCR (rPCR)

Untuk mengetahui spesifisitas primer dan probe yang digunakan pada metode ini maka dilakukan uji menggunakan beberapa spesies bakteri patogen lain yang dapat di deteksi dari urin dan darah. Bakteri yang digunakan adalah *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 45923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* dan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Bakteri yang digunakan ini adalah koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI.

Hasil rPCR menunjukkan bahwa primer dan probe yang digunakan untuk deteksi bakteri *Leptospira* spp tidak bereaksi silang dengan genom bakteri-bakteri tersebut (Gambar 10).



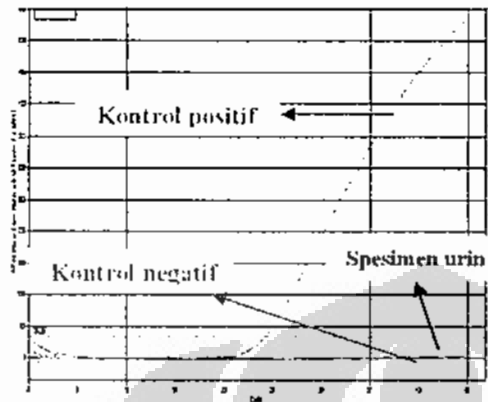
Gambar 10. Hasil uji spesifisitas *real-time* PCR memperlihatkan bahwa bakteri *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 45923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* dan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv tidak bereaksi silang dengan primer yang digunakan untuk deteksi *Leptospira* spp patogen; Merah: Kontrol negatif

Smythe et al, peneliti yang mendesain primer yang digunakan dalam penelitian ini, juga sebelumnya mengevaluasi spesifisitas primer terhadap 22 bakteri uji selain *Leptospira* spp. Hasil evaluasi tersebut tidak menunjukkan reaksi silang terhadap ke 22 bakteri uji yaitu *Escherichia coli* 10418, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* 9001, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Salmonella salford*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella dublin*, *Borrelia burgdorferi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria seeligeri* dan *Listeria monocytogenes*.¹¹

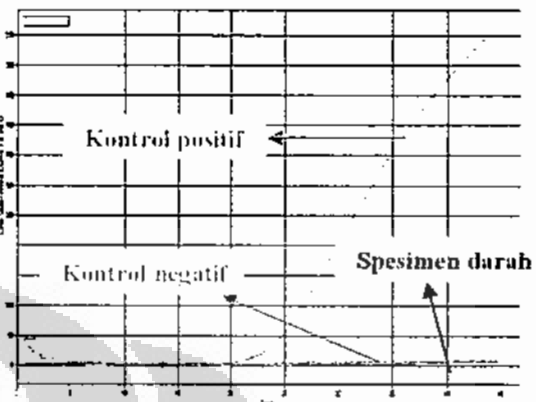
4.4. Uji Simulasi

Uji simulasi pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa metode ekstraksi DNA dari spesimen urin dan darah manusia tidak menyertakan zat tertentu ke dalam ekstrak DNA sehingga dapat mengganggu atau menghambat proses amplifikasi DNA. Selain itu pada tahap ini digunakan beberapa konsentrasi DNA standar untuk mengetahui deteksi minimal DNA pada spesimen urin maupun darah. Uji ini dilakukan menggunakan spesimen urin dan darah manusia

yang telah dibuktikan sebelumnya tidak mengandung DNA *Leptospira* spp (Gambar 11a dan 11b).



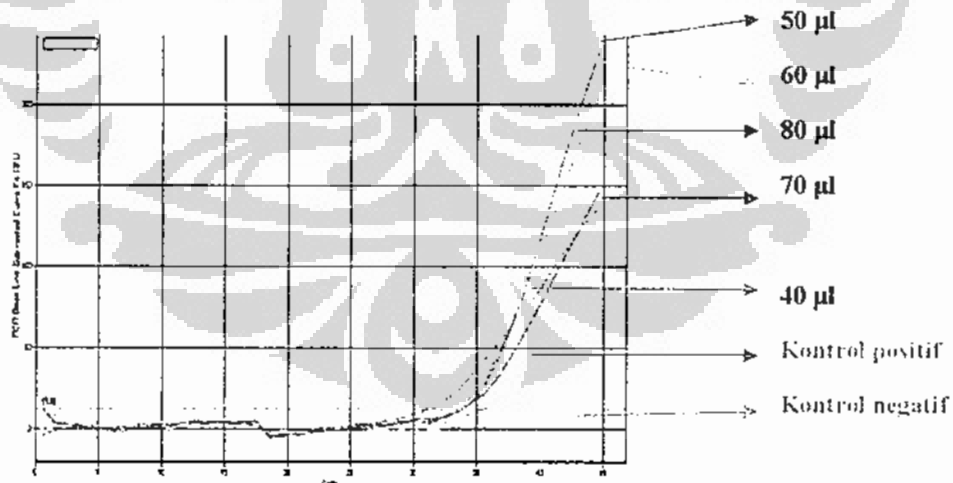
Gambar 11a. Hasil uji simulasi urin yang tidak mengandung DNA *Leptospira* spp
Biru: Kontrol positif; Hijau; Kontrol negatif



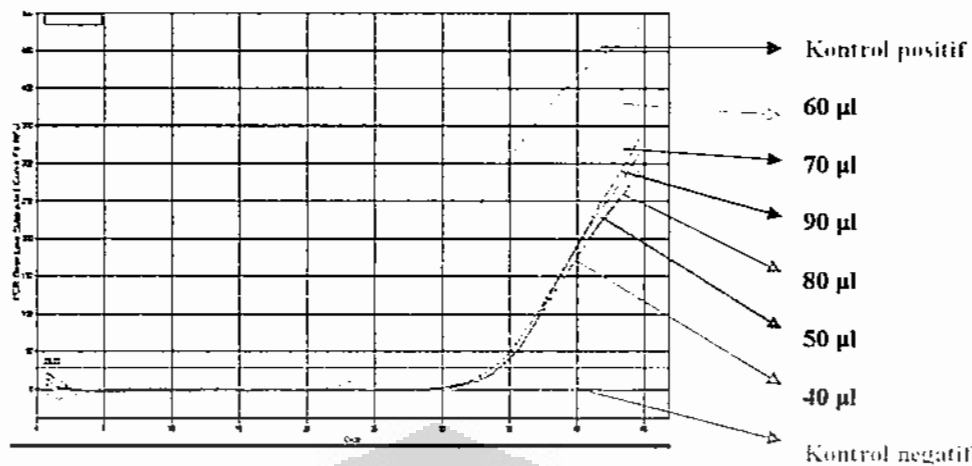
Gambar 11b. Hasil uji simulasi darah yang tidak mengandung DNA *Leptospira* spp
Merah: Kontrol positif; Ungu: Kontrol negatif

A. Penentuan volume elusi DNA untuk meminimalkan pengaruh inhibitor

Uji ini dilakukan untuk mendapat volume optimal yang digunakan sebagai cetakan untuk reaksi rPCR dari spesimen urin dan darah. Berdasarkan uji ini, volume optimal elusi dari spesimen urin dan darah masing-masing adalah 50 μ l dan 60 μ l seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12 dan Gambar 13.



Gambar 12. Uji volume optimal elusi rPCR pada spesimen urin. Berdasarkan hasil uji ini didapat volume optimal elusi dari spesimen urin adalah 50 μ l. Keterangan gambar. Hijau: 50 μ l; Biru muda: 60 μ l; Merah: 80 μ l; Biru; 70 μ l; Hijau muda: 40 μ l; Hijau tua: Kontrol positif; Biru muda: Kontrol negatif



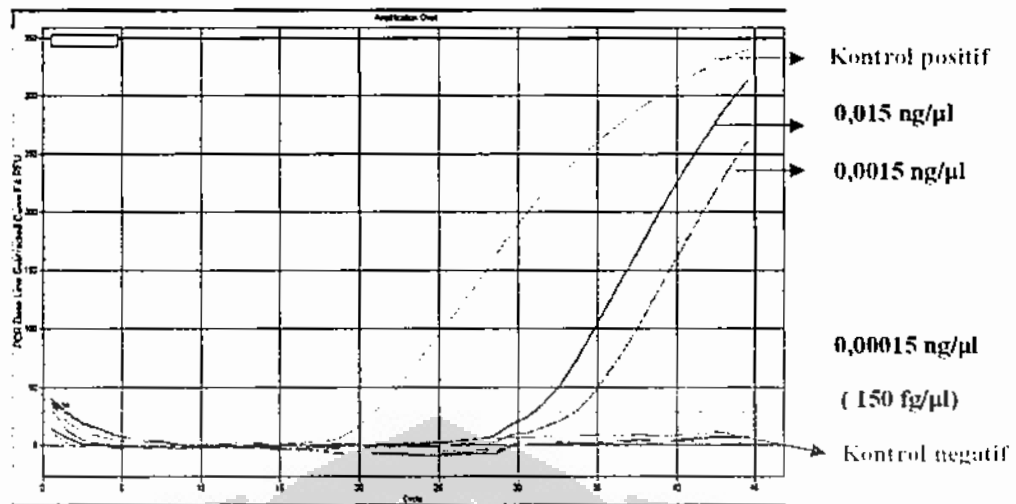
Gambar 13. Uji volume optimal elusi rPCR pada spesimen darah. Berdasarkan hasil uji ini didapat volume optimal elusi dari spesimen darah adalah 60 µl. Keterangan gambar. Merah: Kontrol positif; Biru muda: 60 µl; Biru tua: 70 µl; Merah tua: 90 µl; Merah muda: 80 µl; Hijau tua: 50 µl; Hijau muda: 40 µl; Merah muda: Kontrol negatif

Pada volume elusi yang lebih kecil, hasil rPCR menunjukkan efisiensi amplifikasi yang rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya inhibitor yang terdapat di dalam suspensi hasil ekstraksi DNA dengan volume elusi 40 µl pada spesimen urin atau volume elusi 40 µl dan 50 µl pada spesimen darah. Salah satu cara untuk mengeliminasi adanya inhibitor, yaitu dengan meningkatkan volume elusi ketika ekstraksi DNA dari sampel tertentu.

Adapun pada elusi DNA dengan volume yang lebih besar dari 40 µl yang didapat dari uji volume optimal elusi rPCR pada spesimen urin atau 50 µl yang didapat dari uji volume optimal elusi rPCR pada spesimen darah, memberikan hasil rPCR yang tidak efisien. Hal ini tidak disebabkan oleh adanya inhibitor melainkan konsentrasi DNA yang semakin rendah akibat volume yang besar.

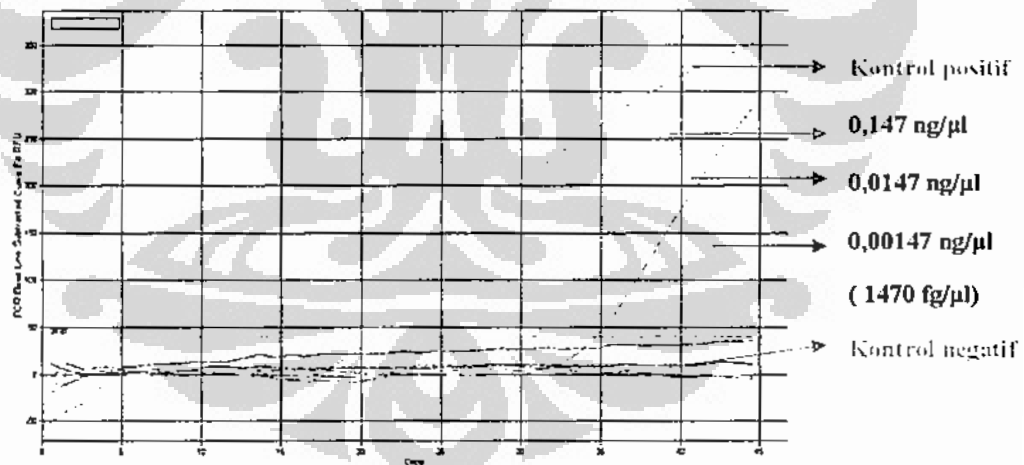
B. Deteksi minimal DNA pada darah dan urin

Hasil uji *real-time* PCR (rPCR) dari spesimen darah terlihat pada Gambar 14 yang menunjukkan bahwa konsentrasi DNA terkecil yang dapat terdeteksi adalah 0,15 pg/µl atau 150 fg/µl.



Gambar 14. Hasil uji *real-time* PCR untuk deteksi DNA *Leptospira* spp pada spesimen darah orang sehat dengan beberapa konsentrasi DNA standar. Keterangan gambar: Merah; Kontrol positif; Biru: 0,015 ng/μl; Ungu: 0,0015 ng/μl; Kuning: 0,0015 ng/μl (0,15 pg/μl atau 150 fg/μl); Merah muda: Kontrol negatif.

Hasil uji *real-time* PCR untuk deteksi DNA *Leptospira* spp patogen pada spesimen urin terlihat pada Gambar 15 yang menunjukkan bahwa konsentrasi DNA terkecil yang dapat terdeteksi adalah pada konsentrasi 1,47 pg/μl atau 1470 fg/μl.



Gambar 15. Hasil uji *real-time* PCR untuk deteksi DNA *Leptospira* spp pada spesimen urin orang sehat dengan beberapa konsentrasi DNA standar. Ungu; Kontrol positif; Hijau muda: 0,147 ng/μl; Hijau tua: 0,0147 ng/μl; Biru muda: 0,00147 ng/μl (1,47 pg/μl atau 1470 fg/μl); Merah muda: Kontrol negatif.

Gambar 14 dan 15 menunjukkan bahwa tingkat sensitifitas uji rPCR yang dikembangkan dalam studi ini bervariasi tergantung spesimen yang digunakan. Pada spesimen urin deteksi minimal DNA lebih rendah dibandingkan dengan spesimen darah. Hal ini dipengaruhi oleh kit ekstraksi yang digunakan atau adanya kandungan inhibitor yang lebih tinggi pada urin dibandingkan darah. Pada penelitian yang dilakukan oleh Fonseca et al, menunjukkan hasil uji rPCR negatif pada saat mengamplifikasi *Leptospira* yang diisolasi dari urin. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya penghambatan amplifikasi DNA *Leptospira* oleh inhibitor seperti urea, kreatinin dan asam radikal dari urin.³⁶



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Hasil optimasi metode *real-time* PCR pada penelitian ini adalah:
 - a. Suhu annealing 60°C
 - b. Konsentrasi primer yang digunakan adalah 0,9 µM
 - c. Konsentrasi probe yang digunakan adalah 0,2 µM
2. Metode *real-time* PCR mampu mendeteksi minimal DNA standar dalam larutan EB pada konsentrasi 0,75 fg/µl.
3. Metode *real-time* PCR tidak bereaksi silang silang dengan *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 45923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* dan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
4. Metode *real-time* PCR mampu mendeteksi minimal DNA standar dari sampel urin dan darah masing-masing pada konsentrasi 1470 fg/ul dan 150 fg/µl.

5.2. Saran

Pada penelitian berikutnya, sistem uji yang telah dioptimasi pada penelitian ini perlu dievaluasi pada sampel klinis urin dan darah orang yang terinfeksi *Leptospira spp* patogen dan dibandingkan dengan uji baku emas untuk mengetahui tingkat sensitifitas dan spesifisitas uji.

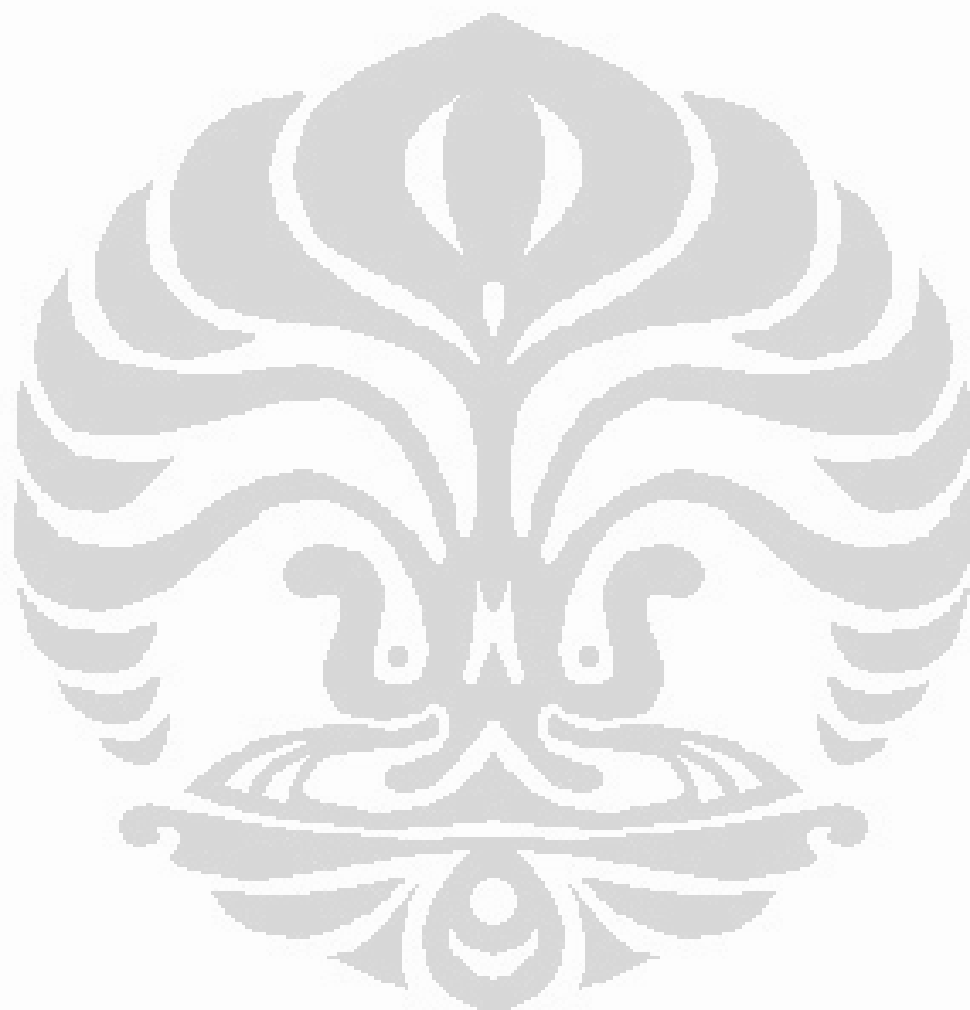
DAFTAR PUSTAKA

1. Colagross S, Schouten A.M, Mazet JA,, Gulland F, Miller MA and S.Hietala. Diagnosis and seroprevalence of Leptospirosis in California sea lions from coastal California. *J.Wildl*, 2002, 38:7-17
2. Gasem M.H, 2002. Gambaran klinik dan diagnosis leptospirosis pada manusia, kumpulan symposium leptospirosis, badan penerbit Universitas Diponegoro
3. Gravekamp.C.K, H Van de kemp,M.franzen, D.Carrington, G.J.Schoone, G.J Van Eys,C.O.Everal,R.A.Hartskeel and W.J.Terpstra. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of pimer, *J.Gen, Microbiol*, 1993, 139:1691-1700
4. Zuerner.R.L.,D.Alt and C.A.Bolin. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates sensulato serovars, *J.Clin.microbiol*, 1997, 33:3284-3289
5. Levett P.N. Leptospirosis, 2001. *Clinical Microbiology Review*, 14(2): 296-326
6. Departemen Kesehatan RI. Pedoman Tatalaksana Kasus dan Pemeriksaan Laboratorium Leptospirosis di Rumah Sakit, Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan, 2003
7. Dohe B.V, Pol S.S, Karmarkar A.P, Bharadwaj R.S. Two Test Strategy for the Diagnosis of Leptospirosis, *Bombay Hospital Journal*, 2009, 5:1,18-21
8. Shah S,Ahmad FM. Laboratory diagnosis of leptospirosis, *Metropolis Health Services, Pvt Ltd, India*, 2005, 51:3,195-200
9. Merck, 2009. Metoda cepat dan akurat deteksi bakteri patogen menggunakan *real-time* PCR, Foodproof Biotecon.
10. Stanford JP. Leptospirosis, In *Hunters Tropical Medicine*, 16th Ed, Stricland GT (Ed Saunders Co), Tokyo, 1984, 262-270
11. Smythe L.D,Smith I.L,Smith G.A,Dohnt M.F,Symonds M.L,Barnett LJ and McKay D.B. A Quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptosrpira spp*,*BMC Infectious Diseases*, 2002, 2:13
12. Aslantas O. Determination of seroprevalence of leptospirosis in Cattle by MAT and ELISA in Hatay, *Turk.J.Vet.Anim.Sci*, 2004, 29:1019-1024

13. Gulland F.M, Koski M, Lowenstine L.J, Colagross A, Morgan,L and Spraker,T. Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast: causes and trends,1990-2000, *Aquat Mammals*, 1996,31:11-22
14. Setiawan I.M, 2008. Pemeriksaan laboratorium untuk mendiagnosis penyakit leptospirosis, *Media Litbang Kesehatan*.
15. Yamamoto S. Studies on leptospire II, serological classification of leptospira strains found in man and animals,Laboratory of veterinary pathology, faculty of agriculture, University of Tokyo, 1958, 56-58.
16. Zein U. Leptospirosis. Dalam Sudoyo AW, Setyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S (ed), *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, jilid III.Ed, Jakarta,Interna Publishing, 2009, 2807-2811.
17. Kusmiyati, Noor SM, Supar. 2005. Leptospirosis pada hewan dan manusia di Indonesia. Balai Penelitian Veteriner Bogor,Wartazoa., 2005, 15:213-220
18. Jacobs.R.A. International Disease Spirochetal, *Current Medical Diagnosis and Treatment*, LM (Eds),34th Ed, A Lange Medical Book, London, 1995, 1197-1214
19. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG,Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR, *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54:45-49
20. Wijayanti K. Penegakkan Diagnosa Leptospirosis, *Dexa Media Surabaya*, 2008, 21:1,17-20
21. Tamper,M.A.,F.M.Gulland and T.Spraker. Leptospirosis in rehabilitated Pacific harbor seals from California. *J.Wildl*, 1998, Dis. 34:407-410
22. Doudier B, Garcia S, Quennee V. Prognosis factors associated wit severe leptospirosis, *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12:299-300
23. Melnick J,Adelberg, 2007. *Medical Microbiology*, Mc.Graw Hill New York, 24th ed, 339-341
24. Okatini M. Hubungan faktor lingkungan dan karakteristik individu terhadap kejadian penyakit leptospirosis di Jakarta 2003-2005,*Makara Kesehatan*, 2007, 11:17-24

25. Bajani,M.D., Ashford, D.A., Braag, S.L., Woods, C.W., Aye, T., Spiegel, R.A.,Plikaytis,B.D., Perkins,B.A., Phelan,M., Levett,P.N., Weyant.R. Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Test for Diagnosis of Leptospirosis. *J. Clin.Microbiol*, 2003, 41:803-809
26. Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1993. Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran, Binarupa Aksara, 218-220
27. Universitas Gajah Mada.. Workshop teknologi realtime PCR dan aplikasinya, 2010
28. Fatchiyah. Kuliah Polimerase Chain Reaction Dasar teknik Amplifikasi DNA, Unibraw,2009 <http://fatchiyah.lecture.ub.ac.id/page/2>
29. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Menguji ekspresi gen menggunakan real time PCR, 2010, 32:1
30. Judarwanto,W. Leptospirosis pada Manusia, Cermin Dunia Kedokteran, Jakarta, 2009, 36:5,347-350
31. Heinemann,M.B,cGarcia,J.F, Nunes, C.M, Morais,Z.M, Gregori,F,Cortez,A, Vasconcellos,S.A, Visintin,J.A, Richzenhain,L.J. Detection of leptospire in bovine semen by polymerasechain reaction, *Australian Veterinary Journal*, 77,;32-34.
32. Richtzenhain, L.J, Cortez, A, Heinemann, M.B, Soares, R.M, Sakamoto, S.M, Vasconcellos,S.A, Higa,Z.M,Scarcelli,E,Genovez,M.E. Multiplex PCr for the detection of *Brucella* spp and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Veterinary Microbiology*, 2002, 87; 139-147.
33. Romero,E.C, Billerbeck,A.E, Lando,V.S, Camargo, E.D, Souza, C.C, Yasuda, P.H. Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36;1453-1455.
34. Harkin,K.R, Roshto,Y.M, Sullivam, J.T, Purvis, T.J, Chengappa, M.M. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriaologic cultureand serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospirosis in dogs. *Journal of the American Veterinary medical Association*, 2003, 222; 1230-1233.
35. Faine,S, Adler.B, Bolin.C, Perolat. P. *Leptospira* and leptospirosis. Second ed, Melbourne, Australia, MedSci, 2005
36. Fonseca.C.D, Teixeira M.G, Romero.E.C, Tengan.F.M, Da silva.M.V, Shikanai M.A, Yasuda. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. *Journal of Infection*, 2006, 52; 15-22.

37. Fearnley.C, Wakeley.P.R, Beltran.J.G, Dalley C, Williamson.S, Gaudie.C, Woodward. M.J. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue, *Research in veterinary Science*, 2008, 85; 8-16



Lampiran 1.

Bahan dan Alat yang digunakan:

1. Kultur bakteri uji

- Medium Nutrient agar
- Medium Agar darah plat
- Uji Biokimia API 20E/20NE
- Inkubator 35°C
- Larutan NaCL 0,9 %

2. Bahan suspensi bakteri

- Larutan NaCL 0,9%
- Nephelometer Mc. Farland 0,5

3. Isolasi DNA

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)
- Nuclease free water
- Pemanas (Dri-Bath type 17.600)
- Sentrifus (Sorvall Biofuge PrimoR)
- Vortex (Genie 2)
- Biological Safety Cabinet
- Pipet dan Tip berfilter 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Tabung eppendorf 1,5 ml

4. Amplifikasi DNA

- Tabung PCR 0,2 ml
- Mesin PCR (*IQTM5 Multicolor real-time PCR Detection system*)
- Refrigerator -20°C
- PCR tube working rack



RIWAYAT HIDUP

1. Nama : Ika Ningsih
2. NPM : 0806419541
3. Jenis Kelamin : Perempuan
4. Agama : Islam
5. Tempat/Tanggal lahir : Jakarta, 26 Maret 1967
6. Alamat : Villa Jombang Baru B1 No. 10 Ciputat, Tangerang
7. Riwayat Pendidikan :

SDN 08 petang Jakarta	Lulus tahun 1980
SMPN 130 Jakarta	Lulus tahun 1983
SMA Yadika Jakarta	Lulus tahun 1986
S1 Universitas Nasional Jakarta Fakultas Biologi	Lulus tahun 1992
Diploma in Medical Microbiology Institute for Medical Research Kuala Lumpur, Malaysia	Lulus tahun 1999
S2 Universitas Indonesia Fakultas Kedokteran Program Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Mikrobiologi	Lulus tahun 2011

8. Sumber Dana Penelitian : Hibah RUUI 2010

Optimization of real-time PCR method for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. In human blood and urine specimens

Anis karuniawati,¹ Andi Yasmon,¹ Ika Ningsih,¹

¹Departement of Microbiology, faculty of Medicine, University of Indonesia, Jakarta

Abstrak

Tujuan: *Leptospirosis* adalah penyakit infeksi akut yang dapat menyerang manusia maupun hewan yang disebabkan bakteri *Leptospira* spp dan digolongkan sebagai zoonosis. Gejala klinis leptospirosis yang tidak spesifik dan sulitnya uji laboratorium untuk konfirmasi diagnosis mengakibatkan penyakit ini seringkali tidak terdiagnosis. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan optimasi uji diagnostik molekuler menggunakan real-time PCR sebagai deteksi cepat, sensitif dan spesifik untuk *Leptospira* patogen pada manusia.

Metode: Desain penelitian ini adalah analisis laboratorium dan deskriptif. DNA bakteri di dalam spesimen darah diisolasi menggunakan kit isolasi DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen) dan spesimen urin diisolasi menggunakan QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen dengan prosedur sesuai dengan petunjuk manualnya. Primer dan probe yang digunakan berdasarkan publikasi penelitian oleh Smythe dkk., 2002. Penelitian ini menggunakan mesin IQTM5, icycler multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad). Spesifisitas primer diuji menggunakan DNA bakteri lain yaitu *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Hasil: Dari hasil uji optimasi kondisi optimal real-time PCR didapat suhu annealing 60°C, konsentrasi primer 0,9 µM dan konsentrasi probe 0,2 µM. Spesifisitas primer diuji menggunakan DNA bakteri patogen lain. Hasil uji sensitifitas real-time PCR untuk mendeteksi konsentrasi DNA terendah bakteri *Leptospira* spp adalah 0,75 fg/µl, hasil uji spesifisitas real-time PCR menunjukkan bahwa primer yang digunakan untuk deteksi bakteri *Leptospira* spp tidak beraksi silang dengan genom bakteri-bakteri uji, konsentrasi minimal DNA bakteri yang masih terdeteksi dalam darah mencapai 150 fg/µl, sedangkan dalam urin mencapai 1470 fg/µl yang masih dapat dideteksi dengan pemeriksaan real-time PCR. Metode real-time PCR ini dapat digunakan sebagai alternatif pemeriksaan mikrobiologi yang cepat dan tepat untuk mendiagnosis leptospirosis.

Kesimpulan: Uji real-time PCR adalah metode yang cepat dan akurat untuk deteksi *Leptospira* spp patogen pada spesimen manusia. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui sensitifitas dan spesifisitas dari uji real-time PCR dibandingkan dengan metode diagnostik lain.

Abstract.

Aim: Leptospirosis is an acute infectious disease that can infect humans and animals caused by the bacteria *Leptospira* spp. and classified as a zoonosis. Clinical symptoms of leptospirosis are nonspecific and the current available laboratory method for detecting *Leptospira* spp. is time-consuming and high cost. Therefore the diagnosis is often missed or delayed. The rapid and accurate method is needed to diagnose the disease. This study is to develop molecular diagnostic test using *real-time* PCR assay a rapid, sensitive and spesific method for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in humans

Method: The design of this research is laboratory analysis and descriptive. The bacterial DNA in blood specimens was isolated by the QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen) and urine specimens were isolated by the QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Primers and probes used in this study based on research done by Smythe et al., 2002. The assay is performed using *IQTM5, icycler multicolor real-time PCR detection system* (Bio-Rad). Specificity of the Primer used was evaluated towards *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* and *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*

Results: The amplification of the DNA control was performed optimally with the following conditions: annealing temperature is 60°C, primer volume is 0.5µl (final concentration: 0.9 µM); probe volume is 0.2 µl (final concentration 0.2 µM). This method may detect the DNA in the Mastermix Mix with the concentration of 0.75fg/µl, however in blood specimen the limit of detection of the DNA 150 fg/µl and in urine is 1470 fg/µl. The primer used in this assay is not complementary with the DNA of other pathogenic *Leptospira* spp. The *real-time* PCR assay is a rapid and accurate method to detect pathogenic *Leptospira* in human specimens. Further studies are needed to know the sensitivity and specificity of the *real-time* PCR assay compared to other diagnostic methods in clinical settings.

Conclusion: *Real-time* PCR test is a rapid and accurate method for detecting pathogenic *Leptospira* spp in human specimens. Further research is needed to determine the sensitivity and specificity of *real-time* PCR tests compared with other diagnostic methods in clinical settings

Key words: *leptospirosis, Leptospira, Real-time* PCR, *Optimization, Sensitivity, Specivisity*

Leptospirosis is an acute infectious disease caused by pathogenic *Leptospira* bacteria and can infect humans and animals that are classified as zoonoses. This disease remains a public health problem, especially in the tropics and sub-tropical with high rainfall, especially in developing countries with poor hygiene attention. International Leptospirosis Society declared

Indonesia as the country's high incidence of leptospirosis and ranked third in the world for mortality (16.7%).^{1,2,3,4}

Clinical symptoms of leptospirosis are nonspecific and the difficulty of

laboratory tests to confirm diagnosis of this disease often lead to undiagnosed. The symptoms closely

mimic clinical malaria, dengue fever, hepatitis, meningitis, enteric fever and many other diseases characterized by fever, headache and myalgia. Therefore the diagnosis is often missed or delayed.^{3,8,11,12}

There are many options for methods of microbiological examination support the diagnosis of leptospirosis which is composed of direct examination to detect the presence of *Leptospira* bacteria or antigenya such as culture, microscopy, PCR (Polymerase Chain Reaction) and examination indirectly through the examination of antibodies to *Leptospira* bacteria such as Microscopic Agglutination Test (MAT), Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay (ELISA, filter test).^{3,6}

Diagnosis of leptospirosis can also be done by detecting *Leptospira*-specific DNA using PCR methods both conventional and real-time, which is a rapid, sensitive and specific method.^{8,13} In this study, we optimized of real-time Taqman PCR assay for early detection of *Leptospira* spp. in human specimen using universal primers.

METHOD

Primer and probe

Primers and probes used in this study based on research done by Smythe et al., 2002, and the rrs design based on gene sequences (16S) between 171 and 258 positions (87 bp product): LEP-patF CCCGCGTCCGATTAG 5'171 primer 3', LEP-primary patR

5'258TCCATTGTGGCCGRA /
GACAC 3 'danPLep-patP
Probe5'205 (FAM)
CTCACCAAGGCGACGATCGGT
AGC2283' (TAMRA).

Positive Control DNA

The DNA of the pathogenic *Leptospira* is obtained from DR. Rudy A Haartkeel Slotewart University, Amsterdam

DNA Extraction

DNA was extracted and purified bacterial test using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). DNA concentration measurements made using a NanoDrop (Thermo).

Optimization of real-time PCR conditions

Pure DNA purification results are used as templates for the optimization of reaction conditions in real-time PCR, e.g. annealing temperature, the concentration of DNA, primer and probe.

The sensitivity of real-time PCR

Distilled water solution containing a concentration of standard DNA of different *Leptospira* spp. tested against real-time PCR assay. The purpose is to find the limit of detection of DNA Mastermix Mix.

Specificity of real-time PCR

Real-time PCR specificity was tested against various pathogen: Streptococcus viridans, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*,

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Limit of detection in urine and blood spesimen

Control DNA is inserted into the human urin and blood, which is known as negative *Leptospira* spp. Several parameters were evaluated in this simulation test are:

- To optimize the method of DNA extraction in urine and blood specimen
- To know the limit of detection of the DNA in blood and urine specimens

Analysis results

Presented in the form of descriptive

Optimization of real-time PCR conditions

Optimization of Annealing Temperature

Optimization of annealing temperature was done by using real-time PCR bergradient in the temperature range 56°C-66°C. Amplification carried out in 25 µl PCR reaction volume consisted of FastStart TaqMan Probe Master Forward Primer 0.5 ul, 12.5 ul with a final concentration of 0.9 uM, 0.5 ul reverse primer with final concentration of 0.9 uM , probe 0.2 ul with a final concentration of 0.2

uM, 9.3 ul distilled water and 2 ul of bacterial DNA template standard, made in duplicate reactions. PCR amplification process using a machine-IQTM5, icycler multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad). Stages of amplification reaction consisted of denaturation at 95°C for 10 min, annealing at a temperature of 56°C temperature range bergradient - 66°C for 1 min and elongation at 95°C for 15 seconds with the number of cycles were 45 cycles.

Optimization of Primer Concentration

Optimization of primer concentration were conducted at several primary concentration of 0.25 µl with a final concentration of 0.45 uM, 0.5 ul with a final concentration of 0.9 µM, 0.75 ul with a final concentration of 1.35 uM, 1 ul with a final concentration of 1.8 µM, 1.25 ul with a final concentration of 2.25 uM and 1.5 ul with a final concentration of 2.7 uM. Amplification carried out in 25 ul reaction volume with the same reaction conditions with annealing temperature optimization condition except for primer concentration, reaction made in duplicate. For the annealing temperature at this stage using the optimum annealing temperature that has been obtained.

Optimization of Probe Concentration

Optimization of the concentration of probes were conducted at several probe concentrations of 0.1 ul with a final concentration of 0.1 uM, 0.2 ul with a final concentration of 0.2 uM,

0.3 µl with a final concentration of 0.3 µM, 0.4 µl with a final concentration of 0.4 µM, 0.5 µl with a final concentration of 0.5 µM. Amplification carried out in 25 µl reaction volume with the reaction mixture conditions similar to the reaction mixture at primary optimization with final primer concentration of 0.9 µM, the reaction was made in duplicate.

The sensitivity of real-time PCR

Determination of sensitivity based on DNA concentration Conducted to determine the ability of real-time PCR reactions to detect the minimum amount of DNA. Isolation of bacterial DNA concentration was measured with a standard tool ThermoScientific NanoDrop spectrophotometer and then performed serial dilution of stock standard bacterial DNA. Each DNA dilution was amplified with real-time PCR in 25 µl reaction volume consisting of Taqman Probe Master Faststart 12.5 µl, while the primary concentration used is a primary optimum results that have been obtained previously with a final concentration of 0.5 µl (0.9 µM) and the concentration of probe used was the result of optimum probe which has been obtained previously with 0.2 µ final konsetrasi 0.2 µM, the remaining volume of water added distilled, the template used for real-time PCR reaction was 5 µl.

Specificity of real-time PCR

Isolation of DNA and measurement of bacterial DNA test real-time PCR specificity was tested against various bacteria other than bacteria standards,

especially bacteria contained in urine and blood. Bacteria used for specificity testing were *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Isolation of DNA in this study using a kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. To measure the concentration and purity of bacterial DNA tests carried out by means ThermoScientific NanoDrop spectrophotometer. Template used for real-time PCR reactions each concentration of DNA used 7.5 ng / µl with 5 µl volumes printed in 25 µl total reaction, the reaction was made in duplicate.

Simulation Test

In this simulation test used urine and blood of healthy humans. This is to prove whether the urine and blood were tested free from bacteria *Leptospira*.

Isolation of healthy human urine

Urine before the first simulation test were centrifuged at 4000 rpm speed for 15 minutes to eliminate bacteria in the urine, the pellet discarded supernatant was taken, then performed the extraction using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Cat no. 51 504, Qiagen) according to manufacturer's instructions. To determine the optimal elution

volume of the urine test is then performed real-time PCR. Template used for PCR reaction was 5 ul in 25 ul total reaction. The reaction was made in duplicate.

Determination of the sensitivity of the urine of healthy people based on bacterial DNA standard dilution series

To determine the sensitivity of real-time PCR in urine of healthy people based on standard bacterial dilution carried out as follows, to 10 ul of each standard dilution of bacterial DNA then was extracted with QIAamp DNA Stool Mini Kit (Cat no, 51,504, Qiagen) according to manufacturer's instructions.

Isolation of human blood of healthy

1200 mL of blood taken and put in falcon tubes containing EDTA, then performed the extraction using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat no.51104, Qiagen) To determine the optimal elution volume of blood is then performed real-time PCR test. Template used for PCR reaction was 5 ul in 25 ul total reaction. The reaction was made in duplicate.

Determination of the sensitivity of the blood of healthy people based on bacterial DNA standard dilution series

To determine the sensitivity of real-time PCR in blood of healthy people based on standard bacterial dilution carried out as follows, to 10 ul of each standard dilution of bacterial DNA was extracted with QIAamp

DNA Blood Mini Kit (Cat no.51104, Qiagen) was included in 190 ul of blood, then elution volume (buffer AE) were added to the mixture using the optimal elution volume of blood that has been obtained. Then, the extracted DNA was amplified with 5 µl volumes printed in total 25 ul PCR reaction.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of real-time Polymerase Chain Reaction (PCR)

In this study, optimization of real-time PCR was conducted in order to obtain optimal conditions in real-time PCR reaction. Real-time PCR performed using primer pair as reported by Smythe et al.,2002. Primer sequences were designed based on rrs gene (16S) between 171 and 258 positions (87 bp product) to detect all pathogenic *Leptospira* spp.

Optimization of Annealing Temperature

Leptospira spp bacterial DNA used as standard bacteria / bacterial control to be optimized in real-time PCR with 8 series of annealing temperatures (56⁰C, 56.8⁰C, 58.1⁰C, 59.9⁰C, 60.4⁰C, 64.3⁰C, 65.5⁰C, 66⁰C) using a PCR machine-IQTM5, icycler multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad). Results gradient real-time PCR at a temperature of 56⁰C-66⁰C show that the annealing temperature chosen for the amplification condition is temperature 59.9⁰C (≈ 60⁰C) which is the optimum annealing temperature for the detection of bacterial pathogen *Leptospira* spp. (Figure.1). PCR annealing

temperature optimization results are then used to test real-time PCR in this study. Annealing temperature of 60°C with a time of 1 minute is the same as that used in the research done by Smythe et al (2002). While Fearnley et al (2007) using annealing temperature of 55°C for 15 seconds. Selection 59.9°C annealing temperature ($\approx 60^\circ\text{C}$) in this study based on the value of Ct (cycle threshold) and substrated signal (the

starting point where the fluorescence is detected) compared to a lower temperature or higher temperatures. In the process of efficient amplification required temperature settings for specific primer annealing. If the temperature used is too high, can cause failure of primer annealing at the complementary DNA template. If too low, the primer can be attached at the wrong place and increase the yield of non-specific amplification.

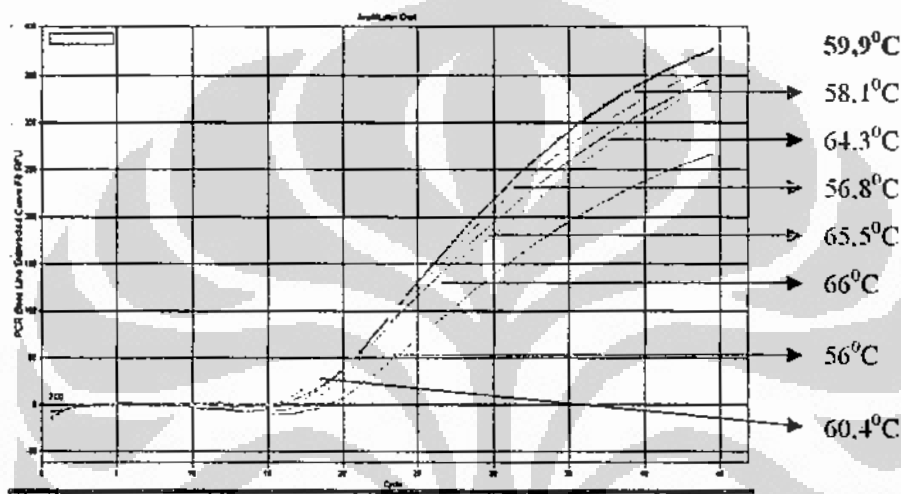


Figure 1. Annealing temperature optimization results show that the annealing temperature is obtained at a temperature of 59.9°C ($\approx 60^\circ\text{C}$)

Optimization of Primer Concentration

Results of optimization of primary concentration used in this research that Primary Forward and Reverse primers with different concentrations: 0.25 ul with a final concentration of 0.45 uM, 0.5 ul with a final concentration of 0.9 uM, 0.75 ul with a final concentration of 1.35 uM, 1ul with a final concentration of 1.8 uM, 1.25 ul with a final concentration of 2.25 uM and 1.5 ul with a final concentration of 2.7 uM, 1.75 ul with a final concentration of 3.15 uM and 2 ul with a final concentration of 3.6 uM.

Results of optimization has been done shows that the optimal conditions obtained primary concentration is at a concentration of 0.5 ul with a final concentration of 0.9 uM (Figure.2). In research done by Smythe et al., (2002) using a primer concentration of 3 pmol / ul, Levett et al., (2005) using a primer concentration of 300 uM and Fearnley et al., (2007) using a primer concentration of 500 uM. The purpose of the use of primers in DNA quantification test is to determine the amount of DNA can

be amplified and serves as penginisiasi DNA polymerase reaction in vitro, because without a primer, polymerase reaction will not occur even if the enzymes and other

components already available. Also primer also serves to limit the area which will be amplified in the PCR reaction.

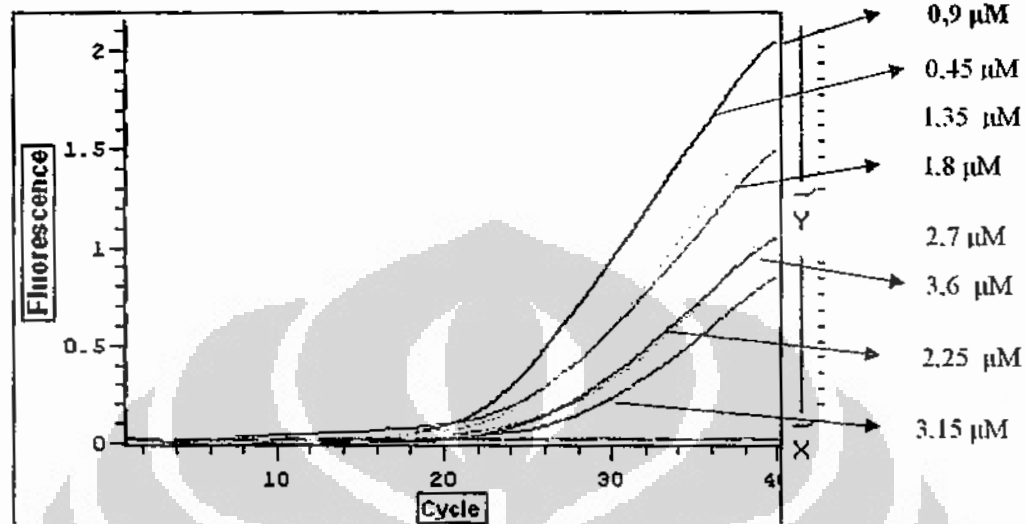


Figure 2. Primer concentration optimization results show that the primary optimal condition is obtained at a concentration of 0.5 ul with a final concentration of 0.9 uM.

Optimization of probe concentration

Results of optimization probe concentration used in this research that probes with different concentrations of each PCR tube is 0.1 ul with a final concentration of 0.1 uM, 0.2 ul with a final concentration of 0.2 uM, 0.3 ul with a final concentration of 0.3 uM, 0.4 ul with a final concentration of 0.4 ul,

0.5 ul with a final concentration of 0.5 uM, showed that the optimal conditions obtained in the probe concentration This study is the concentration of 0.2 ul with a final concentration of 0.2 uM (Figure. 3). In a study conducted Smythe et al., 2002 using a probe concentration of 2 pmol / ul.

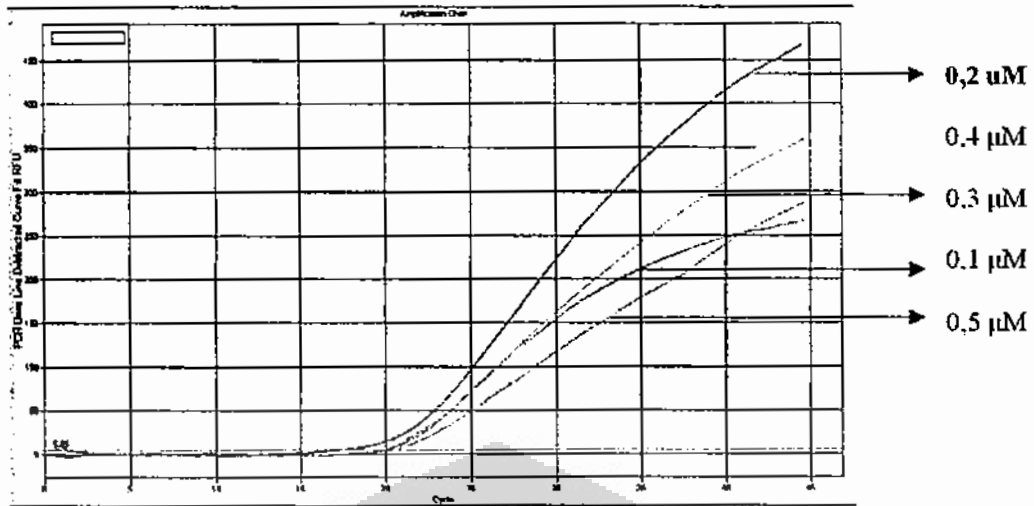


Figure 3. probe concentration optimization results show that the optimal conditions obtained probe concentration is at a concentration of 0.2 ul with a final concentration of 0.2 uM.

Sensitivity based on DNA concentration

The sensitivity of real-time PCR testing conducted to determine the lowest concentration of standard bacterial DNA that can still be detected by real-time PCR. Detection

limit of real-time PCR based on DNA concentrations for standard bacteria *Leptospira* spp in this study reached 75×10^{-8} ng / ul or 0.75 fg / ul (figure 4).

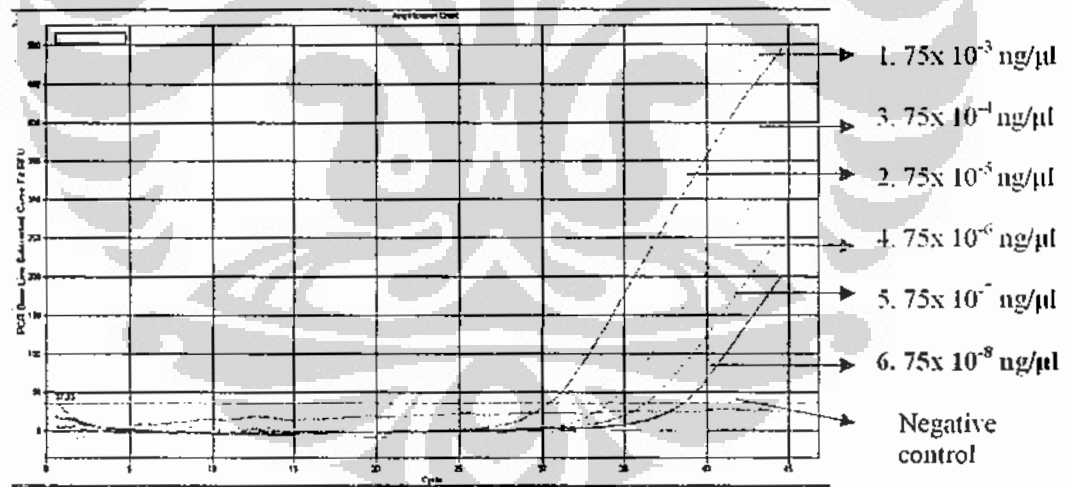


Figure 4. Results on real-time PCR test based sensitivity lowest concentration of DNA. 1. Green color: 75×10^{-3} ng / ul; 2. light blue: 75×10^{-4} ng / ul; 3. dark blue: 75×10^{-5} ng / ul; 4. pink: 75×10^{-6} ng / ul; red : 75×10^{-7} ng/ul; 6. purple: 75×10^{-8} ng / ul

Specificity of real-time PCR

Real-time PCR specificity was tested against various other bacteria, especially bacteria contained in urine and blood. Bacteria used for specificity testing were *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*,

Staphylococcus aureus ATCC 45923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Real-time PCR results showed that the primers used for detection of *Leptospira* spp bacteria do not cross-react with the genomes of these bacteria (figure 5).

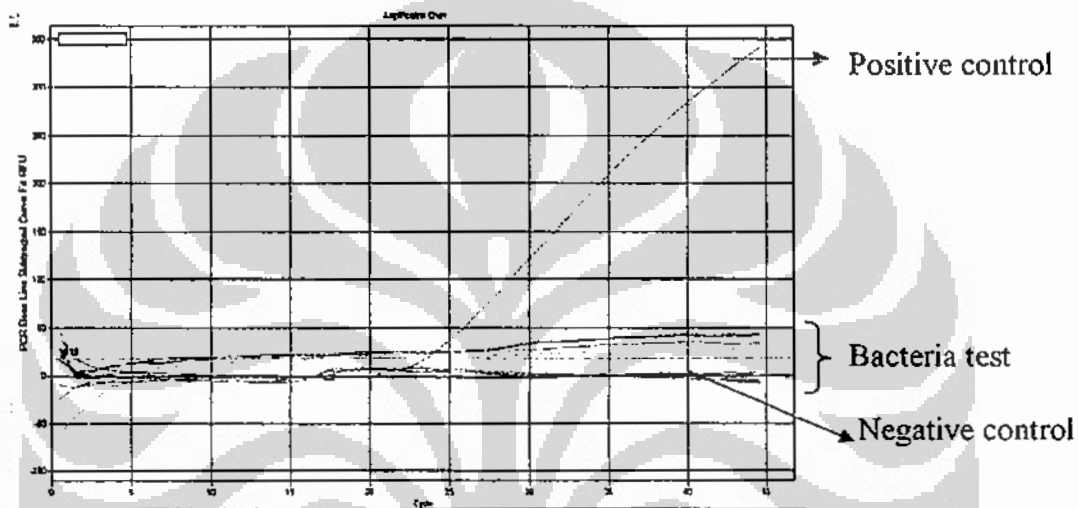


Figure 5. Specificity test results in real-time PCR showed that the bacterium *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter anitratus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 45923, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

In a study conducted Smythe et al., 2002 against the 22 bacteria tested in addition to *Leptospira* spp mentioned that the specificity of the test gives a negative result.

Simulation Test Simulation test in this study aimed to see whether the urine and blood of healthy humans were tested free from bacteria *Leptospira*. Determination of the sensitivity of the blood of healthy

people based on bacterial DNA standard dilution series In this study the detection limits of real-time PCR based on bacterial DNA standard dilution series is the dilution 10^{-6} ng /ul. The sensitivity of real-time PCR standard minimum concentration of bacteria in the blood DNA of healthy people reach 150 fg / ul which still can be detected by checking real-time PCR (Fig. 6).

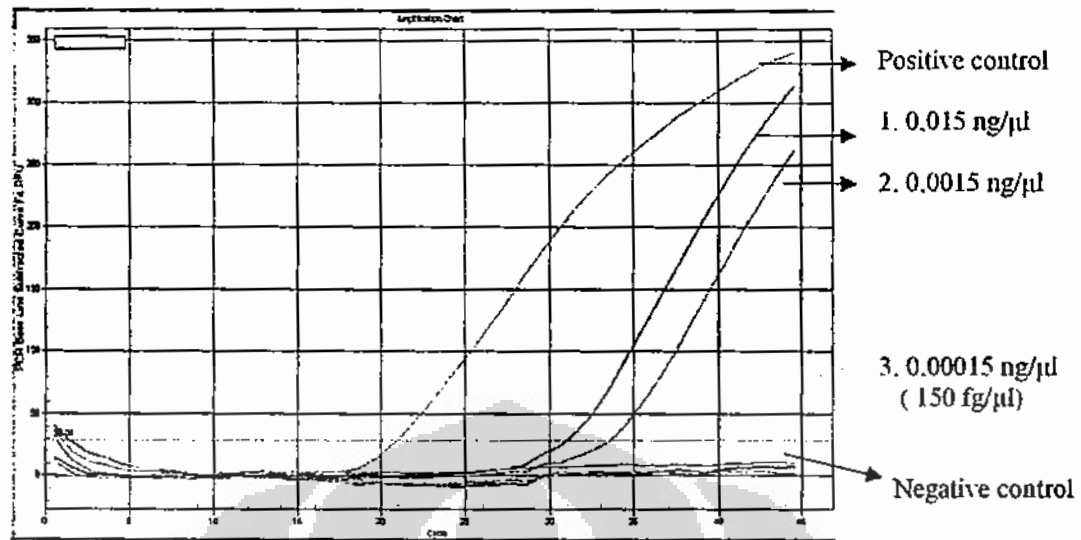


Figure 6. Results of sensitivity blood of healthy persons based on bacterial DNA standard dilution series. red color; positive control: 1.warna blue: 0.015 ng / ul; 2.warna purple: 0.0015 ng / ul; color yellow: 0.0015 ng / ul (15 pg / ul).

While the results of real-time PCR testing of urine specimens are shown in Figure 12 which shows that the concentration of DNA is the smallest

that can be detected at a concentration of 0.00147 ng / ul (1470 fg/ul).

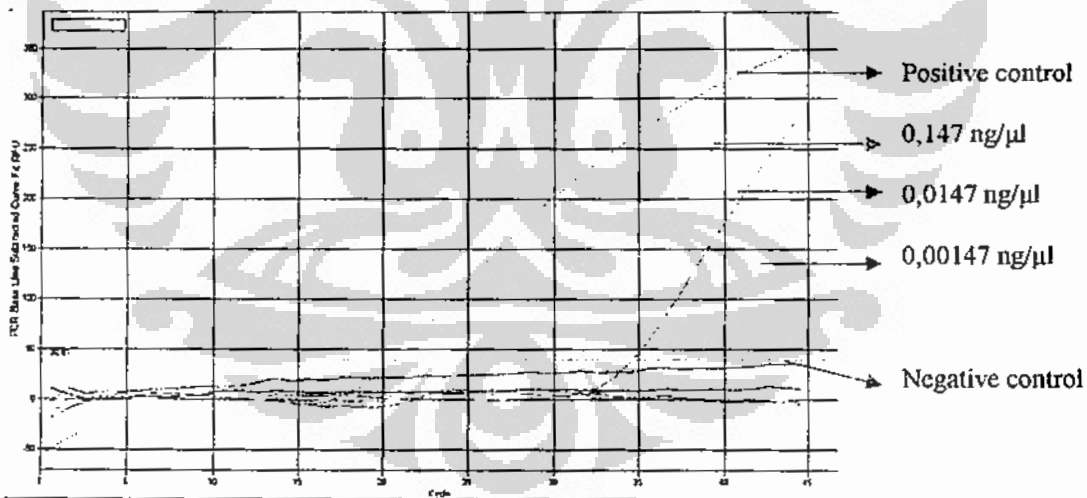


Figure 12. DNA test results *Leptospira* spp detection in urine specimens of healthy persons with several concentrations of standard DNA. purple color; positive control; Green: 0.147 ng / µl; dark green: 0.0147 ng / µl; light blue: 0.00147 ng / µl

From the research that has been done, successfully obtained the optimization of real-time PCR to

detect pathogens *Leptospira* spp owned FKUI microbiology laboratory. In this research, real-time