

**PENGEMBANGAN METODE DUPLEX PCR UNTUK DETEKSI
LEGIONELLA SPP. DAN LEGIONELLA PNEUMOPHILA
PADA SAMPEL AIR *COOLING TOWER***

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Magister Biomedik

YUSMANIAR

NPM : 610502119



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
NOVEMBER 2008**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Dra. Yusmaniar, Apt

NPM : 610502119

Tanda Tangan :

A 6000 postage stamp with a signature and a date stamp. The stamp features a portrait of a man and the number '6000'. The signature is written in black ink over the stamp. Below the stamp, the date '26 November 2008' is stamped.

Tanggal : 26 November 2008

HALAMAN PENGESAHAN

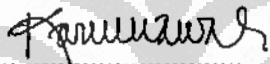
Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Dra. Yusmaniar, Apt
NPM : 610502119
Program Studi : Magister Biomedik Kekhususan Mikrobiologi
Judul Tesis : Pengembangan metode duplex PCR untuk mendeteksi *Legionella spp.* dan *Legionella pneumophila* pada sampel air cooling tower

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada program studi Magister Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

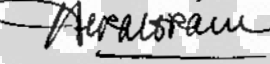
Pembimbing I : dr. Anis Karuniawati, PhD, SpMK

(
.....)

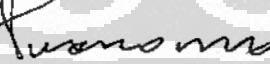
Pembimbing II : Andi Yasmon, S.Pi, M.Biomed

(
.....)

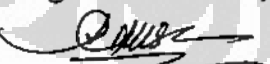
Penguji I : dr. Fera Ibrahim, M.Sc., PhD, SpMK

(
.....)

Penguji II : Prof. Drs. Purnomo Soeharto, PhD

(
.....)

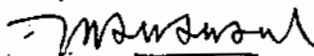
Penguji III : dr. Agnes Kurniawan, PhD, SpParK

(
.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 26 November 2008

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

()

Dr. rer.physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dra. Yusmaniar, Apt
NPM : 610502119
Program Studi : Magister Biomedik Kekhususan 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

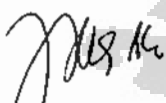
Pengembangan metode duplex PCR untuk mendeteksi *Legionella spp.* dan *Legionella pneumophila* pada sampel air *cooling tower*

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-eksklusif 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 : 26 November 2008

Yang menyatakan


(Dra. Yusmaniar, Apt)

ABSTRAK

Nama : Yusmaniar
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul : Pengembangan Metode Duplex PCR untuk mendeteksi *Legionella spp.* dan *Legionella pneumophila* pada sampel air *Cooling Tower*

Legionella pneumophila merupakan penyebab utama legionellosis yang mulai muncul pada pertengahan abad 20. Legionellosis dapat berkembang menjadi dua keadaan klinik, pertama *Legionnaires' disease* yang merupakan penyakit multi sistem pneumonia, kedua *Pontiac fever* suatu penyakit mirip dengan flu dan dapat sembuh dengan sendirinya. Umumnya kasus legionellosis terjadi akibat dari kontaminasi pada sistem air panas maupun dingin pada gedung bertingkat seperti *cooling tower*, kondensor, spa, kolam renang, Oleh karena itu deteksi bakteri *Legionella* pada sistem air di gedung bertingkat dan rumah sakit diperlukan untuk mencegah legionellosis nosokomial ataupun komunitas. Deteksi legionella dengan metode konvensional memerlukan media khusus dan waktu inkubasi yang lama. Pada penelitian ini duplex PCR dikembangkan untuk mendeteksi *Legionella spp* dan *Legionella pneumophila* pada sampel air *cooling tower*, dengan primer dari sekuens gen 16S rRNA untuk mendeteksi *Legionella spp* serta primer sekuens gen *mip* untuk mendeteksi *Legionella pneumophila*.

Pada penelitian ini *Duplex PCR* dapat digunakan untuk mendeteksi *Legionella pneumophila* dalam suspensi NaCl 0.9% hingga batas deteksi 2,8 CFU/ml. Hasil uji simulasi menggunakan sampel air yang ditambahkan pengenceran berseri *Legionella pneumophila* menunjukkan batas deteksi hingga 62 CFU/ 400 ml air kran, 32 CFU/400 ml akuadest steril dan 32 CFU/ 400 ml NaCl 0.9% steril. Hasil uji simulasi dengan metode kultur tidak menunjukkan pertumbuhan koloni pada agar BCYE plus.

Hasil uji coba Duplex PCR terhadap 9 sampel air *cooling tower* dan 3 sampel air kran adalah satu sampel menunjukkan pita spesifik *L. pneumophila*, 8 sampel yang menunjukkan pita spesifik *Legionella spp* dan 3 sampel negatif. Berdasarkan uji simulasi dan pemeriksaan sampel air *cooling tower*, metode kultur pada penelitian ini belum dapat mendeteksi keberadaan bakteri *Legionella*, sedangkan deteksi *Legionella spp* dan *L. pneumophila* dapat dilakukan dengan metode duplex PCR.

Kata kunci : *Legionella spp*, *Legionella pneumophila*, duplex PCR, *cooling tower*

ABSTRACT

Name : Yusmaniar
Study Programe : Biomedical Science
Title : Development of the duplex PCR for detection *Legionella spp.* and *Legionella pneumophila* in Cooling Tower water samples

Legionellosis is a collection of infection that emerged in the second half of the 20th century, and that are caused by *Legionella pneumophila* and related bacteria. Legionellosis consists of two clinical syndromes, Legionnaires' disease is characterized by pneumonia and pontiac fever is self-limiting, influenza like illness. Outbreaks legionellosis are sporadic. Some outbreaks have been most associated with hot and cold water systems in large building such as cooling towers, condensers and spa pools. Detection of *Legionella* in water systems in large buiding or hospital is needed to prevent community and nosocomial legionellosis. Conventional methods for detecting and identiffying *Legionella* bacteria requires selective media and long incubation . In this study a rapid detection of *Legionella spp* dan *Legionella pneumophila* using a technique of duplex PCR is developed. Primers in the 16S rRNA sequence and primers in the *mip* gene sequence were selected to detect DNA of *Legionella spp* and *L.pneumophila*.

According this study, the sensitivity of duplex PCR to detect *Legionella pneumophila* in sterile NaCl 0.9% is 2.8 CFU/ml. The sensitivity of the duplex PCR in seeded water samples are 62 CFU/400ml of tap water sample, 32 CFU/400ml of sterile distilled water and 32 CFU/400 ml of sterile NaCl 0.9%. The culture method in this study can not recovered *Legionella* from seeded water samples.

The precence of *Legionella spp* and *Legionella pneumophila* in cooling tower water was investigated using the duplex PCR. Of 9 cooling tower water sample and 3 tap water sample, 8 were positive for *Legionella spp*, 1 were positive for *Legionella pneumophila* and 3 were negative. According detection *Legionella* in seeded water samples and cooling tower water, the culture method can not be used to recover *Legionella*, but the duplex PCR can be used as rapid detection for *Legionella spp* and *Legionella pneumophila* .

Key words : *Legionella spp*, *Legionella pneumophila*, Duplex PCR, cooling tower

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah robbil 'alamin, segala puja dan puji hanya kepada Allah SWT, Dzat Yang Maha Pengasih dan Penyayang, atas segala rahmat, kasih sayang, petunjuk dan hidayah sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis yang berjudul '**Pengembangan metode duplex PCR untuk mendeteksi *Legionella spp.* dan *Legionella pneumophila* pada sampel air *cooling tower***'. Semoga dengan petunjuk-Nya pulalah penulis dapat mengambil hikmah dari segala kejadian yang menemani penulis selama menjalani pendidikan, riset hingga penulisan tesis ini serta di kemudian hari.

Selesainya penelitian ini pada akhirnya tidak lepas dari bimbingan, pengarahan dan bantuan berbagai pihak, oleh karena itu, penulis menyampaikan penghargaan dan rasa terima kasih yang tulus dan mendalam kepada:

- **dr. Anis Karuniawati, PhD, SpMK.** selaku Pembimbing I atas segala kepercayaan, bantuan, kesabaran kepada penulis mulai semester satu hingga dapat menyelesaikan tesis ini.
- **Andi Yasmon, S.Pi, M.Biomed** selaku Pembimbing II yang telah banyak memberikan masukan dan petunjuk yang sangat berharga selama penelitian dan dalam penulisan tesis ini.
- **Dr. rer.physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi** selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik, atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Biomedik
- **dr. Mardiasuti, MSc., SpMK** selaku Ketua Departemen Mikrobiologi FKUI dan **dr. Fera Ibrahim, PhD, SpMK** selaku Ketua Kekhususan Mikrobiologi, yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan pendidikan dan riset di lingkungan Departemen Mikrobiologi FKUI.

- **segenap staf dan karyawan Departemen Mikrobiologi FKUI**, terima kasih yang mendalam penulis sampaikan atas bantuan dan kerjasamanya dengan penulis untuk menyelesaikan pendidikan dan penelitian.
- **Dra. Tati Suprapti, Apt**, selaku Ketua Jurusan Farmasi Poltekkes Jakarta II, **ibu Suyati, bu Gloria, Harpolia, Yetri, Retno, Nida, Diah**, dan teman-teman yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas dukungan, persahabatan dan kasih sayangnya.
- Yang terkasih dan tersayang, **suamiku Ir. Syafrimai** dan anak-anakku **Mutia, Hally, Habibi dan Raida**, adik-adik, **mama dan amak** yang senantiasa mendoakan, memberi dukungan, kasih sayang dan perhatian, terima kasih telah menjadi sumber kekuatan dalam menjalani dan menyelesaikan pendidikan magister ini.
- Teman seperjuangan sesama P3S dan PPDS **Angela, Fitri, Yuni, Ika, Deka, Rayhana, Lulut, dr. Vivi S, M.Biomed, Oktavia S.Si, M.Biomed, dr. Dewi, dr. Wani Gunardi, SpMK, dr. Adi Tarini spMK, dr. Lely**, terima kasih atas segala masukan dan persahabatan,serta kesempatan berbagi pengetahuan selama penulis menjalani pendidikan.

Terakhir, hanya kepada Allah SWT saja kita bersandar dan menyerahkan segala sesuatu. Semoga tesis yang tidak lepas dari kekurangan ini dapat berguna bagi kita semua. Amin.

Jakarta, 26 November 2008

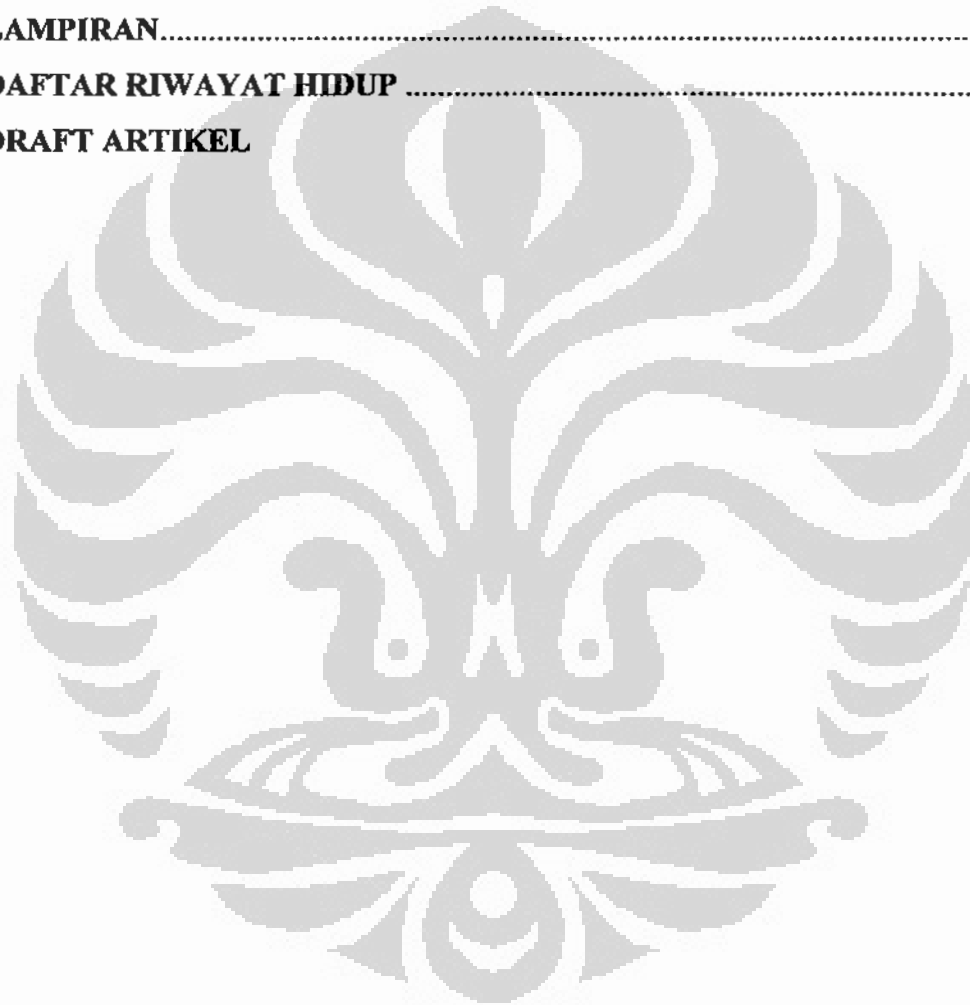
Penulis

DAFTAR ISI

| BAB | Halaman |
|---|----------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iii |
| HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI | iv |
| ABSTRAK | v |
| ABSTRACT | vi |
| KATA PENGANTAR | vii |
| DAFTAR ISI | ix |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiv |
| DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN | xv |
| | |
| I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. LATAR BELAKANG PENELITIAN | 1 |
| 1.2. TUJUAN PENELITIAN | 4 |
| 1.3. MANFAAT PENELITIAN | 4 |
| | |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1. LEGIONELLA PNEUMOPHILA | 5 |
| 2.1.1. Taksonomi dan karakteristik genus <i>Legionella</i> | 6 |
| 2.1.2. Habitat Alami <i>Legionella</i> | 7 |
| 2.1.3. Siklus hidup Intraseluler | 8 |
| 2.1.4. Faktor Virulensi | 9 |
| 2.1.5. Spektrum Legionellosis | 9 |
| 2.1.6. Epidemiologi Legionellosis | 10 |

| | |
|--|----|
| 2.2.DETEKSI LEGIONELLA | 11 |
| 2.2.1. Metode Kultur..... | 11 |
| 2.2.2. Serologi..... | 13 |
| 2.2.3. Amplifikasi Asam Nukleat | 14 |
| | |
| 2.3. COOLING TOWER | 15 |
| | |
| III. METODOLOGI | 17 |
| 3.1. Desain Penelitian | 17 |
| 3.2. Alur Penelitian | 17 |
| 3.3. Cara Pengumpulan Data | 19 |
| 3.4. Bahan dan Cara Kerja | 19 |
| 3.4.1. Persiapan Biakan Bakteri Kontrol..... | 19 |
| 3.4.2. Penentuan Sensitivitas Kultur..... | 20 |
| 3.4.3. Isolasi DNA dan Pengukuran DNA Bakteri Kontrol..... | 20 |
| 3.4.4. Optimasi Suhu Annealing | 21 |
| 3.4.5. Deteksi Produk PCR | 23 |
| 3.4.6. Penentuan Sensitivitas Duplex PCR | 23 |
| 3.4.7. Uji spesifisitas | 24 |
| 3.4.8. Uji Simulasi | 25 |
| 3.4.9. Aplikasi pada sampel air <i>Cooling Tower</i> | 25 |
| | |
| IV. HASIL DAN PEMBAHASAN | 27 |
| 4.1. Hasil | 28 |
| 4.1.1. Optimasi PCR..... | 28 |
| 4.1.2. Sensitifitas Duplex PCR | 29 |
| 4.1.3. Spesifisitas Duplex PCR | 31 |
| 4.1.4. Uji Simulasi | 34 |
| 4.1.5. Deteksi Sampel air <i>Cooling Tower</i> | 37 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 4.2. Pembahasan | 40 |
| V. KESIMPULAN DAN SARAN | 44 |
| 5.1. KESIMPULAN | 44 |
| 5.2. SARAN..... | 45 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 46 |
| LAMPIRAN..... | 50 |
| DAFTAR RIWAYAT HIDUP | 58 |
| DRAFT ARTIKEL | |



DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|---|---------|
| 1. Siklus hidup <i>L. pneumophila</i> dalam protozoa dan makrofag manusia | 1 |
| 2. skema sistem pendingin sentral dengan <i>cooling tower</i> | 13 |
| 3. Hasil amplifikasi DNA Gradient PCR pada elektroforesis gel akrilamid | 29 |
| 4. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji sensitifitas berdasarkan konsentrasi DNA terendah. | 30 |
| 5. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji sensitifitas berdasarkan pengenceran suspensi bakteri kontrol | 31 |
| 6. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji spesifisitas terhadap 7 bakteri | 32 |
| 7. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji spesifisitas terhadap 4 bakteri | 32 |
| 8. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji spesifisitas antara <i>S. aureus</i> dan <i>L. pneumophila</i> menggunakan primer 16S RNA | 33 |
| 9. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji spesifisitas antara <i>S. aureus</i> dan <i>L. pneumophila</i> yang direstriksi dengan enzim HaeIII | 33 |
| 10. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji simulasi sampel air kran | 35 |
| 11. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji simulasi sampel akuadest steril | 36 |
| 12. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji simulasi sampel NaCl 0.9% | 37 |
| 13. Hasil elektroforesis produk PCR 6 sampel air <i>cooling tower</i> | 39 |
| 14. Hasil elektroforesis produk PCR 5 sampel air <i>cooling tower</i> | 39 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|----------------|
| 1. <i>Legionella</i> spesies dan serogroup | 6 |
| 2. Batas deteksi pemeriksaan kultur dan PCR berdasarkan pengenceran suspensi <i>L. pneumophila</i> dalam NaCl 0.9% sesuai McFarland 0.5..... | 29 |
| 3. Perbandingan kultur dan PCR pada uji simulasi sampel air kran | 35 |
| 4. Perbandingan kultur dan PCR pada uji simulasi sampel akuadest steril | 36 |
| 5. Perbandingan kultur dan PCR pada uji simulasi sampel larutan NaCl 0.9% | 37 |
| 6. Hasil Pemeriksaan sampel air cooling tower berdasarkan kultur dan PCR | 38 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|---------|
| 1. Bahan dan Alat yang digunakan | 50 |
| 2. Identifikasi koloni tersangka <i>Legionella</i> | 52 |
| 3. Homologi hasil sekuensing produk PCR <i>L. pneumophila</i> , <i>S. aureus</i> dan sampel air <i>cooling tower</i> | 53 |
| 4. sekuen produk PCR <i>Legionella pneumophila</i> dengan primer LspF | 54 |
| 5. sekuen hasil produk PCR <i>S. aureus</i> dengan primer LspF | 55 |
| 6. sekuen hasil produk PCR sampel air <i>cooling tower</i> dengan primer LspF | 56 |
| 7. Blast hasil sekuen produk PCR <i>L.pneumophila</i> , <i>S aureus</i> dan sampel air <i>cooling tower</i> | 57 |

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

| | |
|-----------|--|
| % | : persen |
| °C | : celcius |
| λ | : lambda |
| kb | : kilobasa |
| ug | : mikrogram |
| ml | : mililiter |
| mM | : milimolar |
| M | : molar |
| pb | : pasang basa |
| rpm | : <i>Rotation Per Minute</i> |
| DNA | : <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| dNTP | : <i>deoxyribonucleoside Triphosphate</i> |
| EDTA | : <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> |
| PCR | : <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| RNA | : <i>Ribonucleic Acid</i> |
| WHO | : <i>World Health Organization</i> |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.LATAR BELAKANG

Legionella sp. adalah bakteri gram-negatif yang banyak ditemukan pada lingkungan air. Infeksi *Legionella* atau legionellosis pertama kali menjadi wabah di Philadelphia Amerika Serikat pada tahun 1976 dengan jumlah kasus 182 dan kematian 29 orang (CFR 15,9%)¹. Legionellosis dapat berkembang menjadi dua keadaan klinik, pertama *Legionnaires' disease* yang merupakan pneumonia akut dan kedua *Pontiac fever*, penyakit yang mirip dengan flu dan dapat sembuh dengan sendirinya¹. Angka kejadian *Legionnaires' disease* di Amerika Serikat antara tahun 1980 – 1998 rata-rata 356 kasus per tahun, saat ini diperkirakan 8000 - 18,000 kasus terjadi setiap tahun^{1,2}.

Di Indonesia kasus ini ada di sejumlah tempat antara lain di Bali (1996), di Karawaci Tangerang (1999), dan di sejumlah kota lainnya. Penelitian *Raharjo* tahun 2002 di laboratorium Pusat Penelitian Pengembangan Pemberantasan Penyakit Indonesia menunjukkan dari 213 sampel serum pekerja *Cooling tower* yang berasal dari Bandung, Surabaya, Medan, dan Makasar terdapat 68 sampel (32%) positif mempunyai antibodi terhadap *Legionella pneumophila*, artinya pekerja yang diperiksa pernah terpapar kuman *Legionella*.

Gejala klinis legionellosis sangat luas mulai dari asimptomatik hingga pneumonia, keadaan klinis pneumonia yang disebabkan oleh *Legionella* tidak dapat dibedakan dengan pneumonia yang disebabkan oleh agen lain¹. Kunci untuk diagnosis legionellosis dengan pemeriksaan mikrobiologi jika pasien tergolong pada kategori resiko tinggi yaitu pasien lanjut usia, pasien dengan status imun lemah (pasien HIV & pasien kanker), perokok berat, pasien dengan pengobatan kortikosteroid dan peminum alkohol berat. Karena legionellosis tidak menyebar dari manusia ke manusia lain dan transmisi yang diketahui melalui aerosol yang terkontaminasi, maka perlu dilakukan pemantauan terhadap adanya bakteri *legionella sp* pada sistem air^{1,2}.

Adanya *Legionella* pada lingkungan air dan temperatur air yang hangat adalah dua faktor yang meningkatkan resiko legionellosis, komponen ketiga adalah faktor nutrisi yang sesuai untuk multiplikasi bakteri¹. *Legionella sp* memerlukan kombinasi nutrisi

yang khusus jika ditumbuhkan di laboratorium kontradiktif dengan penyebarannya yang luas di lingkungan air. Nutrisi yang dibutuhkan *Legionella* jarang terdapat di lingkungan air dan jika ada maka akan meningkatkan pertumbuhan bakteri lain yang lebih cepat tumbuh dibandingkan *Legionella*. Nutrisi untuk *Legionella* terdapat pada lingkungan intraselular bukan materi terlarut dalam lingkungan air. *Legionella* hidup di lingkungan air dan tanah yang basah sebagai parasit protozoa dan juga dapat hidup dalam biofilm pada sistem air. Bakteri ini lebih mudah dideteksi dari sampel swab biofilm dibandingkan dari air yang mengalir, hal ini menunjukkan mayoritas legionella terdapat dalam biofilm^{1,4}.

Umumnya kasus legionellosis bersifat sporadik akibat dari kontaminasi pada sistem air panas maupun dingin seperti pendingin udara, spa, kolam renang, peralatan terapi respirasi. Kasus yang terjadi dihubungkan dengan infeksi nosokomial atau infeksi yang berhubungan dengan pariwisata (*Travel-associated infection*). Dari survei yang dilakukan oleh EWGLINET pada tahun 2004 dilaporkan sebanyak 655 kasus legionellosis yang berhubungan dengan pariwisata tercatat 37 kematian dengan kejadian tersebut diperoleh angka kematian 5.6%⁵. Deteksi *Legionella* pada sistem air di gedung bertingkat dan rumah sakit diperlukan untuk mencegah Legionellosis nosokomial ataupun komunitas.

Saat ini terdapat beberapa metode untuk mendeteksi legionella yaitu isolasi bakteri dengan metode kultur, deteksi antigen di dalam urin, deteksi bakteri dalam jaringan ataupun cairan tubuh menggunakan mikroskop immunofluorescent seperti direct immunofluorescent assay (DFA) dan deteksi DNA bakteri dengan polymerase chain reaction (PCR). Penggunaan metode kultur dan DFA untuk deteksi legionella pada kasus legionellosis telah menurun dan kebanyakan kasus dideteksi langsung dengan deteksi antigen di dalam urin. Akibat dari pergeseran ini maka jumlah deteksi *Legionella pneumophila* serogroup 1 meningkat sebaliknya serogroup lain tidak terdeteksi karena antibodi yang digunakan hanya spesifik terhadap *Legionella pneumophila* serogroup 1.^{1,6}

Sedangkan untuk mendeteksi legionella dari lingkungan, tehnik yang menjadi standar baku emas adalah metode kultur. Meskipun *Legionella sp* tersebar luas, tetapi isolasi *Legionella sp* dari lingkungan air tidak selalu berhasil. Teknik kultur yang umumnya digunakan untuk pemantauan adanya *Legionella sp* pada lingkungan air mempunyai keterbatasan. Pertama kultur memerlukan media selektif dan masa

inkubasi yang panjang (lebih dari 10 hari). Kedua kemungkinan bakteri hilang selama penanganan sampel yaitu pada saat proses sentrifugasi ataupun filtrasi yang dilanjutkan dengan proses dekontaminasi, dan ketiga adanya organisme lain yang mengganggu pertumbuhan *Legionella* sehingga jumlah sebenarnya *Legionella* dalam sampel tidak dapat diketahui. Deteksi yang tepat dan cepat berguna untuk penanganan lingkungan secepatnya sehingga kontaminasi aerosol tidak terjadi⁷.

Pada penelitian ini metode duplex PCR akan dikembangkan untuk mendeteksi *Legionella sp* dan *Legionella pneumophila* dengan primer yang digunakan pada penelitian *Templeton*⁸. Dari teknik yang diperoleh akan dilakukan perbandingan sensitifitas dan spesifitas dengan metode kultur yang merupakan standar baku emas deteksi tersebut. Metoda PCR dipilih karena memiliki beberapa kelebihan antara lain mempersingkat waktu deteksi, dapat mengidentifikasi *L. pneumophila* secara langsung tanpa uji biokimia dan adanya organisme pengganggu tidak menghalangi deteksi untuk *Legionella sp* dan *Legionella pneumophila*.

1.2.TUJUAN PENELITIAN

1.2.1. Tujuan Umum

Mengembangkan metode duplex PCR untuk deteksi *Legionella sp* dan *Legionella pneumophila*.

1.2.2. Tujuan Khusus:

- Memperoleh metode duplex PCR yang optimal untuk deteksi *Legionella sp & Legionella pneumophila*
- Memperoleh sensitifitas dan spesifisitas metode duplex PCR untuk deteksi *Legionella sp & Legionella pneumophila* terhadap kultur berdasarkan uji simulasi
- Memperoleh hasil deteksi *Legionella sp & Legionella pneumophila* yang terdapat pada sampel air *cooling tower* dengan metode duplex PCR

1.3.MANFAAT PENELITIAN

Manfaat yang bisa didapatkan dari penelitian ini antara lain;

- dapat merekomendasikan penggunaan teknik yang lebih cepat dan tepat dalam mendeteksi *Legionella spp* dan *L. Pneumophila* pada sampel yang berasal dari lingkungan.
- dapat menjadi bahan rujukan untuk pengembangan deteksi *Legionella pneumophila* pada spesimen klinik

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

2.1.1. Taksonomi dan karakteristik genus *Legionella*^{1,6,9}

Legionella merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang dengan ukuran lebar 0.5 – 1 um dan panjang 1- 2 um, tidak berkapsul, tidak membentuk spora, bersifat aerob, memiliki membran luar, flagel dan pili. Ukuran bakteri menjadi bervariasi setelah dibiakkan pada media.

Legionella memerlukan nutrisi khusus untuk pertumbuhannya (fastidious) yaitu L-sistein dan garam besi dengan pH 6.8 - 7. Medium optimal untuk *Legionella* adalah kombinasi *charcoal-yeast extract* yang dikembangkan oleh James Feeley, ekstrak yeast menjadi sumber nutrisi sedangkan karbon aktif berfungsi untuk menghilangkan radikal oksigen toksik.

Koloni yang tumbuh mempunyai diameter yang beragam mulai dari 1 mm hingga 4 mm. Koloni terlihat berkilau, berwarna abu-abu putih sampai biru kehijauan dan cembung. Beberapa koloni *Legionella* bila disinari dengan lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm akan tampak fluoresensi biru putih hingga merah terang kecuali koloni *L. pneumophila* tidak menunjukkan adanya fluoresensi.

Semua spesies *Legionella* menghasilkan uji katalase positif lemah, tes oksidasi memberi hasil yang bervariasi, menghasilkan enzim gelatinase, tidak memfermentasi karbohidrat, mereduksi nitrat, menghidrolisis hipurat dan tidak menghidrolisis urea. Hidrolisis hipurat merupakan salah satu sifat spesifik *Legionella pneumophila* yang dapat dibedakan dari *Legionella spp* lainnya.

Famili *Legionellaceae* hanya memiliki satu genus yaitu *Legionella*, kekerabatan DNA diantara strain pada satu spesies sedikitnya 90% sedangkan diantara spesies satu dengan lainnya kurang dari 70%. Pada saat ini dalam genus *Legionella* telah ditemukan sekitar 50 spesies dan 70 serogroup

Tabel 1. *Legionella* spp dan serogroup

| No. | Spesies | Jumlah serogroup | Jumlah yang Berhubungan dengan legionellosis |
|-----|-----------------------------|------------------|--|
| 1 | <i>L. pneumophila</i> | 16 | 16 |
| 2 | <i>L. bozemanii</i> | 2 | 2 |
| 3 | <i>L. erythra</i> | 2 | 1 |
| 4 | <i>L. feelei</i> | 2 | 2 |
| 5 | <i>L. hackeliae</i> | 2 | 2 |
| 6 | <i>L. longbeachae</i> | 2 | 2 |
| 7 | <i>L. sainthelensi,</i> | 2 | 2 |
| 8 | <i>L. anisa</i> | 1 | 1 |
| 9 | <i>L. birminghamensis</i> | 1 | 1 |
| 10 | <i>L. cincinnatiensis</i> | 1 | 1 |
| 11 | <i>L. dumoffii</i> | 1 | 1 |
| 12 | <i>L. gormanii</i> | 1 | 1 |
| 13 | <i>L. jordanis</i> | 1 | 1 |
| 14 | <i>L. lansigensis</i> | 1 | 1 |
| 15 | <i>L. maceachernii</i> | 1 | 1 |
| 16 | <i>L. micdadei</i> | 1 | 1 |
| 17 | <i>L. oakridgensis</i> | 1 | 1 |
| 18 | <i>L. parisiensis</i> | 1 | 1 |
| 19 | <i>L. tusconensis</i> | 1 | 1 |
| 20 | <i>L. wadsworthii</i> | 1 | 1 |
| 21 | <i>L. adelaidensis</i> | 1 | 0 |
| 22 | <i>L. beliardensis</i> | 1 | 0 |
| 23 | <i>L. brunensis</i> | 1 | 0 |
| 24 | <i>L. busanensis</i> | 1 | 0 |
| 25 | <i>L. cherrii</i> | 1 | 0 |
| 26 | <i>L. drozanskii</i> | 1 | 0 |
| 27 | <i>L. drancourtii</i> | 1 | 0 |
| 28 | <i>L. L. Fairfieldensis</i> | 1 | 0 |
| 29 | <i>L. falloni</i> | 1 | 0 |
| 30 | <i>L. geestiana</i> | 1 | 0 |
| 31 | <i>L. genomospesies!</i> | 1 | 0 |
| 32 | <i>L. gratiana</i> | 1 | 0 |
| 33 | <i>L. gresilensis</i> | 1 | 0 |
| 34 | <i>L. israelensis</i> | 1 | 0 |
| 35 | <i>L. jamestownlensis</i> | 1 | 0 |
| 36 | <i>L. iondiniensis</i> | 1 | 0 |
| 37 | <i>L. lytica</i> | 1 | 0 |
| 38 | <i>L. moravica</i> | 1 | 0 |
| 39 | <i>L. nautarum</i> | 1 | 0 |
| 40 | <i>L. quateirensis</i> | 1 | 0 |
| 41 | <i>L. quinlivanii</i> | 2 | 0 |
| 42 | <i>L. rowbothamii</i> | 1 | 0 |
| 43 | <i>L. rubrilucens</i> | 1 | 0 |
| 44 | <i>L. santacrucis</i> | 1 | 0 |
| 45 | <i>L. shakespearei</i> | 1 | 0 |
| 46 | <i>L. spiritensis</i> | 2 | 0 |
| 47 | <i>L. steigerwaitii</i> | 1 | 0 |
| 48 | <i>L. taurinensis</i> | 1 | 0 |
| 49 | <i>L. waitersii</i> | 1 | 0 |
| 50 | <i>L. worsleiensis</i> | 1 | 0 |

Sumber: Bartram, WHO, 2007

2.1.2. Habitat alami *Legionella*

Legionella hidup di lingkungan air pada kondisi lingkungan yang beragam, merupakan bakteri yang toleran terhadap asam dan dapat ditemukan pada lingkungan air yang memiliki kisaran pH 2 – 8.3

L. pneumophila dapat tumbuh pada kisaran suhu 25° – 42° C dengan suhu optimal 35° C. Pada beberapa kasus legionellosis yang berhubungan dengan lingkungan air buatan umumnya memiliki suhu yang lebih tinggi dari suhu ambient.

Adanya bakteri *Legionella* dalam lingkungan air dan suhu air yang hangat merupakan dua faktor yang dapat meningkatkan resiko terjadinya sumber penularan legionellosis. Faktor lainnya adalah nutrisi yang memungkinkan replikasi *Legionella*. Bakteri ini memerlukan kombinasi nutrisi yang unik jika ditumbuhkan pada medium di laboratorium, hal ini kontradiktif dengan penyebaran *Legionella* yang luas pada lingkungan air. Nutrisi yang dibutuhkan *Legionella* merupakan nutrisi yang berada dalam lingkungan intraseluler bukan nutrisi terlarut yang terdapat dalam air^{1,9}.

Legionella hidup dalam lingkungan air dan tanah yang lembab sebagai parasit intraseluler protozoa. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Legionella* mengalami multiplikasi dalam 14 spesies amuba dan dua spesies siliata. *Legionella* yang hidup dalam amuba khususnya kista amuba memungkinkan bakteri *Legionella* dapat hidup pada kondisi yang ekstrim seperti suhu tinggi, klorinasi dan pH yang ekstrim⁶.

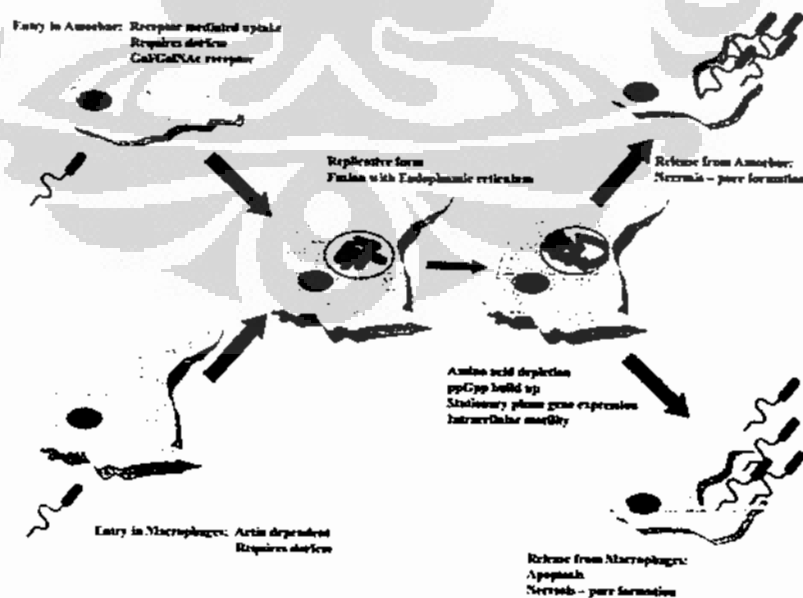
Legionella juga hidup dalam biofilm pada suatu sistem air, hal ini terbukti bahwa bakteri ini lebih mudah dideteksi dari sampel usap biofilm dibandingkan dari air yang mengalir. Pada penelitian yang dilakukan Murga et al tentang pertumbuhan *L. pneumophila* dalam suatu model biofilm dengan dan tanpa protozoa *Hartmannella vermiformis* menunjukkan bahwa *L. pneumophila* tidak dapat bermultiplikasi dalam biofilm tanpa adanya *Hartmannella vermiformis*. Tetapi *Legionella pneumophila* di alam dapat hidup dalam suatu biofilm dengan atau tanpa adanya protozoa^{6,10}.

2.1.3. Siklus Hidup Intraseluler

Siklus hidup *Legionella* baik pada protozoa ataupun sel mamalia menjadi faktor utama patogenesis *Legionella*. Penelitian oleh *Horwitz et al* tentang siklus hidup intraseluler menunjukkan bahwa bakteri masuk kedalam sel melalui proses fagositosis kemudian dalam makrofag *Legionella* akan menghambat fusi fagolisosom.

Legionella menghasilkan enzim proteolitik, fosfatase, lipase dan nuklease yang pada akhirnya dapat membunuh sel inangnya kemudian keluar sel dan menginfeksi sel fagosit lainnya. *Legionella* merupakan patogen intraseluler fakultatif. Multiplikasi umumnya terjadi dalam sistem monosit-makrofag termasuk juga makrofag alveolus. *Legionella* juga difagosit oleh netrofil polimorfonuklear tetapi tidak menunjukkan multiplikasi pada sel tersebut^{11,12}.

Penelitian *Hammer & Swanson* menunjukkan bahwa deplesi asam amino sel inang menyebabkan akumulasi 3',5' bispyrophosphate (ppGpp) yang akan meningkatkan jumlah *stationary-phase protein*. Protein tersebut akan memfasilitasi infeksi bakteri ke sel inang yang baru. Fagosom *Legionella pneumophila* tidak memiliki marker sebagaimana sifat fagosom konvensional, fagosom *Legionella* tidak memiliki alkali fosfatase, MHC I dan II, reseptor transferin, Rab 7, LAMP-1 dan cathepsin D sehingga fagosom *Legionella* terbebas dari sistim endositik sel^{6,11}.



Sumber: Fields, Benson & Besser (2002)

Gambar 1. siklus hidup *L. pneumophila* dalam protozoa dan makrofag manusia

2.1.4. Faktor virulensi

Faktor virulensi dari *Legionella pneumophila* yang pertama kali diidentifikasi adalah suatu protein permukaan yang disebut *macrophage infectivity potentiator (mip)* yang dinotasikan sebagai protein mip 24-kDa. Protein *mip* merupakan protein homolog dari *FK506-binding protein* yang menunjukkan aktifitas *peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase* yang diperlukan untuk fase awal infeksi intraseluler^{6,11}.

Sistem sekresi tipe IV (*dot/icm*) *Legionella* memungkinkan bakteri dapat mengirimkan makromolekul seperti keluar dan masuk ke dalam sel target lain. Sistem sekresi *dot/icm* (*dot*—defective organelle trafficking) dan *icm* (intracellular multification) merupakan faktor penting untuk infeksi bakteri ke dalam sel inang. *Legionella pneumophila* menggunakan sistem ini untuk mengirimkan faktor-faktor virulensi dan protein sehingga fagosom *Legionella* dapat terhindar dari sistem endositik sel^{6,11}.

Sesudah bakteri *Legionella pneumophila* masuk dan sebelum melakukan replikasi, bakteri berada dalam vakuola yang dikelilingi *ribosom-studded membrane* yang berasal dari retikulum endoplasma dan mitokondria. Hal ini memungkinkan bakteri memperoleh akses ke lumen retikulum endoplasma yang kaya akan peptida sehingga dapat menyokong kehidupan dan replikasi *L.pneumophila*.^{6,11}

Selain protein mip dan sistem sekresi tipe IV *dot/icm*, komponen seluler *Legionella pneumophila* yang dapat menjadi faktor virulensi adalah *heat shock protein 60* yang meningkatkan invasi pada sel epitel, pili tipe IV, dan flagella, sedangkan produk ekstraseluler yang bersifat virulen antara lain sitotoksin yang dapat mengganggu kemampuan sel fagosit untuk menggunakan oksigen dan beberapa enzim untuk aktifitas fagositiknya.^{6,11}

2.1.5. Spektrum Legionellosis

Legionella spp dapat dihubungkan dengan keadaan klinis yang bervariasi mulai dari infeksi tanpa gejala hingga infeksi kronis. Sekitar 85% kasus legionellosis disebabkan oleh *L. pneumophila*, 50% diantaranya disebabkan oleh *L. pneumophila* serogroup 1, dan 10% serogroup 6. Tiga manifestasi klinis utama yang dapat terjadi akibat infeksi *Legionella* adalah, pertama pneumonia atau yang lebih dikenal dengan *Legionnaire's*

disease dengan tingkat kefatalan 10 % - 20%, kedua *Pontiac fever* suatu infeksi yang bersifat *self-limited* merupakan infeksi pada saluran pernafasan mirip flu dan yang ketiga infeksi pada tempat lain seperti luka abses^{1,9,11}.

Pontiac fever, ditandai dengan gejala demam, mialgia, malaise dan sakit kepala tetapi tidak disertai pneumonia. Gejala dapat berkembang mulai dari 12 jam setelah terpapar hingga 2 – 5 hari, kemudian sembuh secara spontan tanpa pengobatan dengan antibiotic. Patologi dari *Pontiac fever* lebih disebabkan oleh reaksi hipersensitifitas terhadap *Legionella*^{1,9}.

Legionnaire's disease ditandai dengan pneumonia akut yang disertai manifestasi pada sistem lainnya. Sesudah masa inkubasi selama 2 – 10 hari berkembang gejala awal berupa demam akut, malaise, mialgia, tanpa disertai batuk yang produktif dan sakit kepala. Gangguan multiorgan umumnya terjadi pada saluran pencernaan, sistem saraf pusat, hati dan ginjal. Pemeriksaan radiologis tidak memperlihatkan hasil yang spesifik yang dapat membedakan pneumonia *Legionella* dengan tipe pneumonia lain, Kunci diagnosis untuk mengetahui ada tidaknya infeksi *Legionella* adalah dengan tes mikrobiologi jika pasien merupakan kategori resiko tinggi^{6,9}.

Individu yang beresiko tinggi terhadap *Legionnaire's disease* adalah pasien *immunocompromised*, orang tua yang berusia lebih dari 60 tahun, ataupun perokok berat¹.

2.1.6. Epidemiologi Legionellosis

Kasus legionellosis dapat terjadi secara sporadik dan epidemik. Saat ini kejadian *legionnaires' disease* di Amerika Serikat, yang dilaporkan kepada CDC rata-rata 1200 - 2200 kasus per tahun, diperkirakan kejadian yang sebenarnya antara 10.000 – 20.000 kasus per tahun. Kejadian legionellosis yang dilaporkan tidak merefleksikan insiden yang sebenarnya, hal ini disebabkan antara lain, klinisi umumnya melakukan terapi empiris untuk penanganan pneumonia dan tidak melakukan tes diagnostik untuk menentukan etiologi pneumonia. Untuk kasus *legionnaires' disease*, hal ini tidak hanya menjadi masalah bagi pasien yang tidak mendapat target terapi tetapi juga seluruh komunitas karena setiap kasus *legionnaires' disease* mungkin menunjukkan adanya wabah^{1,6}.

Penelitian yang dilakukan mengenai etiologi pneumonia di USA, menunjukkan bahwa insiden *legionnaires' disease* berkisar antara 2 – 5 % dari seluruh kasus pneumonia. Kejadian yang berhubungan dengan legionellosis umumnya meningkat pada musim panas, wabah yang dihubungkan dengan *cooling tower* lebih sering terjadi pada musim panas dan musim gugur, sedangkan kasus nosokomial tidak berhubungan dengan musim¹.

Bhopal et al melakukan penelitian mengenai kasus legionellosis sporadik dan hubungannya antara jarak *cooling tower* dan perumahan warga. Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa resiko infeksi berkurang dengan bertambahnya jarak. Masyarakat yang tinggal dalam radius 0.5 km dari suatu *cooling tower* memiliki resiko infeksi tiga kali lebih besar dibandingkan dengan masyarakat yang tinggal dalam radius 1 km.^{6,13}

Salah satu kasus legionellosis yang berhubungan dengan *cooling tower* adalah kejadian di Amsterdam Belanda pada bulan juli tahun 2006. Pada kejadian tersebut 30 orang dengan rentang usia 32 – 81 tahun yang tinggal atau bekerja disekitarnya terindikasi *legionnaires' disease*, dua orang diantaranya meninggal dunia. Konsentrasi *Legionella* yang ditemukan pada *cooling tower* tersebut adalah 5×10^6 CFU/L. Strain *Legionella* yang terdapat pada *cooling tower* sesuai dengan yang ditemukan pada pasien dengan menggunakan metode AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).¹⁴

2.2. DETEKSI LEGIONELLA

2.2.1 Metode Kultur^{1,3,6,7}

Legionella pneumophila pertama kali diisolasi menggunakan Mueller-Hinton Agar yang ditambah suplemen hemoglobin dan IsoVitaleX. Selanjutnya Feeley-Gorman mengembangkan media dengan merubah tepung menjadi arang aktif—charcoal untuk detoksifikasi medium dan sumber asam amino menggunakan ekstrak yeast sehingga diperoleh *charcoal yeast extract agar*, yang terus mengalami pengembangan hingga saat ini yang digunakan adalah *buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar*.

Saat ini telah tersedia media kultur komersil yang dapat digunakan untuk mengisolasi *Legionella*, selain media *BCYE agar* tersedia juga suplemen pertumbuhan yang mengandung L-sistein dan ferro-ketoglutarat untuk meningkatkan pertumbuhan. Suplemen selektif yang mengandung antibiotik juga ditambahkan untuk mengurangi bakteri kompetitor sehingga meningkatkan sensitifitas media. Isolasi *Legionella* menggunakan metode kultur umumnya berhasil pada laboratorium yang menggunakan berbagai jenis media dengan proses dekontaminasi sampel.

Metode isolasi sampel lingkungan dan spesimen klinik untuk *Legionella* berbeda. *Legionella* biasanya merupakan komponen minor dari total populasi bakteri yang ada di lingkungan, jarang sekali ada dalam jumlah besar sehingga pengerjaan sampel lingkungan perlu dilakukan pemekatan sebelum kultur baik dengan cara sentrifugasi ataupun filtrasi menggunakan membran filter, sedangkan spesimen klinik seperti sputum dan jaringan biopsi perlu dilakukan homogenisasi. Sebelum dilakukan kultur baik pada konsentrat sampel lingkungan maupun spesimen klinis harus dilakukan dekontaminasi untuk mengurangi bakteri kompetitor.

Proses dekontaminasi yang digunakan pada saat ini adalah dengan penambahan buffer HCL pH 2.2 pada perbandingan 1 : 1 antara konsentrat sampel dan buffer HCl. Proses dekontaminasi lainnya adalah pemanasan konsentrat sampel pada suhu 50° C selama 30 menit

Kultur masih merupakan metode standar baku emas untuk diagnosis legionellosis dan merupakan prosedur yang sangat spesifik. Kelemahan kultur sebagai metode deteksi antara lain memerlukan media khusus, waktu inkubasi yang lama dan pengalaman setiap laboratorium untuk mengisolasi *Legionella* masih rendah. Pada pemeriksaan spesimen klinik umumnya laboratorium menolak sputum yang mengandung banyak sel epitel skuamosa sementara pasien *legionnaires' disease* menghasilkan sedikit sputum. Sedangkan kesulitan metode kultur untuk deteksi *Legionella* dari sampel lingkungan antara lain, adanya bakteri lain yang akan menekan pertumbuhan *Legionella*, sehingga menyulitkan proses isolasi.

Deteksi legionella dengan metode kultur pada kasus legionellosis, jika ditemukan satu atau sedikit koloni, hal ini sudah cukup untuk menetapkan diagnosis. Pertumbuhan koloni umumnya tidak terjadi jika pasien telah menerima pengobatan dengan antibiotika yang sesuai dan jika spesimen terkontaminasi dengan mikroorganisme lain.

2.2.2. Serologi^{6,9}

2.2.2.1. Enzyme-linked Immunoassay (EIA)

Metode Enzyme-linked immunoassay (EIA) digunakan untuk mendeteksi antigen *Legionella* yaitu lipopolisakarida yang terdapat dalam urin pasien yang terinfeksi. Sensitivitas metode ini untuk mendeteksi *L. pneumophila* serogroup 1 relatif tinggi sekitar 60 % - 90%. Selain lipopolisakarida, lipoprotein permukaan sel *Legionella* juga terdapat dalam urin pasien yang terinfeksi, sehingga lipoprotein dapat menjadi target diagnostik.

Deteksi antigen yang terdapat dalam urin merupakan metode pilihan untuk mendeteksi *Legionella pneumophila* serogroup 1 dibandingkan metode lain, karena spesimen mudah diperoleh, antigen *Legionella* dapat terdeteksi lebih awal dan masih dapat terdeteksi dalam urin pasien yang telah diberi pengobatan setelah beberapa waktu.^{6,9}

2.2.2.2. Direct Immunofluorescence Assays (DFA)^{1,9}

Direct Immunofluorescence Assays adalah metode deteksi *Legionella* yang menggunakan antibodi yang berkonjugasi dengan *fluorochrome*. Tes DFA merupakan tes yang spesifik, meskipun sensitivitas DFA tergolong rendah sekitar 25 - 75 %. Hal ini disebabkan karena antibodi yang digunakan adalah antibodi spesifik terhadap serotip ataupun spesies tertentu. Pengerjaan DFA perlu dilakukan dengan hati-hati untuk mencegah hasil DFA positif palsu. Kontaminasi dapat berasal dari kontak spesimen klinik dengan air terkontaminasi ataupun dari organisme yang digunakan sebagai kontrol positif. Selain itu pengalaman dan kemampuan laboratoris untuk menginterpretasikan hasil DFA menjadi faktor yang mempengaruhi hasil DFA.

2.2.2.3. Indirect Immunofluorescence Assays (IFA)^{1,6}

Indirect immunofluorescence antibody technique (IFAT) digunakan untuk mendeteksi titer antibodi serum pasien. Peningkatan titer empat kali atau lebih (1: 128 atau lebih) menjadi dasar diagnostik. Peningkatan titer yang signifikan terjadi dalam minggu pertama sakit pada 25% - 40% pasien. Teknik ini mempunyai keterbatasan untuk digunakan sebagai alat diagnostik legionellosis karena memerlukan waktu yang panjang, dibutuhkan dua pasang serum dan sulit untuk mendapatkan serum konvalesen.

2.2.3. Amplifikasi Asam Nukleat^{1,6,8,16}

Deteksi molekular dikerjakan dengan teknik reaksi berantai polimerase/ Polymerase Chain Reaction (PCR) yang merupakan teknik *in vitro* untuk mengamplifikasi suatu fragmen DNA target secara enzimatik. Reaksi ini minimal menggunakan dua primer oligonukleotida yang berlawanan arah dan mengikat fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Prinsip teknik PCR adalah mencampur DNA sampel, primer spesifik yang mengenal fragmen DNA yang diinginkan, dNTP dan enzim DNA polimerase termotabil dalam larutan penyangga yang sesuai. Teknik ini terdiri dari tiga tahap yang merupakan siklus berulang. Tahap pertama dimulai dengan denaturasi DNA yaitu pemisahan DNA rantai ganda menjadi DNA rantai tunggal. Tahap kedua adalah penempelan primer (*annealing*) pada fragmen DNA target, dan dilanjutkan dengan perpanjangan primer untuk sintesis DNA baru (*extension*).

Teknik PCR memungkinkan deteksi kuman dalam jumlah sedikit, dan merupakan metode yang cepat, sensitif dan spesifik untuk deteksi *Legionella* dibandingkan dengan kultur. Target gen yang digunakan untuk deteksi *Legionella* dengan metode PCR antara gen 16S rRNA, gen yang mengkode *heat-shock protein* (*dnaJ*), gen RNA polimerase (*rpoB*) dan gen *macrophage infectivity factor* (*mip*). Umumnya gen rRNA digunakan untuk target genus *Legionella* dan gen *mip* digunakan sebagai target spesifik *Legionella pneumophila*.

Metode PCR *Legionella* dapat mendeteksi seluruh serogroup dari *L. pneumophila* sehingga berguna untuk diagnostik awal infeksi. Metode ini memiliki beberapa keterbatasan antara lain metode PCR memerlukan evaluasi dan standarisasi dari persiapan sampel dan protokol PCR membutuhkan primer dan probe yang spesifik dan sensitif.

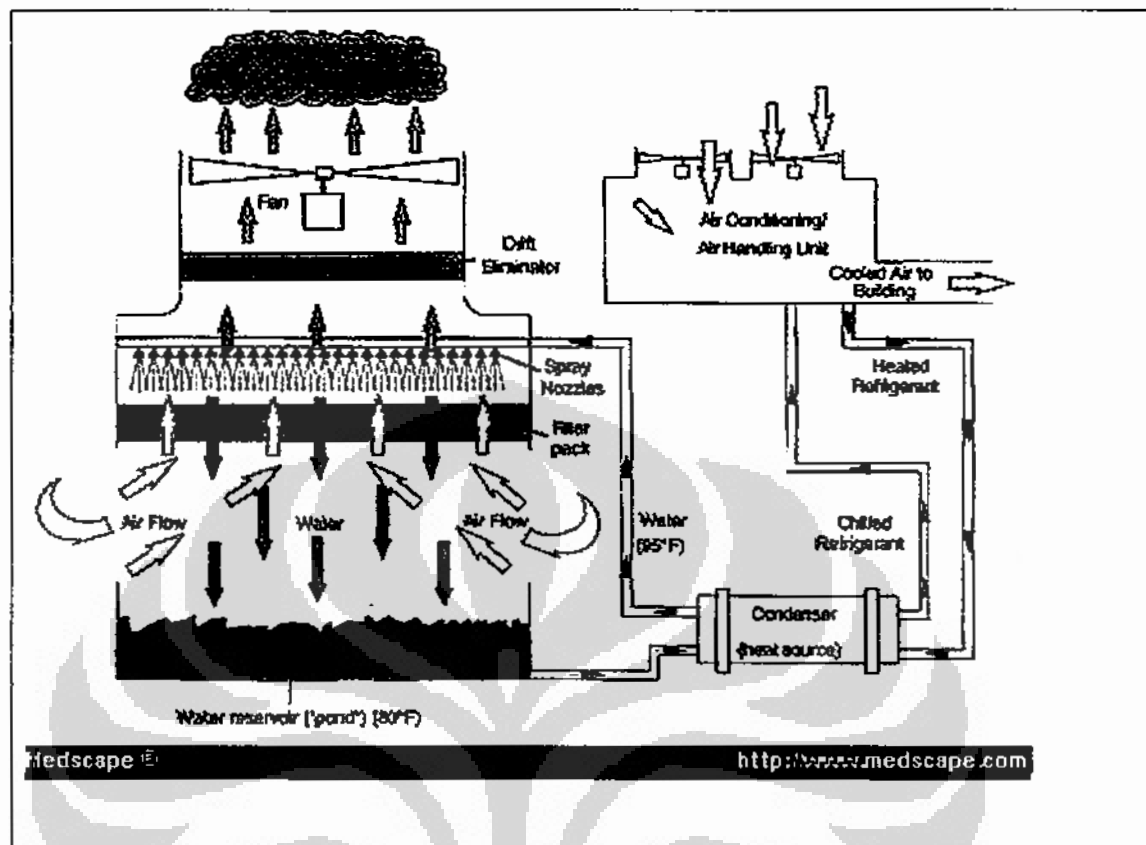
2.3. COOLING TOWER^{6,17,18}

Salah satu komponen utama pada sistem pendingin sentral (AC sentral) adalah *cooling tower* atau menara pendingin. Fungsi utamanya adalah sebagai alat untuk mendinginkan air panas dari kondensor dengan cara dikontakkan langsung dengan udara secara konveksi paksa menggunakan fan/kipas. Udara yang bergerak melalui tower dan kondensor diproduksi oleh fan ataupun berasal dari konveksi alami.

Secara umum bentuk konstruksinya berupa *shell & tube* dimana air mengalir memasuki *shell* dan uap refrigeran *superheat* akan mengalir dalam pipa yang berada di dalam tabung, sehingga terjadi proses pertukaran kalor. Uap refrigeran *superheat* berubah fasa menjadi cair yang memiliki tekanan tinggi mengalir menuju alat ekspansi, sementara air yang keluar memiliki temperatur yang lebih tinggi. Karena air ini akan digunakan lagi untuk proses pendinginan kondensor maka tentu saja temperaturnya harus diturunkan kembali atau didinginkan pada *cooling tower*.

Langkah pertama untuk menurunkan temperatur air yang berasal dari uap refrigeran *superheat* adalah dengan memompa air panas tersebut menuju *cooling tower*, melalui sistem pemipaan yang pada ujungnya memiliki banyak nozzle untuk tahap spraying atau semburan. Air panas yang keluar dari nozzle secara langsung melakukan kontak dengan udara sekitar yang bergerak secara paksa karena pengaruh fan/blower yang terpasang pada *cooling tower*.

Udara yang keluar dari *cooling tower* dapat membawa dua tipe air, pertama air yang telah diuapkan dalam sistem dan mengalami rekondensasi menjadi uap air, kedua tetes air yang terbawa aliran udara, tetes air ini dapat mengandung berbagai partikel termasuk mikroorganisme yang berasal dari sumber air. Tetes air tersebut dapat menjadi aerosol terkontaminasi ketika air menguap dalam udara terbuka diluar *cooling tower* yang dapat mentransmisikan *Legionella*.



Gambar 2. skema sistem pendingin sentral dengan *cooling tower*

BAB III METODOLOGI

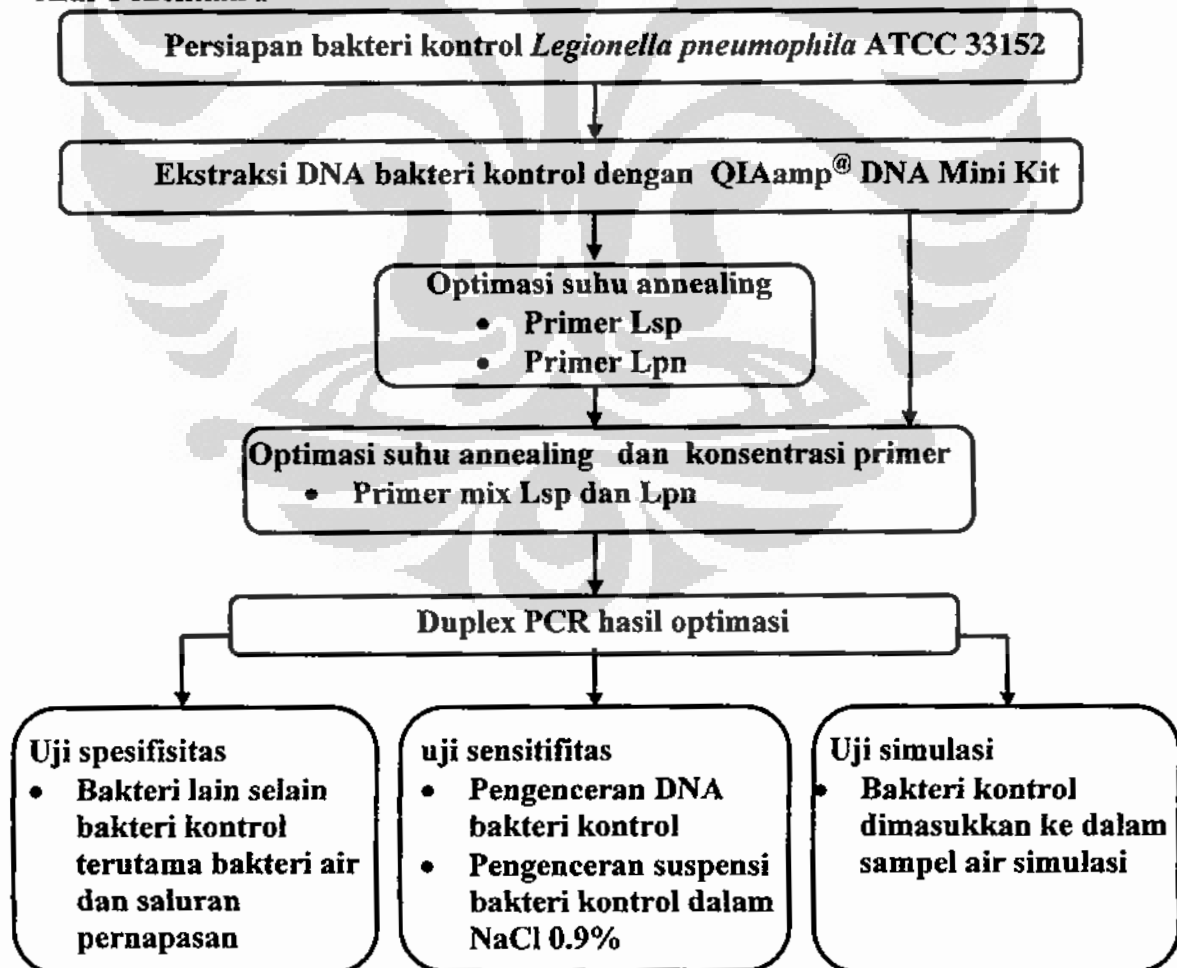
3.1. Disain Penelitian

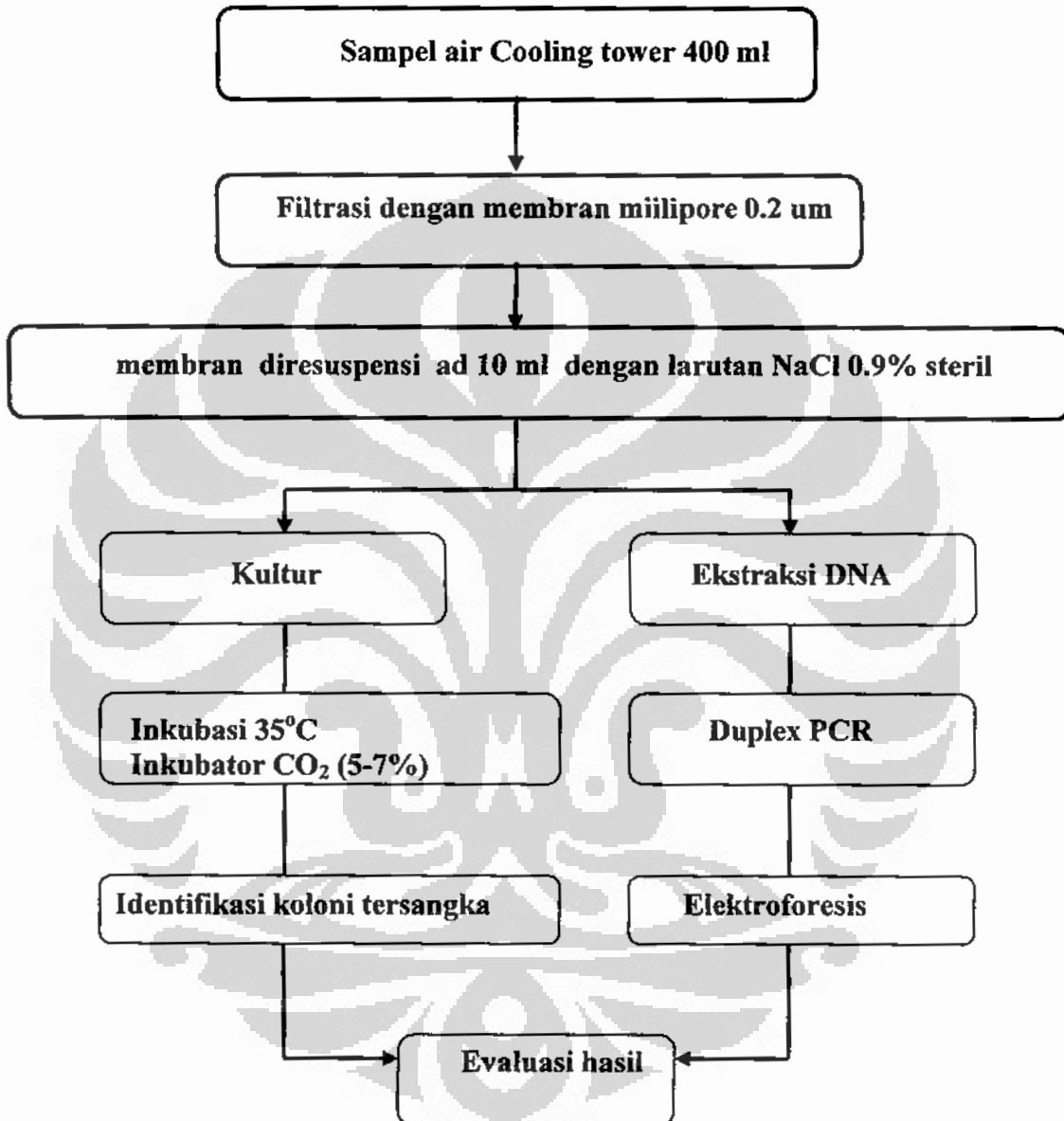
Merupakan penelitian deskriptif

3.2. Alur Penelitian

- Tahap I : Optimasi Duplex PCR
- Tahap II : Uji sensitifitas
- Tahap III : Uji Spesifisitas
- Tahap IV : Uji Simulasi
- Tahap V : Aplikasi pada sampel air *Cooling tower*

Alur Penelitian I



Alur penelitian II**Uji Simulasi dan Aplikasi pada sampel air *cooling tower***

3.3. Cara Pengumpulan Data

3.3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKUI, Jl. Pegangsaan Timur 16 Jakarta Pusat 10310 telp. 021-31922850. Waktu pelaksanaan penelitian mulai bulan November 2007 hingga Oktober 2008

3.3.2. Cara Pemilihan Sampel

Sampel diambil dengan cara *convenient sampling* yaitu sampel dipilih tanpa sistematika tertentu

3.3.3. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah sampel air *cooling tower* dan sampel yang diambil melalui perpipaan atau air kran. Jumlah sampel yang diujikan sebanyak 9 sampel air *cooling tower* dan 3 sampel air kran. Sampel air *cooling tower* berasal dari Hotel (4), Gedung perkantoran (1), Gedung Perpustakaan (1) dan Pusat Perbelanjaan (3) yang berada di Jakarta. Sampel air kran berasal dari 2 buah hotel tempat pengambilan sampel air *cooling tower*

3.4. Bahan dan Cara Kerja

3.4.1. Persiapan Biakan Bakteri kontrol

Bakteri kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Legionella pneumophila* ATCC 33125, ditanam dalam media BCYE CM655 (Oxoid) yang ditambahkan *growth suplement* SR110A (Oxoid) yang mengandung *ACES buffer*, *ferric pyrophosphate*, *L-cysteine HCL*, *α -ketoglutarate*, dan *selective suplement* SR111E (Oxoid) yang mengandung glisin, vancomycin, polymixin dan cycloheximide. Kultur diinkubasi pada inkubator CO₂ (5-7%) suhu 35° C dan pertumbuhan koloninya diamati setelah 48 -72 jam. Kultur yang digunakan untuk pembuatan supensi bakteri kontrol adalah kultur 48 jam. Suspensi bakteri kontrol dibuat dalam larutan NaCl 0.9% steril dan membandingkan kekeruhan suspensi tersebut dengan standard McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml)

3.4.2. Penentuan sensitivitas kultur

Sensitivitas kultur ditentukan berdasarkan pengamatan masih adanya pertumbuhan koloni pada media biakan hasil kultur dari pengenceran terendah suspensi bakteri. Sensitivitas kultur dilakukan dengan cara sebagai berikut, suspensi bakteri kontrol sesuai McFarland 0.5 diencerkan berseri mulai dari 10^{-1} – 10^{-8} . Dua ratus mikroliter dari setiap pengenceran dikultur pada media BCYE plus, diinkubasi pada suhu 35° C dalam inkubator CO_2 (5-7%) selama 48 -72 jam.

Untuk mengetahui jumlah bakteri dalam suspensi bakteri kontrol, dilakukan perhitungan koloni dari pengenceran yang mempunyai jumlah koloni 30 -300 koloni per plat media. Jumlah bakteri dalam suspensi stok dapat dihitung dengan cara sebagai berikut,

$$\frac{\text{Jumlah koloni}}{\text{Pengenceran X volume yang ditanam}} = \text{jumlah bakteri/ml}$$

3.4.3. Isolasi DNA dan Pengukuran DNA bakteri kontrol

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan kit *QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen[®])* dengan cara sebagai berikut. Seribu mikroliter suspensi bakteri kontrol dimasukkan ke dalam tabung ependorf 1.5 ml dan disentrifugasi selama 5 menit pada 7500 rpm. Kemudian supernatan dibuang, pelet ditambahkan buffer ATL (*Qiagen[®]*) hingga diperoleh total volume 180 ul, selanjutnya ditambahkan 20 ul proteinase K. Campuran divortex lalu diinkubasi pada suhu 56° C selama 1 – 3 jam, campuran divortex 2 – 3 kali selama inkubasi berlangsung. Selesai inkubasi dilakukan spin untuk menghilangkan tetesan dari dinding tabung. Kemudian ditambahkan 200 ul buffer AL (*Qiagen[®]*), dilakukan vortex 15 detik dan diinkubasi kembali pada suhu 70° C selama 10 menit. Setelah itu spin beberapa saat, selanjutnya ditambahkan 200 ul etanol absolut (*Sigma[®]*), divortex selama 15 detik untuk homogenisasi larutan dan spin untuk menghilangkan tetesan dari dinding tabung. Selanjutnya pindahkan larutan termasuk presipitat jika ada ke dalam *QIAamp spin column*, lalu tabung ditutup dan disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Kemudian *spin column* ditempatkan kedalam tabung pengumpul yang baru, ditambahkan 500 ul buffer AW1 (*Qiagen[®]*), *spin column* ditutup, lalu disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit.

Setelah selesai *spin column* ditempatkan kedalam tabung pengumpul baru, kemudian ditambahkan 500 ul buffer AW2 (*Qiagen*[®]), *spin column* ditutup, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 12,000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya tabung pengumpul dibuang dan *spin column* ditempatkan kedalam tabung yang baru, lalu disentrifugasi kembali pada 12,000 rpm selama 1 menit. Kemudian *spin column* ditempatkan kedalam tabung ependorf 1.5 ml lalu ditambahkan buffer AE (*Qiagen*[®]), dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, dan disentrifugasi kembali pada 8000 rpm selama 1 menit, selanjutnya hasil elusi yang mengandung DNA yang dapat disimpan pada suhu -20° C sampai saat digunakan.

Untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan dengan cara spektrofotometri. Pertama disiapkan pengenceran produk isolasi hingga 10^{-2} dalam akuabides steril (2 ul produk isolasi dalam 198 akuabides steril). Pengukuran konsentrasi DNA menggunakan alat spektrofotometer dengan absorbansi pada panjang gelombang 260nm dan 280nm. Pengukuran diulang tiga kali hingga diperoleh konsentrasi yang sama. Kemurnian DNA dinilai dengan membandingkan absorbansi pada panjang gelombang 260nm dengan absorbansi pada panjang gelombang 280nm (A_{260} / A_{280}) harus berada pada kisaran 1.7 – 1.9

3.4.4. Optimasi suhu annealing

Optimasi suhu annealing dilakukan dengan teknik temperatur bergradien 57° – 61° C menggunakan mesin PCR *thermal cycler MJ Mini PCR System Biorad*. *Forward primer* (LspF) AGG CTA ATC TTA AAG CGC C, dan *reverse primer* (LspR) CCT GGC TCA GAT TGA ACG dalam penelitian ini adalah primer yang digunakan *Templeton et al* dan dirancang berdasarkan sekuens gen 16S rRNA untuk mendeteksi *Legionella spp*, produk yang dihasilkan mempunyai ukuran 212 bp. Adapun *forward primer* (LpnR) TGG TGA CTG CAG CTG TTA TG dan *reverse primer* (LpnR) CAT TGC TTC CGG ATT AAC AT dirancang berdasarkan sekuens den *mip* untuk mendeteksi *Legionella pneumophila*, produk yang dihasilkan berukuran 124 bp. DNA bakteri kontrol yang digunakan sebagai cetakan mempunyai konsentrasi 1ng/ul dengan volume cetakan 5 ul dalam total volume reaksi PCR sebanyak 25 ul.

Pada penelitian ini amplifikasi DNA menggunakan kit enzim HotStarTaq[®] (Qiagen) yang terdiri dari

- 10 x PCR buffer (Qiagen[®])
- 5 x Q solution (Qiagen[®])
- 25 mM MgCl₂ (Qiagen[®])
- HotStar taq DNA polimerase (Qiagen[®])

Bahan lain yang digunakan untuk menjalankan reaksi PCR ini adalah

- dNTP mix (Biogen) – 2mM tiap dNTP
- campuran primer (LspF,LspR,LpnF,LpnR)
- *DNA-ase free water* 1

Amplifikasi dilakukan dengan cara sebagai berikut; Volume reaksi PCR yang digunakan 25 ul terdiri dari 20 ul larutan *premix* dan 5 ul volume cetakan DNA bakteri kontrol. *Master mix solution* disiapkan lebih dahulu untuk reaksi PCR yang terdiri dari 0.25 ul primer Lsp dengan konsentrasi akhir 0.1 uM, 0.5 ul primer Lpn dengan konsentrasi akhir 0.2 uM, 2.5 ul buffer 10x dengan konsentrasi akhir 1x, 2.5 ul dNTP 2 mM dengan konsentrasi akhir 0.2 mM, 1 ul MgCl₂ 25mM dengan konsentrasi akhir 1 mM, 5 ul larutan Q 5x dengan konsentrasi akhir 1x, dan 0.125 ul HotStart *Taq* Polimerase dengan konsentrasi akhir 0.625 unit/reaksi, sisa volume ditambahkan *DNA-ase free water*. Volume *premix* yang digunakan untuk optimasi suhu *annealing* adalah 20 ul. Volume *premix* dilebihkan 10% dari total volume yang dibutuhkan.

Proses PCR dilakukan dengan mesin PCR MJ Mini Biorad PCR system) dengan prosedur dari buku panduan HotStarTaq[®] (Qiagen) yaitu *Initial PCR activation step* pada suhu 95° C selama 15 menit, denaturasi pada suhu 94° C selama 30 detik, *annealing* pada suhu bergradien 57 -61° C selama 45 detik dan *extention* pada suhu 72° C selama 30 detik, dengan jumlah siklus sebanyak 40 siklus dan diakhiri dengan 1 siklus *post extention* pada temperatur 72° C selama 7 menit.

3.4.5. Deteksi produk PCR

Hasil reaksi PCR dideteksi dengan elektroforesis gel poliakrilamid 9% yang dibuat dari larutan TBE 10 X sebanyak 500 ul, akrilamid 30% sebanyak 1510 ul, aqua bidest 2990 ul, APS sebanyak 30 ul dan TEMED sebanyak 5 ul. Larutan dicampur dan dimasukkan ke dalam cetakan (*slab gel perspex sheet*). Setelah penuh pada bagian atas cetakan dimasukkan sisir sumur gel dengan kedalaman 1 cm, biarkan selama 30 menit pada suhu ruang hingga terjadi polimerasi yang ditandai dengan mengerasnya gel. Setelah mengeras sisir sumur diangkat dari cetakan.

Gel poliakrilamid 9 % yang sudah mengeras diletakkan dalam tangki elektroforesis. Masukkan buffer TBE1X ke dalam tangki elektroforesis sampai bagian atas penuh dan tangki bagian bawah terisi sampai bagian bawah gel. Campuran yang terdiri dari produk PCR sebanyak 10 ul dan 2 ul buffer LB 6X dimasukkan pada masing-masing sumur pada gel. *DNA marker* yang digunakan mempunyai besaran 50 bp atau 100bp dari Invitrogen yang dimasukkan ke dalam sumur gel sebanyak 5 ul. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 1 jam. Setelah 1 jam gel dikeluarkan dari tangki kemudian diwarnai dengan larutan ethidium bromida 0.04% selama 5 menit kemudian dilakukan *destaining* dengan TAE 1X selama 2 menit. Hasil elektroforesis dapat dilihat dengan meletakkan gel pada transluminator ultraviolet dan difoto menggunakan program Gel Doc XR pada mesin UV transluminator

3.4.6. Penentuan sensitifitas Duplex PCR

Penentuan sensitifitas berdasarkan konsentrasi DNA

Hasil isolasi DNA bakteri kontrol *Legionella pneumophila* ATCC 33152 diukur konsentrasinya dengan spektrofotometri UV. Kemudian dilakukan pengenceran berseri terhadap stok DNA kontrol. Setiap pengenceran DNA diamplifikasi dengan duplex PCR. Cetakan yang dipakai untuk reaksi PCR adalah volume cetakan 7 ul dalam total reaksi PCR 25 ul. Sensitifitas duplex PCR berdasarkan konsentrasi DNA adalah pengenceran terendah yang masih dapat memperlihatkan pita spesifik pada analisis produk PCR dengan gel poliakrilamid 9%.

Penentuan sensitifitas berdasarkan pengenceran berseri suspensi bakteri kontrol

Suspensi bakteri dibuat dari kultur *Legionella pneumophila* 48 jam, dibuat suspensi dengan kekeruhan 0.5 mcFarland, kemudian diencerkan berseri menggunakan larutan NaCl 0.9%. Sebanyak 200 ul setiap pengenceran berseri suspensi *Legionella pneumophila* ditanam duplo pada media BCYE plus mulai pengenceran ke-3 dan seterusnya, kemudian diinkubasi menggunakan inkubator CO₂ pada suhu 35° C selama 48 – 72 jam. Koloni yang tumbuh dihitung untuk menentukan CFU/ml dari suspensi bakteri yang dibuat. Jumlah koloni yang digunakan untuk perhitungan CFU/ml adalah yang memiliki jumlah 30 – 300 koloni.

Untuk menentukan sensitifitas duplex PCR berdasarkan pengenceran berseri suspensi bakteri kontrol dilakukan sebagai berikut, sejumlah 200 ul dari setiap pengenceran suspensi *L. pneumophila* diekstraksi menggunakan QIAamp[®] DNA mini kit, kemudian DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan volume cetakan 7 ul dalam total reaksi PCR 25 ul dan hasilnya dideteksi dengan elektroforesis menggunakan gel akrilamid 9%.

3.4.7. Uji Spesifisitas

Spesifisitas duplex PCR diuji terhadap berbagai bakteri lain selain bakteri kontrol, terutama bakteri yang memiliki habitat di lingkungan air dan bakteri penyebab pneumonia. Bakteri yang digunakan untuk uji spesifisitas adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus β haemolyticus*, *Streptococcus α haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Moraxella catharralis*, *Haemophilus influenzae*. Cetakan yang dipakai untuk reaksi PCR masing-masing digunakan konsentrasi DNA 1 ng/ul dengan volume cetakan 7 ul dalam total reaksi PCR 25 ul. Proses PCR dilakukan dengan mesin PCR *AB Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2004*.

3.4.8. Uji Simulasi

Uji simulasi menggunakan sampel air dalam jumlah besar untuk membuat kondisi yang mirip dengan proses deteksi *Legionella* dari sampel air cooling tower. Uji simulasi menggunakan sampel aqua destilata steril, larutan NaCl 0.9% steril dan air kran. Sampel air untuk simulasi merupakan sampel air yang bebas dari *Legionella pneumophila*. Suspensi bakteri kontrol yang digunakan dalam uji simulasi adalah *Legionella pneumophila* dalam NaCl 0.9% dengan kekeruhan McFarland 0.5 kemudian dilakukan pengenceran per $10^{-1} - 10^{-7}$. Sejumlah 10 ml suspensi bakteri kontrol *Legionella pneumophila* mulai dari pengenceran $10^{-2} - 10^{-7}$ Mcfarland 0.5 ditambahkan kedalam 390 ml sampel air, kemudian sampel difiltrasi menggunakan membran filter miliphore ukuran 0.2 um, membran filter diresuspensi dengan larutan NaCl 0.9% steril hingga 10 ml. Hasil resuspensi sebagian dikultur pada BCYE plus dan sebagian digunakan untuk PCR. Cetakan DNA yang digunakan untuk reaksi PCR adalah 7 ul dalam total reaksi 25 ul. Proses PCR dilakukan dengan mesin PCR *AB Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2004*. Hasil kultur dan PCR masing-masing dianalisis dan dibandingkan.

3.4.9. Aplikasi pada sampel air *cooling tower*

Cara pengambilan sampel

Untuk memperoleh sampel yang berasal dari penampung air *cooling tower* dilakukan dengan cara berikut; botol steril ditenamkan kedalam penampung air sampai ke dasar dan di bagian tengah kolam, dengan mulut botol menghadap permukaan air, ambil air sebanyak 400 ml, kemudian mulut botol didesinfeksi dengan alkohol 70% dan ditutup rapat untuk mencegah kontaminasi, lalu botol diberi label (nama/nomor, lokasi sumber air, tanggal pengambilan). Selanjutnya botol dimasukkan kedalam *cool box* yang berisi *ice pack* lalu ditutup rapat.

Untuk memperoleh sampel dari air perpipaan dilakukan dengan cara; ujung kran diusap dengan alkohol 70% kemudian dilidah apikan, lalu kran/shower dibuka, biarkan air mengalir selama beberapa saat, lalu air yang keluar ditampung dalam botol steril, ambil air sebanyak 400 ml, kemudian mulut botol didesinfeksi dengan alkohol 70% dan ditutup rapat untuk mencegah kontaminasi, lalu botol diberi label (nama/nomor, lokasi sumber air, tanggal pengambilan). Selanjutnya botol dimasukkan kedalam *cool box* yang berisi *ice pack* lalu ditutup rapat. Sampel harus segera dikirim ke laboratorium dan diproses

Pemeriksaan kultur

Setiap sampel air yang diperoleh difiltrasi dengan membran milipore 0.2 um, kemudian membran filter diresuspensi dengan 10 ml larutan NaCl 0.9%, dilakukan vortex untuk proses homogenisasi, kemudian sampel resuspensi dialikuot, 1 ml untuk kultur tanpa diasamkan, 1 ml untuk kultur yang diasamkan dan 1 ml untuk bahan PCR.

Proses pengasaman dilakukan dengan menambahkan HCl 0.2 N kedalam 1 ml sampel resuspensi hingga pH 2 selama 15 menit, kemudian sebanyak 200 ul suspensi diinokulasi kedalam lempeng agar BCYE plus, kultur diinkubasi pada suhu 35° C dalam inkubator CO₂ (5-7%) selama 48 -72 jam. Pengamatan pertumbuhan koloni dilakukan hingga hari ke-14, kultur dinyatakan negatif jika tidak ditemukan koloni *Legionella*. Pada pemeriksaan dengan metode kultur, terhadap koloni tersangka *Legionella* dilakukan pewarnaan Gram, hasil pewarnaan adalah batang Gram-negatif. Terhadap koloni tersangka juga dilakukan subkultur dengan media agar darah, BCYE non-sistein dan BCYE plus. *Legionella* tidak dapat tumbuh dalam media tanpa L-sistein. (lampiran 2)

Untuk pemeriksaan kultur tanpa proses pengasaman, dilakukan sebagai berikut, sebanyak 200 ul sampel resuspensi diinokulasikan diinokulasi kedalam lempeng agar BCYE plus, kultur diinkubasi pada suhu 35° C dalam inkubator CO₂ (5-7%) selama 48 - 72 jam. Pemeriksaan koloni sama seperti yang dilakukan pada kultur yang diasamkan.

Pemeriksaan PCR

Untuk melakukan pemeriksaan dengan metode PCR dilakukan lebih dahulu isolasi DNA dari sampel resuspensi, kemudian DNA diamplifikasi dan produk PCR hasil amplifikasi dielektroforesis menggunakan gel akrilamid 9%. Hasil elektroforesis dapat dilihat dengan meletakkan gel pada transluminator ultraviolet dan difoto menggunakan program Gel Doc XR pada mesin UV transluminator.

Isolasi DNA untuk deteksi *Legionella* pada sampel air *cooling tower* menggunakan kit *QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®)*, sebanyak 1 ml sampel konsentrat dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 5 menit pada 7500 rpm, selanjutnya supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk ditambahkan buffer

ATL (*Qiagen*[®]) hingga diperoleh total volume 180 ul. Langkah selanjutnya sama dengan yang dilakukan pada saat optimasi. Filtrat yang terbentuk merupakan hasil isolasi DNA yang dapat disimpan pada suhu -20° C sampai akan digunakan untuk proses PCR.

Metode PCR untuk amplifikasi DNA menggunakan kit enzim HotStarTaq® (*Qiagen*). Volume reaksi PCR yang digunakan 25 ul terdiri dari 18 ul larutan *premix* dan 7 ul volume cetakan DNA sampel. Disiapkan lebih dahulu *master mix solution* untuk reaksi PCR yang terdiri dari primer LspF 0.25 uM, primer LspR 0.25 uM, primer LpnF 0.5 uM, primer LpnR 0.5 uM, dNTP 0.2 mM, Q solution 1X, MgCl₂ 1 mM, Buffer 1X dan Hotstart polimerase 0,625 U/ 25 ul.

Proses PCR dilakukan dengan mesin PCR *AB Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2004*. dengan prosedur dari buku panduan *HotStarTaq*[®] (*Qiagen*) yaitu *Initial PCR activation step* pada suhu 95° C selama 15 menit, denaturasi pada suhu 94° C selama 30 detik, annealing pada suhu 59° C selama 45 detik dan extention pada suhu 72° C selama 30 detik dengan jumlah siklus sebanyak 40 siklus dan diakhiri dengan 1 siklus post extention pada suhu 72° C selama 7 menit.

Pada proses pemeriksaan dengan metode PCR, yang pertama dibuat adalah larutan *premix* PCR dan penambahan kontrol negatif, kemudian dilakukan penambahan cetakan DNA sampel dan terakhir penambahan kontrol positif. Ketiga proses tersebut dilakukan pada ruang yang terpisah dengan peralatan yang berbeda.

3.5. Analisis dan Penyajian Data

Baku emas dalam penelitian ini adalah metode kultur. Data yang diperoleh akan disajikan dalam bentuk tabel serta narasi.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.2. Optimasi PCR

Pada penelitian ini, optimasi PCR dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan kondisi optimal reaksi PCR dan meminimalkan produk pita non-spesifik yang tidak sesuai dengan pita DNA yang diinginkan. Duplex PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer seperti yang dilaporkan oleh *Templeton et al.* Primer dirancang berdasarkan sekuen gen 16S rRNA untuk mendeteksi seluruh *Legionella spp* dan sekuen gen *mip* yang hanya akan mendeteksi *Legionella pneumophila* dan bukan *Legionella* spesies lainnya⁸.

Optimasi Suhu *Annealing*

Hasil Gradient *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada suhu 57° – 61° C menggunakan mesin PCR *Thermal cycler MJ Mini PCR System BioRad* memperlihatkan bahwa suhu *annealing* yang menunjukkan pita yang tebal dan jelas berada antara suhu 57.3° – 60.2° C, dan yang dipilih untuk kondisi amplifikasi adalah suhu 59° C (gambar 2. lajur D/E) yang merupakan suhu *annealing* optimum untuk deteksi bakteri *Legionella pneumophila* sebagai bakteri kontrol. Pada penelitian yang dilakukan oleh *Templeton et al.* kondisi multiplex *Real-time* PCR menggunakan suhu *annealing* 55° C⁸. Pemilihan suhu *annealing* 59° C didasarkan pada pita spesifik yang dihasilkan lebih tebal dan jelas dibandingkan suhu yang lebih rendah ataupun suhu yang lebih tinggi.(gambar 3)



Gambar 3. hasil elektroforesis DNA Gradient PCR. M : Marka 100 pb; Lajur A : suhu 61° C; Lajur B : suhu 60.7° C; Lajur C : suhu 60.2° C; Lajur D : suhu 59.5° C; Lajur E: suhu 58.6° C; Lajur F: suhu 57.9° C; Lajur G: suhu 57.3° C; Lajur H: suhu 57° C

4.1.3. Penentuan Sensitifitas kultur dan duplex PCR

4.1.3.1. Sensitifitas kultur

Sensitifitas kultur ditentukan berdasarkan pengenceran terendah suspensi bakteri yang masih memberikan hasil kultur positif. Sensitifitas suspensi *Legionella pneumophila* dalam NaCl 0.9% adalah 10^{-5} McFarland 0.5 atau berdasarkan hitung koloni $1,4 \times 10^2$ CFU/ml.

Tabel 2. batas deteksi pemeriksaan kultur dan PCR berdasarkan pengenceran suspensi *L. pneumophila* dalam NaCl 0.9% sesuai McFarland 0.5

| Suspensi bakteri | Kultur 200 ul | PCR 200 ul |
|--------------------------|---------------|------------|
| 10^{-3} McFarland 0.5 | > 300 | TD |
| 10^{-4} Mc Farland 0.5 | 274 | + |
| 10^{-5} Mc Farland 0.5 | 21 | + |
| 10^{-6} Mc Farland 0.5 | - | + |
| 10^{-7} Mc Farland 0.5 | - | - |

Keterangan : -: negatif, +:positif, TD: tidak dilakukan

Catatan: hitung koloni menggunakan suspensi dengan jumlah koloni 30 -300, yaitu pada pengenceran 10^{-4} McFarland 0.5 sebanyak 274 koloni /200 ul atau 1370/ml maka suspensi McFarland 0.5 yang dibuat mempunyai konsentrasi $1370 \cdot 10^4$ CFU/ml atau $1.4 \cdot 10^7$ CFU/ml

4.1.3.2. Sensitifitas duplex PCR berdasarkan konsentrasi DNA

Sensitifitas duplex PCR dilakukan untuk mengetahui konsentrasi DNA bakteri kontrol terendah yang masih memperlihatkan pita spesifik. Batas deteksi duplex PCR berdasarkan konsentrasi DNA untuk bakteri kontrol *Legionella pneumophila* pada penelitian ini mencapai 3.5 pg/ul (gambar 4, lajur 4).



Gambar 4. hasil elektroforesis produk PCR pada uji sensitifitas PCR berdasarkan konsentrasi DNA terendah. *M* : Marka 50 pb; *Lajur 1* : DNA 3.5 ng/ul ; *Lajur 2* : DNA 0.35 ng/ul ; *Lajur 3* : 35 pg/ul C ; *Lajur 4*: DNA 3.5 pg/ul ; *Lajur 5*: DNA 1.75 pg/ul ; *Lajur 6*: DNA 0.87 pg/ul

4.1.3.2. Sensitifitas duplex PCR berdasarkan pengenceran berseri suspensi bakteri kontrol

Pada penelitian ini batas deteksi duplex PCR berdasarkan pengenceran suspensi bakteri *L. pneumophila* dalam NaCl 0.9% adalah pengenceran 10^{-6} Mcfarland 0.5. Berdasarkan hitung koloni konsentrasi McFarland 0.5 yang digunakan adalah $1,4 \times 10^7$ CFU/ml. Sensitivitas duplex PCR untuk mendeteksi suspensi *Legionella pneumophila* adalah konsentrasi $1,4 \times 10^1$ CFU/ml (tabel 2), karena volume suspensi yang digunakan untuk isolasi DNA sebanyak 200 ul maka terdapat 2.8 CFU yang masih dapat dideteksi dengan pemeriksaan PCR (gambar 5).



Gambar 5. hasil elektroforesis produk PCR pada uji sensitifitas berdasarkan pengenceran suspensi bakteri kontrol. *M* : Marka 100 pb; *Lajur 1* : $1.4 \cdot 10^3$ CFU/ml *C*; *Lajur 2* : $1.4 \cdot 10^2$ CFU/ml ; *Lajur 3* : $1.4 \cdot 10^1$ CFU/ml ; *Lajur 4* : $1.4 \cdot 10^0$ CFU/ml

Sensitifitas deteksi bakteri *Legionella pneumophila* dalam suspensi NaCl 0.9% pada penelitian ini adalah 2.8 CFU. Adapun pada penelitian dengan Real-time PCR yang dilakukan *Templeton et al.* sensitifitas deteksi *Legionella pneumophila* adalah 2.5 CFU.⁸

4.1.3. Spesifisitas Duplex PCR

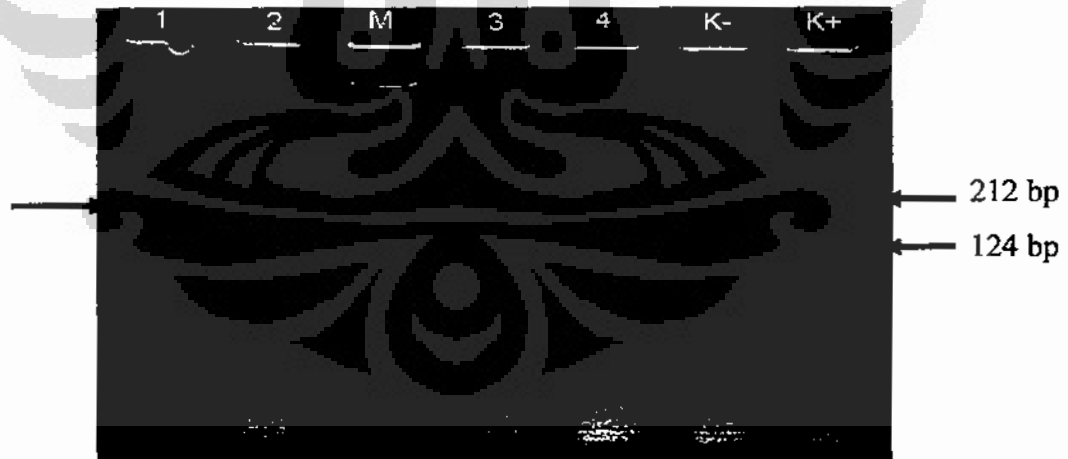
Uji spesifisitas duplex PCR dilakukan terhadap beberapa bakteri selain dari bakteri *Legionella* yang umumnya hidup pada lingkungan air dan juga bakteri yang berhubungan dengan infeksi paru, antara lain *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus β haemolyticus*, *Streptococcus α haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Moraxella catharralis*, *Haemophilus influenzae*.

Hasil duplex PCR menunjukkan pita spesifik terhadap bakteri kontrol *Legionella pneumophila* dan tidak terbentuk pita spesifik dari bakteri yang digunakan dalam uji spesifisitas. Pada cetakan DNA bakteri *Staphylococcus aureus* memberi hasil berupa pita pada besaran 200an yang mirip dengan bakteri kontrol yaitu 212 bp. Pita pada besaran tersebut merupakan pita dari sekuen gen 16S rRNA.



Gambar 6. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji spesifisitas terhadap 7 bakteri
 M: Marker 100 bp, 1. *P.aeruginosa* , 2.*E.coli* ,3. *M. tuberculosis*, 4. *Klebsiella pneumoniae*,
 5. *Streptococcus β haemolyticus*, 6. *S.a haemolyticus*, , 7. *Enterobacter aerogenes*

Hasil uji spesifisitas duplex PCR terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *S.β haemolyticus*, *S.a haemolyticus*, dan *Enterobacter aerogenes* tidak menunjukkan pita spesifik pada gel poliakrilamid (gambar 6).



Gambar 7. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji spesifisitas terhadap 4 bakteri
 M: Marker 100 bp, 1. *Staphylococcus aureus* , 2. *Staphylococcus epidermidis*, 3. *Moraxella catarrhalls*, 4. *Haemophilus influenza*

Hasil uji spesifisitas duplex PCR terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *S. Epidermidis*, *Moraxella catarrhalis* dan *Haemophilus influenza* juga tidak memberikan pita spesifik kecuali pada cetakan DNA *S. aureus* (gambar 7)



Gambar 8. Hasil elektroforesis produk PCR pada uji spesifisitas antara *S. aureus* dan *L. pneumophila* menggunakan primer 16S RNA M: Marker 100 bp, 1. *Legionella Pneumophila* 2. *Staphylococcus aureus* , 3. *Staphylococcus aureus*

Hasil uji ulang terhadap cetakan DNA *S. aureus* tetap memberikan pita yang mirip dengan kontrol. Kemudian dilakukan uji menggunakan satu primer yaitu primer 16S rRNA terhadap bakteri kontrol *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 dan *S. aureus* dari spesimen klinik, hasil amplifikasi menunjukkan pita yang tetap sama pada gel poliakrilamid 9%. (gambar 8).



Gambar 9. Hasil elektroforesis produk PCR yang direstriksi dengan enzim *HaeIII* M: Marker 100 bp, 1. *Legionella pneumophila* dengan primer mix, 2. *Legionella pneumophila* dengan primer Lsp (16S rRNA) 3. *S. aureus* dengan primer mix 4 dan 5. *S. aureus* dengan primer Lsp.

Cara lain yang digunakan untuk membedakan pita yang berukuran sama pada hasil elektroforesis dilakukan dengan restriksi pada produk PCR. Pada penelitian ini produk PCR direstriksi dengan enzim *HaeIII*, diperoleh hasil potongan yang sama antara produk PCR cetakan DNA *S. aureus* dan *L. pneumophila* (gambar 9).

Pada penelitian yang dilakukan *Templeton* disebutkan bahwa uji spesifisitas terhadap 21 bakteri selain *Legionella sp* memberi hasil negatif, termasuk diantaranya adalah bakteri *S. aureus*⁸.

Untuk memastikan apakah pita yang terbentuk pada hasil amplifikasi merupakan sekuens *L. pneumophila* atau sekuens *S. aureus*, maka dilakukan sekuensing pada pita yang dimaksud. Hasil sekuensing terhadap produk PCR *S. aureus* dibandingkan dengan hasil sekuensing produk PCR *Legionella pneumophila* dan hasil sekuensing produk PCR dari salah satu sampel air *cooling tower*. Aligment dilakukan menggunakan program *Genetyx Win*, hasil aligment ketiga produk PCR menunjukkan bahwa antara sekuens *Legionella pneumophila* dan *Staphylococcus aureus* mempunyai nilai homologi 94.118% dan antara sekuens *Legionella pneumophila* dengan sekuens sampel *cooling tower* menunjukkan nilai homologi 93.5 % (lampiran 3).

Runutan nukleotida sekuensing dari produk PCR *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, dan sampel *cooling tower* selanjutnya diidentifikasi spesies bakteri yang dimaksud dengan program BLAST dari GenBank (NCBI). Hasil yang diperoleh menunjukkan ketiga sekuens merupakan sekuens dari bakteri *Legionella pneumophila* (lampiran 7).

Berdasarkan hasil sekuensing, homologi runutan nukleotida dan hasil identifikasi dengan program BLAST, dapat diasumsikan bahwa pita yang terbentuk pada hasil amplifikasi DNA *Staphylococcus aureus* merupakan kontaminasi. Hasil uji ulang dilakukan dengan metode ekstraksi DNA secara *boiling*. Produk PCR dari *S. aureus* tidak menunjukkan pita pada gel akrilamid.

4.1.4. Uji Simulasi

Uji simulasi pada penelitian ini bertujuan untuk melihat apakah perlakuan terhadap sampel air *cooling tower* yaitu proses filtrasi dan penambahan asam akan mempengaruhi hasil pemeriksaan, baik metode kultur dan metode PCR. Pada uji simulasi dimasukkan serial suspensi bakteri *L. pneumophila* kedalam beberapa jenis sampel air yaitu air tanah yang melalui perpipaan—air kran, akuadcs dan larutan NaCl 0.9%.

Simulasi pada sampel air kran

Tabel 4. Perbandingan kultur dan PCR pada uji simulasi dengan sampel air kran

| Suspensi <i>Legionella</i> | Kultur tanpa asam | Kultur dgn asam | PCR |
|---------------------------------|-------------------|-----------------|-----|
| 10 ⁻² Mc Farland 0.5 | - | - | TD |
| 10 ⁻³ Mc Farland 0.5 | - | - | + |
| 10 ⁻⁴ Mc Farland 0.5 | - | - | + |
| 10 ⁻⁵ Mc Farland 0.5 | - | - | + |
| 10 ⁻⁶ Mc Farland 0.5 | - | - | - |

Keterangan : -: negatif, +:positif, TD: tidak dilakukan
McFarland 0.5 = 6.2. 10⁶ CFU/ml

Dari hasil uji simulasi terhadap air kran yang diberikan bakteri kontrol menunjukkan bahwa metode kultur yang digunakan tidak memberikan hasil positif. Pada kultur yang tidak diasamkan menghasilkan banyak koloni bakteri lain sehingga menekan pertumbuhan bakteri *Legionella* sedangkan pada kultur yang diasamkan bakteri *Legionella* juga tidak tumbuh hingga hari ke empat belas.

Hasil uji simulasi dengan metode PCR dari air kran yang diberikan serial suspensi bakteri kontrol menunjukkan pita spesifik *Legionella pneumophila* hingga batas deteksi 6.2.x 10¹ CFU/ 400 ml sampel uji atau 6.2x 10¹ CFU/10 ml konsentrat atau 6.2 CFU/ ml konsentrat.



Gambar 10 . hasil elektroforesis produk PCR simulasi sampel air kran . M : Marka 100 pb; Lajur 1 : 6.2. 10³ CFU/400ml ; Lajur 2 : 6.2 .10² CFU/400ml ; Lajur 3 : 6.2. 10¹ CFU/400ml ; Lajur 4 : 6.2. 10⁰ CFU/400ml

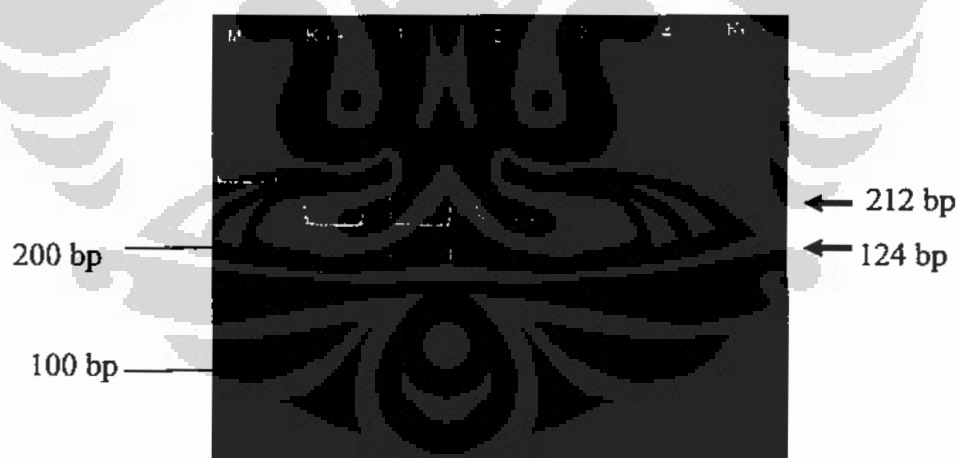
Simulasi pada sampel akuadest steril

Tabel 5. Perbandingan kultur dan PCR pada uji simulasi dengan sampel akuades steril

| Suspensi <i>Legionella</i> | Kultur tanpa asam | PCR |
|----------------------------|-------------------|-----|
| 10^{-3} Mc Farland 0.5 | - | TD |
| 10^{-4} Mc Farland 0.5 | - | + |
| 10^{-5} Mc Farland 0.5 | - | + |
| 10^{-6} Mc Farland 0.5 | - | + |
| 10^{-7} Mc Farland 0.5 | - | - |

Keterangan : -: negatif, +:positif, TD: tidak dilakukan
McFarland 0.5 = 3.2×10^7 CFU/ml

Pemeriksaan PCR untuk uji simulasi dalam akuades steril menunjukkan hasil positif hingga batas deteksi 32 CFU / 400 ml akuadest atau 32 CFU/10 ml konsentrat atau 3.2 CFU/ml konsentrat. Adapun pada metode kultur tidak terdapat pertumbuhan koloni *Legionella* pada media BCYE plus.



Gambar 11 . Hasil elektroforesis produk PCR simulasi sampel akuadest steril. M : Marka 100 pb; Lajur 1 : $3.2 \cdot 10^3$ CFU/ 400 ml ; Lajur 2 : $3.2 \cdot 10^2$ CFU/ 400 ml ; Lajur 3 : $3.2 \cdot 10^1$ CFU/ 400 ml ; Lajur 4 : $3.2 \cdot 10^0$ CFU/ 400 ml

Simulasi pada sampel larutan NaCl 0.9%

Dari hasil uji simulasi terhadap sampel simulasi larutan NaCl 0.9% steril yang diberikan bakteri kontrol, menunjukkan bahwa kultur yang tidak diasamkan memberikan hasil positif pada konsentrasi 3.2×10^4 CFU/ 400 ml sampel uji (tabel 6). Pada konsentrasi lain tidak menunjukkan adanya koloni hingga hari ke-empat belas.

Tabel 6. Perbandingan kultur dan PCR pada uji simulasi dengan sampel larutan NaCl 0.9%

| Suspensi <i>Legionella</i> | Kultur tanpa asam | PCR |
|----------------------------|-------------------|-----|
| 10^{-3} Mc Farland 0.5 | + (>300) | TD |
| 10^{-4} Mc Farland 0.5 | - | + |
| 10^{-5} Mc Farland 0.5 | - | + |
| 10^{-6} Mc Farland 0.5 | - | + |
| 10^{-7} Mc Farland 0.5 | - | - |

Keterangan : -: negatif, +:positif, TD: tidak dilakukan
McFarland 0.5 = $3.2 \cdot 10^7$ CFU/ml

Hasil uji simulasi dengan metode PCR dari larutan NaCl 0.9% yang diberikan serial suspensi bakteri kontrol menunjukkan pita spesifik *Legionella pneumophila* hingga batas deteksi 3.2×10^1 CFU/ 400 ml sampel uji atau $3.2 \cdot 10^1$ CFU/ 10 ml konsentrat atau 3.2 CFU/ ml konsentrat (gambar 10). Seperti halnya pada uji sensitifitas duplex PCR berdasarkan suspensi *Legionella pneumophila*, batas deteksi duplex PCR 2.8 CFU sedangkan uji simulasi pada penelitian ini diperoleh batas 3.2 CFU. Tidak terdapat perbedaan batas deteksi yang besar antara uji sensitifitas dan uji simulasi.



Gambar 12 . hasil elektroforesis produk PCR simulasi sampel NaCl 0.9% steril.
M : Marka 100 pb; Lajur 1 : $3.2 \cdot 10^3$ CFU/ 400 ml ; Lajur 2 : $3.2 \cdot 10^2$ CFU/ 400 ml ;
Lajur 3 : $3.2 \cdot 10^1$ CFU/ 400 ml ; Lajur 4 : $3.2 \cdot 10^0$ CFU/ 400 ml

4.1.5. Deteksi Air *Cooling Tower*

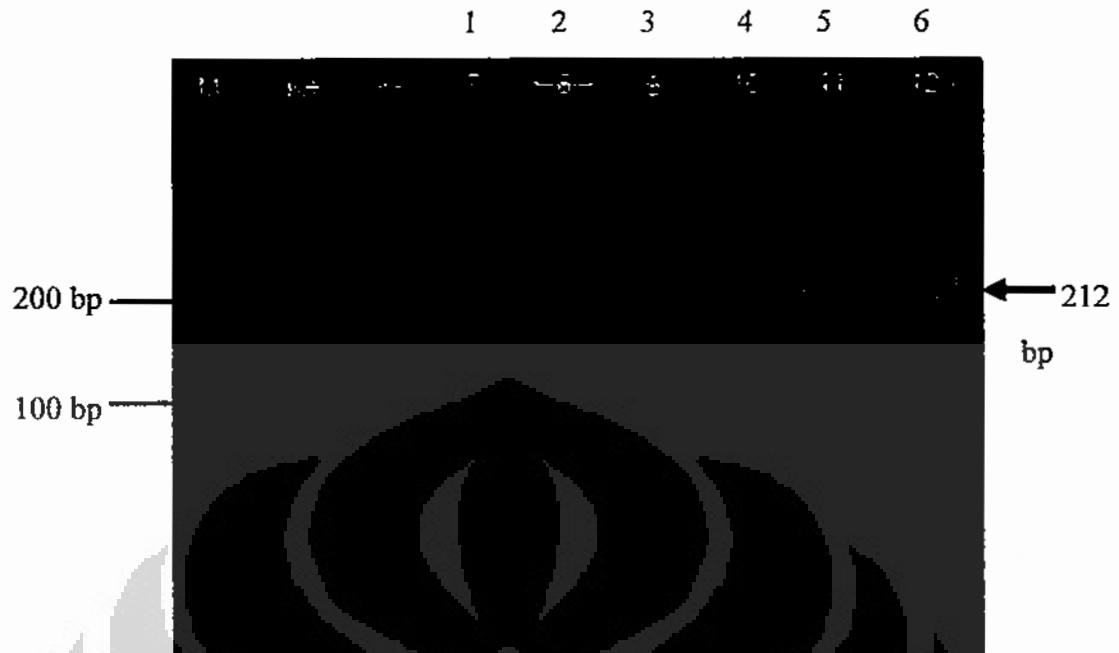
Dari 12 sampel air yang diperiksa yang berasal dari 9 tempat yaitu hotel (4), gedung perpustakaan (1), gedung perkantoran (1), gedung pusat perbelanjaan (3). Sebanyak 9 sampel merupakan sampel air yang berasal dari *cooling tower* sedangkan 3 sampel lainnya berasal dari air perpipaan.

Hasil pemeriksaan dengan metode kultur tidak memberikan hasil positif (tidak terdapat koloni *Legionella*) pada 12 sampel yang diperiksa, sedangkan dengan metode PCR ditemukan 1 sampel yang menunjukkan pita spesifik *L. pneumophila*, 8 sampel yang menunjukkan pita *Legionella spp* dan 3 sampel negatif.

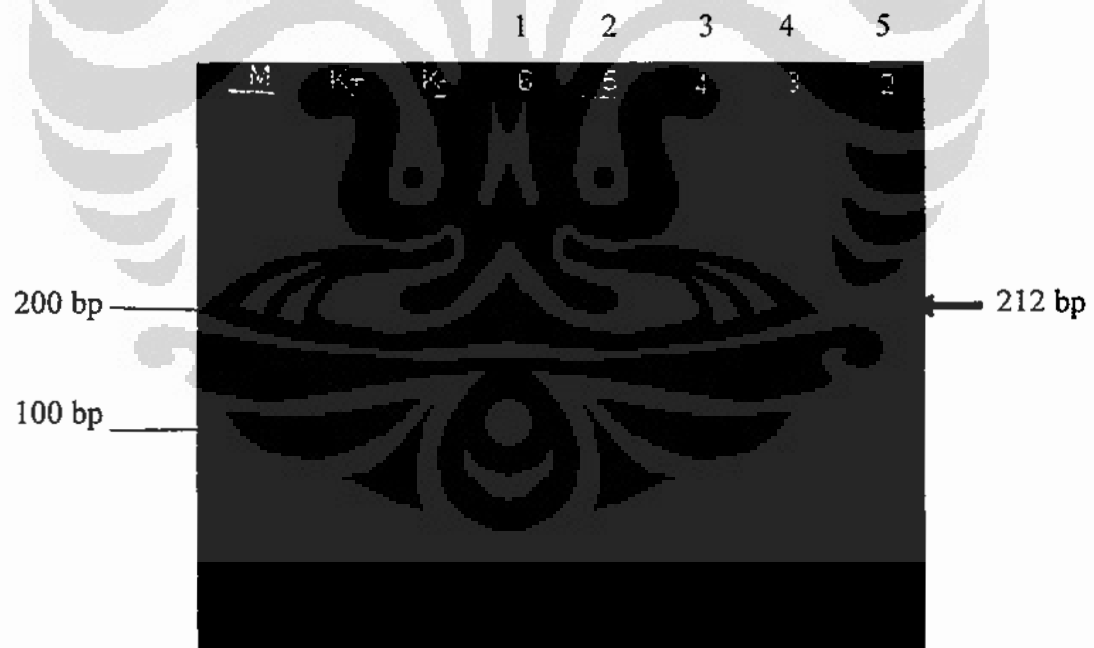
Tabel 7. Hasil pemeriksaan sampel air *cooling tower* berdasarkan kultur dan PCR

| No. sampel | Kultur | PCR |
|------------|---------|---------------------------|
| 1 | negatif | Negatif |
| 2 | negatif | (+) <i>L. Pneumophila</i> |
| 3* | negatif | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 4 | negatif | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 5 | negatif | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 6* | negatif | Negatif |
| 7* | negatif | Negatif |
| 8 | negatif | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 9 | negatif | Negatif |
| 10 | negatif | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 11 | negatif | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 12 | negatif | (+) <i>Legionella spp</i> |

Keterangan: * sampel air tidak berasal dari tempat penampungan air *cooling tower*, sampel diambil dari air perpipaan



Gambar 13. Hasil elektroforesis produk PCR sampel air *cooling tower*. *M* : Marka 100 pb; *Lajur 1* : sampel 7 ; *Lajur 2* : sampel 8 ; *Lajur 3* : sampel 9 ; *Lajur 4* : sampel 10; *Lajur 5* : sampel 11; *Lajur 6*: sampel 12



Gambar 14. Hasil elektroforesis produk PCR sampel air *cooling tower*. *M* : Marka 100 pb; *Lajur 1* : sampel 6 ; *Lajur 2* : sampel 5 ; *Lajur 3* : sampel 4 ; *Lajur 4* : sampel 3; *Lajur 5*: sampel 2

4.2. Pembahasan

Bakteri *Legionella* ditemukan dalam berbagai lingkungan air, baik lingkungan air alam ataupun buatan pada suhu yang bervariasi mulai dari 5°C hingga 50°C. Air hangat dengan suhu sekitar 25°-42°C akan meningkatkan konsentrasi bakteri ini. Selain suhu adanya organisme lain seperti *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella* pada sumber air yang sama akan mendukung replikasi *Legionella* yang terjadi di lingkungan intraseluler amuba.^{6,9,24}

Bakteri *Legionella* merupakan bakteri fastidious yang menunjukkan karakter bakteri *Viable but noncultivable*, hal ini yang sering menyebabkan kegagalan kultur *Legionella* dari lingkungan. *Legionella* memerlukan lingkungan intraseluler amuba untuk replikasinya, tetapi *Legionella* juga dapat hidup tanpa bebas dalam lingkungan selama beberapa waktu. Pada saat bakteri *Legionella* keluar dari intraseluler ke suatu lingkungan, maka bakteri akan mengalami stress yang diakibatkan perubahan nutrisi, pH, suhu, salinitas dan oksigen. Untuk beradaptasi dengan lingkungan yang berubah bakteri terkadang memasuki keadaan *Viable but noncultivable*^{26,27}.

Pada proses isolasi *Legionella* dari sampel air lingkungan dilakukan pemekatan lebih dahulu, kemudian dilanjutkan dengan proses dekontaminasi dengan asam atau dengan pemanasan untuk menekan pertumbuhan bakteri lain. *Legionella* memiliki karakteristik toleran terhadap asam (dapat bertahan terhadap pengaruh asam pH2 dalam waktu singkat) sehingga dengan proses dekontaminasi diharapkan bakteri *Legionella* tetap hidup sedangkan bakteri yang lainnya mati²⁸. Dekontaminasi dengan cara pemanasan dapat dilakukan karena *Legionella* memiliki karakteristik toleran terhadap panas dan dapat bertahan hingga suhu 66° C tetapi pada suhu diatas 70°C *Legionella* segera mati. *Livelo et al* menggunakan teknik pemanasan untuk mengisolasi *Legionella* dari sampel air lingkungan yaitu dengan cara memanaskan 1 ml suspensi hasil pemekatan pada suhu 50° C selama 30 menit¹⁵. Pada penelitian ini dekontaminasi dilakukan dengan penambahan HCl pH 2.

Metode kultur yang digunakan pada penelitian ini tidak dapat menumbuhkan kembali *Legionella* pada uji simulasi. Sampel yang digunakan pada uji simulasi adalah air kran, akuades steril dan NaCl 0.9% steril. Dekontaminasi asam hanya dilakukan terhadap sampel air kran sedangkan pada sampel air steril tidak dilakukan dekontaminasi asam.

Hasil uji simulasi air kran dengan kultur yang tidak diasamkan menghasilkan banyak koloni bakteri lain sehingga menekan pertumbuhan bakteri *Legionella*. Sebaliknya pada kultur yang diasamkan tidak menunjukkan pertumbuhan koloni *Legionella pneumophila* hingga hari ke-14. Kegagalan metode kultur pada uji simulasi tidak hanya terjadi pada penelitian ini. Hasil penelitian *Bartie* untuk evaluasi deteksi *Legionella* menggunakan metode kultur dengan sampel air kran yang dimasukkan bakteri kontrol *Legionella pneumophila* sebanyak 5 ml ($8 \cdot 10^7$ CFU) dalam 500 ml air, menunjukkan hasil koloni *Legionella* < 1 CFU baik untuk metode kultur yang diasamkan maupun yang tidak diasamkan³⁰. Hal yang sama juga terjadi pada penelitian *Hay et al*³¹ tentang deteksi *L. pneumophila* dalam model lingkungan yang mengandung amuba, pada penelitian tersebut metode kultur tidak memberikan hasil positif untuk deteksi *L. pneumophila* (tidak terdapat koloni bakteri dalam agar BCYE plus) meskipun dengan metode amplifikasi DNA dan hibridisasi diperoleh hasil positif.

Hasil pemeriksaan dengan metode kultur pada uji simulasi dengan akuadest yang dimasukkan pengenceran berseri bakteri *Legionella pneumophila* tidak menunjukkan pertumbuhan koloni *Legionella*. Akuades merupakan media yang memiliki konsentrasi mineral yang rendah sehingga merupakan larutan yang hipotonis dibandingkan dengan kondisi internal bakteri perbedaan osmolalitas dapat menyebabkan kematian sel bakteri *Legionella* dalam akuades. Pada penelitian *Ohno et al* tentang faktor yang mempengaruhi *survival* bakteri *Legionella pneumophila* dikemukakan bahwa aktifitas metabolik dan kemampuan bakteri untuk dikultur hilang dengan cepat dalam akuadest steril, selain itu konsentrasi rendah dari mineral tertentu seperti besi, zinc dan kalium adalah faktor penting dalam pertumbuhan *Legionella pneumophila* dalam air, sementara konsentrasi yang tinggi akan menjadi toksik³².

Uji simulasi dengan sampel NaCl 0.9% steril menunjukkan metode kultur yang memberi hasil positif pada konsentrasi 3.2×10^4 CFU/400 ml. Pada uji sensitifitas kultur dalam suspensi NaCl 0.9%, batas deteksi kultur untuk bakteri *L. pneumophila* adalah 1.4×10^2 CFU/ml dengan menggunakan volume inokulum 200 ul sehingga didapat batas deteksi 28 CFU/200 ul. Sedangkan pada uji simulasi batas deteksinya adalah 3.2×10^4 CFU/400 ml atau $3.2 \times 10^4/10$ ml konsentrat atau 600 CFU/200 ul konsentrat. Perbedaan batas deteksi metode kultur antara uji simulasi dan uji sensitifitas dengan menggunakan sampel NaCl 0.9% dapat terjadi karena proses perlakuan sampel pada uji

simulasi. *Bartie* menyebutkan hampir 50% organisme dalam sampel mati selama proses perlakuan sampel³⁰.

Hasil uji simulasi dengan metode PCR tidak menunjukkan penurunan sensitifitas, batas deteksi pada uji sensitifitas adalah 2.8 CFU/ml, sedangkan pada uji simulasi 3.2 CFU/ml (akuadest), 3.2 CFU/ml (NaCl 0.9%) dan 6.2 CFU/ml (air kran). Batas deteksi sensitifitas bakteri *Legionella pneumophila* pada penelitian *Templeton* dengan primer yang sama adalah 2.5 CFU/ml⁸.

Hasil optimasi metode duplex PCR pada penelitian ini menunjukkan sensitifitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode kultur pada uji simulasi. Penelitian lainnya yang menggunakan metode PCR juga menunjukkan hasil deteksi yang lebih baik dan lebih cepat dibandingkan metode kultur.

Hasil deteksi *Legionella spp.* dan *L. pneumophila* pada sampel air *cooling tower* dengan metode kultur juga memberi hasil negatif untuk pertumbuhan koloni *Legionella*, tetapi dengan metode PCR dari sembilan gedung yang diperiksa tujuh diantaranya atau 77.8% terdapat *Legionella spp.*

Pada banyak kasus *Legionella pneumophila* juga sukar dikultur dari *cooling tower* yang telah didesinfeksi dengan biosida²⁸. Faktor lain yang menyebabkan kegagalan kultur dari lingkungan adalah *Legionella* menunjukkan karakter *viable non cultivable* dan jumlah bakteri *Legionella* relatif kecil dalam suatu lingkungan.

Metode kultur yang berhasil mengisolasi *Legionella* dari lingkungan, dilakukan dengan beberapa cara seperti penggunaan media yang bervariasi, teknik perlakuan sampel dilakukan baik dengan cara filtrasi ataupun sentrifugasi, serta konsentrat yang dihasilkan dialikuot kemudian diberi perlakuan dengan asam, tanpa asam dan dengan pemanasan^{30,31,32}.

Pada penelitian ini 7 (77.8%) dari 9 *cooling tower* yang diperiksa dengan metode duplex PCR mengandung *Legionella spp.* satu diantaranya *L. pneumophila*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa terdapat kolonisasi *Legionella* pada sistem *cooling tower* maupun sistem air panas pada gedung bertingkat. Survey EWGLI menyebutkan bahwa 40-60% *cooling tower* positif mengandung *Legionella spp.* Penelitian *Borella* menyebutkan dari sejumlah hotel yang dideteksi di Italia, sebanyak 75% menunjukkan kolonisasi bakteri *Legionella*, 60% diantara air yang terkontaminasi mengandung bakteri *Legionella* lebih dari 10³ CFU/L³⁵. *Mouchtouri* menyebutkan frekwensi

kolonisasi *Legionella* pada 385 sistem distribusi air hotel di Yunani pada tahun 2003 - 2004 adalah 20.8%, dengan kandungan *Legionella* spp > 500 CFU/L³⁶.

Pada penelitian yang dilakukan Ragull menunjukkan 13 (86.6%) dari 15 cooling tower yang diperiksa terdapat kandungan *Legionella* spp yang bervariasi mulai dari 50 CFU/L hingga 2,000,000 CFU/L³⁷. Koide et al menggunakan metode PCR untuk mendeteksi *Legionella* spp pada cooling tower, bahwa dari pemeriksaan terhadap 27 sampel air cooling tower disekitar Tokyo, 25 sampel air cooling tower positif *Legionella* spp, 14 sampel diantaranya merupakan *L. pneumophila*¹⁷.

Metode duplex PCR dengan primer gen 16S rRNA dan primer gen *mip* praktis dan sensitif untuk mendeteksi *Legionella* sp dan *Legionella pneumophila* dari sampel air cooling tower. Dengan metode kultur deteksi *Legionella* sp baik pada sampel lingkungan ataupun spesimen klinik memerlukan waktu 3 – 14 hari sedangkan dengan metode PCR hanya memerlukan waktu 1 hari, sehingga PCR cocok digunakan sebagai metode deteksi pada survei *Legionella*. Dengan metode PCR, keputusan melakukan dekontaminasi pada tempat yang positif *Legionella* dapat segera diambil sehingga mengurangi resiko legionellosis komunitas ataupun legionellosis nosokomial.

Salah satu keterbatasan metode PCR adalah hasil yang diperoleh hanya menunjukkan ada/tidak ada bakteri *Legionella*, jika suatu sampel air menunjukkan hasil positif dengan PCR, maka sebaiknya sampel dengan volume yang sama atau lebih besar dilakukan tes ulang dengan metode kultur untuk memperoleh data kuantitatif dan strain bakteri yang dimaksud. Kombinasi PCR dan kultur merupakan protokol praktis untuk mengurangi resiko infeksi dan penyebaran *Legionella*^{8,17,40}

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

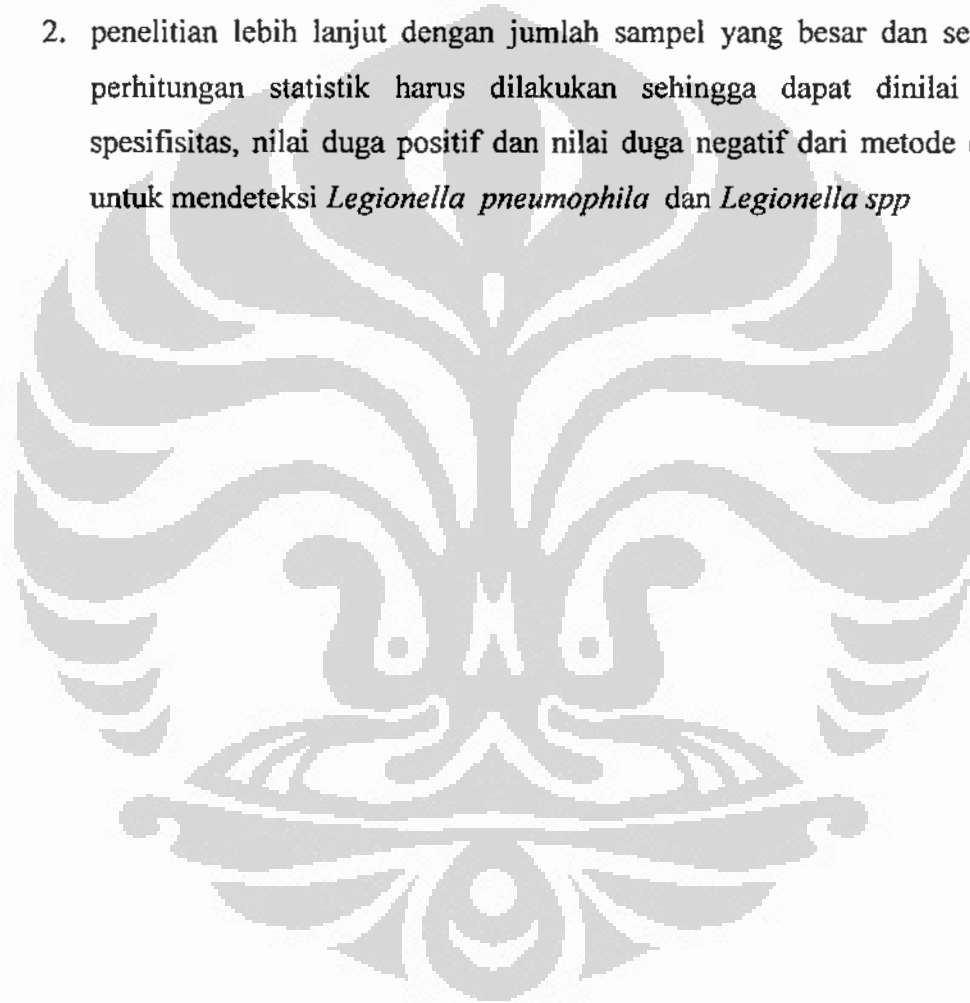
Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan :

1. Duplex PCR dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri *Legionella spp* dan *Legionella pneumophila* dalam sampel air *cooling tower*
2. Sensitifitas kultur untuk mendeteksi bakteri *Legionella pneumophila* adalah $1.4 \cdot 10^2$ cfu/ml
3. Sensitifitas duplex PCR untuk mendeteksi konsentrasi DNA terendah bakteri *Legionella pneumophila* adalah 3.5 pg/ul sedangkan batas deteksi duplex PCR terhadap konsentrasi suspensi *L.pneumophila* adalah 2.8 cfu/ml
4. Uji simulasi dengan metode kultur tidak memberikan hasil positif pada sampel air kran dan akuades steril, sedangkan sampel NaCl 0.9% kultur memberi hasil positif pada konsentrasi $3.2 \cdot 10^4$ cfu/400 ml
5. Hasil uji simulasi dengan metode duplex PCR menunjukkan hasil positif hingga konsentrasi 62 cfu/400 ml air kran, 32 cfu/400 ml akuades dan 32 cfu/400 ml NaCl 0.9% steril
6. Dari 9 sampel air *cooling tower* yang diperiksa, tidak menunjukkan hasil positif dengan metode kultur, dengan metode PCR diperoleh hasil satu sampel menunjukkan pita spesifik *Legionella pneumophila*, 6 sampel menunjukkan pita spesifik *Legionella spp.* dan 2 sampel negatif.

5.2. SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk penyempurnaan penelitian ini. Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan antara lain :

1. Perlu dilakukan optimasi terhadap teknik isolasi bakteri *Legionella* dengan metode kultur
2. penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang besar dan sesuai dengan perhitungan statistik harus dilakukan sehingga dapat dinilai sensitifitas, spesifisitas, nilai duga positif dan nilai duga negatif dari metode duplex PCR untuk mendeteksi *Legionella pneumophila* dan *Legionella spp*



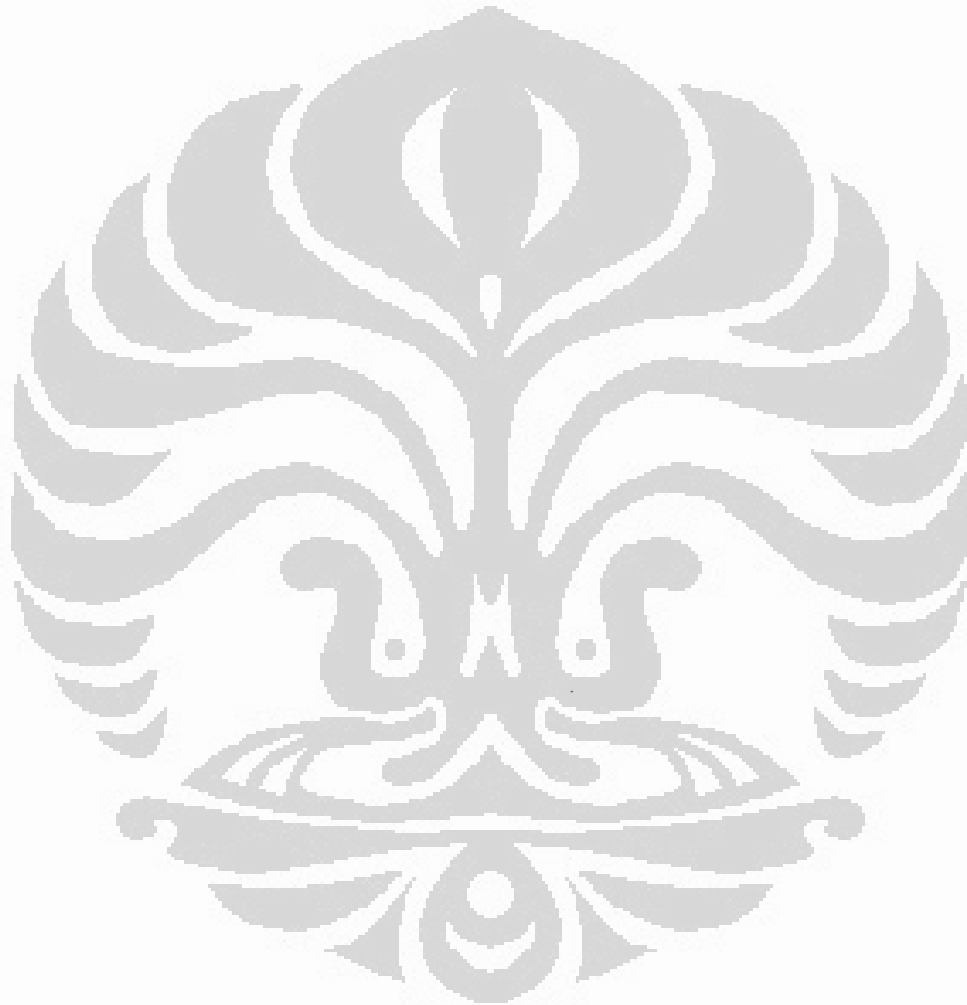
DAFTAR PUSTAKA

1. Fields, BS. Benson, RF. Besser, RE. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of Investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:506-26
2. Cloud, JI. Carrol, KC. Pixton P. Erall, M. Hillyard, DR. 2000. Detection of *Legionella* species in Respiratory Specimens using PCR with sequencing confirmation.
3. Raharjo, E. 2005. Pemeriksaan specimen serum darah terhadap zat anti *Legionella*. *Cermin Dunia Kedokteran.* 148: 49-50
4. Barbaree, JM. Gorman, GW. Martin, WT. Fields, BS. Morrill, WE. 1987. Protocol for sampling environmental sites for *Legionellae*. *J. Clin. Microbiol.* 53: 1454 – 1458
5. EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infection). 2005. Ricketts KD, Joseph CA. Legionnaires' disease in Europe 2003-2004. *Euro Surveill.* 2005.11: 107-110 <http://www.eurosurveillance.org/>
6. WHO (World Health Organization), Bartram, J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S. 2007. *Legionella* and the prevention of legionellosis.
7. Ta, AC. Stout JE. Yu, VL. Wagener MM. 1995. Comparison of Culture methods for monitoring *Legionella* species in Hospital potable water systems and Recommendations for Standardization of such methods. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2118 – 2123
8. Templeton, KE. Scheltinga SA. Et al. 2003. Development and Clinical Evaluation of an Internally Controlled, Single-Tube Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4016 – 4021
9. Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Wood CL. 2006. *Legionella*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins; p. 549-562
10. Murga R. 2001. Role of Biofilm in survival of *Legionella pneumophila* in a model potable –water system. *Microbiology.* 147: 3121-3126
11. Dowling JN, Saha AK, Glew RH. 1992. Virulence Factors of the Family *Legionellaceae*. *Microbiol. Rev.* 56: 32-60
12. Horwitz MA .1984. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocyte. *Journal experinment medicine.* 158: 2108-2126

13. Bhopal RS. 1991. Proximity of the home to cooling tower and the risk of non outbreak Legionnaires' disease. *British Medical Journal*. 302 (6773):378-383
14. EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infection). 2005. Recent Outbreak of Legionnaires' disease. <http://www.eurosurveillance.org/>
15. Livelo, IP, Monzon, OT, Saniel MC, Yamaguchi K. 1988. Isolation of *Legionella* from the Environment. *Phil J Microbil Infect Dis* ; 17(2):37-40
16. Villari P, Motti A, Falluro C, Torre I. 1998. Comparison of conventional culture and PCR methods for the detection of *Legionella pneumophila* in water. *Letter in Applied Microbiology*. 27:106-110
17. Koide, M. Saito, A. Kusano, N. Higa, F. 1993. Detection of *Legionella* spp in cooling tower water by the polymerase chain reaction method. *Appl. Environ. Microbiol.*59:1943-1946
18. ASHRAE (American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers) 2000. Guideline 12-2000—Minimizing the risk of legionellosis associated with building water systems. Atlanta. Georgia. ASHRAE Inc.
19. Kepmenkes RI No. 1538/MENKES/SK/2003. Standar Pengelolaan Spesimen *Legionella*. Tanggal 3 November 2003
20. Qiagen, 2003. QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook.
21. Isenberg, HD.1992. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 2
22. Qiagen, 2005. Hotstart Taq PCR Handbook
23. Palmer, CJ, Bonilla GF, Roll B. et al. 1995. Detection of *Legionella* species in Reclaimed Water and Air with the EnviroAmp *Legionella* PCR kit and Direct Fluorescent Antibody Staining. *Appl. Environ. Microbiol.*61:407 – 412
24. Dennis PJ, Green D, Jones BP .1984. A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *Journal of Applied Bacteriology*, 56:349-350
25. Ratcliff RM, Lancer JA, Manning PA, Heuzenroeder MW, 1998. Sequence-Based Classification Scheme for the Genus *Legionella* Targeting the *mip* Gene. *J. Clin. Microbiol.* 36 (6):1560-1567
26. Hussong D, Colwell R.R, O'Brien M.O., Weiss E, Pearson A.D, Wiener R.M, Burge W.D. 1987. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Bio/Technology* 5:947-950
27. Steinert M, Amann R, Hacker J. 1997. Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2047-2053

28. Sheehan KB, Henson JM, Ferris MJ . 2005. Legionella species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. Applied and Environmental Microbiology, 71:507-511
29. Wilson DA, Reischl U, Hall GS, Procop GW. 2007. Use of partial 16S rRNA Sequencing for identification of *Legionellapneumophila* and non-*Legionella* spp. J.Clin.Microbiol. 45(1):257-258
30. Bartie C, Venter SN, Nel LH. 2001.Evaluation of detection methods for Legionella species using seeded water samples. Water SA. 27:523-527. <http://www.wrc.org.za>
31. Hay J, Seal DV, Billcliffe B, Freer JH. 1995. Non-culturable *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii*: detection of the bacterium using DNA amplification and hybridization. J.Appl. bacterial. 78:61-65
32. Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamagichi K. 2003. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. Appl. Environ. Microbiol. 69(5):2540-2547
33. England, A.C, Fraser DW, Mallison GF, Mackel DC, Skaliy P, Gorman GW. 1982. Failure to predict culture result from disinfectant-treated air conditioning cooling tower. Appl. Environ. Microbiol. 43: 240-244
34. Costa J, Tiago I, da Costa MS, Verissimo A. 2005. Presence and persistente of *Legionella* spp in ground water. Appl. Environ. Microbiol. 71(2):663-667
35. Borella P., Montagna MT, Stampi S , Stancanelli G, Spica V, Triassi M, Marchesi I, Bargellini A, Tato D, Napoli C, Zanetti F, Leoni E, Moro M, Scaltriti S, D'Alcala GR, Santarpia R, Boccia S. 2005. *Legionella* Contamination in Hot Water of Italian Hotels. Appl. Environ. Microbiol. 71: 5805-5813
36. Mouchtouri V, Velonakis E, Tsakalof A, Kapoula C, Goutziana G, Vatopolulos A, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. 2007. Risk factors for contamination of hotel water distribution systems by *Legionella sp.* Appl. Environ. Microbiol. 73: 1489-1492
37. Ragull S, Nunez MG, Sopena N, Esteve M, Montenegro R, Sabria M. 2007. *Legionella pneumophila* in Cooling Tower: Fluctuations in counts, Determination of genetic variability by PFGE, and Persistence of PFGE patterns. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5382-5384
38. Azara A, Piana A, Sotgiu G, Dettori M, Deriu MG, Masis MD, Are BM, Muresu E. 2006. Prevalence study of *Legionella spp.* contamination in ferries and cruise ships. *BMC Public Health*. 6:100
39. Crimi P, Macrina G, Grieco A, Tinteri C, Copello L, Rebora D, Galli A, Rizzetto R. 2006. Correlation between *Legionella* contamination in water and surrounding air. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 27: 771-773

40. Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii R, Maruta K, Izu, K, Shiomori T, Yoshida I. 1997. Development of a New Nested PCR Method for Detection of *Legionella* Species and Its Application to Surveillance of Legionellae in Hospital Cooling Tower Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2489-2494
41. Delgado P, Simonart T, Parent V, Marchand G, Bobbelaere M, Pierlot E, Pierzo V, Szczebara FM, Ferveur EG, Delabre K, Delattre JM. 2005. Rapid method for enumeration of viable *legionella pneumophila* and other *Legionella spp* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4086-4096



Lampiran 1.**Bahan dan Alat yang digunakan:****1. Kultur**

- Medium BCYE (Oxoid)
- Growth Supplement SR110
- Selective supplement SR111
- Inkubator CO₂ suhu 35°

2. Bahan suspensi bakteri

- Larutan NaCl 0.9%
- Suspensi McFarland 0.5

3. Isolasi DNA

- QiaAmp DNA Mini kit (Qiagen)
- Air bebas nuclease
- Heat block atau inkubator
- Sentrifugasi
- Vortexs (Thermolyne, Maxi MixII, USA)
- Biological Safety Cabinet
- Pipet 1 ml, 200 ul dan 20 ul
- Tip hidrofobik berfilter untuk pipet 1 ml, 200 ul dan 20 ul
- Tabung eppendorf 1.5 ml

4. Amplifikasi DNA

- DNA thermal cycler (MJ Mini Thermal Cycler BioRad)
- DNA thermal cycler (AB Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2004)
- Mikrosentrifugasi
- Refrigerator -20° C
- Tabung PCR

5. Deteksi produk PCR

- Bahan gel poliakrilamid 9%

- 10X TBE 500 ul
- Akrilamid 30% 1510 ul
- Akuabides 2990 ul
- TEMED 5 ul
- APS 30 ul

- Bahan untuk deteksi produk PCR

Loading Buffer 6X

- gliserol 30%
- sukrosa 40%
- bromfenol blue 0.25%

Marker 100 bp (Promega)

Ethidium bromide 1 ug/ml

Larutan TAE 50 X (Tris Asetat EDTA)

- tris base 242 g
- asam asetat glacial 57.1 ml
- Na₂EDTA 37.2 g
- Akuabides hingga 1 L

Larutan TBE 10X (Tris Borat EDTA)

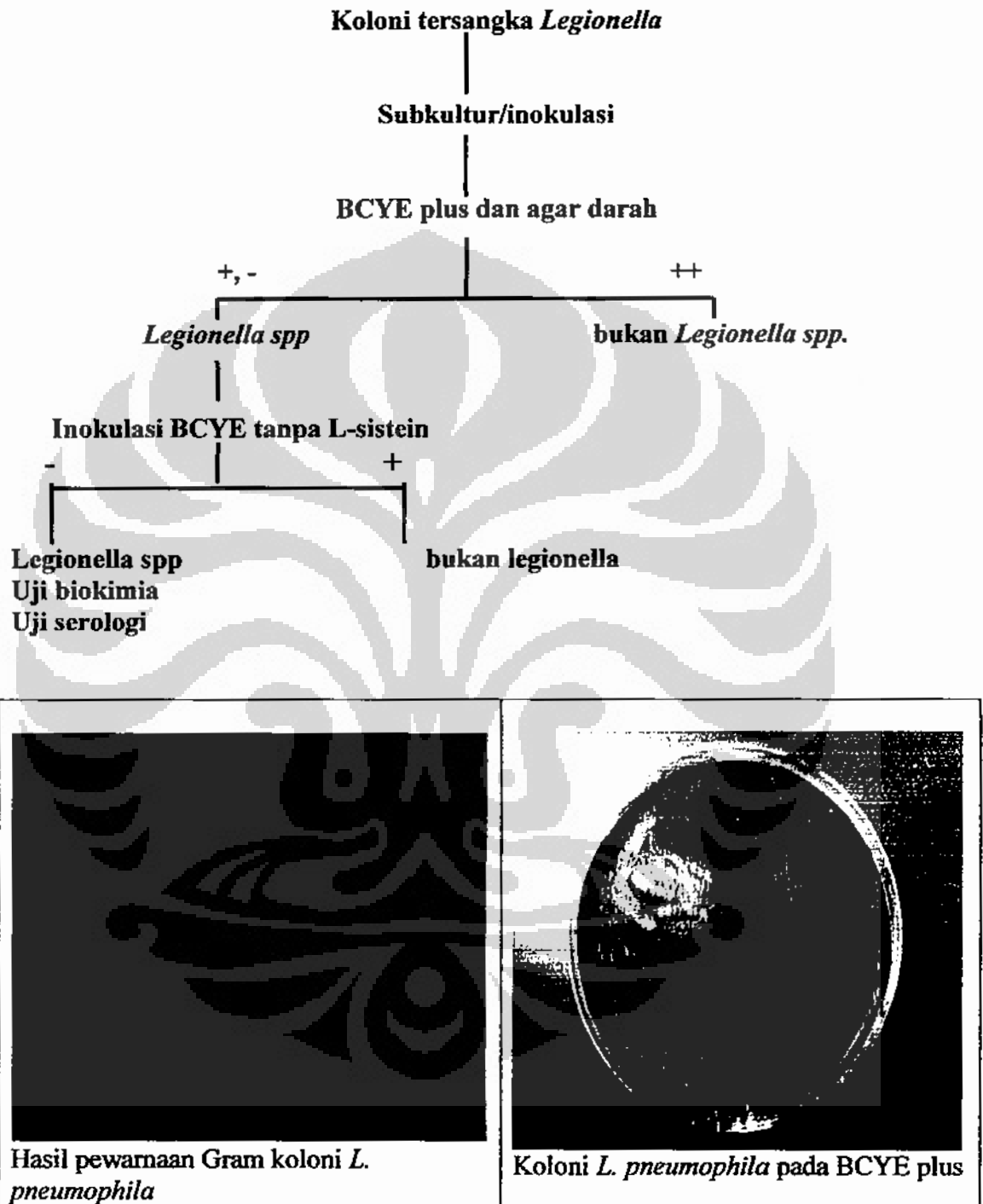
- Tris Base 108 g/L
- Asam borat 55 g/L
- EDTA pH 8.0 40 ml

Parafilm

- Alat

- alat pencetak gel poliakrilamid
- tangki elektroforesis + power supply
- transluminator ultraviolet
- computer dengan program gel Doc XR

Lampiran 2. Identifikasi koloni tersangka *Legionella* spp



Lampiran 3. Homologi hasil sekuensing produk PCR *L.pneumophila*, *S. aureus* dan sampel air cooling tower

1st Nucleotide Sequence

File Name : Sequence2Sta aur.nuc
Sequence Size : 147

2nd Nucleotide Sequence

File Name : Sequencellegionella.nuc
Sequence Size : 153

Unit Size to Compare = 6

Pick up Location = 1

[94.118% / 119 bp] INT/OPT.Score : < 180/ 384 >

```

1'   CTT ACCCGTTC TTCCGGTAATA AAAAAAATA TACC-ACGCG TTACT-ACCC
          *** * * * ***** ***** *****
1"   TGAAGGTTTC CCCAACCCCC CTCCCCCTC TTCAGGCATA TTCCTACGCG TTACTCACCC
52'  GTCCCGCCAC TCGCCATCTG TCTAGCAAGC TAGACAATGC TGCCGTTCTGA CTTGCATGTG
**   ***** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** *****
61"  GT-TCGCCAC TCGCCATCTG TCTAGC-AGC TAGACAATGC TGCCGTTCTGA CTTGCATGTG
12'  TTAAGCATGC CGGCCAGCGT TCAATCTGAG CCAGGA
          ***** * ***** ***** ***** *****
119" TTAAGCATGC C-GCCAGCGT TCAATCTGAG CCAGGA
  
```

1st Nucleotide Sequence

File Name : Sequencellegionella.nuc
Sequence Size : 153

2nd Nucleotide Sequence

File Name : Sequence3sampel ling.nuc
Sequence Size : 155

Unit Size to Compare = 6

Pick up Location = 1

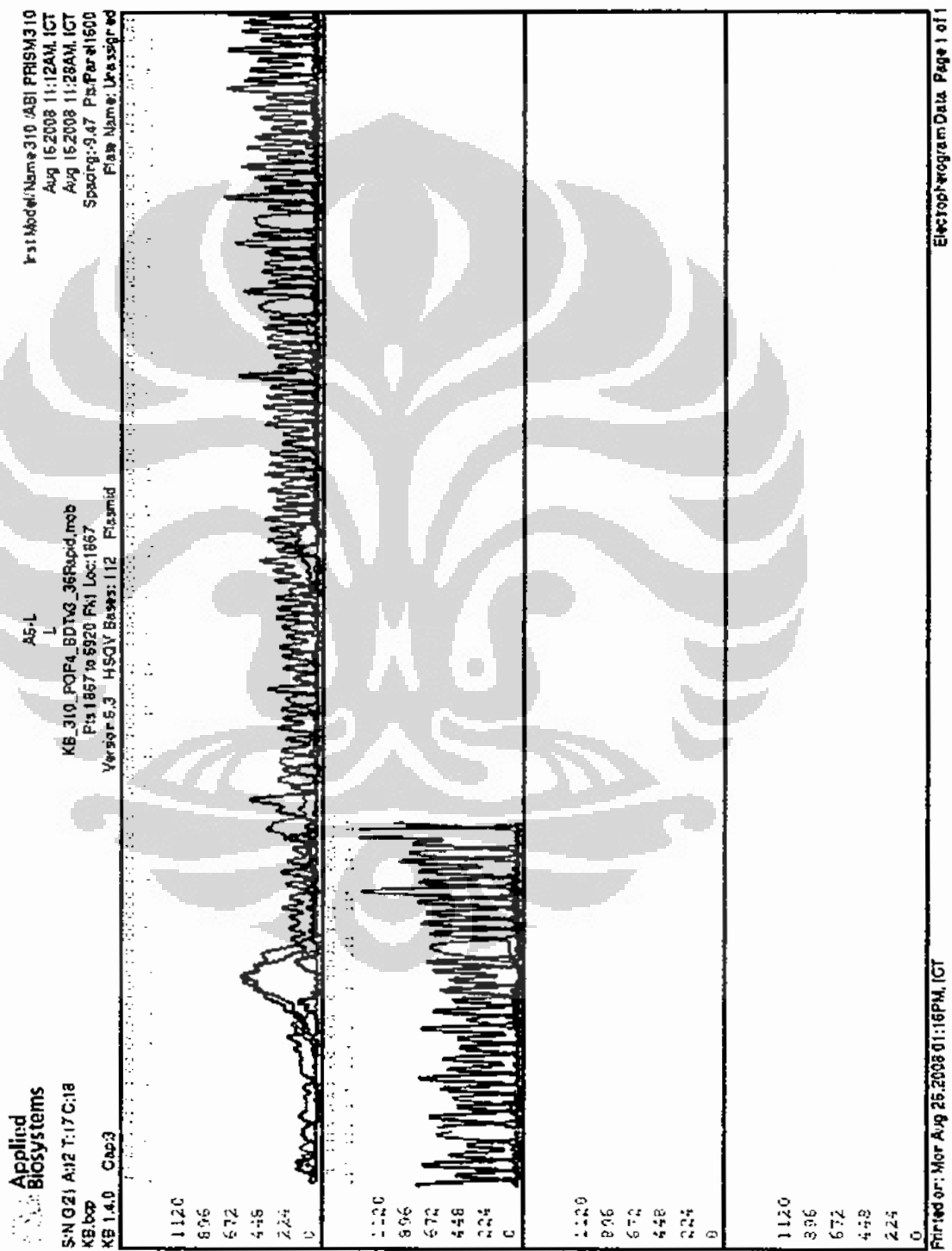
[93.496% / 123 bp] INT/OPT.Score : < 272/ 422 >

```

1'   TGAAGGTTTC CCCAACCCCC CTCCCCCTC TTCAGGCATA TTCCTACGCG TTACTCACCC
          * * * * ***** ***** *****
1"   GCCCACTAC GCCTCGTACA CCCAAACCAA GAAAAGAAA TTCCTACGCG TTACTCACCC
61'  --GTTCCGCA CTCGCCATCT GTCTAGC-AG CTAGACAATG CTGCCGTTCTG ACTTGCATGT
          ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** *****
60"  TCTCTCGCCA CTCGCCATCT GTCTAGCAAG CTAGACAATC CTGCCGTTCTG ACTTGCATGT
118' GTTAAGCATG CCGGCCAGCGT TCAATCTGAG CCAGGA
          ***** ***** ***** ***** *****
120" GTTAAGCATG CCGGCCAGCGT TCAATCTGAG CCAGGA
  
```

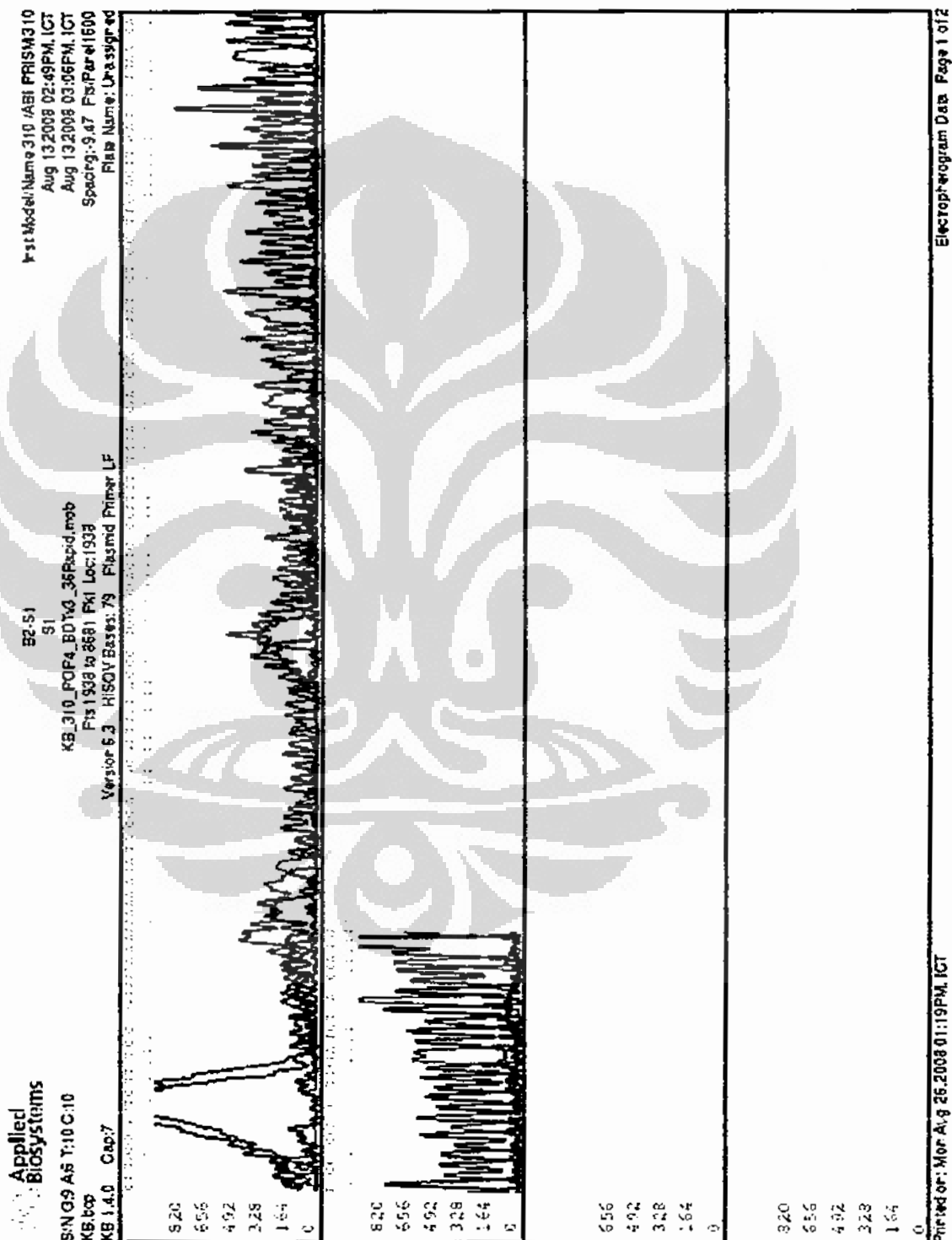
Lampiran 4. sekuen produk PCR *Legionella pneumophila* dengan primer LspF

TGAAGGTTTTCCCCAACCCCTTCCCCCTCTTCAGGCATATTCCTACGCGTT
 ACTCACCCGTTTCGCCACTCGCCATCTGTCTAGCAGCTAGACAATGCTGCCGT
 TCGACTTGCATGTGTTAAGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGA



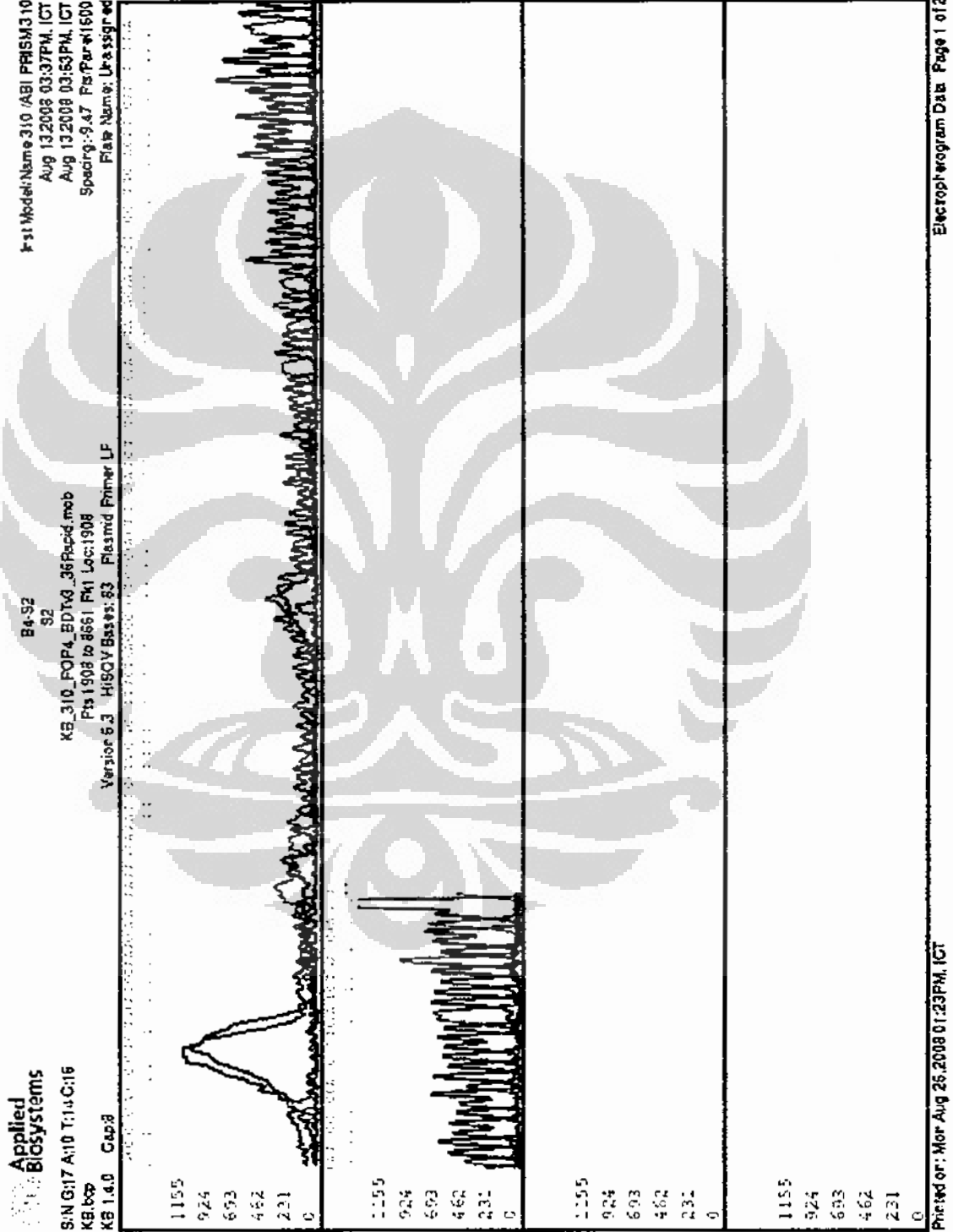
Lampiran 5. sekuen hasil produk PCR sampel S1 (*S. aureus*) dengan primer LspF

CTTACCCGTTCTTTCCGGTAATAAAAAAAAAATATACCACGCGTTACTACCCG
TCCCGCCACTCGCCATCTGTCTAGCAAGCTAGACAATGCTGCCGTTTCGACTT
GCATGTGTTAAGCATGCCGGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGA



Lampiran 6. sekuen hasil produk PCR sampel S2 (air cooling tower) dengan LspF

GCCCACTACGCCTCGTACACCCAAACCAAGAAAAGAAAATTTCCTACGCGTT
ACTCACCTCTCTCGCCACTCGCCATCTGTCTAGCAAGCTAGACAATGCTGC
CGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGG
A



Lampiran 7. Blast hasil sekuen produk PCR *L.pneumophila*, *S aureus* dan sampel air cooling tower

sekuen produk PCR *L. pneumophila*

TGAAGGTTTCCCCAACCCCTTCCCTTTCAGGCATATTCCTACGGCTTACTCACCGGTTCCGCACTCGCCATCTGTCTAGCAGCTAGACAATGCTGCCGTTGCACTTGCATGTGTTAAGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGA

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|---|---------------------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| AE017354.1 | Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1, complete genome | 233 | 701 | 85% | 1e-58 | 98% | |
| EU054324.1 | Legionella pneumophila strain Alcoy 2300/99 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | 233 | 233 | 85% | 1e-58 | 98% | |
| CP000675.1 | Legionella pneumophila str. Corby, complete genome | 233 | 701 | 85% | 1e-58 | 98% | |
| DQ408661.1 | Legionella pneumophila isolate DGGE band 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 233 | 233 | 85% | 1e-58 | 98% | |

Sekuen produk PCR *S. aureus*

CTTACCCGTTCTTCCGGTAATAAAAAAATATACCACGGCTTACTACCCGTCGCCACTCGCCATCTGTCTAGCAAGCTAGACAATGCTGCCGTTGCACTTGCATGTGTTAAGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGA

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|---|---------------------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| EU054324.1 | Legionella pneumophila strain Alcoy 2300/99 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | 183 | 183 | 79% | 1e-43 | 94% | |
| CP000675.1 | Legionella pneumophila str. Corby, complete genome | 183 | 551 | 79% | 1e-43 | 94% | |
| DQ408661.1 | Legionella pneumophila isolate DGGE band 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 183 | 183 | 79% | 1e-43 | 94% | |
| AE017354.1 | Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1, complete genome | 183 | 551 | 79% | 1e-43 | 94% | |
| AF122885.1 | Legionella pneumophila subsp. pascallei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 183 | 183 | 79% | 1e-43 | 94% | |

sekuen produk PCR sampel S2 (air cooling tower)

GCCCACTAGCGCTCGTACACCCAAACCAAGAAAGAAATTCCTACGGCTTACTCACCTCTCTCGCCACTCGCCATCTGTCTAGCAAGCTAGACAATGCTGCCGTTGCACTTGCATGTGTTAAGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGA

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|---|---------------------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| EU054324.1 | Legionella pneumophila strain Alcoy 2300/99 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | 198 | 198 | 75% | 5e-48 | 97% | |
| CP000675.1 | Legionella pneumophila str. Corby, complete genome | 198 | 596 | 75% | 5e-48 | 97% | |
| DQ408661.1 | Legionella pneumophila isolate DGGE band 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 198 | 198 | 75% | 5e-48 | 97% | |



RIWAYAT HIDUP

1. Nama : Yusmaniar
2. NPM : 6105012119
3. Alamat : Jl. Kebon Pala I 012/07 No.28, Jakarta 13320
4. Agama : Islam
5. Tempat/Tanggal lahir : Jakarta , 3 Desember 1966
6. Riwayat Pendidikan :
 - SD : SD Kampung Melayu 01 Lulus Tahun 1979
 - SMP : SMP Negeri 26 Jakarta Lulus Tahun 1982
 - SMA : SAA Ditkesad Lulus Tahun 1985
 - S1 : Universitas Andalas Lulus Tahun 1991
Jurusan Farmasi Fakultas MIPA
 - Pendidikan Profesi Apoteker Lulus tahun 1992
: Universitas Indonesia
Jurusan Farmasi Fakultas MIPA
 - S2 : Universitas Indonesia Lulus Tahun 2008
Program Magister Ilmu Biomedik
Kekhususan Mikrobiologi
7. Riwayat Pekerjaan
 - Balai POM Propinsi Lampung (1993 – 1998)
 - Politeknik Kesehatan Jakarta II (1998 –)
8. Sumber Dana Penelitian :
 - Departemen Mikrobiologi FKUI
 - DIPA Poltekkes Jakarta II tahun 2007

Development of Duplex PCR Assay for Detection of *Legionella* Species and *Legionella pneumophila* in Cooling Tower Water Samples

Yusmaniar, Anis Karuniawati, Andi Yasmon

In this study a rapid detection of *Legionella spp* dan *Legionella pneumophila* using a technique of duplex PCR is developed. Primers in the 16S rRNA sequence and primers in the *mip gene* sequence were selected to detect DNA of *Legionella spp* and *Legionella pneumophila*.

According this study, the sensitivity of duplex PCR to detect *Legionella pneumophila* in NaCl 0.9% is 2.8 CFU/ml. *Legionella pneumophila* cannot be recovered from seeded tap water samples and sterilized distilled water but the bacteria can be detected with the duplex PCR. With polyacrilamide 9% gel electrophoresis for detection of PCR product, the detection limit for *Legionella pneumophila* in seeded water sample is 62 CFU/400ml of tap water sample, 32 CFU/400ml of sterile distilled water and 32 CFU/400 ml of sterile NaCl 0.9%.

The precence of *Legionella spp* and *Legionella pneumophila* in water sample was investigated using the duplex PCR. Of 9 cooling tower water sample, 7 were positive for *Legionella spp.*, and 1 of these contained *Legionella pneumophila*

Key words : *Legionella spp*, *Legionella pneumophila*, Duplex PCR, cooling tower

Legionella spp. are well known as the etiological agent of both Legionnaires' disease and Pontiac fever. The first recognized outbreak of Legionnaires' Disease occurred in the US at the American Legion Convention in Philadelphia during the summer of 1976. There were several hundred people who were stricken. Thirty four people died from the disease. Fifty species and more than 70 serogroups of *Legionella* have been identified. Twenty species have been associated with either fatal pneumonia, i.e., Legionnaires' disease, or a nonpneumonic self-limiting flu-like illness, Pontiac fever. One species of *Legionella*, *L. pneumophila*, cause approximately 85% of all reported cases of legionellosis. Most *L. pneumophila* infections are caused by serogroup 1; however certain serogroup 1 strains may be more virulent.^{1,2}

In the United States between 1980 and 1998, an average of 356 cases were reported to CDC each year, with no trend this is a fraction of the 8,000 to 18,000 cases estimated to occur each year¹. In the Indonesia, cases of Legionnaires' disease have occurred in Bali in 1996 and Karawaci Tangerang in 1999. Raharjo in 2002 have studied by use of ELISA kit of 213 serum specimens of maintenance workers involved with cleaning and servicing cooling towers. The 68 serum specimens had positive titers of antibody *Legionella*, that showed the workers had infected by *Legionella*. The earlier study in 2001 have showed the 90% of workers involved with cleaning and servicing cooling towers had positive titers of *Legionella pneumophila*³.

Legionella species are ubiquitous in environmental waters and capable of surviving extreme ranges of environmental conditions. Human infection occurs through the inhalation of aerosols contaminated with *Legionella spp.* Potential sources of legionellosis include *Legionella*-contaminated water in cooling towers and air conditioners, hot tubs, showerhead water, and public fountains⁴.

When *Legionella* are present in aquatic environments, the risk of transmission of infections to humans depends on the presence of several factors: conditions favorable for amplification of the organism, a mechanism of dissemination e.g. aerosolization of colonized water, inoculation of the organism at site where it is capable of causing infection, bacterial strains- specific virulence factors and the susceptibility of the host⁵.

Methods are currently used for diagnosing *Legionella* infections : isolation of the bacterium on culture media, identification of the bacterium using paired serology, detection of antigens in urine, detection of the bacterium in tissue or body fluids by immunofluorescens microscopy and detection of bacterial DNA using polymerase chain reaction (PCR)⁶.

Culture method remains the gold standar for detecting the legionella from environmental sampel an dis the most specific procedure. However, a number of factors limit the sensitivity of culture. First, isolation *legionella* is carried out using selective medium. Second these techniques require long incubation perodes, are time-consuming and third the recovery rates are often below, as the concentration stage usually centrifugation or filtration entails a variable degree of bacterial loss. PCR methods are attractive alternative for detection these bacteria which pose problems for conventional culture methods^{1,7,8}.

In this study we depeolved duplex PCR for detecting *Legionella sp* and *Legionella pneumophila*. We examined the ability of the duplex PCR method to detect *Legionella sp* and *Legionella pneumophila* in seeded water sampel and in cooling tower water and compared the sensitivity of the duplex PCR methods with the sensitivity of the culture method.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria.

A range of bacterial strains were used to test the specificity of the duplex PCR, including *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus viridans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter anitratus*, *Moraxella catharralis* and *Haemophilus influenza*. Each wa cultured with appropriate agar medium.

Legionella pneumophila ATCC 33152 were used establish the sensitivity and specificity of the duplex PCR. The legionella strains were grown at incubator (5-7% CO₂) at 35° C on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar added growth suplement and selective suplement for 48–72 h. The periode for the diagnostic culture was 14 days.

To evaluted the sensitivity of the duplex PCR test, the *Legionella* were suspended in sterile physiological saline at concentration equivalent to 10⁸ cells per ml, based on McFarland turbidimetric standards. Serial dilutions were made from the suspension and aliquots were extracted and tested in the duplex PCR to determine sensitivity.

DNA extraction.

The genomic DNA was extracted the help of a DNA extraction kit (*QIAamp DNA Mini kit* Qiagen). The DNA was determined by measuring the optical density at 260 nm.

Primer.

The primers for the duplex PCR assay amplified a portion of the 16S rRNA gene for detection *Legionella spp* and product size of PCR-amplified DNA about 212 bp. Forward primer LspF (AGGCTAATCTTAAAGCGCC) and reverse primer LspR (CCTGGCTCAGATTGAACG). The second primer amplified a portion of the *mip* gene for detection of *Legionella pneumophila* and product size of PCR-amplified DNA about 124 bp. Forward primer LpnF (TGGTGACTGCAGCTGTTATG) dan reverse primer LpnR (CATTGCTTCCGGATTAACAT) The primers were previously used by Templeton et al⁹.

The duplex PCR conditions.

Duplex PCR was performed in 25 ul of reaction mixture consisting of 0.625 ul of HostStart *Taq polimerase* (Qiagen), 1 mM MgCl₂, 0.1 uM each primer for 16S rRNA and 0.2 uM each primer of *mip* gene and 7 ul of template. The PCR thermal profile consisted of an initial incubation of 15 min at 95° C, followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 45 at 59°C and 30 s at 72°C, and extention 7 min at 72°C. Amplification were performed with the AB Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2004.

PCR-amplified DNA was separated on 9% acrylamide gels. The acrylamide gels were run in TBE buffer and contained a molecular size marker. The gels were stained with TAE buffer solution containing ethidium bromide and observed with a UV transluminator.

Seeding of samples

Fresh sub-cultures of *Legionella pneumophila* ATCC 33152 were prepared on BCYE medium before each experiment. Plates were incubated aerobically at 35°C for 48 – 72h. Stock solutions for seeding of samples were prepared by inoculating sterile NaCl 0.9% with this culture at concentration equivalent to 10⁸ cells per ml, based on McFarland turbidimetric standards. Serial dilutions were made from the suspension. The final seeding was done by inoculating 10 ml of these serial dilution into 400 ml of samples. Sterile samples of distilled water and NaCl 0.9% and non-sterile tap water were seeded for evaluation. Evaluations were carried out immediately after seeding.

For comparison of the duplex PCR method and the culture method. Samples are filter concentrated in a biological safety cabinet into a sterile membran millipore 0.2 μ m. The filter is removed aseptically, folded to the outside and placed into a steril centrifuge containing 10 ml of sterile physiological saline, vortex for 1 minute. The aliquots sample concentrates were treated with acid prior to inoculation onto BCYE agar. Another aliquots were extracted and tested in the duplex PCR method.

Collection of water sampels from cooling towers,

A total of 12 samples of cooling tower water and tap water were collected from 9 buildings in Jakarta, Indonesia, between November 2007 and June 2008. The water sample (about 400 ml) was collected in a sterile glass bottle from basin of each cooling tower. Sampels are filter concentrated in a biological safety cabinet into a sterile membran millipore 0.2 μ m. The filter is removed aseptically, folded to the outside and placed into a steril centrifuge containing 10 ml of sterile physiological saline, vortex for 1 minute. The aliquots sample concentrates were treated with acid prior to inoculation onto BCYE agar. Another aliquots were extracted and tested in the duplex PCR method.

RESULT

Specificity. The Duplex PCR assay detected DNA *Legionella pneumophila*. This assays generated negative results with a selection of other bacteria, including *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus viridans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter anitratus*, *Moraxella catharralis* and *Haemophilus influenza*.

Sensitivity. Sensitivity was determined by analyzing dilutions of the extracted DNA *Legionella pneumophila*. The sensitivity was 2.5 CFU/ml for the *L. pneumophila*.

Comparison of culture method and the PCR method for Legionella spp. detection using

seeded water samples. In this study, detection *Legionella* using seeded water samples were performed to evaluated whether sample concentration and resuspension may influence the outcome of culture method and the PCR method (table 1)

| Sample | Culture on BCYE | PCR |
|---------------------------------------|-----------------|-----|
| 3.2 x 10 ³ CFU/ 400 ml SDW | - | + |
| 3.2 x 10 ² CFU/ 400 ml SDW | - | + |
| 3.2 x 10 ¹ CFU/ 400 ml SDW | - | + |
| 3.2 x 10 ⁰ CFU/ 400 ml SDW | - | - |
| 3.2 x 10 ⁴ CFU/ 400 ml SS | + | + |
| 3.2 x 10 ³ CFU/ 400 ml SS | - | + |
| 3.2 x 10 ² CFU/ 400 ml SS | - | + |
| 3.2 x 10 ¹ CFU/ 400 ml SS | - | + |
| 3.2 x 10 ⁰ CFU/ 400 ml SS | - | - |
| 6.2 x 10 ³ CFU/ 400 ml TW | - | + |
| 6.2 x 10 ² CFU/ 400 ml TW | - | + |
| 6.2 x 10 ¹ CFU/ 400 ml TW | - | + |
| 6.2 x 10 ⁰ CFU/ 400 ml TW | - | - |

DW: Sterile Distilled Water; SS: Sterile NaCl 0.9%; TW: Tap Water; (-): Negative; (+): positive

Detection *Legionella spp.* and *L. pneumophila* in cooling tower water.

Of 12 water samples subjected to bacterial culture and the duplex PCR, the culture method showed negatif *Legionella* colony. Of 9 cooling tower water samples, 7 samples produced positive band for *Legionella spp.* one of these produced band for *L. pneumophila* and two samples was negative.(table 2, Fig.1)

| No. sampel | Kultur | PCR |
|------------|--------|---------------------------|
| 1 | - | - |
| 2 | - | (+) <i>L. pneumophila</i> |
| 3* | - | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 4 | - | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 5 | - | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 6* | - | - |
| 7* | - | - |
| 8 | - | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 9 | - | - |
| 10 | - | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 11 | - | (+) <i>Legionella spp</i> |
| 12 | - | (+) <i>Legionella spp</i> |

* : Tap Water samples; (-): negative; (+): positive

3. Raharjo, E. 2005. Pemeriksaan specimen serum darah terhadap zat anti Legionella. *Cermin Dunia Kedokteran*. 148: 49-50
4. Barbaree, JM, Gorman, GW, Martin, WT, Fields, BS, Morrill, WE. 1987. Protocol for sampling environmental sites for Legionellae. *J. Clin. Microbiol.* 53: 1454 – 1458
5. WHO, Bartram, J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S. 2007. Legionella and the prevention of legionellosis
6. Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Wood CL. 2006. Legionella. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins; p. 549-562
7. Ta, AC, Stout JE, Yu, VL, Wagener MM. 1995. Comparison of Culture methods for monitoring Legionella species in Hospital potable water systems and Recommendations for Standardization of such methods. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2118 – 2123
8. Villari P, Motti A, Falluro C, Torre I. 1998. Comparison of conventional culture and PCR methods for the detection of *Legionella pneumophila* in water. *Letter in Applied Microbiology*. 27:106-110
9. Templeton, KE, Scheltinga SA, et al. 2003. Development and Clinical Evaluation of an Internally Controlled, Single-Tube Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4016 – 4021
10. Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K. 2003. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5):2540-2547
11. Steinert M, Amann R, Hacker J. 1997. Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2047-2053
12. EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infection). 2005. Ricketts KD, Joseph CA. Legionnaires' disease in Europe 2003-2004. *Euro Surveill.* 2005.11: 107-110
<http://www.eurosurveillance.org/>
13. Koide, M, Saito, A, Kusano, N, Higa, F. 1993. Detection of *Legionella* spp in cooling tower water by the polymerase chain reaction method. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1943-1946
14. Ragull S, Nunez MG, Sopena N, Esteve M, Montenegro R, Sabria M. 2007. *Legionella pneumophila* in Cooling Tower: Fluctuations in counts, Determination of genetic variability by PFGE, and Persistence of PFGE patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5382–5384
15. ASHRAE (American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers) 2000. Guideline 12-2000—Minimizing the risk of legionellosis associated with building water systems. Atlanta, Georgia. ASHRAE Inc.
16. Kepmenkes RI No. 1538/MENKES/SK/2003. Standar Pengelolaan Spesimen Legionella. Tanggal 3 November 2003