

## PEMERIKSAAN LEPTOSPIROSIS SECARA LABORATORIS (HASIL PELATIHAN DI BALAI PENELITIAN VETERINER BOGOR)

Dewi Marbawati\*, Hari Ismanto\*

Pelatihan pemeriksaan leptospirosis dilaksanakan dalam rangka meningkatkan kemampuan laboratorium bakteriologi yang ada di Loka litbang P2B2 Banjarnegara agar memiliki kemampuan melakukan pemeriksaan Leptospirosis. Pelatihan dilaksanakan selama 3 hari dari tanggal 29 Juni sampai 1 Juli 2009, di Balai Besar Penelitian Vetereiner Bogor dengan dipandu oleh Ibu Kusmiyati, M, Si dibantu oleh dua orang stafnya. Beberapa materi yang diberikan dalam pelatihan ini diantaranya teori umum Leptospirosis dan pemeriksaan Leptospirosis secara laboratoris dengan metode MAT (*Microscopic Agglutination Test*). Pelatihan ini dilaksanakan mengingat bidang penelitian di Loka Litbang P2B2 Banjarnegara yang lebih fokus ke bidang penyakit bersumber rodensia, bahkan 3 tahun terakhir ini telah melakukan penelitian mengenai Leptospirosis.

Leptospirosis adalah penyakit menular yang dapat menyerang mamalia termasuk manusia. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Leptospira interrogans* yang terdiri dari beberapa serovar. Gejala klinis penyakit ini sangat bervariasi dari yang ringan hingga yang berat bahkan dapat menyebabkan kematian penderitanya. Leptospirosis dapat berbentuk infeksi yang bersifat subklinik atau demam ringan yang dapat menyebabkan keguguran pada hewan bunting, sampai hepatitis dan nephritis yang berat dan menyebabkan kematian karena kerusakan hati atau ginjal. Karena tidak ada gejala klinis yang patognomis maka penegakan diagnosa harus ditunjang oleh pemeriksaan laboratoris.

Penularan Leptospirosis pada manusia terjadi secara kontak langsung dengan hewan terinfeksi *Leptospira* atau secara tidak langsung melalui genangan air yang terkontaminasi urin yang terinfeksi *Leptospira*. Kuman ini masuk ke dalam tubuh melalui kulit yang luka atau membran mukosa.

*Leptospira* penyebab Leptospirosis berbentuk spiral, tipis, lentur dengan panjang 10 - 20  $\mu\text{m}$  dan tebal 0,1  $\mu\text{m}$  serta memiliki 2 lapis membran. Kedua ujungnya mempunyai kait berupa flagelum periplasmik. Bergerak aktif maju mundur dengan gerakan memutar sepanjang sumbu. Bentuk dan gerakannya dapat dilihat dengan mikroskop medan gelap atau mikroskop fase kontras. Leptospirosis peka terhadap asam dan dapat hidup di dalam air tawar selama kurang lebih satu bulan, tetapi di dalam air laut, air selokan dan air kemih yang tidak

diencerkan akan cepat mati.

Bakteri ini termasuk dalam ordo *spirochaetales*, famili Leptospiraceae, genus *Leptospira*. *Leptospira* bersifat aerob obligat dan tumbuh optimal pada suhu 28-30<sup>o</sup> C. Media untuk pertumbuhannya adalah media dasar yang diperkaya dengan vitamin, asam lemak rantai panjang sebagai sumber karbon dan garam amonium. Genus *Leptospira* dibagi dalam dua spesies yaitu *L.interrogans* yang patogen dan *L. biflexa* yang non patogen. *L. interrogans* dikenal lebih dari 200 serovar.

Bahan-bahan yang diperlukan untuk pemeriksaan laboratoris secara serologis menggunakan MAT adalah :

### a. Serum Sampel

Berupa serum darah atau berupa organ-organ tubuh (hati, otak atau ginjal). Untuk mendapatkan serum dapat dilakukan dengan cara; darah yang didapatkan dilakukan sentrifugasi pemutaran dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dikerjakan untuk memisahkan serum dari bekuan darahnya. Jika tidak dapat dilakukan pemeriksaan MAT pada hari penerimaan serum, maka serum disimpan pada suhu 20<sup>o</sup> C sampai dilakukan pemeriksaan. Data umur, jenis kelamin dan tanggal pengambilan serum dari penderita (pasien) dicatat. Serum yang akan diuji harus tanpa bahan pengawet, tidak tercemar oleh mikroorganisme pencemar, tidak hemolisis dan dalam kondisi dingin selama di perjalanan menuju laboratorium. Disimpan pada suhu 20<sup>o</sup> C sampai waktu pengujian. Serum yang akan diuji diencerkan dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,5

### b. Antigen

Antigen yang digunakan adalah antigen hidup yaitu biakan biakan *Leptospira interrogans* serovar serovar Icterohaemorrhagiae, Javanica, Celledoni, Canicola, Ballum. Pyrogenes, Cynopteri, Rachmati, Australis, Pomona, Grippytyphosa, Hardjo, Bataviae, Tarassovi yang ditumbuhkan di dalam media Ellinghausen, McCullough, Johnson and Harris (EMJH) cair pada suhu 28-30<sup>o</sup>C selama 5 - 9 hari. Antigen harus murni dan homogen serta berkonsentrasi kira kira 2 x 10<sup>8</sup> C *Leptospira* per mililiter.

\*Staf Loka Litbang P2B2 Banjarnegara

**c. Media Leptospira Ellinghausen McCullough Jihson Harris (EMJH)**

Media dasar, terdiri dari :

Difco™ Leptospira Medium Base EMJH 2,3 gr  
 Sodium pyruvat 10 % 1 ml  
 Gliserol 10 % 1 ml  
 H<sub>2</sub>O steril sampai volume akhir menjadi 900 ml  
 pH dijadikan 7,4 dan diautoclave 1210C selama 15 menit

Bahan penyubur, terdiri dari :

Bovine serum albumin fraksi V 10 gr  
 H<sub>2</sub>O steril sampai volume akhir menjadi 30 ml  
 (Kedua bahan tersebut dibuat sehari sebelum pembuatan media, disimpan di refrigerator)

Sambil diaduk ditambahkan : 1 ml CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1%, 1 ml MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1%, 1 ml ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,4%, 0,1 ml CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,3%, 10 ml FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5%, 1 ml cyanocobalamin 0,02% dan 12,5 ml Tween-80 10 %. Juga ditambahkan 20 ml serum kelinci normal yang telah diinaktifkan 56°C selama 30 menit, dan 20 ml larutan 5-Fluorouracil (10 mg/ml). pH dijadikan 7,4 dan ditambahkan 20 ml serum kelinci normal yang telah diinaktifkan 56°C selama 30 menit, dan 20 ml larutan 5-Fluorouracil (10mg/ml). pH dijadikan 7,4 dan ditambahkan H<sub>2</sub>O steril sampai volume akhir menjadi 100 ml. Disterilkan secara filtrasi.

Keterangan : 5-Fluorouracil dilarutkan dengan PBS

**d. Media EMJH cair**

Sebanyak 900 ml media dasar ditambahkan 100 ml bahan penyubur dan dihomogenkan, disterilkan secara filtrasi dan dimasukkan ke dalam botol-botol. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari, setiap hari

dipanaskan dengan waterbath 56°C selama 1 jam. Kemudian dibagi-bagi menjadi 3,6 ml/botol dan disimpan dalam refrigerator.

**e. Media EMJH semisolid**

Tambahkan 2,0 gr agar (Noble agar, Difco) ke dalam 900 ml media dasar dan dipanaskan untuk melarutkan agarnya. Kemudian larutan tersebut disterilkan di dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah suhu media dasar mencapai kir-kira 50°C tambahkan 100 ml bahan penyubur dan dihomogenkan, disterilkan secara filtrasi dan dimasukkan ke dalam botol-botol. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari, setiap hari dipanaskan dengan waterbath 56°C selama 1 jam. Kemudian dibagi-bagi menjadi 3,6 ml/botol dan disimpan dalam refrigerator.

**f. Larutan PBS**

NaCl 0,85 % 1840 ml

Larutan Sorensen\* 160 ml

Dicampur dan diperiksa pHnya (pH 7,5) dan disterilkan 15 lbs, 15 menit.

Larutan Sorensen :

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,33 gr

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,09 gr

H<sub>2</sub>O 1 liter

Pengerjaan MAT menggunakan 15 macam biakan serovar *Leptospira* sp hidup berumur 5 - 8 hari sebagai antigen (Tabel 1). Antigen ini ditumbuhkan dalam media cair EMJH (Johnson dan Harris, 1976) dengan penambahan 2 % serum kelinci dan 100 µg/ml 5-fluorouracil dan dieramkan pada suhu 28 - 30 C.

Tabel 1. Strain *Leptospira* yang digunakan untuk Pemeriksaan MAT Serogroup Serovar Strain/Galur

Serogroup	Serovar	Strain/Galur
Ichterohaemorrhagiae	Ichterohaemorrhagiae	RGA
Javanica	Javanica	Veldrat Bataviae 46
Celledoni	Celledoni	Celledoni
Canicola	Canicola	Utrecht IV
Ballum	Ballum	Mus 127
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Autumnalis	Rachmati	Rachmat
Australis	Australis	Ballico
Pomona	Pomona	Pomona
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
Hebdomadis	Hebdomadis	Hardjoprajitno
Bataviae	Bataviae	Van Tienen
Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin
Semaranga	Semaranga	Veldrat Semarang 173

Kepadatan antigen disesuaikan menjadi kira-kira  $2 \times 10^8$  leptospira/ml.

Serum yang akan diuji diencerkan, mula-mula 1 : 50, lalu menjadi 1 : 200, 1:800 dan 1:3200 dengan phosphate-bufered saline (PBS) pH 7,4 kemudian sebanyak 0,05 ml enceran serum tadi dimasukkan ke dalam lubang lempeng plastik, ditambah 0,05 ml antigen dan diinkubasikan selama dua jam pada suhu  $37^{\circ} \text{C}$  sebelum dilakukan pembacaan. Pembacaan itu sendiri dilakukan dengan memindahkan campuran antigen serum tadi dengan ose pada gelas objek dan diamati dengan mikroskop medan gelap pada perbesaran 100 x. Sebagai titik akhir pembacaan adalah 50 % aglutinasi. Serum yang menunjukkan lebih dari 50 % aglutinasi pada pengenceran akhir (1:6400) dilakukan lagi pemeriksaan ulang dengan enceran yang lebih tinggi. Pada setiap pemeriksaan disertakan kontrol positif (0,05 ml enceran serum homolog + 0,05 ml antigen) dan kontrol pembacaan 50 % aglutinasi (0,15 ml PBS + 0,05 ml antigen).

Sebagai antigen digunakan serovar-serovar *Leptospira* berumur 5-8 hari yang ditumbuhkan di dalam media cair EMJH (Johnson dan Harris, 1967) yang mewakili 15 serogroup. Kepadatan antigen yang digunakan kira-kira  $2 \times 10^8$  *Leptospira*/ml. Sejumlah sama banyak (3 tetes, dengan pipet Pasteur) serum yang diperiksa dan antigen, diteteskan berturut-turut ke dalam satu lubang "WHO plate", lalu diinkubasikan 2 jam pada suhu  $37^{\circ} \text{C}$ . Pembacaan dilakukan di bawah mikroskop medan gelap pada perbesaran 100x, dengan memindahkan suspensi serum antigen ke gelas obyektif. Derajat pembacaan adalah menurut derajat aglutinasi yang terjadi, mulai dari 0 % aglutinasi sampai 100 % aglutinasi. Serum pada pengenceran akhir 1 :100 atau lebih encer yang menunjukkan 50 % aglutinasi dinyatakan positif. Pada setiap pemeriksaan, serum diperiksa dengan pemeriksaan pendahuluan pada pengenceran akhir serum 1 :100, serum yang menunjukkan > 50 % aglutinasi diperiksa lebih lanjut pada pengenceran akhir serum 1 : 400, 1 : 1600 dan 1 : 6400.

MAT dianggap sebagai "baku emas" dalam serodiagnosis leptospirosis karena dapat mendiagnosis secara spesifik pada level serovar/serogroup dibanding pemeriksaan serologi lain. Tes ini menetapkan titer antibodi dalam spesimen serum (dengan pengenceran bertingkat) yang teraglutinasi bila bertemu dengan serovar/serogroup *Leptospira* yang cocok. Aglutinasi yang terbentuk dilihat dengan mikroskop medan gelap. Antibodi yang teraglutinasi dapat berupa IgM maupun IgG, oleh karena itu MAT tidak dapat menentukan apakah infeksi tersebut sedang berlangsung atau baru saja terjadi maupun infeksi yang telah lampau. Seperti tes serodiagnosis lainnya, tes ini idealnya menggunakan

sepasang spesimen serum berselang waktu untuk memperoleh serokonversi, peningkatan titer empat kali lipat, serta dapat menghilangkan fenomena reaksi paradoksial yang mungkin terjadi. (WHO 2003; Hartskeerl et al 2002; Levett 2003)

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam menggunakan metode MAT adalah memerlukan media kultur khusus *Leptospira*, sulit untuk memelihara strain strain *Leptospira* agar tetap hidup dan masing-masing kultur strain mudah tercampur satu sama lain dan sangat mudah terkontaminasi oleh *Leptospira* saprofit ataupun bakteri lain. (Hartskeerl et al 2002). Diharapkan dengan dilaksanakannya pelatihan pemeriksaan leptospirosis ini kedepannya para peneliti dan teknisi Loka litbang P2B2 Banjarnegara mempunyai kemampuan untuk melakukan pemeriksaan *Leptospira* menggunakan metode MAT sehingga dapat membantu kelancaran penelitian di bidang penyakit bersumber rodensia pada umumnya dan leptospirosis pada khususnya.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Johnson dan Harris, 1967, J. Bacteriol, 94 : 27.
2. World Health Organization, *Human Leptospirosis ; Guidance For Diagnosis, Surveillance and Control*, 2003.
3. Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MGA, Terpstra WJ. *Proceeding of the International Course on Laboratory Methods for Diagnosis of Leptospirosis*. Royal Tropical Institute Department of Biomedical Research, Amsterdam; 2002.
4. Levett PN ; *Leptospira and Leptospira*, In : Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC, eds in chief. *Manual of Clin. Microbiology* 8<sup>th</sup> Ed. Washington DC: ASM Press; 2003; 929 – 934.
5. Panduan Pelatihan: *Pemeriksaan Leptospirosis Secara Laboratoris* oleh Kusmiyati, M.Si