

DETEKSI LEPTOSPIRA PATOGEN PADA TERSANGKA PENDERITA LEPTOSPIROSIS DI KABUPATEN PONOROGO

Dyah Widiastuti¹, Anggun Paramita Djati^{*1}

¹Balai Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang, Banjarnegara
Jalan Selomanik 16A Banjarnegara

Abstract

*Up to March 2012, there were increasing leptospirosis cases in Ponorogo. A total of 11 cases of leptospirosis were reported by the Ponorogo District Health Center. This study aims to detect pathogenic *Leptospira* bacteria using Polymerase Chain Reaction (PCR) in suspected leptospirosis in Ponorogo. Collection of blood samples carried out by the local health care medical personnel (doctor, midwife or nurse) was accompanied by a team of researchers. Subjects were people with fever (temperature $>38^{\circ}\text{C}$) or fever accompanied by headache, muscle aches, and rash conjunctivitis. Blood and urine samples were taken purposively. Active case detection was also conducted in communities around the previous patients who had a history of infection risk and relationship of leptospirosis. Further blood samples examined by two different methods, *Lepto Tek Lateral Flow* and *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Ninety blood and urine samples was collected. Four samples were positive for pathogenic *Leptospira* DNA consisted of two samples of blood (whole blood) and two samples of urine. PCR-positive samples in the blood has negative results of *Lepto Tek* examination. While the PCR-positive samples in the urine, *Lepto Tek* was positive. *Lepto tek* showed lower sensitivity in early detection of leptospirosis. Examination of blood and urine samples using PCR can support the early discovery of leptospirosis cases.*

Keywords: *Leptospirosis, Ponorogo, PCR*

DETECTION OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA ON HUMAN LEPTOSPIROSIS SUSPECT IN PONOROGO REGENCY

Abstrak

Sampai dengan bulan Maret 2012 terjadi peningkatan kasus leptospirosis di Ponorogo. Sebanyak 11 kasus leptospirosis dilaporkan oleh Dinas Kesehatan Kabupaten Ponorogo. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi bakteri *Leptospira* patogen menggunakan teknik *Polimerase Chain Reaction (PCR)* pada tersangka penderita leptospirosis di Kabupaten Ponorogo. Pengumpulan sampel darah dilakukan oleh tenaga medis Puskesmas setempat (dokter, bidan atau perawat) didampingi oleh tim peneliti terhadap penduduk yang mengalami demam (suhu badan $> 38^{\circ}\text{C}$) atau demam disertai sakit kepala, nyeri otot, kongjungtivitis dan ruam. Selain sampel darah, diambil pula sampel urin. Pencarian kasus juga dilakukan pada masyarakat di sekitar penderita sebelumnya yang memiliki risiko dan hubungan riwayat penularan leptospirosis. Selanjutnya sampel darah diperiksa dengan dua metode berbeda yaitu menggunakan *Lepto Tek Lateral Flow* dan metode *Polimerase Chain Reaction (PCR)*. Hasil pengumpulan sampel diperoleh 90 sampel darah dan 90 sampel urin. Ditemukan 4 sampel yang positif mengandung DNA *Leptospira* patogen, dua sampel dari darah (*whole blood*) dan dua sampel dari urin. Sampel yang

menunjukkan hasil positif pemeriksaan PCR pada darah, namun hasil pemeriksaan Lepto Tek-nya negatif, sedangkan sampel positif pemeriksaan PCR pada urin, hasil Lepto Tek-nya positif. Deteksi dini Leptospirosis menggunakan Lepto Tek menunjukkan sensitivitas rendah. Pemeriksaan sampel darah dan urin menggunakan metode PCR dapat mendukung upaya penemuan kasus leptospirosis sejak dini.

Kata Kunci: Leptospirosis, Ponorogo, PCR

Naskah masuk: 9 Maret 2014; Review I: 9 Maret 2015; Review II: 30 Maret 2015; Layak Terbit: 16 Juni 2015

* Alamat korespondensi: anggundjati@gmail.com

PENDAHULUAN

Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang sangat penting, dan ditemukan hampir di seluruh dunia, terutama di belahan bumi beriklim tropis dan subtropis. Penyakit ini dapat berkembang menjadi epidemik di daerah perkotaan maupun pedesaan.¹ Leptospirosis disebabkan oleh *spirochaeta* yang termasuk genus *Leptospira*, dan terdiri lebih dari 250 serovar. Leptospirosis pada manusia biasanya terjadi setelah penderita kontak dengan air tergenang yang terkontaminasi dengan kencing binatang yang terinfeksi, atau mempunyai pekerjaan berhubungan dengan tanah basah yang terkontaminasi dengan *Leptospira*.²

Sepanjang 2010 terdapat 8 provinsi di Indonesia yang melaporkan kasus suspek leptospirosis, diantaranya DKI Jakarta, Jawa Barat, Jawa Timur, DI Yogyakarta, Bengkulu, Kepulauan Riau dan Sulawesi Selatan. Kabupaten Ponorogo merupakan salah satu kabupaten di Provinsi Jawa Timur yang mengalami kejadian leptospirosis sejak tahun 2010.³

Menurut data Dinas Kesehatan Kabupaten Ponorogo, pada tahun 2010 dilaporkan 3 kasus leptospirosis di tiga kecamatan yaitu Kecamatan Siman, Kecamatan Kauman, dan Kecamatan Sawo. Pada tahun 2011 terdapat 19 kasus leptospirosis yang dilanjutkan *screening* menggunakan *Rapid Diagnostic Test* (RDT) terhadap 82 orang yang tinggal di sekitar penderita

dan memiliki gejala menyerupai leptospirosis. Hasil *screening* menunjukkan 10 orang positif leptospirosis. Tahun 2012 sampai dengan bulan Maret terdapat 11 kasus positif leptospirosis di Kecamatan Ngrayun.⁴ Keberadaan tenaga kesehatan yang memahami leptospirosis terutama dari sisi medis dan dukungan laboratorium yang memadai, sangat membantu dalam penemuan kasus leptospirosis.

Leptospirosis di Ponorogo termasuk baru diketahui keberadaannya dan perlu dilakukan upaya penemuan kasus, penelitian tentang faktor risiko potensial dan upaya pengendaliannya. Pada penelitian ini, dilakukan deteksi bakteri *Leptospira* patogen menggunakan teknik *Polimerase Chain Reaction* (PCR) pada tersangka penderita leptospirosis di Kabupaten Ponorogo.

METODE

Dalam penemuan kasus secara aktif di unit pelayanan kesehatan, penduduk yang mengalami demam (suhu badan > 38⁰C) atau demam disertai sakit kepala, nyeri otot, kongjungtivitis dan ruam diambil darah vena-nya menggunakan *syringe needle* sebanyak 2-3 ml. Ukuran *needle* 21 G dan volume *syringe* 3 cc. Selain sampel darah, diambil pula sampel urin. Pencarian kasus juga dilakukan pada masyarakat di sekitar penderita yang memiliki risiko dan hubungan riwayat penularan leptospirosis. Pengambilan sampel darah dan urin dilakukan oleh

tenaga medis Puskesmas setempat (dokter, bidan atau perawat) didampingi oleh tim peneliti. Selanjutnya sampel darah diperiksa dengan dua metode berbeda yaitu menggunakan *Leptotek Lateral Flow* dan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Sampel darah diambil serumnya, dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Serum darah diambil dengan mikropipet sebanyak 10 µl, kemudian ditetaskan pada lubang A di *Lepto Tek Lateral flow*. Selanjutnya lubang B ditetaskan *buffer* sebanyak 5 tetes. Kemudian ditunggu sampai 15 menit dan dibaca hasilnya. Serum darah dinyatakan positif mengandung bakteri *Leptospira*, jika muncul garis merah pada kontrol (C) dan pada garis IgM dan/atau IgG. Bila hanya muncul satu garis merah pada kontrol (C) maka dinyatakan negatif.

Hasil pemeriksaan dengan Leptotek didukung dan diperkuat dengan pemeriksaan PCR di Instalasi Bakteriologi Balai Litbang P2B2 Banjarnegara. Sampel yang diperiksa dengan metode PCR adalah darah

lengkap (*whole blood*) dan urin penderita. Bahan dan alat yang digunakan antara lain sampel darah (*whole blood*), sampel urin, Kit Isolasi DNA, etanol absolut, Kit PCR, primer, tabung PCR, tabung sampel darah vakum yang mengandung EDTA, sarung tangan, mikropipet berbagai ukuran serta tipnya, tabung mikro 1,5 ml steril, sentrifus, *waterbath* dan alat *thermacycler*.

DNA *Leptospira* untuk pemeriksaan PCR diisolasi dari 200 µl sampel darah (*whole blood*) dan sampel urin penderita dengan menggunakan *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche). Isolasi dikerjakan sesuai dengan prosedur yang direkomendasikan dalam manual Kit. Untuk mendeteksi DNA *Leptospira*, digunakan metode *Conventional PCR* dengan menggunakan primer yang didesain oleh Kositanont. Primer PU1, dan LepR1 akan melekat pada *conserved region* dari sekuen 23S rDNA *Leptospira* patogen. Adapun sekuen primer yang digunakan dirangkum dalam Tabel 1.⁵

Tabel 1. Primer untuk pemeriksaan PCR

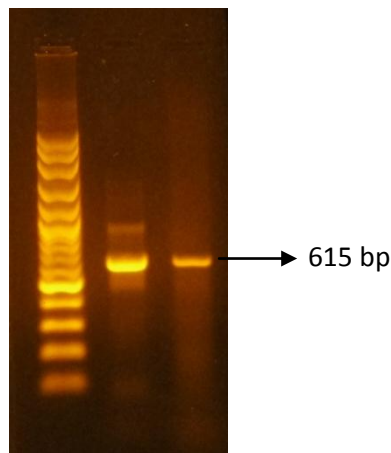
Primer	Sekuen Primer
PU1	5' TATCAGAGCCTTTTAAATGG 3'
LepR1	5' TAGTCCCGATTACATTTTC 3'

Polimerase Chain Reaction dilakukan menggunakan *Dream Taq Green Mastermix* (Fermentas) dengan program sebagai berikut: (i) predenaturasi 1 siklus: 94 °C selama 5 menit; (ii) amplifikasi 35 siklus: 94 °C selama 1 menit, *annealing* 50 °C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 1 menit dan (iii) ekstensi akhir 1 siklus: 72 °C selama 7 menit. Produk PCR dielektrofresis pada *gel agarose* 1,5 % dan 100 bp *ladder* digunakan sebagai marker untuk menganalisis besar produk PCR.

HASIL

Total sebanyak 90 sampel darah diperiksa keberadaan DNA *Leptospira* patogen menggunakan teknik PCR dan Leptotek, sedangkan 90 sampel urin dari penderita yang sama hanya diperiksa dengan teknik PCR. Hasil produk PCR ditampilkan dalam Gambar 1.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa produk PCR memiliki panjang 615 bp, yang sesuai dengan target produk amplifikasi primer PU1 dan LepR1 untuk *Leptospira* patogen.⁵



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Produk PCR yang Positif Mengandung Bakteri *Leptospira* Patogen pada Sampel Urin (*lane 1*) dan Sampel Darah (*lane 2*)

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa ditemukan 4 sampel yang positif mengandung DNA *Leptospira* patogen, dua sampel dari darah (*whole blood*) dan dua sampel dari urin. Sampel positif pemeriksaan PCR pada darah, hasil pemeriksaan leptoteknya negatif, sedangkan sampel positif pemeriksaan PCR pada urin, hasil leptoteknya positif.

Data pemeriksaan Leptotek dari penderita yang positif terinfeksi

Leptospira patogen berdasarkan pemeriksaan PCR ditampilkan dalam Tabel 2.

Pada Tabel 3, terlihat bahwa penderita dengan hasil pemeriksaan PCR positif dari sampel darah, seluruhnya dalam kondisi demam, sedangkan penderita dengan hasil pemeriksaan PCR positif dari sampel urin tidak menunjukkan gejala klinis yang khas.

Tabel 2. Perbandingan hasil pemeriksaan sampel menggunakan PCR dan *Leptotek Lateral Flow*

	PCR	Hasil Lepto Tek	
		Positif (+)	Negatif (-)
Darah	+	0	2
	-	0	88
Urin	+	2	0
	-	0	88

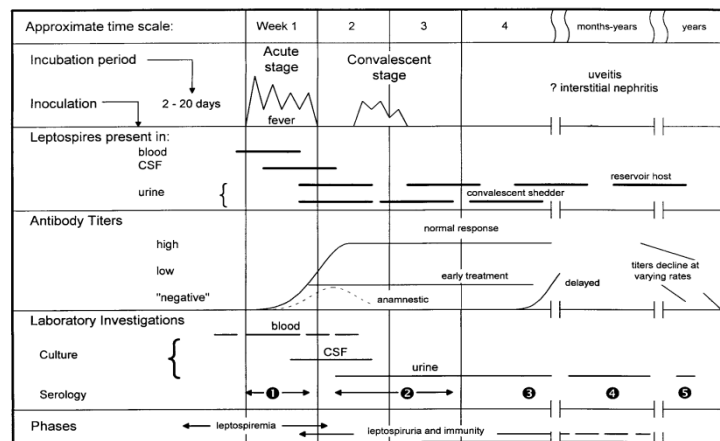
Tabel 3. Gejala klinis penderita leptospirosis dengan hasil pemeriksaan PCR Positif

Sampel Positif PCR	Gejala Klinis			
	Sakit kepala	demam	Mual/muntah	Nyeri otot betis
Darah	1	2	0	0
Urin	0	0	0	0

BAHASAN

Pemeriksaan baku atau standar (*Gold Standard*) untuk diagnosis leptospirosis yang masih diakui sampai saat ini yaitu menggunakan metode *Microscopic Agglutination Test (MAT)*.⁶ Tetapi pemeriksaan ini memiliki kelemahan yaitu hanya mendeteksi

antibodi. Sedangkan riwayat alamiah penyakit leptospirosis menunjukkan bahwa antibodi yang dihasilkan tubuh sebagai sistem kekebalan alami melawan bakteri *Leptospira* spp dihasilkan pada pertengahan minggu pertama. Riwayat alamiah leptospirosis dapat dilihat pada Gambar 2.



Sumber: Levett (2001)

Gambar 2. Riwayat Alamiah Leptospirosis

Leptospira dapat dideteksi pada sampel darah bila penderita sedang mengalami fase bakterimia atau leptospiemia, dimana bakteri *Leptospira* beredar di darah. Fase ini berlangsung selama 10 hari (rentang waktu antara dua sampai 20 hari) sejak bakteri masuk dalam tubuh penderita. Pada fase tersebut bakteri *Leptospira* akan bermultiplikasi di dalam darah dan kemudian menyebar ke berbagai organ.² Penderita leptospirosis pada fase bakterimia yang ditemukan dalam penelitian

ini pemeriksaan leptoteknya menunjukkan hasil negatif. Hal ini disebabkan karena kemungkinan pada fase tersebut antibodi anti *Leptospira* belum terbentuk dalam tubuh penderita. Leptotek yang digunakan dalam penelitian ini mampu mendeteksi keberadaan antibodi anti *Leptospira* baik dari kelas IgM maupun IgG. IgM mulai muncul pada masa awal sakit dan mencapai level yang dapat dideteksi pada kisaran satu minggu pertama. IgG, muncul setelah IgM dan mencapai

puncak titernya setelah beberapa minggu sejak mulai sakit. (Gambar 2)

Kasus yang positif PCR dari sampel darahnya menunjukkan bahwa kasus sedang mengalami fase bakterimia yang kisaran waktunya tidak lebih dari 10 hari sejak bakteri masuk ke dalam tubuh. Pada rentang waktu tersebut, kemungkinan antibodi anti *Leptospira* belum dibentuk oleh tubuh, atau terbentuk namun dalam konsentrasi yang masih sangat rendah sehingga tidak dapat dideteksi. Hal inilah yang kemungkinan menyebabkan hasil pemeriksaan leptotek negatif pada penderita yang positif PCR dari sampel darahnya. Hasil penelitian Wagean⁷ menunjukkan bahwa pemeriksaan leptospirosis menggunakan leptotek lateral flow dapat menghasilkan nilai seroprevalen yang tinggi namun insidensi kasus leptospirosis akutnya rendah. Hal ini dikarenakan antibodi dapat terbentuk pada individu sehat yang berada di sekitar kasus dengan adanya paparan secara berulang oleh sumber penularan.⁷

Penemuan kasus leptospirosis seringkali terlambat. Gejala klinis yang tidak spesifik bahkan spektrumnya dimulai dari tidak bergejala (asimtomatik) hingga menimbulkan gejala berat karena adanya komplikasi dengan penyakit lainnya, menyebabkan leptospirosis masih sulit untuk dapat dideteksi secara dini.

Deteksi penyakit leptospirosis menggunakan metode PCR bukan berdasarkan keberadaan antibodi tetapi berdasarkan keberadaan bakteri secara langsung baik dalam sampel darah, urin, jaringan tubuh tertentu dari penderita maupun hewan reservoir atau bahkan air serta tanah di lingkungan. Metode ini telah banyak dikembangkan dalam berbagai penelitian. Dengan metode PCR, dapat dilakukan deteksi keberadaan bakteri leptospira secara lebih sensitif dan juga lebih cepat. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa sensitivitas dan spesivitas PCR sebesar 80% dan 90%.⁷ Artinya kemampuan PCR untuk memberikan gambaran positif pada orang yang benar-benar sakit rendah, tetapi kemampuan untuk memberikan gambaran negatif bila subyek yang dites adalah bebas dari penyakit, atau persentase hasil negatif, apabila cara uji tersebut dilakukan terhadap orang yang tidak sakit cukup tinggi.

Hasil PCR pada penelitian ini dapat mendeteksi DNA *Leptospira* spesifik spesies patogen. Primer yang digunakan untuk mendeteksi DNA *Leptospira* spesies patogen adalah PU1 dan LepR1 dengan target produk PCR sebesar 615 bp. Sepasang primer tersebut akan melekat pada *conserved region* dari sekuen 23S rDNA *Leptospira* patogen yang tidak dimiliki oleh DNA *Leptospira* saprofit.

Deteksi *Leptospira* pada urin menggunakan metode PCR merupakan salah satu upaya yang tepat untuk penemuan kasus sejak dini.⁹ Kasus yang positif PCR dari sampel urin dalam penelitian ini, hasil pemeriksaan leptoteknya positif. Bakteri *Leptospira*

akan dikeluarkan melalui urin apabila penderita leptospirosis telah memasuki fase imun, yaitu setelah hari ke-10 sejak bakteri memasuki tubuh penderita. Pada fase ini, antibodi dalam tubuh mulai terbentuk, dan titernya telah mencukupi untuk dideteksi menggunakan alat diagnostik untuk deteksi antibodi. Oleh karena itu, pada penderita yang positif PCR dari sampel urinya, hasil pemeriksaan leptoteknya positif. Peluang penemuan sampel urin yang positif sebenarnya lebih besar dibandingkan peluang untuk menemukan sampel darah yang positif menggunakan metode PCR, karena fase leptospiremia hanya berlangsung dalam waktu yang singkat. Sedangkan fase leptospiruria dapat berlangsung dalam waktu yang lebih lama (Gambar 2). Pengumpulan sampel urin juga lebih mudah dibandingkan pengumpulan sampel darah.⁸

Penderita leptospirosis yang terkonfirmasi dengan metode PCR dari sampel darah menunjukkan gejala klinis berupa sakit kepala dan demam (Tabel 2). Demam merupakan gejala dominan yang dialami penderita leptospirosis. Hasil penelitian Dewi, 2010, menunjukkan 86,7% penderita positif Leptotek menderita gejala klinis utama yaitu demam.⁹ Berdasarkan Gambar 2 sebaiknya pengambilan sampel darah dilakukan saat penderita mengalami fase demam sehingga kemungkinan penemuan positif penderita dengan metode PCR menjadi lebih banyak.

Pada penelitian ini penderita yang terkonfirmasi dengan metode PCR dari sampel urin tidak menunjukkan gejala klinis yang khas. Leptospirosis termasuk *self limited disease* pada manusia dengan kondisi kekebalan tubuh yang baik.¹⁰ Namun, pada beberapa penderita, terlebih dengan adanya komplikasi, akan mengalami tingkat keparahan yang semakin tinggi.

Pemeriksaan dengan MAT tetap menjadi *Gold Standard* untuk pendekatan serologi, namun kurang efektif bila digunakan dalam deteksi dini. Demikian juga penggunaan *Leptotek*

lateral flow hanya efektif untuk melihat seroprevalensi leptospirosis di suatu area, namun kurang efektif untuk deteksi di awal waktu sakit. Pemeriksaan PCR dapat menjadi salah satu alternatif metode pemeriksaan yang dapat digunakan untuk deteksi dini. Pemeriksaan PCR juga dapat dilakukan pada fase kronis dengan menggunakan sampel urin.

KESIMPULAN

Deteksi dini Leptospirosis menggunakan Leptotek *lateral flow* menunjukkan sensitivitas rendah. Pemeriksaan sampel darah dan urin menggunakan metode PCR dapat mendukung upaya penemuan kasus sejak dini.

SARAN

Penemuan dini kasus leptospirosis tidak cukup hanya dengan menggunakan Leptotek, tetapi perlu didukung dengan pemeriksaan PCR, sehingga pengobatan segera dapat dilakukan. Pengambilan sampel yang diperiksa berupa darah maupun urin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ucapkan terimakasih kepada Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Ponorogo beserta seluruh stafnya, Kepala Balai Litbang P2B2 Banjarnegara atas ijinnya, dan seluruh rekan-rekan pegawai yang telah membantu pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Vinetz, JM. Leptospirosis. *Current Opinion of Infectious Diseases*. 2001; 14: 527-538.
2. Levett, PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(2): 296–326.
3. DKK Ponorogo. *Data Kasus Penyakit Menular*. 2010.
4. Djati, AP. *Inventarisasi Faktor Risiko Leptospirosis di Kabupaten*

- Ponorogo Tahun 2012 [Laporan Penelitian]. Balai Litbang P2B2 Banjarnegara; 2012.
5. Kositanont, U., Rugsasuk, S., Leelaporn, A., Phulsuksombati, D., Tantitanawat, S., Naigowit, P. *Detection and Differentiation Between Pathogenic And Saprophytic *Leptospira* spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007; 57:117– 122.
6. World Health Organization. *Human Leptospirosis: Guidance For Diagnosis, Surveillance And Control*. WHO; 2003.
7. Wageenar, J.F.P., Falke, T.H.F., Nam, N.V., Binh, T.Q., Smith, H.L., Cobelens, F.G.J., and de Vries, P.J. *Rapid Serological Assay for Leptospirosis are of Limited Value in Southern Vietnam*. *Trop Med and Parasitology*. 2004; 98(8):843-50.
8. Perwez, K., Suman VB., Nayanatara Arun Kumar, N.A., and Hussain, M.A. *Leptospirosis in Febrile Patients: Diagnosis by Serology and Polymerase Chain Reaction*. *Journal of Biology and Life Science*. 2011; 2(1): E2.
9. Bal, AE., Gravekamp, C., Hartskeerl, RA., De Meza-Brewster, J., Korver, H., Terrpstra. *Detection of Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. August 1994; 32(8):1894-1898.
10. Dewi, SK, 2010. *Penyelidikan Kejadian Luar Biasa (KLB) Leptospirosis di Kabupaten Bantul Tahun 2010*. [Laporan Penelitian]. Balai Litbang P2B2 Banjarnegara; 2010.
11. Jones, S and Kim, T. *Fulminant Leptospirosis in a Patient with Human Immunodeficiency Virus Infection: Case Report and Review of the Literature*. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33:E31–3.