

DETEKSI LEPTOSPIRA PATOGENIK PADA URIN ANJING DENGAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) DI KOTA SEMARANG

Dimas Bagus Wicaksono Putro ✉, Ristiyanto, Arief Mulyono, Farida Dwi Handayani, Arum Sih Joharina
Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit
Jl. Hasanudin no. 123 Salatiga, Jawa Tengah, Indonesia
Email: dimasbagus84@gmail.com

DETECTION OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA IN DOGS URINE BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) IN SEMARANG CITY

Naskah masuk : 03 Agustus 2015 Revisi I : 29 September 2015 Revisi II : 19 Desember 2015 Naskah diterima : 7 April 2016

Abstrak

Kota Semarang merupakan salah satu daerah endemis leptospirosis yang memiliki peningkatan kasus antara Tahun 2007-2009. Leptospirosis merupakan zoonosis. Anjing merupakan salah satu hewan penular leptospirosis pada manusia. Penelitian ini bertujuan mendeteksi Leptospira patogen pada Anjing di 16 Kecamatan Kota Semarang, Jawa Tengah yang dilaksanakan bulan Maret- Juli 2012. Penelitian dilakukan dengan mengambil sampel urin anjing dan pemeriksaan PCR menggunakan primer spesifik Leptospira patogenik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa urin yang diperiksa dari 29 ekor anjing menunjukkan positif terdeteksi Leptospira patogenik sebanyak 4 ekor anjing (13,80 %). Anjing yang positif leptospirosis terdapat di Kecamatan Semarang Timur, Semarang Selatan, Candisari, dan Semarang Tengah. Adanya Leptospira patogenik dalam urin anjing berpotensi menularkan leptospirosis pada manusia. Vaksinasi Leptospira pada anjing dapat direkomendasikan untuk pencegahan penularan leptospirosis ke manusia.

Kata Kunci: *Anjing, Leptospirosis, Leptospira patogenik, Polymerase Chain Reaction*

Abstract

Semarang city was one of an endemic area of leptospirosis that had increasing case during 2007-2009. Leptospirosis is a zoonotic. The dog is one of animal that able transmitted leptospirosis to humans. The objectives of this study was to detect pathogenic Leptospira in dogs in 16 Districts of Semarang city, Central Java in March- July 2012. Study was conducted by taking a sample of dog urine and performed PCR using specific primers pathogenic Leptospira. The results showed that 4 dog urine (13.80%) detected positive leptospira pathogenic from 29 dogs urine sample that examined. Dogs were positive leptospirosis were belongs to District East Semarang, South Semarang, Candisari, and Central Semarang. The presence of pathogenic Leptospira in the urine of dogs potentially transmitted leptospirosis to humans. Vaccination of Leptospira in dog for prevention transmitted leptospirosis to human could be recommended.

Keywords: *Dog, Leptospirosis, Pathogenic Leptospira, Polymerase Chain Reaction*

PENDAHULUAN

Leptospirosis merupakan penyakit menular pada hewan dan manusia yang disebabkan oleh bakteri motil dengan genus *Leptospira* (Goldstein, 2010). Penyakit ini ditemukan di seluruh dunia baik pada hewan dan manusia, terutama di daerah tropis atau sub tropis dengan curah hujan yang tinggi. Penyakit infeksi bersifat umum dan terdapat pada berbagai spesies hewan piaraan dan hewan liar terutama tikus. Sumber penularan Leptospirosis pada hewan disebabkan oleh tikus, babi, sapi, kambing, domba, kuda, anjing, kucing (Soeharsono, 2002; Widarso et al., 2008; Ellis, 2015).

Anjing merupakan predator bagi beberapa spesies tikus dan karena kedekatan dengan pemilik memberikan peluang transmisi leptospirosis dari tikus ke manusia (Ellis, 2015). Leptospirosis pada anjing pertama kali ditemukan pada tahun 1899. Sebelum tahun 1960, *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae dan serovar Canicola merupakan penyebab utama kasus leptospirosis pada anjing. Penyakit ini ditandai dengan gejala hepatitis akut atau subakut, gagal ginjal dan sering terjadi diatesis hemoragik akut (Goldstein, 2010). Kejadian leptospirosis pada anjing di Indonesia dalam periode tahun 2002-2004 memiliki rata-rata 24,6% (Kusmiyati et al., 2005).

Infeksi *Leptospira* pada manusia terjadi melalui kontak dengan air, tanah (lumpur), tanaman terkontaminasi urin hewan-hewan penderita leptospirosis. Bakteri *Leptospira* masuk ke dalam tubuh melalui selaput lendir (mukosa) mata, hidung atau kulit yang lecet dan kadang-kadang melalui saluran pencernaan dari makanan yang terkontaminasi oleh urin tikus yang terinfeksi *Leptospira* (Widarso et al., 2008; Soeharsono, 2002). Hewan peliharaan dapat terinfeksi melalui kontak dengan bakteri dalam lingkungan atau terkena hewan yang terinfeksi. Hewan peliharaan mungkin telah minum, berenang, atau berjalan melalui air yang terkontaminasi. Anjing juga dapat menularkan penyakit ini satu sama lain (CDC, 2016; Ellis, 2015).

Kasus leptospirosis di Kota Semarang mengalami peningkatan dari tahun 2007-2009, terjadi penurunan pada tahun 2010 dan 2011. Kasus tertinggi terjadi pada tahun 2009 sebanyak 235 kasus dengan *Case Fatality Rate* (CFR) 5 %. Pada tahun 2011 jumlah kasus mengalami penurunan menjadi 70 kasus namun CFR paling tinggi sebesar 36 %. (Dinkes Propinsi Jawa Tengah, 2009; Dinkes Kota Semarang, 2011).

Diagnosis leptospirosis pada hewan dapat menggunakan uji PCR untuk mendeteksi *Deoxyribonucleic acid* (DNA) *Leptospira* dalam sampel klinis yang berupa darah, urin, cairan serebrospinal dan sampel jaringan. Kelebihan uji ini dapat mengkonfirmasi diagnosis

dalam tahap awal penyakit dimana bakteri mungkin sudah masuk dalam tubuh namun belum membentuk titer antibodi. Metode PCR berguna untuk mendeteksi DNA *Leptospira* pada sampel klinis menggunakan primer berupa sekuen DNA spesifik *Leptospira* (Sykes et al., 2011; WHO, 2003). Saat ini terdapat beberapa target gen dikembangkan untuk deteksi leptospirosis. Beberapa gen tersebut secara universal hadir dalam bakteri *Leptospira*, seperti gen 16S rRNA, atau RRS, SecY, lipL32, Lig A dan lig B yang kemudian lebih efektif untuk diagnosis dini dalam spesimen klinis (Loureiro et al., 2013). Mgone et al., (2005) melakukan pengujian PCR dengan primer spesifik *Leptospira* patogenik menggunakan sampel berupa ginjal tikus dengan menghasilkan produk 330 *base pair* (bp).

Saat ini data kasus leptospirosis pada anjing di Kota Semarang belum dilaporkan termasuk deteksi *Leptospira* patogenik pada urin anjing menggunakan pemeriksaan PCR. Penelitian ini bertujuan mendeteksi *Leptospira* patogenik pada urin anjing. Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi untuk kewaspadaan dini di masyarakat keberadaan anjing terindikasi terinfeksi *Leptospira* patogen.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan sampel dan preparasinya

Penelitian dilakukan pada bulan Maret - Juli 2012 di 16 Kecamatan Kota Semarang dengan sampel berdasarkan total sampling anjing yang ditemukan di dalam wilayah 1 RT dengan kasus leptospirosis tertinggi di setiap kecamatan kota Semarang berdasarkan data dari Dinas Kesehatan Kota Semarang Tahun 2012. Pengambilan sampel urin anjing dilakukan dengan mengusap kapas beralkohol pada lubang saluran kencing dan dilanjutkan palpasi daerah *vesica urinaria* untuk menstimulasi urinasi. Urin yang dikeluarkan di tampung dalam pot steril dan disimpan dalam suhu 2-8 °C sebelum dilakukan analisis lebih lanjut. Analisis hasil dilakukan secara deskriptif.

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan DNA *Purification Kit* (*Promega Corporation, USA*) mengikuti petunjuk protokol manufaktur. Urin anjing sebanyak 300 µl dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml, disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 16000 x g dan disisakan *pellet*. *Pellet* diresuspensi dengan 300 µl *Nuclei Lysis Solution*, divorteks hingga homogen dan diinkubasi 37 °C satu malam. Campuran ditambah 1,5 µl *RNAse* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Campuran ditambahkan dengan 100

µl *Protein Precipitation Solution* dan dicampur hingga homogen dengan vorteks selama 10-20 detik. Campuran disentrifus 13000 x g selama 5 menit pada suhu ruang. Supernatan dimasukkan dalam mikrotub yang berisi 300 µl isopropanol absolut, campuran dibolak-balik hingga homogen dan disentrifus pada kecepatan 13000 x g selama 5 menit pada suhu ruang. Supernatan dibuang dan ditambah 50 µl etanol 70%, campuran dibolak-balik hingga homogen dan disentrifus dengan kecepatan 13000 x g selama 5 menit diulang 2 kali. Selanjutnya etanol dibuang dengan menjaga *pellet* jangan sampai ikut terbuang. *Pellet* diresuspensi dengan 100 µl *DNA Rehydration Solution* dan diinkubasi pada suhu 4 °C satu malam. DNA yang terisolasi disimpan pada suhu 2-8 °C.

Amplifikasi PCR

Ekstrak DNA diamplifikasi menggunakan primer spesifik *Leptospira* patogenik Lepat 1 *Forward*: 5'GAG-TCT-GGG-ATA-ACT-TT-3' dan Lepat 2 *Reverse*: 5'TCA-CAT-CG (CT)-TGC-TTA-TTT-T-3'. Amplifikasi DNA menggunakan mesin C1000 Touch™ Thermal Cycle (*Bio-Rad Laboratories, USA*). Langkah pertama yang dilakukan adalah pembuatan campuran reaksi PCR yang terdiri dari *GoTaq Green*, *Nucleus Free Water Reaksi*. (*Promega Corporation, USA*) *Primer Reverse*, *Forward Primer* (*biogen idec, Singapore, Switzerland*). Campuran reaksi PCR yang sudah jadi dimasukkan ke dalam mesin PCR pada suhu 93 °C selama 3 menit untuk denaturasi awal. Selanjutnya diteruskan denaturasi pada suhu 93 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 48°C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit dengan siklus 35 kali.

Kemudian ditambahkan satu siklus ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit.

Elektroforesis

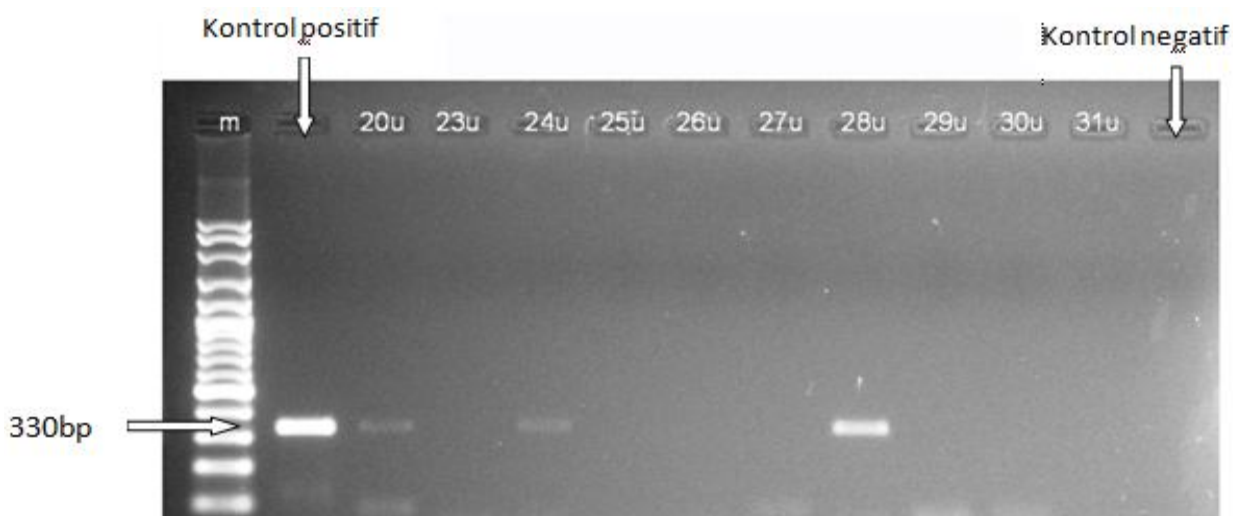
Hasil Produk PCR sebanyak 3 µl dimasukkan dalam sumuran gel agarose 1,5% (1,5 gr/ 100 ml *TAE buffer*) dengan pewarna *ethidium bromide* dan selanjutnya dilakukan *running* sampel yaitu dengan mengalirkan listrik ke *chamber* yang berisi *TAE buffer* dengan tegangan 80 volt dalam waktu 45 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan sinar UV menggunakan Gel Doc™ XR+ System (*Bio-Rad Laboratories, USA*).

Pemetaan lokasi

Pemetaan lokasi anjing dilakukan dengan mencatat titik ordinat rumah yang memelihara anjing dengan *Global Positioning System (GPS)* *Garmin 76csx* (*Garmin.Ltd, USA*). Data lokasi anjing yang positif *Leptospira* patogenik dianalisis menggunakan *software ArcGIS 10*.

HASIL

Dari total 16 kecamatan Kota Semarang yang diskruining terdapat 5 kecamatan tidak ditemukan anjing di sekitar rumah kasus penderita leptospirosis. Total *sampling* anjing yang berhasil terskrining di 11 kecamatan Kota Semarang sebanyak 29 ekor yang ditemukan di sekitar rumah kasus. Hasil pemeriksaan PCR menggunakan primer spesifik *Leptospira* patogenik menunjukkan sebanyak 4 ekor anjing positif dan 25 ekor negatif. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya *band* yang muncul pada 330 bp sesuai target yang diinginkan (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil produk PCR DNA dari urine anjing menggunakan primer *Lepat 1* dan *Lepat 2*. m: marker 100 bp. Kontrol positif (*Leptospira autumnalis*), kontrol negatif (*distilled water*)

Lokasi skrining di beberapa kecamatan dapat dilihat pada Tabel 1. Kecamatan yang memiliki anjing positif leptospirosis yaitu terdapat di Kecamatan Semarang Timur, Semarang Selatan, Candisari, dan Semarang Tengah. Lokasi pemetaan anjing yang positif *Leptospira* patogenik tersajikan pada Gambar 2.

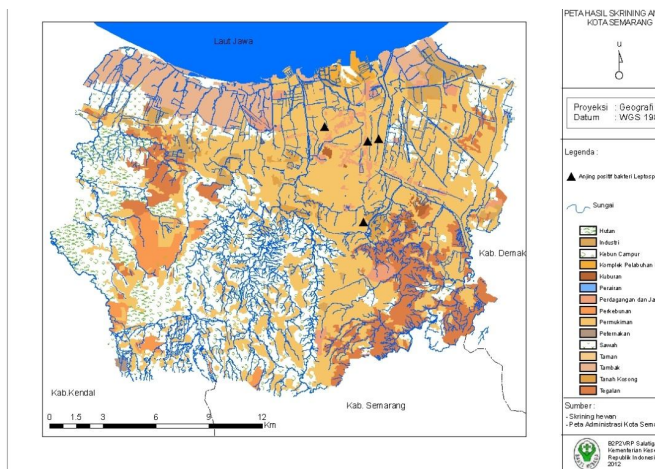
Tabel 1. Hasil deteksi *Leptospira* pada urin anjing di beberapa kecamatan di Kota Semarang Tahun 2012 menggunakan analisis PCR

Kecamatan	Total Sampel	Jumlah Sampel Positif <i>Leptospira</i> (%)
Tembalang	5	0(0)
Pedurungan	2	0(0)
Semarang Selatan	3	1(33,33)
Semarang Barat	3	0(0)
Gajah Mungkur	4	0(0)
Candisari	6	1(16,67)
Semarang Timur	1	1 (100)
Gunungpati	2	0(0)
Mijen	1	0(0)
Semarang Utara	1	0(0)
Semarang Tengah	1	1 (100)
Jumlah total	29	4 (13,80)

plifikasi jumlah minimum mikroorganisme /DNA dalam berbagai jenis sampel (Loureiro et al., 2013). Hasil amplifikasi DNA pada penelitian ini selaras dengan Mgode et al. (2005) menggunakan primer Lepat 1 dan Lepat 2 untuk mendeteksi leptospirosis pada tikus dengan target gen 330 bp. Shukla, Tuteja, & Batra (2003) telah melakukan pengujian terhadap kultur *Leptospira* menggunakan primer 16S rRNA dengan target gen 454 bp dan 631 bp untuk membedakan *Leptospira* patogenik dan tidak patogenik. *Leptospira* patogenik teramplifikasi di 631 bp dan *Leptospira* non patogenik pada 454 bp. Sekuen gen rrs yang menyandi 16S rRNA adalah paling umum digunakan dan dapat diterima untuk mempelajari hubungan genetik (WHO, 2003). Data urutan basa gen penyandi 16S rRNA memungkinkan digunakan untuk membuat pohon filogenetik yang mampu menunjukkan hubungan kekerabatan dan nenek moyang organisme (Pangastuti, 2006).

Urin anjing yang dilakukan pengujian PCR diperoleh hasil positif infeksi *Leptospira* patogenik sebanyak 4 ekor (13,80 %) dari 29 ekor yang diperiksa (Tabel 1). Hasil ini sedikit lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Mutawadiah (2015) yang melaporkan kejadian leptospirosis pada anjing Kintamani di Bali sebesar 18,18 %. Penelitian serupa di Kroasia pada periode tahun 2006-2010 menunjukkan angka kasus leptospirosis pada anjing sebesar 37,7% (Stritof et al., 2012). Sedangkan di Brazil pada tahun 2007-2008 dilakukan pemeriksaan PCR terhadap urin anjing, didapatkan 17 ekor positif leptospirosis dari total 62 ekor yang diperiksa (Oliveira et al., 2010). Rendahnya kejadian leptospirosis anjing pada penelitian ini dibandingkan dengan beberapa studi yang telah dilaporkan bisa dikarenakan jumlah anjing yang didapatkan di sekitar rumah kasus lebih sedikit dan hasil observasi di lapangan kebanyakan anjing yang dipelihara tidak dibiarkan keluar dari halaman rumah sehingga faktor resiko untuk tertular leptospirosis dari lingkungan juga rendah. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Meeyam et al., (2006) di *Chiang Mai University* mengenai faktor resiko leptospirosis pada anjing, diketahui bahwa anjing yang bermain di lingkungan kotor, tinggal di luar rumah, dan konsumsi daging mentah meningkatkan risiko leptospirosis pada anjing.

Pada penelitian ini dilakukan skrining terhadap 29 ekor anjing berasal dari 11 kecamatan di Kota Semarang. Dari total 16 kecamatan yang diskruining ada 5 kecamatan tidak ditemukan anjing di sekitar rumah kasus, yaitu di Kecamatan Ngaliyan, Banyumanik, Gayamsari, Tugu dan Genuk. Hasil pemeriksaan anjing positif *Leptospira* patogenik terdapat di Kecamatan Semarang Timur, Semarang Selatan, Semarang Tengah dan Candisari (Tabel 1) dan (Gambar 2). Pada tahun 2011



Gambar 2. Peta lokasi anjing positif *Leptospira* patogenik di Kota Semarang Tahun 2012

PEMBAHASAN

Deteksi *Leptospira* pada urin anjing dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer Lepat 1 dan Lepat 2 dari gen 16S rRNA yang spesifik untuk *Leptospira* patogen. Besar DNA target untuk leptospira patogen adalah 330 bp. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu metode untuk deteksi leptospira pada hewan. Teknik ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi, sehingga memungkinkan am-

Kecamatan Semarang Selatan merupakan daerah yang memiliki angka kesakitan leptospirosis (IR) $>10/100.000$ penduduk. Angka kesakitan leptospirosis di Kecamatan Semarang Timur, Semarang Tengah dan Candisari berkisar pada 0,1-10/100.000 penduduk (Dinkes Kota Semarang, 2011). Dinas Kesehatan Kota Semarang (2012) melaporkan analisis leptospirosis dimana angka kesakitan di Kecamatan Semarang Timur paling tinggi yaitu 12,34%, sedangkan Kecamatan Semarang Selatan sebesar 7,01%, Candisari 4,99%, dan Semarang Tengah 1,17%. Adanya angka kesakitan di tiap-tiap kecamatan tersebut maka perlu diwaspadai penularan leptospirosis pada manusia oleh anjing yang positif *Leptospira*. Hasil studi leptospirosis pada manusia di Jerman pada tahun 1997-2000 diketahui dari 102 kasus yang terjadi, 11 diantaranya dikarenakan memiliki hewan peliharaan. Berperannya anjing yang diduga sebagai penular leptospirosis didukung oleh hasil survei epidemiologi leptospirosis pada anjing yang dilakukan sejak tahun 1999-2002 diketahui dari 3.671 anjing 29,8% positif leptospirosis (Jansen et al., 2005). Penelitian di Chile dan Zimbabwe menunjukkan anjing positif leptospirosis cukup tinggi berasal dari desa dan daerah perkotaan yang kumuh. Tingginya transmisi leptospirosis pada anjing dikarenakan efek gabungan dari faktor kondisi lingkungan tempat tinggal anjing, ekologi, dan masyarakat sekitar (Dhliwayo et al., 2012; Lelu et al., 2015).

Ditemukannya anjing yang positif terinfeksi *Leptospira* di lokasi penelitian perlu menjadi perhatian untuk potensi penularan leptospirosis pada manusia. Kedekatan hewan kesayangan dengan pemilikinya merupakan faktor pendukung terjadinya penularan. Urin anjing yang positif perlu dipertimbangkan menjadi sumber penularan leptospirosis pada hewan lain dan manusia. *Tubulus* ginjal merupakan target organ *Leptospira* dimana bakteri mampu bertahan lama dan nantinya bakteri ini akan diekskresikan melalui urin (Haake & Levett, 2015; OIE, 2005). *Leptospira* yang dikeluarkan melalui urin akan berenang bebas di air dan akan menginfeksi melalui luka kulit, luka gigitan, dan selaput lendir seperti mata, mulut, alat kelamin. Selain itu penularan dapat terjadi melalui transmisi seksual, plasenta, kotoran, jaringan, tanah, alas tidur yang tercemar dan tanpa sengaja termakan. Anjing yang terinfeksi *Leptospira* dan mampu beradaptasi menyebabkan hewan menjadi reservoir yang secara berkala akan membebaskan *Leptospira* melalui urinnya (Subronto, 2006; Ellis, 2015; Sykes et al., 2011).

Menurut Goldstein (2010) dan Soeharsono (2002) tindakan pencegahan leptospirosis pada anjing dapat dilakukan dengan program vaksinasi yang umum

diberikan mulai umur 3 bulan. Vaksinasi tahunan menggunakan 4 serovar dianjurkan diberikan pada anjing yang tinggal di daerah yang beresiko terinfeksi leptospirosis tanpa membedakan ras anjing (Sykes et al., 2011). Di daerah endemik leptospirosis anjing perlu disuntik 3 kali dengan interval waktu 2-3 minggu. Hasil vaksinasi 3 kali terbukti memberikan kekebalan sampai lebih dari 1 tahun (Subronto, 2006).

Ellis(2015);Soeharsono(2002);danSubronto(2006) menjelaskan bahwa anjing yang terinfeksi leptospirosis perlu mendapatkan pengobatan menggunakan antibiotik spektrum luas seperti tetrasiklin, streptomisin, ampicilin, penisilin, eritromisin dan doksisisiklin untuk memperoleh kesembuhan yang efektif. Penggunaan doksisisiklin dengan dosis 5 mg/kg selama 14 hari dianjurkan untuk pembersihan optimal leptospirosis hingga *tubulus* ginjal (Sykes et al., 2011). Penurunan resiko penularan penyakit ini dapat dilakukan dengan membatasi kontak anjing dengan hewan reservoir lain termasuk tikus, menjaga kebersihan lingkungan dan pemberantasan tikus (Goldstein, 2010; Meeyam et al., 2006).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Persentase anjing yang positif terdeteksi *Leptospira* dengan uji PCR di Kota Semarang sebesar 13,80 %. Empat kecamatan diketahui memiliki anjing positif leptospirosis dari 11 Kecamatan yang diskriming yaitu Kecamatan Semarang Timur, Semarang Selatan, Candisari, dan Semarang Tengah. Adanya *Leptospira* patogenik dalam urin anjing berpotensi menularkan leptospirosis pada manusia.

Saran

Berdasarkan hasil pemeriksaan laboratorium diketahui bahwa beberapa anjing di sekitar rumah kasus penderita leptospirosis positif leptospirosis. Langkah awal pencegahan penularan leptospirosis dari anjing ke manusia yaitu menjaga kebersihan kandang anjing dan lingkungan di sekitarnya. Pemberian vaksin *Leptospira* pada anjing peliharaan dan pemeriksaan rutin ke dokter hewan ketika anjing sakit untuk segera mendapatkan pengobatan sangat direkomendasikan. Selain itu perlu dilakukan koordinasi lintas sektor antara Dinas Kesehatan dengan Dinas Peternakan setempat terkait tindak lanjut pencegahan atau pengobatan kasus leptospirosis pada anjing di daerah kasus leptospirosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Kepala Balai Besar Penelitian Pe-

ngembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga yang telah memberikan ijin dan kesempatan sehingga terlaksananya penelitian ini, Kepala Dinas Kesehatan Kota Semarang dan staf yang telah mengizinkan dan membantu dalam penelitian, Tim B2P2VRP Salatiga dan semua pihak yang sudah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Centers for Disease Control and Prevention, 2016. Leptospirosis. Available at: <http://www.cdc.gov/leptospirosis/index.html> [Accessed February 14, 2016].
- Dhliwayo S, Matope G, Marabini L, Dutlow K & Pfukenyi DM, 2012. Seroprevalence of leptospirosis in dogs in urban Harare and selected rural communities in Zimbabwe. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 79(1), pp.E1–6.
- Dinkes Kota Semarang, 2012. *Analisis Leptospirosis Desiminasi Hasil Kesehatan*, Semarang: Dinkes Kota Semarang.
- Dinkes Kota Semarang, 2011. *Profil Kesehatan Kota Semarang 2011*, Semarang: Dinkes Kota Semarang.
- Dinkes Propinsi Jawa Tengah, 2009. *Visualisasi Data Kesehatan*, Semarang: Dinkes Propinsi Jawa Tengah.
- Ellis WA, 2015. Animal Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, pp.99–137.
- Goldstein RE, 2010. Canine Leptospirosis. *Vet Clin Small Anim*, 40(6), pp.1091–1101.
- Haake DA & Levett PN, 2015. Leptospirosis in Humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387.
- Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T & Stark K, 2005. Leptospirosis in Germany, 1962–2003. *Emerg Infect Dis*, 11(7), pp.1048–1054.
- Kusmiyati, Noor SM & Supar, 2005. Leptospirosis pada hewan dan manusia di Indonesia. *Wartazoa*, 15(4), pp.213–220.
- Lelu M, Muñoz-zanzi C, Higgins B & Galloway R, 2015. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Rios Region, Chile Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Rios Region, Chile. *BioMed Central*, 11(31), pp.1–8.
- Loureiro AP, Martins G, Thomé S & Lilenbaum W, 2013. Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis * Diagnóstico laboratorial de leptospirose animal. *R. bras. Ci. Vet.*, 20(3), pp.119–126.
- Meeyam T, Tablerk P, Petchanok B & Pichpol D, 2006. SEROPREVALENCE AND RISK FACTORS ASSOCIATED WITH. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 37(1), pp.148–153.
- Mgode GF, Mhamphi G, Katakweba A, Paemelaere E, Willekens N, Leirs H, et al., 2005. Pcr detection of Leptospira DNA in rodents and insectivores from Tanzania. *Belg. J. Zool*, 135(supplement), pp.17–19.
- Mutawadiah, 2015. *Seroprevalensi leptospirosis pada anjing kintamani di Bali*. Tesis Program Magister program Studi Kedokteran Hewan Program Pascasarjana Universitas Udayana Denpasar.
- OIE, 2005. Leptospirosis. An OIE Collaborating Center Iowa State University College of Veterinary Medicine.
- Oliveira ST, Messick JB, Biondo AW, Santos AP, Márcia A, Guimarães DS, et al., 2010. Serum and Urinary C-Reactive Protein Concentrations in Dogs with Leptospirosis. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38(3), pp.245–249.
- Pangastuti A, 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*, 7(3), pp.292–296.
- Shukla J, Tuteja U & Batra H V, 2003. 16s rRNA PCR For Differentiation Of Pathogenic And Non Pathogenic Leptospira Isolates. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 21(1), pp.25–30.
- Soeharsono, 2002. *Zoonosis Penyakit Menular dari Hewan ke Manusia*, Yogyakarta: Kanisius.
- Stritof Z, Habus J, Milas Z, Moj V, Staresina V & Turk N, 2012. Serological survey of canine leptospirosis in Croatia - the changing epizootiology of the disease. *Veterinarski Arhiv*, 82(2), pp.183–191.
- Subronto, 2006. *Penyakit Infeksi Parasit dan Mikroba pada Anjing dan Kucing*, Yogyakarta: UGM Press.
- Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA & Goldstein RE, 2011. ACVIM Consensus Statement On Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J Vet Intern Med*, 25, pp.1–13.
- WHO, 2003. *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis Surveillance and Control*, Malta: WHO.
- Widarso H., Gasem M, Purba W, Suharso T & Ganefa S, 2008. *Pedoman Diagnosa dan Penataan Kasus Penanggulangan Leptospirosis di Indonesia*, Jakarta: Sub Direktorat Zoonosis Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan.