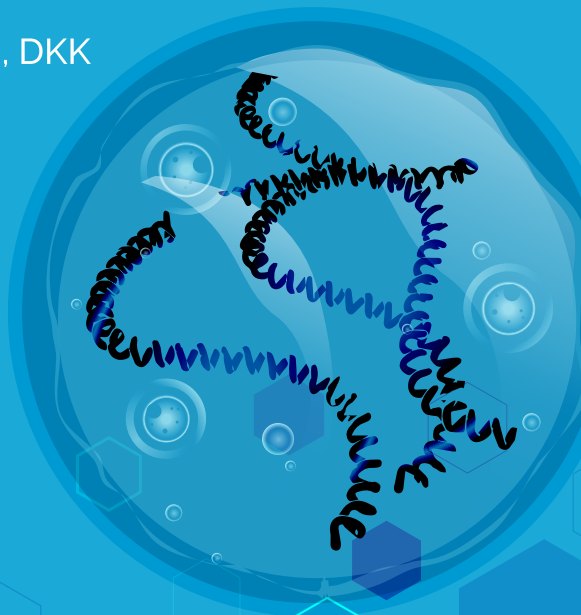
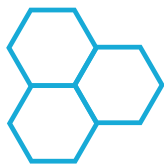


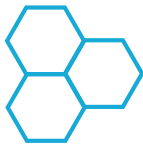
DIAGNOSIS LABORATORIS **LEPTOSPIROSIS**

FARIDA DWI HANDAYANI, DKK





DIAGNOSIS LABORATORIS
LEPTOSPIROSIS



DIAGNOSIS LABORATORIS **LEPTOSPIROSIS**

Pengarah

Kepala Badan Litbang Kesehatan
Sekretaris Badan Litbang Kesehatan

Tim Penyusun

Farida Dwi Handayani, Ristiyanto, Arum Sih Joharina
Esti Rahardiningtyas, Arief Mulyono, Dimas Bagus

Penelaah (Pengulas)

Prof. Dr. Hussein Gassem, Ph.D, Sp.PD-KPTI
Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes

Ilustrator

Restu Khoirul Saban
Wakhidah Kurniawati

Kontributor

Restu Khoirul S., Aprilia Safitri Nurhidayati,
Wakhidah Kurniawati Waheni Rizki A



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN | 2019

© BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN KEMENTERIAN KESEHATAN RI

Jl. Hasanudin No.123, PO Box 200 Salatiga, 50721

Telp. 0298 327096, Fax 0298 322604

Email: b2p2vrp@litbang.depkes.go.id; Website: b2p2vrp.litbang.depkes.go.id

Diagnosis Laboratoris Leptospirosis

@2019 oleh Farida Handayani, dkk.

Hak Cipta yang dilindungi Undang-undang ada pada penulis.

Hak Penerbitan yang dilindungi Undang-undang ada pada Lembaga Penerbit
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (LPB)

Dilarang mengutip dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin
tertulis dari Penerbit

Diterbitkan oleh Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (LPB)

Anggota IKAPI No. 468/DKI/XI/2013

Jalan Percetakan Negara No. 23, Jakarta 10560

Telp. (021) 4261088, ext. 222, 223. Faks. (021) 4243933

Email :LPB@litbang.depkes.go.id; website : www.litbang.depkes.go.id

Didistribusikan oleh

Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (LPB)

Katalog Dalam Terbitan

WC 420

Farida Handayani

d Diagnosis Laboratoris Leptospirosis/ Farida Handayani,

Jakarta : Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2019.

ix, 55p. : ilus.; 21 cm.

ISBN 978-602-373-1602

1. JUDUL I. LEPTOSPIROSIS
II. LABORATORIES

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	v
KATA PENGANTAR KABADAN LITBANGKES	vi
KATA PENGANTAR KEPALA B2P2VRP	vii
PRAKATA	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Infeksi Leptospirosis	3
B. Laboratorium Leptospirosis	3
C. Metode Diagnostik/Pemeriksaan	4
D. Leptospira	7
E. Kultur Media	9
F. Klasifikasi <i>Leptospira</i>	11
BAB II. PROSEDUR PENGAMBILAN SAMPEL	17
A. Prosedur Pengambilan Sampel dari Manusia	17
B. Prosedur Pengambilan Sampel Tikus	20
1. Prosedur Pengambilan Darah Tikus dan Koleksi Serum	20
2. Prosedur Pengambilan Ginjal Tikus	22
BAB III. PROSEDUR PEMERIKSAAN	27
A. Deteksi Antibodi Leptospira dengan MAT	29
B. Pemeriksaan Molekuler	32
1. Ekstraksi DNA	32
2. Amplifikasi DNA	38
2.1 PCR Konvensional	39
2.2 Real Time PCR	44
3. Sequencing DNA	47
DAFTAR PUSTAKA	53

Kata Pengantar



Puji syukur kepada Allah Swt. dan apresiasi atas selesainya pembuatan buku saku *Diagnosis Laboratoris Leptospirosis*. Buku saku ini merupakan produk para peneliti dan teknisi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) yang menekuni leptospirosis, dalam aspek epidemiologi, pemeriksaan laboratoris dan penanggulangan.

Buku ini menjabarkan tata cara memilih sampel klinis dan metode yang tepat untuk pemeriksaan leptospirosis di laboratorium. Secara spesifik, buku ini berisi penjelasan singkat langkah-langkah teknis dan metode pemeriksaan leptospirosis di laboratorium.

Naskah buku “Diagnosis Laboratoris Leptospirosis” ini telah dikaji mendalam dan mungkin masih tetap ada hal yang masih perlu disempurnakan. Teknologi pemeriksaan laboratoris dituntut lebih efektif, efisien, dan akurat. Oleh karena itu, perlu adanya buku *Diagnosis Laboratoris Leptospirosis* untuk menunjang hasil pemeriksaan klinis dan lingkungan. Buku ini berisi proses pengambilan sampel, rantai dingin hingga pemeriksaan di laboratorium untuk konfirmasi/diagnosis leptospirosis.

Dengan terbitnya buku ini dapat dilakukan deteksi dini dalam upaya pengendalian dan pencegahan kejadian luar biasa leptospirosis. Kami berharap buku ini dapat bermanfaat bagi program laboratorium, peneliti, dan pengguna lainnya untuk konfirmasi/diagnosis Leptospira.

Terima kasih.

Jakarta, Maret 2019
Kepala Badan Litbangkes

dr. Siswanto, M.H.P., DTM
NIP 196005271988031001

Kata Pengantar



Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) merupakan Unit Pelaksana Teknis Badan Litbangkes khusus di bidang penelitian dan pengembangan metode pengendalian penyakit tular vektor dan reservoir (zoonosis) diantaranya leptospirosis.

Pemeriksaan leptospirosis yang dilakukan di B2P2VRP meliputi pemeriksaan *gold standard*, yaitu *Microscopic Agglutination Test* (MAT); kultur bakteri; dan biologi molekuler dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional maupun *real time* serta *sequencing* DNA. Pemeriksaan dilaksanakan berdasarkan kaidah ilmiah dan *biosafety and biosecurity* baku.

USAID melalui program penelitian PEER Health telah memberikan kepercayaan kepada kami untuk melakukan penelitian alat deteksi cepat dan dini leptospirosis dengan judul: “*Development of an Antigen-Capture Immunoassay for Rapid Diagnosis of Acute Leptospirosis*” berkolaborasi dengan Prof. dr M. Hussein Gasem, Ph.D, Sp.PD, K-PTI dari RS dr. Kariadi dan David Aucoin, Ph.D *Associate Professor* dari University of Nevada Reno, US.

B2P2VRP juga memiliki instalasi Proteomik di bawah Laboratorium Mikrobiologi untuk mengkarakterisasi *leptospirosis* dengan metode *Pulse Field Gel Elctrophoresis* (PFGE). Semoga buku ini bermanfaat sebagai pedoman di laboratorium untuk konfirmasi atau diagnosis *leptospirosis*.

Terima kasih.

Salatiga, Maret 2019
Kepala B2P2VRP

Joko Waluyo, S.T., M.Sc., PH.
NIP 196110211986031002

Prakata



Alhamdulillah Rabbil'alamiin, puji syukur kepada Allah Swt., Buku Diagnosis Laboratoris Leptospirosis telah selesai disusun. Buku saku ini merupakan hasil kerja rekan-rekan peneliti dan teknisi di B2P2VRP yang melakukan penelitian leptospirosis sejak 2004. Pengembangan laboratorium deteksi Leptospirosis diawali pada tahun 2011 dengan pendampingan dari *WHO Colaborating Centre for Leptospirosis*, *Indian Council of Medical Research (ICMR)* Port Blair, Andaman India. Penelitian hibah PEER Health dari USAID, dengan judul “Development of an Antigen-Capture Immunoassay for Rapid Diagnosis of Acute Leptospirosis”, bekerjasama dengan University of Nevada Reno (UNR) Amerika, juga telah berkontribusi dalam proses pengembangan laboratorium pemeriksaan leptospirosis di B2P2VRP.

Kami ucapkan terima kasih kepada Kepala Badan Litbangkes atas nasihat dan dukungan yang amat berharga dan Kepala B2P2VRP yang telah memberikan fasilitas dan dukungan sehingga pelaksanaan penelitian dan penyusunan buku saku Diagnosis Laboratoris Leptospirosis terwujud. Tak lupa kami ucapkan terima kasih kepada Prof. M. Hussein Gasem atas bimbingannya dan Prof. M. Sudomo yang telah memberikan masukan dalam penyusunan buku, Dr. Trihono yang telah memberikan wawasan tentang program kebijakan pengendalian penyakit tular vektor dan zoonosis, serta bapak ibu peneliti dan teknisi khususnya di laboratorium Reservoir dan laboratorium Mikrobiologi yang telah mendukung. Terima kasih atas kerja keras Tim PEER Health di laboratorium. Tak lupa semangat yang dicontohkan alm. Astri Maharani, rekan sejawat yang telah tenang di sisi Allah Swt.

Last but not least, ucapan terima kasih kami kepada orang tua dan keluarga kami yang senantiasa mendoakan dan mendukung

tanpa lelah. Tak lupa akhirnya kami ucapkan terima kasih kepada USAID yang telah mendukung melalui penelitian PEER Health sehingga kemampuan kami makin terasah, terutama dalam pemeriksaan *Leptospirosis* di laboratorium. Semoga Allah SWT memberikan kemudahan dalam melaksanakan tugas penelitian demi kemajuan dan kemandirian bangsa.

Salatiga, Maret 2019

Farida Dwi Handayani, S,Si, MS
NIP. 197809032003122001



BAB. I

Pendahuluan



BAB I

Pendahuluan

Leptospirosis merupakan infeksi zoonosis umum di dunia yang disebabkan oleh *Leptospira sp.* bakteri Gram-negatif golongan *Spirochaeta*. *Leptospira* digolongkan menjadi dua kelompok yaitu golongan patogen dan non-patogen. Tikus adalah reservoir utama dan bakteri ini dipelihara secara alami dalam *tubulus* ginjal dan dikeluarkan melalui urin. Leptospirosis berat (dikenal sebagai sindrom Weil) dengan gambaran klinis ikterus, gangguan fungsi ginjal, dan manifestasi perdarahan diidentifikasi oleh Adolf Weil pada tahun 1886.

Wabah leptospirosis telah dilaporkan di seluruh dunia antara lain di India, Indonesia, Malaysia, Sri Lanka, Thailand, Eropa, Afrika, Amerika Utara dan Selatan. Kejadian ini mengklasifikasi *leptospirosis* sebagai penyakit menular yang muncul kembali (*re-emerging disease*).

Manifestasi klinis leptospirosis mirip penyakit infeksi lain, seperti demam *dengue*, malaria dan penyakit demam akut (*acute febrile illness*) lain sehingga menyebabkan misdiagnosis. Gejala leptospirosis bervariasi, mulai sindrom flu sampai penyakit Weil yang sering menyebabkan kematian.

Masa inkubasi biasanya 7 – 14 hari berkisar antara 2 – 21 hari. Ciri khas leptospirosis adalah penyakit biphasic.

Fase sistemik merupakan fase pertama yang ditandai dengan infeksi sistemik akut yaitu ditemukannya *Leptospira* dalam darah (*leptospiremia*) dan cairan serebrospinal. Fase ini biasanya terjadi selama 4 – 7 hari diikuti oleh 1 – 3 hari periode asimtomatik. Fase kedua atau fase imun ditandai dengan demam dan ditemukannya *Leptospira* dalam urin (*leptospiruria*).

Ikterus adalah tanda klinik penting leptospirosis berat. Ikterus biasanya terjadi mulai hari keempat hingga kesembilan infeksi. Selain itu, pendarahan paru dapat muncul pada minggu kedua merupakan bentuk paling parah dari leptospirosis ikterik. Infeksi *Leptospira* juga dapat menimbulkan gejala meningitis dengan demam, sakit kepala dan fotofobia, tetapi tidak fatal. Pengobatan leptospirosis dengan antibiotik pilihan *Doxycycline* diberikan 200 mg per hari per oral, selama 7 – 10 hari untuk dewasa, sedangkan injeksi seftriakson diberikan untuk leptospirosis berat. Pilihan antibiotik lain adalah ampicilin atau amoksisilin 4 kali/ hari, 500 mg / dosis, selama 7 – 10 hari.

Diagnosis leptospirosis secara klinis sulit dan diagnosis laboratorium membutuhkan peralatan khusus dan kemampuan tenaga yang terlatih. Uji laboratorium, termasuk isolasi bakteri, pemeriksaan molekuler DNA dan serologi *Micro Agglutination Test* (MAT), masih terbatas pada laboratorium yang mampu mengembangkan atau mengkultur sejumlah panel serovar leptospira. Pemeriksaan molekuler DNA dengan metode PCR pada sampel darah

atau urin dapat mendeteksi *Leptospira*. Laboratorium Bakteriologi B2P2VRP juga mengembangkan metode *immunoassays* dan biologi molekuler untuk konfirmasi atau diagnosis leptospirosis. Pada buku saku ini disajikan beberapa metode untuk mendeteksi *Leptospira* di laboratorium dan diharapkan dapat menjadi acuan bagi laboratorium lain.

A. Infeksi Leptospirosis

Di Indonesia, leptospirosis merupakan fenomena *the tip of iceberg* yang kenyataannya leptospirosis meningkat tetapi terjadi *misdiagnosis*, *under-diagnosis* dan *under-reported* di pelayanan kesehatan.

Baik manusia maupun inang (*host*) lain merespons infeksi *Leptospira* dengan memproduksi antibodi spesifik *anti-Leptospira*. Serokonversi dapat terjadi paling cepat 5 – 7 hari setelah onset penyakit, tetapi kadang-kadang setelah 10 hari atau bahkan lebih lama lagi. Antibodi IgM muncul sesaat sebelum antibodi IgG, umumnya IgG ini masih dapat terdeteksi bulanan bahkan bertahun-tahun tetapi dengan titer yang rendah.

B. Laboratorium Leptospirosis

Fasilitas yang dibutuhkan oleh laboratorium diagnostik untuk leptospirosis pada dasarnya sama dengan mikrobiologi diagnostik, yaitu dalam hal peralatan, staf teknis dan pelatihan, praktik laboratorium yang aman dengan mengedepankan *biosafety* dan *biosecurity*.

Fungsi laboratorium terkait dengan pemeriksaan leptospirosis adalah sebagai berikut:

1. Mengonfirmasi diagnosis

Diagnosis leptospirosis sulit ditegakkan karena secara klinis mirip dengan penyakit infeksi endemis di Indonesia. antara lain infeksi virus *dengue*, demam tifoid atau hepatitis akut. Pemeriksaan laboratorium dapat mengonfirmasi kasus leptospirosis.

2. Kepentingan epidemiologis dan kesehatan masyarakat

Pada kejadian penyakit penting diketahui etiologi infeksi, etiologi penyakit, jenis serovar, serta potensi reservoir (hewan pembawa) untuk melihat keterkaitannya. Data epidemiologi tersebut menjadi panduan strategi pengendalian penyakit bagi program.

C. Metode Diagnostik/Pemeriksaan

Diagnosis laboratorium leptospirosis dapat dilakukan dengan mendeteksi antibodi untuk keterpaparannya yaitu menggunakan tes deteksi cepat (*rapid diagnostic test* /RDT) atau metode *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Teknik diagnosis laboratorium lain dapat dilakukan dengan mengisolasi dan mengembangbiakkan bakteri dari darah, urin atau jaringan. Imunofluoresen dapat digunakan untuk mendeteksi leptospira pada jaringan. Pewarnaan umum yang digunakan untuk deteksi *Leptospira* adalah pewarnaan perak (*silver staining*) Metode terkini yang sering digunakan adalah metode berbasis DNA yang disebut *Polimerase Chain*

Reaction atau biasa dikenal dengan nama PCR. Metode PCR terbagi menjadi dua, yaitu metode PCR konvensional (*end-point PCR*) dan *real-time PCR (qPCR)*. Sampel klinis yang dikumpulkan untuk pemeriksaan sangat menentukan metode pemeriksaan. Keadaan ini tergantung pada fase infeksi. *Leptospira* biasanya beredar di dalam darah pasien selama sekitar 10 hari setelah onset penyakit. Bakteri juga muncul dan dijumpai pada cairan tubuh lainnya, seperti urine dan cairan serebrospinal beberapa hari setelah onset penyakit. Titer antibodi yang dapat dideteksi muncul dalam darah sekitar 5 – 10 hari setelah onset penyakit, tetapi kadang kala lebih dari waktu tersebut bila antibiotik diberikan.

Skrining leptospirosis di laboratorium diawali dengan pengambilan sampel untuk bahan uji. Sampel yang sering dikumpulkan adalah sebagai berikut:

1. Darah segar dengan EDTA untuk kultur dan PCR

Darah segar dengan EDTA dapat digunakan untuk kultur dalam 10 hari pertama. Kultur darah lebih dari 10 hari setelah onset penyakit biasanya sulit mendapatkannya karena bakteri *Leptospira* sebagian besar telah hilang dari darah. Sampel untuk kultur harus disimpan pada suhu ruang, karena suhu rendah atau dingin akan merugikan *leptospira* patogen. Darah segar dengan EDTA ini juga dapat digunakan untuk pemeriksaan antigen dengan metode PCR. Penyimpanan dan transportasi harus terjaga pada kondisi antara suhu -20°C sampai 4°C.

2. Serum untuk serologi

Deteksi antibodi menjadi harapan pemeriksaan serum. Sebaiknya serum dikumpulkan dua kali dengan selang waktu beberapa hari (biasanya 1 sampai 2 minggu) berdasarkan tanggal dimulainya penyakit (onset) dan kemungkinan waktu terjadinya serokonversi. Pengujian serum ulang ini diperlukan untuk mengukur kenaikan titer antara dua sampel (serokonversi), untuk mengonfirmasi diagnosis leptospirosis. Hasil serologis negatif pada fase awal penyakit tidak berarti bahwa pasien tersebut tidak terinfeksi leptospirosis. Kenaikan titer serokonversi 4 kali dapat menyatakan pasien mengalami infeksi *Leptospira*.

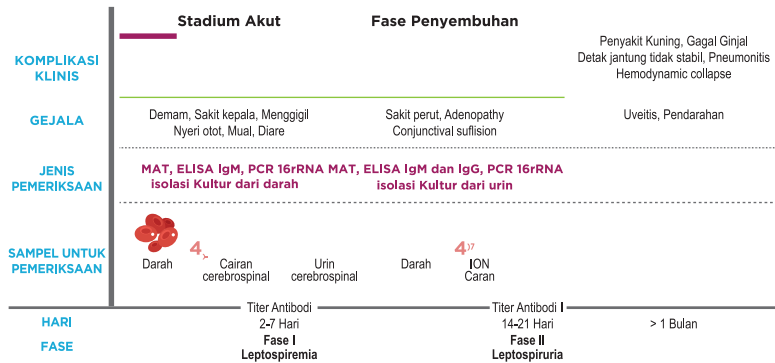
3. Urin untuk kultur dan PCR

Leptospira mati dengan cepat dalam urine. Penggunaan urine untuk kultur harus dapat diperoleh dan diinokulasi ke dalam medium kultur sesuai dengan tidak lebih dari 2 jam setelah urin dikumpulkan. Kelangsungan hidup *leptospira* dalam urine yang bersifat asam dapat ditingkatkan dengan membuatnya netral. Sampel urine untuk pemeriksaan PCR segera diisolasi DNANYa dan disimpan dalam -20°C.

4. Sampel ginjal untuk kultur dan PCR

Leptospira hidup subur dan terpelihara di dalam ginjal hewan reservoir. Tikus merupakan hewan pembawa atau *reservoir* utama leptospirosis. Upaya mengetahui

keberadaan *Leptospira* dan jenis serovar bersirkulasi di lingkungan dapat dilakukan dengan surveilans tikus dan mendeteksi bakteri *Leptospira* pada tikus.



Gambar I .Tahapan leptospirosis dan pemilihan koleksi sampel (Natarajaseenivasan, 2010).

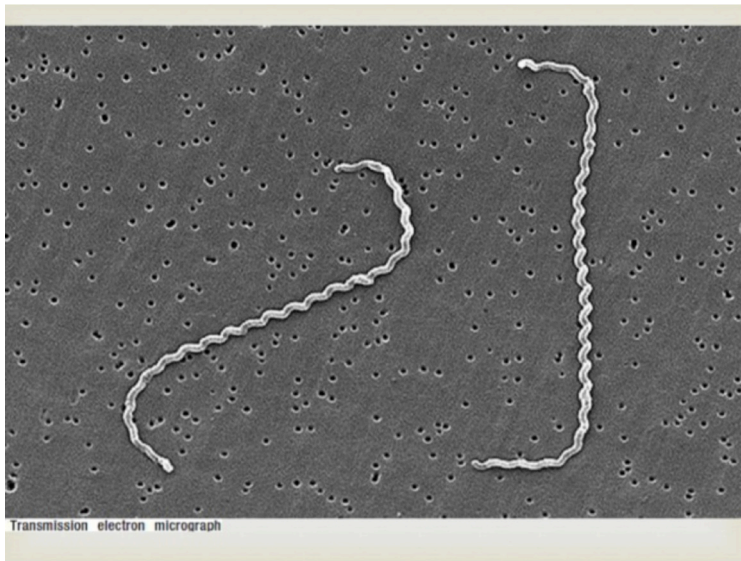
D. *Leptospira*

Leptospira adalah bakteri helik yang fleksibel dan bergerak aktif. Pergerakannya berotasi atau berputar pada sumbu longitudinal. *Leptospira* juga bergerak fleksi dan ekstensi. Fleksi adalah gerakan menekuk atau membengkok, sedangkan ekstensi adalah gerakan meluruskan. Rotasi atau berputarnya bergantian antara dua ujungnya. Ujung *Leptospira* berbentuk lengkung atau seperti mata pancing.

Bakteri ini tidak bisa dilihat dengan mikroskop cahaya biasa, tetapi harus dengan mikroskop medan gelap atau *Dark Field Microscope* (DFM). Demikian pula dengan pewarnaan, *Leptospira* tidak bisa diwarnai dengan pewarnaan Giemsa,

seperti halnya bakteri Gram negatif lain, tetapi harus menggunakan pewarnaan silver atau perak.

Ukuran bakteri sangat kecil, panjang berkisar antara 6-20 μm dan ketebalan hanya sekitar 0,1 μm . Dengan perbesaran yang rendah (200x) di bawah DFM, *Leptospira* terlihat hanya seperti serpihan dengan ujung lengkungnya terlihat seperti titik atau bulatan berwarna terang. Akan tetapi dengan perbesaran 1000x, lengkungan (hook) pada ujung baru bisa terlihat jelas.



Gambar 2. Bakteri *Leptospira* dengan perbesaran menggunakan mikroskop elektron

Leptospira merupakan bakteri aerob dan membutuhkan rantai panjang *fatty acid* sebagai sumber energi dan karbon. *Fatty acid* bebas akan menjadi racun bagi *Leptospira*, oleh karena

itu albumin dibutuhkan untuk mengikat *fatty acid* bebas di media. Selain itu, vitamin B1, vitamin B12, dan garam ammonium juga dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri ini. Terkait pengaruh antibiotik, *Leptospira* resisten terhadap 5-fluoro urasil. Sehingga antibiotik tersebut biasa ditambahkan pada media basal untuk mengurangi kontaminasi, demikian pula pada saat isolasi *Leptospira*.

Bakteri ini hidup pada pH 7-8, dan optimal tumbuh pada suhu 28-30°C. Untuk membedakan antara *Leptospira* pathogen dengan *Leptospira* non pathogen, dapat diinkubasi pada suhu 13 °C. *Leptospira* pathogenik tidak bisa hidup pada suhu 13 °C. *Leptospira* akan beregenerasi setiap 7-12 jam pada suhu 30 °C dan akan mencapai kepadatan $1-2 \times 10^8$ sel/ml selama 7-10 hari inkubasi. Kepadatan $1-2 \times 10^8$ sel/ml merupakan kepadatan optimum untuk melaksanakan uji *gold standard Microscopic Agglutination Test* (MAT).

Bakteri penyebab leptospirosis ini dapat bertahan hidup selama beberapa hari bahkan bulan di tanah lembab atau basah dengan pH netral atau sedikit basa. Pada air payau atau bersalinitas tinggi, kemampuan hidup *Leptospira* pathogen hanya bertahan beberapa jam.

E. Kultur Media

Beberapa media kultur yang biasa digunakan untuk pertumbuhan *Leptospira* adalah:

a. Media yang mengandung serum kelinci.

Termasuk dalam kelompok ini adalah media Korthof, media Fletcher, dan media Stuart. Serum kelinci mengandung nutrisi termasuk konsentrasi tinggi vitamin B12 yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Leptospira*. Media-media tersebut dapat digunakan untuk mengisolasi *Leptospira* pathogen dari spesimen klinis (pasien) dan untuk pengembangbiakkan kultur *Leptospira*. Akan tetapi, media ini tidak diperuntukkan ketika mempersiapkan bakteri untuk MAT.

b. Media yang mengandung rantai panjang *fatty acid*.

Media ini menggunakan rantai Panjang *fatty acid* untuk sumber nutrisi dan serum albumin untuk bahan detoksikan. Media ini umumnya dikenal sebagai Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). Media ini umumnya digunakan untuk isolasi, perbanyakan dan persiapan antigen untuk MAT serta penumbuhan *Leptospira* dalam jumlah besar.

c. Media bebas protein.

Media ini menggunakan pula rantai panjang *fatty acid*, akan tetapi bahan detoksikannya menggunakan charcoal atau arang aktif. Arang aktif ini digunakan untuk menangkap *fatty acid* bebas di media yang sangat toksik atau beracun untuk kelangsungan hidup *Leptospira*.

Media kultur dapat diperkaya dengan menambahkan 1% serum Fetal bovine serum (FBS) atau serum kelinci untuk dapat menumbuhkan *Leptospira* yang banyak. Media kultur selektif, yang mengandung antibiotik 5-fluoro urasil 50-1000 µg/ml atau kombinasi dari *nalidixic acid* 50 µg/ml, *vancomycin* 10µg/ml dan *polymyxin B sulphate* 5 unit/ml. Selain itu untuk mengurangi kontaminasi, dapat digunakan kombinasi antara *actidione* 100 µg/ml, *bacitracin* 40 µg/ml, 5 FU 250 µg/ml, *neomycin sulphate* 2 µg/ml, *polymyxin B sulphate* 0,2 µg/ml dan *rifampicin* 10 µg/ml.

Media cair dapat dibuat menjadi semi-solid dengan cara menambahkan agar atau agarose sebanyak 0,1-0,2%. Media cair banyak digunakan untuk rutin perbanyakan dan pengujian, sedangkan media semi-solid digunakan ketika isolasi *Leptospira* dan perbanyakannya. Pada media semi-solid, subkultur hasil isolasi akan terlihat pada permukaan media setelah diinkubasi selama 7-21 hari. Sedangkan untuk menyimpan kultur bakteri dalam jangka waktu lama, dan memisahkan koloni *leptospira* pada saat penelitian, media solid dapat digunakan, dengan menambahkan 0,8-1% agar ke dalam media.

F. Klasifikasi *Leptospira*

Genus *Leptospira*, *Leptonema*, dan *Turneria* adalah dari satu Famili yaitu *Leptospiraceae*. Famili *Leptospiraceae* dan

Spirochaetaceae (genus: *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Borrelia* dan *Treponema*) termasuk dalam *Ordo Spirochaetales*.

Klasifikasi dan nomenklatur *Leptospira* sangat kompleks. Saat ini ada dua pendekatan dan sistem dalam mengklasifikasi bakteri ini. Sistem pertama berbasis karakteristik Fenotipik, dan kedua berdasarkan homologi genetik yang dimiliki.

a. Klasifikasi berdasarkan Fenotipik.

Genus *Leptospira* dibagi kedalam dua spesies, yaitu *Leptospira interrogans* (patogenik) dan *Leptospira biflexa* (non-patogenik). Pertumbuhan pada suhu 13 °C dan keberadaan 8-azaguanine menjadi penanda perbedaan keduanya. *L. interrogans* tidak dapat tumbuh pada kondisi suhu 13 °C dan adanya 8-azaguanine, sedangkan non-patogenik *Leptospira* resisten terhadap 8-azaguanine dan dapat tumbuh pada suhu 13 °C.

Kedua kelompok tersebut memiliki beberapa serovar yang merupakan takson terendah. Serovar yang memiliki homolog antigenik yang sama atau berkorelasi, dimasukkan ke dalam satu serogroup. Akan tetapi serogroup tidak memiliki takson tertentu dan digunakan hanya untuk kepentingan di laboratorium.

Saat ini lebih dari 250 serovar di dalam 25 serogroup berada dalam kelompok *L. interrogans*. Sedangkan *L. biflexa* terdiri dari 65 serovar dan termasuk dalam 38 serogroup. Sistem klasifikasi Binominal harus selalu diikuti. Akan tetapi serovar dan serogroup

dapat ditambahkan, contohnya leptospira interrogans serovar *ictero haimorrhgiae* pada serogroup *ictero haimorrhgiae*.

Panel serum kelinci (*rabbit anti sera*) digunakan untuk mendeterminasi serogroup. *Cross Agglutination Absorption Test* (CAAT) adalah pilihan uji untuk mendeterminasi serovar. Panel monoklonal antibodi sangat membantu untuk membedakan berbasis antigen antara strain referensi di laboratorium rujukan dan isolat dari lapangan.

b. Klasifikasi berdasarkan Genetik.

Berdasarkan dari homologi genetik pada percobaan DNA hybridization, 22 genomik spesies digambarkan pada genus *Leptospira*. Genomik spesies adalah group serovar *Leptospiraceae* yang memiliki DNA lebih dari atau sama dengan 70% homologi pada temperatur 70 °C dan dimana DNA yang berkorelasi 5% atau kurang basa yang tidak berpasangan.

Genus *Leptospira* dikarakterisasi dengan G+C konten sebanyak 34,4 mol%. Genus *Leptonema* memiliki G+C konten sebanyak 51 sampai 53 mol% dimana genus *Turneria* memiliki 47 sampai 48 mol%. Data lengkap sekuensing telah tersedia untuk 2 *Leptospira* yaitu serovar Lai dan serovar Copenhageni. Genus *Leptospira* memiliki 2 kromosom, kromosom besar (CI) dan kromosom kecil (CII). Ukuran kromosom

besar berkisar antara 4.332.241 bp sampai 4.277.185 bp. Sedangkan untuk kromosom kecil berukuran antara 358.943 bp sampai 350.181 bp.

Walaupun DNA_DNA hybridization diyakini sebagai *gold standard* teknik untuk identifikasi *Leptospira* spesies, tetapi teknik ini jarang dilakukan karena sangat kompleks. beberapa metode PCR berbasis DNA fingerprinting menjadi lebih disukai dan sering dilakukan untuk mengkarakterisasi *Leptospira*.



Prosedur Pengambilan Sampel



BAB 1I

Prosedur Pengambilan Sampel

PENGAMBILAN SAMPEL

SKRINING LEPTOSPIROSIS DI LABORATORIUM DIAWALI DENGAN PENGAMBILAN SAMPEL DI LAPANGAN UNTUK BAHAN UJI YAITU URIN, DARAH, SERUM DAN GINJAL. BERIKUT KAMI JABARKAN CARA PENGAMBILAN SAMPEL YANG DILAKUKAN OLEH B2P2VRP SALATIGA.

A. Prosedur Pengambilan Sampel Manusia

Prosedur pengambilan darah vena dengan spuit/ tabung vakum

Alat dan bahan:

Syringe 3cc, 5cc

Tali pembendung (torniket)

Holder

Tabung *vacutainer* EDTA (uji PCR)

Tabung *vacutainer* Heparin (kultur *Leptospira*)

Tabung *vacutainer* non EDTA (MAT)

Cara Kerja:

1. Sebelum diambil darah, pasien diberikan penjelasan dan menandatangani *informed concent*. (Sebelum mengambil darah pasien, petugas memberi penjelasan dan pasien menandatangani *informed concent*.)
2. Persiapkan alat-alat yang diperlukan untuk pemilihan *syringe*, pilihlah ukuran/volume sesuai dengan jumlah sampel yang akan diambil, pilih ukuran jarum yang sesuai dan pastikan jarum terpasang dengan erat.
3. Lakukan pendekatan pasien dengan tenang dan ramah; usahakan pasien dalam kondisi nyaman mungkin.
4. Identifikasi pasien dengan benar sesuai dengan data pada lembar permintaan.
5. Verifikasi keadaan pasien, misalnya puasa atau mengonsumsi obat. Catat bila pasien minum obat tertentu, tidak puasa dan sebagainya.
6. Minta pasien meluruskan lengannya, pilih lengan yang banyak melakukan aktivitas. Minta pasien mengepalkan tangan, pasang tali pembendung (turniket) kira-kira 10 cm di atas lipat siku.
7. Pilih bagian vena *median cubital* atau *cephalic*. Lakukan perabaan (palpasi) untuk memastikan posisi vena; vena teraba seperti sebuah pipa kecil, elastis dan memiliki dinding tebal. Jika vena tidak teraba, lakukan

pengurutan dari arah pergelangan ke siku, atau kompres hangat selama 5 menit daerah lengan.

8. Bersihkan kulit pada bagian yang akan diambil dengan kapas alkohol 70% dan biarkan kering. Kulit yang sudah dibersihkan jangan dipegang lagi.
9. Jika menggunakan *sputit* tusuk bagian vena, posisi lubang jarum menghadap ke atas. Jika jarum telah masuk ke dalam vena, akan terlihat darah masuk ke dalam semprit (dinamakan *flash*). Usahakan sekali tusuk kena.
10. Jika menggunakan *holder* tusuk bagian vena dengan posisi lubang jarum menghadap ke atas, masukkan tabung *vacutainer* ke dalam holder dan dorong sehingga jarum bagian posterior tertancap pada tabung, maka darah akan mengalir masuk ke dalam tabung. Tunggu sampai darah berhenti mengalir. Jika memerlukan beberapa tabung, setelah tabung pertama terisi, cabut dan ganti dengan tabung kedua, begitu seterusnya.
11. Setelah volume darah dianggap cukup, lepas turniket dan minta pasien membuka kepalan tangannya.
12. Letakkan kapas di tempat suntikan lalu segera lepaskan/tarik jarum. Tekan kapas beberapa saat lalu plester selama kira-kira 15 menit. Jangan menarik jarum sebelum turniket dibuka.

13. Lakukan pendokumentasian dan pencatatan.

Literatur: **Direktorat Laboratorium Kesehatan Departemen Kesehatan RI, *Pedoman Praktek Laboratorium yang Benar (Good Laboratory Practice)***. cetakan ketiga. Jakarta. 2004

Laboratorium Patologi Klinik FK-UGM *Tuntunan Praktikum Haematologi*, Bagian Patologi FK-UGM. Yogyakarta, 1995.

B. Prosedur Pengambilan Sampel Tikus

1. Prosedur Pengambilan darah Tikus dan Koleksi Serum

Alat dan Bahan:

Syringe 1 ml dan 3 ml

Tabung *vacutainer* non EDTA 5 cc

Centrifuge

Cara Kerja:

1. Tikus dianastesi dengan menyuntikkan campuran Ketamin dan Xylasin pada kaki belakang/paha tikus yang sudah di *swab* alkohol. (Dosis ketamin 70 – 100 mg/kg BB, Dosis xylasin 2 mg/kg BB)
2. Tikus dibiarkan selama 5 – 10 menit agar efek obat bekerja sebelum dilakukan pengambilan darah dan pembedahan
3. Bagian dadatikus dibersihkan menggunakan alkohol *swab*

4. Dengan menggunakan syringe 1 ml/ 3ml, disesuaikan besar tikus, jarum ditusukkan ke bawah tulang rusuk sampai masuk kurang lebih 50 – 75% panjang jarum dengan posisi jarum membentuk sudut 45°C terhadap badan tikus yang dipegang tegak lurus.
5. Pada jarum yang tepat mengenai jantung akan terlihat darah mengalir ke *syringe* dan secara hati-hati darah diisap sampai syringe terisi penuh.
6. Selanjutnya darah yang berhasil diambil dimasukkan ke dalam *vacutainer* Non EDTA secara hati-hati melewati dindingnya untuk menghindari hemolysis.
7. Vacutainer sudah diberi label disentrifus dengan kecepatan 3000 nrpm selama 5 menit
8. Serum yang berhasil terbentuk diambil secara perlahan menggunakan micropipe.
9. Serum yang sudah diambil dimasukkan ke dalam *cryotube* 2 ml dan di *seal* menggunakan parafilm.
10. Serum yang diperoleh disimpan dalam kulkas 4°C sebelum dilakukan pemeriksaan laboratorium.

Literatur: Epstein, J., *et al.* Protocol Bat and Rodent Sampling Methods. Usaid-Predict. 2013

Anesthetic_____Dept/Monitiring/Rodents.www.ohio.edu/research/compliance

2. Prosedur Pengambilan Ginjal Tikus

Alat dan bahan:

Gunting tulang Pinset

Syringe 1 ml dan 3 ml

Vial kaca ulir

Mikropipet dan tips

Ketamin

Alkohol 70% Alkohol Swab Xylasin

Cara Kerja:

1. Tikus yang sudah teranestesi dan diambil darahnya diletakkan di atas nampan bersih
2. Permukaan ventral diusap dengan swab alkohol untuk desinfeksi
3. Kulit bagian bawah perut dijepit menggunakan pinset, digunting hingga menembus kulit dan otot-otot perut
4. Satu sisi gunting dimasukkan ke dalam sayatan dan dibuat satu potongan dengan pola lurus dari perut ke arah dada
5. Potongan kulit dan otot-otot di atas diafragma ditarik untuk mengekspos sepenuhnya rongga perut
6. Ginjal diambil keduanya dan dimasukkan dalam vial kaca ulir yang berisi alkohol 70%

7. Label kertas berkode dimasukkan dalam vial
8. Ginjal yang terkoleksi disimpan pada suhu ruang sebelum dilakukan pemeriksaan laboratorium

Literatur: **CDC. Methods for Trapping and sampling Small Mammals for Virologic Testing. 1995 B2P2VRP, Pedoman Pengumpulan Data Reservoir di Lapangan, 2015**



Prosedur Pemeriksaan



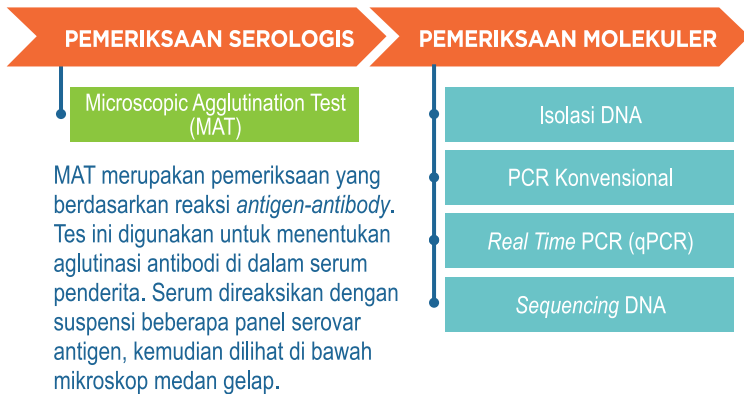
BAB 1II

Prosedur Pemeriksaan

JENIS PEMERIKSAAN LEPTOSPIROSIS

BAKTERIOLOGI	<ul style="list-style-type: none"> • Inokulasi • Isolasi Hewan
MIKROSKOPI	<ul style="list-style-type: none"> • Mikroskopi langsung, Pewarnaan immunohistokimia, imunofluoresensi • Pewarnaan Perak
IMUNOLOGI	<ul style="list-style-type: none"> • MAT • ELISA • Immunobloting • Lepto dipstick • Lepto lateralflow • Lepto dri dot
BIOLOGI MOLEKULER	<ul style="list-style-type: none"> • Polymerase chain reaction (PCR)

JENIS PEMERIKSAAN LEPTOSPIROSIS DI B2P2VRP

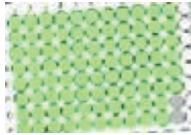


MICROSCOPIC AGGLUTINATION TEST (MAT)

MAT hingga kini masih digunakan sebagai *gold standard* pemeriksaan leptospirosis. Keuntungan utama MAT adalah spesifitasnya tinggi. Kekurangannya adalah membutuhkan fasilitas khusus untuk kultur dan pemeliharaan panel *Leptospira* hidup. Bakteri ini sangat mudah terkontaminasi baik antar serovar maupun bakteri lain yang dapat menyebabkan ketidaktepatan dalam pembacaan hasil. Oleh karena itu selain keterampilan teknis pekerja laboratorium, pemeliharaan kultur *Leptospira* adalah *time consuming*, terutama bila panel kulturnya berjumlah banyak.

Kekurangan lain yang sering terjadi dan jelas adalah ketika titer antibodi belum cukup terdeteksi atau bila serovar infeksi tersebut tidak ada dalam panel serovar. Hal itu diketahui hingga kini ada lebih dari 300 serovar di dunia, yang terbagi ke dalam 25 serogrup. Jadi harus diketahui lebih dahulu jenis serovar apa saja yang bersirkulasi di wilayah tersebut, untuk menentukan jenis dan jumlah serovar dalam pelaksanaan MAT di laboratorium.

A. Deteksi Antibodi Leptospira dengan MAT



Dilakukan Serial Dilusi

Inkubasi

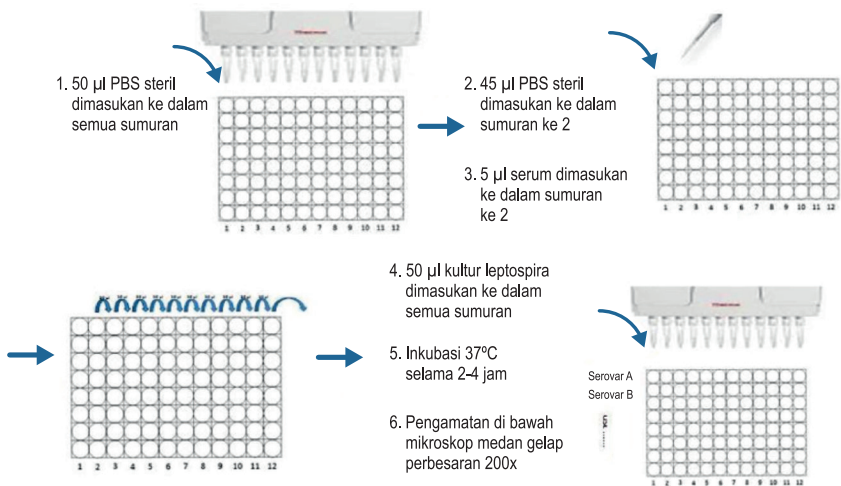
Suhu 37 C°

Selama 2-4 Jam

O

Cek dengan Mikroskop
Medan Gelap

Positif



Deteksi Antibodi *Leptospira* dengan MAT

Alat dan Bahan:

Plate MAT

Inkubator

Mikroskop medan gelap

Kaca slide

Mikro *shaker*

Syringe 3/5 cc

Serum

Kultur *Leptospira*

PBS 1x

Langkah kerja:

1. Semua sumuran diisi dengan 50 μ l PBS, dan 95 μ l PBS untuk kolom kedua.
2. 5 μ l serum ditambahkan ke dalam sumuran di kolom ke-2 (pengenceran 1:20).
3. Sumuran kolom ke-2 ke sumuran selanjutnya diencerkan dengan mengambil 50 μ l dan membuang 50 μ l dari sumuran terakhir (*serial dilution*).
4. 50 μ l kultur *leptospira* ditambahkan ke dalam semua sumuran.

5. Sampel dicampur secara menyeluruh dengan shaker.
6. Sampel diinkubasi selama 2 – 4 jam pada 37°C.
7. Sampel diperiksa pada mikroskop medan gelap untuk mengetahui aglutinasinya.
8. Sampel yang berasal dari serum tikus dinyatakan positif terinfeksi *Leptospira* jika terjadi aglutinasi dengan cut off titer 1:20 yang dibandingkan dengan kontrol negatif. Kontrol negatif merupakan kultur bakteri *Leptospira* ditambah PBS. Kontrol negatif tidak menunjukkan reaksi aglutinasi atau bebas sama sekali.

Literatur: **Vijayachari, P., *Leptospirosis (laboratory manual)* Regional Medical Research Centre Indian Council of Medical Research. 2010. Port Blair, India.**

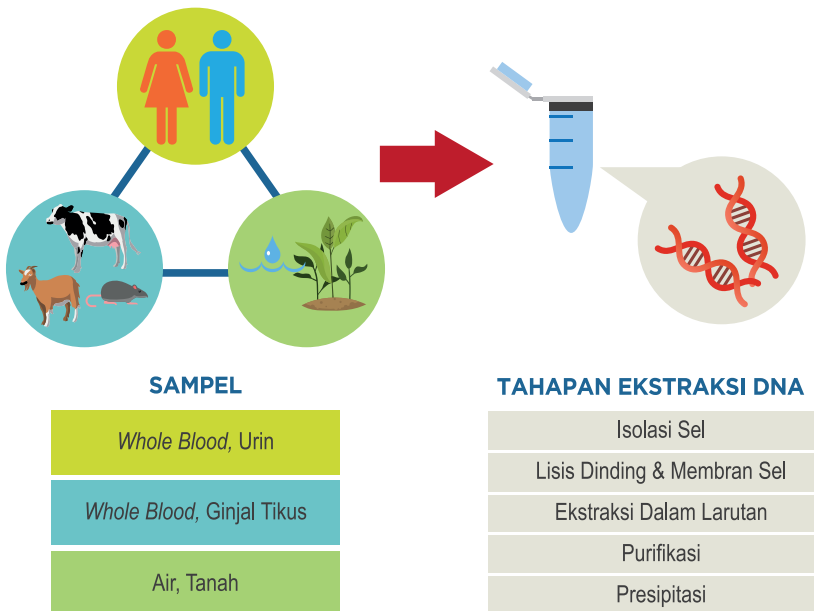
SOP laboratorium mikrobiologi B2P2VRP. 2013. Salatiga

B. Pemeriksaan Molekuler

EKSTRAKSI DNA

Ekstraksi DNA merupakan teknik untuk mendapatkan DNA dari sampel. Prinsip dasar ekstraksi DNA/RNA adalah memecah dan mengekstraksi sampel yang diuji hingga terbentuk ekstrak sel yang terdiri atas sel-sel, jaringan, DNA, dan RNA, kemudian ekstrak sel dipurifikasi sehingga dihasilkan pelet sel yang mengandung DNA/RNA. Ekstraksi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu: (1) Isolasi sel; (2) Lisis dinding dan membran sel; (3) Ekstraksi dalam larutan; (4) Purifikasi; dan (5) Presipitasi.

I. Ekstraksi DNA



1.1 Sampel Urin

Alat dan Bahan:

Centrifuge

Inkubator

Mikropipet dan tips Kit ekstraksi DNA Vortex

Langkah kerja:

1. Siapkan *waterbath* dengan suhu 55°C, *sentrifuge* 1,5 ml urin dengan kecepatan tinggi selama 5 menit, buang *supernatan*, ambil pellet.
2. Cuci dengan 500 µl PBS, *sentrifuge* kecepatan tinggi selama 5 menit, buang *supernatan*, ambil pellet.
3. Cuci kembali dengan 500 µl PBS, *sentrifuge* kecepatan tinggi selama 5 menit, buang *supernatan*, ambil pellet.
4. Resuspen dilakukan dengan 200 µl PBS.
5. Tambahkan 180 µl *Digestion Buffer* dan 20 µl *Proteinase K*, vortex. Lakukan inkubasi selama 30 menit hingga 4 jam.
6. Tambahkan 20 µl *RNAse A*, vortex, inkubasi dalam suhu ruang selama 2 menit.
7. Tambahkan 200 µl *Lysis/ Binding Buffer*, vortex.
8. Tambahkan 200 µl 96-100% etanol, vortex 5 detik.
9. Ambil 640 µl *lysate* dan masukkan ke dalam *Spin Column*.

10. *Sentrifuge* dengan kecepatan 10.000 x g selama 1 menit, buang *collection tube* dan pindahkan *spin column* ke dalam *collection tube* baru.
11. Tambahkan 500 µl *Wash Buffer 1*, *sentrifuge* dengan kecepatan 10.000x g selama 1 menit, buang *collection tube* dan pindahkan *spin column* ke dalam *collection tube* baru.
12. Tambahkan 500 µl *Wash Buffer 2*, *sentrifuge* dengan kecepatan tinggi selama 3 menit, pindahkan *spin column* ke dalam *tube microsentrifuge* 1,5 ml
13. Tambahkan 25 – 200 µl *Elution Buffer*, inkubasi dalam suhu ruang selama 1 menit, *sentrifuge* kecepatan tinggi selama 1 menit

Literatur: **User guide PureLink® Genomic DNA Kits for Purification of Genomic DNA by Invitrogen kits**

1.2 Sampel Darah / Serum

Alat dan Bahan:

Centrifuge

Inkubator

Mikropipet dan tips

Etanol absolut

Kit ekstraksi DNA (untuk darah dan jaringan)

Langkah kerja:

1. Siapkan *waterbath* dengan suhu 56°C.
2. Masukkan 20 µl proteinase K ke dalam *microsentrifuge tube* 1,5 ml.
3. Tambahkan 200 µl *sampel (whole blood, plasma, serum, atau body fluids)* ke dalam tube tersebut. Jika sampel kurang dari 200 µl, tambahkan volume hingga 200 µl menggunakan PBS.
4. Tambahkan 200 µl *Buffer Lysis* pada sampel, vortex selama \pm 15 detik atau hingga homogen.
5. Inkubasi dilakukan pada suhu 56°C selama 10 menit.
6. *Vortex* dan *spindown* secukupnya.
7. Tambahkan 200 µl etanol absolut, kemudian vortex atau *pipetting up & down* dan *spindown*.

Literatur: **Manual Insert Kit by QIAGEN Kits**

8. Pindahkan sampel ke dalam *mini spin column*, *sentrifuge* 8000 rpm selama 1 menit, buang filtrat, pindahkan *column* ke *tube* yang baru.
9. Tambahkan 500 µl *Wash Buffer 1*, lalu *sentrifuge* 8000 rpm 1 menit, buang filtrat, pindahkan *solumn* ke *tube* yang baru.
10. Tambahkan 500 µl *Wash Buffer 2*, *sentrifuge* 14.000 rpm 1 menit. Pindahkan *spin column* ke tube 1,5 µl,

11. Tambahkan 200 µl *Elusion Buffer*, inkubasi suhu ruang 1 menit, lalu *sentrifuge* 8000 rpm 1 menit.
12. Aliquot dan simpan dalam suhu -20°C

Literatur: **Manual Insert Kit by QIAGEN Kits**

1.3 Ginjal Tikus

Alat dan Bahan:

Centrifuge Inkubator

Kit ekstraksi DNA

Langkah kerja:

1. Siapkan vial tube 1,5 ml dan beri kode sampel di bagian tutupnya.
2. Spesimen ginjal dalam alkohol 70% dicuci dengan akuades steril dalam cawan petri selama beberapa saat.
3. Spesimen ginjal dipotong melintang sampai menembus bagian korteks menggunakan pinset dan skalpel.
4. Ambil bagian korteks kira-kira 2 mg kemudian masukkan dalam vial tube 1,5 ml.
5. Tambahkan larutan *digestion buffer* 180 µl dan *Proteinase K* 20 µl.

6. Gerus ginjal dalam larutan menggunakan *pellet pastle* dan *pellet pastle motor* sampai hancur homogen.
7. Inkubasi gerusan ginjal dalam *waterbath*/inkubator pada suhu 55°C sambil beberapa kali di vortex. Diamkan semalaman.

Literatur: User guide PureLink® Genomic DNA Kits for Purification of Genomic DNA by Invitrogen kits

8. Tambahkan 20 µl RNase A, vortex, inkubasi dalam suhu ruang selama 2 menit.
9. Tambahkan 200 µl *Lysis/ Binding Buffer*, vortex.
10. Tambahkan 200 µl 96 – 100% etanol, vortex 5 detik.
11. Ambil 640 µl *lysate* dan masukkan ke dalam *Spin Column*.
12. *Sentrifuge* dengan kecepatan 10.000 x g selama 1 menit, buang *collection tube* dan pindahkan *spin column* ke dalam *collection tube* baru.
13. Tambahkan 500 µl *Wash Buffer 1*, *sentrifuge* dengan kecepatan 10.000x g selama 1 menit, buang *collection tube* dan pindahkan *spin column* ke dalam *collection tube* baru.
14. Tambahkan 500 µl *Wash Buffer 2*, *sentrifuge* dengan kecepatan tinggi selama 3 menit, pindahkan *spin column* ke dalam tube *microcentrifuge* 1,5 ml

15. Tambahkan 25–200 µl *Elution Buffer*, inkubasi dalam suhu ruang selama 1 menit, *sentrifuge* kecepatan tinggi selama 1 menit

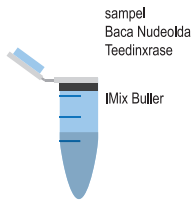
Literatur: User guide PureLink® Genomic DNA Kits for Purification of Genomic DNA by Invitrogen kits

2. Amplifikasi DNA

AMPLIFIKASI DNA

Polimerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik yang menggunakan kemampuan enzim DNA polimerase sebagai dasar mensintesis untai DNA baru yang merupakan komplemen dari template DNA yang diberikan. Pada akhir reaksi PCR dihasilkan jutaan kopi DNA (amplikon). Selain template DNA dan enzim DNA polimerase, reaksi PCR membutuhkan primer, dNTP, $MgCl_2$, dan buffer *nuclease-free water* dalam proses reaksinya.

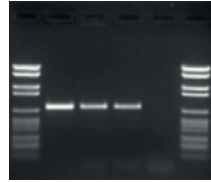
2. 1 PCR Konvensional



1



2



Keterangan.

1. Preparasi Sampel
2. Amplifikasi DNA
3. Elektroforesis
4. Visualisasi Hasil Elektroforesis
5. Analisis Data

PCR Konvensional

Alat dan Bahan:

PCR *thermal cycler* Mikropipet dan tips Vortex

Mini *centrifuge* (*spin down*)

PCR *mastermix*

Primer LipL32

Forward 5' – ATC TCC GTT GCA CTC TTT GC – 3'

Reverse 5' – ACC ATC ATC ATC ATC GTC CA – 3'

Primer secY

Forward 5' – ATG CCG ATC ATT TTT GCT TC – 3'

Reverse 5' – CCG TCC CTT AAT TTT AGA CTT CTT

C– 3'

DNA *template*

Langkah kerja:

1. Siapkan tabung PCR, beri kode sesuai dengan kode isolasi DNA yang akan di-PCR.
2. Lakukan *thawing primer*, *reagen master mix* dan ddH₂O, Siapkan *mix* sesuai dengan protokol (Tabel 1.)

Tabel 1 Mix PCR konvensional

Reagen	Jumlah (µl)
Master Mix	12,5
Primer <i>forward</i>	1
Primer <i>reverse</i>	1
ddH ₂ O	5,5
Total reaksi	20

3. Bagi mix PCR ke dalam *tube* PCR dengan volume masing-masing 20µl.
4. Tambahkan sampel (*DNA template*) masing-masing 5 µl.
5. Tambahkan kontrol negatif (ddH₂O) di tube kontrol negatif, dan kontrol positif (DNA kultur *Leptospira*) di tube kontrol positif.
6. Lakukan *spin down* sampai tidak ada sampel/reagen yang tertinggal menempel di dinding tabung.

7. Siapkan mesin *thermocycler* untuk proses PCR.
8. Lakukan setting mesin untuk proses denaturasi, *annealing*, dan ekstensi dengan protokol (Tabel 2)

Tabel 2 Tahapan PCR Konvensional

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu	
Predenaturasi	95	5 menit	
Denaturasi	94	30 detik	35x
<i>Annealing</i>	58	30 detik	
Ekstensi	72	1 menit	
Ekstra Ekstensi	72	7 menit	
<i>Endless</i>	4	~	

9. Masukkan tube yang berisi sampel ke dalam mesin. Lakukan proses PCR. Tunggu mesin selesai bekerja.
10. Sampel hasil PCR diambil 5 µl untuk kemudian divisualisasi dengan proses elektroforesis gel agarose 1,5%; 100 Volt selama 30 menit.

Literatur: Ahmed, A; Engelberts, MFM; Boer,K.R; Ahmed, N;and Hartskeerl, R.A. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. 2009. PLoS One; 4(9): e7093 dengan modifikasi.

Elektroforesis Gel Agarose

Alat dan Bahan:

Power Supply

Botol kaca tebal (duran)

Microwave

Neraca analitik

Gell caster + comb

Agarosa

Buffer TBE/TAE 1X

Sybr Safe

Langkah kerja:

1. Pilih *gel caster* dengan jumlah lubang yang disesuaikan dengan jumlah sampel yang akan dielektroforesis. Pastikan posisi gel caster rata air (dengan menggunakan waterpass)
2. Buat gel agarose (1,5% – 2%, sesuai dengan besar bp produk DNA).
3. Misalnya untuk membuat gel agarose 1,5% dengan volume 70 ml (untuk gel caster kecil). Timbang agarose sebanyak 0,5 g, masukkan dalam botol duran.
4. Tambahkan *buffer* TBE/TAE 1X sebanyak 70 ml.
5. Panaskan dengan *microwave* sampai mendidih dan larutan bening.

6. Tambahkan 5 μ l EtBr atau 7 μ l SyBr Safe. Aduk dengan cara digoyang-goyang sampai larutan tercampur rata.
7. Tuangkan perlahan pada gel caster yang telah dipasangi sisir (*comb*). Tepikan/hilangkan gelembung yang ada.
8. Tunggu sampai gel padat.
9. Setelah keras, posisikan gel pada gel caster lalu rendam dengan *buffer*TBE/TAE 1x sampai gel terndam semua.
10. *Loading* sampel ke dalam gel agarose.

***Loading* sampel dan dokumentasi**

Alat dan Bahan:

Power supply

Micropipet

Gel Documentation Produk PCR (amplikon) Marker (*DNA ladder*)

Langkah kerja:

1. Produk PCR (amplikon) dimasukkan ke dalam sumuran yang telah dicetak pada gel agarose dengan volume 5 μ l (mix mengandung *loading dye*).
2. Jika *mastermix* yang digunakan belum mengandung *loading dye*, maka terlebih dahulu campur 2 μ l *loading dye* + 5 μ l amplikon di atas parafilm menggunakan

mikropipet, *up and down*, kemudian masukkan campuran ke lubang sumuran.

3. Masukkan pula marker (DNA *ladder*) sebagai penanda ukuran DNA (sebaiknya diletakkan di kolom pertama)
4. Jika sudah dimasukkan semua, atur *powersupply* pada tegangan 80 – 100 V selama 30 – 60 menit. Makin tinggi voltase, semakin pendek waktu yang diperlukan.
5. Visualisasi hasil elektroforesis dengan alat gel dokumentasi (Gel Doc).

2.2 Real Time PCR (qPCR)



Keterangan.

1. Preparasi Sampel
2. Amplifikasi DNA
3. Analisis Data

Alat dan Bahan:

Real-Time PCR System

Mikropipet dan tips

Vortex

Mini *centrifuge (spin down)*

Eva Green mix

Primer SecY IVF dan SecY IV

SecY IVF 5' – GCG ATT CAG TTT AAT CCT GC – 3'

SecY IV 5' –GAG TTA GAG CTC AAA TCT A AG – 3'

Langkah kerja:

1. Siapkan tabung qPCR, beri kode sesuai dengan kode isolasi DNA.
2. Lakukan *thawing* primer, reagen master mix dan ddH₂O
6. Siapkan mix reagen sesuai dengan jumlah sampel yang akan diperiksa sesuai dengan protokol (Tabel 3)

Tabel 3 Mix Reagen qPCR

Reagen	Jumlah (µl)
EvaGreen	5
Primer <i>forward</i>	1
Primer <i>reverse</i>	1
ddH ₂ O	2
Total reaksi	9

7. Bagi *master mix* ke dalam tabung qPCR dengan volume masing-masing 9 µl untuk tiap sampel.
8. Tambahkan sampel (*DNA template*) masing-masing 1 µl.
9. Tambahkan kontrol negatif di *tube* kontrol negatif (kultur *Leptorpira* non patogenik), ddH₂O sebagai NTC dan kontrol positif (kultur *Leptospira* patogenik) di *tube* kontrol positif.
10. Lakukan *spindown* sampai tidak ada sampel/reagen yang tertinggal menempel di dinding tabung.
11. Siapkan mesin *thermocycle* untuk proses qPCR.
12. Lakukan setting mesin untuk proses denaturasi, *annealing*, dan ekstensi, serta mengatur *melting temperature* (suhu dan waktu sesuai dengan optimasi masing-masing primer) sesuai dengan Tabel 4.

Tabel 4 Tahapan qPCR

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Predenaturasi	98	2 menit	
Denaturasi	95	30 detik	40x
<i>Annealing</i>	60	30 detik	
<i>Meltcurve</i>	65-95	5 detik	

- Literatur: Ahmed, A ; Engelberts, M.F.M.; Boer, K.R; Ahmed, N.; Hartskeerl, R.A. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Material. 2009. PLoS ONE 4 (9)

4' PCR (+ one dideoxynucleotide)

LA3L

ddTTP ddATP ddGTP ddCTP

4 LUNA sequence

C T G A C T TCGA

G A C T G A AGCT

A C T G A AGC

MITA A A G C

T G A A GC

GA A GC

A A GC I

A GC

GC T

Use sequencing machine

a

GA GTG A AGGT

1 1 1 1

T A

Separate with a gel

1. Purifikasi produk PCR
2. Kuantifikasi purifikasi produk PCR
3. Cycle sequencing

4. Purifikasi produk sequencing
5. Capillary elektroforesis
6. Analisis data

SEQUENCING DNA

Sekuensing adalah suatu metode untuk menentukan urutan basa (sekuens) DNA, RNA, atau asam amino dalam protein. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan, baik untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens tersebut dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui. Selain itu, teknik ini dapat membantu menentukan, baik efek dari ekspresi gen, pemetaan lokus penyakit, maupun menunjukkan penyimpangan kromosom.

Purifikasi produk PCR

Tujuan purifikasi untuk menghilangkan sisa-sisa primer *forward* maupun *reverse*. Langkah-langkahnya purifikasi DNA adalah sebagai berikut:

1. *Template* DNA dimasukkan dalam vial PCR
2. Botol vial dengan *template* DNA tersebut kemudian ditambahkan 2 µl alkali fosfatase
3. Botol vial dengan *template* DNA dan alkali fosfatase kemudian ditambahkan 2 µl eksonuklease
4. Botol vial selanjutnya di-*spiningdown*

5. Botol vial diinkubasi dalam *thermal cyclers* pada suhu 37°C selama 15 menit dan 80°C selama 15 menit selama 15 menit dan 80°C selama 15 menit.

Menghitung kuantitas produk PCR terpurifikasi

Kuantitas produk PCR diukur menggunakan alat *nano drop*. Konsentrasi produk PCR didilusi menggunakan *nuclease-free water* sampai dengan konsentrasi yang diinginkan. Produk PCR sebesar 200 – 500 bp memerlukan konsentrasi 3 – 10 µg/ µl.

Cycle sequencing

Cara menyiapkan komponen reaksi yang digunakan adalah sebagai berikut:

Vortex campuran *reagent* dan DNA dengan vortex selama 5 detik, lalu spin selama 2 detik. Reaksi *cycle sequencing* dijalankan dengan alat *termocycler* dengan suhu 96°C selama 1 menit, 25 siklus 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik, dan 60°C selama 4 menit kemudian *holding* pada 4°C.

Purifikasi produk *cycle sequencing*

Produk *cycle sekuensing* ditambah dengan 5 µl 125 mM EDTA dan 60 µl etanol absolut. Tutup dengan aluminium foil, homogenkan, dan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah itu lakukan sentrifuse dengan kecepatan 3000XG selama 30 menit pada suhu 4°C. Buang supernatan pelan-pelan, buka tutup vial supaya kering. Tambahkan etanol 70% 60 µl lalu *vortex*. Sentrifuse 1650xG selama 15 menit pada suhu 4°C. Buang supernatan, tambahkan HIDI Formamide 13 µl. Inkubasi dalam *thermal cycler* 95°C selama 5 menit. Pindahkan dalam *plate* sekuensing.

Capillary electrophoresis

Plate sekuensing dimasukkan dalam instrumen sekuenser.

Analisis Data Sekuensing

Hasil sekuensing berupa elektrofrenogram dianalisis dengan menggunakan software BioEdit. Sekuen disejajarkan dengan sekuen *Leptospira* referensi dari *GeneBank*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, N., Manjulata Devi S., Valverde³, M., Vijayachari, P.; Robert, S. Machang'u, Ellis, W.A., and Hartskeerl, R.A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. 2006. BioMed Central, 5:28..
- Ahmed, A., Engelberts M.F.M., Boer K.R. Ahmed, N., and Hartskeerl, R.A. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. 2009. PLoS One; 4(9): e7093.
- Ahmed A., Engelberts M.F.M., Boer, K.R., Ahmed N., Hartskeerl, R.A. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Material. 2009. PLoS ONE 4 (9)
- Anesthetic Dept/Monitoring/Rodents. [www.ohio.edu/research compliance](http://www.ohio.edu/research/compliance).
- Bharti A.R., Nally J.E., Ricaldi J.N., Matthias M.A., Diaz M.M., Lovett M.A., Levett P.N., Gilman R.H., Willig M.R., Gotuzzo E, Vinetz J.M., Peru-United States Leptospirosis C. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet infectious diseases 3: 757 – 771.

*Pedoman Pengumpulan Data Reservoir di Lapangan Salatiga:
B2P2VRP; 2015*

Direktorat Laboratorium Kesehatan Departemen Kesehatan RI, Pedoman Praktek Laboratorium yang Benar (Good Laboratory Practice). 2004. cetakan ketiga. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI. Epstein, J., *et al.* Protocol Bat and Rodent Sampling Methods. USA : Usaid-Predict, 2013

Epstein, J., *et al.* 2013. Protocol Bat and Rodent Sampling Methods. USA : Usaid-Predict ; 2013

Kementerian Kesehatan RI. *Petunjuk Teknis Pengendalian Leptospirosis*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI ; 2014

Laboratorium Patologi Klinik FK,UGM. *Tuntunan Praktikum Haematologi*. Yogyakarta : FK UGM ; 2015

Manual Protocol Purelink Genomic DNA Mini Kit.

Natarajaseenivasan, K; Raja,V, and Narayanan, R. Rapid diagnosis of leptospirosis in patients with different clinical manifestations by 16S rRNA gene based nested PCR.Saudi J Biol Sci. 2012 Apr; 19(2): 151 – 155.

Mendell G.B.,J.E., Dolin R. 2000. Principles and Practice of Infectious Diseses, 6th ed, vol. 2.Pacific WROotW 2009, posting date. [Online.]

Singh S.S., Vijayachari P., Sinha A., Sugunan A.P., Rasheed M.A., Sehgal S.C. 1999. Clinico- epidemiological study of hospitalized cases of severe leptospirosis. The Indian journal of medical research 109: 94--99.



Diterbitkan oleh :

LEMBAGA PENERBIT
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Percetakan Negara No. 29, Jakarta 10560
Telp. (021) 4261088, ext. 2.2.2, 2.2.3. Fax. (021) 4243933

ISBN 978-602-373-160-2

