

PEMERIKSAAN BAKTERI *LEPTOSPIRA* PADA SAMPEL DARAH MANUSIA SUSPECT LEPTOSPIROSIS MENGGUNAKAN METODE PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

EXAMINATION OF LEPTOSPIRA BACTERIA IN LEPTOSPIROSIS SUSPECT HUMAN BLOOD SAMPLES USING PCR METHOD (POLYMERASE CHAIN REACTION)

*Sefrita Tri Utami, Dyah Fitri Kusharyati, Hendro Pramono**
**Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto*
Jl. Dr. Soeparno No. 63 Grendeng, Purwokerto
E-mail: <http://bio.unsoed.ac.id>

Accepted: 26/8/2013 Reviewed: 28/8/2013 Reviewed: 8/10/2013 Revised: 21/10/2013

ABSTRAK

*Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang disebabkan oleh bakteri *Leptospira*. Kasus leptospirosis sering tidak menunjukkan gejala klinis yang spesifik dan sulit didiagnosis tanpa pengujian sampel di laboratorium. Pengujian dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dinilai lebih akurat dibandingkan dengan metode yang lain. Komponen-komponen yang dibutuhkan dalam pemeriksaan bakteri *Leptospira* pada sampel darah manusia menggunakan metode PCR adalah DNA template, enzim polymerase, Primer PU 1 dan Primer SU 1, Primer Lep R1, air, Mg^{2+} , dan dNTP. Pemeriksaan bakteri *Leptospira* pada sampel darah manusia meliputi pengambilan sampel, isolasi DNA, pemeriksaan dengan metode PCR, dan running elektroforesis.*

*Kata kunci: leptospirosis, *Leptospira*, metode PCR*

ABSTRACT

*Leptospirosis is a zoonotic disease, which is caused by leptospira. Leptospirosis cases often show no specific clinical symptoms and is difficult to diagnose without testing samples in the laboratory. Testing using PCR (*Polymerase Chain Reaction*) is considered more accurate than the other methods. Components required in the examination *Leptospira* bacteria in human blood samples using PCR method is DNA template, DNA polymerase enzyme, forward primer (PU1 and SU1) and reverse primer (Lep R1), nuclease free water, Mg^{2+} , and dNTPs. Examination of *Leptospira* bacteria in human blood samples include sampling, DNA isolation, examination by PCR, and electrophoresis running.*

*Key words: leptospirosis, *Leptospira*, PCR methods*

PENDAHULUAN

Leptospirosis adalah penyakit zoonosis, disebabkan oleh infeksi bakteri yang berbentuk spiral dari genus *Leptospira*. Leptospirosis tersebar luas di seluruh dunia, terutama pada daerah tropis.¹ Penularan leptospirosis pada manusia terjadi melalui kontak langsung dengan hewan terinfeksi *Leptospira* atau secara tidak langsung melalui genangan air yang terkontaminasi urin yang terinfeksi *Leptospira*. Bakteri ini masuk ke dalam tubuh melalui kulit yang luka atau membran mukosa.²

Gejala penyakit ini sangat bervariasi mulai dari demam, ikterus, hemoglobinuria, pada hewan yang hamil dapat terjadi abortus dan janin lahir mati, bahkan dapat menyebabkan kematian pada penderitanya. Tingkat keganasan serangan leptospirosis tergantung dari serovar *Leptospira* dan spesies hewan yang terinfeksi pada daerah tertentu.^{3,4,5} Leptospirosis pada manusia dapat berupa penyakit ringan sampai berat tergantung serovar yang menginfeksi. Penderita penyakit leptospirosis yang kronis dapat bertindak sebagai karier karena bakteri dapat bersarang di dalam ginjal dan *Leptospira* diekskresikan bersama urin mulai

minggu pertama setelah infeksi dan berlangsung sampai beberapa bulan. Kasus leptospirosis seringkali tidak menunjukkan gejala klinis yang spesifik dan sulit didiagnosis tanpa pengujian sampel di laboratorium. Pengujian dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dinilai lebih akurat apabila dibandingkan dengan metode yang lain.⁶

METODE

Bahan penulisan artikel ini adalah literatur dan cara yang digunakan dalam penulisan ini adalah studi literatur dari berbagai sumber baik berupa buku maupun artikel ilmiah yang berhubungan dengan pemeriksaan bakteri *Leptospira* menggunakan metode PCR.

PEMBAHASAN

Pemeriksaan bakteri *Leptospira* pada sampel darah penderita *suspect* leptospirosis melalui beberapa tahapan berikut:

1. Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah memisahkan DNA kromosom atau DNA genom dari komponen-komponen sel lain. Sumber DNA bisa berasal dari tanaman, kultur mikroorganisme, atau sel manusia. Membran sel dilisis dengan menambahkan detergen untuk membebaskan isinya, kemudian pada ekstrak sel tersebut ditambahkan *protease*, yang berfungsi mendegradasi protein dan RNase, yang berfungsi untuk mendegradasi RNA, sehingga yang tinggal adalah DNA. Ekstrak tersebut selanjutnya dipanaskan sampai suhu 90 °C untuk menginaktivasi enzim yang mendegradasi DNA (DNase). Larutan DNA kemudian di presipitasi dengan etanol dan bisa dilarutkan kembali menggunakan air, akhirnya didapatkan DNA murni.⁷

Isolasi DNA diawali dengan perusakan dan atau pembuangan dinding sel, yang dapat dilakukan baik dengan cara mekanis seperti sonikasi, tekanan tinggi, beku-leleh, maupun dengan cara enzimatik seperti pemberian *lisozim*. Langkah berikutnya adalah lisis sel. Bahan-bahan sel yang relatif lunak dapat dengan mudah diresuspensi di dalam *medium buffer*

monosmotik, sedangkan bahan-bahan yang lebih kasar perlu diperlakukan dengan detergen yang kuat seperti *triton X-100* atau dengan *sodium dodesil sulfat* (SDS). Langkah ini harus disertai dengan perusakan membran nukleus. Sel mengalami lisis, remukan-remukan sel harus dibuang. Pembuangan remukan sel dilakukan dengan sentrifugasi. Protein yang tersisa dipresipitasi menggunakan fenol atau pelarut organik seperti kloroform, selanjutnya disentrifugasi dan dihancurkan secara enzimatik dengan *protease*. DNA yang telah dibersihkan dari protein dan remukan sel masih tercampur dengan RNA sehingga perlu ditambahkan RNase untuk membersihkan DNA dari RNA.⁷

Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul. DNA kromosom dan plasmid yang kemurniannya cukup tinggi akan diperoleh dengan menjalankan prosedur secara benar, dapat dilihat dari penampakan hasil elektroforesis yang baik. Tujuan dilakukannya lima kali sentrifugasi adalah agar dalam proses isolasi DNA akan didapatkan DNA murni yang bebas dari kotoran-kotoran sel, maupun RNA dan protein. Ketelitian dan kecermatan dalam pelaksanaan penelitian, sangat menentukan hasil kemurnian DNA kromosom dan plasmid.⁸ Presipitasi merupakan tahap terakhir dalam isolasi DNA. Presipitasi bertujuan untuk mengendapkan protein histon, sehingga untai-untai DNA tidak lagi menggulung (*coiling*) dan berikatan dengan protein histon, yang menyebabkan DNA menjadi terlihat.⁹

Berdasarkan hasil isolasi DNA menggunakan sampel darah manusia, menunjukkan adanya kabut putih, hal ini dapat dikatakan bahwa isolasi DNA berhasil, sesuai pernyataan,¹⁰ pekat atau tidaknya larutan DNA tergantung dari preparasinya, ditunjukkan dengan adanya kabut putih. Semakin baik preparasinya, seringkali menghasilkan DNA yang pekat. Hasil DNA yang didapatkan kurang pekat, maka diperlukan adanya pemekatan untuk meningkatkan konsentrasi DNA.

Isolasi DNA bakteri *Leptospira* menggunakan alat-alat, seperti sarung tangan digunakan untuk menghindari hasil isolasi terkontaminasi DNase dari keringat atau

kontaminan lain pada tangan, serta menjaga tangan dari larutan yang berbahaya. Tabung *ependorf (tube)* digunakan untuk menampung larutan hasil ekstraksi, sedangkan *vortex* digunakan untuk menghomogenkan larutan dengan prinsip menggunakan bantuan energi listrik. *Waterbath* digunakan untuk inkubasi sampel DNA. *Ice pack* berfungsi untuk menyimpan DNA hasil isolasi. *Microcentrifuge* digunakan untuk sentrifugasi, mikropipet dan tip digunakan untuk memindahkan larutan secara akurat, lemari pendingin digunakan untuk proses kondensasi. Tabung *high pure filter* berfungsi untuk memisahkan natan dan supernatan yang diperoleh ketika proses sentrifugasi. DNA sampel tidak luruh bersama kotoran, protein, maupun RNA, karena DNA akan menempel pada filter yang terdapat dalam tabung tersebut (bagian yang berwarna putih). Pasangan dari tabung *high pure filter* ini dinamakan tabung koleksi (*collection tube*), yang berfungsi untuk menampung cairan berupa kotoran, protein, maupun RNA pada saat proses sentrifugasi. Tabung vakum digunakan untuk menampung sampel darah manusia.⁷

Sementara bahan yang digunakan meliputi sampel darah manusia. *Binding buffer* berfungsi untuk melisis sel sampel yang digunakan, sedangkan Proteinase K berperan dalam perusakan protein yang terdapat dalam sel darah manusia yang digunakan. Isopropanol digunakan untuk presipitasi DNA setelah disentrifugasi, yaitu pembuangan remukan sel atau protein maupun RNA. Larutan *inhibitor removal buffer* berfungsi untuk menjaga agar natan (sampel DNA) tetap menempel pada filter dan digunakan juga sebagai pencuci dan langkah awal protokol elusi. *Wash buffer* digunakan sebagai pencuci dan langkah kedua dan ketiga pada protokol elusi. Larutan *elution buffer* berfungsi untuk menghasilkan purifikasi DNA yang ditambahkan sebelum sentrifugasi terakhir agar didapatkan DNA yang benar-benar murni.⁷

Pemeriksaan DNA bakteri *Leptospira* untuk pemeriksaan *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Cat. No. 11 858 874 001). Langkah-langkah isolasi DNA diawali dengan pengambilan 200 mikroliter sampel darah manusia dan kemudian diletakkan dalam tabung *ependorf*. *Binding buffer* sebanyak 200

mikroliter dan 40 mikroliter Proteinase K ditambahkan ke dalam *ependorf*, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Selanjutnya, diinkubasi dalam *waterbath* selama 10 menit pada suhu 70^o C. setelah diinkubasi, ditambahkan 100 mikroliter isopropanol dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Larutan yang sudah homogen dipindah ke tabung *high pure filter*, kemudian disentrifugasi selama satu menit dengan kecepatan 8000 x g. Cairan berupa kotoran yang terdapat di tabung koleksi dibuang. 500 mikroliter *inhibitor removal buffer* ditambahkan, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya, cairan berupa kotoran yang terdapat di tabung koleksi dibuang. *Wash buffer* sebanyak 500 mikroliter ditambahkan, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 x g selama 1 menit. Cairan berupa kotoran yang terdapat di tabung koleksi dibuang kembali, kemudian 500 mikroliter *inhibitor removal buffer* ditambahkan, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 x g selama 1 menit. Cairan berupa kotoran yang terdapat di tabung koleksi dibuang, dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 x g selama 10 menit. Tabung koleksi dibuang, tabung mikro di masukkan ke dalam tabung *ependorf* dan ditambahkan 200 mikroliter *elution buffer* (70^o C). Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 x g. Akhirnya, purifikasi DNA *template* dihasilkan.

2. Pemeriksaan dengan PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode yang digunakan untuk amplifikasi urutan basa DNA tertentu (selektif). Metode yang ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1987 ini dapat digunakan untuk menggandakan urutan basa nukleotida tertentu secara *in vitro*. Penggandaan urutan basa nukleotida berlangsung melalui reaksi polimerisasi yang dilakukan berulang-ulang secara berantai selama beberapa putaran (siklus). Tiap reaksi polimerisasi membutuhkan komponen-komponen sintesis DNA seperti untai DNA yang akan digunakan sebagai cetakan (*template*), molekul oligonukleotida untai tunggal dengan ujung 3'-OH bebas yang berfungsi sebagai prekursor (primer), sumber

basa nukleotida berupa empat macam dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dan enzim DNA polimerase. Langkah pertama dalam metode ini adalah membuat DNA *template*.¹¹

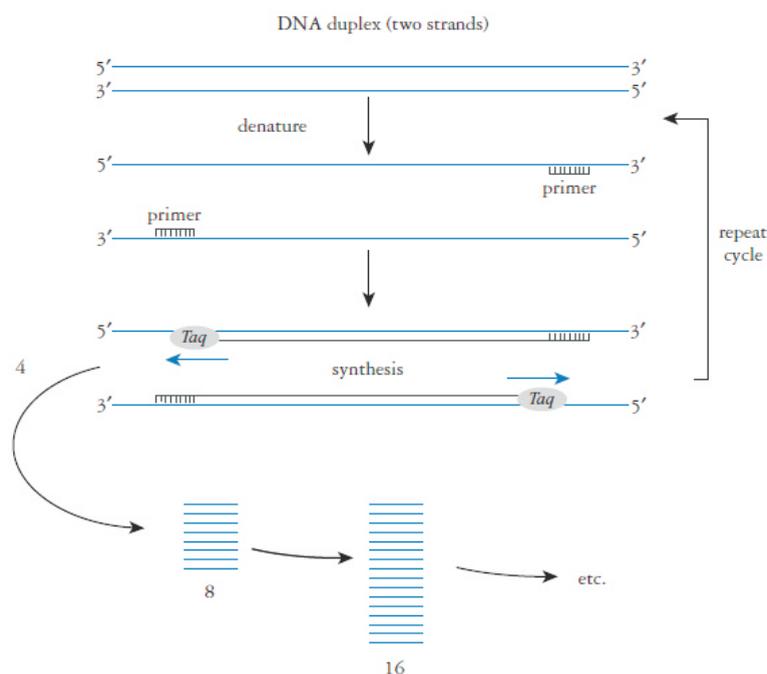
DNA *template* adalah DNA untai ganda yang membawa urutan basa fragmen atau gen yang akan digandakan. Urutan basa ini disebut juga urutan target (*target sequence*). Penggandaan urutan target pada dasarnya merupakan akumulasi hasil polimerisasi molekul primer. Primer adalah molekul oligonukleotida untai tunggal yang terdiri atas sekitar 30 basa. Polimerisasi primer dapat berlangsung karena adanya penambahan basa demi basa dari dNTP yang dikatalisasi oleh enzim DNA polimerase. Namun, pada PCR enzim DNA polimerase yang digunakan harus termostabil karena salah satu tahap reaksinya adalah denaturasi untai ganda DNA yang membutuhkan suhu sangat tinggi (sekitar 95°C). Salah satu enzim DNA polimerase yang umum digunakan adalah *taq* DNA polimerase, yang berasal dari bakteri termofilik *thermus aquaticus*.¹¹

Tiap putaran reaksi PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu denaturasi *template*, penempelan primer, dan polimerisasi primer, yang masing-masing berlangsung pada suhu lebih kurang 95°C, 50°C, dan 70°C. Pada tahap denaturasi, pasangan untai DNA templat dipisahkan satu sama lain sehingga menjadi untai tunggal. Pada

tahap selanjutnya, masing-masing untai tunggal akan ditemplei oleh primer. Jadi, ada dua buah primer yang masing-masing menempel pada untai tunggal DNA *template*. Biasanya, kedua primer tersebut dinamakan primer maju (*forward primer*) dan primer mundur (*reverse primer*). Setelah menempel pada untai DNA *template*, primer mengalami polimerisasi mulai dari tempat penempelannya hingga ujung 5' DNA *template*. Dengan demikian, pada akhir putaran reaksi pertama akan diperoleh dua pasang untai DNA, jika DNA *template* awalnya berupa sepasang untai DNA.¹²

Pasangan-pasangan untai DNA yang diperoleh pada suatu akhir putaran reaksi akan menjadi *template* pada putaran reaksi berikutnya. Begitu seterusnya hingga pada putaran yang ke n diharapkan akan diperoleh fragmen DNA pendek sebanyak $2^n - 2n$. Fragmen DNA pendek yang dimaksudkan adalah fragmen yang ukurannya sama dengan jarak antara kedua tempat penempelan primer. Fragmen pendek inilah yang merupakan urutan target yang memang dikehendaki untuk digandakan (diampifikasi).¹³

Alat-alat yang digunakan dalam pemeriksaan dengan menggunakan metode PCR antara lain, PCR *tube* 0,2 ml yang bebas *nuclease* digunakan sebagai tempat pembuatan PCR *mix* dengan komposisi sebagai berikut:



Gambar 1. Putaran Pertama PCR

<u>Komponen</u>	<u>Volume</u>
2x Reaction Mix	101
Primer PU 1 (Forward)	21
Primer SU 1 (Forward)	21
Primer Lep R1 (Reverse)	21
DNA	41

PCR *tube* ini harus bebas dari *nuclease* dengan tujuan agar DNA hasil isolasi tidak rusak oleh enzim nuklease. Tujuan PCR *mix* disentrifus sebentar adalah untuk memastikan agar tidak ada sisa remukan sel, protein, maupun RNA. *Thermal cycler* digunakan untuk tahap pemeriksaan PCR. Alat *thermal cycler* ini disesuaikan dengan program yang telah dijelaskan pada langkah kerja.¹²

Bahan-bahan yang digunakan antara lain Primer PU 1 (Forward) digunakan untuk mendeteksi *Leptospira* patogen dengan produk PCR sebesar 615 bp. Primer SU 1 (Forward) digunakan untuk mendeteksi *Leptospira* saprofit dengan produk PCR sebesar 316 bp. Primer Lep R1 digunakan sebagai *reverse* yang digunakan untuk membuat PCR *mix*. DNA hasil isolasi berfungsi sebagai komposisi utama dalam pembuatan PCR *mix*. Hasil PCR selanjutnya di *running* dengan elektroforesis untuk mengetahui jenis bakteri *Leptospira* yang berasal dari sampel darah manusia.

Langkah-langkah yang dilakukan dalam metode PCR diawali dengan pembuatan PCR *mix* dalam PCR *tube* 0,2 ml yang bebas *nuclease*, dan dikerjakan di dalam es menggunakan dua kali reaksi pencampuran dengan komposisi sebagai berikut: Primer PU 1 sebagai *forward* sebanyak 2 mikroliter, primer SU 1 (*forward*) sebanyak 2 mikroliter, primer Lep R1 sebagai *reverse* sebanyak 2 mikroliter, dan DNA 4 mikroliter. Komponen-komponen tersebut dicampur perlahan-lahan, dan dipastikan semua komponen berada di bagian bawah atau dasar

tabung, jika perlu dapat disentrifus sebentar. PCR *mix* selanjutnya dimasukkan ke dalam *thermal cycler*, kemudian alat dijalankan sesuai dengan program sebagai berikut: (i) Sintesis cDNA 1 siklus : 60°C selama 45 menit; (ii) Predenaturasi 1 siklus : 94°C selama 1 menit; (iii) Amplifikasi 30-35 siklus ; 94°C selama 1 menit (denaturasi), 60°C selama 30 detik (*annealing*), 68°C selama 1 menit (ekstensi); (iv) Ekstensi akhir 1 siklus : 68°C selama 5 menit. Untuk mengetahui hasil akhirnya, selanjutnya digunakan metode elektroforesis.

3. Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan DNA berdasarkan ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan antara lain agarosa. Dengan gel agarosa dapat dilakukan pemisahan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (pb). Molekul DNA bermuatan negatif sehingga di dalam medan listrik akan bermigrasi melalui matriks gel menuju kutub positif (*anode*). Makin besar ukuran molekulnya, makin rendah laju migrasinya. Berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA standar (*marker*) yang telah diketahui ukurannya. Visualisasi DNA selanjutnya dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dulu gel direndam di dalam larutan *etidium bromid*.¹⁴

Metode elektroforesis adalah metode untuk mengidentifikasi suatu zat berdasarkan pada sifat kelistrikan zat tersebut, khususnya berdasar besarnya berat molekul (BM) dan struktur fisik (ukuran) zat tersebut. Elektroforesis dalam dunia medis biasa digunakan dalam proses pencucian darah, diagnosis penyakit, dan digunakan dalam bidang

Tabel 1. Primer untuk Pemeriksaan Bakteri *Leptospira* dengan Metode PCR

Jenis Primer <i>Leptospira</i>	Sekuens Primer	Ukuran Pita
Forward:		
PU 1	Patogen 5'-TAT CAG AGC CTT TTA ATG G- 3'	PU 1 – Lep R1= 615
SU 1	Saprofit 5'-TTT AGG GTT AGC GTG GTA- 3'	SU 1 – Lep R1= 316
Reverse:		
Lep R1	5'-TAG TCC CGA TTA CAT TTT C- 3'	

farmasi untuk identifikasi DNA dalam pembuatan antibiotik.¹⁵

Marker adalah segmen DNA yang spesifik dan telah diketahui ukurannya. *Marker* berfungsi untuk mengetahui ukuran DNA hasil amplifikasi. *Marker* DNA (*fermentas*) berfungsi sebagai penanda posisi molekul DNA yang bermigrasi, untuk menentukan perkiraan ukuran basa-basanya. Fragmen DNA yang letaknya paling dekat dari sumuran adalah fragmen DNA yang memiliki berat molekul terbesar. Fragmen DNA marker yang laju migrasinya paling cepat atau paling jauh dari sumuran adalah fragmen marker yang memiliki berat molekul atau ukuran fragmen terkecil.¹⁶

Alat-alat yang digunakan dalam tahap elektroforesis adalah *microwave* yang digunakan untuk membuat gel agarosa. Baki gel agarosa berfungsi untuk mencetak gel agarosa sebagai tempat DNA sampel akan ditempatkan dalam sumuran-sumuran, sedangkan sisir elektroforesis digunakan untuk membuat sumuran. Sisir elektroforesis tersebut dipasang di salah satu ujung baki gel agarosa dengan posisi hampir menyentuh dasar baki. Selotip digunakan untuk melekatkan tiap ujung baki gel agarosa yang bertujuan mencegah terjadinya lubang pada masing-masing ujung baki. Tangki elektroforesis berfungsi sebagai tempat *running* elektroforesis. Mikropipet digunakan untuk memindahkan DNA ke dalam sumuran dengan volume 0,7 mikroliter. UV transilluminator digunakan untuk interpretasi hasil pemeriksaan PCR.¹⁵

Bahan dan larutan yang digunakan dalam *running* elektroforesis memiliki fungsi masing-masing. Gel agarosa merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk separasi protein dan asam nukleat, digunakan sebagai pematat, sebagai media elektroforesis. DNA marka sebagai DNA penanda. Larutan *buffer* TBE 1 X untuk penyangga. Akuades untuk melarutkan agarosa. Pewarna *Gold View* bekerja menyisip di sela-sela basa-basa DNA, berfungsi sebagai pewarna agar DNA dapat tervisualisasi pada UV Transilluminator.⁷

Pergerakan DNA pada elektroforesis dipengaruhi oleh beberapa faktor sebagai berikut:¹⁷

1. Ukuran molekul DNA

Molekul DNA kecil akan melintasi gel lebih cepat karena ruang gerak yang tersedia untuk melintasi gel lebih banyak.

2. Konsentrasi gel

Konsentrasi agarosa yang semakin tinggi menyebabkan molekul-molekul DNA sukar melewati gel. Konsentrasi gel tinggi mempermudah DNA berukuran kecil melewati gel, sedangkan konsentrasi gel rendah mempermudah molekul DNA berukuran besar untuk melintasi gel.

3. Bentuk molekul

Molekul yang berbentuk supercoil atau elips akan bergerak lebih cepat melewati gel.

4. Densitas muatan

Molekul dengan densitas tinggi akan lebih cepat bergerak dibandingkan molekul dengan densitas yang rendah. Densitas merupakan jumlah muatan per unit volume molekul.

5. Voltase

Voltase tinggi akan menyebabkan cepatnya pergerakan molekul DNA. Hal tersebut dikarenakan oleh tingginya muatan positif yang ditimbulkan.

6. Larutan *buffer*

Buffer dengan kadar ion tinggi akan menaikkan konduktansi listrik sehingga migrasi DNA akan lebih cepat.

Tahapan-tahapan dalam melakukan elektroforesis adalah membuat gel agarosa 1% dibuat dengan cara menimbang agarosa 0,3 g untuk dilarutkan ke dalam *buffer* TBE 1x hingga volume 30 ml. Larutan agarosa dididihkan hingga larut sempurna. Selanjutnya, baki gel agarosa disiapkan, selotip dilekatkan di tiap ujung baki gel agarosa (pastikan bahwa selotip melekat kuat dan tidak ada lubang pada masing-masing ujung baki). Sisir elektroforesis dipasang di salah satu ujung baki gel agarosa dengan posisi hampir menyentuh dasar baki. Suhu larutan agarosa ditunggu hingga sekitar 50-60°C, ditambahkan 1 µl *etidium bromid*. Sarung tangan digunakan untuk melindungi dari EtBr yang bersifat karsinogenik. Larutan agarosa dihomogenkan sebentar, kemudian larutan

dituangkan ke dalam baki gel agarosa, dibiarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat. Sisir diambil dengan hati-hati, selotip dilepaskan dari ujung-ujung baki. Baki yang telah berisi gel agarosa dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan larutan *buffer* TBE 1x (dipastikan bahwa gel terendam seluruhnya dalam TBE). DNA hasil PCR diambil 0,7 l menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumuran. Kabel dari sumber arus dihubungkan ke tangki elektroforesis (dipastikan bahwa kabel yang tersambung ke kutub negatif berada di dekat sumuran; jika tidak demikian, posisi baki/gel diubah ke arah sebaliknya). Sumber arus dinyalakan, voltase dan waktu *running* diatur hingga diperoleh angka 100 V dan 40 menit dengan cara menekan tombol yang sesuai pada sumber arus. Elektroforesis dijalankan (*running*) dengan cara tombol *run* pada sumber arus ditekan. Elektroforesis dihentikan apabila DNA-nya sudah mencapai garis ketiga. Sumber arus dimatikan dan baki diangkat dari tangki elektroforesis. Gel dikeluarkan dan diletakkan di atas UV transluminator (selubung kaca hitam diletakkan di atas UV transluminator). UV transluminator dinyalakan, pita-pita DNA yang tervisualisasi diamati.

KESIMPULAN

Komponen-komponen yang dibutuhkan dalam pemeriksaan bakteri *Leptospira* pada sampel darah manusia menggunakan metode PCR adalah DNA *template*, enzim *polymerase*, Primer PU 1 dan Primer SU 1 (*forward*), Primer Lep R1 (*reverse*), air, Mg²⁺, dan dNTP. Pemeriksaan bakteri *Leptospira* pada sampel darah manusia meliputi beberapa teknik, yaitu pengambilan sampel, isolasi DNA, pemeriksaan dengan metode PCR, dan *running* elektroforesis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hickey PW, Deemeks D. Leptospirosis. *Emedicine*. 2003: 1-9.
2. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization,

Geneva. 1982; 171.

3. Ebrahimi A, Nasr Z, Kojouri GHA. Seroinvestigation of bovine leptospirosis in Shahrekord district, central Iran. *Iranian J. Vet. Res.* 2004; 5(2): 110-113.
4. Rad MA, Zeinali A, Yousofi JV, Tabata AH, Brokaie S. Seroprevalence and bacteriological study of canine leptospirosis in Tchrn and its suburban areas. *Iranian J. Vet. Res.* 2004; 5(2): 73-80.
5. Rocha T. A review of leptospirosis in farm animals in Portugal. *Rev. Sci. Tech. Off. In. Epiz.* 1998; 17 (3): 699-712.
6. Hartman EG, Ingh TSGAM, Rothuizen J. Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG- specific ELISA. *Vet. Immunol, and Immunopathol.* 1986; 13: 261-271.
7. Kositanont. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2007: 117-122.
8. Albert B. Biologi molekular sel Edisi ke-2. Jakarta:Gramedia; 1994.
9. Doyle JJ, Doyle JL. 1997. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*
10. Arumingtyas EL. Isolasi DNA dan RAPD. Disampaikan pada Pelatihan Analisis DNA Fingerprinting Tanaman dengan Metode RAPD Tanggal 4-6 Juli 2011. Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya. Malang.
11. Jamilah. 2005. Pengaruh berbagai macam detergen, penambahan enzim, dan ekstrak nanas (*Ananas comusus* (L) Merr) Terhadap hasil isolasi DNA berbagai macam buah sebagai topik praktikum mata kuliah genetika. Skripsi.Malang:Universitas Negeri Malang; 2005.
12. Nicholl DST. An introduction to genetic engineering Third Edition. New York:Cambridge University; 2008.
13. Sachse K, Nat R, Frey J. PCR detection of microbial pathogens. Humana Press; 2010.
14. Saiki RKS, Faloona F, Mullis F, Horn KB, Erlich GT, Arnheim N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1989; 230: 1350-54.
15. Pratiwi R. Mengenal Metode Elektroforesis.

Jakarta:Puslitbang Oseanologi-LIPI; 2009.

16. Yepyhardi. 2009. Elektroforesis:pintu gerbang penelitian biologi molekular. [diakses tanggal 2 Juni 2013]. Available from: <http://sciencebiotech.net>.
17. Martin R. Gel electrophoresis: nucleid acids. Oxford: Bios scientific Publisher; 1996.