

DIAGNOSIS LEPTOSPIROSIS DAN KARAKTERISASI LEPTOSPIRA SECARA MOLEKULER

*Nur Ika Hariastuti**

Epidemiologi Leptospirosis di Asia Tenggara

Leptospirosis merupakan salah satu penyakit yang menjadi masalah kesehatan masyarakat pada beberapa negara di daerah Asia Tenggara (SEA). Leptospirosis masih menjadi penyakit yang terabaikan dan tidak tercatat dengan baik. Hal ini mungkin disebabkan oleh konfirmasi penyakit leptospirosis yang memerlukan uji laboratorium tidak selalu tersedia, dan diagnosis cepat untuk penyakit ini juga tidak dapat diandalkan.

Leptospirosis terus menjadi masalah yang signifikan di daerah dengan populasi tinggi seperti di negara-negara SEA. Jumlah total penduduk dari sebelas negara Asia Tenggara lebih dari 1,7 milyar dan 774 juta diantaranya dalam usia produktif dengan 447 juta orang terlibat dalam bidang pertanian sebagai salah satu faktor resiko. Di India, kejadian luar biasa leptospirosis banyak dilaporkan di berbagai wilayah. Penyakit ini juga umum dijumpai di Thailand, kebanyakan kasus terjadi di daerah timur laut, umumnya sebagai akibat dari banjir.

Di India, kejadian luar biasa leptospirosis dilaporkan meningkat pada berbagai wilayah di India seperti Kerala, Gujarat, Tamil Nadu dan Karnataka. Selain itu peningkatan kasus juga terus terjadi di daerah Goa, Andhra Pradesh dan Assam. Kebanyakan kasus leptospirosis terjadi di wilayah padat penduduk pada daerah pantai yang terkena rob.

Tidak ada publikasi data mengenai kasus leptospirosis pada manusia di Bhutan, namun, tersangka kasus leptospirosis pada manusia telah dilaporkan di daerah Chukha selama musim panas paskabanjir tahun 2008. Pusat pengkajian kesehatan hewan nasional mendeteksi kasus leptospirosis pada babi berdasarkan uji serologis. Sementara Maldives pertama kali menyatakan kasus leptospirosis pada manusia pada bulan November 2000, dan sejak itu penyakit ini diawasi secara nasional.

Di Indonesia, leptospirosis masih berperan sebagai penyakit berbahaya yang terabaikan dan terus menjadi masalah kesehatan. Kejadian tahunan berkisar antara 0,5 sampai 5,1 per 100.000 penduduk. Peningkatan jumlah kasus leptospirosis juga terlihat pada beberapa tahun terakhir di Srilanka, meskipun telah

dilaksanakan upaya-upaya pengendalian dan pencegahan. Catatan tahunan kejadian leptospirosis mendekati 14 per 100.000 penduduk.

Minimnya jumlah laboratorium yang dapat melakukan pemeriksaan leptospirosis terbakukan mendorong WHOSEARO untuk mengadakan pelatihan tentang diagnosis leptospirosis dan karakterisasi leptospirosis secara molekuler pada tanggal 2-8 Desember 2010. Pelatihan ini diselenggarakan oleh wakil dari Indian Council of Medical Research (ICMR) yaitu Regional Medical Research Centre Port Blair (RMRC-PB) yang merupakan WHO Collaborating Centre (WHO CC) untuk leptospirosis.

Regional Medical Research Centre, Port Blair

RMRC-PB terletak di Port Blair salah satu kota kecil di kepulauan Andaman & Nicobar yang berbatasan dengan provinsi NAD Indonesia. Institut ini banyak melakukan penelitian mengenai penyakit menular dan tidak menular yang umum dijumpai di kepulauan Andaman dan Nikobar dengan penekanan khusus pada masalah kesehatan dari suku-suku asli. Fokus kerja RMRC-PB meliputi leptospirosis, penyakit diare, hepatitis virus, tuberkulosis, penyakit filariasis limfatik, chikungunya, dan malaria. Sedangkan untuk penyakit tidak menular kronis fokus kerja meliputi diabetes mellitus dan penyakit kardiovaskuler serta isu-isu psiko-sosial termasuk alkoholisme dan pasca-trauma sindrom stres yang dipicu oleh bencana alam seperti gempa bumi dan tsunami. Selain itu RMRC-PB juga melakukan pengumpulan dan pemeriksaan informasi mengenai obat tradisional / praktek pengetahuan kaum pribumi tentang tanaman obat, rumput laut dan sifat obat tersebut.

Di bidang leptospirosis RMRC-PB telah melakukan kegiatan-kegiatan berupa

1. Pembentukan etiologi *Leptospira* dari 'Andaman Dengue' (penyakit demam misterius yang terkait dengan pendarahan paru yang terjadi sebagai wabah musiman selama 1980-an dan 90-an).
2. Pengembangan adat dan biaya tes cepat efektif untuk diagnosis leptospirosis dan teknik baru standar untuk karakterisasi genetik leptospirosis.
3. Pembentukan *Leptospira* Nasional Repository yang memelihara beberapa ratus strain referensi dan isolat leptospirosis dari berbagai bagian negeri di India dan luar negeri.

*Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

4. Pembentukan etiologi leptospira dari wabah demam berdarah yang terjadi di Orissa setelah super-topan pada tahun 1999.
5. Investigasi beberapa wabah Leptospirosis pada berbagai bagian negeri, dan membantu dalam penanggulangan, pengaturan pengawasan dan mengembangkan strategi untuk pencegahan dan pengendalian penyakit.

Ketersediaan jumlah kasus yang tinggi dan kontinyu mendukung kajian tentang leptospirosis yang mendalam dan berkelanjutan, sehingga RMRC-PB dapat menjadi *centre of excellence* penelitian leptospirosis dan diangkat menjadi WHOCC. Sebagai WHO *Collaborating Centre*, RMRC-PB memiliki tugas untuk melakukan diagnosis, penelitian, referensi dan pelatihan mengenai Leptospirosis, dengan mandat tambahan untuk mengembangkan laboratorium leptospirosis referensi di negara-negara lain di kawasan Asia Tenggara.

Kondisi Leptospirosis di Indonesia

Leptospirosis di Indonesia memiliki fenomena seperti gunung es, yang hanya tampak sedikit di permukaan, namun, jika kita melakukan pencarian yang intensif di wilayah endemis maka jumlah kasusnya akan jauh meningkat. Sebagai contoh di Kota Semarang pada tahun 2007 hanya tercatat 9 penderita, dan dengan pencarian yang intensif pada tahun 2008 ditemukan 131 pasien positif leptotek.

Kabar terbaru mengenai leptospirosis di Indonesia adalah terjadinya peningkatan jumlah kasus di Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) pada awal tahun 2011 ini. Pemda DIY menetapkan sebagai kejadian luar biasa (KLB) yang menyerang kabupaten Bantul, Kulon Progo dan Gunung Kidul. Dengan jumlah kematian yang cukup tinggi yaitu mencapai 10 orang dari 60 kasus. Pemda telah bekerja sama dengan Dirjen P2PL, WHO dan BBTCL Surabaya melakukan usaha penanggulangan wabah leptospirosis ini.

Hal lain yang perlu menjadi perhatian adalah adanya kemungkinan sapi ternak yang dikirim dari Indonesia ke Nicaragua sebagai bantuan, positif terinfeksi leptospira. Hal ini mungkin terjadi karena lemahnya daya dukung laboratorium yang mampu melakukan pemeriksaan leptospira terbakukan. Sampai dengan saat ini baru ada 2 laboratorium yang mampu melaksanakan *gold standard* pemeriksaan leptospirosis yaitu laboratorium FK UNDIP di RS Dr. Karyadi Semarang dan Laboratorium BBLITVET di Bogor. Sehingga sulit untuk mencakup wilayah Indonesia yang begitu luas. Oleh sebab itu masih diperlukan peningkatan kapasitas pemeriksaan yang diawali oleh peningkatan pengetahuan SDM melalui pelatihan mengenai diagnosis

Leptospirosis.

Diagnosis Leptospira

Diagnosa leptospira secara garis besar dapat dilakukan melalui 4 cara yaitu bakteriologis, mikroskopis, immunologis, dan biologi molekular. Secara bakteriologis diagnosis dapat dilakukan dengan cara isolasi dan inokulasi hewan uji. Hasil isolasi dapat menjadi bukti nyata terjadinya infeksi pada pasien. Namun leptospira termasuk jenis bakteri yang sensitif dan tidak mudah untuk dikembangbiakkan. Spirokaeta ini membutuhkan kondisi lingkungan yang berkisar pada suhu 28-30 °C dan pH 7-8. Selain itu, banyaknya jenis serotipe leptospira juga menambah tingkat kesulitan untuk memperoleh kultur biakan murni.

Secara mikroskopis pemeriksaan dapat dilakukan dengan cara *direct microscopy*, *immunohistochemical staining*, *immunofluorescence*, dan *silver impregnation techniques*. Secara mikroskopis pengamatan leptospira dapat dilakukan dengan menggunakan *dark ground microscope*, namun umumnya konsentrasi leptospira dalam darah sangatlah rendah. Pewarnaan immunohistokemikal dapat dilakukan antara antigen jaringan, antibodi primer dan sekunder serta enzim. Sedangkan teknik immunofluoresensi dapat dilakukan pada preparat segar atau yang telah difiksasi. Berbagai teknik silver impregnation dirancang untuk mendeteksi leptospira pada cairan tubuh maupun jaringan, namun teknik ini memiliki kelemahan yang sama dengan teknik *dark ground microscopy*.

Metode *microscopic agglutination test* (MAT), ELISA, *indirect haemagglutination test* (IH), *lepto dipstick*, *lepto lateral flow*, dan *lepto dri dot* juga dapat diaplikasikan untuk pemeriksaan serum penderita secara immunologis. Sebagai *gold standard* untuk pemeriksaan leptospira, metode MAT membutuhkan waktu dan tenaga yang cukup banyak untuk memelihara berbagai strain antigen uji. Disamping itu MAT juga membutuhkan keterampilan pemeriksa untuk menentukan titer dalam bentuk ikatan antigen-antibodi. Pemeriksaan leptospira dengan teknik ELISA sudah dapat dilakukan menggunakan tes kit yang banyak beredar dipasaran sehingga cukup praktis untuk laboratorium yang sudah memiliki alat ELISA reader. IH merupakan salah satu metode deteksi yang praktis, namun reagen-reagen yang digunakan memiliki masa pakai yang singkat. *Lepto dipstick*, *Lepto lateral flow*, dan *Lepto dri dot* adalah berbagai model *rapid test detection* yang dapat digunakan hanya bila suatu daerah telah dinyatakan sebagai daerah endemis.

Sedangkan, target DNA sequence amplification

(PCR and real-time PCR) dan *in-situ* hybridization (ISH) merupakan metode-metode yang digunakan untuk diagnosis leptospirosis secara molekuler biologis. Saat ini teknik PCR (Polimerase Chain Reaction) dan real-time PCR lebih banyak diminati karena dianggap lebih praktis dan memberikan hasil yang cukup akurat. Deteksi leptospira dapat dilakukan pada gen-gen yang stabil seperti *secY* dan *lipL32*. Sayangnya teknik ini masih terbilang cukup mahal untuk masyarakat Indonesia. *In-situ hybridization* termasuk teknik pewarnaan yang dapat dilakukan menggunakan probe DNA.

Karakterisasi *Leptospira* secara Molekular

Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) juga disebut *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) *fingerprinting*, teknik ini didasarkan pada amplifikasi DNA dalam PCR dengan primer oligonukleotida pendek acak. Ukuran dan jumlah produk yang diperbanyak tergantung pada primer tertentu dan DNA *template*. Teknik ini digunakan untuk membandingkan perbedaan intra dan inter-spesifik antar patogen termasuk leptospira. Teknik RAPD dapat diterapkan pada DNA murni atau ekstrak kasar sel dari koloni pada plate agar. Teknik ini juga digunakan untuk diferensiasi molekul dari berbagai isolat leptospira.

Restriction endonuclease analysis (REA) didasarkan pada fakta bahwa urutan nukleotida DNA yang berbeda memiliki asal genetik yang berbeda, dan akan memberikan pola pita yang berbeda dalam elektroforesis gel setelah perlakuan enzimatik. REA ini melibatkan ekstraksi DNA dari populasi yang homogen, pemotongan DNA dengan *restriction endonuclease* dan elektroforesis DNA pada gel agarosa. *Restriction endonuclease* mengenali dan memotong DNA untai ganda pada urutan tertentu, menghasilkan satu set fragmen. Fragmen ini sangat spesifik untuk karakterisasi molekul setiap jenis leptospira. Teknik REA cukup sensitif untuk membedakan antara strain leptospira yang berbeda berdasarkan perbedaan genetik. Dengan membandingkan peta restriksi dari strain yang berbeda, maka dapat dibedakan pula di tingkat molekul. Teknik ini sangat berguna untuk identifikasi molekul dari isolat leptospira dari berbagai sumber.

Teknik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) adalah teknik berbasis DNA yang diperkenalkan pada tahun 1990 sebagai alat yang ampuh untuk mendeteksi perbedaan antara kromosom organisme yang sangat erat terkait, dengan menggunakan analisis genom konvensional. Dengan RFLP analisis perbedaan urutan DNA ditentukan

dengan memeriksa ukuran fragmen yang terjadi ketika DNA dipotong dengan enzim restriksi. Analisis RFLP melibatkan ekstraksi DNA dari populasi yang homogen, pemotongan DNA dengan enzim restriksi dan elektroforesis DNA pada gel agarosa, *south blotting* pada membran nitroselulosa dan hibridisasi dengan probe yang spesifik.

Enzim restriksi yang berbeda akan mengenali urutan basa yang berbeda dan memotong DNA pada urutan tertentu, sehingga menghasilkan pola pita yang berbeda yang disebut sebagai sidik jari DNA. Saat ini karakterisasi strain leptospira ditingkat genom dengan pola-pola unik panjang fragmen restriksi polimorfisme DNA sudah umum dilakukan. Oleh karena itu teknik ini sangat berguna untuk identifikasi molekul isolat leptospira dari berbagai sumber dan untuk penyelidikan epidemiologi dalam penyebaran strain tertentu di masyarakat.

Praktek karakterisasi molekular pada pelatihan ini, dilakukan secara terpisah dalam beberapa kelompok dan masih sangat mendasar. Hal ini disebabkan karena keterbatasan waktu yang tersisa untuk mempelajari metode MAT sebagai *gold standard* pemeriksaan leptospirosis. Selain itu juga dilakukan kunjungan ke rumah sakit lokal untuk melakukan identifikasi gejala klinis pada pasien leptospirosis.

Simpulan

Loka Litbang P2B2 Banjarnegara saat ini sudah menjadi Balai Penelitian dan Pengembangan Penyakit Bersumber Rodensia. Peran serta dalam pelatihan diagnosis leptospirosis sebagai salah satu penyakit bersumber rodensia akan memberikan kontribusi dalam pengembangan diagnosis yang berstandar internasional. Diharapkan kedepannya Balai Litbang P2B2 Banjarnegara dapat menjadi *center of excellence* untuk penelitian-penelitian dalam rangka pengendalian penyakit bersumber rodensia di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA :

1. WHO. Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003.
2. Kumar GL, L Rudbeck. Immunohistochemical Staining Methods, 5ed. DAKO, California. 2009.
3. WHO Regional Office for South-East Asia. Leptospirosis Situation in the WHO South-East Asia Region. 2010.
4. Regional Medical Research Centre-Port Blair and WHO Country Office for India. Leptospirosis Laboratory Manual. 2007.