

Deteksi Spesies *Leptospira* Dengan Teknik *Conventional PCR* Pada Target Gen *secY*

Detection of Leptospira Species by Conventional PCR Technique Target on Gen secY

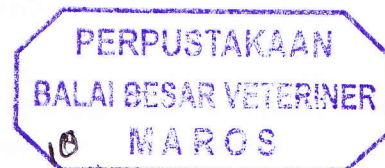
Muflihanah¹, Djatmikowati T.F², Anis S², Siswani², Haeriah², Rosmiaty²

¹⁾ Laboratorium Bioteknologi, Balai Besar Veteriner Maros

²⁾ Laboratorium Bakteriologi, Balai Besar Veteriner Maros

Email : muflibd@yahoo.com

titis.furi@yahoo.co.id



Intisari

Deteksi spesies *Leptospira* sangat penting diketahui karena untuk pengembangan diagnosa Leptospirosis di laboratorium. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi spesies *Leptospira* dengan menggunakan teknik *Conventional PCR* pada target gen *secY*.

Empat spesies bakteri standar *Leptospira interrogans* yaitu *L. hardjo*, *L. tarassovi*, *L. bataviae* dan *L. ichterohaemorrhagica* digunakan dalam pengembangan metode ini. Primer yang digunakan yaitu primer spesifik G1 dan G2 pada target gen *secY* menghasilkan panjang amplicon 285 pasangan basa. *Conventional PCR* dapat digunakan sebagai alternatif pengujian Leptospirosis karena lebih cepat, sensitif dan spesifik.

Kata kunci : *Leptospira*, gen *secY*, *cPCR*.

Abstract

Detection of Leptospira species is important to develop diagnosis in laboratory. The purpose of this research to detections Leptospira species by conventional PCR technique for target gen secY.

Four standart bacteria Leptospira interrogans L. hardjo, L. tarassovi, L. bataviae dan L. ichterohaemorrhagica were use to develop this methode. G1 and G2 primer target gen secY gived result amplicon length 285 base pair. Conventional PCR can be used for Leptospira alternatif test because faster, more sensitive and specific.

Key words : *Leptospira*, gen *secY*, *cPCR*.

PENDAHULUAN

Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang disebabkan bakteri patogenik dari genus *Leptospira*. Leptospirosis menyebar diberbagai negara terutama di daerah tropis dan subtropis. Secara global diperkirakan terjadi 500.000 kasus dan terjadi kematian 3 -70% tergantung dari manifestasi klinis (Ahmed *et al.*, 2009). Kejadian di Indonesia sangat tinggi pada manusia sedangkan pada hewan termasuk penyakit hewan menular strategis berdasarkan surat keputusan Menteri Pertanian Nomor 4026/Kpts/OT.140/4/2013.

Leptospira merupakan bakteri gram negatif, batang helix yang sangat aktif terkadang saling berikatan satu dengan yang lainnya. Bentuknya sangat tipis dan panjangnya 6-20 μm serta lebarnya 0.2-0.15 μm . Genus *Leptospira* terdiri dari patogenik dan saprofitik spesies, *Leptospira* saprofitik hidup dipermukaan air dan tidak bersifat parasitik. *Leptospira* patogenik umumnya disebabkan serovar spesies *L. interrogans* yang dapat menginfeksi binatang dan manusia (Ghane dan Yasouri, 2013). Hingga saat ini 17 spesies yang teridentifikasi patogen dan empat genomspesies *Leptospira*. Kurang lebih 200 serovar *Leptospira* patogen telah diidentifikasi dan hampir setengahnya terdapat di Indonesia (Ikawati dkk, 2010; OIE, 2008).

Reservoir utama *Leptospira* adalah rodentia dan wild animal. Pada hewan sering menimbulkan abortus, infertility, repeat breeding, gagal ginjal dan penyakit sistemik. Penularan ke manusia melalui kontak langsung dengan produk pertanian yang terkontaminasi *Leptospira* tanah, air, binatang, sayuran, daging susu dan industri. Penyakit tersebut juga diketahui menyebar melalui tikus

domestik dan banyak dijumpai sesudah banjir dan musim penghujan, sehingga sangat memungkinkan penularan pada manusia karena kontak dengan lingkungan yang terkontaminasi (Ikawati dkk, 2010; OIE, 2008). Pada Manusia menimbulkan sindroma klinis yang bervariasi dari ringan hingga fatal yaitu melibatkan organ syaraf, hati, jantung, *jaundice*, gagal ginjal, *myocarditis*, *pneumonia* pada manusia yang sulit dibedakan dengan penyakit lain yang mempunyai gejala dan epidemiologi serupa (Setiawan, 2008; Ghane dan Yasouri, 2013). Sehingga *Leptospirosis* merupakan salah satu *emerging infectious disease* di dunia dan memerlukan penanganan serius.

Diagnosis *Leptospira* menggunakan metode pengujian *culture* dan identifikasi (isolasi dan PCR) maupun secara serologi yaitu *Microscopy Agglutination Test* (MAT), dan *Enzyme Linked Immuno Assay* (ELISA) (OIE, 2008). Diagnosis *Leptospira* dengan metode *culture* organisme tidak mudah dilakukan karena *Leptospira* merupakan organisme yang membutuhkan media dan bahan yang sangat kompleks serta membutuhkan waktu inkubasi pada suhu $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ kurang lebih 16 minggu. Diagnosa secara serologis biasanya dipastikan dengan *Microscopic Agglutination Test* (MAT) sebagai *Gold Standart* yang mampu mendeteksi antibodi spesifik yang timbul dalam tubuh penderita pada saat terjadi infeksi. Umumnya respon antibodi spesifik muncul sekitar 8-10 hari sesudah munculnya gejala. Namun pengujian MAT masih terkendala karena ketersediaan antigen *Leptospira* hidup sebagai bahan dasar uji. (Setiawan, 2008 ; OIE, 2008). Selain itu pengujian serologis tidak dapat digunakan sebagai deteksi dini karena hasil diperoleh rata-rata dalam tujuh hari (Gravenkamp *et al.*, 1993).

Metode PCR memiliki beberapa keunggulan yaitu lebih cepat, mudah, lebih sensitif (28-96%), lebih spesifik, dapat mendeteksi bakteri yang tidak dapat tumbuh secara *invitro* atau tumbuh membutuhkan waktu yang lama. Sehingga PCR sebagai alternatif deteksi dini diagnosis *Leptospirosis* terutama pada kejadian *outbreak*.

TUJUAN

Tujuan pengembangan metode ini adalah sebagai alternatif konfirmasi pengujian penyakit hewan menular strategis penyakit *Leptospirosis*.

MATERI DAN METODE

Pada penelitian ini ekstraksi DNA menggunakan DNA kit *extraction* (Qiagen) Kemudian amplifikasi pada mesin PCR menggunakan reagen *Platinum Blue PCR Supermix* (Invitrogen, Cat. 12580-015) dengan susunan primer seperti pada Tabel 1 berikut :

Tabel 1. Primer dan amplifikasi target gen *secY*

Primer	5' to 3' Sequence	Target
G1	5'-CTGAAT CGC TGT ATA AAA GT -3	Gen <i>sec Y</i> (285 bp)
G2	5'GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG -3'	

Isolat bakteri standar *Leptospira interrogans* yaitu, *L. hardjo*, *L. tarassovi*, *L. bataviae*, & *L. ichterohaemorrhagica* dalam medium *Ellinghausen McCullough Johnson Harris* (EMJH) dari Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.

Kondisi *thermocycle* denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit sebanyak 30 siklus, *annealing* pada suhu 55°C selama 45 detik, *extension* pada suhu 72°C selama 30 detik dan *final extension* pada suhu 72°C selama 6 menit.

Kemudian dilakukan elektroforesis pada gel agarose 1,5 % dengan menggunakan voltase 110 volt dalam waktu 50 menit. Hasil elektroforesis kemudian dibaca di bawah sinar ultra violet.

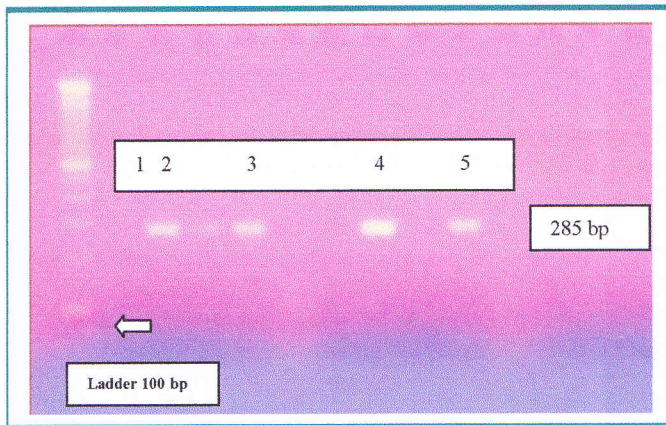
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis genetik bakteri *Leptospira* dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa target gen diantaranya *RNA polymerase β subunit* (*rpoB*), *DNA gyrase subunit β* (*gyrB*), *leptospira immunoglobulin like protein* (*ligB*). Secara taksonomi dapat dideteksi menggunakan 16S rRNA (Reitstetter, 2006, Balamurugan *et al.*, 2013). Selain itu beberapa literatur mengkaji deteksi *Leptospira*

pada target gen *secY* yang mengkode preprotein translokasi yang terletak diantara lokus S10-spc- α yang mengandung gen protein ribosomal.

Pada penelitian ini menggunakan primer G1 dan G2. Gen *secY* merupakan gen pemelihara dan merupakan daerah sejati yang dapat digunakan untuk interpretasi filogenetik sekuen *Leptospira* (Ahmed *et al*, 2009). Hasil penelitian Yalin Wang, *et al* (2011) menyatakan bahwa identifikasi *Leptospira* dengan menggunakan metode PCR primer G1/G2 dan B641/B642 menunjukkan hasil lebih signifikan daripada menggunakan pasangan primer *lipL32* ($P < 0.01$) pada hewan carier “wild rats”. Penelitian sebelumnya mengidentifikasi bahwa penggunaan primer G1/G2 mampu mendeteksi 10 pg DNA *Leptospira*, dan dibandingkan dengan *lipL32*, G1/G2 lebih sensitif mendeteksi DNA *Leptospira* pada jaringan tubuh *host*. Primer G1 dan G2 dapat membedakan secara keseluruhan spesies *pathogenic* dari bakteri *Leptospira* (Gravekamp *et al.*, 1993)

Pada penelitian ini target gen G1 dan G2 terbaca pada 285 pasangan basa pada empat serovar *L.interrogans* (*L. harjo*, *L. tarrasovi*, *L. ichterohaemorrhagica* dan *L.bataviae*).



Keterangan :

1. NTC
2. *Leptospira Hardjo*
3. *Leptospira Ichterohaemorrhagica*
4. *Leptospira Tarassovi*
5. *Leptospira Bataviae*

Gambar 1. Hasil visualisasi Conventional PCR *Leptospira*

KESIMPULAN

Deteksi *Leptospira* pada target gen *secY* menggunakan standar bakteri *L.interrogans* serovar *L. hardjo*, *L. tarrasovi*, *L. ichterohaemorrhagica* dan *L.bataviae* dengan primer G1 dan G2 terbaca pada 285 pasangan basa.

SARAN

Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap sampel lapangan menggunakan teknik PCR dibandingkan dengan pengujian isolasi dan serologi.

DAFTAR PUSTAKA

- A.Ahmed, M.F.M. Engelberts, K.R. Boer, N. Ahmed, R.A Hartskeerl.. 2009. Development and validation of real time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* spesie in Clinical Material. WHO/FAO/OIE and National
- Balamurugan, V., N.L.Gangadar, N. Mohandoss, S.R.A. Thirumalesh, M. Dhar, P. Krishnamoorthy, K. Prabhudas, H. Rahman. 2013. Characterization of *Leptospira* isolates from animals and humans :phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. Springer Plus Journal. Vol 2:362
- Gabriel *et al*, 2006. The Detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. Tropical Biomedicine 23(2): 207 (2006). Departement of Medical Microbiology-Faculty of Medicine, Malaya University. Malaysia.

- Gravekamp, C, H. Van De Kemp, M. Franzen, D. Carrinton, G.j. Schoone, G.J.J.M Van Eys, C.O.R.Everard, R.A. Hartskeerl, W.J. Terpstra. Detect of seven of pathogenic leptospires ny PCR using two sets of primers. 1193. Journal of General Microbiology Vol 139. P 1691 - 1700.
- OIE Terrestrial Manual, 2008, Chapter 2.1.9-Leptospirosis
- P S Cheema *et al*, 2007. Detection of pathogenic leptospirosis in animals by PCR based on *lipL21* and *lipL23* genes. Indian Journal of Experimental Biology. Vol.45, June 2007, pp 568-673.
- Reitstetter, R. E. 2006. Development of spesific-spesific PCR Primer sets for the detection of leptospira. FEMS Journal Vol 264 p. 31-39.
- Setiawan, I.M, 2008. Pemeriksaan Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk deteksi *Leptospira spp.* pada Penderita Leptospirosis. Majalah Kedokteran FK UKI. Vol XXVI No.2, April-Juni 2008.
- Wang Yalin *et al*, 2011. High prevalence of pathogenic *Leptospira* in wild and domesticated animals in an endemic area of China. Asian Pasific Journal of Tropical Medicine (2011)841-845.
- Collaborating Centre and Research on Leptospirosis and Section of Epidemiology, Departement of biomedical Reseaerch, Royal Tropical Institute (KIT), Amsterdam, The Netherlands. PloS ONE4(9): e7093. Doi:10.137/journal.pone.0007093
- Ghane, M. And Yasouri S.R, 2013. Isolation and Identification of pathogenic and saprofic *Leptospira spp.* from the rice fields of Tonekabon Township using culture and pCR technique. Departement of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon-Iran. Scholar Research Library. Annals of Biological research, 2013, 4(11):123-128.
- Songer J.G dan Post KW, 2005. Veterinary Micrbiology : Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. Elsevier Saunders. (244-250)