



---

## METODE DIAGNOSIS PENYAKIT LEPTOSPIROSIS DENGAN UJI MICROSCOPIC AGGLUTINATION TEST

Oleh

Adhitya Yoga Pradana Riyadi<sup>1)</sup> & Sunarno<sup>1)</sup>

<sup>1,2</sup>Universitas Diponegoro

Email: <sup>1</sup>[yoga.pradana88@gmail.com](mailto:yoga.pradana88@gmail.com) & <sup>2</sup>[sunzen07@gmail.com](mailto:sunzen07@gmail.com)

### Abstrak

Leptospirosis merupakan penyakit menular pada hewan dan manusia yang disebabkan oleh bakteri motil dengan genus *Leptospira*. Penyakit ini ditemukan di seluruh dunia baik pada hewan atau manusia, terutama di daerah tropis atau sub tropis dengan curah hujan yang tinggi. Leptospirosis pada awalnya sering salah didiagnosis sebagai meningitis, influenza, penyakit hepar atau demam (pyrexia) dari sumber yang tidak diketahui. Banyak metode yang digunakan untuk mendiagnosis penyakit leptospirosis, salah satunya adalah metode serologis dengan uji MAT (*Microscopic Agglutination Test*) untuk diagnosis antibodi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui tahapan dalam melakukan uji MAT untuk diagnosis penyakit leptospirosis. Metode MAT dibagi menjadi dua kelompok, yaitu alat dan bahan untuk persiapan kultur antigen *Leptospira* dan alat dan bahan untuk uji MAT. Tahapan uji MAT dibagi menjadi tiga tahap, yaitu persiapan kultur antigen *Leptospira*, persiapan sampel yang ingin diuji dan uji MAT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji MAT yang dilakukan di laboratorium Bakteriologi B2P2VRP Salatiga dibagi menjadi tiga tahap, yaitu persiapan kultur antigen *Leptospira*, persiapan sampel yang akan diuji dan prosedur uji MAT. Ada satu sampel serum manusia dari total 32 sampel yang menunjukkan aglutinasi.

**Kata Kunci:** *Leptospira*, Leptospirosis, Antibody, Uji MAT & Uji Serologis

### PENDAHUALUAN

Leptospirosis merupakan penyakit menular pada hewan dan manusia yang disebabkan oleh bakteri motil dengan genus *Leptospira* [1]. Penyakit ini ditemukan di seluruh dunia baik pada hewan atau manusia, terutama di daerah tropis atau sub tropis dengan curah hujan yang tinggi [2]. Manusia dapat terkena leptospirosis melalui urin dari hewan peliharaan atau ternak seperti sapi, babi, anjing dan tikus [3]. Leptospirosis pada awalnya sering salah didiagnosis sebagai meningitis, influenza, penyakit hepar atau demam (pyrexia) dari sumber yang tidak diketahui [4]. Banyak metode yang digunakan untuk mendiagnosis penyakit leptospirosis, yaitu metode diagnosis langsung secara mikroskopis menggunakan mikroskop medan gelap, kultur primer menggunakan media EMJH (Elinghausen, McCullough, Johnson, Harris), dan isolasi primer pada sampel yang terkontaminasi. Metode lain yang juga digunakan untuk diagnosis leptospirosis adalah metode

molekuler dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) langsung pada sampel yang terkontaminasi, metode serologis dengan uji MAT (*Microscopic Agglutination Test*) dan uji ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) untuk diagnosis antibodi.

Salah satu metode diagnosis leptospirosis yang dilakukan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga adalah uji MAT. Uji MAT adalah metode diagnosis yang digunakan sebagai uji acuan (*gold standard*) untuk diagnosis antibodi. Uji MAT menggunakan antigen 2 hidup dan merupakan uji serologis yang paling banyak dilakukan sebagai uji referensi pada semua uji serologis lainnya [5].

Prinsip kerja dari uji MAT adalah dengan menginkubasi sampel dari pasien dengan berbagai serovar dari *Leptospira*. Sampel yang biasa digunakan untuk uji MAT adalah serum darah. Hasil positif dari uji MAT adalah adanya penggumpalan pada sampel yang sudah



ditambahkan antigen *Leptospira* serovar tertentu yang menunjukkan reaksi antara serum dan antigen *Leptospira*. Serovar yang bereaksi dengan serum pasien terindikasi sebagai serovar yang menginfeksi. Informasi pada serovar yang menginfeksi yang didapatkan uji MAT digunakan untuk studi epidemiologi [6].

Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menganalisis tahapan dalam melakukan uji MAT untuk diagnosis penyakit leptospirosis. Diagnosis leptospirosis yang dapat digunakan sebagai metode dalam pengembangan penelitian baik bagi peneliti, akademisi maupun stakeholder serta tenaga medis

## LANDASAN TEORI

Leptospirosis adalah penyakit akibat bakteri *Leptospira* sp. yang dapat ditularkan dari hewan ke manusia atau sebaliknya. Leptospirosis dikenal juga dengan nama Weil's disease, demam Icterohemorrhage, Swineherd's disease, Ricefield fever, Cane-cutter fever, Demam Lumpur, Jaundis berdarah, Penyakit Stuttgart, Demam Canicola, penyakit kuning non virus, penyakit air merah pada anak sapi, dan tifus anjing [7].

Leptospirosis merupakan penyakit yang dapat ditularkan melalui air (water borne disease). Urin (air kencing) dari individu yang terserang penyakit ini merupakan sumber utama penularan, baik pada manusia maupun pada hewan. Kemampuan *Leptospira* untuk bergerak dengan cepat dalam air menjadi salah satu faktor penentu utama yang dapat menginfeksi induk semang (*host*) yang baru. Hujan deras membantu penyebaran penyakit ini, terutama di daerah banjir. Gerakan bakteri memang tidak memengaruhi kemampuannya untuk memasuki jaringan tubuh namun mendukung invasi dan penyebaran di dalam aliran darah induk semang [8].

Masa inkubasi Leptospirosis pada manusia yaitu 2-26 hari. Infeksi Leptospirosis mempunyai manifestasi yang sangat bervariasi dan kadang tanpa gejala, sehingga sering terjadi kesalahan diagnose. Infeksi *L. interrogans* dapat berupa

infeksi subklinis yang ditandai dengan flu ringan sampai berat. Hampir 15-40% penderita terpapar infeksi tidak bergejala tetapi serologis positif. Perjalanan penyakit *Leptospira* terdiri dari dua fase, yaitu fase septisemik dan fase imun [9]. Untuk mengukuhkan diagnosa Leptospirosis biasanya dilakukan pemeriksaan serologis. Antibodi dapat ditemukan di dalam darah pada hari ke 5-7 sesudah adanya gejala klinis. Kultur atau pengamatan bakteri *Leptospira* di bawah mikroskop berlatar gelap umumnya tidak sensitif. Tes serologis untuk mengonfirmasi infeksi Leptospirosis yaitu *Microscopic agglutination test* (MAT). Tes ini mengukur kemampuan serum darah untuk mengaglutinasi bakteri *Leptospira* yang hidup [10].

Uji MAT didefinisikan sebagai pengenceran bertingkat pada serum yang ditemukan dengan volume yang sama dari suspensi *Leptospira* pada suhu tertentu selama waktu tertentu dan diamati secara mikroskopis dengan memperkirakan 50% aglutinasi sebagai titik terakhir titer pada campuran reaksi. Pengenceran serum dilakukan pada *microtiter plates* dan ditambahkan *Leptospira* hidup. Terdapat lebih dari 250 serovar *Leptospira* berbeda yang diketahui di seluruh dunia. Dengan melihat spesifitas serovar dari MAT, panel *Leptospira* harus digunakan, idealnya terdiri dari isolat terbaru dan mewakili serovar yang beredar dalam area dimana pasien terinfeksi. Secara alternatif, referensi perwakilan strain *Leptospira* global yang direkomendasi oleh World Health Organization dapat digunakan. Secara umum, laboratorium menggunakan subkultur *Leptospira* berusia 5-7 hari. Untuk standarisasi, sebelum uji dilakukan sebaiknya kultur diatur hingga mencapai konsentrasi  $2 \times 10^8$  *Leptospira* per ml. Kepadatan kultur *Leptospira* dapat ditentukan dengan menghitung dengan *counting chamber* yang sesuai (Helber atau Petroff-Hauser, kedalaman cell 0.02 mm), mengukur densitasi optik (OD) kultur dengan spektrofotometri pada 420 nm, menggunakan skala McFarland, dan memperkirakan jumlah *Leptospira* per area dengan mikroskop fase gelap [11].



## METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga pada bulan Maret 2019. Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi dua kelompok, yaitu alat dan bahan untuk persiapan kultur antigen *Leptospira* dan untuk uji MAT.

Alat yang digunakan untuk persiapan kultur antigen *Leptospira* adalah masker, *nitrile gloves*, jas laboratorium, tisu, dua buah bunsen, 15 buah spuit 3cc, spuit 10cc, tabung *conical steril*, parafilm, marker, kaca objek, *Petroff-Hausser counting chamber*, *laminar air flow*, inkubator dan mikroskop medan gelap. Alat yang digunakan untuk uji MAT adalah masker, *nitrile gloves*, jas laboratorium, *micropipet multichannel*, *tip mikropipet*, *microplate U bottom*, *reagen reservoir*, *biohazard bag*, kaca objek, mikroskop medan gelap, kamera dan inkubator.

Bahan yang digunakan untuk persiapan kultur antigen *Leptospira* adalah alkohol 90%, media EMJH (*Elinghausen*, *McCullough*, *Johnson*, *Harris*) dan kultur murni *Leptospira* dari 15 serovar. Bahan yang digunakan untuk uji MAT adalah *phosphate buffer saline* (PBS) 1×, alkohol 90%, kultur antigen *Leptospira* dari 15 serovar, sampel serum manusia (n = 19) dan sampel darah tikus (n = 13).

### Tahapan Uji MAT

Penelitian dilakukan dengan melakukan uji MAT pada sampel di Laboratorium Bakteriologi B2P2VRP Salatiga. Uji MAT yang dilakukan dibagi menjadi tiga tahap, yaitu persiapan kultur antigen *Leptospira*, persiapan sampel yang akan diuji, dan uji MAT.

#### a. Persiapan Kultur Antigen *Leptospira*

Persiapan kultur antigen *Leptospira* dibagi menjadi tiga prosedur, yaitu rekultur *Leptospira*, pemeriksaan pertumbuhan, dan pengambilan kultur antigen *Leptospira* untuk uji MAT. Rekultur *Leptospira* diawali dengan menyalakan ultraviolet pada *laminar air flow* dinyalakan selama 30 menit sebelum alat ini digunakan.

Aliran udara pada *laminar air flow* dinyalakan. Area kerja dibersihkan dengan disemprot alkohol 90% kemudian dibersihkan dengan tisu. Tempat kerja *laminar air flow* dibagi menjadi tiga bagian, yaitu bagian steril, bagian tempat kerja dan bagian hasil. Bunsen dinyalakan di samping kiri dan kanan tempat kerja. Tabung conical steril diisi dengan media EMJH cair yang dilarutkan dengan aquabides dan ditambahkan pengayaan, masing-masing sebanyak 10 ml menggunakan spuit 10 cc. Kultur murni *Leptospira* diinokulasikan ke dalam tabung conical masing-masing sebanyak 1 cc sesuai jenis serovarnya. Tabung conical ditandai dengan marker sesuai serovarnya. Tabung conical ditutup dan dilapisi dengan parafilm pada tutupnya. Kultur baru diinkubasi pada suhu 28-30°C selama 5-7 hari.

#### b. Pemeriksaan Pertumbuhan Kultur *Leptospira*

Pemeriksaan pertumbuhan kultur *Leptospira* diawali dengan kegiatan menyalakan UV pada *laminar air flow* dinyalakan selama 30 menit sebelum alat ini digunakan. Aliran udara pada *laminar air flow* dinyalakan. Area kerja *laminar air flow* dibersihkan dengan disemprot alkohol 90% kemudian dibersihkan dengan tisu. Alat dan bahan disiapkan di dalam *laminar air flow*. Tempat kerja *laminar air flow* dibagi menjadi tiga bagian, yaitu bagian steril, bagian tempat kerja dan bagian hasil. Bunsen dinyalakan di samping kiri dan kanan tempat kerja. Spuit 3 cc disiapkan sebanyak 15 buah sesuai jumlah serovar yang ada, kemudian setiap spuit ditandai dengan marker sesuai jenis serovar yang akan diambil. Kultur antigen *Leptospira* dalam tabung conical dibuka kemudian diambil sebanyak 2 µl menggunakan spuit 3 cc sesuai jenis serovarnya dengan teknik aseptis. Kultur antigen *Leptospira* yang sudah diambil lalu diteteskan ke kaca objek kemudian diamati dengan mikroskop medan gelap untuk dihitung kepadatannya dengan *Petroff-Hausser counting chamber* dan diamati ada atau tidak kontaminasi.

#### c. Pengambilan Kultur Antigen *Leptospira* untuk Uji MAT



Pengambilan kultur antigen *Leptospira* untuk Uji MAT diawali dengan kegiatan menyalakan UV pada *laminar air flow* dinyalakan selama 30 menit sebelum alat ini digunakan. Aliran udara pada *laminar air flow* dinyalakan. Area kerja *laminar air flow* dibersihkan dengan disemprot alkohol 90% kemudian dibersihkan dengan tisu. Tempat kerja *laminar air flow* dibagi menjadi tiga bagian, yaitu bagian steril, bagian tempat kerja dan bagian hasil. Bunsen dinyalakan di samping kiri dan kanan tempat kerja. S spuit 3 cc disiapkan sebanyak 15 buah sesuai jumlah serovar yang ada kemudian setiap spuit ditandai dengan marker sesuai jenis serovar yang akan diambil. Kultur antigen *Leptospira* dalam tabung conical dibuka, kemudian diambil sebanyak 2 ml dengan spuit 3 cc sesuai dengan jenis serovar dengan teknik aseptis. Setelah tabung conical berisi kultur antigen *Leptospira* dibuka, tabung conical ditutup kembali dan dilapisi dengan parafilm. S spuit yang sudah berisi kultur antigen *Leptospira* siap digunakan untuk uji MAT.

#### **Persiapan Sampel yang Ingin di Uji dengan Uji MAT**

Sampel yang diperiksa dengan uji MAT di Laboratorium Bakteriologi B2P2VRP Salatiga adalah serum manusia dan darah hewan yaitu tikus, kelinci, dan sapi. Serum manusia yang diperiksa dengan uji MAT umumnya diambil saat hari ke 7 dari awal infeksi. Sampel yang digunakan untuk praktik langsung berjumlah 32 sampel yang terdiri dari 19 sampel serum manusia dan 13 sampel darah tikus.

#### **Uji MAT**

Uji MAT dibagi menjadi empat prosedur, yaitu *screening* sampel, pengamatan hasil *screening* sampel, uji MAT lanjutan, dan pengamatan hasil uji MAT lanjutan. *Screening* sampel bertujuan untuk mengefisienkan waktu dan bahan pemeriksaan. Prinsipnya adalah mengetahui ada atau tidaknya reaksi antibodi terhadap antigen *Leptospira* tanpa melihat titernya. Prosedur *screening* sampel diawali dengan menyiapkan alat dan bahan. Dua microplate disiapkan dan dilabeli sesuai kode sampel dan jenis serovarnya. Baris ke delapan

microplate kedua digunakan untuk kontrol negative. Sampel yang akan diuji diencerkan menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) 1× yang berfungsi mempertahankan konsistensi pH, dengan perbandingan 1:20 dengan cara mengisi sumuran microplate kolom pertama dengan PBS 1× sebanyak 95 µl kemudian ditambahkan 5 µl sampel sesuai kode sampel. Campuran PBS dan sampel dihomogenkan dengan mikropipet multichannel. Campuran PBS dan sampel diambil 50 µl kemudian dibuang ke dalam *biohazard bag*. Kultur antigen *Leptospira* dalam spuit dikeluarkan ke reagen reservoir sesuai jenis serovarnya. Sumuran yang telah berisi sisa campuran PBS dan sampel ditambahkan 50µl antigen *Leptospira* sesuai jenis serovarnya lalu dihomogenkan dengan mikropipet multichannel. Untuk kontrol negatif, sumuran diisi 50 µl PBS lalu ditambahkan antigen *Leptospira* sebanyak 50 µl sesuai dengan jenis serovarnya. Microplate ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-4 jam.

Tahap berikutnya adalah pengamatan hasil *screening* sampel. Larutan sampel yang sudah diinkubasi diambil masing-masing kurang lebih 1.3 µl dengan mikropipet lalu diletakkan di kaca objek. Larutan sampel diamati dibawah mikroskop medan gelap dengan perbesaran 100×, selanjutnya diamati ada atau tidaknya aglutinasi kemudian dibandingkan dengan kontrol negatif. Sampel memenuhi syarat dilakukan uji MAT lanjutan jika terdapat aglutinasi dan bakteri bebas dengan perbandingan 50:50. Setelah melakukan *screening* pada 32 sampel, terdapat empat sampel yang menunjukkan aglutinasi yaitu dua sampel serum manusia dan dua sampel darah tikus. Keempat sampel ini akan diperiksa kembali dengan uji MAT lanjutan.

#### **Uji MAT Lanjutan**

Uji MAT lanjutan dilakukan pada empat sampel yang menunjukkan agglutinasi pada tahap *screening* sampel. Uji MAT lanjutan bertujuan untuk mengetahui jenis serovar yang menginfeksi sampel tersebut serta titernya. Prosedur uji MAT lanjutan diawali dengan menyiapkan alat dan bahan. Microplate disiapkan dan dilabeli sesuai dengan kode sampel dan jenis serovarnya. Baris



ke delapan microplate digunakan untuk kontrol negative. Sampel diencerkan menggunakan PBS 1× dengan perbandingan 1:20 dengan mengisi sumuran kolom pertama microplate dengan PBS 1× sebanyak 95 µl lalu ditambahkan 5 µl sampel sesuai kode sampel. Pada kolom kedua sampai kolom ke duabelas diisi PBS 1× sebanyak 50 µl. Campuran PBS dan sampel pada kolom pertama microplate dihomogenkan dengan mikropipet multichannel. Sampel diencerkan dengan perbandingan 1:40 dengan cara campuran PBS dan sampel pada kolom pertama microplate diambil sebanyak 50 µl lalu ditambahkan ke kolom kedua dan seterusnya sampai kolom ke-12. Setelah campuran PBS dan sampel dari kolom ke-11 dihomogenkan pada sumuran ke-12, campuran PBS dan sampel diambil sebanyak 50 µl lalu dibuang ke biohazard bag. Campuran ini merupakan pengenceran dengan perbandingan 1:40.960. Kultur antigen Leptospira dalam spuit dikeluarkan ke reagen reservoir sesuai jenis serovarnya. Sumuran microplate ditambahkan 50 µl antigen Leptospira sesuai jenis serovarnya lalu dihomogenkan dengan mikropipet. Untuk kontrol negatif, sumuran diisi 50 µl PBS lalu ditambahkan antigen Leptospira sebanyak 50 µl sesuai jenis serovarnya. Microplate ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-4 jam.

#### Pengamatan Hasil Uji MAT Lanjutan

Larutan sampel yang sudah diinkubasi diambil masing-masing ± 1,3 µl dengan mikropipet kemudian diletakkan di kaca objek. Larutan sampel diamati dibawah mikroskop medan gelap dengan perbesaran 100× untuk mencari ada atau tidaknya aglutinasi dan bakteri bebas pada setiap serovar, tingkat pengenceran serta cut of titre setiap serovar. Cut off titer ditentukan pada pengenceran ke berapa ditemukan aglutinasi dan bakteri bebas dengan perbandingan 50:50. Sampel yang menunjukkan hasil positif lalu ditandai dan dicatat jenis serovarnya.

#### Data analysis

Data hasil pengamatan dianalisis secara diskriptif kualitatif. Sampel serum yang mengalami aglutinasi menunjukkan keberadaan bakteri leptospirosis pada sampel yang diamati.

<http://ejurnal.binawakya.or.id/index.php/MBI>

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji MAT membutuhkan kultur hidup Leptospira dengan berbagai serovar berbeda. Jumlah serovar dari Leptospira adalah 15 serovar. Serovar ini diperoleh dari India Council of Medical Research (ICMR). Jenis serovar ditunjukkan pada Tabel 1.

**Tabel 1. Daftar serovar Leptospira**

Serogroup	Serovar	Strain
<i>Autumnalis</i>	<i>Bangkinang</i>	Bangkinang I
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Hond Uterrecht IV
<i>Pyrogens</i>	<i>Pyrogens</i>	Salinem
<i>Sejroe</i>	<i>Hardjo</i>	Harjoprajitno
<i>Djasiman</i>	<i>Djasiman</i>	Djasiman
<i>Grippothyphosa</i>	<i>Grippothyphosa</i>	Moskva V
<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	RGA
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Pomona
<i>Pyrogens</i>	<i>Robinsoni</i>	Robinsoni
<i>Bataviae</i>	<i>Bataviae</i>	Swart
<i>Tarassovi</i>	<i>Rama</i>	316
<i>Mini</i>	<i>Mini</i>	Sari
<i>Sarmin</i>	<i>Sarmin</i>	Sarmin
<i>Manhao</i>	<i>Manhao</i>	LT-130

Tabel 1 menunjukkan jenis serogroup, serovar, dan strain dari Leptospira. Ada 19 serovar dari Leptospira namun empat dari serovar ini tidak bisa tumbuh dengan baik pada media kultur rutin sehingga yang tersisa hanya 15 serovar, yaitu Bangkinang, Canicola, Pyrogens, Hardjo, Djasiman, Grippothyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Robinsoni, Bataviae, Mini, Rama, Sarmin, dan Manhao. Empat serovar yang tidak bisa tumbuh tersebut adalah Australis, Louisiana, Poi, dan Cynopteri. Empat serovar ini tidak bisa tumbuh.

#### Gambar 1. Kultur antigen Leptospira



Kultur antigen *Leptospira* dibedakan menjadi kultur murni dan kultur rutin. Kultur murni adalah kultur yang menggunakan media Fletcher untuk pertumbuhan *Leptospira*, sedangkan kultur rutin adalah kultur antigen *Leptospira* yang digunakan untuk uji MAT. Kultur rutin *Leptospira* menggunakan media EMJH disimpan dalam tabung *conical* yang ditunjukkan oleh Gambar 1. Kultur rutin dibuat setiap 7 hari sekali atau menyesuaikan waktu persiapan uji MAT. Kultur antigen *Leptospira* yang akan digunakan untuk uji MAT perlu dicek terlebih dahulu pada prosedur pengamatan pertumbuhan kultur *Leptospira* setelah dilakukan rekultur. Pengamatan pertumbuhan kultur *Leptospira* dilakukan menggunakan *Petroff-Hausser counting chamber*. Hasil dari pengamatan pertumbuhan kultur *Leptospira* dibagi menjadi 3 kelompok, yang meliputi positif satu (+) jika kepadatan kultur kurang dari  $2 \times 10^8$  bakteri/ml; positif dua (++) jika kepadatan kultur  $2 \times 10^8$  bakteri/ml; dan positif tiga (+++) jika kepadatan kultur lebih dari  $2 \times 10^8$  bakteri/ml.

Kultur antigen *Leptospira* yang digunakan untuk uji MAT harus memiliki kepadatan kultur  $2 \times 10^8$  bakteri/ml, berusia 5-7 hari, ditumbuhkan dalam medium EMJH cair dan diinkubasi pada suhu 28-30 °C, selain itu kultur antigen *Leptospira* juga harus bebas dari kontaminasi, seperti kontaminasi serovar lain dari *Leptospira* yang tidak sesuai dengan tempatnya dan kontaminasi dari bakteri lain selain bakteri *Leptospira*. Kultur *Leptospira* harus berusia 5-7 hari karena *Leptospira* perlu ditumbuhkan untuk mencapai kepadatan kultur  $2 \times 10^8$  bakteri/ml dan waktu yang dibutuhkan adalah kisaran 5-7 hari.

Kultur *Leptospira* menggunakan media EMJH cair dan diinkubasi pada suhu 28-30°C karena media EMJH cair selain diperlukan untuk menumbuhkan kultur *Leptospira*, media cair tidak mengganggu reaksi antara *Leptospira* sebagai antigen dan antibodi tubuh saat uji MAT dilakukan. Suhu 28-30°C digunakan untuk inkubasi bakteri *Leptospira* karena suhu menyerupai suhu normal makhluk hidup, oleh karena itu suhu ini ideal untuk menumbuhkan bakteri *Leptospira*. Sampel yang diperiksa dengan uji MAT pada penelitian ini adalah sampel serum manusia ( $n = 19$ ) dan sampel darah tikus ( $n = 13$ ).

**Tabel 2. Hasil Uji MAT**

Jenis sampel	Sampel	Positif	Negatif	Serovar positif
Serum manusia	19	1	18	Bataviae, Djasiman, Icterohaemorrhagiae, Mini, Rama
Darah tikus	13	-	13	-
Keterangan	Titer pada setiap serovar yang menunjukkan hasil positif adalah 1:80 pada Bataviae dan Mini, 1:160 pada Rama, 1:320 pada Canicola, Djasiman dan Hebdomadis, dan 1:640 pada Icterohaemorrhagiae			

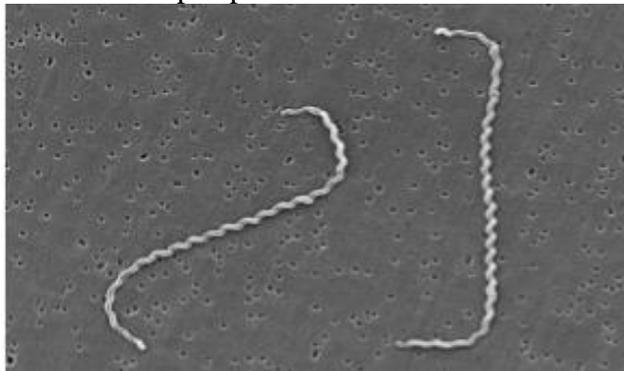
Hasil uji MAT yang ditampilkan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa ada satu sampel serum manusia dari total 32 sampel yang menunjukkan aglutinasi. Aglutinasi terjadi karena ada reaksi antara *Leptospira* sebagai antigen dan antibodi tubuh. Serovar yang menunjukkan aglutinasi dengan antibodi adalah serovar Bataviae pada titer 1:80, Canicola pada titer 1:320, Djasiman pada titer 1:320, Hebdomadis pada titer 1:320, Icterohaemorrhagiae pada titer 1:640, Mini pada titer 1:80 dan Rama pada titer 1:160. Titer yang berbeda-beda menunjukkan tingkat aglutinasi antara serovar-serovar yang digunakan pada uji MAT.

Uji MAT adalah uji serologis untuk deteksi antibodi yang telah digunakan secara luas sebagai uji referensi karena uji MAT dapat mendeteksi antibodi IgG dan IgM pada serum. Uji MAT juga memiliki sensitifitas dan spesifitas yang tinggi, yaitu masing-masing 91,94% dan 73,77% [12]. Uji MAT dilakukan dengan menginkubasi serum



pasien dengan berbagai serovar dari *Leptospira* [13]. Uji MAT untuk diagnosis leptospirosis yang bermanfaat untuk memeriksa sampel yang diduga terinfeksi leptospirosis dengan melihat reaksi antibodi tubuh terhadap bakteri *Leptospira* yang menjadi penyebab leptospirosis. Uji MAT membutuhkan kultur hidup *Leptospira* sebagai antigen yang akan bereaksi dengan antibodi tubuh.

Gambar 2. *Leptospira* strain RGA 01



Leptospirosis disebabkan oleh bakteri *Leptospira* yang berbentuk spiral, tipis, lentur dengan panjang 10-20  $\mu\text{m}$  dan tebal 0,1  $\mu\text{m}$  serta memiliki dua lapis membran. *Leptospira* adalah bakteri spirochaeta gram negatif aerob obligat dengan flagella periplasma. Ketika dilihat melalui mikroskop medan gelap, bakteri ini sering menyerupai tanda tanya, dan hal ini menggambarkan nama dari spesies ini. Bakteri ini adalah anggota dari genus *Leptospira*. Beberapa serovar patogen dari spesies ini adalah *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, dan *Australis* [14]. Antigen (Ag) adalah struktur (atau senyawa) yang secara spesifik terikat oleh antibodi (Ab) atau permukaan sel dari Ab, yaitu reseptor antigen sel B (BCR) [15]. *Leptospira* mempunyai lebih dari 170 serovar patogen yang telah diidentifikasi dan hampir setengahnya terdapat di Indonesia [16]. Ada 20 spesies *Leptospira* yang terdiri atas lebih 200 serovar dan bersirkulasi pada hospes atau reservoir hewan, misalnya tikus dan rodensia lainnya, ternak dan hewan peliharaan [17].

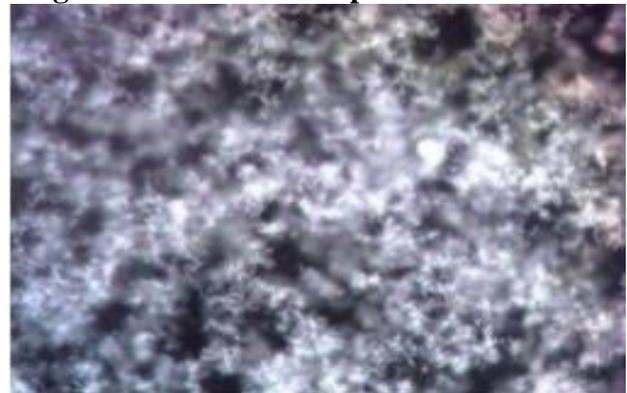
Sampel yang diperiksa dalam uji MAT pada kerja praktik ini adalah sampel serum manusia dan darah tikus. Sampel serum manusia diambil saat hari ketujuh pasca infeksi *Leptospira*

<http://ejurnal.binawakya.or.id/index.php/MBI>

Open Journal Systems

atau saat fase bakterimia berlangsung. Hal ini dikarenakan *Leptospira* dapat dideteksi dalam darah bila penderita sedang mengalami fase bakterimia, dimana bakteri *Leptospira* beredar dalam darah [18]. Antibodi IgM anti leptospira dapat dideteksi pada minggu pertama infeksi, dimana antibodi meningkat dengan cepat pada awal infeksi [19]. Prinsip kerja uji MAT adalah mereaksikan antigen dengan antibodi pada sampel yang ada. Hasil positif ditunjukkan dengan pembentukan gumpalan pada sampel yang ditambahkan antigen *Leptospira*. Gumpalan ini terbentuk karena antibodi anti-*Leptospira* yang ada dalam serum darah membentuk ikatan dengan bakteri *Leptospira*. Gumpalan ini disebut aglutinasi. Aglutinasi dapat diamati dengan menggunakan mikroskop medan gelap [20].

Gambar 3. Aglutinasi sampel serum manusia dengan serovar *Canicola* pada titer 1:80



Gambar 4. Aglutinasi sampel serum manusia dengan serovar *Canicola* pada titer 1:320



Serovar penginfeksi (current infection) pada sampel manusia ditentukan jika pada sampel terdapat perbandingan antara bakteri yang teraglutinasi dan bakteri bebas minimal 50:50 dan



terjadi pada titer minimal 1:320 pada single sera, atau terdapat kenaikan titer 4 kali lipat pada serum akut dan serum konvalesen. Jika bakteri bebas lebih banyak dari bakteri yang teraglutinasi pada titer 1:320, maka serovar *Leptospira* tersebut disebut background serovar. Uji MAT membutuhkan uji serologis ganda untuk konfirmasi diagnosis oleh uji MAT. Kenaikan titer antibodi 4 kali telah digunakan sebagai indikator dari infeksi yang terjadi. Titer didefinisikan sebagai enceran akhir tertinggi serum dalam campuran serum-antigen yang menunjukkan 50% aglutinasi atau lebih [21]. Salah satu serovar yang menunjukkan aglutinasi adalah *Canicola* yang menunjukkan aglutinasi sampai titer 1:80 pada Gambar 4. Titer 1:80 dari serovar *Canicola* masih menunjukkan aglutinasi tinggi, sehingga perlu dicek apakah aglutinasi masih muncul pada pengenceran selanjutnya sampai titer 1:320 yang ditunjukkan Gambar 7. Pada Gambar 7, sampel masih menunjukkan perbandingan 50:50, maka serovar *Canicola* merupakan salah satu serovar penginfeksi. Berdasarkan hal tersebut, diketahui serovar dari *Leptospira* yang menginfeksi sampel ini, yaitu *Canicola*, *Djasiman*, *Hebdomadis* pada titer 1:320 dan *Icterohaemorrhagiae* pada titer 1:640. Background serovar *Leptospira* yang menginfeksi sampel ini adalah *Bataviae* dan *Mini* pada titer 1:80, dan *Rama* pada titer 1:160.

Serum manusia dapat bereaksi dengan banyak serovar bisa disebabkan karena *cross-reaction* diantara serovar-serovar tersebut, dan pasien tersebut terinfeksi oleh lebih dari satu serovar. Berdasarkan hal tersebut bisa diketahui bahwa serovar yang menunjukkan titer antibodi yang paling tinggi merupakan serovar penginfeksi. Tetapi, hal ini juga bisa disebabkan karena pasien sebelumnya terinfeksi oleh satu serovar dan selanjutnya pasien ini terinfeksi oleh serovar lain. Serovar yang baru ditemukan ini dapat mengalami *cross-reaction* dengan serovar penginfeksi sebelumnya. Hal ini menyebabkan aktivasi repons memori terhadap serovar sebelumnya. Jika hal ini adalah penyebabnya, titer antibodi spesifik terhadap serovar sebelumnya dapat lebih tinggi daripada titer

antibodi yang melawan serovar penginfeksi baru. Pada hewan reservoir, penentuan serovar penginfeksi ditentukan dengan titer berbeda-beda tergantung spesies hewan tersebut. Serum tikus dianggap positif ketika didapatkan titer 1:20 atau lebih setidaknya pada satu strain [22]. Hal ini dikarenakan tikus merupakan inang reservoir bagi *Leptospira*. Di dalam inang reservoir, *Leptospira* telah beradaptasi dan tidak menimbulkan kerugian apapun terhadap inangnya. Inang reservoir terutama tikus merupakan pencemar *Leptospira* di lingkungan dan jadi sumber penular leptospirosis [23].

## PENUTUP

### Kesimpulan

Hasil uji MAT yang dilakukan pada 32 sampel, didapatkan ada 1 sampel yang menunjukkan aglutinasi dengan serovar penginfeksi adalah *Canicola*, *Djasiman*, *Hebdomadis* dengan titer 1:320 dan *Icterohaemorrhagiae* dengan titer 1:640.

### Saran

Perlu penelitian lebih lanjut tentang pengembangan dan penyediaan jumlah serovar di Indonesia untuk kepentingan deteksi bakteri *Leptospira*.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Goldstein, R. E., 2010, *Canine Leptospirosis. Vet Clin Small Anim*, hal 1091-1101.
- [2] Soeharsono, 2012, *Zoonosis Penyakit Menular dari Hewan ke Manusia*, Kanisius, Yogyakarta
- [3] Rebecca, P, and Deborrah, D. 2010. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect*, Vol. 2, pp. 1265-1276.
- [4] Suman, V R, and Khalid, P. 2014. Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, No. 1, Vol. 8, pp. 199-202.
- [5] Turner, L H., 2017. Leptospirosis I. *Trans R. Soc Trop Med Hyg*, Vol. 6, 842-55.
- [6] Office International des Epizooties, 2010, *Leptospirosis. In: Manual of Standards for*



- Diagnostic Test and Vaccines*. Office International des Epizooties, Paris.
- [7] Chirathawor, C. R., Inwattana, Y., Poovorawan, and Suwancharoen, D. 2014. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. *Asian Pac J Trop Biomed*, pp. 162-164.
- [8] Dharmajono, 2012, Leptospirosis-Anthrax-Mulut dan Kuku-Sapi Gila, Waspadailah Akibatnya!, Edisi 1, Pustaka Populer Obor, Jakarta, hal 1-10.
- [9] Priyanto, A., 2018, Faktor-Faktor Risiko yang Berpengaruh terhadap Kejadian Leptospirosis (Studi Kasus di Kabupaten Demak). Thesis, Program Magister Epidemiologi Program Pascasarjana, Universitas Diponegoro, Semarang.
- [10] Judarwanto, W., 2009, Leptospirosis pada Manusia. Allergy Behaviour Clinic, Picky Eaters Clinic (Klinik Kesulitan Makan) Rumah Sakit Bunda, Jakarta.
- [11] Stoddard, R., 2009, Other Infectious Diseases Related to Travel: Leptospirosis, Center for Disease Control and Prevention.
- [12] Marga, G. A., Goris, R, and Hartskeerl, H. A., 2014, Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Curr. Protoc. Microbiol*, Vol. 32, pp. 501-518
- [13] Dassanayake, D. L. B., Wimalaratna, H., Agampodi, S. B., Liyanapathirana, V. C., Piyarathna, T. A. C. L., and Goonapienuwala, B. L, 2009. Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the microscopic agglutination test: a validation study. *BMC Infect Dis*, Vol. 9, p. 48.
- [14] Chirathawor, C., Inwattana, R., Poovorawan, Y., and Suwancharoen, D., 2014, Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. *Asian Pac J Trop Biomed*, pp. 162-164.
- [15] Black, J. G., 2015, Microbiology: Principles and Explorations. Ed. 6<sup>th</sup>, Hoboken John Wiley & Sons, pp. 583-584.
- [16] Abbas, K. A., Lichtman, A., and Pillai, S., 2018, Cellular and Molecular Immunology, 9<sup>th</sup> Ed.), Philadelphia, USA.
- [17] Widarso, Wilfried, and Siti, G., 2015, Penanggulangan Leptospirosis di Indonesia. Perhimpunan Rumah Sakit Seluruh Indonesia, Jakarta
- [18] Ko, A. I., Goarant, C., and Picardeau, M., 2009, Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonosis pathogen. *Nat. Rev. Microbiol*, Vol. 7, pp. 736- 747.
- [19] Levett, P. N., 2011, Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 14, pp. 296-326.



HALAMAN INI SENGAJA DIKOSONGKAN