

Lateral Flow Immunoassay untuk Deteksi Leptospirosis
Pengembangan Metode Berdasar Protein Antigen LipL32
Leptospira icterohaemorrhagica



Tesis
Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2

Magister Ilmu Biomedis

Angga Ari Wibowo
22010114410006

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2020

TESIS

LATERAL FLOW IMMUNOASSAY UNTUK DETEKSI LEPTOSPIROSIS

Pengembangan Metode Berdasar Protein Antigen LipL32 *Leptospira*
icterohaemorrhagica

Diajukan oleh

Angga Ari Wibowo
22010114410006

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada tanggal 30 Januari 2020
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui
Pembimbing

Pembimbing I



Prof. dr. M. Hussein Gasem, Ph.D., Sp.PD-KPTI

NIDK. 88779 70018

Pembimbing II



dr. Helmia Farida, Sp.A, M.Kes, PhD

NIP. 19661213 2001122001

Penguji Utama



Dr. dr. Yan Wisnu Prajoko,
Sp.B(K) Onk., M. Kes

NIP. 197501242008011006

Penguji Anggota



Prof. Dr. dr. Hendro Wahjono,
M.Sc. TropMed, DMM,
Sp.MK(K)

NIP. 130701414

Penguji Anggota



Dr. Endang Sri Lestari, PhD

NIP. 196610161997022001

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedis
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro



Dr. dr. Yan Wisnu Prajoko, Sp.B (K) Onk., M. Kes
NIP. 197501242008011006

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa proposal penelitian ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong Plagiatism sebagaimana dimaksud dalam Permendinas No. 17 Tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka

Semarang, 30 Januari 2020



Angga Ari Wibowo
22010114410006

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Angga Ari Wibowo, S. Si
Tempat/ tanggal lahir : Blora, 27 Maret 1987
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-Laki

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Tunas Rimba II Dopleng, Blora : 1994
2. SD Negeri Dopleng V, Blora : 1995
3. SMP Negeri 1 Dopleng, Blora : 1999
4. SMA Negeri 1 Blora : 2002
5. Jurusan Biologi, FMIPA UNNES : 2005
6. Magister Ilmu Biomedis FK UNDIP : 2014-sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2012-2014 : Staf Pengembangan Metode Analisa BA/BE Econolab International, PT Pharos Indonesia, Jakarta
2. Tahun 2015-2019 : Supervisor Metode Analisa Obat, PT Gratia Husada Farma (HUFA), Semarang

D. Riwayat Keluarga

Nama Orang Tua

Ayah : Kustanto
Ibu : Sri Rejeki (Almh)
Nama Saudara : Rengga Jaka Pratama (Kakak)

KATA PENGANTAR

Puji syukur peneliti panjatkan sebesar-besarnya kepada Sang Maha Agung Allah SWT atas segala nikmat dan karunia yang telah diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian Tesis saya yang berjudul “*Lateral Flow Immunoassay* Untuk Deteksi Leptospirosis Pengembangan Metode Berdasar Protein Antigen *Leptospira icterohaemorrhagica*”. Penyusunan Tesis ini sebagai persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Penulis tidak semata-mata hanya melakukan agenda ini sendiri, tetapi juga adanya dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini peneliti bermaksud mengucapkan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk belajar di Universitas Diponegoro.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk belajar di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang memberikan kesempatan kepada penulis untuk belajar dan memperdalam ilmu di Program Studi Ilmu Biomedik.
4. Prof. dr. M. Hussein Gasem, Ph.D., Sp.PD.K, sebagai dosen pembimbing pertama yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing penulis dalam menyusun, melaporkan penelitian tesis ini.
5. dr. Helmia Farida, Sp.A, M.Kes, PhD, sebagai dosen pembimbing anggota yang turut berjasa besar memberikan masukan dan bimbingan dalam menyusun dan menyelesaikan tesis penelitian ini.
6. Bapak saya Kustanto S, Pd., ibu Nanik Dwi L. yang telah melimpahkan keringat, memberikan dukungan, doa dan biaya sehingga saya dapat menempuh jenjang pendidikan sejauh ini.

7. Lisy Apriandini S. Farm Apt. yang ikut memberikan motivasi dan dorongan, serta pemikiran untuk membantu dalam menyelesaikan penulisan tesis dan studi biomedis ini.
8. Ibu Farida Dwi H. sebagai pembimbing di laboratorium Balai Vektor Salatiga yang telah memberikan informasi dan wawasan sehingga saya bisa mendapatkan pengetahuan yang lebih.
9. Mas Restu, sebagai teknisi di laboratorium Balai Vektor Salatiga yang bersedia mendampingi, membantu dan memberikan pengalaman yang lebih untuk saya sebagai peneliti tamu.
10. Pihak dan personil-personil baik di laboratorium maupun di rumah sakit yang tidak dapat saya sebutkan satu demi satu yang telah membantu terlaksananya penelitian tersebut.
11. Partisipan dan Sukarelawan uji yang telah menyumbangkan sebagian yang dimiliki untuk kepentingan penelitian.
12. Pihak-pihak lain yang membantu dalam proses pendidikan yang peneliti jalani sampai dengan saat ini.

Dalam penyusunan penelitian tesis ini, penulis menyadari masih banyak kekurangan, jauh dari kesempurnaan dikarenakan keterbatasan pengetahuan, pengalaman serta waktu yang diberikan. Maka sangat diharapkan adanya kritik dan saran kepada peneliti agar titik kesempurnaan menjadi semakin dekat. Kesempatan ini juga penulis gunakan untuk mengucapkan permohonan maaf atas segala kekurangan yang ada pada penelitian ini. Terakhir, penulis mengucapkan terima kasih atas segala perhatian pembaca untuk mencermati dan memahami isi dari penelitian ini. Semoga kelak berguna di suatu waktu.

Semarang, 30 Januari 2020



Angga Ari Wibowo

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
ABSTRAK	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.5. Keaslian Penelitian.....	5
1.6. Ruang Lingkup Penelitian	9
1.6.1. Lingkup Waktu.....	9
1.6.2. Lingkup Tempat	9
1.6.3. Lingkup Materi.....	9
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Leptospirosis.....	10
2.2 Agen (Bakteri <i>Leptospira</i>).....	12
2.3 Patogenesis Leptospirosis.....	14
2.4 Protein LipL32.....	15
2.5. Respon Imunitas Terhadap <i>Leptospira</i>	16
2.6. Diagnosis Laboratorium <i>Leptospira</i>	17
2.7. Teknik atau Jenis Pemeriksaan Berdasarkan Reaksi Antigen-antibodi Penunjang Diagnosis Lepospirosis.....	18
2.7.1. MAT (Microscopic Agglutination Test).....	18
2.7.2. ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay)	18
2.7.3. Dri Dot (Latex Agglutination Test).....	19
2.8. Teknik Lateral Flow Imunoassay (LFIA)	20
BAB III. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP	23
3.1 Kerangka Teori	23
3.2 Kerangka Konsep.....	24

BAB VI. METODE PENELITIAN	25
4.1. Desain Penelitian	25
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	25
4.3. Etik	25
4.4. Alat dan Bahan Penelitian	25
4.5. Alur Penelitian	27
4.6. Langkah Kerja.....	28
4.6.1. Kultur <i>Leptospira (in vitro)</i>	28
4.6.2. Ekstraksi Antigen LipL32 <i>Leptospira</i>	28
4.6.3. Uji Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Purifikasi Antigen LipL32	30
4.6.4. Pembuatan Prototipe LFIA (Metode Baru)	31
a. Membran Nitroselulosa	31
b. <i>Conjugate pads</i>	32
c. Sample pads dan absorbent pads	32
4.6.5. Pengumpulan Sampel Uji	33
4.6.6. Baku Emas (Gold Standard) Metode MAT	34
4.6.7. Uji Metode LFIA Sampel Serum	34
4.8.8. Validasi Internal Skala Laboratorium	34
4.7. Analisis Data.....	35
BAB V. HASIL PENELITIAN	36
a. Kultur Bakteri <i>Leptospira</i>	36
b. Ekstraksi Bakteri <i>Leptospira</i>	36
c. Pengembangan Lateral Flow Immunoassay	39
d. Evaluasi skala laboratorium	41
BAB VI. PEMBAHASAN	45
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	52
7.1. Kesimpulan	52
7.2. Saran.....	52
DARTAR PUSTAKA.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Publikasi terkait penelitian tentang antigen LipL32 <i>Leptospira</i> dan pengembangan teknik LFIA untuk studi diagnostik leptospirosis	5
Tabel 2. Rekapitulasi Kemenkes RI mengenai jumlah kasus, meninggal dan <i>Case Fatality Rate</i> (CFR) Leptospirosis Berdasarkan Propinsi Tahun 2016 – 2018.....	11
Tabel 3. Tabel Perhitungan nilai Uji Diagnostik 2x2	35
Tabel 4. Hasil akhir dari uji alat untuk diagnosa leptospirosis menggunakan metode <i>Lateral Flow Immunoassay</i> (LFIA) dan baku standar <i>Microscopic Agglutination Test</i> (MAT).....	43
Tabel 5. Nilai Uji Diagnostik metode LFIA terhadap Baku Standar MAT	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. <i>Leptospira</i> serovar <i>interrogans</i> dilihat dari mikroskop elektron.....	13
Gambar 2. Perjalanan agen leptospiral dalam darah.....	16
Gambar 3. Kerangka teori perjalanan penyakit Leptospirosis dan potensi diagnosis laboratorium berdasar protein membran luar <i>leptospira</i>	23
Gambar 4. Kerangka konsep diagnosis Leptospirosis	24
Gambar 5. Skema alur penelitian	27
Gambar 6. Skema alur ekstraksi protein LipL32 dari bakteri <i>Leptospira</i> Itcherohemorage (A) menggunakan metode ekstraksi Triton X-114 dan (B) menggunakan metode Heats shock	30
Gambar 7. Skema prototipe <i>rapid diagnostic test</i> (RDT) berdasarkan <i>Lateral flow Immunoassay</i> (motode baru) untuk diagnosis <i>Leptospirosis</i>	32
Gambar 8. Bilik hitung bakteri menggunakan metode Petroff Hause Chamber. Perbesaran sebesar 20x bakteri leptospira terlihat berbentuk seperti spiral memanjang, dengan pergerakan yang sudah dilemahkan	36
Gambar 9. SDS PAGE menggunakan metode Triton X-114 dan <i>Heat Shock Protein</i>	38
Gambar 10. Percobaan immobilisasi protein LipL32 ke membran nitroselulosa dengan konsentrasi yang bertahap yaitu 10 µg, 20 µg dan 30 µg(a), dan hasil pengulangan analisa dengan konsentrasi protein 20 µg.....	40
Gambar 11. Waktu reaksi penempelan antigen antibodi kompleks dalam analisa sampel uji menggunakan prototipe <i>Lateral Flow Immunoassay</i>	40
Gambar 12. Hasil uji pengembangan alat <i>Lateral Flow Immunoassay</i> berdasar protein LipL32 menggunakan berbagai sampel serum positif dan negatif pasien leptospirosis	42

ABSTRAK

Pendahuluan. Leptospirosis adalah penyakit yang umum ditemukan di Negara tropis seperti Indonesia. Penyakit ini sangat berbahaya bagi manusia, yang tidak sedikit menyebabkan kasus kematian dengan catatan muncul diagnosis menengah. Metode diagnose teknik *Lateral Flow Immunoassay* (LFIA) adalah salah satu alternative yang sangat aman dan mudah digunakan serta diaplikasikan oleh para paramedis dan juga masyarakat umum itu sendiri.. Protein LipL32 yang terdapat pada pada bagian membran luar permukaan sel bakteri *Leptospira* adalah salah satu yang berpotensi diaplikasikan untuk pengembangan alat diagnostic yang bagus.

Metode. Prototype untuk diganosa menggunakan protein LipL32 dari *Leptospira Icterohaemorrhagica* yang merupakan salah satu dari *leptospira* patogenik, yang diekstrak dengan metode Triton X-114 and metode Heat Shock dilanjutkan dengan purifikasi metode SDS-PAGE, selanjutnya dilakukan pengukuran protein menggunakan Nanodrop spectrophotometer. Protein LipL32 yang diekstrak dengan metode Heat shock lebih baik digunakan untuk diaplikasikan dalam membuat prototipe LFIA dengan dibuat *immobile* pada membran nitrocellulosa dan kemudian dilengkapi dengan bagian - bagian lainnya (*conjugate pads, sample pads dan absorbent pads*). Prototype diuji dengan 16 sampel dari serum manusia yang terkonfirmasi sebagai pasien dan bukan pasien leptospirosis.

Hasil. Secara visual hasil uji yang paling baik adalah menggunakan konsentrasi protein 20 µg jika dibandingkan dengan konsentrasi 10 µg and 30 µg. Hasil sensitivitas mendapatkan 42.9% dan spesifitas mendapatkan 88.9%.

Kesimpulan. Prototipe masih perlu dioptimalkan kembali pada beberapa aspek sehingga mendapatkan sensitivitas yang lebih baik untuk tujuan uji skrining leptospirosis.

Kata Kunci: *Lateral Flow Immunoassay, LipL32, Leptospirosis*

ABSTRACT

Background. Leptospirosis is a common disease found in tropical countries like Indonesia. The disease is very dangerous for humans, not even a few that end in cases of death, underlining the necessity to make immediate diagnosis. The diagnostic method of *Lateral Flow Immunoassay* (LFIA) technique is an alternative method that is very safe and easy to use and is applied by paramedics and even the ordinary people themselves. The presence of LipL32 protein in the *Leptospira* bacterial cell which is an abundant membrane surface protein will have the potential to be applied as part of the development of a good diagnostic tool.

Methods. A diagnostic prototype was made using LipL32 protein from *Leptospira Icterohaemorrhagica* one of pathogenic *leptospire*s, which was extracted using the Triton X-114 liquid extraction and Heat Shock method followed by purification with SDS-PAGE, continuous on quantifications measured by nanodrop spectrophotometer. LipL32 protein extract by heat shock method is used for the application of making LFIA devices by fixating it in nitrocellulose membranes and then completing it with the other parts (conjugate pads, sample pads and absorbent pads). The prototype was then tested to 16 samples of human serum from patients with and without leptospirosis.

Results. The visualization of test result was best at 20 µg as compared to 10µg and 30 µg. The sensitivity reached 42.9% and the specificity reached 88.9%.

Conclusions. The prototype needs to be optimized in some aspects to achieved better sensitivity as a screening test for leptospirosis.

Keywords: *Lateral Flow Immunoassay, LipL32, Leptospirosis*