

## **BAB I PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Leptospirosis merupakan zoonosis yang disebabkan oleh bakteri patogen *Leptospira sp.*, ditransmisikan oleh *host reservoir* misalnya tikus ke manusia dari kontaminasi air melalui hewan yang terinfeksi dan dapat menyebabkan kasus serius pada manusia. Leptospirosis juga menyebabkan efek samping seperti aborsi, steril dan kematian.<sup>1</sup> Leptospirosis merupakan masalah yang kebanyakan terdapat pada negara-negara tropis, dengan kejadian mengikuti musim hujan dan setelah adanya banjir.<sup>2</sup> Kasus Leptospirosis di Jawa Tengah menempati urutan pertama di Indonesia pada tahun 2014 dengan *Case Fatality Rate* (CFR) sebesar 16,6%.<sup>18</sup> Puncak kejadian Leptospirosis yang pernah terpublikasi adalah di sekitar bulan Juni sampai dengan Oktober sepanjang musim penghujan.<sup>21,22</sup>

Bakteri *Leptospira* berbentuk panjang, tipis heliks yang sangat motil dengan dua flagel. Amplop sel tidak seperti pada bakteri pada umumnya, yaitu berbagi sifat antara bakteri gram negatif dan positif. Membran luarnya mengandung lipopolisakarida dan juga memiliki lipoprotein yang sangat besar proporsinya. Lipoprotein yang paling melimpah adalah LipL32 sebagai protein membran utama *Leptospira*.<sup>3</sup>

LipL32 adalah protein utama bakteri *Leptospira* dengan jumlah lebih dari 40000 kopi yang ditemukan pada semua sel *Leptospira*. Protein tersebut hanya ada pada bakteri strain patogenik. Protein ini dapat dijadikan kandidat yang baik untuk mendeteksi Leptospirosis.<sup>4</sup> Besar molekul protein LipL32 adalah 26,7 kDa

tetapi sering terdeteksi pada elektroforesis sebesar 32 kDa.<sup>5</sup> Selain LipL32, Lipopolisakarida (LPS) juga terekspresi di membran bagian luar dari *Leptospira* dan juga merupakan salah satu antigen immunodominan yang beresensi besar terhadap patogenitas,<sup>9</sup> akan tetapi jumlahnya per sel masih lebih sedikit dibandingkan LipL32.

Beberapa diagnosis laboratorium untuk Leptospirosis adalah *Microscopic Agglutination Test* (MAT), deteksi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), isolasi mikroba berdasar metode kultur, atau deteksi antibodi dari mikroorganisme tersebut. MAT merupakan standar baku (*gold standard*) immunologikal karena mampu mengidentifikasi strain atau serovar.<sup>6</sup> *Lateral Flow Assay* atau dalam bidang diagnostik klinis yang melibatkan sistem imunologi adalah *Lateral Flow Immunoassay* (LFIA) merupakan uji *Point Of Care* (POC) yang mampu memberikan hasil yang cepat dalam waktu yang lebih singkat. Metode analisis ini merupakan strategi yang berkembang pesat untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif.<sup>7</sup> Metode ini tidak memerlukan peralatan khusus, petunjuk yang mudah untuk pengguna dan juga mampu mereduksi biaya dari pengembangan produk. Format LFIA mirip dengan ELISA, dengan penangkapan oleh immobile protein yang mampu berikatan, yang biasanya selalu antibodi atau antigen.<sup>8</sup>

Metode analisa berdasarkan teknik LFIA yang ada, yaitu *Leptotek-Lateral flow<sup>TM</sup>* masih memiliki dengan sensitivitas sebesar 85,8% dan spesifitas sebesar 93,6% pada fase akut penyakit,<sup>6</sup> dengan memasukkan antigen yang digunakan dari leptospira non patogenik, sehingga kemungkinan positif palsu akan

cenderung besar. Sehingga diperlukan suatu antigen alternatif lain yang dapat meminimalisir hasil tersebut atau dengan antigen spesifik yang hanya dimiliki oleh *leptospira* serovar patogenik maka akan mendapat hasil yang lebih baik.

Kondisi peralatan instansi kesehatan di Indonesia yang masih belum merata, dikarenakan di daerah-daerah instrument kesehatan penunjang untuk deteksi leptospirosis secara canggih belum mampu disediakan. Oleh karena itu optimasi pengembangan dari *rapid diagnostic test* (RDT) dengan instrumentasi yang sederhana sangat tepat diaplikasikan kepada seluruh daerah di wilayah negara kesatuan republik Indonesia.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan permasalahan tersebut diatas, maka timbul permasalahan apakah LFIA teknik Immunokromatografi berdasar protein LipL32 *Leptospira* berpotensi dalam mendeteksi senyawa target yaitu Immunoglobulin M (IgM) anti protein LipL32 bakteri *Leptospira* dalam sampel serum darah manusia.

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi protein LipL32 *Leptospira* sebagai metode analisa dalam pengembangan metode RDT berdasarkan LFIA dari sampel serum dengan target antibodi IgM anti LipL32 untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Leptospira sp.* patogen serta mengetahui apakah metode baru spesifik dan sensitif sama dengan baku emas (metode MAT) yang dapat diaplikasikan untuk skrining diagnosis leptospirosis.

### 1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Mengukur sensitivitas metode RDT berdasar protein LipL32 dengan prinsip LFIA (metode baru) dibandingkan dengan baku emas MAT.
- b. Mengukur spesifisitas metode baru dibandingkan dengan baku emas MAT.

## 1.4. Manfaat Penelitian

Metode analisa baru menggunakan metode LFIA berdasarkan protein LipL32 *Leptospira* patogenik dengan IgM sebagai senyawa tergetnya, dapat dijadikan acuan dalam pengembangan pembuatan RDT untuk deteksi leptospirosis pada manusia di dunia secara umum dan masyarakat Indonesia khususnya. Metode analisa juga dapat digunakan sebagai alat diagnostik alternatif yang mudah diperoleh dan dikerjakan, serta memiliki nilai diagnostik yang tinggi.

### 1.5. Keaslian Penelitian

Tabel 1. Publikasi terkait penelitian tentang antigen LipL32 *Leptospira* dan pengembangan teknik LFIA untuk studi diagnostik leptospirosis

Penulis	Tahun	Judul Jurnal/ Buku	Judul penelitian	Hasil Penelitian
Henk L. Smits, et al. <sup>33</sup>	1999	Journal of Clinical Microbiology	Lepto Dipstick, a Dipstick Assay for Detection of Leptospira-Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Sera	Pengembangan alat dengan metode batang celup ( <i>dipstick</i> ) menggunakan isolasi dari <i>heat stable-antigen</i> dari <i>Leptospira biflexa</i> . Antibody target adalah immunoglobulin M spesifik anti <i>Leptospira</i> . Setelah performa alat dibandingkan dengan metode ELISA, didapatkan rata-rata sensitivitas dan spesifitas alat sebesar 91,6% dan 88,6%.
Henk L. Smits, et al. <sup>34</sup>	2000	Clinical Diagnostic Laboratory Immunology and	Lateral Flow Assay for rapid Serodiagnosis of Human Leptospirosis	Pengembangan alat dengan metode <i>Lateral Flow Immunoassay</i> dengan target immunoglobulin M spesifik anti <i>Leptospira</i> dari serum manusia. Hasil evaluasi alat memperlihatkan keseluruhan sensitivitas sebesar 85,8% dan spesifitas sebesar 93,6%. <i>Heat resistant-Antigen</i> diisolasi dari <i>Leptospira Patoc I</i> dan digunakan untuk menangkap IgM yang dilekatkan pada membran. Dari <i>tes lateral flow assay</i> tersebut terbukti bereaksi setidaknya dengan serovar <i>australis, autumnalis, bataviae, canicola, celledoni, cynopteri, grippotyphosa, icterohaemorrhagica, javanica, Pomona, serjoe, shermani dan tarasovi</i>

Penulis	Tahun	Judul Jurnal/ Buku	Judul penelitian	Hasil Penelitian
Cullen PA, et al. <sup>24</sup>	2002	Infection And Immunity, 70 (5). 2311–2318	Global Analysis of Outer Membrane Proteins from <i>Leptospira interrogans</i> Serovar Lai	LipL32 merupakan protein struktural penyusun membran luar bakteri <i>Leptospira</i> . Ekspresi gen penyandi protein LipL32 sangat dipengaruhi oleh temperatur dan keberadaan Fe <sup>2+</sup> lingkungan. Perubahan temperatur dan konsentrasi besi berdampak pada jenis LipL32 tertentu atau protein berbeda seperti LipL41 (11).
Wynwood SJ, et al. <sup>25</sup>	2015	PLOS Neglected Tropical Diseases, 9(3): e0003636.	Validation of a Microsphere Immunoassay for Serological Leptospirosis Diagnosis in Human Serum by Comparison to the Current Gold Standard	Assay pengembangan diagnostik baru untuk pengukuran serological leptospirosis yang spesifik, sensitif dan dapat membedakan antara kelas IgG dan IgM dari antibodi. Biaya yang akan lebih rendah yang akan meningkatkan kemampuan untuk deteksi infeksi leptospirosis. Hasil validasi ( <i>Microsphere Immunoassay</i> ) MIA dapat membedakan hasil uji dalam 3 kategori (reaktif, samar dan non reaktif), lebih baik daripada MAT yang hanya memiliki 2 kategori (positif dan negatif). Kemampuan membeda tersebut akan mampu menyediakan informasi diagnostik vital sehingga tersedia gambaran epidemiologi yang lebih baik.

Penulis	Tahun	Judul Jurnal/ Buku	Judul penelitian	Hasil Penelitian
Vanithamani S, et al. <sup>11</sup>	2015	PLOS ONE Journal	Lipopolysaccharide Specific Immunochromatography Based Lateral Flow Assay for Serogroup Specific Diagnosis of Leptospirosis in India	LPS diekstraksi dari lima serogrup lokal dominan yang beredar termasuk: Australis, autumnalis, Ballum, Grippytyphosa, Pomona dan digunakan sebagai antigen dalam diagnostik untuk mendeteksi IgM antibodi dalam serum pasien. Sensitivitas yang diamati oleh IgM ELISA dan dot blot assay menggunakan berbagai leptospiral LPS > 90% untuk sera homolog. Kecuali LPS untuk Ballum, tidak ada LPS lain menunjukkan reaktivitas silang ke sera heterolog. Sebuah usaha telah dilakukan untuk mengembangkan berdasarkan LPS ICG LFA untuk diagnostik spesifik serogrup cepat dan sensitif leptospirosis. ICG-LFA menunjukkan sensitivitas dalam kisaran antara 93 dan 100% untuk sera homolog. Analisis menunjukkan LPS berdasarkan ICG-LFA tidak berbeda secara signifikan dari standar emas MAT.
Chirathaworn C, et al. <sup>15</sup>	2014	New Microbiologica	Development of an immunochromatographic test with anti-LipL32-coupled gold nanoparticles for Leptospira detection	Sensivitas berdasarkan metode imunokromatografi dengan senyawa targetnya adalah bakteri leptospira utuh menunjukkan sebesar $10^3$ /ml, spesifitas kuat dengan tidak adanya reaksi dengan bakteri leptospira non patogen dan bakteri patogen lain. Secara persentase sensitivitas pengembangan berdasar target protein LipL32

Penulis	Tahun	Judul Jurnal/ Buku	Judul penelitian	Hasil Penelitian
				masih 50% karena bakteri diisolasi hanya sekitar seminggu dari onset.
Suamrningsih et al. <sup>3</sup>	2016	Procedia Chemistry	Recombinan LipL32 Protein for Leptospirosis Detection in Indonesia	Analisa menggunakan <i>Westernblotting</i> dan ELISA menunjukkan bahwa serum yang positif serovar Harjo sesuai MAT mampu berikatan dengan protein rLipL32. Berarti dari studi ini mengindikasikan bahwa rLipL32 adalah antigen yang bagus untuk deteksi Leptospira.
Niloofa R, et al. <sup>6</sup>	2015	PLOS One	Diagnosis of Leptospirosis: Comparison between Microscopic Agglutination Test, IgM-ELISA and IgM rapid Immunochromatography test	MAT, IgM ELISA dan Leptocheck-WB bernilai positif sebesar 39,8%, 45,8% dan 38,7% dibanding dengan MAT yang memiliki spesifitas dan sensitivitas sebesar 95,7% dan 55,3% pada fase akut Leptospira. Sensitivitas IgM ELISA dan Leptocheck-WB sama dengan MAT pada saat fase akut, tetapi spesifitas ELISA sedikit lebih besar dari Leptocheck-WB. Karena kemiripan sensitivitas dan spesifitas dari IGM ELISA maupun Leptocheck-WB sehingga dapat dipilih Leptocheck-WB untuk diagnostik akut Leptospira atau deteksi awal Leptosiprakarena keunggulannya yaitu cepat, tanpa instrumentasi yang terbatas.

Penelitian ini menitikberatkan pada analisis berdasarkan pengembangan metode LFIA, berdasarkan protein murni LipL32 *Leptospira* yang dibuat *immobile* (tidak bergerak) pada garis uji prototipe dengan target adalah IgM dari serum host atau manusia untuk deteksi leptospirosis.

## **1.6. Ruang Lingkup Penelitian**

Adapun ruang lingkup penelitian ini antara lain :

### **1.6.1. Lingkup Waktu**

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2018 - Desember 2019.

### **1.6.2. Lingkup Tempat**

Penelitian ini menggunakan sampel serum pada kejadian leptospirosis yang terjadi di Indonesia.

### **1.6.3. Lingkup Materi**

Materi hanya dibatasi pada pengembangan metode analisa berdasar protein LipL32 *Leptospira* dengan target IgM dan IgG anti LipL32 manusia pada serum penderita leptospirosis.