

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Leptospirosis merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh bakteri dari genus *Leptospira* yang ditularkan melalui tikus atau hewan lain yang terinfeksi. Penyakit leptospirosis terjadi hampir di seluruh dunia dan memiliki angka prevalensi yang tinggi di negara tropis dan subtropis. Data dari *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2022 menunjukkan terdapat lebih dari 500.000 kasus leptospirosis dengan tingkat kematian mencapai 10% setiap tahunnya (Purnama & Hartono, 2022). Di Indonesia sendiri, kejadian leptospirosis masih sering ditemukan. Data dari kementerian kesehatan (Kemenkes) menunjukkan adanya peningkatan kasus leptospirosis sepanjang bulan Juli hingga Agustus 2025. Tren peningkatan kasus leptospirosis ini banyak terjadi di Pulau Jawa. Provinsi Jawa Tengah menempati urutan pertama dengan 1.014 kasus. Kasus leptospirosis di Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta sebesar 703 kasus (Kemenkes, 2025). Namun, prevalensi kasus leptospirosis di luar Pulau Jawa belum diketahui secara pasti. Banyak kasus leptospirosis di luar Pulau Jawa yang tidak dilaporkan karena diagnosis laboratorium yang tidak tepat, kesadaran medis yang buruk, serta gejala yang tidak spesifik.

Urgensi penyakit ini diperburuk dengan gejala yang ditimbulkan tidak khas. Gejala bisa bervariasi mulai dari asimtomatik hingga penyakit hemoragik berat. Pada kondisi yang ringan, penyakit ini dapat sembuh

sendiri tanpa pengobatan dari dokter. Hal ini yang menyebabkan sulitnya pencatatan kasus leptospirosis (Cahyadi, 2019). Tingkat keparahan gejala ini bergantung pada jenis spesies *Leptospira* dan kemampuan *strain* dalam menimbulkan infeksi (Goarant dkk., 2019). Oleh karena itu, identifikasi spesies dan *serovar* yang tepat sangatlah diperlukan dalam mendukung surveilans epidemiologi, pemilihan terapi yang sesuai, serta pengendalian penyebaran penyakit.

Leptospirosis disebabkan oleh bakteri *Leptospira sp.* Bakteri ini terdiri dari 35 spesies yang secara filogenetik dibagi menjadi 3 grup: 13 patogenik, 11 saprofitik dan 11 intermediet. Agen penyebab penyakit leptospirosis berasal dari grup patogenik dan intermediet yang mencakup lebih dari 260 *serovar* (Goarant dkk., 2019). Salah satu spesies patogenik yang sering ditemukan di Indonesia adalah *Leptospira interrogans*, yang diklasifikasikan lagi menjadi beberapa *serovar* dan menyebabkan infeksi pada manusia maupun hewan.

Secara tradisional, metode pemeriksaan baku emas (*gold standard*) yang umum digunakan dalam diagnosis leptospirosis adalah *Microscopic Agglutination Test* (MAT). Namun MAT memiliki kekurangan ketika titer antibodi belum cukup terdeteksi pada awal infeksi sehingga menimbulkan negatif palsu. Pengerjaan pemeriksaan MAT juga membutuhkan waktu yang lama. Metode pemeriksaan lain yang dapat digunakan untuk mendeteksi leptospirosis adalah dengan menggunakan metode berbasis molekuler seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR menjadi

alternatif yang lebih cepat, sensitif, dan spesifik untuk mendeteksi keberadaan DNA bakteri *Leptospira sp.* (Handayani dkk., 2019). Teknik PCR mampu memperbanyak fragmen DNA target dalam jumlah besar sehingga dapat mendeteksi infeksi bahkan pada tahap awal penyakit.

Salah satu pengembangan dari metode ini adalah *Multiplex* PCR, yaitu teknik PCR yang dapat mendeteksi lebih dari satu gen target dalam satu reaksi (Khaki dkk., 2023). *Multiplex* PCR memiliki beberapa kelebihan lain yakni biaya yang dibutuhkan lebih sedikit karena penggunaan reagen menjadi lebih hemat serta waktu yang dibutuhkan juga akan menjadi lebih singkat. *Multiplex* PCR juga akan mengurangi kesalahan akibat pemipetan yang terlalu banyak (Rahayu dkk., 2018).

Gen lipL32 merupakan gen spesifik konservatif yang hanya dapat ditemukan dalam *Leptospira sp.* yang bersifat patogenik. Gen lipL32 ini terdapat pada membran luar dari *Leptospira sp.* dan bersifat imunogenik sehingga dapat menjadi penanda spesifik untuk mendeteksi *Leptospira interrogans*. Gen lipL32 di tiap *serovar* *Leptospira interrogans* juga memiliki perbedaan. Sementara itu, gen 16S rRNA merupakan gen konservatif yang terdapat pada seluruh bakteri dan sering digunakan sebagai marker universal untuk identifikasi tingkat genus. Kombinasi kedua gen ini memungkinkan deteksi yang spesifik terhadap spesies patogen, jenis *serovar*, sekaligus konfirmasi keberadaan bakteri *Leptospira sp.* secara umum (Khaki dkk., 2023).

Dalam deteksi gen molekuler menggunakan PCR, salah satu hal dibutuhkan adalah primer. Primer yang tidak menempel dengan benar akan menyebabkan kegagalan pada saat *annealing*. Hingga saat ini primer yang secara spesifik mendeteksi *serovar Leptospira interrogans* masih sangat terbatas, khususnya pada isolat yang berasal dari Indonesia. Penelitian Khaki, dkk. (2023) telah menggunakan primer dari gen lipL32 dan 16s rRNA namun terbatas pada deteksi patogen dan non-patogen *Leptospira sp.* Oleh karena itu, diperlukan perancangan spesifik untuk mendeteksi *serovar* pada spesies *Leptospira interrogans* isolat Indonesia. Proses perancangan primer PCR dapat dilakukan secara *in silico* dengan memanfaatkan berbagai perangkat lunak bioinformatika. Pendekatan *in silico* memungkinkan peneliti untuk merancang dan mengevaluasi primer secara komputasional sebelum dilakukan uji di laboratorium. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar bagi pengembangan metode deteksi molekuler yang lebih efisien, cepat, dan akurat dalam mendiagnosis leptospirosis di masa mendatang.

B. Rumusan Masalah

Bagaimana urutan primer *multiplex* PCR yang spesifik untuk amplifikasi gen lipL32 dan 16s rRNA pada *Leptospira interrogans*?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengidentifikasi daerah konservatif dari urutan gen lipL32 pada *Leptospira interrogans*

2. Mengidentifikasi daerah konservatif dari urutan gen 16s rRNA pada *Leptospira sp.*
3. Merancang kandidat pasangan primer spesifik untuk amplifikasi gen lipL32 dan 16s rRNA pada *Leptospira interrogans*.
4. Menganalisis struktur sekunder pasangan primer spesifik untuk amplifikasi gen lipL32 dan 16s rRNA pada *Leptospira interrogans*.
5. Menganalisis kompatibilitas primer set dalam mengamplifikasikan gen lipL32 dan 16s rRNA dengan simulasi *multiplex* PCR secara *in silico*.
6. Menguji similiaritas pasangan primer yang telah dirancang dalam mengamplifikasi gen lipL32 dan 16s rRNA pada *Leptospira interrogans* menggunakan metode *in silico*.
7. Menentukan kombinasi primer *multiplex* PCR gen 16s rRNA dan lipL32 untuk deteksi serovar *Leptospira interrogans*.

D. Ruang Lingkup

Penelitian ini dilakukan dalam ruang lingkup ilmu Teknologi Laboratorium Medis bidang Biologi Molekuler.

E. Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat menambah kepustakaan dan memberikan informasi ilmiah di bidang Biologi Molekuler khususnya terkait perancangan primer *multiplex* PCR gen lipL32 dan 16s rRNA untuk deteksi serovar *Leptospira interrogans* secara *in silico*.

2. Manfaat praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan rekomendasi dalam optimalisasi dan pengembangan pengujian molekuler pada deteksi serovar *Leptospira interrogans* sehingga dapat berkontribusi dalam peningkatan kapasitas diagnostik leptospirosis, sehingga mendukung upaya pengendalian penyakit berbasis laboratorium di tingkat nasional. Penelitian ini juga diharapkan mampu berkontribusi dalam pengembangan metode penelitian biomedis yang lebih canggih dan hemat biaya menggunakan metode komputasional.

F. Keaslian Penelitian

1. Penelitian Khaki dkk. (2023) “*Application of a Multiplex PCR Assay for Molecular Identification of Pathogenic and Non-Pathogenic Leptospire based on lipL32 and 16S rRNA Genes*”. Penelitian tersebut berfokus pada pengaplikasian gen 16s rRNA dan lipL32 dalam mendeteksi patogen dan nonpatogen pada *Leptospira sp.* menggunakan *multiplex* PCR secara *in vitro*. Penelitian tersebut menggunakan *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Serjo, Pomona, Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Ballum dan Australis sebagai cetakan untuk membuat primer gen lipL32. Sedangkan primer gen 16s rRNA dibuat dengan menggunakan cetakan dari *Leptospira biflexa* serovar Patoc. Metode yang digunakan untuk perancangan primer tidak disebutkan secara terperinci.

Tabel 1. Keaslian penelitian oleh Khaki dkk. (2023)

Persamaan	Perbedaan
- Jenis gen spesifik yang digunakan yaitu 16s rRNA dan lipL32	- Metode perancangan primer - Target deteksi penelitian sebelumnya hanya menentukan patogen dan non patogen tanpa menentukan jenis serovar - Organisme untuk cetakan gen lipL32

Penelitian ini berfokus pada perancangan primer untuk mendeteksi serovar pada *Leptospira interrogans* isolat Indonesia dan Asia. Organisme yang akan digunakan sebagai cetakan *template* primer gen lipL32 adalah *Leptospira interrogans* serovar Bataviae, Hardjo, dan Pyrogenes isolat Indonesia dan Asia yang tersedia di *database* GenBank NCBI. Penelitian ini dilakukan secara *in silico* (berbasis komputasional) tanpa percobaan langsung di laboratorium.

2. Penelitian Rakhmiantri (2020) “Desain dan Optimasi Primer Multipleks untuk Deteksi Efektif Bakteri *Aeromonas hydrophila* Patogen”. Penelitian tersebut melibatkan penggunaan beberapa gen virulen (*act*, *alt*, *ast*, *aerA*, *pla/lip*, *ahyB*, *asc-FG*, *lip*, dan *hlyA*) sebagai target amplifikasi, serta dilakukan melalui tahapan *in silico* dan *in vitro* untuk menentukan kombinasi primer multiplex terbaik.

Tabel 2. Keaslian penelitian oleh Rakhmiantri (2020)

Persamaan	Perbedaan
- Metode perancangan dilakukan secara <i>in silico</i>	- Organisme - Target gen spesifik - <i>Software</i> untuk merancang dan menganalisis primer dan uji similiaritas

Penelitian ini berfokus pada perancangan primer set untuk mendeteksi gen 16s rRNA dan lipL32 pada *Leptospira interrogans* isolat Indonesia dan Asia. *Software* yang digunakan dalam penelitian ini adalah MAFFT, Unipro UGENE, Primer-BLAST, NetPrimer, PrimerPooler, dan Nucleotide BLAST. Penelitian ini juga tidak menggunakan analisis secara *in vitro*.

3. Penelitian Vishakarma dkk. (2021) “*Development of a Multiplex PCR Assay for Detection and Discrimination of Pathogenic and Saprophytic Leptospira in Water*”. Penelitian tersebut berhasil membedakan antara *Leptospira* patogenik dan non-patogenik pada sampel air menggunakan metode *multiplex* PCR. Penelitian tersebut menggunakan primer gen lipL32 dan lipL21, kemudian dilakukan pengujian langsung pada 20 sampel air.

Tabel 3. Keaslian penelitian oleh Vishakarma dkk. (2021)

Persamaan	Perbedaan
- Deteksi bakteri <i>Leptospira interrogans</i>	- Kombinasi gen (penelitian Vishakarma dkk. (2021) menggunakan kombinasi gen lipL21 dan lipL32, sedangkan penelitian ini menggunakan kombinasi gen lipL32 dan 16s rRNA)
- Menggunakan target gen lipL32	- Metode analisis (penelitian Vishakarma dkk. (2021) menggunakan pendekatan <i>in vitro</i> sedangkan penelitian ini menggunakan pendekatan <i>in silico</i>).

Penelitian ini memiliki pendekatan yang berbeda, yaitu perancangan primer *multiplex* PCR secara *in silico* untuk mendeteksi *Leptospira interrogans* berdasarkan dua gen target,

yaitu lipL32 (spesifik patogenik) dan 16S rRNA (konservatif genus). Penelitian ini memanfaatkan data sekuens gen dari basis data GenBank serta perangkat lunak bioinformatika untuk menentukan karakteristik primer terbaik (panjang, T_m , GC *content*, dan kompatibilitas *multiplex*).