

Bakteri *Legionella pneumophila* Terdeteksi pada Air Kolam Renang di Kota Surabaya dengan *Nested Polymerase Chain Reaction*

(*LEGIONELLA PNEUMOPHILA BACTERIA DETECTED IN SWIMMING POOL WATER OF SURABAYA BY USING NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION*)

**Eduardus Bimo Aksono^{1*}, Ana Adelina Farahdiba²,
Eka Pramytha Hestianah³**

¹Departemen Kedokteran Dasar Veteriner, ²Program Studi Pendidikan Dokter Hewan
³Departemen Histologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga,
Kampus C Unair, Jl Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia 60115,
Telp: +6231 5992 785, Fax: +6231 5993 015; *Email: baksono@yahoo.com

ABSTRAK

Legionella pneumophila adalah bakteri Gram-negatif berbentuk batang yang dapat menyebabkan penyakit nosokomial dan pneumonia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan bakteri *L. pneumophila* pada air kolam renang di Kota Surabaya dengan menggunakan *nested Polymerase Chain Reaction* (PCR) berbasis gen spesifik *L. pneumophila* (*mip* gene). Penelitian ini menggunakan metode *purposive sampling*. Sebanyak sepuluh sampel diambil dari lima kolam renang. Sampel diambil sebanyak 200 mL dari air kolam renang di setiap lokasi. Hasil dari 10 sampel yang diuji menggunakan *nested* PCR, satu sampel menunjukkan hasil positif untuk *L. pneumophila*, dan sembilan sampel menunjukkan hasil negatif. Bakteri *L. pneumophila* ditemukan pada sampel air kolam dengan suhu yang lebih tinggi (>30°C). Satu sampel positif tersebut ketika dilanjutkan terhadap analisis serogrup terlihat bahwa bakteri *L. pneumophila* yang terdeteksi pada air kolam renang di Kota Surabaya termasuk *L. pneumophila* serogrup 9 (98%) dan serogrup 10 (98%). Terdeteksinya bakteri *L. pneumophila* ini diharapkan dapat meningkatkan kesadaran dokter dan ahli mikrobiologi tentang penyebaran *L. pneumophila* dan juga bermanfaat untuk mengontrol agen *Legionellosis*.

Kata-kata kunci: *Legionella pneumophila*; kolam renang; gen *mip*; PCR

ABSTRACT

Legionella pneumophila is a Gram-negative bacillus that causes nosocomial and community-acquired pneumonia. The aim of this research was to detect the presence of bacteria of *L. pneumophila* species in the swimming pools water of Surabaya city by using nested Polymerase Chain Reaction (PCR) assay of a specific gene for *L. pneumophila* (*mip* gene). This study used purposive sampling method. A total of 10 water samples were collected from five swimming pools consisting of 200 mL water for each swimming pool. The results showed that of 10 samples tested by nested PCR, one sample was positive for *L. pneumophila*, and nine samples were negative. *L. pneumophila* were found in pool water samples with a higher temperature (>30°C). Serogrouping analysis of positive sample that *L. pneumophila* bacteria detected in the water sample of swimming pool in Surabaya was *L. pneumophila* serogroup 9 (98%) and serogroup 10 (98%). *L. pneumophila* detection of bacteria is expected to raise the awareness of physician and microbiologists about the transmission of *L. pneumophila* and will also be useful for controlling the agents.

Keywords: *Legionella pneumophila*; swimming pool; *mip* gene; nested PCR

PENDAHULUAN

Legionella adalah agen penyebab pneumonia pada manusia dan telah dilaporkan hingga 90% kasus *Legionnaires disease* disebabkan oleh *Legionella pneumophila* (Moosavian dan Dashti, 2011). Penyakit ini dapat terjadi melalui inhalasi dari aerosol atau mikroaspirasi dari air yang mengandung *L. pneumophila* (Diederer, 2008; Kumpers *et al.*, 2008). Menurut Yu (1993), beberapa peneliti melaporkan bahwa aspirasi sebagai cara penularan utama. Air dapat menjadi sumber penyebaran penyakit yang cepat jika tidak diketahui cara pengolahannya dengan baik.

Legionella merupakan bakteri yang berkaitan dengan air dan tersebar luas di lingkungan, dan mampu bertahan dalam kondisi ekstrim suhu tinggi (Yasmon *et al.*, 2010). Bakteri ini dapat ditemukan pada sumber-sumber air alami dan juga buatan manusia. Sumber yang berpotensi dalam kontaminasi *L. pneumophila* yaitu sistem penyejuk udara seperti *cooling tower* dan penyejuk ruangan, kolam air hangat, kolam renang, *shower head*, dan air pancuran (Hsu *et al.*, 2006).

Identifikasi *L. pneumophila* dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu isolasi bakteri dengan metode kultur, identifikasi bakteri dengan uji serologi, deteksi antigen di dalam urin, deteksi bakteri dalam jaringan ataupun cairan tubuh menggunakan mikroskop *immunofluorescent* seperti *Direct Immunofluorescent Assay* (DFA) dan deteksi DNA bakteri dengan *Polymerase Chain Reaction/PCR* (Stout *et al.*, 2003).

Metode PCR merupakan alternatif metode kultur konvensional untuk mendeteksi bakteri dengan pertumbuhan lambat dan sangat kritis seperti *Legionella sp.* (Behets *et al.*, 2007; Dusserre *et al.*, 2008). Metode PCR merupakan salah satu dari beberapa tes diagnostik yang dapat mendeteksi infeksi yang disebabkan oleh semua spesies dari *Legionella* (Diederer *et al.*, 2007). Metode PCR memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang sesuai untuk deteksi cepat organisme yang terdapat di sumber air lingkungan (Moosavian dan Dashti, 2011). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan bakteri *L. pneumophila* pada air kolam renang di Kota Surabaya dengan menggunakan *Nested Polymerase Chain Reaction* berbasis gen *mip*.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Sampel air diambil dari lima lokasi kolam renang yang berada di wilayah Kota Surabaya. Pengambilan sampel menggunakan metode *purposive sampling*. Pengambilan sampel air kolam renang dilakukan pada sore hari. Masing-masing kolam renang diambil dua sampel sebanyak 200 mL dari air kolam renang dan kran. Tiap sampel air disimpan dalam botol steril, kemudian dimasukkan ke dalam *cool box*.

Persiapan Ekstraksi

Masing-masing 200 mL sampel air yang disimpan dalam botol steril kemudian disaring menggunakan *Millipore membrane* 0,22 μ m. *Millipore membrane* dipindahkan ke dalam *conical tube* 50 mL dan dibilas dengan larutan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* 1 mL. Sampel tersebut divortex selama 10 menit. Suspensi sebanyak 1 mL dan pindahkan ke dalam tabung *ependorf*, kemudian disentrifus pada 13.000 rpm selama tiga menit. Supernatan dibuang dan *pellet* siap digunakan untuk ekstraksi DNA.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA *L. pneumophila* menggunakan DNA ekstraksi kit (QIAamp® DNA mini kit Qiagen) mengikuti instruksi produsen. Volume akhir ekstraksi didapatkan sebanyak 50 μ L, digunakan sebagai *template* DNA. Senyawa DNA yang terkandung dalam elusi akhir disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Amplifikasi dengan *Nested Polymerase Chain Reaction*

Proses amplifikasi dijalankan dengan metode *nested PCR*. Pada amplifikasi ronde pertama, campuran reagen PCR dimasukkan dalam tabung *ependorf* yang terdiri dari 12,5 μ L GoTaq® Green Master mix, 0,5 μ L air suling, 1 μ L untuk primer *forward* (10 pmol/ μ L) dan 1 μ L primer *reverse* (10 pmol/ μ L) gen *mip* (Tabel 1), dan 5 μ L *template* DNA. Campuran reagen PCR tersebut kemudian dimasukkan dalam *thermocycler* PCR dengan program suhu sebagai berikut: denaturasi awal 95°C selama lima menit, kemudian denaturasi DNA 95°C selama 30 detik. *Annealing* 55°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama satu menit, diikuti *post-extension* pada 72°C selama 10 menit dan diulang sebanyak 30 siklus.

Amplifikasi pada ronde kedua, digunakan hasil campuran reagen dari ronde pertama kemudian tambahkan 12,5 iL GoTaq® Green Master mix, 5 iL air suling, 1 iL untuk primer *forward* (10 pmol/iL) dan 1 iL primer *reverse* (10 pmol/iL) gen *mip* (Bernander *et al.*, 1997) (Tabel 1), dan 0,5 iL template DNA. Campuran reagen PCR tersebut kemudian dimasukkan lagi ke dalam *thermocycler* PCR dengan program suhu sama seperti ronde pertama.

Analisis Hasil PCR dengan Elektroforesis

Hasil amplifikasi dari proses PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 2% menggunakan alat elektroforesis. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan konstan 100 volt selama 30 menit. Elektroforesis dihentikan kemudian gel diangkat untuk diamati dengan *transluminator*-UV. Penentuan sampel yang dinyatakan positif *L. pneumophila* dilihat dari keberadaan pita gen *mip* dengan panjang pita 403 bp. Hasil penelitian disajikan secara deskriptif.

Analisis Diversitas

Produk PCR yang diperoleh dimurnikan dengan prosedur sesuai kit Qiagen. Setelah pemurnian, selanjutnya dilakukan pelabelan

dan sekuensing dengan menggunakan *ABI Prism 310*. Analisis diversitas terhadap serogrup *L. pneumophila* dilakukan menggunakan *software Genetix Mac Ver. 10.0*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian deteksi bakteri *L. pneumophila* pada air di beberapa kolam renang yang berada di Kota Surabaya diperoleh hasil positif sebesar 11,11% (satu dari 10 sampel). Menurut Permenkes RI No:416/Menkes/Per/IX/1990, kadar klorin air kolam renang pada standar baku mutu kualitas air yaitu 0,2-0,5 mg/L. Kemungkinan tingginya kadar klorin pada kolam renang di Surabaya dapat membunuh berbagai macam bakteri yang berbahaya, sehingga sembilan dari 10 sampel air menunjukkan hasil negatif *L. pneumophila* (Tabel 2).

Kolam air hangat dan *spa* merupakan jalur utama penularan *Legionella*, yang merupakan kondisi optimal untuk berkembang biak serta mengandung nutrisi untuk pertumbuhannya. Berdasarkan laporan penelitian Hsu *et al.* (2006), persentase positif ditemukannya *Legionella* pada kolam air hangat 25%, *spa* 3,5%,

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam penelitian.

Target	Primer Sekuens	panjang
<i>Legionella pneumophila</i> (<i>mip</i> gene)	F ₁ : 5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3'	649 bp
	R ₁ : 5'-GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3'	
	F ₂ : 5'-CATGCAAGACGCTATGAGTG-3'	403 bp
	R ₂ : 5'-CAAGTTGATCCAGCTGGCAT-3'	

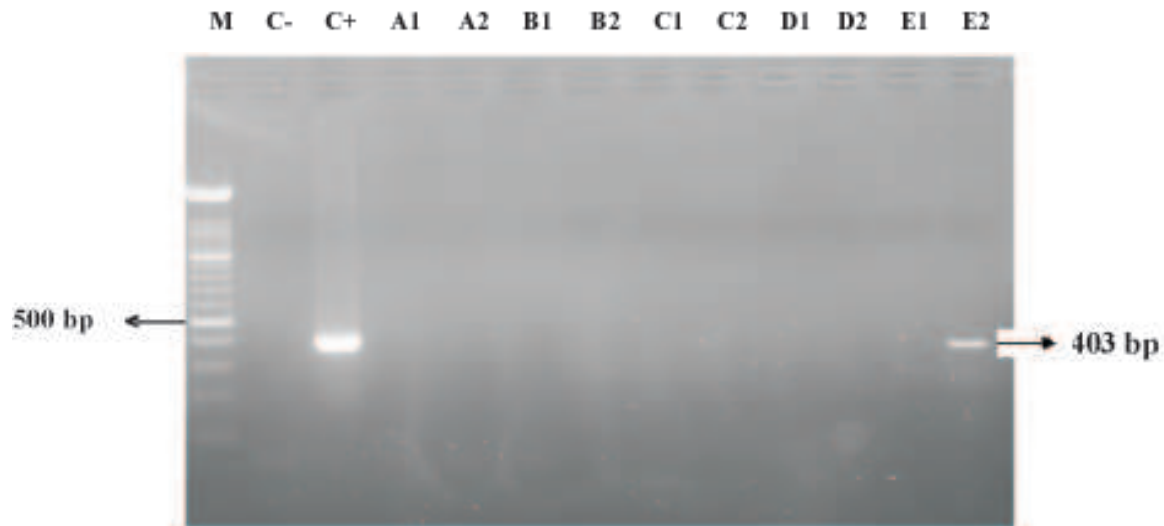
Keterangan: F1, R1 : Primer Forward dan Reverse pada ronde pertama; F2, R2 : Primer Forward dan Reverse pada ronde kedua

Tabel 2. Hasil pemeriksaan sampel air kolam renang di Surabaya

Kode Sampel	Jenis Sampel	Hasil PCR
A 1	Air kran	Negatif (-)
A 2	Air kolam renang	Negatif (-)
B 1	Air kran	Negatif (-)
B 2	Air kolam renang	Negatif (-)
C 1	Air kran	Negatif (-)
C 2	Air kolam renang	Negatif (-)
D 1	Air kran	Negatif (-)
D 2	Air kolam renang	Negatif (-)
E 1	Air kran	Negatif (-)
E 2	Air kolam renang	Positif (+)

dan kolam renang 10%. Pada penelitian ini, hasil elektroforesis produk PCR menunjukkan bahwa dari 10 sampel air yang dilakukan amplifikasi ditemukan satu sampel yang menunjukkan pita hasil amplifikasi primer *mip* dengan panjang 403 bp (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa ada sampel air kolam renang di Surabaya mengandung bakteri *L. pneumophila*.

Bakteri *Legionella* dapat tumbuh secara intraseluler dalam makrofag dan monosit, sedangkan pada habitat perairan berbagai *amoeba* dan *cilliata* bertindak sebagai tuan rumah. Infeksi didapat ketika air yang mengandung *Legionella* terhirup ke dalam paru-paru, infeksi tersebut tidak saja terjadi pada



Gambar 1. Hasil Elektroforesis menggunakan gel agarosa 2% pada sampel air kolam renang di Kota Surabaya. (M: marker; C-: kontrol negatif; C+: kontrol positif; A1-E2: sampel)

Tabel 3. Analisis diversitas terhadap serogrup *L. pneumophila*

Sampel	Isolat Referens	Persentase Homologi
Surabaya isolat	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	96%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 2	97%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 3	97%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 4	97%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 5	95%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 6	95%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 7	97%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 8	97%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 9	98%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 10	98%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 11	96%
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 12	98%

manusia tetapi juga pada hewan. Fabbi *et al.* (1998) melaporkan bahwa adanya pneumonia pada sapi, maka infeksi *Legionella* bisa dipertimbangkan sebagai salah satu penyebabnya.

Setidaknya terdapat 12 serogrup dari *L. pneumophila*. Serogroup-I bertanggung jawab atas lebih dari 84% kasus *legionellosis* di seluruh dunia. Sebuah penelitian di Perancis membandingkan isolat *Legionella* asal klinis dan asal lingkungan menunjukkan bahwa 28% *L. pneumophila* serogrup satu diperoleh dari lingkungan sedangkan 95% diperoleh dari klinis (Doleans *et al.*, 2004). Hasil analisis diversitas memperlihatkan bahwa sampel positif yang terdeteksi pada air kolam renang di Surabaya termasuk *L. pneumophila* serogrup 9 (98%) dan serogrup 10 (98%) (Tabel 3).

Pengendalian *L. pneumophila* pada air dapat dilakukan dengan beberapa cara menjaga kebersihan sistem air, menggunakan teknik pengolahan air, melakukan desinfeksi kimia dengan senyawa klorin yang diketahui efektif dan banyak digunakan dan melakukan desinfeksi panas yang efektif pada suhu di atas 60°C (Kim *et al.*, 2002).

SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa bakteri *L. pneumophila* terdeteksi pada air kolam renang di Surabaya. Bakteri *L. pneumophila* pada air kolam renang di Surabaya termasuk *L. pneumophila* serogrup sembilan (98%) dan serogrup 10 (98%).

SARAN

Perlu diambil langkah-langkah pencegahan di kolam renang khususnya untuk menghindari infeksi *L. pneumophila*, terutama pada pengguna kolam renang dari segala usia dan kesehatan yang mungkin lebih rentan terhadap infeksi bakteri oportunistis. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut di tempat-tempat serupa seperti kolam air hangat dan pemandian umum lainnya yang kemungkinan terdapat bakteri *L. pneumophila* agar dapat memberikan informasi terkait pengendalian legionellosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Rektor Universitas Airlangga atas hibah penelitian melalui skema Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Creemers B, Ollevier F. 2007. Development and evaluation of a taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. *J Microbiol Methods* 68(1): 137-144.
- Bernander S, Hanson HS, Johansson B, von Stedingk LV. 1997. A nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. *J Clin Microbiol Infect* 3(1): 95-101.
- Diederer BM, de Jong CM, Marmouk F, Kluytmans JA, Peeters MF, Van der Zee A. 2007. Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *J Med Microbiol* 56: 94-101.
- Diederer BMW. 2008. *Legionella spp.* and legionnaires' disease. *J Infect* 56(1): 1-12.
- Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. 2004. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J Clin Microbiol* 42: 458-460.
- Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. 2008. A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable legionellae that can recover their cultivability. *Appl Environ Microbiol* 74(15): 4817-4824.
- Fabbi M, Pastoris MC, Scanziani E, Magnino S, Di Matteo L. 1998. Epidemiological and environmental investigations of *Legionella pneumophila* infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf. *J Clin Microbiol* 36(7): 1942-1947
- Hsu BM, Chen CH, Wan MT, Cheng HW. 2006. Legionella prevalence in hot spring recreation areas of taiwan. *Water Research* 40(17): 3267-3273.
- Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM. 2002. Literature review- efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research* 4433-4444.
- Kümpers P, Tiede A, Kirschner P, Girke J, Ganser A, Peest D. 2008. Legionnaires' disease in immunocompromised patients: a case report of *Legionella longbeachae* pneumonia and review of the literature. *J Med Microbiol* 57: 384-387.
- Moosavian M, Dashti A. 2011. Isolation and identification of legionellosis agents from fishponds, swimming pools and cooling towers in Khuzestan Province, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 4(4): 209-215.
- Peraturan Menteri Kesehatan RI. 1990. Permenkes RI No:416/Menkes/Per/IX/1990 tentang Syarat-syarat dan Pengawasan Kualitas Air. Jakarta. Menteri Kesehatan RI.
- Stout JE, Rihs JD, Yu VL. 2003. *Legionella*. Dalam: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Editors). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington: ASM Press. Hlm. 809-823.
- WHO (World Health Organization). 2007. *Legionella* and the prevention of legionellosis .<http://www.who.int/watersanitation/health/emerging/legionella.pdf>. [Diakses 25 April 2015].
- Yasmon A, Yusmaniar, Karuniawati A, Bela B. 2010. Simultaneous detection of *Legionella sp.* and *Legionella pneumophila* by duplex PCR (dPCR) assay in cooling tower water samples from Jakarta, Indonesia. *Med J Ina* 223-227.
- Yu VL. 1993. Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella*? *Am J Med* 95: 13-15.