



Studi *Leptospira sp* Pada Beberapa Daerah Rawan Banjir di Jakarta

Study of Leptospira sp In Several Flood-Vulnerable Areas in Jakarta

Dian Widiyanti, Ike Irmawati Purbo Astuti

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

KATA KUNCI
KEYWORDS

Leptospira; banjir; flab; patogenik
Leptospira; flood; flab; pathogenic

ABSTRAK

Leptospirosis termasuk re-emerging disease dan sering menjadi wabah setelah bencana banjir. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri Leptospira patogen yang ditransmisikan secara langsung lewat hewan terinfeksi atau tidak langsung melalui lingkungan yang terkontaminasi urin hewan tersebut. Studi mengenai Leptospira yang ada di lingkungan perairan daerah rawan banjir dilakukan untuk mengetahui penyebaran Leptospira, terutama strain patogen, sehingga dapat dilakukan antisipasi pencegahan. Sampel dikumpulkan dan diukur pHnya dari 20 penampungan air, seperti waduk, danau, sungai, selokan air, di daerah rawan banjir di Jakarta, dan dikultur pada medium Korthof modifikasi mengandung 5-fluorouracil. Pengamatan hasil kultur dilakukan dengan mikroskop lapang gelap selama satu bulan. Diferensiasi Leptospira dilakukan dengan deteksi gen flab. Hasil menunjukkan bahwa 75% dari sampel yang diperoleh, positif Leptospira. Ph sampel air sebesar 6,6–7,9 masih sesuai untuk pertumbuhan Leptospira. Analisis dengan gen flab menunjukkan bahwa Leptospira yang diisolasi termasuk jenis saprofit.

ABSTRACT

Leptospirosis is a re-emerging disease which could become an outbreak after disaster, such as flooding. This disease is caused by pathogenic Leptospira, which directly transmitted through infected animal or indirectly through urine-contaminated environment. The study about Leptospira in flood-vulnerable area was carried out to know the Leptospira's distribution, particularly pathogenic strain, so that precaution effort could be performed. Samples were collected and measured their pH, from twenty water or ponds, such as tank, lake, river, or drainage, in flood-vulnerable area in Jakarta, and then were cultured in modified Korthod medium, contain 5-fluorouracil. Observation

of the cultures was carried out using dark field microscope for one month. Leptospira differentiation was detected using flaB gene. The result showed that Leptospira was found out in 75% of sample cultures. The pH environments were still suitable for Leptospira growth. Analysis using flaB gene showed that all of the Leptospira isolates belonged to saprophyte strain.

Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang disebabkan oleh bakteri *Leptospira* patogen yang ditransmisikan melalui hewan baik langsung atau pun tidak langsung (Adler & Moctezuma, 2010). Leptospirosis menjadi penyakit yang muncul kembali (*re-emerging disease*) ketika wabah leptospirosis muncul di beberapa negara (WHO, 2003). Manifestasi klinis leptospirosis bervariasi mulai dari yang ringan atau *self-limiting disease* seperti demam, sakit kepala, sakit perut dan myalgia, sedangkan gejala yang berat, seperti ikterik, gagal ginjal, kegagalan fungsi hati, perdarahan paru, bahkan hingga kematian (Bharti *et al.*, 2003). Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan RI mencatat bahwa sejak tahun 2004 hingga 2012 terjadi peningkatan kasus leptospirosis di Indonesia dengan *case fatality rate* (CFR) antara 5-15%, sehingga leptospirosis menjadi salah satu penyakit yang mendapat perhatian dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Depkes, 2014). Gejala leptospirosis yang mirip dengan penyakit infeksi lain menyebabkan sulitnya diagnosis leptospirosis secara dini dan penanganan kasus menjadi terlambat.

Lingkungan berperan penting terhadap transmisi *Leptospira*. *Leptospira* dapat bertahan lama hidup di lingkungan seperti tanah dengan kelembaban > 20% dan air (Faine *et al.*, 1999). Penularan bakteri tersebut ke

manusia dapat terjadi secara tidak langsung melalui lingkungan yang tercemar urin hewan terinfeksi *Leptospira*, yang kemudian masuk ke tubuh manusia melalui luka terbuka atau membran mukosa (Ko *et al.*, 2009). Beberapa studi juga menunjukkan munculnya infeksi leptospirosis pada manusia yang kontak dengan lingkungan terkontaminasi *Leptospira*, diantaranya kasus leptospirosis ikterik pada 2 turis setelah tercebur pada kanal di Venice Italia (Lagi *et al.*, 2013) dan kasus leptospirosis pada tim relawan SAR (*search and rescue*) di hutan Malaysia (Sapian *et al.*, 2012). Wabah leptospirosis juga seringkali timbul pada saat atau setelah terjadinya bencana, seperti banjir, taifun, atau tsunami. Wabah atau lebih dikenal sebagai Kejadian luar biasa (KLB) leptospirosis pernah beberapa kali muncul di Indonesia setelah terjadinya bencana, seperti di Jakarta pada tahun 2007 dan di Sampang Madura pada tahun 2013 pasca terjadinya banjir besar, serta di Yogyakarta pada tahun 2011 pasca terjadinya letusan gunung Merapi, (DepKes, 2014).

Correspondence:

Dian Widiyanti, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta
Email;dian.widiyanti@yarsi.ac.id

Data tentang penyebaran *Leptospira*, terutama strain patogen, di lingkungan sekitar tempat tinggal dan aktivitas manusia, dapat memberikan informasi penting untuk pencegahan infeksi melalui pengendalian terhadap sumber infeksi dan lingkungan. Beberapa penelitian yang telah dilakukan berhasil menemukan *Leptospira* patogen di lingkungan perairan dan tanah yang dekat dengan aktivitas manusia (Alexander *et al.*, 1975; Ridzlan *et al.*, 2010; Benacer *et al.*, 2013; Saito *et al.*, 2013; Calderon *et al.*, 2013). Survey pada tahun 2008 menunjukkan bahwa negara-negara di daerah karibia, Amerika selatan, anak benua (*subcontinent*) India, Asia Tenggara dan Oseania adalah daerah endemis *Leptospira* (Pappas *et al.*, 2008).

Saat ini belum ada data atau penelitian tentang penyebaran bakteri *Leptospira* di lingkungan sekitar hunian penduduk, terutama di wilayah DKI Jakarta, yang rentan terjadinya banjir di setiap musim penghujan. Studi terhadap penyebaran bakteri *Leptospira* patogen di lingkungan, terutama perairan di DKI Jakarta perlu dilakukan untuk mengetahui adanya bakteri tersebut di perairan dan dapat diketahui kemungkinan daerah yang dapat terjangkit leptospirosis sehingga dapat dilakukan upaya pencegahan dengan disinfeksi, sanitasi dan penyuluhan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Lokasi dan waktu penelitian

Sampel dikumpulkan dalam rentang waktu April-Juli 2015 dari 20 daerah rawan (Cempaka Putih, Sunter, Kelapa Gading, Koja, Tanjung Priok, Pluit, Pulomas, Tomang) di DKI Jakarta, berdasarkan data dari Badan

Nasional Penanggulangan Bencana (BNPB, 2013).

Pengambilan dan pengolahan sampel

Sampel dikumpulkan dari penampungan air (waduk, saluran air, danau) sesuai dengan literatur (Benacer *et al.*, 2013). Lokasi pemilihan sampel pada tempat penampungan air yang statis atau tidak mengalir deras dimaksudkan untuk memudahkan penentuan daerah yang dominan *Leptospira* dari hasil penelitian. pH sampel diukur di lokasi dengan menggunakan pH meter digital. Sampel air dikumpulkan sebanyak 100 mL dan ditampung dalam botol steril. Sampel disaring dengan filter dengan ukuran pori 0,45µm (Sartorius). Satu mililiter dari air yang sudah disaring tersebut, kemudian ditumbuhkan pada medium Korthof modifikasi yang mengandung 10% Rabbit serum (Gibco) dan 5-fluorouracil (Sigma-Aldrich), diinkubasi pada suhu 30°C dan diamati dengan mikroskop lapang gelap hingga satu bulan. Sampel dikatakan positif jika ditemukan pertumbuhan bakteri spiral dalam interval waktu pengamatan.

Diferensiasi *Leptospira* strain patogen dan saprofit

Sampel yang positif *Leptospira* diinokulasi ulang pada medium Korthof modifikasi dan dianalisis secara kualitatif. Diferensiasi strain patogen dan saprofit dilakukan induksi dengan 1 M NaCl dan deteksi gen *flaB*. *Leptospira* pada umumnya sensitif terhadap saline, kecuali saprofit. Perubahan bentuk menjadi bulat (*spherical*) pada 1 M NaCl, menunjukkan sifat *Leptospira* patogen (Levett, 2001). Diferensiasi strain *Leptospira* dilakukan dengan deteksi gen *flaB* (793 bp) yang spesifik untuk

Leptospira patogen (Kawabata, *et.al*, 2001). Kultur isolat *Leptospira* disentrifugasi pada kecepatan 13,000 × g selama 10 menit. DNA diisolasi dengan PureLink Genomic DNA mini kit (Invitrogen). Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan KAPA Taq Extra HotStart (KAPA Biosystems). Primer yang digunakan dalam eksperimen ini adalah primer spesifik gen *flab* (L-flaB-F1 5'TCTCACCGTTCTCTAAAGTTCAAC-3', L-flaB-R1 5'CTGAATTCGGTTTCATATTTGCC-3') (Kawabata *et al.*, 2001). *flaB* diamplifikasi dengan kondisi berikut 40 *cycles denaturing* pada 94°C untuk 20

detik; *annealing* pada 50°C untuk 30 detik; *extension* pada 72°C untuk 60 detik; dan, *final extension* pada 72°C untuk 5 menit (Widiyanti *et.al*, 2013). PCR produk dielektroforesis menggunakan 0.7% gel agarose dan divisualisasi menggunakan SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

HASIL

Sampel air diambil dari 20 lokasi penampungan air di daerah rawan banjir Jakarta Hasil pengukuran pH dan kultur pada medium Korthof ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengukuran pH sampel dan kultur pada medium Korthof modifikasi

Kode Sampel	pH	Kultur
A	7,2	positif
B	7	positif
C	7	positif
D	7,1	positif
E	7,1	negatif
F	6,6	negatif
G	6,7	positif
H	7,5	positif
I	6,6	positif
J	7,1	positif
K	6,9	positif
L	7	positif
M	7,1	positif
N	7,1	positif
O	7	negatif
P	7	positif
Q	7	positif
R	7,8	positif
S	7,9	negatif
T	7,5	negatif

Hasil kultur menunjukkan bahwa 75% sampel yang diambil positif pertumbuhan *Leptospira* setelah diamati

dengan *dark field microscope* dalam rentang waktu 1 bulan. Hasil pengukuran pH menunjukkan pH

terendah yang diukur adalah 6,6; sedangkan pH tertinggi adalah 7,9. Empat sampel memiliki pH dibawah 7, sedangkan 16 sampel memiliki $pH \geq 7$. Lima sampel yang negatif menunjukkan pH bervariasi (tabel 1).

Hasil induksi dengan 1M NaCl menunjukkan semua isolat tidak membentuk *spherical form*. Perubahan bentuk spiral menjadi sferis (bulat) menandakan *Leptospira* tersebut termasuk patogen. Konfirmasi dilakukan dengan deteksi gen *flaB*, yang mana metode ini dapat

membedakan antara *Leptospira* patogen dengan *Leptospira* saprofit (Kawabata *et.al*, 2001; Widiyanti *et al.*, 2013). Kondisi PCR yang digunakan sesuai dengan kondisi optimum yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Widiyanti *et al.*, 2013). Hasil dari PCR menunjukkan bahwa dari semua sampel, gen *flaB* (782 bp) tidak terdeteksi pada sampel (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa *Leptospira* yang diperoleh dari sampel adalah *Leptospira* saprofit.



Gambar 1. Hasil PCR *flaB* gen. M = 100 bp DNA ladder, kolom 1-15 = sampel

PEMBAHASAN

Hasil kultur pada medium Korthof menunjukkan pertumbuhan *Leptospira* pada sebagian besar sampel. Medium Korthof termasuk medium yang selektif karena mengandung 5-fluorouracil (5-FU) untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya, dan dapat digunakan untuk menyeleksi *Leptospira* dari lingkungan (Ridzlan *et al.*, 2010). 5-FU merupakan obat yang digunakan untuk terapi kanker. Obat ini juga diketahui memiliki efek antibakterisidal, yang mana pada konsentrasi 400 μ g/ml dapat menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan, kecuali *Leptospira* (Ris, 1974). 5-FU juga dapat menghambat pembentukan biofilm pada *E.coli* dan *Pseudomonas* (Attila *et al.*, 2009).

Mekanisme bakterisid 5 FU dapat terjadi melalui penghambatan sintesis DNA, sintesis mukopeptida dinding sel dan stress karena ketidakseimbangan osmotik (Singh *et al.*, 2015).

Sebanyak 75% sampel yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Leptospira* memperlihatkan bahwa lingkungan perairan di Jakarta merupakan tempat yang sesuai untuk pertumbuhan atau hidup *Leptospira*. Bakteri tersebut pada umumnya hidup pada lingkungan yang hangat dan lembab. Kondisi seperti itu banyak ditemukan di negara tropis seperti Indonesia. Kontaminasi oleh mikroorganisme lain juga ditemukan pada beberapa kultur medium Korthof, walaupun telah ditambahkan 5-fluorouracil. Hal ini menunjukkan masih adanya mikroorganisme lain

yang resisten terhadap zat kimia ini. Masalah ini mungkin dapat diatasi dengan penambahan zat kimia atau antibiotika lain sehingga membuat médium pertumbuhan *Leptospira* menjadi lebih selektif. Kombinasi antibiotika lain dapat digunakan untuk menghasilkan kultur murni, diantaranya STAFF, yang merupakan kombinasi antibiotika Sulfometoxazole, Trimetoprim, Amphotericin B, Fosfomisin dan 5-fluorouracil. Kombinasi ini diketahui dapat menghambat pertumbuhan 16 mikroorganisme yang menjadi kontaminan pada saat isolasi *Leptospira* (Chakraborty *et al.*, 2011; Saito *et al.*, 2013). Walaupun terdapat beberapa kontaminan pada kultur, namun *Leptospira* masih bisa dibedakan dari mikroorganisme lain berdasarkan morfologinya. *Leptospira* memiliki bentuk spiral dan adanya bentuk melengkung di ujung sel (Gambar 2).



Gambar 2. Morfologi *Leptospira* (direproduksi dari Anonim, 2012)

Leptospira merupakan bakteri yang hidup pada lingkungan hangat, lembab dengan kisaran pH netral. pH sangat mempengaruhi pertumbuhan *Leptospira* pada lingkungan (perairan dan tanah). Pengukuran pH pada sampel perairan dilakukan untuk mengetahui pengaruh keasaman lingkungan terhadap hasil isolasi

Leptospira. Kisaran pH sampel antara 6,6–7,9 masih dapat ditolerir untuk pertumbuhan *Leptospira*. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa *Leptospira* masih dapat bertahan pada kisaran pH 6-8 di tempat yang terlindung dari matahari (Bejo *et al.*, 2004).

Hasil induksi dengan 1 M NaCl, menunjukkan semua isolat tidak membentuk sferis (*spherical form*). *Leptospira* saprofit dapat dibedakan dari *Leptospira* patogen berdasarkan pertumbuhan positif strain patogen pada suhu 13°C dan dengan penambahan 8 azaguanin (225µg/ml) serta kegagalan strain saprofit membentuk sferis dalam 1 M NaCl (Levett, 2001). *Leptospira* saprofit lebih bertahan lama hidup di lingkungan dengan kondisi yang tercemar dan salinitas tinggi dibandingkan strain patogen. *Leptospira* saprofit dapat bertahan hingga 192 jam pada kondisi lingkungan perairan yang tercemar dan salinitas tinggi, dibandingkan *Leptospira* patogen yang hanya bertahan 24–48 jam (Bejo *et al.*, 2004). Efek induksi/pemberian 1 M NaCl yang tidak merubah bentuk *Leptospira* dari spiral menjadi sferis (bulat) menunjukkan ketahanan yang lebih tinggi terhadap salinitas, yang merupakan sifat *Leptospira* saprofit. Konfirmasi dilakukan dengan analisis gen *flaB* untuk membedakan *Leptospira* patogen dan saprofit (Kawabata *et al.*, 2001; Widiyanti, *et al.*, 2013; Saito *et al.*, 2013). Hasil analisis gen *flaB* pada isolat *Leptospira* menunjukkan tidak terdeteksinya gen *flaB* pada semua sampel. Gen *flaB* mengkode protein pada flagel dan dapat membedakan *Leptospira* patogen dari saprofit. Tidak terdeteksinya gen *flaB* menunjukkan isolat yang diperoleh adalah *Leptospira* saprofit. Hal ini sesuai dengan hasil

yang diperoleh dari induksi 1 M NaCl. Pertumbuhan *Leptospira* saprofit pada umumnya lebih cepat dibanding *Leptospira* patogen, sehingga pada saat dikultur pertumbuhan *Leptospira* saprofit akan mengalahkan pertumbuhan patogen. *Leptospira* saprofit juga mungkin lebih dominan berada di perairan, sehingga semua sampel menunjukkan hasil identifikasi gen *flaB* negatif. Kondisi lingkungan juga mempengaruhi pertumbuhan *Leptospira* patogen yang lebih rentan terhadap kondisi lingkungan yang mengandung zat kimia, deterjen atau salinitas tinggi. Untuk mendapatkan hasil isolasi *Leptospira* patogen mungkin lebih baik dilakukan pada lingkungan yang banyak kontak dengan *host reservoir Leptospira*, karena bakteri ini umumnya terkolonisasi di ginjal host. Kombinasi identifikasi dengan gen lain, seperti gen *rrs* dan *rrl* (Woo, et al., 1997), *hap1* (Leon, et al., 2006), LipL32 (Rojas, et al., 2010), 16S rDNA (Saito et al., 2013), dapat dilakukan juga untuk mengidentifikasi atau membedakan isolat *Leptospira* yang diperoleh. Penelitian lanjut perlu dilakukan dengan jumlah sampel lebih banyak dan variasi gen.

SIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi bahwa *Leptospira* hidup di lingkungan wilayah banjir di DKI Jakarta, yang ditunjukkan oleh 75% sampel yang diambil menghasilkan kultur positif *Leptospira*. Berdasarkan penelitian ini juga dapat dilihat bahwa rentan pH perairan di wilayah banjir Jakarta mendukung pertumbuhan bakteri tersebut. *Leptospira* yang berhasil diisolasi merupakan jenis saprofit. *Leptospira* patogen mungkin dapat diperoleh

dengan persentase cukup tinggi pada daerah yang dekat dengan tempat hidup *host reservoir*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada universitas YARSI atas dibiayainya penelitian ini melalui skema hibah internal Universitas YARSI 2014. Terima kasih juga kami ucapkan kepada Bapak Luis Bastian dan Siswanto, laboran mikrobiologi FK Universitas YARSI, yang telah membantu pengambilan sampel di beberapa tempat di DKI Jakarta. Terima kasih juga kami ucapkan kepada semua staf bagian mikrobiologi atas bantuan dan dukungannya.

KEPUSTAKAAN

- Adler B and Moctezuma AP 2010. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol* 140:287-296.
- Alexander AD, Evans LB, Baker MF, Baker HJ, Ellison D and Marriapan M 1975. Pathogenic leptospire isolated from Malaysian surface waters. *Appl Environ Microbiol* 29: 30-33.
- Anonim 2012. *Leptospira Leptospirosis Weil disease*. <http://www.78stepshealth.us/medical-microbiology/leptospira-leptospirosis-weil-disease.html> (diakses pada 10 Januari 2017).
- Attila C, Ueda A, and Wood TK 2009. 5 Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriRas an antivirulence compound. *Appl Microbiol Biotechnol* 82 (3): 523-55.
- Bejo SK, Bahaman AR, Saad MZ, and Mutalib AR 2004. The survival of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the Malaysian environment. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 3 (3): 123-129.

- Bharti AR, JE Nally, JN Ricardi, MA Matthias, MM Diaz, MA Lovett, PN Levett, RH Gilman, MR Willig, E Gotuzzo, and JM Vinetz 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Disease*. 3:757-771.
- Benacer D, Woh PY, Zain SNM, Amran F and Thong KL 2013. Pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in peninsular Malaysia. *Microbes Environ* 28 (1): 135-140.
- BNPB 2013. Peta terdampak banjir 2013. http://geospasial.bnpb.go.id/wp-content/uploads/2013/01/2013-01-18_Banjir_Jakarta_RW_0600_v10.pdf. diakses pada 30 Desember 2013.
- Calderon A, Rodriguez V, Mattar S and Arrieta G 2013. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. *Trop Anim Health Prod*. DOI 10.1007/s11250-013-0508-y.
- Chakraborty A, Miyahara S, Villanueva SYAM, Saito M, Gloriani N, and Yoshida S 2011. A novel combination of selective agent for isolation of *Leptospira* species. *Microbiology and Immunology* 55: 494-501.
- Depkes 2014. *Profil pengendalian penyakit dan penyehatan lingkungan tahun 2013*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.
- Faine S, Adler B, Bolin C and Perolat P 1999. *Leptospira & Leptospirosis*. Melbourne: Medisci.
- Kawabata H, Dancel L, Villanueva SY, Yanagihara Y, Koizumi N and Watanabe H 2001. *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira spp.* *Microbiol Immunol* 45: 491-496.
- Ko AI, Goarant C, and Picardeau M 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7:736-47.
- Lagi F, Corti G, Mali M, Pinto A and Bartoloni A 2013. Leptospirosis acquired by tourists in Venice Italy. *Journal of travel Medicine* 20 (2): 128-130.
- Leon A, Pronost S, Tapprest J, Foucher N, Blanchard B, Andre-Fontaine G, Laugier C, Fortier G, Leclercq R 2006. Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:218-221
- Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14:296-326.
- Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L and Akritidis N 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis* 12: 351-357.
- Ridzlan FR, Bahaman AR, Khairani-Bejo S and Mutalib AR 2010. Detection of pathogenic *Leptospira* from selected environment in Kelantan and Terengganu, Malaysia. *Trop Biomed* 27: 632-638.
- Ris, DR 1974. Limitations of the use of 5-Fluorouracil as a selective agent for the isolation of *Leptospirae*. *Applied Microbiology* (27) 1: 270-271.
- Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE 2010. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29:1305-1309.
- Saito M, Villanueva SY, Chakraborty A, Miyahara S, Segawa T, Asoh T, Ozuru R, Gloriani N, Yanagihara Y and Yoshida S 2013. Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Appl Environ Microbiol* 79 (2): 601-609.
- Sapian M, Khairi MT, How SH, Rajalingam R, Sahhir K, Norazah A, Khebir R and Jamaluddin AR 2012. Outbreak of meliodosis and leptospirosis co-infection following a rescue operation. *Med J Malaysia* 67 (3): 293-297.
- Singh V, Breck M, Mukherjee R *et al.*, 2015. The complex mechanism of

- antimycobacterial action of 5-Fluorouracil. *Chemistry & Biology* 22: 63-75.
- WHO 2003. *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control*. Geneva : World Health Organization and International Leptospirosis Society.
- Woo THS, LD Smythe, ML Symonds, MA Norris, MF Dohnt and BKC Patel 1997. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Letters* 150: 9-18.
- Widiyanti D, Koizumi N, Fukui T, Muslich LT, Villanueva S, Segawa T, Mitsumasa S, Masuzawa T, Gloriani N and Yoshida S 2013. Development of immunochromatography-based assay for detection of *Leptospiral* lipopolysaccharide antigen in urine. *Clin Vac Immunol* 20 (5) : 683-690.