

KARAKTERISTIK LINGKUNGAN ABIOTIK DAN POTENSI KEBERADAAN *Leptospira* PATOGENIK DI AIR DALAM KEJADIAN LUAR BIASA LEPTOSPIROSIS DI KOTA SEMARANG

Arief Nugroho✉, **Arum Sih Joharina**, **Lulus Susanti**
Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit
Jl. Hasanudin No. 123, Salatiga, Jawa Tengah, Indonesia
Email: ariefnugroho12@gmail.com

ABIOTIK ENVIRONMENTAL CHARACTERISTICS AND POTENTIAL PRESENCE OF PATHOGENIC *Leptospira* IN WATER DURING LEPTOSPIROSIS OUTBREAKS IN SEMARANG

Naskah masuk :05 Februari 2016 Revisi I : 19 Juli 2016 Revisi II : 28 April 2017 Naskah Diterima : 10 Mei 2017

Abstrak

*Leptospirosis merupakan penyakit zoonosis yang tersebar di seluruh dunia termasuk Indonesia. Lingkungan sangat berpengaruh dalam kehidupan *Leptospira*. Leptospirosis dapat terjadi melalui kontak dengan air yang terkontaminasi *Leptospira* patogen. Tujuan penelitian ini menganalisis lingkungan abiotik dan mendeteksi *Leptospira* patogenik pada air baik pada badan air alami maupun tempat penampungan air di masyarakat dalam kejadian luar biasa leptospirosis di Kota Semarang. Pengambilan 60 sampel air secara random sampling dan dilakukan pengukuran lingkungan abiotik. Sampel air diperiksa menggunakan PCR dan pengukuran lingkungan abiotik dianalisis secara deskriptif. Lima sampel (8,3%) dideteksi positif *Leptospira* patogenik berdasarkan PCR. Hasil pengukuran lingkungan abiotik yaitu pH, salinitas, suhu dan kelembaban udara menunjang pertumbuhan *Leptospira*. Penelitian ini menunjukkan bahwa air dan kondisi lingkungan berpotensi menyebabkan penularan leptospirosis di Kota Semarang.*

Kata kunci: Air, *Leptospira*, Lingkungan, Abiotik, Semarang

Abstract

*Leptospirosis is a zoonotic disease that is spread all over the world including Indonesia . The environment is very influential in the life of the *Leptospira* bacteria. Leptospirosis may occur through water contaminated with pathogenic *Leptospira* bacteria. The purpose of this study was to analyze the abiotic environment and detect pathogenic *Leptospira* in the water either natural water bodies or reservoirs in the community with high leptospirosis in the city of Semarang. Water samples were selected by random sampling and measurement of abiotic environment. The bacteria content in the water samples were detected using PCR and abiotic environmental measurements were analyzed descriptively. The result revealed that five samples (8,3 %) were pathogenic *Leptospira* strain. The measurement results abiotic environment investigated were pH, salinity, temperature and humidity to support the growth of *Leptospira*. This study indicated that the water and environmental conditions could potentially lead to the transmission of leptospirosis in the city of Semarang.*

Keywords: Water, *Leptospira*, Abiotic, Environment, Semarang

PENDAHULUAN

Leptospirosis merupakan salah satu penyakit infeksi yang terabaikan atau *Neglected Infectious Diseases* (NIDs). Leptospirosis merupakan zoonosis dengan distribusi luas di seluruh dunia terutama pada wilayah dengan iklim subtropis maupun tropis (WHO, 2003). Mikroorganisme penyebab leptospirosis adalah bakteri patogenik yang termasuk genus *Leptospira*. Secara antigenik genus *Leptospira* terdiri dari 2 spesies yaitu *L. interrogans* yang merupakan bakteri patogen dan *L. biflexa* adalah saprofitik. Spesies *L. interrogans* adalah spesies yang dapat menginfeksi manusia dan hewan (Widoyono, 2008). *Leptospira* merupakan bakteri gram negatif berbentuk spiral dengan hook di kedua sisi/ujungnya yang bergerak dengan aktif. Bakteri ini berukuran sangat tipis dengan panjang 6-20 um dan lebar 0,2-0,15 um (Levett, 2001).

Bakteri *Leptospira* mampu beradaptasi pada lingkungan tropis dengan curah hujan yang tinggi. Saat ini diprediksi kasus leptospirosis meningkat seiring dampak *global warming* (pemanasan global) dan buruknya kondisi lingkungan fisik, kimiawi dan biologi di pemukiman penduduk, baik karena hasil kegiatan manusia, seperti sampah, selokan, dan genangan air maupun kejadian alami, seperti bencana alam : banjir, gempa bumi dan lain-lain (Vijayachari, 2010). Penularan leptospirosis berkaitan dengan faktor lingkungan, baik lingkungan abiotik maupun biotik. Faktor lingkungan abiotik meliputi indeks curah hujan, suhu udara, suhu air, kelembaban udara, intensitas cahaya, pH air, pH tanah, dan badan air alami. Faktor lingkungan biotik meliputi vegetasi, populasi tikus dan prevalensi *Leptospira* pada tikus (Yunianto, 2009).

Kejadian leptospirosis selalu dikaitkan dengan hal yang berhubungan dengan air seperti kegiatan olahraga air, adanya genangan air, maupun air untuk konsumsi sehari-hari. Hal ini dikarenakan kemampuan bakteri *Leptospira* yang bertahan hidup di tempat yang lembab sehingga mempunyai resiko infeksi yang tinggi bila sumber air telah terkontaminasi (Wynwood et al., 2014). Hasil penelitian Khairani Bejo S, R. Bahaman A., (2004) yang mengujikan *Leptospira* serovar *Hardjo* di beberapa jenis air menjelaskan bahwa di air selokan pada rentang pH 6,7-7,5 pada kondisi di bawah sinar matahari (32°C) mampu bertahan hidup selama 6 jam, sedangkan pada kondisi terhalang sinar matahari (27°C) mampu bertahan hidup selama 192 jam. Penelitian Sumanta, Wibawa, Hadisusanto, Nuryati, & Kusnanto, (2015) di Kabupaten Bantul menemukan 42.86% sampel air di sekitar persawahan terdapat *Leptospira* berdasarkan hasil PCR.

Kota Semarang merupakan salah satu daerah dengan permasalahan leptospirosis di Provinsi Jawa Tengah. Kasus leptospirosis yang terdapat di Kota Semarang cenderung fluktuatif. Pada tahun 2007 ditemukan 8 kasus dan 1 kasus meninggal dunia (*Case Fatality Rate* (CFR) = 13%), tahun 2008 dilaporkan 178 kasus dan 8 kasus meninggal (CFR 4%), tahun 2009 ditemukan 235 kasus dan 9 kasus meninggal dunia (CFR 5%), tahun 2010 ditemukan 71 kasus dan 6 kasus meninggal dunia (CFR 8%), tahun 2011 dilaporkan 70 kasus dan 25 kasus meninggal dunia (CFR 36%) dan pada tahun 2012 (per juni 2012) ditemukan 29 kasus dan 12 kasus meninggal dunia (CFR 41%) (Dinas Kesehatan Kota Semarang, 2012). Hasil penyelidikan epidemiologi (PE) Dinas Kesehatan Kota Semarang tahun 2011 menunjukkan bahwa faktor resiko kejadian leptospirosis antara lain adanya banjir/lumpur (35,0%), adanya kontak air tergenang (33,%), kegiatan membersihkan selokan (12,0%), dan mandi di sungai (2,0%). Hasil PE tersebut mengindikasikan bahwa adanya keberadaan air di sekitar rumah tempat tinggal dapat menjadi salah satu sumber penularan leptospirosis (Wahyuni, 2011)

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis karakteristik lingkungan abiotik dan mendeteksi keberadaan *Leptospira* patogenik pada air baik pada badan air alami maupun tempat penampungan air di masyarakat dalam kejadian luar biasa leptospirosis di Kota Semarang.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan April – Juni 2012. Pengambilan 60 sampel air dilakukan secara random. Sampel air diambil di seluruh wilayah Kota Semarang yang ditemukan kasus leptospirosis. Sampel air yang diambil berasal dari sumber air di tempat penampungan milik warga baik rumah kasus maupun non-kasus. Selain itu, sampel air yang diambil juga berasal dari badan air alami seperti air genangan, air selokan, air sawah, air sungai yang berada di lokasi yang ditemukan kasus leptospirosis.

Pada pengambilan sampel air juga dilakukan pemeriksaan lingkungan abiotik yang meliputi pemeriksaan suhu dan kelembaban udara di lokasi, pH air, salinitas air, dan kadar klorin dalam air. Penentuan suhu dan kelembaban udara diukur dengan hygrometer, nilai pH air menggunakan alat pH meter, salinitas air ditentukan dengan refraktometer, dan penentuan nilai kadar klorin dalam air menggunakan *chlorine test kit*. Pada proses pemeriksaan lingkungan abiotik dilakukan pengukuran secara langsung di lapangan.

Proses pengambilan sampel air menggunakan botol volume 600 ml dengan tujuan agar sampel air yang didapat banyak sehingga kemungkinan terdapat *Leptospira* patogenik juga besar. Proses penyimpanan sampel air setelah pengambilan dari lapangan disimpan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ dengan tujuan untuk memperlambat aktifitas biologi. Pada penelitian ini hanya dilakukan 1 x ulangan pengambilan sampel air di setiap titik. Setiap sampel air kemudian disaring menggunakan kertas saring berukuran $0,2\ \mu\text{m}$ yang dibentuk corong dengan tujuan agar setiap sampel air yang disaring, bakteri *Leptospira* dapat terkumpul di tengah corong kertas saring. Setelah kering, bagian ujung lancip kertas saring digunting lalu dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml kira-kira sampai dengan skala 0.1 ml. Tambahkan 180 μL *Digestion Buffer* dan 20 μL Proteinase K ke dalam *tube* kemudian divortex. Pastikan kertas telah terendam sepenuhnya dalam larutan. Kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit dengan sesekali divortex. Sentrifuge sampel pada kecepatan maksimal selama 2-3 menit pada suhu ruang untuk mengendapkan *pellet* kertas. Pindahkan supernatant ke *vial tube* baru yang steril kemudian tambahkan 20 μL RNase A, divortex, dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang. Tambahkan 200 μL *Lysis/Binding Buffer* dan divortex. Tambahkan 200 μL etanol 96–100% kemudian campur dengan vortex sampai larutan homogen.

Proses selanjutnya dilakukan amplifikasi PCR. Proses dilakukan secara *one step* menggunakan *Go Taq Green Master Mix* dengan formula : 12,5 μL *master mix*, 5,5 μL *Nuclease free water*, *primer forward* dan *reverse* masing-masing 1 μL dan 5 μL *DNA template*. Primer yang digunakan berasal dari segmen gen 16s rRNA dengan urutan : Lepat1 (forward) 5'-GAGTCTGGGATAACTTT-3' dan Lepat2 (reverse) 5'TCACATCGCTTGCTTATTTT-3'. Amplifikasi dijalankan dengan mesin *termocycler Bio Rad C 1000* dengan suhu amplifikasi sebagai berikut: Denaturasi awal (93°C selama 3 menit), Denaturasi (93°C selama 1 menit), Annealing (48°C selama 1 menit), Elongasi (72°C selama 1 menit), Elongasi akhir (72°C selama 10 menit), dan Holding (4°C). Pada proses Denaturasi, Annealing, dan Elongasi dilakukan proses 35 siklus. Selanjutnya produk DNA di visualisasi dengan

elektroforesis gel, menggunakan *agarose* 2% dengan DNA target adalah 330 bp.

Data hasil pemeriksaan lingkungan abiotik dan hasil pemeriksaan air dianalisis secara deskriptif.

HASIL

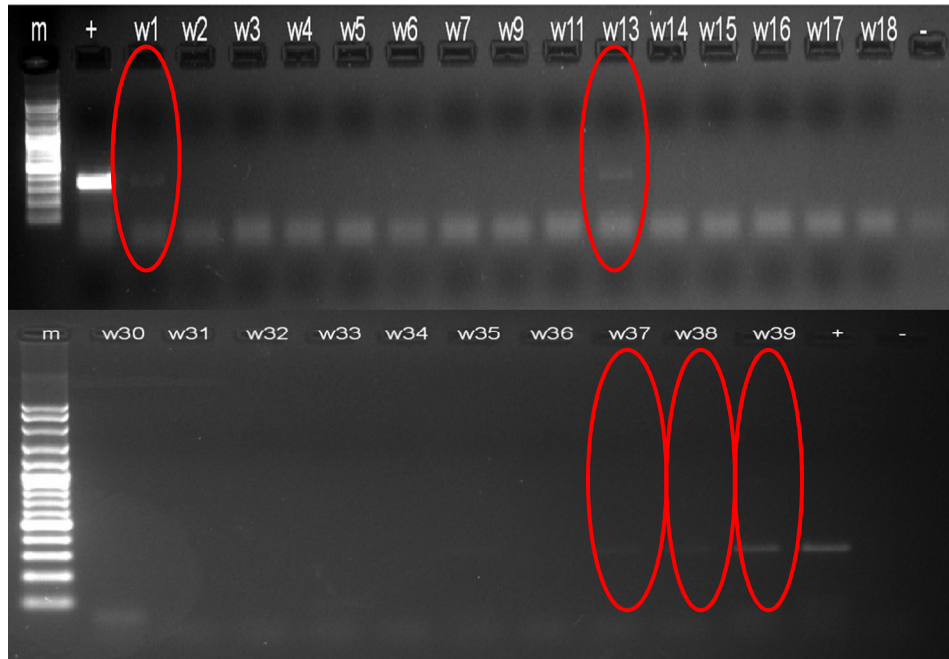
A. Karakteristik Kota Semarang

Kota Semarang memiliki topografi terdiri atas daerah pantai, dataran rendah, dan perbukitan. Ketinggian tempat bervariasi antara 0-3,5m di atas permukaan laut. Dataran rendah sangat sempit, yaitu sekitar 4 km dari garis pantai dikenal dengan sebutan Kota Bawah. Kawasan tersebut sering dilanda banjir, disebabkan luapan air laut (rob). Daerah perbukitan merupakan kawasan bagian selatan, ketinggian tempat antara 90-200 m dpl, dikenal dengan sebutan Kota Atas. Kota Atas meliputi Kecamatan Candisari, Mijen, Gunungpati, Tembalang dan Banyumanik. Karakteristik kontur wilayah berbukit dengan perbedaan ketinggian yang sangat curam, sehingga pada musim penghujan, air hujan di daerah hulu akan sangat cepat mengalir ke daerah hilir dan mengakibatkan banjir.

Kota Semarang beriklim tropis dengan dua musim, yaitu musim kemarau pada bulan April-September dan musim penghujan antara bulan Oktober-Maret. Curah hujan tahunan rata-rata sebesar 2.790 mm, suhu udara berkisar antara 23°C - 34°C , dengan kelembaban udara tahunan rata-rata 77%.

B. Pemeriksaan Sampel Air dan Pengukuran Lingkungan Abiotik

Sebanyak 60 sampel air diambil di seluruh wilayah Kota Semarang yang ditemukan kasus leptospirosis. Berdasarkan hasil PCR didapat sebanyak 5 sampel air (8,3%) positif mengandung *Leptospira* patogenik. Kelima sampel air yang positif tersebut berasal dari: sampel air sawah yang berada di Kelurahan Kudu, sampel air genangan pembuangan limbah rumah tangga di Kelurahan Bangetayu Wetan, sampel air got di Kelurahan Sambiroto, sampel air bak mandi rumah kasus di Kelurahan Tandang, serta sampel air bak mandi rumah warga di Kelurahan Randusari. Hasil PCR ditampilkan dalam Gambar 1 berikut:



Gambar 1. Hasil PCR air

Kejadian leptospirosis dipengaruhi oleh lingkungan abiotik. Lingkungan abiotik yang diukur meliputi suhu dan kelembaban udara, pH air, salinitas, dan kadar klor air. Hasil rekapitulasi pengukuran lingkungan abiotik di daerah dengan sampel air positif *Leptospira* disajikan dalam Tabel 1 berikut:

pertumbuhan bakteri *Leptospira* sekitar 25°C, dengan tidak terpapar sinar matahari langsung, oleh karena itu suhu udara pada lima daerah tersebut kurang cocok untuk pertumbuhan bakteri *Leptospira* di air. Akan tetapi menurut Khairani Bejo S, R. Bahaman A., (2004), yang mengujikan *Leptospira* serovar *Hardjo*

Tabel 1. Hasil Rekapitulasi Pengukuran Lingkungan Pada Daerah Sampel Air Positif *Leptospira*

No	Kelurahan	Rata-rata				
		Salinitas (%)	Suhu udara (°C)	Kelembaban (%)	pH air	Klor (mg/l)
1	Tandang (RW 13)	0	31,79	65,11	7,65 - 8,25	0 - 0,38
2	Sambiroto (RT 5 & RT 9)	0	32,83	66,67	7,93 - 8,20	0 - 0,50
3	Kudu	0	33,00	68,33	7,0 - 8,0	0 - 0,50
4	Randusari (RT 5 & RT 6)	0	34,49	71,58	7,0 - 8,63	0 - 1,15
5	Bangetayu Wetan (RT 1 RW 2)	0	31,40	74,67	7,5 - 8,70	0,5 - 1,0

PEMBAHASAN

Faktor lingkungan sangat berpengaruh terhadap kehidupan bakteri *Leptospira* di air. Faktor lingkungan tersebut antara lain pH air, suhu dan kelembaban udara, maupun salinitas air. Pada pengukuran suhu udara dan kelembaban udara di daerah dengan sampel air positif *Leptospira* didapat suhu rata-rata berkisar pada rentang 31-34°C dengan kelembaban rata-rata berkisar pada rentang 65-74%. Menurut Levett, (2001), suhu lingkungan yang optimal untuk menunjang

di beberapa jenis air menjelaskan bahwa di air selokan pada kondisi di bawah sinar matahari (32°C) mampu bertahan hidup selama 6 jam. Sedangkan kelembaban udara pada lima daerah tersebut sangat optimal untuk menunjang pertumbuhan bakteri *Leptospira* karena *Leptospira* hidup pada suasana basah/lembab lebih dari 31,4% (Sumanta *et al.*, 2015; Yuniyanto B., 2010).

Pada pengukuran pH air di daerah dengan sampel air positif *Leptospira* didapat hasil pengukuran berkisar pada rentang pH 7-8. Kondisi pH air tersebut sangat

mendukung pertumbuhan *Leptospira* karena *Leptospira* tumbuh optimal pada rentang 6,2-8 (Sumanta *et al.*, 2015). Manusia dapat terinfeksi melalui kontak dengan air jika telah terkontaminasi oleh urin tikus.

Pada daerah dengan sampel air positif *Leptospira* didapat nilai salinitas air rata-rata sebesar 0 ‰. Salinitas berhubungan dengan kadar garam terlarut dalam air, sehingga air di daerah dengan sampel air positif *Leptospira* termasuk jenis air tawar karena nilai salinitas <0,5 ‰ (Nybakken, 1992). Kondisi air ini sangat mendukung untuk kelangsungan hidup bakteri *Leptospira* karena *Leptospira* tidak dapat bertahan hidup pada salinitas yang tinggi/hanya mampu hidup kurang dari 24 jam pada salinitas yang tinggi (Viau & Boehm, 2011).

Pada pemeriksaan nilai klorin dalam air menunjukkan kadar klorin di daerah dengan sampel positif *Leptospira* berkisar pada rentang 0-1 mg/l. Adanya kadar klorin dalam air berpengaruh sebagai desinfektan yang digunakan dalam membunuh kuman penyakit. Menurut WHO, (2011) kandungan klorin dalam air sebesar 2,5 mg/l dapat membunuh semua organisme/kuman, sedangkan sisa klorin dalam air yang efektif sebagai desinfektan sebesar $\geq 0,5$ mg/l setelah kontak minimum 30 menit dengan pH < 8,0. Oleh karena itu, dari hasil pengukuran di lima daerah tersebut, masih cukup kadar klorin untuk membunuh *Leptospira* dalam air meskipun pemeriksaan PCR terdeteksi adanya *Leptospira* dalam sampel air akan tetapi kemungkinan telah mati.

Penularan leptospirosis dapat karena pengaruh lingkungan. *Leptospira* dapat bertahan hidup di air. Lingkungan yang basah dan lembab serta tidak terkena sinar matahari secara langsung merupakan tempat yang berpotensi untuk media penularan leptospirosis. Dari sampel yang diperiksa dengan PCR tampak bahwa 8,3% positif bakteri *Leptospira* patogenik. Persentase air positif bakteri *Leptospira* patogenik ini menunjukkan nilai persentase yang besar dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Wójcik-fatla *et al.*, (2014), yang menemukan 5% sampel air (2 dari 40 sampel air) di Polandia positif mengandung DNA *Leptospira*. Hasil penelitian lain yang dilakukan Vital-brazil *et al.*, (2010) juga menemukan 3% sampel air (3 dari 100 sampel air) di daerah perkotaan Brazil positif terdapat DNA Spirochaeta. Begitu pula hasil yang dilaporkan oleh Muñoz-zanzi, Mason, Encina, Astroza, & Romero, (2014) di Chile berdasarkan hasil PCR menunjukkan persentase lebih kecil sebesar 3,9% dari sampel air yang dikumpulkan dari sungai dan saluran irigasi (4 dari 103 sampel air). Namun, hasil presentase pada penelitian

ini lebih kecil dibandingkan penelitian yang dilakukan Rawlins, Portanova, Zuckerman, & Loftis (2014) di Pulau St. Kitts yang menemukan sampel air pada air permukaan positif *Leptospira* sebanyak 18% (8 dari 44 sampel) berdasarkan hasil PCR. Presentase tinggi juga ditemukan oleh Saito *et al.*, (2013) di Filipina dan Jepang yang menemukan sampel air sebanyak 42,5% dari hasil isolasi *Leptospira* (31 dari 73 sampel air).

Keberadaan air yang terkontaminasi di lingkungan baik di dalam rumah maupun badan air alami merupakan faktor penting dalam penularan leptospirosis. Penularan leptospirosis melalui air atau lingkungan merupakan tipe penularan secara tidak langsung. Air yang telah terkontaminasi oleh urin hewan akan masuk ke dalam tubuh melalui kulit yang luka atau membran mukosa (Saroso, 2003).

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah kurangnya ulangan dalam pengambilan sampel air yang hanya dilakukan 1 x dikarenakan banyaknya sampel air yang diambil.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Sebanyak 5 dari 60 sampel air (8,3%) yang diambil di Kota Semarang dideteksi positif *Leptospira* patogenik. Hasil pengukuran lingkungan abiotik di daerah positif *Leptospira* yaitu salinitas, pH, suhu dan kelembaban udara sangat mendukung pertumbuhan *Leptospira*.

Saran

Perlu dilakukan pengendalian leptospirosis terhadap sumber air maupun badan air alami yang ada di masyarakat melalui pemberian desinfektan menggunakan klorin atau Sodium Hipoklorit dengan dilakukan pengecekan kadar sisa klor terlebih dahulu secara rutin. Selain itu, pada badan air alami juga dilakukan penyemprotan menggunakan klorin. Masyarakat atau pekerja agar selalu memakai alat pelindung diri saat bekerja atau berada di lingkungan yang berair.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga, Kepala Dinas Kesehatan Kota Semarang beserta seluruh stafnya, Dr. Ristiyanto, M.Kes, peneliti dan teknisi B2P2VRP, tokoh masyarakat serta semua pihak yang telah berpartisipasi aktif terhadap pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Dinas Kesehatan Kota Semarang. 2012. *Profil Kesehatan Kota Semarang 2012* . pp. 66–68.
- Khairani Bejo S, R. Bahaman A., Z.-S. M. and R. M. A. 2004. the survival of leptospira interrogans. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(3), 123–129.
- Levett, P. N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296–326.
- Muñoz-zanzi, C., Mason, M. R., Encina, C., Astroza, A., & Romero, A. 2014. Leptospira Contamination in Household and Environmental Water in Rural Communities in Southern Chile. *Int.J. Environ. Res. Public Health*, 11(7), 6666–6680.
- Nybakken JW, 1992, *Biologi laut suatu pendekatan biologis*, Eidman M, Koesoebiono, Bengen DG, Hutomo M, Sukardjo S, editor. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Rawlins, J., Portanova, A., Zuckerman, I., & Loftis, A. 2014. Molecular Detection of Leptospiral DNA in Environmental Water on St . Kitts. *Int.J. Environ. Res. Public Health*, 11(8), 7953–7960.
- Saito, M., Villanueva, S. Y. A. M., Chakraborty, A., Miyahara, S., Segawa, T., & Asoh, T. 2013. Comparative Analysis of Leptospira Strains Isolated from Environmental Soil and Water in the Philippines and Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), 601–609.
- Saroso, S, 2003, *Pedoman Tatalaksana Kasus dan Pemeriksaan Laboratorium Leptospirosis di Rumah Sakit*. Jakarta: Departemen Kesehatan R.I.
- Sumanta, H., Wibawa, T., Hadisusanto, S., Nuryati, A., & Kusnanto, H. 2015. Spatial Analysis of Leptospira in Rats , Water and Soil in Bantul District Yogyakarta Indonesia. *Open Journal of Epidemiology*, 5(1), 22–31.
- Viau, E. J., & Boehm, A. B. 2011. Quantitative PCR-based detection of pathogenic Leptospira in Hawai ' ian coastal streams. *Journal of Water and Health*, 9(4), 637–646.
- Vijayachari, P. 2010. *Leptospirosis. Leptospirosis (Laboratory Manual)*.
- Vital-brazil, J. M., Balassiano, I. T., Oliveira, F. S. De, Dias, A., Costa, D. S., Hillen, L., & Pereira, M. M. 2010. Multiplex PCR-based detection of leptospira in environmental water samples obtained from a slum settlement. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(3), 353–355.
- Wahyuni, dkk, 2011, *Kajian Leptospirosis di Kota Semarang*. Semarang: Departemen Kesehatan Provinsi Jateng.
- WHO. 2003. *Human Leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control*. p. iii.
- WHO. 2011. *Guidelines for Drinking-water Quality*, 4th ed.
- Widoyono. 2008, *Penyakit tropis: epidemiologi, penularan, pencegahan dan pemberantasannya*. Jakarta : Erlangga.
- Wójcik-fatla, A., Zajac, V., Wasinski, B., Sroka, J., Cisak, E., Sawczyn, A., & Dutkiewicz, J. 2014. Occurrence of Leptospira DNA in water and soil samples collected in eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21(4), 730–732.
- Wynwood, S. J., Graham, G. C., Weier, S. L., Collet, T. A., Mckay, D. B., & Craig, S. B. 2014. Leptospirosis from water sources. *Pathogens and Global Health*, 108(7), 334–338.
- Yunianto B, 2010, *Studi epigeografi kejadian leptospirosis di Kabupaten Gresik Provinsi Jawa Timur*, Laporan Akhir Penelitian, Banjarnegara: Loka Litbang P2B2 Banjarnegara.
- Yunianto B, Tri Ramadhani, Dewi Marbawati, Zumrotus, 2009, *Studi Epidemiologi Leptospirosis di Kota Semarang Tahap II*, Laporan Penelitian. Banjarnegara. Loka Penelitian dan Pengembangan P2B2.