

INTISARI

Leptospirosis merupakan penyakit zoonosis dan merupakan *reemerging infectious disease* yang penting di Indonesia. Leptospirosis pada sapi terutama disebabkan oleh *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Diagnosis leptospirosis biasanya dilakukan berdasarkan uji serologis dengan *Microscopic Agglutination Test* (MAT), tetapi MAT ini membutuhkan antigen hidup, harus disubkultur setiap minggu dan uji bersifat subyektif. Baru-baru ini penelitian difokuskan pada identifikasi *outer membrane protein* bakteri yaitu protein LipL32. Protein ini merupakan protein yang *conserved* terhadap serovar *Leptospira* patogen. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengekspresikan dan mempurifikasi protein rekombinan LipL32 dari *Leptospira interrogans* serovar Hardjo sebagai sumber antigen untuk diagnosis leptospirosis pada sapi. Bakteri ditumbuhkan pada media *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH) selama 7 hari sampai mencapai konsentrasi 2×10^8 *Leptospira*/ml. Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen). Konsentrasi DNA diukur dengan NanoSpektrofotometer (OD₂₆₀). Amplifikasi gen LipL32 dilakukan dengan *KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit* (KAPA biosystems) dan dianalisis dengan elektroforesis. Gen LipL32 yang diperoleh dimurnikan dengan *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). DNA hasil purifikasi dipotong dengan enzim restriksi XhoI dan EcoRI-HF dan dikloning ke dalam vektor pRSET C yang dipotong dengan enzim yang sama. Proses Ligasi DNA dilakukan dengan enzim T4 DNA ligase. Produk ligasi pRSET C-DNA LipL32 ditransformasi ke dalam sel *E.coli* BL21 (DE3) pLysS dan dipilih transforman yang resisten terhadap ampicillin. Ekspresi protein LipL32 dilakukan dengan menginduksi sel menggunakan IPTG selama 1, 2, 3 dan 4 jam pada suhu 37°C dan protein yang dihasilkan dipurifikasi dengan *QIAexpress[®] Ni-NTA Fast Start Kit* (Qiagen). Analisis protein dilakukan dengan SDS-PAGE dan *western blotting*. Amplifikasi gen LipL32 menghasilkan produk PCR sebesar 782 bp. Pada percobaan induksi ekspresi dengan IPTG, ekspresi protein paling tinggi dicapai pada induksi 4 jam suhu 37°C. Konsentrasi protein hasil purifikasi yaitu 0,11 mg/ml. Hasil analisis protein dengan SDS-PAGE menunjukkan pita dengan ukuran 32 kDa dan hasil *western blotting* menunjukkan bahwa protein LipL32 mampu mengenali serum anti-*Leptospira* terhadap serovar Canicola, Ballum, Hardjo, Batavia, Tarrasovi dan Rachmati. Protein LipL32 *conserved* terhadap beberapa serovar *Leptospira* patogen yang digunakan sehingga dapat digunakan sebagai sumber antigen untuk pengembangan teknik diagnosis leptospirosis pada sapi.

Kata kunci: Ekspresi, purifikasi, protein rLipL32, *Leptospira interrogans*, Hardjo, leptospirosis

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease and important reemerging infectious disease in Indonesia. Bovine leptospirosis is mainly caused by *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Diagnosis of leptospirosis is usually carried out based on serological test with Microscopic Agglutination Test (MAT), but it need live antigen, must subculture every week, and the test is subjective. Recently, research has focused on the identification of bacterial outer membrane proteins such as LipL32 protein. This protein is conserved within pathogenic *Leptospira* serovar. The purpose of this study is to express and purify LipL32 recombinant protein from *Leptospira interrogans* serovar Hardjo as a source of antigen for the diagnosis of bovine leptospirosis. *Leptospira interrogans* serovar Hardjo was grown in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) media for 7 days until it reached concentration of 2×10^8 *Leptospira*/ml. The genomic DNA was isolated using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). DNA concentration was measured by NanoSpektrofotometer (OD260). LipL32 gene amplification was carried out with KAPA HiFi HotStart Ready Mix PCR Kit (KAPA biosystems). The PCR product was analyzed by electrophoresis and purified with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Purified DNA was digested with XhoI and EcoRI-HF restriction enzyme and cloned into pRSET C vector which was digested with the same enzymes. DNA ligation process was carried out with T4 DNA ligase. Ligation product of LipL32 DNA-pRSET C was transformed into *E.coli* BL21 (DE3) pLysS cells. Transformants were selected which resistant for ampicillin. LipL32 protein expression was performed by inducing cells using IPTG for 1, 2, 3, 4 hour at 37°C. The protein was purified with QIAexpress® Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen) and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. LipL32 gene amplification produced PCR product of 782 bp. On the experiment for induction of expression with IPTG, the highest protein expression was achieved for 4 hours induction at 37°C. The concentration of purified protein was 0.11 mg / ml. Protein analysis by SDS-PAGE showed a band with size of 32 kDa. Western blotting assay showed that the LipL32 protein able to recognized anti-*Leptospira* serum against Canicola, Ballum, Hardjo, Batavia, Tarrasovi and Rachmati serovar. LipL32 protein conserved within some pathogenic *Leptospira* serovar can be used as an antigen source for the development of bovine leptospirosis diagnostic techniques.

Keywords: Expression, purification, rLipL32 protein, *Leptospira interrogans*, Hardjo, leptospirosis