

## PENDAHULUAN

Leptospirosis merupakan salah satu penyakit zoonosis yang tersebar luas di seluruh dunia terutama di daerah tropis. Penyakit ini berpotensi untuk menjadi endemis, dan telah menyebabkan *outbreak* (Kejadian Luar Biasa/KLB) di beberapa benua. Penyakit ini diketahui dapat menyerang hewan liar maupun domestik yang selanjutnya hewan-hewan tersebut dapat melepaskan bakteri *Leptospira* ke lingkungan melalui urin mereka. Manusia merupakan *accidental host* yang juga dapat terinfeksi *Leptospirosis* bila terkontaminasi urin hewan yang mengandung *Leptospira*. Gejala yang ditimbulkan sangat bervariasi mulai dari asimtomatis hingga terjadinya kerusakan multiorgan yang sangat fatal.<sup>1)</sup>

Leptospirosis penting untuk diperhatikan karena penyakit ini penyebarannya luas, mengancam kehidupan manusia dan hewan, serta berdampak pada ekonomi. *Leptospirosis* pada manusia dapat berupa penyakit ringan sampai berat bergantung kepada serovar yang menginfeksi. Penderita penyakit *leptospirosis* yang kronis dapat bertindak sebagai karier karena bakteri dapat bersarang di dalam ginjal dan *Leptospira* diekskresikan bersama urin mulai minggu pertama setelah infeksi dan berlangsung sampai beberapa bulan.<sup>1)</sup>

Luasnya penyebaran *Leptospirosis* menyebabkan sulitnya proses penanggulangan penyakit ini. Daerah padat penduduk dengan kondisi sanitasi yang buruk memperbesar peluang terjadinya kontaminasi oleh bakteri *Leptospira* melalui air. Salah satu cara penanggulangan yang dapat dilakukan adalah dengan mendesain vaksin anti *Leptospirosis*.

Vaksin untuk *Leptospirosis* pada manusia telah dikembangkan di beberapa negara termasuk Jepang. Vaksin ini merupakan jenis *killed whole cell* yang berasal dari bakteri *Leptospira* yang telah dimatikan dengan menggunakan formalin. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa vaksin jenis ini dapat menginduksi imunitas jangka panjang.<sup>1)</sup>

Namun, ada beberapa kelemahan yang ada pada *killed vaccine*, diantaranya timbulnya efek samping yang

berupa reaksi lokal dan sistemik. Untuk mengurangi efek samping ini digunakan bakteri *Leptospira* yang ditumbuhkan pada media penumbuh yang bebas protein. Namun ternyata setelah diujikan, ternyata tidak bisa mengurangi efek samping yang ditimbulkan. Selain itu, *whole cell vaccine* juga diketahui dapat menimbulkan penyakit autoimun seperti uveitis.<sup>2)</sup> Kelemahan lain dari pembuatan *whole cell vaccine* adalah kesulitan untuk mengkultur bakteri *Leptospira*. *Leptospira* merupakan salah satu jenis *spirochaeta*. Berbeda dengan jenis bakteri yang lain, *spirochaeta* cenderung lebih sulit untuk dikultur karena membutuhkan kondisi yang lebih khusus untuk proses pertumbuhannya.<sup>3)</sup>

## DESAIN VAKSIN SUB UNIT UNTUK LEPTOSPIROSIS

Permasalahan inilah yang kemudian mendorong untuk dilakukannya kajian pada *Outer Membrane Protein* (OMP) bakteri *Leptospira*. OMP merupakan protein yang *conserved* pada spesies *Leptospira* patogen yang dapat menimbulkan *cross protection* terhadap infeksi oleh berbagai serovar *Leptospira*. Protein ini dianggap memiliki potensi yang besar untuk digunakan sebagai vaksin sub unit.<sup>3)</sup>

Membrane luar bakteri *Leptospira* terdiri dari protein transmembran dan lipoprotein. Protein transmembran merupakan porin seperti *OmpL1* dan Lipoprotein seperti *LipL41* dan *LipL36*, tetapi yang terekspose di permukaan hanya *Lip41*. *OmpL1* dikode oleh suatu *single gene* yang hanya dimiliki oleh spesies *Leptospira* patogen, sedangkan spesies non patogen tidak memiliki gen ini. OMP yang merupakan bagian yang terekspose di permukaan sel bakteri memiliki kaitan yang erat dengan patogenesis bakteri. Hal ini dibuktikan dengan penemuan yang menunjukkan bahwa *OmpL1* dan *LipL41* memang terekspresi selama bakteri menginfeksi inang mamalia. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan diketahui bahwa *OmpL1* dan *LipL41* memiliki aktivitas sinergis yang menghasilkan kemampuan proteksi dengan tingkat yang signifikan terhadap infeksi.<sup>3)</sup>

\* Balai Litbang P2B2 Banjarnegara

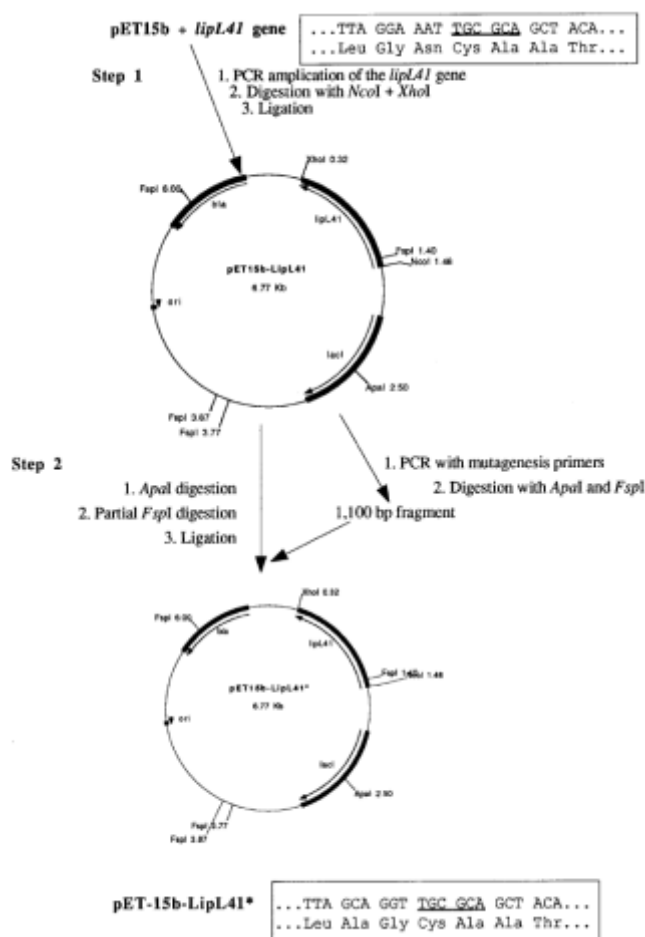
## PEMBUATAN OMPREKOMBINAN

Karena sulitnya proses purifikasi OMP murni yang tidak terkontaminasi komponen membran yang lain, maka dibuatlah OMP rekombinan. Dengan pembuatan OMP rekombinan ini akan memudahkan untuk mendapatkan OMP murni tanpa harus melakukan kultur bakteri dalam jumlah banyak dan lebih mudah purifikasinya. Selain itu, dengan metode rekombinan ini dapat dihasilkan OMP yang strukturnya sama dengan OMP asli yang sedang berikatan dengan lipid bilayer yaitu ketika sel bakteri menempel pada sel inang mamalia. Adapun metodenya adalah sebagai berikut:<sup>3)</sup>

1. Dilakukan kultur bakteri *Leptospira* dari strain yang patogen untuk mengisolasi gen OmpL1 dan LipL41
2. Gen OmpL1 *deconstruct* pada plasmid ekspresi pMMB66
3. Dilakukan amplifikasi gen OmpL1 dengan menggunakan PCR

4. Gen LipL41 *deconstruct* pada plasmid pET-15b lalu dimutagenesis dengan PCR untuk mengubah lipoprotein signal peptidase yang sesuai untuk *Leptospira* menjadi lipoprotein signal peptidase yang sesuai untuk *E. coli*
5. Kedua plasmid ditransformasi ke bakteri *E. coli* kemudian diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37°C
6. Rekombinan OMPL1 dan LipL41 yang selanjutnya disebut OmpL1-M dan LipL41-M dipanen dari membran sel *E. coli* dengan cara diisolasi menggunakan sentrifugasi pada kecepatan maksimal selama 30 menit.

Kemampuan imunoprotektif dari OMP *Leptospira* sangat terkait dengan asosiasi protein ini pada membrane sel bakteri. Oleh karena itu, untuk mengevaluasi kemampuan tersebut, dibuat OMP rekombinan yang sedemikian rupa sehingga sifatnya sama dengan pada saat terasosiasi pada membran sel.



Gambar 1. PCR mutagenesis of the lipoprotein signal peptidase cleavage site of LipL41.<sup>3)</sup>

OmpL1 merupakan protein transmembran yang berfungsi sebagai porin pada membran luar bakteri *Leptospira*. Berdasarkan pengamatan crystallography dan analisis sekuen asam amino dari OMP *E.coli*, diperkirakan OmpL1 mengandung segmen transmembran yang melintasi membran luar dengan konformasi beta. Konformasi OMP rekombinan dibuat sangat mirip dengan protein aslinya ketika sedang berasosiasi dengan lipid *bilayer* yang ada pada membran sel bakteri.<sup>3)</sup>

LipL41 rekombinan didesain agar mempunyai lipoprotein signal peptidase yang sesuai untuk *E.coli* dengan cara melakukan mutagenesis dengan PCR. Tujuan mutagenesis ini adalah untuk mengubah sekuens LGNC menjadi LAGC (gambar 1). Pada proses mutagenesis tersebut, perubahan urutan basa tidak menyebabkan perubahan asam amino, karena kodon yang berubah tetap menyandi asam amino yang sama.

**Gambar 1. PCR mutagenesis of the lipoprotein signal peptidase cleavage site of LipL41.**<sup>3)</sup>

#### EVALUASI IMUNOGENISITAS OmpL1-M and LipL41-M

Untuk mengevaluasi imunogenisitas protein OmpL1-M dan LipL41-M, dilakukan imunisasi dengan kombinasi OmpL1-M dan LipL41-M yang diberikan kepada hamster untuk memberikan proteksi yang signifikan terhadap *L. Kirschneri* secara intra parenteral. Dari beberapa experiment terbukti bahwa *survival rate* dari kelompok yang mendapatkan *dual immunization* selalu lebih tinggi dibanding kelompok kontrol yang tidak diberi OmpL1-M dan LipL41-M.<sup>3)</sup>

Berbeda dari hasil imunisasi menggunakan kombinasi OmpL1-M dan LipL41-M, imunisasi dengan OmpL1-M saja tidak bisa memberikan proteksi dengan tingkat yang signifikan. Demikian juga pada hamster yang hanya diimunisasi dengan LipL41 saja terbukti sama sekali tidak mendapatkan proteksi terhadap infeksi *L.kirschneri*. Hal ini menandakan bahwa ada mekanisme sinergi antara OmpL1-M dan LipL41-M yang meningkatkan aktivitas imunoprotektif. Namun bagaimana mekanisme ini bekerja masih belum diketahui.<sup>3)</sup>

OMP *Leptospira* memiliki beberapa kelebihan untuk dijadikan vaksinogen terhadap Leptospirosis. Salah satu diantaranya adalah protein ini merupakan protein yang conserved, yang hanya ada pada spesies *Leptospira* patogen. Dan protein ini bisa terekspresi baik pada biakan bakteri ataupun pada saat menginfeksi inang mamalia. Dengan sekuens yang conserved ini maka dimungkinkan adanya proteksi terhadap berbagai spesies *Leptospira* patogenik. Berdasarkan data dari *GenBank*, diketahui bahwa sekuen asam amino penyusun LipL41 dari *L. interrogans* serovar pomona dan *L. Kirschneri* serovar grippotyphosa memang 99% identik.<sup>3)</sup>

#### KESIMPULAN

Vaksin subunit dengan menggunakan OMP *Leptospira* memiliki peluang untuk dikembangkan. Kombinasi protein OmpL1 dan LipL41 sangat berpotensi untuk menjadi vaksinogen terhadap Leptospirosis. Karena protein ini merupakan protein yang conserved, yang hanya ada pada spesies *Leptospira* patogen dan bisa terekspresi baik pada biakan bakteri ataupun pada saat menginfeksi inang mamalia. Di samping itu, adanya aktivitas sinergi antara OmpL1 dan LipL41 terbukti dapat meningkatkan tingkat proteksi secara signifikan.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Koizumi N, Watanabe H. Leptospirosis Vaccines: Past, Present and Future. [www.jpgmonline.com](http://www.jpgmonline.com)
2. Bolin, C. A., J. A. Cassells, R. L. Zuerner, and G. Trueba. 1991. Effect of Vaccination with A Monovalent *Leptospira Interrogans* Serovar Hardjo Type Hardjo-Bovis Vaccine on Type Hardjo-Bovis Infection of Cattle. *Am. J. Vet.Res.* 52:1639–1643.
3. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, et al. 1999. *Leptospira* Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 Exhibit Synergistic Immunoprotection. *J Infect Immun* (67)