

BOTULISMUS: PATOGENESIS, DIAGNOSIS DAN PENCEGAHAN

LILY NATALIA dan A. PRIADI

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114
lilynataliad@live.com

(Makalah masuk 4 April 2012 – Diterima 18 Agustus 2012)

ABSTRAK

Botulismus adalah penyakit yang berpotensi menyebabkan kematian pada hewan maupun manusia, bersifat neuromuscular yang disebabkan oleh toksin dari *Clostridium botulinum*. *Clostridium botulinum* tersebar secara luas dalam tanah dan tanaman, isi usus dari hewan mamalia, burung dan ikan. Kedelapan tipe *C. botulinum* (A, B, C1, C2, D, E, F, G) telah dikenali dan masing-masing tipe toksin secara imunologik berbeda. Neurotoksin botulinum merupakan toksin biologis terkuat yang pernah diketahui dan bahkan di beberapa negara telah dikembangkan menjadi senjata biologis. Selain itu, aspek medik dari toksin telah dikembangkan untuk pengobatan berbagai penyakit pada manusia. Spora *C. botulinum* relatif tahan panas tetapi toksin botulinum tidak tahan panas dan dapat dinaktifasi dengan antitoksin yang sesuai. Toksin botulinum menimbulkan manifestasi klinis jika masuk melalui pernafasan atau mulut. Sesudah toksin diabsorpsi, maka toksin masuk dalam aliran darah menuju *synaps* cholinergik perifer. Toksin akan diinternalisasi dan secara ensimatik akan menghambat pelepasan *acetyl choline*, yang pada akhirnya berakibat paralisis. Diagnosis laboratorium untuk botulismus yang utama harus dilakukan adalah isolasi *C. botulinum* dan deteksi toksinnya dalam individu yang terserang. Deteksi cepat dan sensitif terhadap semua tipe toksin botulinum diperlukan dalam kasus botulismus. Kasus botulismus di Indonesia ditemukan terutama pada unggas dan meskipun banyak kasus dicurigai botulismus tetapi tidak dilakukan konfirmasi diagnosis laboratorium. Kasus botulismus yang diduga terjadi pada sapi di Jawa Timur menunjukkan hasil uji serologi positif untuk *C. botulinum* tipe C. Pencegahan botulinum dengan vaksinasi dapat menginduksi respon antibodi yang kuat dan mampu bertahan protektif selama 12 bulan, sedangkan pengobatan pada hewan biasanya tidak efektif.

Kata kunci: Botulismus, *Clostridium botulinum*, toksin, diagnosis, pencegahan

ABSTRACT

BOTULISM: PATHOGENESIS, DIAGNOSIS AND PREVENTION

Botulism is a potential lethal disease in animals as well as in human, a neuromuscular disease caused by *Clostridium botulinum* toxin. *C. botulinum* is widely distributed in the soil and vegetation, intestinal contents of mammals, birds and fish. Eight types of *C. botulinum* (A, B, C1, C2, D, E, F, G) have been recognized, each elaborating an immunologically distinct form of toxin. Botulinum neurotoxins are the most powerful biological toxins known and in some countries they have been studied and developed as biological weapon. The medical aspects of the toxin were also developed for therapeutic uses in human diseases. The spores of *C. botulinum* are relatively heat resistant and in contrast to the spores, botulinum toxin is relatively heat labile. Botulinum toxins are inactivated by their antitoxins. Botulinum toxin produces clinical manifestations when either inhaled or ingested. After toxin is absorbed, it enters the bloodstream and travels to peripheral cholinergic synapses, primarily the neuromuscular junction. Once at these sites, botulinum toxin is internalized and enzymatically prevents the release of acetylcholine leads to paralysis. Laboratory diagnoses for botulism should include isolating *C. botulinum* and detecting of toxin in the patient. Rapid and sensitive detection of all types of botulinum toxin are needed. Cases of botulism in Indonesia were found primarily in poultry and many cases were suspected and remained undiagnosed. Cases of botulism were suspected affecting cattle in East Java and serologically results showed positive to *C. botulinum* type C. The botulismus prevention using vaccine induced a strong antibody response and could be remained protective for 12 months, while botulism treatment in animals is usually ineffective.

Key words: Botulism, *Clostridium botulinum*, toxin, diagnosis, prevention

PENDAHULUAN

Botulismus merupakan penyakit yang bersifat neuromuscular (melumpuhkan syaraf), dan biasanya berakibat fatal. Penyakit ini dapat menyerang manusia, unggas, hewan mamalia, dan ikan yang disebabkan

karena paparan toksin dari berbagai biotipe *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*). Pada manusia, telah dikenal *food borne botulism* (botulismus akibat tertelannya *C. botulinum* dan neurotoksinnya bersama makanan), *infant botulism* (botulismus akibat tertelannya spora *C. botulinum* toksigenik), *infectious botulism* (botulismus

akibat berkembangnya *C. botulinum* dalam usus setelah proses pembedahan atau luka di daerah perut), dan *inhalation botulism* atau botulismus akibat terhirupnya neurotoksin botulinum melalui saluran pernafasan (LINDSTROM dan KORKEALA, 2006). Pada unggas, penyakit botulismus disebut juga *limberneck*, *western duck sickness*, *duck disease* dan *alkaline poisoning* (LOCKE dan FRIEND, 1989; HOGG *et al.*, 2008). Kasus botulismus pada sapi biasanya dihubungkan dengan tertelannya bangkai dari hewan kecil atau burung, yang mengandung toksin *C. botulinum* akibat *pica* yang dapat dialami hewan yang berada dalam daerah defisiensi fosfor atau mineral lain (APPLEYARD dan MOLLISON, 1985). Kejadian botulismus pada sapi dan domba dapat juga terjadi dengan penggunaan limbah alas kandang (*litter*) dari peternakan ayam pedaging sebagai pupuk padang penggembalaan sapi (OTTER *et al.*, 2006). Kemungkinan limbah alas kandang tersebut juga mengandung bangkai hewan kecil yang sudah membusuk dan mengandung toksin *C. botulinum*. Tertelannya toksin oleh sapi akan menyebabkan timbulnya kasus botulismus pada sapi.

Penyakit ini dapat terjadi di mana-mana karena spora *C. botulinum* tersebar luas di tanah, tanaman, isi usus hewan dan manusia. Penyakit ini kurang dikenal di Indonesia karena pada umumnya hewan yang mati akibat botulismus tidak didiagnosa di laboratorium, kecuali bila ada jumlah kematian ternak yang tinggi dan pemilik hewan ingin mengetahui penyebab kerugian yang dideritanya. Botulismus pada manusia karena tertelannya toksin dari makanan lebih jarang ditemui daripada kasus pada hewan. Masyarakat umumnya telah menyadari pentingnya kebersihan dan risiko yang besar jika mengkonsumsi makanan dalam kaleng yang tidak dipanaskan. Toksin syaraf (neurotoksin) yang dihasilkan *C. botulinum* dapat bertahan dalam suhu kamar atau suhu dingin, tetapi tidak tahan panas dan dapat diinaktivasi pada 100°C selama 10 menit.

AGEN PENYEBAB BOTULISMUS

Penyebab botulismus adalah neurotoksin dari *Clostridium botulinum* yang merupakan bakteri berspora, berbentuk batang, Gram positif dan bersifat anaerobik. Spora dari *C. botulinum* tersebar dalam tanah, tumbuh-tumbuhan, isi usus hewan mamalia, unggas dan ikan. Dalam kondisi tertentu, spora dapat bergerminasi menjadi sel vegetatif yang dapat menghasilkan toksin. Hal ini yang menyebabkan *C. botulinum* dapat tumbuh dan menghasilkan neurotoksin dalam kondisi anaerobik seperti pada bangkai hewan ataupun dalam makanan kalengan.

Botulismus merupakan gejala intoksikasi yang terjadi karena aktivitas neurotoksin botulinum. Ada 8 tipe *C. botulinum* yaitu A, B, C1, C2, D, E, F dan G

yang menghasilkan toksin berbeda secara imunologis. Botulismus pada manusia disebabkan terutama oleh neurotoksin dari tipe A, B dan E dan terkadang tipe F. Sedangkan tipe C dan D menyebabkan botulismus pada hewan (unggas, sapi dan kuda). Tetapi, ada beberapa reaksi silang serum diantara serotipe tersebut, karena adanya kesamaan beberapa sekuens yang homolog seperti yang terjadi juga pada toksin tetanus (HALPERN *et al.*, 1989). *Clostridial* C2 sitotoksin adalah enterotoksin tetapi bukan neurotoksin. Toksin ini menyerang permeabilitas vaskular multi organ melalui kerusakan seluler dari aksinya pada polimerisasi *actin* dalam kerangka sel selular dan telah diimplikasikan sebagai penyakit enterik yang fatal pada burung air (AKTORIES dan BARTH, 2004).

Neurotoksin botulinum merupakan protein dengan berat molekul 150 kDa yang mempunyai aktivitas *zinc-endopeptidase* (protease/endopeptidase spesifik yang tergantung pada keberadaan ion Zn) (MONTECUCCO dan SCHIAVO, 1993). Toksin ini dapat diaktivasi oleh pemecahan proteolitik. Molekul toksin disekresikan sebagai toksin awal yang mengandung neurotoksin dan komponen nontoksik lainnya. Komponen nontoksik akan melindungi neurotoksin terhadap stres lingkungan dan membantu proses absorpsi neurotoksin ke dalam tubuh. Molekul neurotoksin botulinum terdiri atas 2 subunit yang dihubungkan oleh ikatan tunggal disulfida. Sub-unit 100 kDa (*heavy chain*) berperan dalam pengikatan dan translokasi toksin menyeberangi *membrane synaptic* melalui reseptor spesifik, dan sub-unit 50 kDa (*light chain*) berperan memecah protein yang terlibat dalam *acetyl choline vesicle docking* serta berfusi ke membran *presynaptic* (MONTECUCCO dan SCHIAVO, 1994). Penghambatan pelepasan *neurotransmitter* menyebabkan adanya kelumpuhan otot.

Berdasarkan karakteristik atau aktivitas metabolik bakterinya, *C. botulinum* dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok I termasuk tipe A dan galur proteolitik tipe B dan F. Kelompok II termasuk tipe E dan galur nonproteolitik tipe B dan F. Kelompok III termasuk galur nonproteolitik tipe C dan D. Kelompok IV adalah tipe G. Secara umum, kelompok proteolitik I dari *C. botulinum* bekerja dengan enzim endogenous dari bakteri, tetapi neurotoksin yang dihasilkan oleh galur proteolitik kelompok II memerlukan protease eksternal seperti tripsin untuk aktifasinya (DAHLENBORG *et.al.*, 2003).

Toksin *C. botulinum* adalah toksin biologis terkuat dari semua toksin lain yang pernah dikenal. Dosis toksik tipe A sekitar 0,001 µg/kg, sehingga dosis yang dapat membunuh manusia dengan berat badan sekitar 70 kg dengan rute per oral adalah sekitar 70 µg, dengan rute pernafasan: 0,7 – 0,9 µg dan secara *intravenous* 0,09 sampai 0,15 µg. (SOBEL, 2005; DEMBEK *et al.*, 2009). Karena potensinya, toksin dari *C. botulinum*

merupakan salah satu senjata biologis pertama yang telah dikembangkan di beberapa negara seperti Jepang, Jerman, Amerika, Rusia dan Irak (SUGISHIMA, 2003; ZILINSKAS, 1997; WEIN dan LIU, 2005). Senjata biologis toksin botulinum biasanya disebarkan secara aerosol atau melalui makanan.

Spora *C. botulinum* dapat bertahan sampai 3 – 4 jam jika dididihkan atau pada suhu 105°C selama 100 menit. Spora dapat dibunuh oleh klorin atau larutan hipoklorit. Spora *C. botulinum* dapat bergerminasi jika diaktivasi oleh panas. Pengamatan untuk *C. botulinum* tipe A, menunjukkan kemampuan bergerminasi dengan perlakuan panas atau *heat shocking* pada suhu 80°C selama 10 – 20 menit. Spora sangat resisten terhadap pengeringan dan bertahan hidup dalam keadaan kering untuk waktu lebih dari 30 tahun. Demikian pula spora resisten terhadap sinar ultraviolet, alkohol dan senyawa fenol (SMITH dan SUGIYAMA, 1988).

PATOGENESIS

Mekanisme masuknya *C. botulinum* toksigenik ke dalam tubuh dapat melalui kontaminasi luka, mulut/makanan dan inhalasi. *C. botulinum* yang sudah masuk dalam tubuh dapat memproduksi toksin dalam saluran pencernaan atau jaringan tubuh yang luka karena lingkungannya mendukung untuk pertumbuhannya. Toksin tidak diabsorpsi melalui kulit yang utuh.

Sesudah toksin diabsorpsi, maka toksin masuk dalam aliran darah dan ditransportasikan menuju *synaps* cholinergik perifer terutama *neuromuscular junction*. Pada tempat ini, *heavy chain* toksin berikatan dengan membran neuronal pada bagian *presynaptic synaps* perifer. Toksin kemudian memasuki sel neuronal melalui *receptor-mediated endocytosis*. *Light chain* dari toksin menyeberangi membran vesikel *endocytic* dan memasuki sitoplasma. Di dalam sitoplasma, *light chain* toksin (yaitu senyawa zinc-yang mengandung *endopeptidase*) memecah beberapa protein yang membentuk *synaptic fusion complex*. Protein *synaptic* ini disebut sebagai protein *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors* (SNARE), termasuk *synaptobrevin* (terpecah oleh toksin tipe B, D, F dan G), *syntaxin* (terpecah oleh toksin tipe C), dan *synaptosomal-associated protein* (SNAP-25; terpecah oleh toksin tipe A, C, E) (ARNON, 2001).

Neurotoksin *clostridial* mula-mula tampak terikat pada kompleks SNARE sebelum terjadi pemecahan (BREIDENBACH dan BRUNGER, 2004). Kompleks *synaptic fusion* akan menyatukan vesikel *synaptic* (yang berisi *acetyl choline*) dengan membran terminal neuron. Pecahnya kompleks *synaptic fusion* mencegah vesikel mengalami fusi dengan membran, yang akan

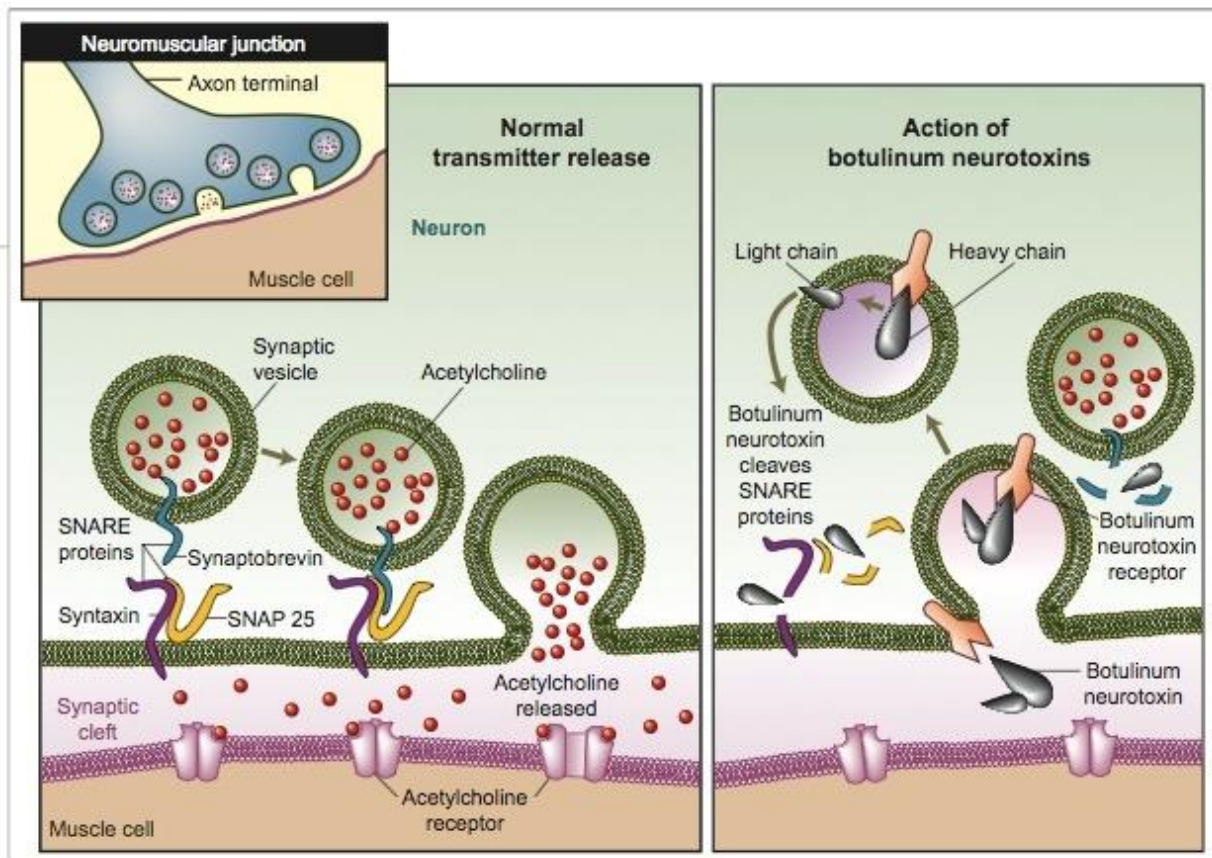
mencegah pelepasan *acetylcholine* ke dalam celah *synaptic*. Tanpa pelepasan *acetylcholine neuronal*, otot yang berhubungan tidak dapat berkontraksi dan menjadi lumpuh. Blokade pelepasan *acetylcholine* dapat berlangsung beberapa bulan. Fungsi normal akan kembali dengan lambat melalui kembalinya protein SNARE ke dalam sitoplasma atau melalui produksi *synaps* yang baru. Kematian akibat botulismus secara akut terjadi karena obstruksi udara pernafasan atau kelumpuhan otot-otot pernafasan.

Pengaruh langsung *botulinum neurotoxin* (BoNT) pada sistem syaraf pusat belum dapat diperlihatkan secara jelas. BoNT tidak dapat melakukan penetrasi ke *blood-brain barrier* karena ukurannya yaitu 150kDa, (DRESSLER *et al.*, 2005). Pengaruh BoNT pada *neuromuscular junction* dan organ otot dapat mempengaruhi sistem syaraf pusat secara tidak langsung.

Mekanisme aksi toksin pada *neuromuscular cholinergic synapse*

Otot rangka tubuh disyarafi oleh motoneuron yang mempunyai sel-sel dalam batang otak atau sumsum punggung. Axon dari motoneuron lewat dan keluar dari sistem susunan syaraf pusat di bagian anterior akar spinal untuk membentuk syaraf perifer yang cabangnya berada dalam otot rangka lalu ke terminal dan berhubungan dengan serabut otot lurik/kasar, membentuk *synapses* neuromuskuler. Satu kelompok serabut otot kasar disyarafi oleh motoneuron tunggal membentuk motor unit. Sinyal yang dikirim ke otot untuk berkontraksi berasal dari sistem syaraf pusat dan berlanjut ke serabut otot rangka sebagai aksi potensial motoneuron. Aksi potensial mendepolarisasi terminal motoneuron untuk menstimulasi pelepasan *acetylcholine* ke dalam celah neuromuskular *synaptic* melalui peningkatan konsentrasi Ca^{2+} .

Acetylcholine dilepaskan dari *cytosol* oleh Ca^{2+} yang mengatur *exocytosis*, suatu proses multi tahap yang melibatkan partisipasi dari beberapa protein yang secara kolektif disebut SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*). Ketika *acetylcholine* mencapai membran otot *postsynaptic*, ikatannya terhadap *nicotinic cholinergic receptors* membuka saluran transmembran, menghasilkan suatu *influx* ion sodium (Na^{+}) ke dalam serabut otot dan berikutnya *efflux* dari potasium (K^{+}); reduksi permulaan ini dalam potensial membran serabut otot menimbulkan *endplate* potensial. Ketika *endplate* potensial mencapai ambangnya, aksi potensial dibentuk dalam otot, dan menyebabkannya berkontraksi (DOLLY *et al.*, 1994).



Gambar 1. *Acetylcholine* pada syaraf terminal dikemas dalam vesikel. Pada stimulasi syaraf, yang meningkatkan konsentrasi intra-neuronal Ca^{2+} , membran vesikel berfusi dengan *plasmalemma* dari syaraf terminal, membebaskan *transmitter* ke dalam *synaptic cleft*. Proses ini dimediasi oleh satu serial protein yang secara kolektif disebut protein SNARE. BoNT, memasuki syaraf terminal, memecah protein SNARE, mencegah pembentukan *functional fusion complex*, dan memblokir pembebasan *acetylcholine*

Sumber: ROWLAND (2002)

Mekanisme multi tahap dari kerja BoNT pada syaraf motor terminal pertama kali dikemukakan oleh SIMPSON (1979) dan kemudian ada bukti eksperimental yang menjelaskannya (DOLLY *et al.*, 1984; BLACK dan DOLLY, 1986 a, b; DOLLY *et al.*, 1994). Tahapan-tahapan tersebut adalah: 1. Pengikatan pada *ecto-acceptor* pada syaraf *cholinergic* terminal 2. Internalisasi *acceptor mediated* 3. Translokasi pada *cytosol* dan penghambatan pelepasan Ca^{2+} dependent *neurotransmitter* (THAKKER dan RUBIN, 2004).

Pengikatan pada *presynaptic acceptor* membutuhkan C-terminal, sebagian dari *heavy chain* (100 kDa), yang dapat dipertahankan dalam konfirmasi yang sesuai oleh asosiasinya dengan *light chain* (50kDa). Toksin ini kemudian diinternalisasi oleh *receptor mediated endocytosis* sampai dikelilingi secara keseluruhan dalam bentuk vesikel. Pada saat itu, (Gambar 1), *moiety* aktif melewati dinding vesikel dan protease rantai pendek memecah satu dari protein yang bertanggung jawab untuk fusi vesikel dan pelepasan

acetylcholine (DOLLY, 1997; AOKI, 2004). Pada Tabel 1 disebutkan berbagai protein SNARE atau tempat target-target dari setiap serotipe BoNT yang memecahnya secara selektif (AOKI dan GUYER, 2001).

BoNT tipe A, C1 dan E memecah *synaptosomal-associated protein 25 kDa* (SNAP-25), dan tipe B,D,F dan G memecah *vesicle-associatedmembrane protein* (VAMP), yang juga dikenal sebagai *synaptobrevin*. Pemecahan proteolitik dari SNAREs menyebabkan ketidakmampuan kerja *exocytotic*, sehingga *exocytosis* dari *acetylcholine* dihambat. Jika jaringan targetnya adalah otot, pengaruh pada syaraf secara kimia menghasilkan peristiwa kelumpuhan. Toksin tipe A dapat menyebabkan neuroparalisis yang berkepanjangan, berlangsung hingga ber bulan-bulan pada manusia. Hal ini mungkin disebabkan oleh: a. Aktivitas protease toksin yang berumur panjang; b. Tertanamnya rantai pendek pada membran *presynaptic*; c. Persistensi *toxin-truncated SNAP-25*; dan d. *Endplate remodelling*.

Tabel 1. Protein SNARE intraseluler yang dipecah oleh berbagai serotipe neurotoksin botulinum

Serotipe	Protein intraseluler
A	SNAP-25
B	VAMP/synaptobrevin
C1	SNAP-25 dan Syntaxin
D	VAMP/synaptobrevin
E	SNAP-25
F	VAMP/synaptobrevin
G	VAMP/synaptobrevin

SNAP-25: *synaptosomal-associated protein 25 kDa*VAMP : *vesicle-associated membrane protein***Sumber:** AOKI DAN GUYER (2001)

Ketujuh serotipe BoNT (A, B, C1, D, E, F dan G) semuanya menghambat pelepasan *acetylcholine*, meskipun secara substansi, target protein intraselulernya, karakteristik aksinya, dan potensinya cukup bervariasi (AOKI dan GUYER, 2001; DOLLY dan LAWRENCE, 2005). Sedangkan *Clostridial* C2 sitotoksin adalah enterotoksin bukan neurotoksin dan telah diimplikasikan sebagai penyebab penyakit enterik (AKTORIES dan BARTH, 2004).

Implikasi terapeutik dari mekanisme aksi neurotoksin botulinum telah banyak digunakan dalam ilmu kedokteran manusia. Pengobatan dengan menggunakan neurotoksin botulinum antara lain telah dilakukan untuk mengatasi gangguan hiperaktivitas otot (*dystonia*, *spasticity*, kekejangan otot dan sebagainya), mengatasi gangguan pada sistem syaraf otonom pada kelenjar keringat, kelenjar ludah, kelenjar air mata, saluran pencernaan, dan *sphincter* urogenital, juga untuk mengatasi rasa sakit (DOLLY, 1997; JANKOVIC, 2004). Toksin tipe A telah dipelajari secara mendalam dan menunjukkan keberhasilan untuk dapat digunakan dalam berbagai tujuan pengobatan berbagai penyakit pada manusia. Baru-baru ini, tipe B dikomersialkan (CALLAWAY, 2004), tetapi pengaruhnya tidak berlangsung lama dan memerlukan dosis penggunaan yang lebih tinggi (JANKOVIC, 2004).

GEJALA BOTULISMUS PADA MANUSIA DAN HEWAN

Botulismus dapat terjadi pada manusia dan hewan dengan cara yang sama, yaitu melalui makanan, *intestinal toxico infection*, dan infeksi luka. Botulismus yang tidak mendapatkan pertolongan medis biasanya berakibat fatal. Kecepatan timbulnya gejala, keparahan dan lamanya penyakit tergantung pada jumlah toksin dan tipe toksin yang masuk ke dalam tubuh. Pada botulismus yang disebabkan oleh makanan, gejala mulai tampak beberapa jam sampai beberapa hari (2 –

8 hari) setelah tertelannya makanan yang terkontaminasi. Umumnya terjadi dalam 12 – 72 jam setelah makan. Gejala dari *foodborne botulism* yang disebabkan toksin *C. botulinum* serotipe A biasanya lebih parah dibandingkan dengan serotipe B dan E (DEMBEK *et al.*, 2009; WOODRUFF *et al.*, 1992). KRUGER *et al.* (2012) menyatakan bahwa tipe toksin *C. botulinum* yang ditemukan pada manusia dan sapi berbeda. Toksin tipe A secara dominan ditemukan pada feses sapi sedangkan tipe E ditemukan sebagai penyebab botulism pada manusia yang terserang dan pakan hewan yang terkontaminasi.

Sebagai penyakit yang berakibat *neuroparalysis*, botulismus merupakan penyakit akut, simetrik, *descending*, *flaccid paralysis* pada manusia atau hewan. Yang terserang *foodborne* botulismus, mula-mula memperlihatkan gejala gastrointestinal seperti mual, muntah, kram perut, mulut kering dan diare. Gejala syaraf awal biasanya, menyerang syaraf bagian kepala seperti pandangan kabur, kelopak mata jatuh, fotofobia, dan disfungsi syaraf seperti kekakuan sendi, gangguan bicara dan tidak dapat menelan makanan. Kelemahan otot dimulai dari otot yang menggerakkan kepala, otot lengan atas, otot pernafasan dan yang terakhir otot tungkai bagian bawah. Kelemahan ini biasanya berlangsung secara simetrik. Kematian biasanya akibat dari kegagalan sistem pernafasan. Gejala klinis yang timbul akibat terhirupnya toksin melalui saluran nafas (biasanya terjadi di laboratorium) menimbulkan gejala klinis yang serupa dengan *foodborne botulism* (VARMA *et al.*, 2004).

Kelumpuhan akibat botulismus dapat berlangsung lama. Ventilasi mekanis mungkin diperlukan selama 2 sampai 8 minggu dan kelumpuhan dapat berlangsung selama 7 bulan. Suhu tubuh biasanya normal (DEMBEK *et al.*, 2009).

Pada penderita yang terserang senjata biologis neurotoksin botulinum melalui aerosol atau makanan, akan terlihat gejala akut, simetrik, *decending flaccid paralysis* dan kelumpuhan bola mata, jatuhnya kelopak mata, kekakuan sendi, gangguan bicara dan tidak dapat menelan makanan. Gejala tersebut tampak setelah 12 sampai 72 jam setelah terpapar (ARNON *et al.*, 2001). Kecepatan diagnosis, tindakan pengobatan dengan pemberian antitoksin yang sesuai akan menentukan kesembuhan penderita.

Gejala klinis botulismus hanya berbeda sedikit antara yang terjadi pada manusia dan hewan (CRITCHLEY, 1991). Pada sapi dan kuda terlihat depresi, malas bergerak dan tidak ada nafsu makan, tidak dapat menelan dan pakan jatuh dari mulut, kemudian terlihat adanya kembung, dan muntah. Penyakit tidak menunjukkan gejala demam, tetapi ada *flaccid paralysis*, dimulai dengan kelemahan, tremor otot dan sulit berdiri. Cara hewan berbaring juga tidak normal. Kelemahan dari kaki belakang menjalar ke

kaki depan, kepala dan leher. Mata dapat terlihat menutup, pupil dilatasi. Diagnosis dapat mudah dilakukan dengan cara menarik lidah keluar dari rongga mulut, dan terlihat ada kelumpuhan otot lidah. Ketidakmampuan menelan diikuti dengan kelumpuhan otot dada dan sulit bernafas.

Clostridium botulinum berperan pada stadium awal terjadinya dekomposisi bangkai hewan, atau bahan sayuran. Dalam kondisi anaerob dan peningkatan kondisi alkali dan suhu, spora akan bergerminasi dan menghasilkan toksin. Ketika itik, burung air liar bermain di danau, spora *C. botulinum* yang terdapat pada dasar sedimen danau tertelan. Spora ini dapat tinggal dalam tubuh unggas tersebut untuk beberapa lama sampai saatnya unggas tersebut mati karena berbagai sebab. Sesudah unggas mati, terciptalah suatu kondisi anaerob yang menyebabkan aktifnya spora yang ada dalam bangkai unggas mati tersebut dan memproduksi toksin yang mematikan. Serangga/lalat biasanya tertarik pada bangkai dan bertelur pada bangkai tersebut, yang kemudian menjadi larva. Larva tidak terpengaruh oleh toksin, tetapi toksin terakumulasi di dalamnya. Unggas yang kemudian memakan larva tersebut akan mati akibat toksin yang terkandung di dalamnya (LOCKE dan FRIEND, 1989). Kematian pada ayam dapat menunjukkan adanya inkoordinasi, *flaccid paralysis* dari otot kaki, sayap dan leher, leher memanjang dan diare. Tidak ada lesi mikroskopik atau makroskopik yang dapat diamati. Toksin *C. botulinum* ditemukan dari darah jantung dan ceca (TRAMPEL *et al.*, 2005).

DIAGNOSIS LABORATORIUM TERHADAP BOTULISMUS

Botulismus merupakan kejadian yang cepat mematikan, sehingga diagnosis cepat diperlukan untuk keberhasilan pengobatan atau penyelesaian masalah penyakit. Gambar 2 menunjukkan alur pemeriksaan di laboratorium menggunakan metode standar. Deteksi *C. botulinum* pada sampel seperti feses, isi lambung, isi usus, swab luka dan jaringan akan membantu penegakkan diagnosis. Sejarah penyakit harus disertakan. Terkadang adanya beberapa galur *C. botulinum* penghasil beberapa macam toksin cukup menyulitkan. Masalah metode pengujian yang perlu diperhatikan untuk melakukan diagnosis botulismus menurut LINDSTROM dan KORKEALA (2006) adalah sebagai berikut:

Keselamatan dan keamanan di laboratorium

Potensi neurotoksin botulinum yang sangat ekstrim membutuhkan jaminan keamanan pekerja laboratorium. Harus diperhitungkan jika ada

pembentukan material toksik *C. botulinum* yang bersifat aerosol atau tetesan. Ancaman penggunaan material toksik untuk kegiatan bioterorisme juga memerlukan penjagaan laboratorium secara ketat. Pegawai lab harus mendapatkan vaksinasi (misalnya *pentavalent toxoid*) mencegah paparan material toksik. Hanya petugas laboratorium terlatih baik dan mengerti cara bekerja dengan toksin syaraf yang diizinkan masuk ruangan laboratorium dan bekerja dengan toksin *C. botulinum*. Laboratorium harus dijaga ketat dari masuknya personil yang tidak berkepentingan dan dilengkapi dengan fasilitas pelindung pekerja seperti jas laboratorium, sarung tangan, masker, pelindung mata dan sarana PPPK. Fasilitas *biosafety level* (BSL) 3 tidak mutlak diperlukan untuk isolasi *C. botulinum*, tetapi yang diperlukan adalah laboratorium yang setingkat BSL2 dengan sistem keamanan yang ketat dan terjamin.

Deteksi neurotoksin botulinum (BoNT)

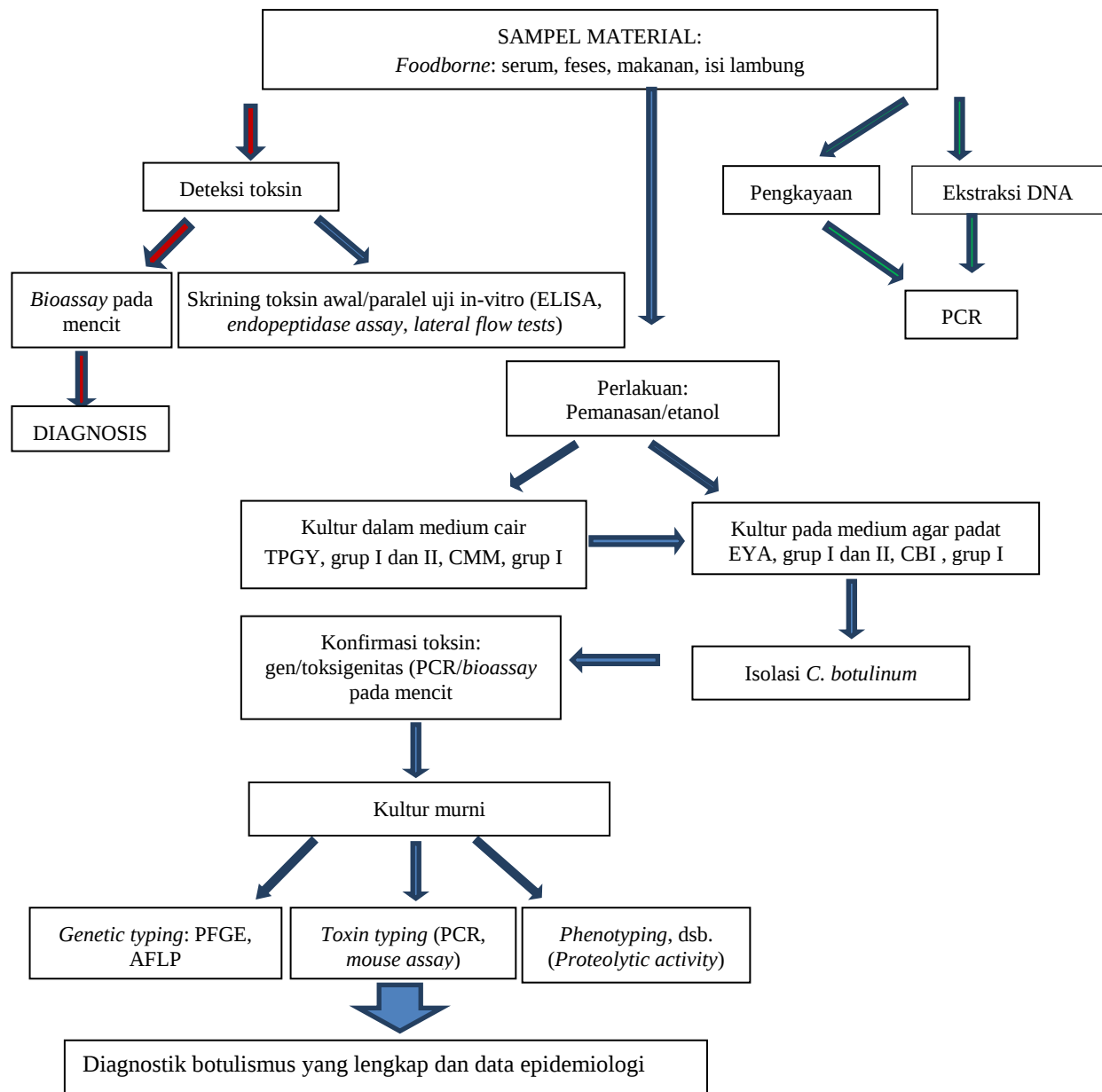
Sampai saat ini, uji *mouse lethality assay* masih menjadi uji standar untuk deteksi BoNT, tetapi ada usaha untuk pengembangan uji alternatif yang telah dilakukan dalam dekade tahun terakhir. Berbagai uji tersebut dapat dilihat pada Tabel 2. Umumnya semua uji mengarah pada kecepatan dan kepekaan uji. Ada uji yang dapat dilakukan dalam 20 menit saja dan kepekaannya melebihi uji menggunakan mencit. Umumnya uji ini ditargetkan untuk pengujian obat-obatan seperti toksin botulinum murni untuk tujuan pengobatan. Tetapi uji ini belum dapat direkomendasikan untuk dapat diterapkan pada uji sampel makanan atau spesimen lainnya (organ, feses). Dalam pengujian, sampel yang mengandung darah, nanah, feses dan makanan dapat mengganggu hasil uji. Adanya pertumbuhan mikroba lain pada sampel juga dapat mengganggu deteksi BoNT. Proteinase feses dapat memecah BoNT yang menyebabkan hasil negatif palsu (SHARMA dan WHITING, 2005).

Mouse lethality assay

Uji proteksi pada mencit atau *mouse lethality assay* dilakukan dengan cara penyuntikan enceran sampel dalam larutan penyangga posfat secara intraperitoneal pada mencit. Jika sampel mengandung toksin, mencit akan menunjukkan gejala karakteristik botulismus seperti kelemahan otot, sesak atau sulit bernafas dan bulu yang kusut. Gejala biasanya nampak dalam 1 hari setelah penyuntikkan. Dapat juga gejala muncul setelah beberapa hari penyuntikan. Toksin yang berasal dari kelompok II *C. botulinum* membutuhkan aktivasi tripsin karena galur ini tidak mempunyai aktivitas proteolitik yang diperlukan

(NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS, 1991). Tipe toksin ditentukan dengan cara netralisasi toksin dengan antitoksin spesifik. Jika mencit yang disuntik dengan sampel dan antitoksin bertahan hidup, maka tipe toksin adalah sesuai dengan antitoksin yang diberikan. Jika toksin dan antitoksin tidak sesuai, mencit akan menunjukkan gejala botulinum. Metode ini sangat spesifik dan ke-8 tipe toksin dapat diidentifikasi.

Dengan pengujian *mouse lethality assay*, 50% dosis *lethal* sebanding dengan 5 – 0 pg dan limit deteksinya 0.01 ng/ml enceran sampel (WICTOME *et al.*, 1999). Uji ini dapat digunakan untuk sampel feses, serum, isi lambung, organ dan makanan. Uji ini mulai mendapatkan tentangan dari beberapa pihak karena banyak menggunakan hewan percobaan.



Gambar 2. Diagnosis laboratorium untuk botulismus. Metode diagnosis standar bertanda panah merah, metode diagnosis cepat untuk skrining awal bertanda panah hijau. Karakterisasi isolat penyebab penyakit, yang memberikan informasi epidemiologi bertanda panah biru

TPGY: *Tryptone peptone glucose yeast extract medium*; CMM: *Cooked meat medium*; CBI: *C. botulinum* isolation medium

Sumber: LINDSTROM dan KORKEALA (2006)

Tabel 2. Uji diagnostik untuk mendeteksi neurotoksin botulinum

Assay	Waktu pengujian	Tipe toksin	Limit deteksi	Sampel uji	Keterangan
<i>Mouse lethality assay</i>	1 – 4 hari	A,B,C,D,E,F,G	20 – 30pg/ml, 1 MLD/ml	Kultur bakteri, serum feses, isi usus, makanan	Metode standard
ELISA	1 – 2 hari	A	10 MLD50	Sayuran yang diinokulasi	Antibodi poliklonal sebagai <i>capture</i> antigen
	8 jam	A	4 – 8 pg/ml, 1 – 2 MLD/ml	Uji potensi toksin (untuk pengobatan)	Antibodi monoklonal dan poliklonal sebagai <i>capture</i> antigen
	8 jam	A, B	-	Feses (botulismus pada bayi)	Antibodi polivalent, poliklonal sebagai <i>capture</i> antigen
	8 jam	A, B	0,2 ng/ml	Serum manusia	Antibodi poliklonal (kuda) sebagai <i>capture</i> antigen
	8 jam	E,F	0,5 – 2 ng/ml	Serum manusia	Antibodi poliklonal (kuda) sebagai <i>capture</i> antigen
	8 jam	A,B,E	9 – 45 pg	Daging kalkun yang diinokulasi	Antibodi polivalent, poliklonal (kuda) sebagai <i>capture</i> antigen
<i>Amplified ELISA</i>	8 jam	A	5 – 10 MLD50		Antibodi monoklonal, <i>diaphorase-based amplification system</i>
	8 jam	A	10 MLD/ml	Kornet dan ikan kaleng yang diinokulasi	Antibodi poliklonal (kambing), <i>diaphorase-based amplification system</i>
	8 jam	A,B,E,F	1 – 10 MLD, 0,2 – 1 ng/ml	Kultur bakteri	Antibodi poliklonal (kambing) sebagai <i>capture antigen</i> , <i>biotin-streptavidin-based amplification system</i>
ELISA-ELCA	5 jam 1 – 2 hari	E A,B,E	<1 MLD 5-10 pg/ml, 1 MLD	Ikan yang diinokulasi Kultur bakteri	Antibodi poliklonal (ayam) sebagai <i>capture</i> antigen
Immuno-PCR	8 jam	A	5 pg	Toksin murni	Antibodi monoklonal, amplifikasi PCR dari DNA yang dilekatkan pada antibodi
<i>Chemiluminescent slot blot immunoassay</i>	6 jam	E	4 MLD	Kultur bakteri, ikan yang diinokulasi	Antibodi poliklonal (kelinci), deteksi <i>chemiluminescent</i> dari supernatan kultur <i>slot-blotted</i>
<i>Electro chemiluminescence</i>	1 – 3 jam	B	<1 – 2 ng/ml	Toksin murni	Antibodi monoklonal dan poliklonal (kuda), konsentrasi immunomagnetik
<i>Radioimmunoassay</i>	8 jam	A	100 MLD50	Toksin murni	Antibodi poliklonal (kelinci)
<i>Lateral flow immunoassay</i>	15 – 30 menit	A,B,E	15 pg – 10 ng/ml	Produk susu yang diinokulasi	Deteksi <i>immunochromatographic</i>
	20 menit	A	15 – 150 pg/ml	Sayuran dan makanan laut	Gangliosida-liposom sebagai <i>capture</i> antigen, deteksi imunologi

Tabel 2. (lanjutan)

Assay	Waktu pengujian	Tipe toksin	Limit deteksi	Sampel uji	Keterangan
<i>Endopeptide assay</i>	8 jam	A	0,1 – 0,8 MLD ₅₀	Uji potensi toksin dalam industri obat	Substrat peptida spesifik untuk SNAP-25, deteksi imunologi
	5 – 6 jam	B	5 – 10 pg/ml	Daging, keju, sosis, ikan <i>Cod</i> yang diinokulasi	Imunokonsentrasi toksin dengan antibodi monoklonal, substrat peptida spesifik untuk VAMP/deteksi imunologi
	8 jam	A,B	0,1 – 4,5 ng/ml	Kultur bakteri	Substrat peptida spesifik untuk VAMP/SNAP-25, deteksi imunologi
	8 jam	A,B,D,F	2 ng/ml	Uji potensi toksin dalam industri obat	Substrat peptida fluorogenik spesifik untuk VAMP/SNAP-25
	8 jam	A,B,E,F	0,04 – 0,6 MLD ₅₀ /ml	Toksin murni	Substrat peptida spesifik untuk VAMP/SNAP-25, deteksi multipleks dengan spektrofotometri masa

Sumber: SHARMA dan WHITING (2005)

Nonlethal mouse assay

Uji ini serupa *mouse bioassay*, tetapi tidak membunuh mencit dan hanya menyebabkan gejala kelumpuhan otot lokal karena toksin disuntikkan secara subkutan (SESARDIC *et al.*, 1996).

Metode imunologi

Uji ini lebih sederhana, cepat dilakukan dan diinterpretasi. Uji-uji ini adalah *radioimmunoassay*, *gel diffusion assay*, *passive hemagglutination assay* dan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Pada awalnya, ELISA mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang kurang baik, tetapi dengan adanya perkembangan pada tahun-tahun terakhir, sensitivitasnya sudah dapat menyamai *mouse bioassay*. Titer ELISA (TAKEDA *et al.*, 2006) dari serum bebek yang baru saja divaksinasi, ternyata tidak berkorelasi dengan titer uji serum netralisasi. Kemungkinan, titer serum netralisasi lebih berarti daripada titer ELISA untuk mengevaluasi kemampuan proteksi terhadap tantangan toksin. Jadi, titer serum netralisasi akan lebih menggambarkan atau menjamin adanya proteksi dibandingkan dengan titer ELISA. Namun demikian teknik ELISA akan lebih mudah digunakan untuk mendeteksi adanya kejadian botulismus.

Variasi genetik dari berbagai serotipe neurotoksin dapat menyebabkan penurunan afinitas pada antibodi monoklonal yang digunakan, sehingga menyebabkan hasil negatif palsu (SMITH *et al.*, 2005). *Lateral flow assay* komersial dalam bentuk *dipstick* memberikan kemudahan pengujian. Uji ini cepat (kurang dari 30 menit), dan tidak diperlukan adanya peralatan lain. Uji ini bermanfaat untuk melakukan skrining terhadap kasus botulismus. *Endopeptidase assay* dapat berfungsi untuk menggantikan *mouse lethality assay* karena uji ini sangat spesifik, lebih sensitif dan hanya mendeteksi neurotoksin yang aktif secara biologi (WICTOME *et al.*, 1999; BOYER *et al.*, 2005).

Metode isolasi *C. botulinum*

Clostridium botulinum membutuhkan kondisi anaerobik untuk pertumbuhannya. Deteksi konvensional dan isolasi *C. botulinum* dilakukan berdasarkan pembiakan bakteri pada media cair diikuti deteksi toksin dalam supernatan kultur dengan *mouse bioassay*. Sampel positif akan dipindahkan ke media padat untuk pengamatan bentuk koloni. Perlakuan terhadap sampel yang terkontaminasi dengan bakteri lain biasanya dilakukan dengan pemanasan 80°C selama 10 menit, untuk kelompok I dari *C. botulinum* dan 60°C selama 20 menit untuk kelompok II *C. botulinum*. Penambahan *heat resistant lytic enzyme* seperti *lysozyme* (5 µg/ml) terhadap media dapat meningkatkan germinasi spora yang telah di *heat-*

stressed (PECK *et al.*, 1993). Media rutin yang digunakan untuk isolasi adalah *chopped-meat-glucose starch*, *cooked meat medium*, *broth* yang mengandung berbagai kombinasi *tryptone*, *peptone-glucose-yeast extract*, *reinforced clostridial medium* dan *fastidious anaerobe broth* (QUAGLIARO, 1977; SAEED, 2005). Lempeng agar darah dan *egg yolk agar* merupakan media *plating* umum yang tidak selektif. Antibodi *fluorescent* terhadap dinding sel vegetatif *C. botulinum* banyak digunakan untuk mengidentifikasi *C. botulinum*, tetapi perlu diikuti uji kemampuan toksigenisitasnya (GLASBY dan HATHEWAY, 1983; QUINN *et al.*, 2002).

Deteksi molekuler dari *C. botulinum* dan karakterisasi genetik *C. botulinum*

Metode deteksi DNA telah mengambil alih teknik konvensional untuk deteksi *C. botulinum*. Teknik seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan *southern hybridization* merupakan uji sensitif dan spesifik dibandingkan dengan media kultur atau *mouse bioassay*. Untuk karakterisasi isolat *C. botulinum*, dapat dilakukan *DNA sequencing*, *pulse-field gel electrophoresis* (PFGE), *ribotyping*, *randomly amplified polymorphic DNA analysis* (RAPD) dan *repetitive element sequence based PCR* (LINDSTROM dan KORKEALA, 2006).

PENCEGAHAN BOTULISMUS

Vaksin *C. botulinum* untuk penggunaan pada bidang veteriner dibuat dari kultur dalam medium cair dari *C. botulinum* tipe C atau tipe D atau campuran kedua tipe tersebut. Kultur keseluruhan atau filtratnya atau gabungan keduanya diinaktivasi dengan cara tertentu sehingga toksisitasnya dapat dihilangkan, tetapi aktivitas imunogeniknya dipertahankan. Produk ini kemudian dapat diadsorpsi, dipresipitasi atau dikonsentrasikan. Dapat pula diberi ajuvan yang sesuai atau dibeku-keringkan (COUNCIL of EUROPE, 2005). Vaksin ini harus melalui uji potensi sebelum digunakan pada hewan, yaitu melindungi mencit terhadap tantangan berupa 25 kali dosis *paralytic* 50%. Dosis *paralytic* 50% adalah jumlah toksin yang bila disuntikkan secara intra peritoneal pada mencit, akan menimbulkan paralisis pada 50% jumlah hewan uji dengan waktu pengamatan 7 hari).

Toksoid yang dibuat dari *C. botulinum* tipe C dan D juga telah digunakan untuk pencegahan botulismus pada bebek (TAKEDA *et al.*, 2006). Vaksin semacam ini ternyata dapat menimbulkan antibodi yang cukup kuat dan dapat menahan tantangan dosis toksin yang mematikan.

Vaksin untuk pencegahan botulismus pada manusia dapat berupa *pentavalent botulinum toxoid* (PBT) yang telah digunakan sejak tahun 1959 dan masih dipergunakan sampai saat ini dengan berbagai modifikasi (SIEGEL, 1988; TORRI *et al.*, 2002; DEMBEK *et al.*, 2009). PBT adalah toksoid (toksin yang telah diinaktivasi), yang dibuat dari toksin serotipe A, B, C, D dan E yang diinaktivasi dengan formalin, dan mengalami pemurnian. Setiap toksin dari serotipe tertentu telah dipropagasi masing-masing dalam kulturnya, kemudian mengalami proses presipitasi asam, filtrasi, inaktivasi dengan formaldehida, dan diadsorpsi dalam adjuvan aluminium fosfat. Ke lima serotipe kemudian dicampur sehingga dihasilkan produk akhir dengan formula yang berdasarkan konsentrasi yang dapat menginduksi imunitas protektif pada marmot terhadap tantangan 10^5 mouse lethal doses (MLD₅₀) secara intra peritoneal. Sebagai pengawet vaksin dipergunakan thimerosal dalam perbandingan 1:10.000 dan sebagai *stabilizer* digunakan 0,22% formaldehida. Sampai saat ini terbukti PBT aman digunakan dan imunogenik. Vaksin botulismus biasanya diberikan secara *subcutaneous* secara berseri (0, 2 dan 12 minggu), dan berikutnya dapat diberikan *booster* pada 12 bulan dan setiap tahun berikutnya. Efek samping yang ditemukan biasanya adanya reaksi lokal (edema dengan ukuran 30 – 120 mm) pada 7% populasi yang divaksin. Ketidak murnian dari toksoid (10% neurotoksoid dan 90% merupakan material lainnya) yang digunakan kemungkinan merupakan penyebab terjadinya reaksi samping dan kebutuhan akan vaksinasi yang berulang guna mencapai tingkat antibodi protektif (DEMBEK *et al.*, 2009). Pembuatan vaksin dengan menggunakan antigen yang lebih murni dengan konsentrasi yang lebih tinggi diharapkan dapat meningkatkan imunogenisitas dan mengurangi reaksi lokal pada tempat penyuntikkan akibat toksoid yang diinaktivasi dengan formalin.

Teknik rekombinan menggunakan fragmen toksin yang imunogenik ternyata tidak mempunyai kemampuan untuk memblokir *cholinergic neurotransmitter*. Sistem ekspresi menggunakan *Escherichia coli* dan ragi (*yeast*) telah digunakan untuk memproduksi *fragment recombinant*, terutama *carboxy-terminal fragment* dari *heavy chain* (Hc) toksin. Kandidat vaksin dengan menggunakan *fragment recombinant* toksin botulinum terhadap serotipe A, B, C, E dan F dapat memproteksi mencit. (CLAYTON *et al.*, 1995; CLAYTON dan MIDDLEBROOK, 2000; KIYATKIN *et al.*, 1997). Vaksin rekombinan untuk serotipe A dapat melindungi mencit terhadap tantangan secara intra peritoneal dan menghasilkan tingkat kekebalan seperti yang dicapai oleh PBT, tetapi lebih aman diproduksi dan ada penurunan biaya produksi per dosis vaksin (MIDDLEBROOK, 1995). Vaksin rekombinan yang diberikan secara intra nasal juga

sedang diteliti (DEMBEK *et al.*, 2009; PARK dan SIMPSON, 2004).

Pengobatan harus diberikan segera sebelum ada hasil pemeriksaan laboratorium karena jika toksin sudah terfiksasi dan simptom syaraf sudah terlihat, maka pemberian antitoksin sudah tidak efektif lagi. Pengobatan botulismus pada unggas biasanya tidak sempat dilakukan karena pada umumnya sejumlah besar hewan telah ditemukan dalam keadaan mati. Bila sapi yang sudah menunjukkan gejala klinis botulismus, maka prognosisnya buruk. Pengobatan simptomatik dan penunjang seperti pemberian cairan infus atau cairan melalui *stomach tube* dapat dilakukan. Pemberian antibiotika dilakukan untuk mencegah infeksi sekunder. Biasanya hewan yang terserang tidak dapat menelan pakan atau minum (CUTLER, 2005). Kepekaan *C. botulinum* terhadap antibiotika dapat bervariasi, tetapi pada umumnya hampir semua galur *C. botulinum* peka terhadap *penicillin*, *metronidazole*, rifampin dan *erythromycin* (SMITH dan SUGIYAMA, 1988), tetapi toksin botulinum tidak dapat dinetralkan oleh antibiotika melainkan harus dengan antitoksin yang sesuai.

KASUS BOTULISMUS PADA HEWAN DAN KEJADIANNYA DI INDONESIA

Botulismus pada unggas biasanya merupakan keracunan makanan yang dapat membunuh sekelompok unggas sekaligus. Awalnya wabah botulismus pada unggas liar, terjadi kematian pada sejumlah kecil unggas. Tetapi kemudian dapat terjadi kematian sampai berjuta-juta ekor (ALBERTA AGRICULTURE, FOOD AND RURAL DEVELOPMENT, 2004). Kombinasi infeksi dari bakteri dan virus patogen unggas akan menyebabkan kematian unggas tersebut.

Kasus botulismus dicurigai banyak terjadi di Indonesia yang menyerang ternak unggas. Peternak biasanya menemukan itiknya mati setelah mengalami kelumpuhan sesaat di sawah atau padang penggembalaan. Gejala pada unggas ditandai dengan adanya inkoordinasi, *flaccid paralysis* dari otot kaki, sayap dan leher, dan disusul dengan kematian mendadak. Tidak ada lesi mikroskopik atau makroskopik yang dapat diamati, tetapi toksin *C. botulinum* dapat ditemukan dari darah hewan yang terserang. Gejala sampai kematian yang cepat dan terjadi hanya beberapa jam akan membedakannya dengan gejala penyakit oleh toksin lain seperti *aflatoxin* dan sebagainya. Diagnosis terhadap kematian semacam ini biasanya tidak dilakukan karena keterbatasan kemampuan laboratorium kesehatan hewan setempat. Sampai saat ini, deteksi toksin botulinum yang harus dilakukan dalam peneguhan diagnosis botulismus di Indonesia hanya dilakukan di

BBALITVET. Kasus kematian pada itik dapat mencapai 100% populasi dalam 1 hari pernah ditemukan pada bulan Mei tahun 2001. Kasus kematian ini merupakan penularan dari kematian burung unta yang dimiliki akibat toksin *C. botulinum*. Diagnosa yang dilakukan di BBALITVET menunjukkan adanya toksin kuat dari sampel usus itik dan usus burung unta yang mengalami perdarahan hebat yang dapat membunuh mencit (*unpublished data*, 2001).

Kejadian botulismus pada sapi di Indonesia mulai diselidiki pada akhir tahun 2010, setelah adanya kematian mendadak pada sapi Peranakan Ongole (PO) di Jawa Timur. Sebanyak 23 sampel serum dari sapi yang masih hidup dikirim ke Dr. Mayberry dari University of Queensland Australia untuk diuji dengan ELISA antibodi *C. botulinum* tipe C dan tipe D (*C. botulinum* tipe C dan D adalah tipe yang sering menimbulkan kematian pada ternak). Hasil pengujian dari Animal Health Laboratories, Department of Agriculture and Food, Western Australia menunjukkan bahwa 10 ekor sapi menunjukkan titer yang tinggi terhadap *C. botulinum* tipe C tetapi negatif terhadap tipe D. Uji serologis (ELISA) ini menunjukkan adanya sapi yang terpapar oleh *C. botulinum* tipe C. Tetapi penyebab dari kematian sejumlah sapi harus dibuktikan dengan menemukan adanya *C. botulinum* toksigenik dan toksinnya di dalam tubuh hewan yang mati. Indikasi yang diberikan hasil uji serologis menunjukkan bahwa botulismus pada sapi di Indonesia mungkin bisa terjadi dan untuk itu perlu dipertimbangkan untuk penggunaan vaksin terhadap *C. botulinum* tipe C dan D guna pencegahan penyakit.

KESIMPULAN

Botulismus adalah penyakit neuroparalitik pada hewan maupun manusia, yang disebabkan oleh berbagai tipe *C. botulinum* (A, B, C1, C2, D, E, F, G). Neurotoksin botulinum merupakan toksin biologis terkuat yang pernah diketahui. Neurotoksin *C. botulinum* telah dipelajari dan dimanfaatkan sebagai senjata biologis dan juga berhasil digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit pada manusia. Spora *C. botulinum* relatif tahan panas tetapi toksinnya tidak tahan panas dan dapat dinetralkan dengan antitoksin yang sesuai. Diagnosis laboratorium untuk botulismus harus dilakukan dengan isolasi, karakterisasi *C. botulinum* dan deteksi/identifikasi toksinnya pada hewan yang terserang/mati. Kasus botulismus di Indonesia telah ditemukan terutama pada unggas dengan mortalitas tinggi dan kemungkinan terjadi juga pada sapi. Pencegahan botulinum dapat dilakukan dengan cara vaksinasi. Tindakan pencegahan dengan vaksinasi harus lebih diutamakan karena rendahnya tingkat keberhasilan pengobatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan pada Dr. Geoffry Fordyce dan Dr. Dianne Mayberry dari The University of Queensland, Gatton, Australia atas informasi hasil pengujian ELISA antibodi *C. botulinum* tipe C dan D dari sapi-sapi di Jawa Timur.

DAFTAR PUSTAKA

- AKTORIES, K. and H. BARTH. 2004. *Clostridium botulinum* C2 toxin_ New insights into the cellular uptake of the actin-ADP ribosylating toxin. J. Med Microbiol. 293: 557 – 564
- ALBERTA AGRICULTURE, FOOD AND RURAL DEVELOPMENT. 2004. Avian botulism (*Clostridium botulinum*) in Alberta. Fact sheet no. 4. Pub.No. I/154. Alberta Sustainable Resource Development: Fish and Wildlife, Canada.
- APPLEYARD, W.T. and A. MOLLISON. 1985. Suspected bovine botulism associated with broiler litter waste. Vet. Rec. 116: 522.
- AOKI, K.R. 2004. Botulinum toxin: A succesful therapeutic protein. Curr. Med. Chem. 11: 3085 – 3092
- AOKI, K.R. and B. GUYER. 2001. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: A comparative review of biochemical and pharmacological actions. Eur. J. Neurol. 8(suppl 5): 21 – 29.
- ARNON, S.S., R. SCHECHTER, V. THOMAS, M.D. INGELSBY, D.A. HENDERSON, J.G. BARTLETT, M.S. ARCHER, E.EITZEN, A.D. FINE, J. HAUSER, M. LAYTON, S. LILLIBRIDGE, M.T. OSTERHOLM, T.OTOOLE, G. PARKER, T.M. PERL, P.K. RUSSELL, D.L. SWERDLOW and K. TONAT. 2001. Botulinum toxin as biological weapon. JAMA 285(8): 1059 – 1070.
- BLACK, J.D. and J.O. DOLLY.1986a. Interaction of 125I-labelled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membran acceptors for types A and B on motor nerves. J. Cell. Biol. 103:521 – 534.
- BLACK, J.D. and J.O. DOLLY.1986b. Interaction of 125I-labelled botulinum neurotoxins with nerve terminals.II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. J. Cell. Biol. 103:535 – 544.
- BOYER, A.E., H. MOURA, A.R. WOOLFITT, S.R. KALB, L.G. MCWILLIAMS, A. PAVLOPOULOS, J.G. SCHMIDT, D.L. ASHLEY and J.R. BARR. 2005. From the mouse to the mass spectrophotometer: Detection and differentiation of the endoprotease activities of botulinum neurotoxins A-G by mass spectrometry. Anal. Chem. 77: 3916 – 3924.
- BREIDENBACH, M.A. and A.T. BRUNGER. 2004. Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A. Nature 432: 925 – 929.

- CALLAWAY, J.E. 2004. Botulinum toxin type B (Myobloc®): Pharmacology and biochemistry. Clin. Dermatol. 22: 23 – 28.
- COUNCIL OF EUROPE. 2005. European Pharmacopoeia 5th Ed. Main Vol. 5.0 with supplements 5.1. and 5.2. pp 745.
- CLAYTON, M.A., J.M. CLAYTON, D.R. BROWN and J.L. MIDDLEBROOK. 1995. Protective vaccination with recombinant fragment of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 63: 2738 – 2742.
- CLAYTON, J. and F.L. MIDDLEBROOK. 2000. Vaccination of mice with DNA encoding a large fragment of botulinum neurotoxin serotype A. Vaccine 18: 1855 – 1862.
- CRITCHLEY, E.M.R. 1991. A comparison of human and animal botulism: A review. J. Royal Soc. Med. 84: 295 – 298
- CUTLER, K. 2005. Clinical refresher. Cattle Medicine. UK Vet. 10(2): 1 – 3.
- DAHLENBORG, M. E. BORCH, and P. RADSTROM. 2003. Prevalence of *Clostridium botulinum* type B, E and F in faecal samples from Sweddish cattle Int. J. Food Microbiol. 82: 105 – 110.
- DEMBEK, Z.F., L.A. SMITH and J.M. RUSNAK. 2009. Botulinum Toxin. Medical Aspects of Biological Warfare. Chap. 16. US Army Medical Department. Borden Institute. pp. 337 – 353.
- DOLLY, J.O., J. BLACK, R.S. WILLIAMS and J. MELLING. 1984. Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. Nature 307: 457 – 460.
- DOLLY, J.O., A. DEPAIVA, P. FORAN, G. LAWRENCE, P. DANIELS HOLGATE and A.C. ASHTON. 1994. Probing the process of transmitter release with botulinum and tetanus neurotoxins. Semin. Neurosci. 6: 149 – 158.
- DOLLY, J.O. 1997. Theurapeutic and research exploitation of botulinum neurotoxins. Eur. J. Neurol. 4(suppl 2): S5 – S10.
- DOLLY, J.O and G. LAWRENCE. 2005. Mechanistic basis for the therapeutic effectiveness of botulinum toxin A on over-active cholinergic nerves. In: Barnes, P.M., B.S. WARD (eds) The Clinical Use of Botulinum Toxins. Cambridge. Cambridge University Press.
- DRESSLER, D., F.A. SABERI and E.R. BARBOSA. 2005. Botulinum toxin:mechanisms of action. Arq. Neuropsiquiatr. 63: 180 – 185
- FERRACCI, G.R. MIQUELIS, S. KOZAKI, M. SEAGAR and C. LEVEQUE. 2005. Synaptic vesicle chips to assay botulinum neurotoxin. Biochem. J. 391: 659 – 666.
- GLASBY, C. and C.L. HATHEWAY. 1983. Fluorescent antibody reagents for the identification of *Clostridium botulinum*. J. Clin. Microbiol. 18: 1378 – 1383.
- HALPERN, J.L., L.A. SMITH, K.B. SEAMON, K.A. GROOVER and W.H. HABIG. 1989. Sequence homology between tetanus and botulinum toxins detected by an antipeptide antibody. Infect. Immun. 57: 18 – 22.
- HOGG, R., C. LIVESEY and J. PAYNE. 2008. Diagnosis and implications of botulism. In Practice 30:392 – 397.
- JANKOVIC, J. 2004. Botulinum toxin in clinical practice. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 75: 951 – 957.
- KIYATKIN, N., A.B. MAKSYMOWYCH and L.L. SIMPSON. 1997. Induction of an immune response by oral administration of recombinant botulinum toxin. Infect. Immun. 65:4586 – 4591.
- KRUGER, M., A.G. HERRENTHEY, W. SCHRODL, A. GERLACH and A. RODLOFF. 2012. Visceral botulism at dairy farms in Schleswig Holstein, Germany- Prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feeds, in feces of the farmers and in house dust. Anaerobe 30:1 – 3.
- LINDSTROM, M. and H. KORKEALA. 2006. Laboratory diagnostic of botulism. Clin. Microbiol. Rev. 19(2): 298 – 314.
- LOCKE, L.N. and M. FRIEND. 1989. Avian Botulism:Geographic expansion of a historic disease. Field guide to wildlife disease. US Fish Wildl. Serv. Resour. Publ. (Fish and Wildlife Leaflet 13.2.4.) pp. 167 – 225.
- MIDDLEBROOK, J.L. 1995. Protection strategies against botulinum toxin. Adv. Exp. Med. Biol. 383:93 – 98.
- MONTECUCCO, C. and G. SCHIAVO. 1993. Tetanus and botulism neurotoxins: A new group of zinc proteases. Trends Biochem. Sci. 18:324 – 327.
- MONTECUCCO, C. and G. SCHIAVO. 1994. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. Mol. Microbiol. 13:1 – 8.
- NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS. 1991. Botulinum toxin. Detection in Foods, Blood and other Tests Materials. Method no. 80. 2nd Ed. Nordic Comittee on Food Analysis. Espoo. Findland.
- OTTER, A., C. LIVESEY, R. HOGG, R. SHARPE and D. GRAY. 2006. Risk of botulism in cattle and sheep arising from contact with broiler litter. Vet. Rec. 159: 186 – 187.
- PARK, J.B. and L.L. SIMPSON 2004. Progress towards development of an inhalation vaccine against botulinum toxin. Expert Rev. Vaccines 3: 477 – 487.
- PECK, M.W., D.A. FAIRBAIRN and B.M. LUND. 1993. Heat resistant of spores of non proteolytic *Clostridium botulinum* estimated on medium containing lysozyme. Lett. Appl. Microbiol. 16: 126 – 131.
- QUAGLIARO, D.A. 1977. An improved cooked meat medium for the detection of *Clostridium botulinum*. J. AOAC 60: 563 – 569.

- QUINN, P.J., B.K. MARKEY, M.E. CARTER, W.J. DONNELLY and F.C. LEONARD. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science Ltd. pp. 84 – 96.
- ROWLAND, L.P. 2002. Stroke, spasticity and botulinum toxin. *N. Engl J. Med.* 347:382 – 383.
- SAEED, E.M.A. 2005. *Studies on Isolation and Identification of Clostridium botulinum Investigating Field Samples Specially from Equine Grass Sickness Cases*. Doctoral Thesis. University of Gottingen, Gottingen, Germany.
- SESARDIC, D., K. MCLELLAN, T.A.N. EKONG and R.G. DAS. 1996. Refinement and validation of an alternative bioassay for potency testing of therapeutic botulinum type A toxin. *Pharmacol. Toxicol.* 78: 283 – 288.
- SHARMA, S.K. and R.C. WHITING. 2005. Methods for detection of *Clostridium botulinum* toxin in foods. *J. Food Prot.* 68: 1256 – 1263.
- SIEGEL, L.S. 1988. Human immune response to botulinum pentavalent (ABCDE) toxoid determined by a neutralization test and by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin Microbiol.* 26: 2351 – 2356.
- SIMPSON, L.L. 1979. The action of botulinum toxin. *Rev. Infect. Dis.* 1: 656 – 662.
- SMITH, L.D.S. and H. SUGIYAMA. 1988. *Botulism. The organism, its toxins, the disease*. Charles C. Thomas (ed). Springfield. III. USA. 171 p.
- SMITH, T.J., J. LOU, I.N. GREEN, C.M. FORSYTH, R. TSAI, S.L. LAPORTE, W.H. TEPP, M. BRADSHAW, E.A. JOHNSON, L.A. SMITH and J.D. MARKS. 2005. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect. Immun.* 73: 5450 – 5457.
- SOBEL, J. 2005. Botulism. *Clin Infect. Dis.* 41: 1167 – 1173.
- SUGISHIMA, M. 2003. Aum Shinrikyo and the Japanese law on bioterrorism. 2003. *Preshop. Disast. Med.* 18: 179 – 183.
- TAKEDA, M.H. KASAI, Y. TARI, M. MUKAMOTO, T. KOHDA, K. TSUKAMOTO and S. KOZAKI. 2006. Protective effect of botulinum C/D mosaic toxoid against avian botulism. *J. Vet. Med. Sci.* 68(4): 325 – 330.
- THAKKER, M.M. and P.A. RUBIN. 2004. Pharmacology and clinical application of botulinum toxins A and B. *Int. Ophthalmol. Clin.* 44: 147 – 163.
- TORRI, Y., Y. TOKUMARU and S. KAWAGUCHI. 2002. Production and immunogenic efficacy of botulinum tetraivalent (A, B, E, F) toxoid. *Vaccine* 20: 2556 – 2561.
- TRAMPEL, D.W., S.R. SMITH and T.E. ROCKE. 2005. Toxoinfectious botulism in commercial caponized chickens. *Avian Dis.* 49: 301 – 303.
- WEIN, L.M. and Y. LIU. 2005. Analyzing a bioterror attack on the food supply: The case of botulinum toxin in milk. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 9984 – 9989.
- WICTOME, M., K. NEWTON, K. JAMESON, B. HALLIS, P. DUNNIGAN, E. MACKAY, S. CLARKE, R. TAYLOR, J. GAZE, K. FOSTER and C. SHONE. 1999. Development of an in vitro assay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3787 – 3792.
- WOODRUFF, B.A., A.M. GRIFFIN and L.M. MCCROSKEY. 1992. Clinical and laboratory comparison of botulism from toxin types type A, B, and E in the United States, 1975 – 1988. *J. Infect. Dis.* 166: 1281 – 1286.
- VARMA, J.K., G. KATSITADZE and MOISCRAFISHVILI. 2004. Signs and symptoms predictive of death in patients with foodborne botulism- Republic of Georgia, 1980 – 2002. *Clin. Infect. Dis.* 39: 357 – 362.
- ZILINSKAS, R.A. 1997. Iraq's biological weapons: The past as future? *JAMA* 278: 418 – 424.