



BULETIN

VETERINER FARMA

MEDIA INFORMASI KEGIATAN
BALAI BESAR VETERINER FARMA PUSVETMA



DETEKSI KETIDAKBERADAAN
PENYAKIT MULUT DAN KUKU
BERBASIS RISIKO DI WILAYAH PROVINSI
STATUS BEBAS BERBATAS PULAU
DI INDONESIA



PENERAPAN KESEJAHTERAAN HEWAN
SERTA TEKNIK DAN MANAJEMEN
PEMELIHARAAN MENCIT
DI BBVF PUSVETMA SURABAYA



PENGAJIAN PEMBUATAN
VAKSIN RABIES INAKTIF GENERASI KE-7



PENINGKATAN MUTU
PENGUNAAN ANTIGEN ANTRAKS REKOMBINAN
SEBAGAI BAHAN COATING ANTIGEN
PADA KIT ELISA ANTRAKS

aan
ETMA



PENINGKATAN MUTU PENGGUNAAN ANTIGEN ANTRAKS REKOMBINAN SEBAGAI BAHAN *COATING* ANTIGEN PADA KIT ELISA ANTRAKS

Fatkhanuddin Aziz¹ dan Dina Ristiana²

¹ Universitas Gadjah Mada; ² Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

ABSTRAK

Antraks adalah penyakit menular yang disebabkan oleh *Bacillus anthracis*. Deteksi antibodi pada serum hewan dapat menggunakan teknik *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sebagai prosedur uji. Pengujian serologis masih terkendala dengan belum tersedianya Kit ELISA. Untuk memenuhi kebutuhan pengujian ini dibutuhkan antigen yang homolog dan stabil. Toksin Antraks dapat digunakan sebagai antigen. Teknik kloning gen digunakan untuk mendapatkan protein rekombinan *Protective antigen* (PA). Kloning gen telah berhasil dilakukan, didapatkan bakteri *E. coli* BL21 DE3 pembawa gen parsial *protective antigen* Antraks yang terintegrasi plasmid pET22b+. Ekspresi rekombinan protein telah dilaksanakan namun diperlukan optimasi lebih lanjut untuk ekspresi dan purifikasi.

Kata Kunci: *Antigen, Antraks, Rekombinan*

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Penyakit Antraks disebut juga radang limpa adalah penyakit yang disebabkan oleh kuman *Bacillus anthracis* dapat menyerang semua hewan berdarah panas termasuk unggas dan manusia (bersifat zoonosis). Kuman Antraks dapat berubah menjadi bentuk spora yang diketahui dapat bertahan hidup sampai 40 tahun lebih, menjadi sumber penularan penyakit baik kepada manusia maupun hewan ternak. Mayoritas provinsi di Indonesia merupakan daerah endemis Antraks. Hingga tahun 2016, tercatat 22 provinsi di Indonesia pernah terjadi kasus Antraks, terbaru dilaporkan terjadi di Desa Gombang, Kabupaten Gunungkidul, Yogyakarta pada tahun 2020. Kasus *outbreak* di daerah baru maupun kejadian berulang penyakit Antraks pada ternak yang dipelihara masyarakat menunjukkan eksistensi dan potensi infeksi penyakit Antraks dimasa yang akan datang.

Uji serologis mempunyai peranan penting dalam diagnosa Antraks dalam suatu sebuah populasi, konservasi, atau bila hewan tersebut sudah diberi perlakuan tertentu. Penelitian dalam hal pengembangan tes secara serologis banyak dilakukan, yaitu mengenai evaluasi vaksinasi dan untuk studi epidemiologi *livestock*, atau hewan liar (WHO, 2008). Deteksi antibodi pada serum hewan terinfeksi sering dipergunakan untuk tujuan penelitian, dengan teknik *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sebagai prosedur uji (OIE 2012).

Guna menunjang keberhasilan penerapan strategi pencegahan penyakit, yaitu vaksinasi, maka upaya mengetahui titer antibodi pasca vaksinasi sangat diperlukan. Saat ini pengujian serologis masih terkendala dengan belum tersedianya Kit ELISA dengan antigen Antraks. Antigen yang dibutuhkan harus homolog dengan isolat yang beredar di lapangan yang disebut isolat lokal. Antigen yang dibutuhkan meliputi *protective* antigen (PA), *lethal factor* (LF) dan *edema factor* (EF). Oleh karena itu, Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma mengembangkan antigen Antraks yang berasal dari isolat lokal tersebut bekerjasama dengan Sekolah Vokasi UGM dalam peningkatan mutu pembuatan antigen rekombinan dengan bantuan Program *Matching Fund* yang diinisiasi Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Republik Indonesia tahun 2022.

Rumusan Masalah

Antigen yang dibutuhkan untuk pembuatan Kit ELISA haruslah berasal dari isolat yang homolog dengan strain yang beredar di lapangan. Isolat tersebut disebut sebagai isolat lokal yang merupakan bakteri strain ganas dan bersifat zoonosis. Apabila menggunakan bakteri ini untuk produksi antigen maka keamanan pekerja dan lingkungan menjadi perhatian serius. Untuk meminimalkan resiko kebocoran, maka diperlukan antigen rekombinan sebagai bahan *coating* antigen. Sumber daya yang dimiliki BBVF Pusvetma terbatas dan belum memiliki pengalaman dalam pembuatan antigen rekombinan yang berasal dari toksin, oleh karena itu diperlukan kerjasama dengan lembaga penelitian lain.

Tujuan Penelitian

Adapun tujuan peningkatan mutu ini adalah:

1. Menemukan formulasi pembuatan rekombinan antigen Antraks yang lebih baik.
2. Menghasilkan rekombinan antigen Antraks yang stabil.

Manfaat

ELISA merupakan salah satu uji diagnosa serologis secara *screening* yang sangat bermanfaat dalam suatu kelompok populasi hewan. Penyakit Antraks merupakan penyakit zoonosis dengan kerugian ekonomi yang tinggi, sehingga diperlukan uji cepat untuk penentuan tindakan dan kebijakan yang harus diambil berikutnya. Selain itu produk-produk yang diproduksi Pusvetma dapat menurunkan ketergantungan dari penyedia dari luar negeri dan menunjukkan komitmen bagi kemandirian kesehatan.

Tinjauan Pustaka

Antraks merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh *Bacillus anthracis* termasuk ke dalam famili *Bacillaceae*. *Bacillus anthracis* adalah bakterium Gram-positif aerob berbentuk batang lurus dengan ujung siku, membentuk rantai panjang dalam biakan. Dalam jaringan tubuh tidak pernah terlihat rantai panjang, biasanya tersusun secara tunggal atau dalam rantai pendek dari 2-6 mikroorganisme, berselubung (berkapsul) dan kadang-kadang satu selubung melingkupi beberapa organisme. Bakteri Antraks bersifat aerob, membentuk spora yang letaknya sentral bila cukup oksigen (Dirjennakkeswan, 2012)

B. anthracis di luar tubuh inang akan bersporulasi pada suhu 14 – 42°C dengan suhu optimum 21 – 37°C. Spora *B. anthracis* berbentuk oval dan dilepaskan setelah bakteri lisis. Sporulasi terjadi dalam waktu 48 jam dan akan terhambat pada konsentrasi CO₂ yang tinggi. Spora Antraks akan mengalami germinasi menjadi bentuk vegetatif bila masuk ke dalam lingkungan yang kaya nukleotida, asam amino dan glukosa, seperti yang ditemukan dalam darah dan jaringan binatang atau manusia.

Pengukuran imunitas seluler pada umumnya tidak digunakan untuk evaluasi vaksin, karena patogenesis Antraks mungkin sebagian besar karena basilus ekstraseluler. Evaluasi menyeluruh terhadap vaksin baru mungkin dapat dikombinasikan uji *in vitro* yang mengukur respon antibodi, netralisasi toksin, bakteri dan kekebalan seluler. Metode *in vitro* untuk evaluasi vaksin termasuk *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) digunakan untuk mengukur antibodi terhadap toksin, kapsul, spora mati, dan antigen yang lain. Respon anti letal toksin (LT) juga dapat dievaluasi menggunakan *toxin neutralization assay* (TNA) yang merupakan *gold standard in vitro* untuk evaluasi vaksin berdasar PA, walaupun pada suatu penelitian diketahui bahwa titer TNA tidak selalu berhubungan dengan proteksi (Chabot *et al.*, 2004).

Uji serologis mempunyai peranan penting dalam diagnosa Antraks dalam suatu populasi, konservasi, atau bila hewan tersebut sudah diberi perlakuan tertentu. Penelitian dalam hal pengembangan tes secara serologis banyak dilakukan, yaitu mengenai evaluasi vaksinasi dan untuk studi epidemiologi, atau hewan liar (WHO, 2008). Deteksi antibodi pada serum hewan terinfeksi sering dipergunakan untuk tujuan penelitian, dengan ELISA sebagai prosedur uji (OIE 2012, Merck 2013). Prosedur serologis paling baik, secara diagnosa retrospektif adalah ELISA di plat mikrotiter dengan komponen Antigen Protektif (PA) dan Faktor Lethal (LF) di dalam toksin Antraks. Toksin antigen tersebut spesifik untuk *B. Anthracis* dan dijual dengan harga yang mahal, hal ini menjadikan uji serologis Antraks hanya dilakukan di laboratorium tertentu dengan fasilitas yang memenuhi persyaratan uji (WHO,2008).

Antibodi adalah senyawa protektif dari sistem kekebalan yang bertugas menetralisasi benda asing atau yang disebut antigen (patogen) yang masuk ke dalam tubuh. Antibodi memiliki dua bentuk, yaitu terlarut dan terikat membran. Antibodi terlarut disekresikan atau terdapat dalam darah dan jaringan, sedangkan antibodi yang

terikat pada membran terdapat pada permukaan sel B yang dikenal dengan nama reseptor sel B. Reseptor sel B akan mengikat antigen yang bersirkulasi, mengaktivasi sel B, dan membentuk plasma sel atau sel B memori (Wasito dan Wuryastuti, 2014). Antibodi didistribusikan dalam cairan biologis ke seluruh tubuh. Ketika darah atau plasma membeku, maka akan terbentuk suatu cairan yang disebut serum. Suatu sampel serum mengandung molekul antibodi yang dapat dideteksi (Abbas *et al.*, 2007).

Antibodi diklasifikasikan dalam sub tipe IgG, IgM, IgD, IgE, dan IgA. IgG adalah antibodi utama dalam serum normal yang banyaknya 70-75% (Burgess, 1988). Antibodi IgG mempunyai ukuran paling kecil dibandingkan molekul yang lain, yaitu berat molekulnya 180 kDa, maka IgG dapat keluar dengan mudah dari pembuluh darah dan beraksi dalam pertahanan jaringan dan permukaan tubuh. IgG mengikat antigen spesifik diantaranya pada permukaan bakteri yang dapat menyebabkan aglutinasi dan membawa pada proses opsonisasi (Tizard, 2004).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) adalah suatu teknik deteksi dengan metode serologis yang berdasarkan atas reaksi spesifik antara antigen dan antibodi, mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dengan menggunakan enzim sebagai indikator. Prinsip dasar ELISA adalah analisis interaksi antara antigen dan antibodi yang teradsorpsi secara pasif pada permukaan fase padat dengan menggunakan konjugat antibodi atau antigen yang dilabel enzim. Enzim ini akan bereaksi dengan substrat dan menghasilkan warna. Warna yang timbul dapat ditentukan secara kualitatif dengan pandangan mata atau kuantitatif dengan pembacaan nilai absorbansi (OD) pada ELISA *plate reader* (Burgess, 1995).

Berbagai cara digunakan untuk menyatakan hasil uji ELISA. Ada yang menyatakannya dalam bentuk kualitatif yang dinyatakan dalam hasil positif atau negatif, namun ada pula yang secara kuantitatif yang sama dengan titer dalam serologi konvensional. Uji ELISA untuk antraks telah dikembangkan oleh Balai Besar Penelitian Veteriner (BBalitvet) Bogor (Hardjoutomo, 1990).

MATERI DAN METODE

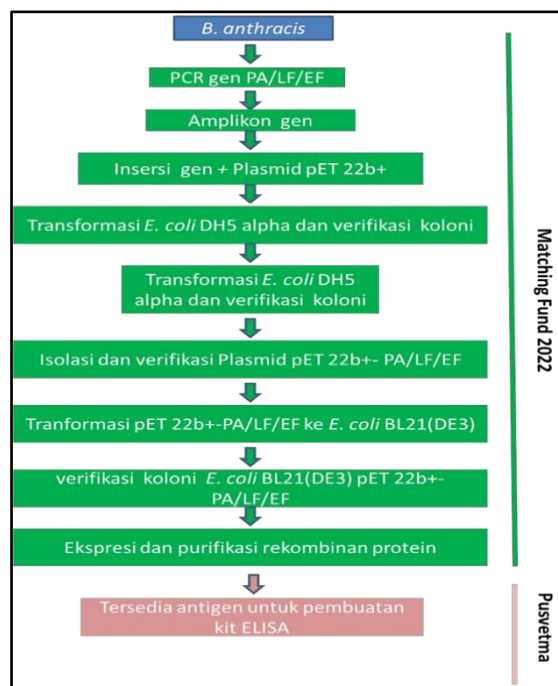
Pembuatan Antigen Antraks Rekombinan

Antigen PA, LF dan EF dibuat dengan teknik kloning gen untuk mendapatkan protein rekombinan. Dalam pelaksanaannya dilakukan dalam beberapa tahapan, sebagai berikut:

Tahap pertama: Kloning gen. Rekayasa dilakukan dengan memasukkan gen penyandi protein PA, LF dan EF ke dalam plasmid. Kemudian plasmid diperbanyak pada kloning vektor berupa bakteri *E. coli* strain DH5 alpha. Keberhasilan kloning gen diverifikasi dengan teknik PCR dan atau sekuensing.

Tahap kedua: Ekspresi dan purifikasi rekombinan protein. Plasmid yang telah diverifikasi membawa gen penyandi protein PA, LF dan EF, kemudian ditransformasikan ke dalam vector ekspresi *E. coli* strain BL21 DE3. Ekspresi gen penyandi protein PA, LF dan EF dilakukan dengan menginduksi promotor T7 plasmid menggunakan *Isopropyl β- d-1- thiogalactopyranoside* (IPTG). Purifikasi rekombinan protein PA, LF dan EF dilakukan dengan *TALON Metal Affinity Resin*. Kemurnian rekombinan protein diverifikasi dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), kemudian konsentrasi protein diukur dengan *Bradford assay*.

Tahap pertama dan kedua dilakukan di UGM, sesuai ketersediaan sumberdaya. Berikut adalah alur proses pembuatan antigen rekombinan Antraks:



HASIL DAN PEMBAHASAN

Gene	Predicted amino sequences	Insert verification by sequencing	Position
PA_4	>ORF sequence 146 aa MHHHHHHHYDRNNI AVG ADESVVKEAHREVINSSTE GLLLNIDKDIRKILSGYIVEI EDTEGLKEVINDRYDMLNI SSLRQDGKTFIDFKKYNDK LPLYISNPNYKVNYYAVTK ENTIINPSENGDTSTNGIKKI LIFSCKGYEIG	Verified	E. coli BL21 DE3
PA_34	>ORF sequence (253 aa) MHHHHHHRIIFNGKDLNL VERRIAAVNPSDPLETTKPD MTLKEALKIAFGFNEPNGN LQYQGDITEFDNFQQT SQNIKNQLAELNATNIYTV LDKIKLNAKMNILIRDKRF HYDRNNAVGADESUVVKE AHREVINSSTEGLLNIDKD IRKILSGYIVEIEDTEGLKEVI NDRYDMLNSSLRQDGKTF IDFKKYNDKLPYISNPNYK VNYYAVTKENTIINPSENG DTSTNGIKKILIFSCKGYEIG	Verified	E. coli BL21 DE3

Kloning gen telah berhasil dilakukan, dan ekspresi protein rekombinan telah berhasil dilakukan juga. Namun demikian, antigen rekombinan ini bersifat *insoluble*, sehingga sulit untuk dipisahkan dari protein kontaminan di dalam pelet. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk membuat antigen yang didapat menjadi *soluble* atau larut sehingga mudah untuk dimurnikan dan lebih stabil.

Antigen adalah zat yang menimbulkan respon imun dalam tubuh. Antigen yang larut dapat larut dalam larutan seperti darah atau getah bening, bersirkulasi ke seluruh tubuh dan berinteraksi dengan sel kekebalan. Antigen terlarut dapat berupa antigen hewan itu sendiri, yang biasanya terdapat di dalam tubuh dan tidak memicu respons imun, atau antigen asing, yang berasal dari luar tubuh dan dikenali sebagai “*non-self*” oleh sistem imun.

Ketika antigen asing yang larut memasuki tubuh, antigen tersebut diambil oleh sel penyaji antigen (APC) seperti sel dendritik, makrofag, atau sel B. APC ini kemudian memproses antigen menjadi fragmen yang lebih kecil dan menyajikannya pada permukaan selnya dalam bentuk kompleks dengan molekul kompleks histokompatibilitas utama (MHC). Sel T, sejenis sel imun, dapat mengenali kompleks antigen-MHC dan menjadi aktif. Hal ini memicu respon imun yang dapat mencakup produksi antibodi oleh sel B, aktivasi sel imun lainnya, dan penghancuran sel yang terinfeksi atau menyimpan antigen.

Antigen terlarut dapat digunakan dalam penelitian, diagnostik, dan terapi. Misalnya, antigen terlarut dapat digunakan untuk merangsang respon imun pada hewan percobaan untuk mempelajari respon imun terhadap patogen tertentu. Dalam tes diagnostik, antigen terlarut dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan antibodi spesifik dalam darah pasien, yang menunjukkan bahwa pasien telah terpapar patogen tertentu (Anonymous, 2002).

KESIMPULAN DAN SARAN

Sebagai kesimpulan, melalui kegiatan MF 2022 ini berhasil mendapatkan bakteri *E. coli* BL21 DE3 pembawa gen parsial *protective antigen* Antraks yang terintegrasi plasmid pET22b+. Ekspresi rekombinan protein telah dilaksanakan namun optimasi lebih lanjut untuk ekspresi dan purifikasi akan dilakukan pada tahap selanjutnya.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Republik Indonesia yang menginisiasi Program *Matching Fund* tahun 2022 sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Linchtman, A. H., and Pillai, S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th Edition. Saunders Elsevier Philadelphia.
- Anonimous, 2002-2023. *Biology Terms Dictionary*. Gen Script. <https://www.genscript.com/biology-glossary/16560/soluble-antigen#:~:text=Antigens%20are%20substances%20that%20elicit,and%20interacting%20with%20immune%20cells>.
- Aziz F, Hisatsune J, Yu L, Kajimura J, Sato'o Y, Ono HK, Masuda K, Yamaoka M, Salasia SIO, Nakane A, Ohge H, Kusunoki Y, Sugai M. Staphylococcus aureus Isolated from Skin from Atopic-Dermatitis Patients Produces Staphylococcal Enterotoxin Y, Which Predominantly Induces T-Cell Receptor V α -Specific Expansion of T Cells. *Infect Immun*. 2020 Jan 22;88(2):e00360-19. doi: 10.1128/IAI.00360-19. PMID: 31740530; PMCID: PMC6977126.D. Catty, 1989. *Antibodies Volume II. A Practical approach*. IRL Press, Oxford, England.
- Burgess, G. W. 1995. *Teknologi s dalam Diagnosis dan Penelitian*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta, Indonesia.Chabot, D. J., Scorpio, A., Tobery, S. A., Little, S. F., Norris, S. L., and Friedlander, A. M. 2004. Antraks capsule vaccine protects against experimental infection. *Vaccine*. 23: 43-47.
- Dirjennak dan Keswan Kementan, 2012, *Manual Penyakit Hewan Mamalia*, Antraks
- Hardjoutomo, S. 1990. Antraks in Indonesia: A continuing problem for developing country. *Salisbury Medical Buletin. Special Supplement. Salisbury, Wiltshire*. 68: 14-115.
- Merck, 2013, Antraks: Introduction, *The Merck Veterinary Manual*. www.merckvetmanual.com/mvm/htm/bc/50400.htm
- OIE, 2012, OIE Manual Antraks, Section 2.1, chapter 2.1.1, www.oie.int/2.01.01_ANTRAKS.pdf
- Tizard, I.R. 2004. *Veterinary Immunology, An Introduction*. 7th edition. Elsevier. USA. 145-153; 247-265; 272-273.
- Wasito, R., dan Wuryastuti, H. 2014. *Antibodi & Imunohistokimia – Kupas Tuntas*. Rapha Publishing, Yogyakarta.
- WHO/OIE/FAO,2008, *Antraks in Human and Animals*, 4th edition, www.who.int/entity/csr/resources/publication/AntraksGuidelines2008/en