

ANALISA PLASMID DAN PROTEIN *Bacillus anthracis* STRAIN VAKSIN YANG DIISOLASI DARI MARMOT VAKSINASI

Sumadi¹, Kamaluddin Zarkasie¹ dan Yutaka Tamura²

1. Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur, Bogor 16340

2. National Veterinary Assay Laboratory, Tokyo, Jepang

PENDAHULUAN

Bacillus anthracis (*B. anthracis*) adalah kuman penyebab penyakit Antraks yang sangat menular dan menimbulkan kerugian yang besar. Sapi, domba, kambing dan kuda umumnya sangat peka. Kuman ini mempunyai 2 macam faktor virulensi untuk menyebabkan timbulnya penyakit (Ivan and Welkons, 1988). Faktor virulensi yang pertama adalah senyawa toksin yang terdiri dari 3 protein yang berbeda yang dikenal sebagai faktor edema, faktor letal dan antigen perlindungan. Faktor virulensi yang kedua adalah kapsul yang tersusun dari D-glutamyl-polypeptide. Hal ini membuktikan bahwa plasmid merupakan salah satu faktor virulensi pada kuman *B. anthracis*. Mikesell et al. (1983) melaporkan bahwa *B. anthracis* mempunyai plasmid besar yang bertanggung jawab pada produksi toksin. Sedangkan Uchida et al. (1985) dan Green et al. (1985) mengatakan bahwa *B. anthracis* mempunyai 2 plasmid dengan berat molekul 110 M Dal dan 60 M Dal, dan plasmid kecil bertanggung jawab pada pembentukan kapsul. Walaupun vaksin telah dipergunakan untuk melindungi infeksi *B. anthracis* sejak abad yang silam, namun mekanisme kekebalannya belum diketahui secara jelas. Louis Pasteur telah memberi andil besar dengan mengembangkan vaksin antraks yang pertama untuk ternak (Pasteur, L., 1881). Vaksin ini terdiri dari biakan kuman *B. anthracis* yang telah dilemahkan dengan menumbuhkan pada temperatur tinggi. Mekanisme molekuler pada sistem pelemahan ini telah dapat dijelaskan oleh Mikesell et al., yang mendemonstrasikan bahwa pertumbuhan *B. anthracis* pada suhu 42°C dapat menghasilkan plasmid toksin (Mikesell et al., 1983). Immunisasi pada ternak, secara umum menggunakan suspensi spora dari strain toksigenik dan non kapsul yang sama dengan strain kuman yang diisolasi oleh Sterne (Ivan and Welkons, 1988). Strain Sterne's hanya mempunyai

plasmid 114 M Dal (Uchida et al., 1985 dan Green et al., 1985). Dasar utama penggunaan vaksin antraks adalah keamanan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui bahwa seed strain yang dipakai untuk produksi vaksin itu aman.

MATERI DAN METODA

Strain kuman

Kuman yang dipergunakan untuk penelitian ini adalah *B. anthracis* yang diisolasi dari marmot yang telah selesai dipergunakan uji keamanan, sebagai pembandingan dipergunakan *B. anthracis* strain 34F₂ yang merupakan seed strain untuk produksi vaksin dan kuman *B. anthracis* strain 17 JB yang merupakan kuman tentang pada uji potensi.

Analisa Plasmid

Kuman *B. anthracis* yang akan diekstraksi plasmidnya ditumbuhkan pada 100 ml medium heart infusion broth (HIB), diinkubasikan pada 37°C selama 16-18 jam dalam shaking water bath. Kuman dipanen dengan cara disentrifugasi pada 15°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang, endapan dilarutkan dalam 2 ml E Buffer (0,04 M Tris; 0,002 M EDTA; 15% Sukrose; pH 7,9) dan dikocok. Sel kuman dilisis dengan cara 1 ml suspensi kuman ditambah 2 ml lysis buffer (lysis buffer dibuat dari 3 gram sodium dodecyl sulfat, 5 ml 3 N NaOH dalam 100 ml sukrose 15% dalam 0,05 M Tris) pada 60°C selama 30 menit. Proteinase K (0,5 ml, Merck) (larutan 2 µg/ml dalam 2 M Tris) ditambahkan ke dalamnya dan diinkubasikan pada 37°C selama 20 menit dalam water bath. Sel kuman yang telah dilisis diekstraksi lagi dengan menambahkan 6 ml phenol-chloroform (1 : 1 vol/vol) ke dalam tabung. Emulsi dipisahkan dengan disentrifugasi pada 15°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, cairan di bagian atas (ekstrak) diambil secara hati-hati dengan mikropipet untuk elektroporesis.

Ekstrak (40 μ l) dicampur dengan 10 μ l pewarna (0,25% Bromophenol blue dalam E buffer mengandung 50% Glycerin), dan 15 μ l campuran ekstrak ini dimasukkan ke dalam Agarose gel (0,7%) yang telah disiapkan sebelumnya dan E buffer digunakan sebagai running buffer. Elektroporesis dilakukan pada 160 volt selama 90 menit pada temperatur ruangan, kemudian gel diwarnai dengan ethidium bromide (0,5 mg/ml) dalam buffer. Garis plasmid diamati di bawah lampu ultra violet dengan panjang gelombang pendek.

Analisa Protein

Kuman *B. anthracis* yang akan diperiksa ditumbuhkan pada 100 ml medium HIB, diinkubasikan pada 37°C selama 16-18 jam dalam shaking waterbath. Kuman dipanen dengan sentrifugasi pada 15°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan sedimen dilarutkan dalam 1 ml 625 m M Tris hydrochloride buffer (pH 6,8) mengandung 2- mercapto ethanol 2%, 0,5 M urea, sodium dodecyl sulfate 2%, glycerin 10% dan bromophenol blue 0,002%. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel elektroporesis (SDS-PAGE) dilakukan dengan 10% gel dengan metode Laemmli (Laemmli, 1970). Berat molekul dihitung dengan membandingkan gerakan perpindahan protein yang berat molekulnya telah diketahui (Pharmacia Fine Chemicals). Gel diwarnai dengan commasive brilliant R-250.

Uji Patogenisitas

Tiga strain biakan *B. anthracis* umur 16-18 jam yang dipergunakan dalam penelitian ini, masing-masing diencerkan 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} . Setiap pengenceran dari masing-masing strain diinokulasikan pada 5 ekor marmot dan diamati selama 10 hari. Lethal Dose 50 (LD₅₀) dihitung dengan metoda "Behrens-Käber" (Kärber G., 1931).

HASIL

Gambar 1 memperlihatkan plasmid yang ada pada 3 strain yang diperoleh dari elektroporesis. Dua macam plasmid telah terdeteksi, seed strain (strain 34 E₂) yang dipakai untuk produksi vaksin dan strain

vaksin yang diperiksa, yang merupakan isolat dari marmot yang divaksin hanya mempunyai plasmid besar, tetapi strain 17 JB mempunyai plasmid besar dan kecil.

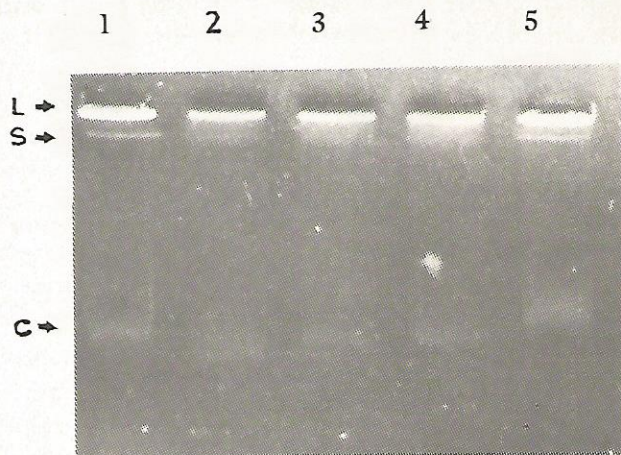


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from various strains of *Bacillus anthracis*.

Lanes : 1, 17 JB; 2, seed strain; 3, vaccine strain isolated from affected guinea pig in the safety test; 4, seed strain plus vaccine strain; 5, 17 JB plus vaccine strain.

Symbol; L, larger plasmid; S, smaller plasmid. The large diffuse bands in all lanes is chromosomal DNA (C).

Protein dari 3 strain yang diperoleh dengan SDS-PAGE tertera pada Gambar 2. Tabel menunjukkan bahwa protein besar dengan berat molekul 87, 81, 72, 69, 53, 40 36, 29 dan 28 K Dal diperoleh pada seed strain yang dipakai produksi. Semua protein ini juga didapatkan pada strain vaksin, tetapi beberapa garis protein dengan berat molekul 87, 81, 72, 34, dan 29 K Dal tidak diperoleh pada strain 17 JB.

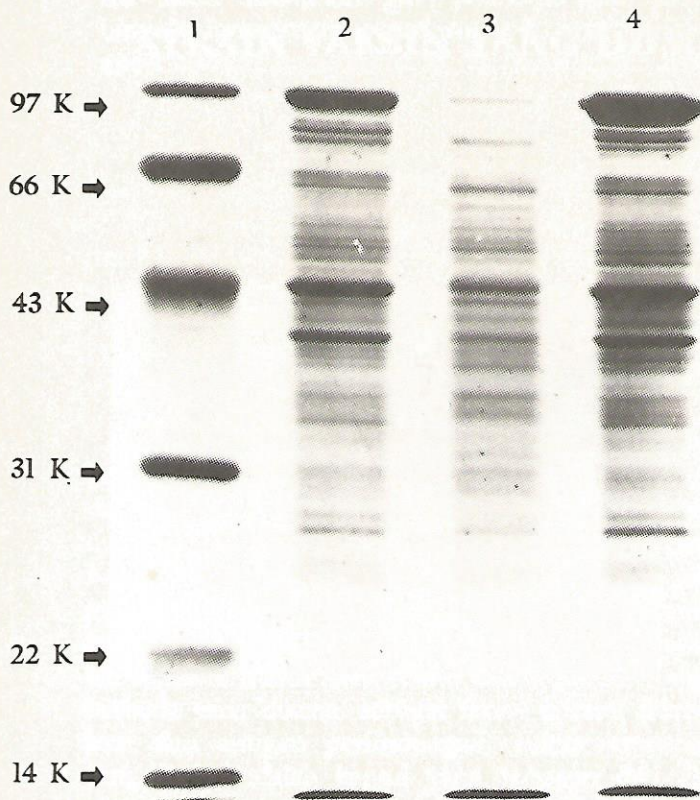


Fig 2. SDS-PAGE profile of various strains of *Bacillus anthracis*.

Lanes : 1, molecular weight standard; 2, vaccine strain isolated from affected guinea pig in the safety test; 3, 17 JB; 4, seed strain

Pada uji patogenisitas diperoleh hasil bahwa LD_{50} *B. anthracis* dari seed strain $10^{8.60}$ CFU (Colonies Forming Unit) dan strain vaksin $10^{8.37}$ CFU, sedang LD_{50} strain 17JB $10^{4.40}$ CFU (Tabel 1).

DISKUSI

Imunisasi pada hewan sebagai pencegahan secara intensif dipergunakan pada penyakit antraks dan banyak tipe vaksin dapat dipergunakan, vaksin antraks pertama yang sudah secara luas dipergunakan untuk peternakan adalah vaksin tipe Pasteur yang merupakan biakan kuman virulen *B. anthracis* yang dilemahkan dengan menumbuhkan pada $42 - 43^{\circ}C$, tetapi vaksin ini sangat bervariasi derajat pelemahannya. Beberapa biakan cukup virulen untuk membunuh hewan yang divaksin. Pengujian vaksin ini sangat sulit untuk memperoleh hasil yang stabil dari virulensi dan kehandalan imunitas pada hewan percobaan, pada saat ini *B. anthracis* (strain 34 F₂), non kapsul dan avirulen digunakan secara luas di seluruh dunia untuk produksi vaksin hidup spora anthrax karena keamanan dan imunitasnya sangat efektif. LD_{50} yang didapat dari seed strain $10^{8.60}$ CFU dan strain vaksin $10^{8.37}$ CFU, hal ini menunjukkan bahwa kedua strain tersebut tidak virulen sedangkan LD_{50} strain 17 JB $10^{4.4}$ CFU, hal ini menunjukkan bahwa strain tersebut virulen.

Table 1. Comparison between seed strain and vaccine strain isolated from affected guinea pig in the safety test

Characteristics	Seed strain (34F ₂)	Strain tested vaccine strain *1	17 JB
Plasmid profile *2	L	L	L, S
Protein profile *3	87, 81, 72, 69, 53, 40, 36, 34, 29, 28	87, 81, 72, 69, 53, 40, 36, 34, 29, 28	69, 53, 40, 36, 28
LD_{50} (log) *4	8.60	8.37	4.40

*1 This strain was isolated from affected guinea pigs in the safety test.

*2 L; larger plasmid, S; smaller plasmid

*3 Numbrs were indicated as molecular weigh (K Dal).

*4 Bacterial suspension was injected intramuscularly to guinea pigs. LD_{50} value were indicated as Log CFU.

Uchida et al., (1985) menyatakan bahwa *B. anthracis* strain avirulen mempunyai 2 faktor virulensi yaitu kapsul dan tripartite exotoxin. Produksi toksin dikontrol oleh plasmid 140 M Dal dan sintesa kapsul tergantung pada plasmid 60 M Dal. Faktor virulensi *B. anthracis* tergantung pada adanya plasmid. Plasmid dan protein yang didapat dari seed strain dan strain vaksin mempunyai persamaan.

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa strain vaksin yang diisolasi dari marmot yang telah divaksin pada uji keamanan tidak berbeda dengan seed strain yang dipakai dalam produksi vaksin.

DAFTAR PUSTAKA

- Green D.B. et al.**, 1985. Demonstration of capsule plasmid in *Bacillus anthracis*, *Infect. Immun.*, 49:291-297.
- Ivan B.E. and Welkos L.S.** 1988. Recent advances in the development of an improved human anthrax vaccine, *Eur. J. Epidemiol.*, 4:12-19.
- Karber G.** 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche, *Path. Pham*, 162: 482-487.
- Laemmli, U.K.** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685.
- Mikesell P. et al.** 1983. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*, *Infect. Immun.*, 39:371-376.
- Uchida I. et al.**, 1985. Association of the encapsulation of *Bacillus anthracis* with 60 Megadalton plasmid, *J. Gen. Microbiol.*, 131:363-367.

PLASMID AND PROTEIN PROFILING OF *Bacillus anthracis* VACCINE STRAIN ISOLATED FROM AFFECTED GUINEA PIGS.

ABSTRACT

The strain 34 F₂ (Sterne Strain), a non capsulated strain, has been used as anthrax live vaccine for various domestic animals. According to the Technical Guidance of Quality Assay, the anthrax live vaccine assayed in guinea pigs for safety and potency test. Sometime guinea pigs died after inoculation and the organism can be isolated. In this experiment, the vaccine strain isolated from affected guinea pigs were characterized to compare with seed strain. The result shows identical properties of two strains, suggesting that these two strains were indistinguishable by plasmid, protein profiling and pathogenicity in guinea pigs.