

Identifikasi Cepat *Bacillus anthracis* dengan *Direct Fluorescent Antibody Assay* yang Menggunakan Komponen Dinding Sel dan Kapsul

LILY NATALIA dan RAHMAT SETYA ADJI

Balai Besar Penelitian Veteriner
Jl R.E. Martadinata 30, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 16 Maret 2008)

ABSTRACT

NATALIA, L. and R. SETYA ADJI. 2007. Rapid identification of *Bacillus anthracis* by cell wall and capsule components direct fluorescent antibody assay. *JITV* 13(2): 140-149.

During the outbreak of anthrax, early diagnosis is critical for effective treatment. Numerous attempts have been made to design antigen based detection tests and to rapidly identify truly anthrax specific antigens for *B. anthracis*. In Indonesia, standard identification of *B. anthracis* relies on a combination of time consuming steps including bacterial culture and Ascoli precipitin test, which can take several days to provide a diagnosis. In this study, two component (cell wall and capsule) direct fluorescent antibody assay (DFA) were developed to rapidly identify and to directly detect capsulated *B. anthracis*. The component used in cell wall DFA (CW-DFA) assay is polysaccharide-peptidoglycan complex, which was prepared from *B. anthracis* culture by cell lysis, guanidine and sodium dodecyl sulphate (SDS) extraction. The component used in capsule DFA (CAP-DFA) is poly-D-glutamic acid (PGA) which were prepared by extraction of *B. anthracis* capsule. Component of polysaccharide-peptidoglycan complex and PGA conjugated with hemocyanin were then used as immunogen for immunizing rabbits using Freund's complete/incomplete adjuvant. The hyperimmune sera were then collected, purified and conjugated to Fluorescent Iso Thiocyanate (FITC). *B. anthracis* isolates and non *B. anthracis* isolates were tested by the CW-DFA and CAP-DFA Assays. *B. cereus*, *B. subtilis*, other *Bacillus* sp. and other Gram positive rod bacteria were negative, while capsulated *B. anthracis* gave positive results. The two component (CW DFA and CAP-DFA) assay are specific rapid confirmatory test for capsulated *B. anthracis*.

Key Words: *Bacillus anthracis*, Cell Wall and Capsule Direct Fluorescent Antibody Assay

ABSTRAK

NATALIA, L. dan R. Setya ADJI. 2007. Identifikasi cepat *Bacillus anthracis* dengan *direct fluorescent antibody assay* yang menggunakan komponen dinding sel dan kapsul. *JITV* 13(2): 140-149.

Dalam kejadian kasus antraks, diagnosa dini sangat penting untuk tindakan pengendalian yang efektif. Telah banyak penelitian yang dilakukan untuk membuat uji yang secara cepat dapat mendeteksi dan mengidentifikasi antigen spesifik *B. anthracis*. Di Indonesia, identifikasi standar *B. anthracis* tergantung pada kombinasi uji termasuk biakan bakteri dan Ascoli precipitin test, yang menggunakan waktu beberapa hari untuk menghasilkan diagnosis. Dalam penelitian ini, *direct fluorescent antibody assay* (DFA) dengan dua komponen (dinding sel dan kapsul), dikembangkan untuk secara cepat dapat mengidentifikasi dan secara langsung mendeteksi *B. anthracis* berkapsul. Komponen yang digunakan dalam DFA dinding sel (CW-DFA) assay adalah *polysaccharide-peptidoglycan complex* yang dibuat dari kultur *B. anthracis* dengan cara melakukan lisis terhadap sel, ekstraksi guanidine dan ekstraksi dengan *sodium dodecyl sulphate* (SDS). Komponen untuk DFA kapsul (CAP-DFA) assay adalah *poly-D-glutamic acid* (PGA) yang dibuat dengan cara ekstraksi dari kapsul *B. anthracis*. Komponen *polysaccharide-peptidoglycan complex* dan PGA yang dikonjugasi dengan *hemocyanin* kemudian digunakan sebagai imunogen untuk imunisasi kelinci dengan menggunakan adjuvan *Freund's complete/incomplete*. Serum hiperimun kemudian dikoleksi dan dimurnikan dan dikonjugasikan dengan *Fluorescent Iso Thiocyanate*. Berbagai isolat *B. anthracis* dan bukan isolat *B. anthracis* telah diuji dengan uji CW-DFA dan CAP-DFA assay. *B. cereus*, *B. subtilis* dan *Bacillus* sp. dan bakteri Gram positif lain yang berbentuk batang memberikan hasil negatif, sedangkan *B. anthracis* berkapsul memberikan hasil positif. Uji CW-DFA dan CAP-DFA adalah uji yang spesifik dan cepat untuk konfirmasi *B. anthracis* berkapsul.

Kata Kunci: *Bacillus anthracis*, Cell Wall Direct Fluorescent Antibody Assay (CW-DFA)

PENDAHULUAN

Penyakit antraks merupakan penyakit infeksi bakteri akut atau perakut yang disebabkan *B. anthracis*. Penyakit antraks tersebar diseluruh dunia dan tingkat

kematian karena penyakit ini sangat tinggi terutama pada herbivora. Kejadian antraks di Indonesia sudah menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar dan mengancam keselamatan manusia. Indonesia merupakan daerah endemik antraks, dan sampai saat ini tercatat 11 provinsi endemis antraks pada binatang, sedangkan 5

propinsi (Jabar, Jateng, NTB, NTT dan DI Yogyakarta) tercatat telah terjadi kasus antraks pada manusia (DEPKES, 2003). Menurut SIREGAR (2002), Sumatera (kecuali propinsi Jambi), Jawa Barat, Jawa Tengah, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tengah, Sulawesi Utara, dan Sulawesi Tenggara; Nusa Tenggara Barat dan Nusa Tenggara Timur masih merupakan daerah yang mempunyai kecenderungan muncul wabah secara periodik. Seringnya terjadi wabah penyakit, memerlukan usaha pengendalian penyakit yang terencana, termasuk cara diagnosa penyakit yang cepat dan tepat agar penyakit dapat segera diatasi.

Dalam usaha pengawasan penggunaan *B. anthracis* sebagai senjata biologis yang sangat membahayakan kesehatan masyarakat, harus dibuat suatu perangkat uji yang mampu mendeteksi antraks dengan cepat dan tepat. Uji ini diharapkan dapat mendeteksi bakteri antraks dalam berbagai bentuk (serbuk, cairan). Metoda isolasi dan identifikasi *B. anthracis* dengan media biakkan, uji biokimia, uji Ascoli *precipitin test* dan uji biologis menggunakan marmot atau mencit atau dirasakan tidak praktis. Kelemahan uji-uji tersebut adalah diperlukan waktu yang cukup lama untuk mengetahui hasil uji. Seringkali juga pada usaha isolasi dan pembiakan *B. anthracis* di laboratorium juga mengalami kegagalan walaupun gejala klinis pada hewan atau manusia sudah tampak jelas. *B. anthracis* tidak dapat diisolasi atau ditumbuhkan (terutama pada manusia) jika bakteri sudah mati karena terhadap penderita sudah diberikan pengobatan antibiotika.

Penelitian-penelitian terdahulu menunjukkan keunggulan *immunofluorescence assay*, yang didasarkan pada pembuatan antibodi poliklonal terhadap antigen permukaan sel *B. anthracis*, yang mampu mengidentifikasi isolat-isolat *B. anthracis* (PHILLIPS *et al.*, 1989), dan juga mampu secara langsung mengidentifikasi *B. anthracis* dari spesimen dari hewan yang terinfeksi. Tetapi, masih ada keterbatasan dalam uji yang telah dikembangkan, yaitu adanya reaksi silang dengan kelompok bakteri *Bacillus cereus* (HELGASON *et al.*, 2000).

Untuk mengatasi reaksi silang tersebut, maka dilakukan pemurnian *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide*, yang merupakan komponen dari dinding sel *B. anthracis* (EZZELL dan ABSHIRE, 1988, EZZELL *et al.*, 1990). Komponen ini akan dipakai untuk membuat antibodi yang akan digunakan dalam *Cell Wall-Direct Fluorescent Assay* (CW-DFA). Uji ini telah berhasil dikembangkan antara lain oleh PHILLIPS dan EZZELL (1989), serta DE *et al.* (2002).

Semua galur *B. anthracis* yang virulen membentuk kapsul (TODAR, 2004). Ekspresi virulensi *B. anthracis* ditentukan oleh kemampuannya memproduksi dua faktor virulensi utama, yaitu toksin antraks dan *poly-D-glutamic acid* (PGA) kapsul. Produksi kapsul tergantung pada adanya plasmid pX02, 60 megadalton.

PGA dari kapsul itu sendiri tidak bersifat toksik, tetapi berfungsi untuk melindungi bakteri *B. anthracis* dari fagositosis dan komponen bakterisidal. (TURNBULL, *et al.*, 1998; TODAR, 2004). Kapsul mempunyai peranan penting sewaktu mulainya proses infeksi, dan kurang berperan dalam fase terminal penyakit yang disebabkan toksin antraks. Kapsul dibentuk *in vivo* dan mempunyai peranan penting dalam uji diagnostik (GREEN *et al.*, 1985). Dari genus Bacilli, *B. anthracis* dapat berkapsul sedangkan bacilli lain seperti *B. thuringensis*, *B. cereus*, *B. mycoides* (BARROW dan FELTHAM, 2003). Jika telah diidentifikasi kapsul dari bacilli, maka identifikasi *Bacillus* sp sudah dapat diarahkan pada *B. anthracis*.

Dalam uji *direct fluorescent assay* yang dikembangkan dalam penelitian ini, juga diarahkan pada identifikasi PGA dari kapsul *B. anthracis*. Uji ini disebut *capsule- direct fluorescent assay* (CAP-DFA), yang harus digunakan bersama uji CW-DFA untuk membuat kesimpulan akhir dari identifikasi bakteri. Dalam penelitian ini, uji DFA telah dikembangkan bertujuan untuk secara langsung mendeteksi *B. anthracis* berkapsul dalam spesimen. Sesuai rekomendasi yang dikeluarkan oleh Dirjen Pemberantasan Penyakit Menular dan PENYEHATAN Lingkungan, DEPARTEMEN KESEHATAN (2003), dan CENTERS FOR DISEASE CONTROL and PREVENTION (CDC) (2002), *direct fluorescence antibody assay* merupakan salah satu teknik diagnosa yang perlu dilakukan oleh laboratorium rujukan.

MATERI DAN METODE

Preparasi *polysaccharide-peptidoglycan complex* dinding sel *B. anthracis*

B. anthracis galur Sterne yang mempunyai pX01 dan tidak mempunyai pX02 sesudah ditumbuhkan pada lempeng agar darah, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Kultur yang tumbuh kemudian digunakan sebagai inokulum untuk medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Kultur dalam RPMI diinkubasi dengan pengocokan pada 100 rpm, suhu 37°C selama 18-20 jam. Purifikasi polisakarida dari dinding sel *B. anthracis* kemudian dilakukan dengan modifikasi dari EZZELL *et al.* (1990), dengan cara sebagai berikut:

Kultur *B. anthracis* dipanen dengan sentrifugasi selama 15 menit pada 10.000 g dan disuspensikan pada 0,1 g/ml dalam 0,1 M *acetate buffer* (1,25 mM MgSO₄, pH 5,0) yang mengandung 1 µg *DNase* dan *RNase* per ml (Sigma Chem. Co). Sel yang didinginkan kemudian dipecahkan dengan *sonifier* B-12 (Branson Sonic Power Co, Danbury, Connecticut, USA). Dilakukan 5 kali sonikasi dengan waktu 1 jam dengan proses *freeze-thawing*. Proses pemecahan sel dinyatakan selesai bila dipastikan melalui pemeriksaan mikroskopis dengan

pewarnaan *crystal violet* bahwa tidak ada lagi sel yang utuh di bawah mikroskop dan jika ditumbuhkan pada *Brain Heart Infusion (BHI) broth* tidak ada pertumbuhan lagi. Sel yang telah terpecah kemudian disentrifus pada 10.000 g. Pellet dicuci sebanyak 3 kali dalam larutan dingin 10 mM *N-2-hydroethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid* (HEPES) dengan penambahan 2 mM MgSO_4 (pH 7,5) pada kira-kira 0,1 g sel bakteri per ml. Akhirnya, *pellet* dicuci tiga kali lagi dengan *buffer* HEPES MgSO_4 yang mengandung 0,1 M NaCl.

Bahan tersebut kemudian disuspensikan dalam 0,05 g/ml PBS (10 mM *sodium phosphate* dalam 0,85% NaCl, pH 7,3) dan selanjutnya disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit.

Selanjutnya bahan tersebut disuspensikan pada 0,1 g/ml dalam 2M *guanidine HCl* (mengandung 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 μg *phenylmethylsulfonyl fluoride*(PMSF) per ml, 0,02% *sodium azide* (pH 8,5)) dan di-*stirr* perlahan selama 2 jam di suhu ruangan. Bahan ekstrak yang tidak larut dibuang dengan sentrifugasi, dan *guanidine soluble material* diendapkan dengan 10 volume *methanol* dingin. Presipitat dilarutkan lagi dalam 2M *guanidine* dan di steril filter, presipitasi dengan *methanol* diulang kembali seperti di atas. Presipitat, yaitu ekstrak *guanidine*, dicuci 2 kali dengan 1 volume *aquades* dan dikering bekukan. Hasil analisa *electrophoresis* akan membuktikan bahwa bahan ini murni (hasil elektroforesis menunjukkan berat molekul 91 kDa). Bahan ini kemudian disuspensikan dalam 0,25g/ml dalam 1% SDS, kemudian dipanaskan sampai 90°C selama 5 menit. Bahan tersebut kemudian disentrifus selama 10 menit pada kecepatan 27.000 g. Supernatan dibuang, dan ekstraksi dengan 1% SDS panas dilakukan 2 kali terhadap *pellet* yang terjadi, dilanjutkan dengan *aquades* pada suhu 90°C sebanyak 4 kali. Akhirnya bahan dikering bekukan. Polisakarida ini mempunyai berat molekul 12 kDa (EKWUNIFE *et al.*, 1991).

Preparasi capsular poly- γ -D-glutamic acid (PGA) *B. anthracis*

Dalam penelitian ini digunakan isolat lokal *B. anthracis* yang berkapsul. Bakteri ini mula-mula ditumbuhkan pada lempeng NBY agar (Difco lab, Detroit, Mich. USA) yang mengandung 5 sampai 20% CO_2 pada suhu 37°C selama 24 sampai 48 jam. NBY medium mengandung *nutrient broth* 8 g dan *yeast extract* 3 g per liter. Untuk memproduksi kapsul, NBY medium diberi tambahan NaHCO_3 (disterilisasi dengan filtrasi pada larutan 9%) sehingga konsentrasi akhirnya 0,7% (w/v) dan tambahkan serum kuda dengan konsentrasi akhir 10% (v/v) (GREEN *et al.*, 1985). Koloni yang bersifat sangat mukoid diseleksi untuk kemudian ditumbuhkan secara aerobik pada *erlenmeyer*

menggunakan medium *E broth* (RHIE *et al.*, 2003). Kultur yang ditumbuhkan pada *E broth* diinkubasi pada 37°C dengan pengocokan pada 250 rpm selama 96 jam. PGA dipurifikasi dari supernatan kultur dengan cara RHIE *et al.* (2003) sebagai berikut:

Kultur bakteri yang sangat kental disentrifus pada 4°C (6.500 g selama 20 menit) untuk menyingkirkan sel bakterinya. Supernatan diambil dan diendapkan dengan 3 volume *ethanol* pada suhu 4°C semalam. Endapan PGA diambil dengan sentrifugasi, dan didialisa terhadap *deionized water*. Larutan PGA diasamkan sampai pH 1,5 dengan menggunakan 6 M HCl dan segera diendapkan kembali dengan 3 volume *1-propanol* pada suhu -20°C. PGA dikoleksi dengan cara sentrifugasi dan dicuci 2 kali dengan *acetone* dan sekali pencucian dengan *ethyl ether*. PGA yang murni kemudian dilarutkan dalam *aquades*, didialisa dengan baik dan dikeringbekukan. Berat molekul PGA kira-kira 500 kDa. Karena ukuran yang besar dari PGA, konjugasi langsung akan berakibat pembentukan gel yang tidak larut dan tidak diinginkan untuk imunisasi. Jadi PGA yang dihasilkan didegradasi dengan *sonifier* B-12 (Branson Sonic Power Co, Danbury, Connecticut, USA), selama 1,5 jam (ROBINSON *et al.*, 1996). Sebelum digunakan untuk produksi antibodi, PGA yang sudah didegradasi dikonjugasikan dengan *Imject Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin* (mc KLH) (PIERCE Biotechnology, Inc. USA). Konjugasi serupa telah dilakukan MAY *et al.* (2003). *Keyhole limpet hemocyanin* dalam hal ini berfungsi sebagai *carrier*. Konjugasi *hapten-carrier* dilakukan dengan menggunakan *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride* (EDC). EDC merupakan *crosslinker* yang bereaksi dengan grup karboksil dan amino untuk membentuk ikatan amida yang stabil. Sebanyak 8 mg mcKLH ditambah 800 μl *deionized water* sehingga diperoleh 10 mg/ml larutan A. Kemudian 10 mg PGA kapsul *B. anthracis* dilarutkan dalam 2 ml *imject EDC Conjugation buffer* (mengandung 0,1 M MES, 0,9 M NaCl, 0,02% NaN_3 ; pH 4,7) (larutan B). Sebanyak 2 ml larutan B ditambahkan pada 800 μl larutan A. Campuran direaksikan selama 2 jam pada suhu ruangan. Konjugat dimurnikan dengan *desalting* atau dialisis dengan PBS untuk membuang *crosslinker* yang tidak bereaksi dan juga *sodium azida*.

Imunisasi pada kelinci

Pembuatan anti *polysaccharide-peptidoglycan complex* dari dinding sel *B. anthracis* (anti CW) dan pembuatan anti PGA dari kapsul *B. anthracis* (anti CAP) yang telah dikonjugasikan dengan hemocyanin dilakukan pada kelinci. Imunisasi awal dilakukan dengan menyuntikkan (i.m.) per ekor kelinci, 3 mg antigen dan *Freund's Complete Adjuvant*

(perbandingan volume 1:1). Imunisasi ke dua dilakukan pada hari ke 28, menggunakan imunogen yang serupa tetapi digunakan Freund's *Incomplete Adjuvant*. Pada hari ke 42 dan 66 imunisasi diulang kembali seperti imunisasi ke dua, dengan dosis yang sama.

Purifikasi IgG

Serum yang diperoleh sebagai hasil imunisasi diuji dengan agar gel presipitasi (AGP), untuk memastikan antibodi yang dihasilkan telah cukup tinggi (ditunjukkan oleh garis yang jelas antara lubang antigen dan antibodi). Purifikasi IgG dilakukan dengan modifikasi metoda WALKER *et al.* (1971). Terhadap serum hiperimun dari kelinci ditambahkan 0,4% Rivanol dengan perbandingan: 1 : 3,5. Larutan kemudian disaring, endapan dibuang. Terhadap supernatan ditambahkan arang aktif (1,2g/100ml). Larutan disaring kembali dengan bubuk kertas pada corong Buchner. Tambahkan volume yang sama larutan amonium sulfat jenuh. Endapan diambil dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5000 RPM selama 15 menit. Dialisis kemudian dilakukan terhadap endapan menggunakan *phosphate buffered solution* (PBS), pH 7,4. Pergantian PBS dilakukan beberapa kali sampai dialisis selesai. Selanjutnya purifikasi dilanjutkan dengan menggunakan kolom kromatografi (DEAE SEphacel). IgG yang telah dimurnikan kemudian diukur konsentrasinya dengan metoda BRADFORD (1976).

Konjugasi dengan FITC

Ke dua macam antibodi di atas dikonjugasikan dengan *Fluorescent Iso Thiocyanate* (FITC) dengan cara WALKER *et al.* (1971). Perbandingan IgG dengan FITC: 25:1 (wt/wt) dalam 0,05 M *buffer carbonate* pH 9,0. Campuran di *stirr* perlahan selama 4 jam pada suhu ruangan, dan FITC yang tidak terikat dibuang dengan kolom kromatografi menggunakan Sephadex G-25 M (Pharmacia). Ekuilibrisasi dilakukan dengan PBS, pH 7,3. Konjugat akan mengandung 3,5 sampai 5,5 µg FITC per mg protein.

CW-DFA dan CAP-DFA Assay

Untuk mengevaluasi ke dua macam *assay*, sebanyak 50 µl suspensi sel bakteri yang telah difiksasi pada gelas obyek dicampur dengan 20 µl konjugat anti CW-FITC atau anti CAP-FITC. Kemudian inkubasi pada ruang lembab dilakukan pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, preparat dicuci 3 kali dengan menggunakan larutan PBS. Preparat lalu dikeringkan dan ditetaskan *mounting fluid* (1,4-diazobicyclo(2,2,2)-octane (Sigma) dalam 10% PBS dan 90% gliserol pH 7,4), kemudian beri kaca penutup. Sel bakteri dapat diamati menggunakan fluorescent/UV mikroskop

menggunakan lensa obyek 100X dengan minyak emersi. Jika terdapat *B. anthracis* (hasil positif), akan terlihat sel bakteri berbentuk batang berwarna hijau terang berfluoresens dengan latar belakang gelap. Reaksi negatif ditunjukkan jika sel bakteri tidak menunjukkan adanya fluoresens. *Assay* akan dipakai untuk menguji berbagai isolat *B. anthracis* dan isolat bukan *B. anthracis* seperti *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringensis* dan *Bacillus* sp yang sudah diidentifikasi dengan metoda biakkan/kultur dan uji biokimiawi (COGNE *et al.*, 1995). Dalam tulisan ini dijelaskan tentang pengembangan uji dan evaluasi hasil uji dalam usaha melakukan konfirmasi identitas kultur *B. anthracis* dan mendeteksinya dengan cepat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk deteksi *B. anthracis*, uji DFA yang dikembangkan harus mampu mengidentifikasi *Bacillus anthracis* dalam spesimen dengan cepat, sensitif dan spesifik. Jadi, dalam pengembangan teknik DFA ini, telah digunakan antibodi untuk mendeteksi antigen yang spesifik dan unik hanya dapat ditemukan pada galur-galur *B. anthracis* dan tidak ditemukan pada spesies *Bacillus* lainnya. Dalam penelitian ini, telah diisolasi antigen yang *species specific* untuk nantinya dapat menghasilkan antibodi yang akan digunakan dalam uji DFA.

Untuk pengembangan uji CW-DFA, digunakan antigen dari dinding sel yang spesifik. Telah diketahui, bahwa struktur dari polisakarida utama dinding sel *B. anthracis* adalah *species specific* (CHOUHURY *et al.*, 2006). Dalam penelitian ini telah diisolasi *polysaccharide-peptidoglycan complex* dari sel *B. anthracis*, karena bahan ini bersifat *species specific*. Secara keseluruhan, dinding sel *B. anthracis* terdiri atas *peptidoglycan*, suatu kompleks heteropolisakarida yang terbuat dari rantai *glycan* yang dihubungkan oleh peptida-peptida kecil. Bahan ini membentuk suatu jaringan yang menutupi seluruh bakteri, dan merupakan 40% dari seluruh masa sel. Rantai *glycan* terdiri atas unit *N-acetylglucosamine* dan *N-acetylmuramic acid*. Rantai *glycan* terhubung oleh peptida-peptida kecil membentuk bagian *glycan* dalam dinding sel (LEMAIRE *et al.*, 1995; POPOV *et al.*, 2002). Komposisi utama dari polisakarida dinding sel *B. anthracis* dinding sel terutama terdiri atas *Galactose-N-acetylglucosamine* (Gal-NAG) *polysaccharide* yang sangat unik untuk galur-galur *B. anthracis* (EZZEL *et al.*, 1990). Bahan ini dapat dipreparasi dari kultur *B. anthracis* dengan kombinasi *cell lysis* dan ekstraksi (POPOV *et al.*, 2002). Jadi, polisakarida *B. anthracis* ini telah banyak diteliti dan telah dibuktikan polisakarida tersebut akan sangat potensial untuk identifikasi *B. anthracis*. Hal ini tentunya merupakan dasar untuk membedakannya dari spesies *Bacilli* lainnya. Oleh

karena itu, dalam penelitian ini telah diisolasi *Galactose-N-acetylglucosamine* (Gal-NAG) *polysaccharide* dari dinding sel untuk digunakan dalam pengembangan uji DFA *B. anthracis*.

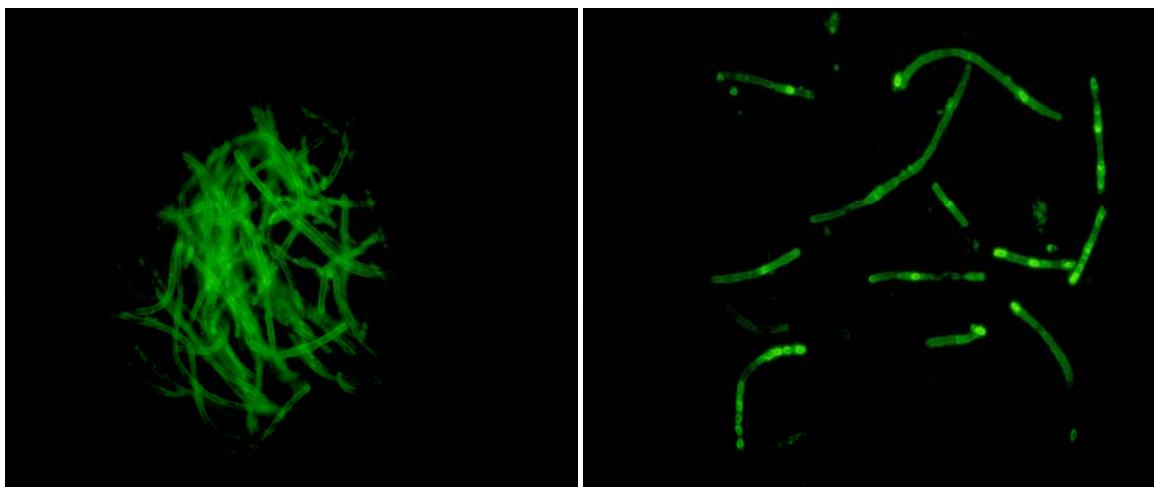
B. anthracis virulen membentuk kapsul *in vivo* dalam kondisi anaerobik, atau lingkungan yang mengandung 5% CO₂ atau media yang mengandung bikarbonat (HCO₃). Sel vegetatif akan mensekresikan kapsul polipeptida (atau PGA) dan membentuk koloni yang bersifat mukoid. Untuk pengembangan CAP-DFA, telah diisolasi *poly-γ-D-glutamic acid* (PGA) dari kapsul *B. anthracis* yang bersifat mukoid, untuk kemudian digunakan untuk menghasilkan antibodi spesifik. Dari *Bacillus* sp, (*B. cereus*, *B. thuringensis* atau *B. megaterium* dan sebagainya) tidak menghasilkan polimer kapsul ini. Jadi, deteksi komponen PGA kapsul akan dapat membedakan *B. anthracis* dari *Bacillus* sp lainnya. (FOUET *et al.*, 1999; MESNAGE *et al.*, 2000).

Dalam penelitian ini telah dievaluasi kedua macam uji DFA (CW-DFA dan CAP-DFA) yang menggunakan komponen dinding sel dan komponen kapsul spesifik untuk melakukan identifikasi konfirmasi dari berbagai galur *B. anthracis* dan berbagai galur *Bacillus* sp dan

bakteri lain yang berbentuk batang dan Gram positif (Tabel 1). Dari hasil evaluasi, ternyata uji dengan 2 macam komponen ini terbukti sensitif dan spesifik. Untuk identifikasi *B. anthracis*, kedua uji harus dilakukan secara bersamaan untuk mendapatkan kesimpulan akhir. Meskipun galur tertentu *B. cereus* dan *B. thuringensis* dapat menghasilkan antigen *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide* seperti *B. anthracis*, tetapi mikroorganisme ini tidak mempunyai kapsul *poly-γ-D-glutamic acid* (PGA), sehingga mudah dibedakan dengan *B. anthracis*. Jadi deteksi *B. anthracis* dengan CW-DFA dan CAP-DFA adalah sangat spesifik untuk *B. anthracis* (DE *et al.*, 2002).

Dari uji CW-DFA, dapat diidentifikasi *B. anthracis*, penyebab penyakit antraks merupakan bakteri berbentuk batang, biasanya tampak membentuk rantai yang terdiri dari sel-sel bakteri (Gambar 1). Bentuk tersebut, akan tampak di bawah mikroskop fluoresent dalam CW-DFA dengan pembesaran obyektif 100X.

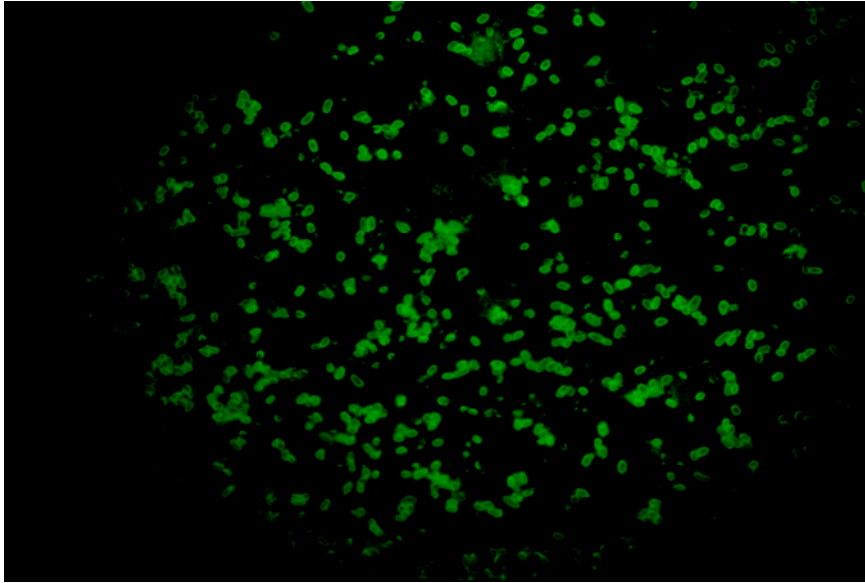
Untuk uji CAP-DFA, dapat terlihat bahwa *B. anthracis* yang patogen (berkapsul) akan memberikan fluoresens, sedangkan bakteri yang tidak berkapsul tidak akan berfluoresens dan terlihat gelap (Gambar 3).



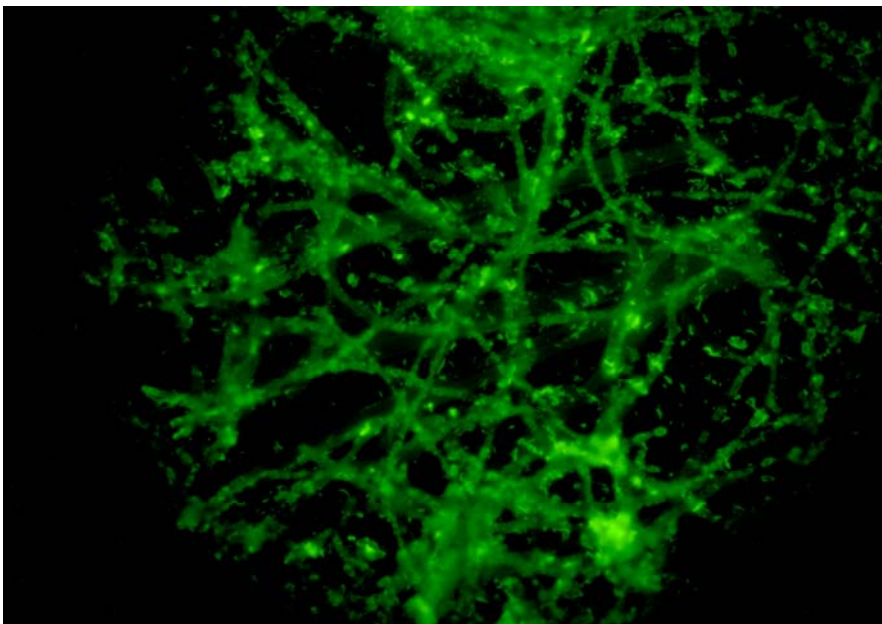
Gambar 1. Hasil DFA terhadap dinding sel (DFA CW) *B. anthracis*

Dari 24 isolat *B. anthracis* yang diperiksa, semua isolat menunjukkan hasil positif dengan CW-DFA dan CAP-DFA, kecuali isolat *B. anthracis* galur Sterne (galur vaksin), tidak mempunyai kapsul akan memberikan hasil negatif dalam CAP-DFA dan hasil positif dalam CW-DFA. *B. anthracis* galur Sterne (34F2) merupakan galur yang digunakan untuk memproduksi vaksin antraks, tidak mempunyai kapsul.

Hasil *direct fluorescent antibody* (DFA) assay terhadap dinding sel *B. anthracis* yang diproduksi dapat dilihat pada Gambar 1, 2 dan 3. Jika konjugat dipakai pada kultur campuran dengan *Bacillus* lainnya (*B. subtilis*, *B. cereus*), tampak pada Gambar 2, kultur *B. anthracis* terlihat masih bersinar jelas, sedangkan *B. subtilis* terlihat gelap.



Gambar 2. CW-DFA *B. anthracis* terhadap bentuk spora isolat 34F2 *B. anthracis* (Sterne strain, galur vaksin)
Galur *B. anthracis* ini terlihat negatif dalam CAP-DFA, karena tidak mempunyai kapsul



Gambar 3. Hasil pemeriksaan isolat *B. anthracis* asal kasus di Citaringgul, Kabupaten Bogor, dengan uji capsule DFA (CAP-DFA)

Tabel 1. Hasil pemeriksaan berbagai isolat dengan *direct fluorescent antibody assay* yang menggunakan komponen dinding sel dan kapsul

	Isolat	Identitas isolat	CW- DFA	CAP- DFA	Kesimpulan akhir
1	Citaringgul	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
2	34F2/Sterne (vaccine strain)	<i>B. anthracis</i>	+	-	<i>B. anthracis</i> <i>unencapsulated</i>
3	Mkmr/K.Pedes, Bgr	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
4	Karadenan, Bgr	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
5	NTT-1	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
6	NTB-1	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
7	CTR, Bgr	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
8	Purwakarta	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
9	Irian Jaya	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
10	Jambi	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
11	T. Safari	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
12	Salatiga	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
13	DKI	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
14	Grati	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
15	Krawang	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
16	Bekasi	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
17	NTB/Bima 07	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
18	Cibinong 07	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
19	Yogya 1 /08	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
20	Yogya 2 /08	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
21	Depok 07	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
22	Karang Tengah 06	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
23	NTT 06	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
24	NTB 06	<i>B. anthracis</i>	+	+	<i>B. anthracis</i>
25	2496	<i>B. thuringensis</i>	+	-	negatif
26	0606	<i>B. cereus</i>	-	-	negatif
27	0608	<i>B. megaterium</i>	-	-	negatif
28	2523	<i>B. thuringensis</i>	-	-	negatif
29	2503	<i>B. thuringensis</i>	-	-	negatif
30	2536	<i>B. thuringensis</i>	-	-	negatif
31	2546	<i>B. thuringensis</i>	+	-	negatif
32	A/1/05	<i>B. mycoides</i>	-	-	negatif
33	A/2/05	<i>B. firmus</i>	-	-	negatif
34	A/3/05	<i>B. pumilus</i>	-	-	negatif
35	A/4/05	<i>B. licheriformis</i>	-	-	negatif

Tabel 1. (lanjutan)

36	A/5/05	<i>B. steorothermophilus</i>	-	-	negatif
37	A/6/05	<i>B. subtilis</i>	-	-	negatif
38	A/7/05	<i>L. plantarum</i>	-	-	negatif
39	A/8/05	<i>L. sporogenes</i>	-	-	negatif
40	A/9/05	<i>L. acidophilus</i>	-	-	negatif
41	A/2/08	<i>B. cereus</i> 1	-	-	negatif
42	B/2/08	<i>B. subtilis</i>	-	-	negatif
43	B2562	<i>B. pumilus</i>	-	-	negatif
44	B2566	<i>B. subtilis</i>	-	-	negatif
45	B2574	<i>B. sphaericus</i>	-	-	negatif
46	B2565	<i>B. mesentericus</i>	-	-	negatif
47	B2561	<i>B. pumilus</i>	-	-	negatif
48	B2560	<i>B. licheniformis</i>	-	-	negatif
49	B2564	<i>B. shaericus</i>	-	-	negatif
50	B2563	<i>B. sphaericus</i>	-	-	negatif
51	B2559	<i>B. firmus</i>	-	-	negatif
52	B2556	<i>B. mycoides</i>	-	-	negatif
53	B2557	<i>B. pumilus</i>	-	-	negatif
54	B2558	<i>B. subtilis</i>	-	-	negatif
55	B2186	<i>B. cereus</i>	-	-	negatif

Dari Tabel 1, diperoleh sensitifitas dari uji CW-DFA 100%, dan spesifisitasnya adalah 93,5%. Sementara itu, untuk uji CAP-DFA *B. anthracis*, diperoleh sensitifitas dan spesifitas 100%, karena uji ini hanya mendeteksi kapsul dari *B. anthracis*, sedangkan bakteri Gram positif lainnya menunjukkan hasil negatif. Jadi untuk uji CAP-DFA tidak ditemukan adanya negatif palsu atau positif palsu. Dalam hal ini tentunya jumlah isolat yang diuji mempengaruhi penilaian spesifisitas dan sensitifitas. Jumlah isolat yang banyak akan lebih mencerminkan nilai yang lebih tepat. Dalam penelitian ini hanya diperoleh untuk diuji sebanyak 24 isolat *B. anthracis*. *B. anthracis* ini berasal dari berbagai kasus yang terjadi di Indonesia. Hasil pengujian dengan DFA menunjukkan bahwa telah dikonfirmasi seluruh isolat *B. anthracis* yang diperiksa adalah *B. anthracis*. Hasil pengujian dari sampel *B. anthracis* yang dicampur dengan bakteri Gram positif lainnya tetap menunjukkan bahwa *B. anthracis* tetap dapat dideteksi dengan cepat dan tepat, tanpa terganggu oleh bakteri Gram positif lain ataupun material lain. Hal ini menunjukkan spesifisitas uji DFA (terutama CAP-DFA) yang cukup tinggi.

Semua isolat *B. anthracis* menunjukkan hasil positif pada DFA *B. anthracis*. Dari 31 isolat non *B. anthracis*, dua isolat *B. thuringensis* memberikan hasil positif palsu pada uji CW-DFA, tetapi memberikan hasil negatif dalam uji CAP-DFA, sehingga diyakini bahwa isolat-isolat tersebut bukan *B. anthracis*. Tetapi untuk isolat *B. thuringensis* lain, semua menunjukkan hasil negatif. Hasil semacam ini juga dialami oleh DE *et al.*, (2002). Dalam pengujian dengan DFA, untuk konfirmasi isolat *B. anthracis* yang patogen, harus dilakukan uji DFA dari 2 komponen, yaitu uji yang mendeteksi dinding sel dan kapsul dari *B. anthracis*. Hanya isolat *B. anthracis* yang positif dalam kedua macam uji tersebut (DE *et al.*, 2002; HOFFMASTER *et al.*, 2002). Dalam penggunaan DFA, ada satu isolat *B. anthracis* yaitu Sterne strain (34F2), yang tidak mempunyai kapsul, tetapi dapat membentuk spora. Spora tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.

Uji DFA telah dikenal dan digunakan untuk mengidentifikasi secara cepat kultur bakteri dan secara langsung mendeteksi penyakit bakterial dari spesimen yang berasal dari berbagai organ hewan yang terinfeksi. Penggunaan teknik ini secara luas sangat tergantung

pada kemampuan konjugat untuk dapat secara sensitif dan spesifik mendeteksi mikroorganisme yang dimaksud dan mengidentifikasinya sebagai penyebab penyakit. Dari hasil uji ternyata diperoleh nilai sensitifitas dan spesifisitas uji yang sangat baik. Kecepatan hasil uji dalam kasus antraks sangat penting karena hal ini berperan dalam tindak lanjut penanganan kasus antraks yang sangat memerlukan kecepatan karena penyakit ini dapat bersifat sangat akut (TURNBULL *et al.*, 1998).

KESIMPULAN DAN SARAN

Uji DFA dengan menggunakan komponen dinding sel dan kapsul telah digunakan untuk mengkonfirmasi *B. anthracis* dan mendeteksi *B. anthracis* dari sampel lapangan. Uji tersebut menggunakan 2 macam konjugat yang dilabel FITC, yaitu konjugat antibodi spesifik terhadap polisakarida-*peptidoglycan* dinding sel dan konjugat antibodi spesifik terhadap *capsular* PGA *B. anthracis*. Kesimpulan bahwa hasil identifikasi adalah *B. anthracis* diperoleh jika kedua uji, yaitu CW-DFA (DFA terhadap dinding sel) dan CAP-DFA (DFA terhadap kapsul) menunjukkan hasil positif. Sebanyak 55 isolat bakteri Gram positif yang terdiri atas 24 isolat *B. anthracis* dan 31 isolat non *B. anthracis* dari berbagai sumber telah diuji, dan *B. anthracis* dapat dideteksi dengan baik. Uji DFA dengan menggunakan 2 macam komponen dinding sel dan kapsul ternyata sensitif, spesifik dan dapat merupakan uji konfirmasi untuk identifikasi *B. anthracis*.

DAFTAR PUSTAKA

- BARROW, G.I. and R.K.A. FELTHAM. 2003. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press. Cambridge, USA.
- BRADFORD, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL and PREVENTION (CDC). 2002. Approved tests for the detection of *Bacillus anthracis* in the laboratory response network (LRN). [http://www.bt.cdc.gov/Documents App/Anthrax/ApprovedLRNTest.asp](http://www.bt.cdc.gov/Documents/App/Anthrax/ApprovedLRNTest.asp).
- COGNE, R., N.E. STARES, M.N. JONES, J.E. BOWEN, P.C.B. TURNBULL and J.M. BOEUFGRAS. 1996. Identification of *Bacillus anthracis* using the API 50 CHB system. *Salisbury Medical Bulletin*. Special supplement no. 87. (Proceedings of the International Workshop on Anthrax, Winchester, England, September 19-21, 1995).
- CHOUDRURY, B., C. LEOFF, E. SAILE, P. WILKINS, C.P. QUINN, E.L. KANNENBERG and R.W. CARLSON. 2006. The structure of the major cell wall polysaccharide of *Bacillus anthracis* is species specific. *J. Biol. Chem.* 10: 1074.
- DE, B.K., S.L. BRAGG, G.N. SANDEN, K.E. WILSON, L.A. DIEM, C.K. MARSTON, A.R. HOFFMASTER, G.A. BARNETT, R.S. WEYANT, T.G. ABSHIRE, J.W. EZZELL and T. POPOVIC. 2002. Two component Direct Fluorescent Antibody Assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1060-1065.
- DEPARTEMEN KESEHATAN R.I. 2003. Pedoman Tata laksana Kasus dan Pemeriksaan Laboratorium Penyakit Antraks di Rumah Sakit. Dirjen Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan. DEPKES R.I.
- EKWUNIFE, F.S., J. SINGH, K.G. TAYLOR and R.J. DOYLE. 1991. Isolation and purification of cell wall polysaccharide of *Bacillus anthracis* (delta Sterne). *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 257-262.
- EZZELL, J.W. and T.G. ABSHIRE. 1988. Immunological analysis of cell associated antigens of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 56: 349-356.
- EZZELL, J.W., T.G. ABSHIRE, S.F. LITTLE, B.C. LIDGERDING and C. BROWN. 1990. Identification of *B. anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall galactose-N-acetylglucosamine polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 28: 223-231.
- FOUET, A., S. MESNAGE, E. TOSI-COUTURE, P. GOUNON and M. MOCK. *Bacillus anthracis* surface: capsule and S layer. 1999. *J. Appl. Microbiol.* 87: 251-255.
- GREEN, B.D., L. BATISTI, T.M. KOEHLER, C.B. THORNE and B.E. IVINS. 1985. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 49: 291-297.
- MAY, R.J., D.O. BEENHOUWER and M.D. SCHARFF. 2003. Antibodies to keyhole limpet hemocyanin cross react with an epitope on the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* and other carbohydrates: implications for vaccine development. *J. Immunol.* 171: 4905-4912.
- HELGASON, E., D. OLKSTAD, H. CAUGANT, A. JOHANSEN, M. FOUET and M. MOCK. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*- one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ. Microbiol.* 66: 2627-2630.
- HOFFMASTER, A. C. FITZGERALD, E. RIBOT, L. MEYER and T. POPOVIC. 2002. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak., United States. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1111-1116.
- LEMAIRE, M., H. OHAYON, P. GOUNON, T. FUJINO and P. BEGUIN. 1995. OlpB, a new outer layer protein of *Clostridium thermocellum*, and binding of its S-layer-like domains to components of the cell envelope. *J. Bacteriol.* 177: 2451-2459.
- MESNAGE, S., T. FONTAINE, T. MIGNOT, M. DELEPIERRE, M. MOCK and A. FOUET. 2000. Bacterial SLH domain proteins are noncovalently anchored to the cell surface via a conserved mechanisms involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J.* 19: 4473-4484.

- PHILLIPS, A.P. and J.W. EZZELL. 1989. Identification of *Bacillus anthracis* by polyclonal antibodies against extracted vegetative cell antigens. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 419-432.
- POPOV, S.G., R. VILASMIL, J. BERNARDI, E. GRENE, J. CARDWELL, T. POPOVA, A. WU, D. ALIBEK, C. BAILEY and K. ALIBEK. 2002. Effect of *Bacillus anthracis* lethal toxin on human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Letters*. 527: 211-215.
- RHIE, G E., M.H. ROEHRI, M. MOUREZ, R.J. COLLIER, J.J. MEKALANOS and J.Y. WANG. 2003. A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins. *PNAS*. 100: 10925-10930.
- ROBINSON, A., G.H. FARRAR and C.N. WIBLIN. 1996. Vaccine Protocols. Humana Press, New Jersey. pp. 111-119.
- SIREGAR, E.A. 2002. Antraks: sejarah masa lalu, situasi pada saat ini, sejarah diagnosa dan kecenderungan perkembangan ilmu di masa depan. Simposium sehari Penyakit Antraks: Antraks di Indonesia, masa lalu, masa kini dan masa depan. Balitvet, Bogor, 17 Juli 2002.
- TODAR, K. 2004. *Bacillus anthracis* and *anthrax*. Todar's online textbook of bacteriology. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/Anthrax.html>
- TURNBULL, P.C.B., R. BOHM, O. COSIVI, M. DOGANAY, M.E. HUGH JONES, D.D. JOSHI, M.K. LALITHA and V. DE VOS. 1998. Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals. 3rd Edition. Departement of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization.