

Inaktifasi *Bacillus anthracis* dengan Iradiasi Sinar Gamma

L. NATALIA¹, A. PRIADI¹ dan Z. IRAWATI²

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. Martadinata 30, Bogor 16114

²Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN. Jl Lebak Bulus Raya no. 49 Lebak Bulus, Jakarta 12440

(Diterima dewan redaksi 6 Agustus 2009)

ABSTRACT

NATALIA, L., A. PRIADI and Z. IRAWATI. 2009. Inactivation of *Bacillus anthracis* by Gamma irradiation. *JITV* 14(3): 244-251.

The use of *Bacillus anthracis* as a biological weapon heightened awareness of the need for validated methods for the inactivation of *B. anthracis* spores. Ionizing radiation is capable of causing a variety of chemical changes and biological effects on bacteria which can be due both to direct interactions with critical cell components and to indirect actions on bacteria by molecular entities formed as a result of radiolysis of other molecules in the bacterial cell. This study determined the gamma irradiation dose for inactivating *B. anthracis* spores and its biological effects on the bacterial characteristics. Gamma irradiation was conducted at the IRKA irradiator at the National Nuclear Energy Agency, Jakarta and cobalt-60 was used as the source of ionizing radiation (capacity of ca. 134,044 Kci). Freeze dried culture of *B. anthracis* in glass ampoules was irradiated using variable doses of 30, 20 and 10 KGy. Viability, biochemical and protease enzyme characteristics of *B. anthracis* were evaluated before and after irradiation. The ability of *B. anthracis* to degrade gelatin, haemoglobin and bovine immunoglobulin G was also tested. The results showed that ionizing radiation was able to inactivate or kill $11,05 \times 10^8$ cfu *B. anthracis* by 95.37%, 99.58% and 99.99 at respective doses of 10, 20 and 30 KGy. Bacterial spores appear to be less susceptible to irradiation than the vegetative cells, because of their specific structure. The survive spores irradiated at 30kGy shows some biochemical characteristic changes. The survivors failed to degrade methyl α -D-glucopyranoside and arbutine. The ability of *B. anthracis* protease to degrade gelatin, haemoglobin and bovine immunoglobulin G was not affected by irradiation. These findings showed that a gamma irradiation at 30 KGy effectively inactivates *B. anthracis* spores without changing the protease activities.

Key words: Gamma Irradiation, *B. anthracis* Characters, Protease

ABSTRAK

NATALIA, L., A. PRIADI dan Z. IRAWATI. 2009. Inaktifasi *Bacillus anthracis* dengan iradiasi sinar Gamma. *JITV* 14(3): 244-251.

Penggunaan *Bacillus anthracis* sebagai senjata biologis telah meningkatkan kewaspadaan terhadap perlunya metode yang sudah divalidasi untuk inaktifasi spora *B. anthracis*. Radiasi ionisasi mampu menyebabkan berbagai perubahan kimia dan efek biologis pada bakteri, yang dapat disebabkan karena interaksi langsung dengan komponen penting sel dan interaksi tidak langsung pada bakteri dengan adanya bahan molekuler yang terbentuk sebagai akibat radiolysis dari molekul lainnya di dalam sel bakteri. Dalam penelitian ini, ditentukan dosis iradiasi gamma untuk melakukan inaktifasi terhadap spora *B. anthracis* dan pengaruh biologisnya terhadap karakter bakteri tersebut. Iradiasi sinar gamma dilakukan pada irradiator IRKA pada Badan Tenaga Nuklir Nasional, Jakarta. Cobalt-60 digunakan sebagai sumber radiasi ionisasi (kapasitas sumber 134,044 Kci). Kultur kering beku *B. anthracis* dalam ampul gelas diradiasi dengan menggunakan berbagai dosis (30, 20 dan 10 KGy). Viabilitas, sifat biokimiawi, dan karakter enzim protease *B. anthracis* dievaluasi sebelum dan sesudah radiasi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa radiasi ionisasi mampu menginaktifasi atau membunuh *B. anthracis*, sesuai dengan dosis tertentu yang diabsorpsi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa radiasi ionisasi mampu menginaktifasi atau membunuh $11,05 \times 10^8$ cfu *B. anthracis* sebesar 95,37%, 99,58% dan 99,99% pada masing-masing dosis 10, 20 dan 30 kGy. Spora bakteri kelihatannya kurang peka terhadap iradiasi dibanding sel vegetatif, karena strukturnya. Iradiasi pada 30 kGy mampu mengubah sifat biokimiawi *B. anthracis*. Bakteri yang bertahan dari iradiasi tidak mampu mendegradasi methyl α -D-glucopyranoside dan arbutine. Aktifitas protease *B. anthracis* mendegradasi gelatin, hemoglobin dan imunoglobulin G sapi tidak dipengaruhi oleh iradiasi. Dapat disimpulkan bahwa iradiasi sinar gama pada 30kGy dapat menginaktifasi spora *B. anthracis* tanpa menimbulkan perubahan pada aktifitas proteasenya.

Kata kunci: Iradiasi Gama, Karakter *B. anthracis*, Protease

PENDAHULUAN

Penggunaan *Bacillus anthracis* sebagai senjata biologis telah meningkatkan kewaspadaan kita terhadap bahaya yang dapat ditimbulkannya. Berbagai cara telah

dilakukan untuk dapat membunuh spora *Bacillus anthracis*, bakteri penyebab penyakit antraks (WHITNEY, et al., 2003; ISHIZAKI et al., 1986; CURRIER et al., 2001). Aktifitas bahan sporisidal untuk *B. anthracis* dipengaruhi konsentrasi, lama kontak,

kelembaban, temperatur dan pH. Uap panas, pemanasan kering, pemakaian berbagai bahan kimia (seperti kalsium hipoklorida, H₂O₂, NaOCl, *formaldehyde*), penggunaan gas (seperti *ethylene oxide*, *chlorine dioxide*, *ozone*, *propylene oxide*) juga dapat membunuh spora *B. anthracis* dalam jumlah tertentu. Penggunaan *formaldehyde* (CH₂O) sudah dilakukan sejak tahun 1880 untuk mendekontaminasi *biologic safety cabinets* dan laboratorium, untuk fumigasi dan sebagainya (TOKARS *et al.*, 1997; MUNRO, 1999). Tetapi kemungkinan peranan *formaldehyde* sebagai bahan karsinogenik telah membatasi penggunaannya meskipun pengaruh buruknya telah dicoba untuk dinetralkan dengan amonium bikarbonat (WHITNEY *et al.*, 2003).

Sterilisasi dan sanitisasi dengan menggunakan sinar gama telah dilakukan puluhan tahun yang lalu untuk berbagai aplikasi. HORNE *et al.* (1959) menyarankan penggunaan dosis 1,5 sampai 2 megarads (sama dengan 15 - 20 kGy) dengan menggunakan sumber *cobalt* 200.000 rad/jam untuk membunuh spora yang sangat resisten dalam bulu domba. Iradiasi dengan menggunakan sinar gama telah digunakan sejak tahun 1960an untuk mendesinfeksi bulu domba import yang diduga tercemar *B. anthracis* (WHITNEY *et al.*, 2003). Penggunaan iradiasi gama untuk mendekontaminasi surat pos telah dilakukan setelah banyaknya ancaman bioterrorisme dengan menggunakan spora *B. anthracis* yang dimasukkan dalam surat pos (WHITNEY *et al.*, 2003). Pada dosis medium 20, 25, 30 kGy, sinar gama dapat digunakan untuk sterilisasi alat-alat kesehatan sekali pakai (seperti *disposable syringe*), makanan, kosmetik dan kemasan *pharmaceutical*.

Dalam penelitian ini akan diamati pengaruh besaran dosis iradiasi sinar gama terhadap *B. anthracis*. Dari hasil pengamatan akan dapat diperoleh gambaran mengenai kegunaan sinar gamma untuk menginaktivasi *B. anthracis* dan juga pengaruhnya terhadap perubahan karakter *B. anthracis* yang masih bertahan hidup setelah proses iradiasi sinar gama.

MATERI DAN METODA

Bakteri *B. anthracis strain* 34F2 (Sterne) digunakan dalam penelitian ini. Mula-mula, *B. anthracis* ditumbuhkan pada *Brain Heart Infusion* (BHI) broth medium untuk selanjutnya ditumbuhkan kembali pada media agar darah, dan diinkubasikan semalam pada suhu 37°C. Koloni bakteri yang tumbuh dipanen dalam media *glucose serum* (7% *glucose* dalam *foetal calf serum*) dan dihomogenkan. Sebanyak 0,2 ml suspensi kultur tersebut dimasukkan ke dalam tiap ampul gelas steril, siap dikeringbekukan. Setelah proses kering beku, maka diperoleh kultur *B. anthracis* dalam ampul gelas berkondisi vakum yang siap diiradiasi.

Iradiasi sinar gama dilakukan pada irradiator IRKA pada Badan Tenaga Nuklir Nasional, Jakarta. Cobalt-60 digunakan sebagai sumber radiasi ionisasi (kapasitas sumber 134,044 Kci). Dosis yang digunakan untuk iradiasi adalah 10 kGy, 20 kGy dan 30 kGy. Untuk tiap dosis iradiasi digunakan 4 ampul kultur kering beku. Sebagai kontrol yang tidak diiradiasi, digunakan 4 ampul kultur kering beku *B. anthracis*. Viabilitas, sifat biokimiawi, dan karakter enzim protease *B. anthracis* dievaluasi sebelum dan sesudah radiasi.

Pengaruh dosis iradiasi terhadap viabilitas dan sifat biokimiawi *B. anthracis*

Viabilitas *B. anthracis* diuji dengan membandingkan daya hidup kultur kering beku *B. anthracis* yang sudah diiradiasi dengan dosis tertentu dengan kultur yang tidak diiradiasi pada media agar darah dan *Brain Heart Infusion* (BHI) broth. Pengenceran kultur dilakukan dengan menggunakan *peptone water*. Kemudian dilakukan penghitungan sesuai metoda *total plate count* (TPC) dengan ulangan sebanyak 3 kali. Sifat biokimiawi *B. anthracis* sebelum dan sesudah iradiasi pada dosis 30 kGy dilakukan dengan menggunakan API 50 CHB (Biomérieux, France).

Deteksi protease pada media milk agar dengan menggunakan *tannic acid* (SARAN *et al.*, 2007)

Skrining dilakukan dengan menggunakan *milk agar plate*. Dua macam *milk agar* diuji dalam pengamatan ini. Media 1 mengandung 5,0 g *skim milk powder* dalam 200 ml aquades, yang kemudian ditambahkan 11,25 g *plate count agar* dan dipanaskan sampai mendidih. Media 2. *milk agar* dibuat dengan melarutkan 5,0 g *tryptone/peptone*, 2,5 g *yeast extract*, 1,0 g *dextrose*, 10,0 g *skim milk powder*, dan 12,5 g agar untuk mendapatkan 1 liter media. Panaskan sambil dicampur dan dididihkan selama 1 menit sampai semua melarut sempurna. Terhadap kedua macam media dilakukan *autoclave* 121 °C selama 15 menit, dan dituangkan ke dalam *petri dish* steril. Larutan 10% *tannic acid* dibanjeri pada *milk agar plate* setelah ke dua macam media diinokulasi *B. anthracis strain* 34F2 dan diinkubasi untuk mengamati *zone hydrolysis*. *Tannic acid* akan meningkatkan intensitas warna karena akan meningkatkan presipitasi protein yang tidak terhidrolisa dalam *plate*, sehingga memperbaiki kontras antara *zone intact* dan *zone lysis protease* dari substrat.

Deteksi protease ekstraseluler dari *B. anthracis* pada media agar (VERMELHO *et al.*, 1996)

Medium yang digunakan untuk deteksi protease ekstraseluler *B. anthracis* adalah: Media A: 5% (w/v)

BHI dan 1,5% w/v agar, dan Media B : 2% (w/v) *sucrose*, 0,5% w/v *yeast extracts*, 2% w/v *peptone*, 2% w/v KCl dan 1,5% w/v agar. Untuk deteksi protease yang dihasilkan *B. anthracis* pada media dengan gelatin, maka terhadap media A atau B tersebut ditambahkan 1% w/v gelatin dan diautoclaf. Untuk deteksi protease yang dihasilkan *B. anthracis* pada media dengan hemoglobin, dipersiapkan medium yang mengandung 1% hemoglobin (dibuat dari larutan stok 1 g hemoglobin dalam 50 ml aquades). Larutan stok hemoglobin diautoclaf, dan didinginkan sampai 50°C dan ditambahkan dalam proporsi yang sama ke medium steril A atau B. Medium ini mempunyai pH 7,0. Sebanyak 20 ml media kultur A atau B yang sudah disuplementasi dengan gelatin, atau hemoglobin, dituangkan ke dalam Petri *dish* dan dibiarkan membeku. Satu *loop* kultur ditaruh di tengah-tengah media agar. Setelah inokulasi, dilakukan inkubasi pada suhu 37°C dan diamati setiap hari.

Untuk gelatin, deteksi ekstraseluler protease dilakukan setelah pewarnaan *Coomassie blue* (0,25% w/v) dalam *methanol-acetic acid-water* 5:1:4 (v/v/v) dapat juga digunakan. Aktifitas enzim dideteksi sebagai area jernih, yang menunjukkan terjadinya *hydrolysis* dari *substrate* telah terjadi. Untuk hemoglobin, deteksi protease ekstraseluler langsung dapat dilihat pada agar plate setelah pewarnaan *Coomassie blue*. Aktifitas protease dinilai negatif jika tidak ada *zone halo*. Nilai positif jika ada proteolisis yang dibatasi 1-2 mm disekitar koloni, atau nilai positif kuat (++) jika *zone* proteolisis lebih dari 2 mm dari tepi koloni.

Deteksi degradasi immunoglobulin G oleh protease *B. anthracis* dengan *Thin layer Enzyme Assay (TEA) Cultivation Technique*. (WIKSTROM, *et al.*, 1984.)

Bovine immunoglobulin G diadsorb dari bentuk larutan (0,1 mg/ml) pada permukaan *polysterene* Petri *dish* (Nunc). Permukaannya dicuci dan dikeringkan pada suhu kamar. Agar darah (5% sel darah merah domba) kemudian dimasukkan dalam Petri *dish* yang sudah dilapisi immunoglobulin. *B. anthracis* ditumbuhkan pada agar medium pada 36°C selama semalam. *Enzyme* yang dihasilkan bakteri selama pertumbuhan akan mencapai immunoglobulin G pada permukaan Petri *dish* dengan cara difusi. Setelah *B. anthracis* diinkubasi pada 36°C semalam dengan kandungan udara 10% CO₂, agar darah disingkirkan dari Petri *dish*, dicuci dan dikeringkan. Enzim/protease *B. anthracis* akan bereaksi dengan bagian immunoglobulin yang melapisi permukaan *polystyrene*. Daya pembasahan (*wettability*) akan menurun pada bagian protease yang bereaksi dengan immunoglobulin dibandingkan bagian yang tidak bereaksi. Perbedaan *wettability* akan dapat diperlihatkan dengan kondensasi uap air pada permukaan selama 1 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Telah banyak penelitian yang menyatakan bahwa iradiasi merupakan proses yang mampu menginaktivasi berbagai tipe mikroorganisme dan spora bakteri yang umumnya sangat resisten terhadap berbagai cara sterilisasi (RUSSEL *et al.*, 1999, DAUPHIN *et al.*, 2008). Berbagai metode inaktivasi yang dijelaskan oleh SPOTTS WHITNEY (2003) menyebutkan bahwa iradiasi sinar gamma merupakan metoda yang dapat digunakan untuk menginaktivasi spora *B. anthracis*. HORNE *et al.*, (1959) menyatakan dosis 1,5 x 10⁶ rads atau 15 kGy dibutuhkan untuk menginaktivasi spora *B. anthracis* sejumlah 10⁶ spora/ml. Sedangkan DANG *et al.*, (2001) menyatakan 2,0 x 10⁶ sampai 2,24 x 10⁶ rads (atau 20 kGy sampai 22,4 kGy) cukup untuk menginaktivasi *B. anthracis* pada konsentrasi 10⁸ CFU/ml. Hasil penelitian DAUPHIN *et al.*, (2008) menunjukkan *B. anthracis* dalam konsentrasi 10⁷ CFU/ml yang diekspos dengan sinar gamma dengan dosis 25 kGy akan menurunkan 6 log viabilitas sporanya.

Terlihat pada Tabel 1, bahwa dosis 30kGy belum dapat membunuh seluruh (100%) bakteri yang diiradiasi (11,05 x 10⁸ CFU). Tetapi 99,99% keseluruhan *B. anthracis* sudah terbunuh dengan dosis 30 kGy. Jadi hasil yang diperoleh tidak berbeda jauh dengan penelitian-penelitian sebelumnya. Karena jumlah *B. anthracis* yang digunakan dalam penelitian ini lebih tinggi dibanding jumlah bakteri yang digunakan peneliti-peneliti lain yang disebutkan di atas, maka dosis iradiasi yang dibutuhkan juga akan lebih tinggi.

Dari hasil pemeriksaan biokimiawi terhadap kultur *B. anthracis* 34F2 sebelum dan sesudah iradiasi, terlihat adanya perubahan pada media *methyl-α-D glucopyranoside* dan *Arbutine* (Tabel 2.) Terlihat bahwa proses iradiasi tersebut telah merubah karakter biokimiawi dari *B. anthracis*. Hal serupa telah dinyatakan oleh DIEHL (1990) bahwa morfologi, biokimiawi atau sifat dalam uji serologi dapat berubah setelah proses iradiasi. Walaupun ada beberapa perubahan karakter biokimiawi, tetapi dengan API 50 CHB (Biomérieux, France) masih dapat diidentifikasi bahwa kultur yang diperiksa adalah *B. anthracis*.

Deteksi protease ekstraseluler dari *B. anthracis* pada media *milk agar* dapat dilihat pada Gambar 1. Pengamatan menunjukkan bahwa besarnya dosis iradiasi atau proses iradiasi tidak menurunkan kadar protease yang dihasilkan oleh *B. anthracis*. Adanya *zone* bening disekitar kultur *B. anthracis* menunjukkan aktifitas proteolisis dari protease yang dihasilkan *B. anthracis*.

Pada Gambar 2 terlihat kemampuan protease *B. anthracis* untuk menghidrolisis gelatin. Proses iradiasi dan berbagai dosis iradiasi juga tidak terlihat berpengaruh terhadap kemampuan untuk menghidrolisis gelatin. Gelatin yang merupakan

Tabel 1. Pengaruh berbagai dosis iradiasi sinar gama terhadap jumlah koloni *B. anthracis* (rata-rata dari 3 kali ulangan)

	Sebelum iradiasi	Sesudah iradiasi		
		10 kGy	20 kGy	30 kGy
Jumlah koloni <i>B. anthracis</i> (cfu/ampul)	11,05 x 10 ⁸	51,20 x 10 ⁶	46,20 x 10 ⁵	10,65 x 10 ³
Penurunan jumlah koloni <i>B. anthracis</i> (%)		95,37	99,58	99,99

Tabel 2. Hasil uji biokimiawi *B. anthracis* 34F2, sebelum dan sesudah proses iradiasi dengan dosis 30 kGy menggunakan API 50 CHB

No	Media	Tidak diiradiasi	Iradiasi 30kGy	No	Media	Tidak diiradiasi	Iradiasi 30kGy
1	<i>Glycerol</i>	-	-	26	<i>Salicine</i>	-	-
2	<i>Erythritol</i>	-	-	27	<i>D- cellobiose</i>	+	+
3	<i>D-arabinose</i>	-	-	28	<i>D- maltose</i>	+	+
4	<i>L-arabinose</i>	-	-	29	<i>D- lactose</i>	-	-
5	<i>D-ribose</i>	+	+	30	<i>D- melibiose</i>	-	-
6	<i>D-xylose</i>	-	-	31	<i>D- saccharose</i>	+	+
7	<i>L-xylose</i>	-	-	32	<i>D- trehalose</i>	+	+
8	<i>Adonitol</i>	-	-	33	<i>Inuline</i>	-	-
9	<i>Methyl β D xylopyranoside</i>	-	-	34	<i>D- lezitose</i>	-	-
10	<i>D- galactose</i>	-	-	35	<i>D- raffinose</i>	-	-
11	<i>D- glucose</i>	+	+	36	<i>Amidon</i>	-	-
12	<i>D- fructose</i>	+	+	37	<i>Glycogene</i>	-	-
13	<i>D- mannose</i>	-	-	38	<i>Xylitol</i>	-	-
14	<i>L- sorbose</i>	-	-	39	<i>Gentibiose</i>	-	-
15	<i>Rhamnose</i>	-	-	40	<i>D-turanose</i>	-	-
16	<i>Dulcitol</i>	-	-	41	<i>D-lyxose</i>	-	-
17	<i>Inositol</i>	-	-	42	<i>D- Tagatose</i>	-	-
18	<i>D- Mannitol</i>	-	-	43	<i>D- fucose</i>	-	-
19	<i>D- Sorbitol</i>	-	-	44	<i>L- fucose</i>	-	-
20	<i>Methyl-α-D mannopyranoside</i>	-	-	45	<i>D- arabitol</i>	-	-
21	<i>Methyl-α-D glucopyranoside</i>	+	-	46	<i>L- arabitol</i>	-	-
22	<i>N acetyl glucosamine</i>	+	+	47	<i>Potasium gluconate</i>	-	-
23	<i>Amygdaline</i>	-	-	48	<i>Potassium 2 cetogluconate</i>	-	-
24	<i>Arbutine</i>	+	-	49	<i>Potassium 5 cetogluconate</i>	-	-
25	<i>Esculine</i>	+	+				

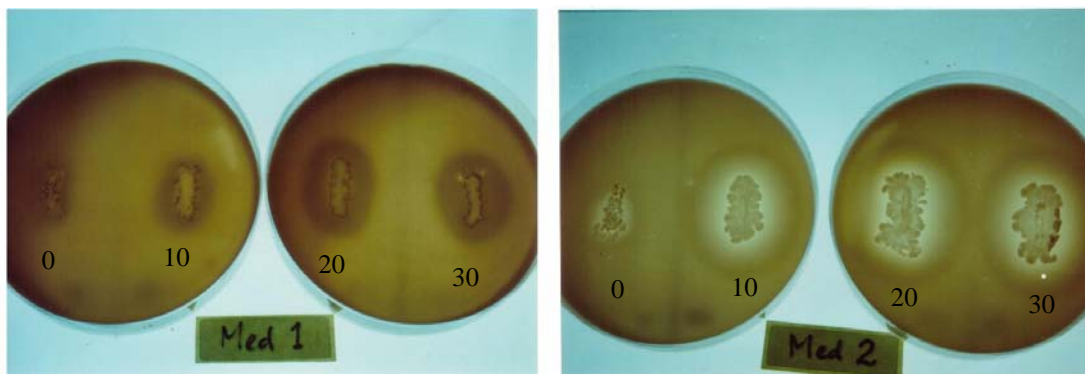
kolagen tipe 1 merupakan substrat yang dapat menginduksi dihasilkannya protease. Kemungkinan gelatin yang merupakan protein dengan berat molekul tinggi menginduksi peningkatan produksi protease untuk mendegradasi substrat menjadi bentuk yang dapat dimanfaatkan oleh bakteri (VERMELHO *et al.*, 1996; GRUBB, 1994). Uji dengan menggunakan gelatin sebagai substrat merupakan suatu *assay* kualitatif, sederhana, ekonomis, dan langsung menunjukkan adanya aktifitas proteolitik dari suatu koloni bakteri.

Dalam pengamatan (Gambar 3.), terlihat bahwa media A atau BHI (yang mengandung 1,25% *calf brain infusion* 0,5% *beef heart infusion*, 1% *proteose*, 0,2% *peptone glucose* 0,5% NaCl dan 0,25% Na₂HPO₄) merupakan media yang lebih baik dibanding media B yang mengandung: 2% (w/v) *sucrose*, 0,5% w/v *yeast extracts*, 2% w/v *peptone*, 2% w/v KCl dan 1,5% w/v agar. VERMELHO *et al.* (1996) menyatakan bahwa komposisi medium yang digunakan

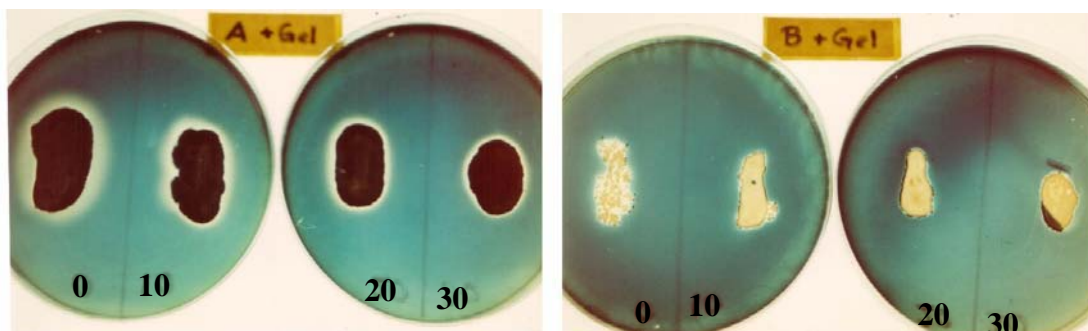
dapat mempengaruhi produksi protease ekstraseluler oleh suatu bakteri.

Proses iradiasi sinar gama ternyata tidak berpengaruh terhadap morfologi koloni *B.anthraxis* (Gambar 4). Setelah iradiasi dengan 10 kGy, 20 kGy, 30 kGy, morfologi koloni *B. anthracis* masih serupa dengan tanpa iradiasi (0 kGy). DAUPHIN *et al.* (2008) juga menyatakan bahwa proses iradiasi tidak berpengaruh nyata terhadap sensitifitas uji diagnostik seperti *real time* PCR dan ELISA. Sedangkan mekanisme iradiasi gama yang dapat merubah struktur komponen spora *B. anthracis* merupakan hal yang masih harus diteliti.

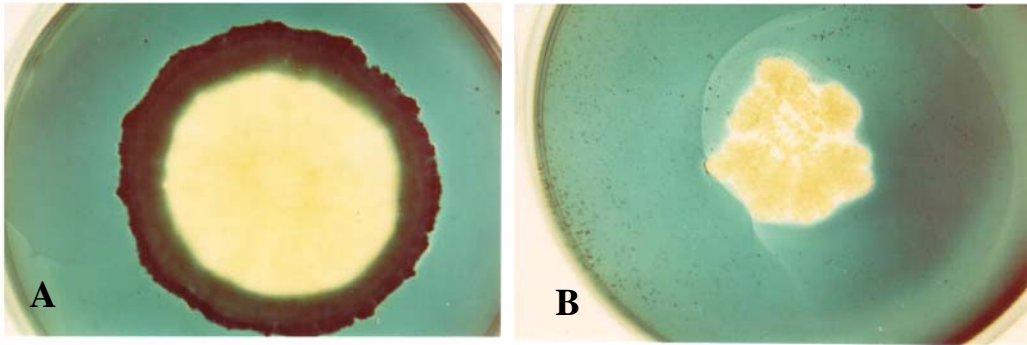
Pengujian dengan menggunakan hemoglobin (Gambar 5.) menunjukkan protease *B. anthracis* mempunyai aktifitas proteolisis terhadap hemoglobin, yang tidak menurun dengan bertambahnya dosis iradiasi. Media B memperlihatkan hasil yang lebih jelas dibanding media A



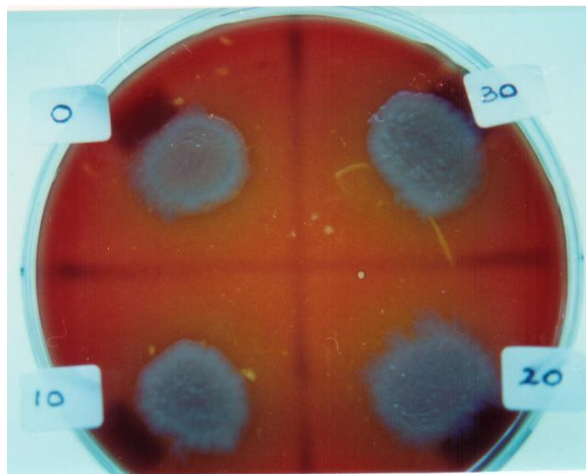
Gambar 1. Milk agar untuk deteksi protease *B. anthracis*. Media 1 dan media 2 menunjukkan perbedaan warna karena komposisi media yang berbeda. Aktifitas protease ditunjukkan dengan adanya zona disekitar kultur *B. anthracis*. Empat kultur dengan dosis iradiasi 0 kGy , 10 kGy, 20 kGy, dan 30 kGy ditumbuhkan pada media ini



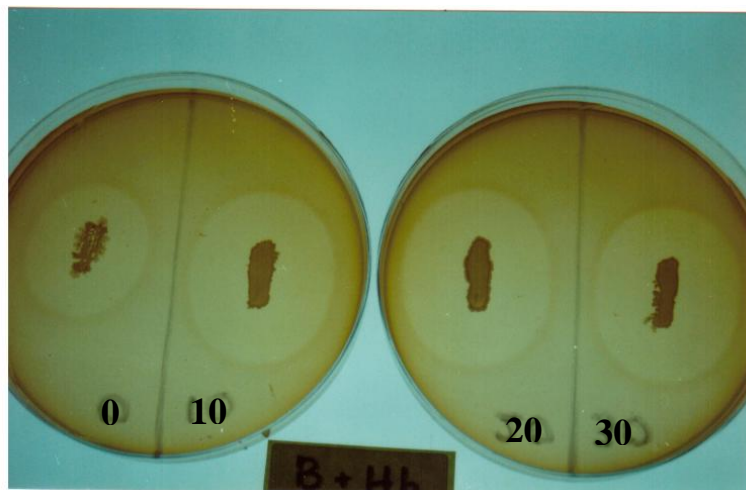
Gambar 2. Media A dan B dengan penambahan gelatin. Empat kultur dengan dosis iradiasi 0 kGy, 10 kGy, 20 kGy dan 30 kGy ditumbuhkan pada media ini. Terlihat adanya zona hidrolisis dari gelatin disekitar kultur



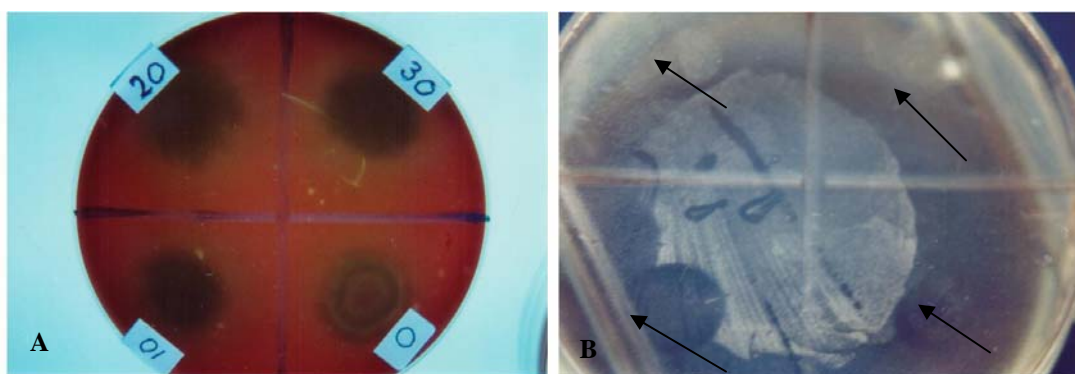
Gambar 3. Perbedaan penggunaan media A dan B untuk pertumbuhan *B. Anthracis*



Gambar 4. *B. anthracis* pada agar darah. Kultur dengan dosis iradiasi 0 kGy , 10 kGy, 20 kGy, dan 30 kGy ditumbuhkan pada media ini. Tidak terlihat perbedaan morphologi koloni yang nyata.



Gambar 5. *B. anthracis* dengan dosis iradiasi 0 kGy, 10 kGy, 20 kGy, dan 30 kGy ditumbuhkan pada media B dengan penambahan hemoglobin. Terlihat adanya zona disekitar kultur yang menunjukkan adanya proses proteolisis dari hemoglobin



Gambar 6. Degradasi immunoglobulin G (*bovine*) oleh protease *B. anthracis*. A: Dasar lempeng agar darah dengan kultur *B. anthracis* sebelum pengujian *wettability*. B: Sesudah agar darah disingkirkan dan diuji *wettability*-nya, terlihat daya pembasahan (*wettability*) dari protease bereaksi dengan bagian immunoglobulin yang melapisi permukaan *polystyrene* akan menurun (tanda panah) dibandingkan bagian yang tidak bereaksi

Protease yang dapat mendegradasi imunoglobulin merupakan enzim mikroba yang mempunyai faktor virulensi yang nyata (WIKSTROM *et al.*, 1984; NA *et al.*, 2002). Enzim/protease semacam ini dapat memfasilitasi terjadinya kolonisasi bakteri pada membran mukosa, penetrasi sel bakteri serta produk antigeniknya melalui pertahanan mukosa dengan kemampuannya mendegradasi imunoglobulin. Jadi, biasanya hanya sepsis bakteri patogen dan berhubungan erat dengan penyakit infeksius, yang dapat menghasilkan enzim yang dapat mendegradasi imunoglobulin. Aktifitas protease *B. anthracis* ini memperlihatkan potensinya sebagai faktor virulensi yang dapat memfasilitasi kolonisasi bakteri dan penetrasi sel bakteri melalui hambatan mukosa dengan merusak imunoglobulin.

Dalam penelitian ini pengujian protease yang dapat mendegradasi imunoglobulin diuji dengan *plate assay* (*TEA cultivation technique*) telah banyak digunakan, dan merupakan uji yang sensitif dan mudah dilakukan untuk melakukan skrining terhadap protease mikroba (WIKSTROM, *et al.*, 1984; WIKSTROM, 1983). Uji ini menggunakan protein yang diadsorb pada permukaan *polystyrene* (*petri dish* plastik) sebagai substrat dari enzim. Protein yang terdegradasi diperlihatkan dengan adanya kondensasi uap air. *Wettability* (daya pembasahan) dari daerah yang sudah dilapisi protein substrat, jika bereaksi dengan enzim/protease akan menurun dibanding dengan daerah protein yang tidak bereaksi dengan protease. Kegunaan indikator *wettability* untuk mengetahui adanya degradasi imunoglobulin telah dilakukan oleh ELWING dan NYGREN (1979), dengan menggunakan antibodi yang dilabel enzim peroksidase.

Bakteri yang telah diiradiasi dengan dosis *sublethal*, tetapi masih bertahan hidup, biasanya memerlukan bahan/media tumbuh yang lebih dari biasanya. Perlakuan iradiasi dapat menimbulkan kerusakan genetik yang tidak tampak nyata, sehingga enzim yang

dihasilkan dapat berkurang fungsinya atau hilang sama sekali (DIEHL, 1990). Dari penelitian ini, diperoleh *B. anthracis* yang tidak terbunuh dengan dosis iradiasi 30 kGy, tetapi ternyata proteasenya masih mampu mendegradasi gelatin, hemoglobin dan immunoglobulin G.

DAUPHIN *et al.* (2008) menyatakan bahwa iradiasi gama bahwa iradiasi gama merusak struktur spora *B. anthracis* dan dapat digunakan untuk menginaktivasi spora *B. anthracis* tanpa mengganggu sensitifitas uji diagnostik seperti *real time* PCR untuk mendeteksi target plasmid *B. anthracis* pX01 dan pXO2. Sedangkan bila dianalisa dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), iradiasi mempengaruhi deteksi spora *B. anthracis* dalam ELISA *direct* (DANG *et al.*, 2001), tetapi tidak berpengaruh terhadap limit deteksi dalam *sandwich* ELISA. Sehingga iradiasi dapat digunakan untuk mengamankan sampel yang dicurigai mengandung *B. anthracis* tanpa adanya kekhawatiran mengganggu sensitivitas uji yang akan dilakukan.

KESIMPULAN

Dari hasil pengamatan yang dilakukan ternyata iradiasi sinar gama dengan dosis 10, 20 dan 30 kGy dapat menurunkan daya hidup *B. anthracis* lebih dari 95% dari jumlah awal bakteri $11,05 \times 10^8$ cfu. Dari hasil pemeriksaan biokimiawi terhadap kultur *B. anthracis* 34F2 sebelum dan sesudah iradiasi, terlihat adanya perbedaan reaksi pada media *methyl- α -D glucopyranoside* dan *Arbutine*. Sesudah iradiasi, reaksi yang positif terhadap media tersebut berubah menjadi reaksi negatif. Walaupun demikian, hasil identifikasi API 50 CHB masih menunjukkan bahwa kultur sesudah diiradiasi adalah *B. anthracis*. Iradiasi sinar gama dengan dosis 10,20 dan 30 kGy tidak menurunkan kadar protease yang dihasilkan oleh *B. anthracis*.

Kemampuan protease dari *B. anthracis* untuk mendegradasi gelatin, hemoglobin dan IgG tidak berkurang setelah proses iradiasi sampai dosis 30 kGy. Hal ini menggambarkan bahwa virulensi *B. anthracis* tidak menurun setelah proses iradiasi dengan dosis *sublethal*.

DAFTAR PUSTAKA

- CURRIER, R., D. TORRACO, J. CROSS, G. WAGNER, P. GLADDEN and L. VANDEBERG. 2001. Deactivation of clumped and dirty spores of *Bacillus globigii*. *Ozone Sci. Engin.* 23: 285-294.
- DANG, J.L., K. HEROUX, J. KEARNEY, A. ARASTEH, M. GOSTOMSKI and P.A. EMANUEL. 2001. Bacillus spore inactivation methods affect detection assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3665-3670.
- DIEHL, J.F. 1990. Safety of irradiated foods. Marcel Dekker Inc. New York. USA. pp. 181-191.
- DAUPHIN, L.A, B.R. NEWTON, M.V. RASMUSSEN, R.F. MEYER and M.D. BOWEN. 2008. Gamma irradiation can be used to inactivate *Bacillus anthracis* spores without compromising the sensitivity of diagnostic assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4427-4433.
- ELWING, H. and H. NYGREN. 1979. Diffusion in gel enzyme linked immunosorbent assay (DIG ELISA): A simple method for quantitation of class specific antibodies. *J. Immunol. Methods.* 31: 101-107.
- GRUBB, J.D. 1994. Assay for bacterial type I collagenases. *Methods Enzymol.* 235: 602-606.
- ISHIZAKI, K., N. SHINRIKI and H. MATSUYAMA. 1986. Inactivation of *Bacillus* spores by gaseous ozone. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 49-259.
- HORNE, T., G. TURNER and A. WILLIS. 1959. Inactivation of spores of *Bacillus anthracis* by G-radiation. *Nature.* 4659: 475-476.
- MUNRO, K. 1999. A comparative study of methods to validate formaldehyde decontamination of biological safety cabinets. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 873-876.
- NA, B.K., J.H. CHO, C.Y. SONG and T.S. KIM. 2002. Degradation of immunoglobulins, protease inhibitors and interleukin-1 by a secretory proteinase of *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J. Parasitol.* 10: 93-99.
- RUSSEL, A.D., W.B. HUGO and G.A.J. AYLIFE. 1999. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 3rd Blackwell Science, Inc. Malden. M.A.
- SARAN, S., J. ISAR and R.K. SAXENA. 2007. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 697-699.
- SPOTTS WHITNEY, E.A., M.E. BEATTY, T.H. TAYLOR JR., R. WEYANT, J. SOBEL, M.J. ARDUINO and D.A. ASHFORD. 2003. Inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 623-627.
- TOKARS, J., E. MILLER, M. ALTER and M. ARDUINO. 1997. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States. *Semin Dial.* 3: 75-85.
- VERMELHO, A.B., M.N.L. MEIRELLES, A. LOPES, S.D.G. PETINATE, A.A. CHAIA and M.H. BRANQUINHA. 1996. Detection of extracellular microbial proteases on agar plates Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro, 91: 755-760
- WHITNEY, E.A.S., M.E. BEATTY, T.H. TAYLOR, R. WEYANT, J. SOBEL, M.J. ARDUINO and D.A. ASHFORD. 2003. Inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 623-627.
- WIKSTROM, M.B., 1983 Detection of microbial proteolytic activity by a cultivation plate assay in which different proteins adsorbed to a hydrophobic surface are used as substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 393-400.
- WIKSTROM, M.B., G. DAHLEN, B. KAUJER and H. NYGREN. 1984. Degradation of human immunoglobulins by proteases from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 44: 33-37.