

Proteksi Vaksin Antraks Inaktif Intranasal terhadap Infeksi *Bacillus anthracis*

ADIN PRIADI, LILY NATALIA dan RAHMAT S. ADJI

Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 6 Mei 2010)

ABSTRACT

PRIADI, A., L. NATALIA and R.S. ADJI. 2010. Protection of inactive intranasal antrax vaccine to *Bacillus anthracis* infection. *JITV* 15(2): 147-156.

Anthrax is an endemic zoonotic disease distributed in many parts of Indonesia. Although vaccination program has been implemented in many areas, cases are still frequently reported. Farmers are reluctant to vaccinate their livestock since spore vaccine used in the field often cause side effects and death of the animals. To overcome this problem, an inactive vaccine composes of *Bacillus anthracis* toxins, cell wall and capsule subunits was developed. *B. anthracis* Sterne strain (34F2) was selected to produce toxins and cell walls. Local *Bacillus anthracis* isolated from Citaringgul was used to produce capsule as the Polymerase Chain Reaction (PCR) revealed that this isolate poses *cap* gene encoding for capsule. Two vaccines compose of 15 µg toxoid, 30 µg of capsule, 15 µg of cell wall and 30 µg toxoid, 60 µg of capsule, 15 µg of cell walls were designated as vaccine I and vaccine II respectively. For each experiment, 10 mice were nasally immunized by placing 5 µl of vaccine into each nare 3 times at 2-week intervals. A group of 10 mice were unvaccinated and used as control. Blood was collected fortnightly to monitor antibody responses. All mice were challenged with 2×10^5 *B. anthracis* Sterne spores injected subcutaneously two weeks after the last vaccination. Two weeks after vaccination of antibodies to *B. anthracis* toxin, capsule and cell wall were detected in dot-blot assay. Mice that were immunised intranasally with chitosan adjuvanted vaccine developed high IgG responses in sera as detected by ELISA, and the response was dose dependent. Vaccine II gave better response than vaccine I. Vaccine I and II protected mice from challenge at a rate of 60 and 80% respectively. This results showed that intranasal *B. anthracis* vaccine composes of toxin, capsule and cell wall with chitosan as an adjuvant gave a good protection against *B. anthracis* Sterne spores challenge in mice.

Key Words: Inactive Intranasal Antrax Vaccine, Protection, *Bacillus anthracis*, Mice

ABSTRAK

PRIADI, A., L. NATALIA dan R.S. ADJI. 2010. Proteksi vaksin antraks inaktif intranasal terhadap infeksi *Bacillus anthracis*. *JITV* 15(2): 147-156.

Penyakit antraks merupakan penyakit zoonosis endemik yang tersebar di banyak daerah di Indonesia. Meskipun program vaksinasi telah diterapkan di banyak daerah, kasus penyakit antraks masih sering dilaporkan. Para peternak enggan untuk melakukan vaksinasi ternaknya karena vaksin spora yang saat ini digunakan di lapang sering memberi efek samping dan dapat menyebabkan kematian pada hewan. Untuk mengatasi hal ini, vaksin inaktif yang mengandung komponen toksin, dinding sel dan kapsul *Bacillus anthracis* telah dikembangkan. Galur *B. anthracis* Sterne (34F2) dipilih untuk menghasilkan komponen toksin dan dinding sel. Sementara itu, isolat lokal *B. anthracis*, asal Citaringgul, yang pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menunjukkan adanya gen untuk kapsul telah digunakan untuk menghasilkan komponen kapsul. Dua macam vaksin yang dikembangkan yaitu vaksin I mengandung 15 µg toksoid, 30 µg kapsul, dan 15 µg dinding sel; sedangkan vaksin II mengandung 30 µg toksoid, 60 µg kapsul, dan 30 µg dinding sel. Untuk setiap perlakuan, 10 ekor mencit dimunisasi secara intranasal dengan memasukkan 5 µl vaksin ke dalam setiap lubang hidungnya. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali dengan waktu antara 2 minggu. Satu kelompok yang terdiri atas 10 ekor mencit digunakan sebagai control dan tidak mendapatkan vaksinasi apapun. Sampel darah mencit diambil sebelum dan sesudah vaksinasi untuk pemantauan respon antibodi. Semua mencit ditantang dengan menyuntikan 2×10^5 spora *B. anthracis* Sterne secara sub kutan 2 minggu setelah vaksinasi terakhir. Dua minggu setelah vaksinasi, antibodi terhadap toksin, kapsul dan dinding sel *B. anthracis* dapat dideteksi dengan menggunakan *dot-blot assay*. Mencit yang diimunisasi menggunakan vaksin beradjuvan chitosan menunjukkan adanya respon IgG yang tinggi dalam sera dalam ELISA dan responnya tergantung pada dosis vaksin yang diberikan. Vaksin II memberikan respon yang lebih baik dibanding vaksin I. Hasil penelitian ini menunjukkan vaksin I dan II dapat melindungi mencit terhadap tantangan, yaitu memberikan tingkat proteksi 60 dan 80%. Vaksin antraks intranasal yang mengandung toksin, kapsul dan dinding sel dengan menggunakan chitosan sebagai adjuvan, memberikan proteksi yang baik pada mencit terhadap tantangan spora *B. anthracis* (34F2).

Kata Kunci: Vaksin Inaktif Intranasal, Proteksi, *Bacillus Anthracis*, Mencit

PENDAHULUAN

Penyakit antraks disebabkan *Bacillus anthracis* atau dikenal sebagai radang limpa, seringkali dijumpai di Indonesia dan menimbulkan kerugian besar akibat kematian ternak domba, kambing, sapi, dan burung unta (SIREGAR, 2002). Kematian pada manusia akibat antraks umumnya disebabkan karena terekspos atau mengkonsumsi daging yang berasal dari hewan ternak yang terinfeksi. Penyakit ini sudah endemik dan kasus terjadi setiap tahun di berbagai daerah di Indonesia.

Saat ini program pengendalian dengan vaksinasi masih menggunakan vaksin spora hidup *B. anthracis* yang pada aplikasinya sering menimbulkan efek samping berupa kematian ternak (HARDJOUTOMO *et al.*, 1993). Vaksin spora dibuat dari *B. anthracis* galur Sterne yang toksigenik, dan *nonencapsulated* pada tahun 2004, pelaksanaan vaksinasi di Desa Hargobinangun, Sleman Yogyakarta terjadi kematian 53 ekor dari 826 ekor domba pasca vaksinasi antraks (AZIS, 2004). Kejadian di daerah lain juga sering terjadi sehingga menyebabkan penolakan terhadap program vaksinasi.

Imunisasi mukosa telah lama diketahui dapat menimbulkan imunitas mukosal dan sistemik (DAVIS, 2001; MIKSZTA *et al.*, 2005). Vaksin mukosal ini diharapkan cukup efektif dalam pencegahan atau pengendalian penyakit antraks pada ternak di Indonesia. Aplikasi vaksin mukosa dengan *nasal spray* akan memberikan keuntungan karena pelaksanaan vaksinasi yang mudah, tidak memerlukan jarum suntik, dan bebas dari efek samping karena tidak menggunakan spora hidup *B. anthracis*.

Saat ini penelitian vaksin antraks sudah mengarah ke aplikasi vaksin. Vaksin antraks dengan aplikasi *intranasal spray* telah banyak diteliti dan memberikan hasil yang baik pada uji coba dengan hewan percobaan (SLOAT dan CUI, 2006; BIELINSKA *et al.*, 2007; WIMER-MACKIN *et al.*, 2006; XU dan ZENG, 2008). Berbagai komposisi vaksin mukosal antraks juga telah diteliti. BIELINSKA *et al.* (2007) dan BOYAKA *et al.* (2003) mengembangkan vaksin mukosal yang mengandung *protective antigen B. anthracis* (PA), WIMER-MACKIN *et al.* (2006) meneliti vaksin mukosal yang mengandung kapsul *B. anthracis*. Vaksin mukosal yang mengandung toksin dan *bacilli* diteliti efektifitasnya oleh SLOAT dan CUI, 2006), sedangkan penelitian vaksin yang mengandung *lethal toxin* (LF) dan PA *B. anthracis* dilakukan oleh XU dan ZENG (2008)

Pada penelitian ini akan dikembangkan vaksin mukosal yang mengandung komponen kapsul, dinding sel dan toksoid *B. anthracis* yang diaplikasikan pada mencit secara *intranasal*. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan sebelum diuji coba pada hewan ternak. Program pengendalian penyakit antraks dengan menggunakan vaksin yang aman dan mudah aplikasinya akan lebih menjamin keberhasilan dalam pencegahan

penyakit antraks yang pada akhirnya akan dapat mendukung pengembangan peternakan di Indonesia, menjamin keamanan pangan serta menghindari terjadinya penularan penyakit antraks dari hewan ke manusia.

MATERI DAN METODE

Seleksi isolat penghasil toksin

Dalam pengembangan vaksin antraks inaktif intranasal, dilakukan beberapa tahap pengerjaan guna memproduksi komponen *B. anthracis* (toksin, dinding sel dan kapsul). Seleksi isolat dilakukan terhadap berbagai koleksi isolat *B. anthracis* yang ada. Isolat terbaik dalam menghasilkan material dinding sel, kapsul dan toksin akan digunakan dalam preparasi vaksin.

Untuk seleksi penghasil toksin tertinggi, sebanyak 14 isolat *B. anthracis* ditumbuhkan masing-masing dalam 1 liter media Roswell Park Memorial Institute (RPMI) yang diinkubasikan pada suhu 37°C selama semalam. Inaktivasi *B. anthracis* dilakukan dengan menggunakan 0,6% formalin. Toksin kemudian dipresipitasi menggunakan 26% *ammonium sulfate*. Presipitat disuspensi dengan PBS dan kemudian didialisis terhadap *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Sebanyak 5 ml masing-masing toksoid yang terkonsentrasi telah dihasilkan dan disimpan pada suhu -20°C. Kandungan protein dalam toksoid diukur dengan spektrofotometer dan dilakukan uji dot-blot untuk konfirmasi. Dari hasil seleksi ini, dipilih isolat penghasil toksin dinding sel.

Dalam konfirmasi isolat penghasil kapsul, isolat *B. anthracis* yang akan dipilih, diuji dengan *Polymerase chain reaction* (PCR) antraks untuk mendeteksi adanya gen pembawa sifat pembentukan kapsul dan produksi toksin dari isolat *Bacillus anthracis* Citaringgul (CTR), Strene 34F2 sementara kontrol negatif menggunakan *Bacillus cereus* dan TE buffer. *Primers* yang digunakan untuk deteksi toksin pag F (5'-TCCTAACACTAACGAAGTCG-3') dan pag R (5'-GAGGTAGAAGGATATACGGT-3') sedangkan untuk deteksi kapsul digunakan *primer cap* F (5'-CTGAGCCATTAATCGATATG-3') dan cap R (5'-TCCCCTTACGTAATCTGAG-3'). Reaksi PCR menggunakan volume 50 ul, yang terdiri dari: 5 ul PCR buffer, 3 ul MgCl₂, 1 ul dNTP, *primers* masing – masing 2 ul, Tag DNA *polymerase* 0,35 ul, *nuclease free water* 60,35 ul dan *template* DNA 5 ul.

Siklus amplifikasi yang digunakan adalah: 1 siklus (94°C, 5 menit), 30 siklus (94°C, 1 menit; 55°C, 1 menit, 72°C, 1 menit) dan 1 siklus (72°C, 7 menit). Produk PCR (amplikon) diambil 10 µl dan dicampur dengan 2 µl *loading dye* (Vivantis), selanjutnya diseparasi menggunakan 1,5 - 2% *agarose* yang telah ditambahkan *ethidium bromide* 0,5 µg/ml pada

tegangan 120 V selama 50 menit dengan menggunakan *marker* 1000 bp DNA *ladder*. Hasil elektroforesis selanjutnya dilihat dengan menggunakan *Gel Documentation System*.

Sesudah dilakukan seleksi isolat *B. anthracis* galur Sterne dipilih untuk memproduksi toksin dan dinding sel, sedangkan isolat lokal *B. anthracis* asal Citaringgul dipilih untuk memproduksi komponen kapsul.

Produksi dinding sel (EZZEL *et al.*, 1990)

B. anthracis galur Sterne yang tidak berkapsul, mempunyai plasmid pX01 dan tidak mempunyai plasmid pX02, digunakan untuk memproduksi dinding sel (EZZEL dan ABSHIRE, 1988). Mula-mula, isolat ditumbuhkan pada *Brain Heart Infusion (BHI) Broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Kultur yang tumbuh kemudian digunakan sebagai inokulum untuk medium RPMI. Kultur dalam RPMI diinkubasi dengan pengocokan pada 100 rpm, suhu 37°C selama semalam. Kultur *B. anthracis* dipanen dengan sentrifugasi selama 1 jam pada 10.000 x g. Kultur langsung dibunuh dengan menggunakan 6,5 µg/ml Gentamycin, (Dopharma, Netherland). Sel yang didinginkan kemudian dipecahkan dengan *sonifier* B-12 (Branson Sonic Power Co, Danbury, Connecticut, USA). Dilakukan 5 kali sonikasi dengan waktu 5 x 0,5 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 *BHI broth* tidak ada pertumbuhan lagi. Sel yang telah terpecah kemudian disentrifus pada 10.000 x g. Pellet dinding sel kemudian disimpan pada suhu -20°C.

Produksi kapsul (GREEN *et al.*, 1985)

Dalam penelitian ini digunakan isolat lokal *B. anthracis* asal Citaringgul yang berkapsul. Bakteri ditumbuhkan pada lempeng NBY agar (Difco lab, Detroit, Mich. USA) yang mengandung 5 sampai 20% CO₂ pada suhu 37°C selama 48 jam. NBY medium mengandung *nutrient broth* 8 g dan *yeast extract* 3 g per liter. Untuk memproduksi kapsul, NBY medium diberi tambahan NaHCO₃ (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. 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 diambil dengan sentrifugasi, dan didialisa terhadap *deionized water*. Komponen kapsul kemudian disimpan pada suhu -20°C.

Produksi toksin (REUVENY *et al.*, 2001)

B. anthracis galur Sterne (34F2) ditumbuhkan pada 50 lempeng agar darah dalam cawan Petri dengan inkubasi pada suhu 37°C semalam. Kultur dipanen dan ditumbuhkan pada media RPMI dan diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Kultur dari RPMI di sentrifus pada 10.000 g selama 1 jam. Supernatan yang terkumpul diinaktivasi dengan penambahan 0,6% formalin yang akan merubah toksin menjadi toksoid. Proses ini diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Toksoid diendapkan dengan menambahkan 26% amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) kedalam supernatan sambil diaduk hingga larut. Biarkan semalam dalam suhu 4°C. Endapan yang terjadi dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 5000 x g selama 15 menit. Endapan kemudian diresuspensi dan didialisa terhadap PBS sampai amonium sulfat hilang dari larutan (dilakukan 3 kali penggantian *buffer*). Toksoid ini siap digunakan sebagai komponen vaksin.

Formulasi vaksin

Komponen vaksin (dinding sel, toksoid, kapsul *B. anthracis*) yang telah dihasilkan digabung dan dijadikan imunogen. Ada dua macam vaksin yang dibuat dalam penelitian ini yaitu: vaksin I mengandung 15 µg toksoid, 30 µg kapsul, dan 15 µg dinding sel, sedangkan vaksin II mengandung 30 µg toksoid, 60 µg kapsul, dan 30 µg dinding sel. Imunogen di atas diberi adjuvan, yaitu Chitosan (SIGMA) 0,5% dan selanjutnya diaplikasikan secara *intranasal spray* dengan dosis 5 ul per lubang hidung pada hewan percobaan (mencit) dengan jadwal vaksinasi seperti pada Tabel 1.

Evaluasi vaksinasi uji tantang

Keberhasilan vaksinasi akan dinilai proteksi terhadap tantangan/*challenge*. Untuk uji tantang yang digunakan mencit (berat 20 gr/ekor). Untuk uji coba vaksin I digunakan 10 ekor mencit yang divaksinasi secara intranasal dengan dosis: 2 x 5µl/mencit. Untuk uji coba vaksin II, juga digunakan 10 ekor mencit dengan dosis yang sama dengan vaksin I. Kelompok kontrol, yaitu mencit yang tidak divaksinasi terdiri atas 10 ekor mencit. Uji tantang akan dilakukan terhadap kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol pada saat 2 minggu setelah vaksinasi, yaitu dengan menyuntikkan *B. anthracis* strain 34F2 dengan dosis 2 X 10⁵ spora/ekor secara sub kutan (XU dan ZENG, 2008).

Tabel 1. Komposisi vaksin, jadwal vaksinasi dan uji tantang

	Komposisi			Jumlah mencit	Vaksinasi pada minggu ke	Pengambilan darah (hari ke:)
	Toksoid	Kapsul	Dinding Sel			
Vaksin I	15 µg	30 µg	15 µg	10 ekor	0, 2, 4	0, 2, 4, 6
Vaksin II	30 µg	60 µg	15 µg	10 ekor	0, 2, 4	0, 2, 4, 6
Kontrol	-	-	-	10 ekor	-	0, 2, 4, 6

Pada minggu ke-7 mencit ditantang dengan penyuntikkan 2×10^5 spora *B. anthracis* Sterne (*subcutan*)

Keberhasilan vaksinasi diamati dengan mengamati jumlah mencit yang mati dan hidup setelah uji tantang.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) untuk pemantauan respon kekebalan pasca vaksinasi

ELISA dilakukan dengan menggunakan mikroplat ELISA (Corning, high-bind) dengan 96 lubang berdasar U. Antigen pelapis yang digunakan adalah antigen dinding sel, toksin dan kapsul dengan perbandingan 1 : 1 : 1. Pengencer antigen adalah *carbonate buffer* pH 9,6. Setelah pelapisan, mikroplat disimpan pada suhu 4°C. Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali dengan menggunakan PBS-Tween 0,05% (PBST). Selanjutnya dilakukan *blocking* dengan PBS-Casein 0,2% selama semalam. Pencucian dilakukan kembali dengan PBST sebanyak 3 kali. Sampel serum mencit dimasukkan dalam enceran 1/50 dalam PBST-Casein 0,2% (PBST-C). *Microplate* kemudian digoyang pada suhu kamar selama 1 jam. Pencucian dilakukan kembali sebanyak 3 kali dengan PBST. Konjugat anti *mouse* yang dilabel *horse raddish peroxidase labelled* (HPRO) dalam enceran 1 : 2000 dalam PBST-C kemudian dimasukkan ke dalam lubang mikroplat. Inkubasi dilakukan kembali dalam suhu ruang sambil digoyang selama 1 jam. Pencucian dilakukan kembali sebanyak 3 kali dengan PBST. Substrat 2,2'-Azino bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) (ABTS) dimasukkan ke dalam lubang dan *microplate* digoyang selama 1 jam. Pembacaan dilakukan dengan ELISA reader (Titertek EX) pada panjang gelombang 405nm.

Uji dot blot

Metode ini dikembangkan sendiri dengan menggunakan *strip nitrocellulose membrane* sebagai membran perlekatan antigen. Sebanyak 2 µl antigen dinding sel, toksin dan kapsul diteteskan pada membran. Selanjutnya dilakukan *blocking* dengan PBS-Casein 0,2% selama semalam. Pencucian dilakukan

dengan perendaman dalam PBS-Tween 0,05% (PBST). Membran *nitrocellulose* kemudian direndam dalam sampel serum mencit dalam enceran 1/20 dalam PBST-Casein 0,2% (PBST-C) dan diamkan selama 1 jam. Pencucian dilakukan lagi dengan perendaman dalam PBST. Kemudian, *nitrocellulose* direndam dalam konjugat anti *mouse*-HRPO dalam enceran 1: 1000 PBST-C. Pencucian dilakukan kembali dengan PBST. Terakhir, dilakukan perendaman dalam substrat 3,3' *Diaminobenzidine* (DAB) dengan konsentrasi 0,6 mg/ml dalam buffer asetat pH 4,2 dan penambahan 2 µl/ml H₂O₂. Reaksi dihentikan sesudah 5 menit, dengan menambahkan aquades. Reaksi positif memberikan warna coklat pada antigen yang diteteskan di membran *nitrocellulose*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

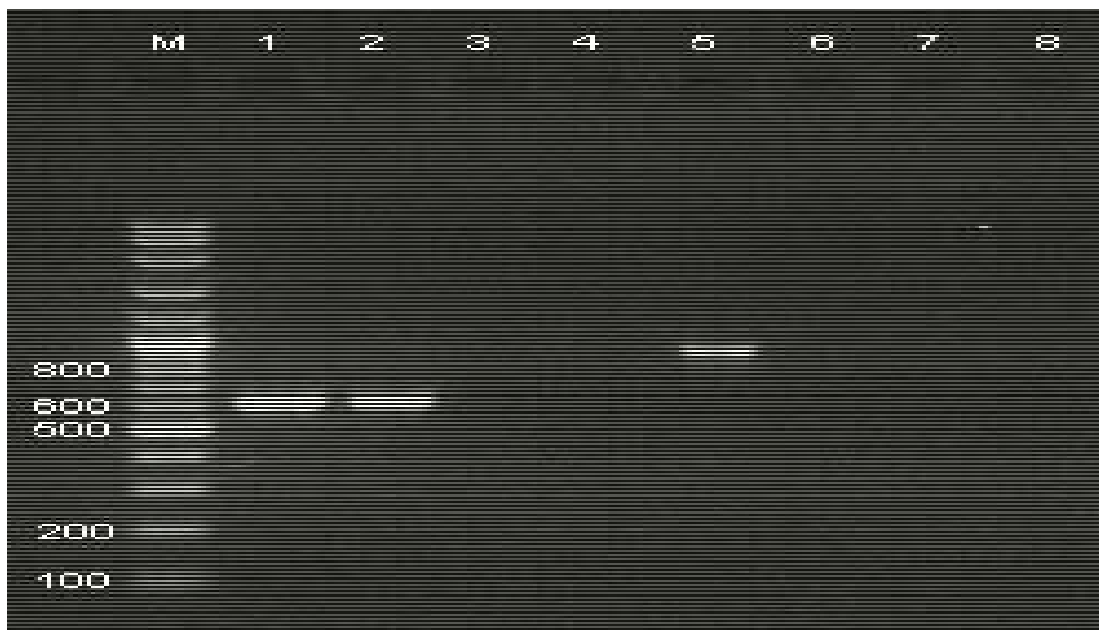
Seleksi isolat

B. anthracis yang digunakan untuk memproduksi toksin dan dinding sel, telah ditentukan melalui seleksi isolat. Dari 14 isolat yang diseleksi terhadap kemampuan menghasilkan toksin, didapatkan isolat galur Sterne dan Tenganan yang menghasilkan toksin tertinggi yaitu masing-masing 81,66 dan 91,38 µg/ml (Tabel 2). Isolat galur Sterne kemudian digunakan sebagai isolat untuk memproduksi toksin dan dinding sel karena isolat ini adalah isolat laboratorium non-kapsuler yang tidak ganas dan relatif aman digunakan.

Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa isolat *B. anthracis* asal Citaringgul mempunyai gen *cap* yang mengkode produksi kapsul. Hal tersebut terlihat pada Gambar 1 di jalur 4. Sementara itu, *B. anthracis* Sterne 34F2 dan *B. cereus* tidak memproduksi kapsul dan tidak menghasilkan *band* di jalur 5 dan 6. Dalam uji PCR ini, *B. cereus* berfungsi sebagai kontrol negatif. Analisis PCR juga memperlihatkan *B. anthracis* yang mampu menghasilkan toksin, yaitu *B. anthracis* asal Citaringgul dan *B. anthracis* Sterne 34F2 (Gambar 1, jalur 1 dan 2).

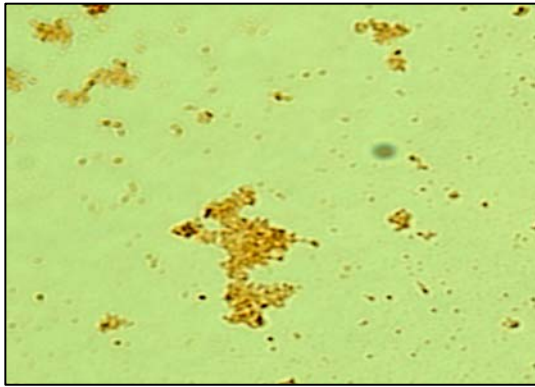
Tabel 2. Hasil pengukuran konsentrasi protein filtrat *B. anthracis*

No. Isolat	Asal <i>B. anthracis</i>	Konsentrasi protein (µg/ml)
1.	Maros, Sulawesi Selatan	25,74
2.	Pangkep, Sulawesi Selatan	32,06
3.	Bone, Sulawesi Selatan	14,55
4.	Vollum, Australia	36,92
5.	Sterne, Inggris	81,66
6.	Netherland	34,98
7.	Nusa Tenggara Timur	22,33
8.	Bekasi	47,62
9.	Tengaran, Salatiga, Jawa Tengah	91,38
10.	Grati, Jawa Timur	43,73
11.	Irian Jaya	0,45
12.	Kodya Bogor	27,20
13.	Kabupaten Bogor	23,79
14.	DKI	42,76



Gambar 1. Hasil PCR dari sampel isolat *B. anthracis* Citaringgul (1), *B. anthracis* Sterne 34F2 (2), *B. cereus* (3) dan TE buffer (4) dengan menggunakan primer toksin dan sampel isolate *B. anthracis* Citaringgul (5) *B. anthracis* Sterne 34F2 (6), *B. cereus* (7) dan TE buffer (8) dengan menggunakan primer kapsul

Dalam uji patogenitas pada marmot, isolat *B. anthracis* asal Citaringgul ini dapat membunuh marmot dalam waktu 52 jam dengan dosis inokulasi *lethal dose* 50 (LD50): 10^2 spora/ml. Isolat ini kemudian dipilih untuk memproduksi kapsul *B. anthracis*. Sebanyak 5 ml suspensi kapsul sudah dihasilkan dengan cara yang sudah disebutkan di atas dan diperoleh konsentrasi protein kapsul 5460 $\mu\text{g/ml}$. Kapsul yang diproduksi merupakan agregat yang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Agregat kapsul *B. anthracis* pada pewarnaan 3,3' Diaminobenzidine (DAB).

Setelah dilakukan isolasi dinding sel yang dilanjutkan dengan proses sonikasi menghasilkan suspensi dinding sel *B. anthracis* dari galur Sterne sebanyak 10 ml dengan konsentrasi 21 mg/ml. Dari sebanyak 3 liter media RPMI yang digunakan untuk menghasilkan toksin *B. anthracis* galur Sterne, diperoleh *crude toxin* yang setelah diendapkan dengan amonium sulfat dan didialisis dengan PBS, diperoleh toksin dengan konsentrasi protein 570 $\mu\text{g/ml}$ dengan volume 5 ml. Toksin yang diinaktifasi dengan formalin untuk menghasilkan toksoid ini memberikan reaksi hingga pengenceran 1/40 pada uji *dot-blot* (Gambar 3).

Formulasi vaksin

Dalam penelitian ini, komposisi dan konsentrasi antigen yang digunakan dalam formulasi vaksin

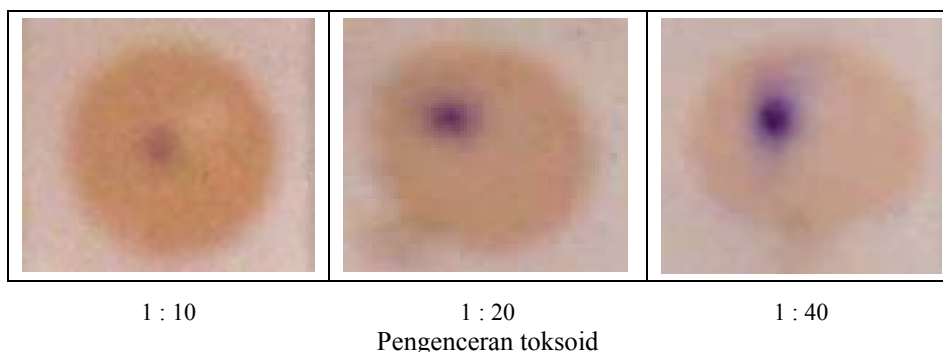
merupakan besaran perkiraan untuk dapat menimbulkan respon kekebalan yang baik dan memberikan proteksi terhadap ujiantang yang akan dilakukan setelah vaksinasi. Karena lubang hidung mencit yang sangat kecil, maka aplikasi vaksin intranasal dilakukan pada kedua lubang hidung dengan dosis $2 \times 5\mu\text{l}$. Pada hewan ternak yang jauh lebih besar tentunya aplikasi tidak perlu dilakukan dengan aplikasi intranasal serupa.

Beberapa sampel serum mencit yang diambil 2 minggu pasca vaksinasi dan pada uji *dot-blot* memberikan reaksi yang cukup tinggi. Serum bereaksi baik dengan komponen vaksin yang diberikan secara intranasal (Gambar 4). Hasil ini menunjukkan bahwa ketiga komponen menimbulkan respon pembentukan antibodi yang tinggi yang mempunyai korelasi dengan tingkat proteksi (REUVENY *et al.*, 2001)

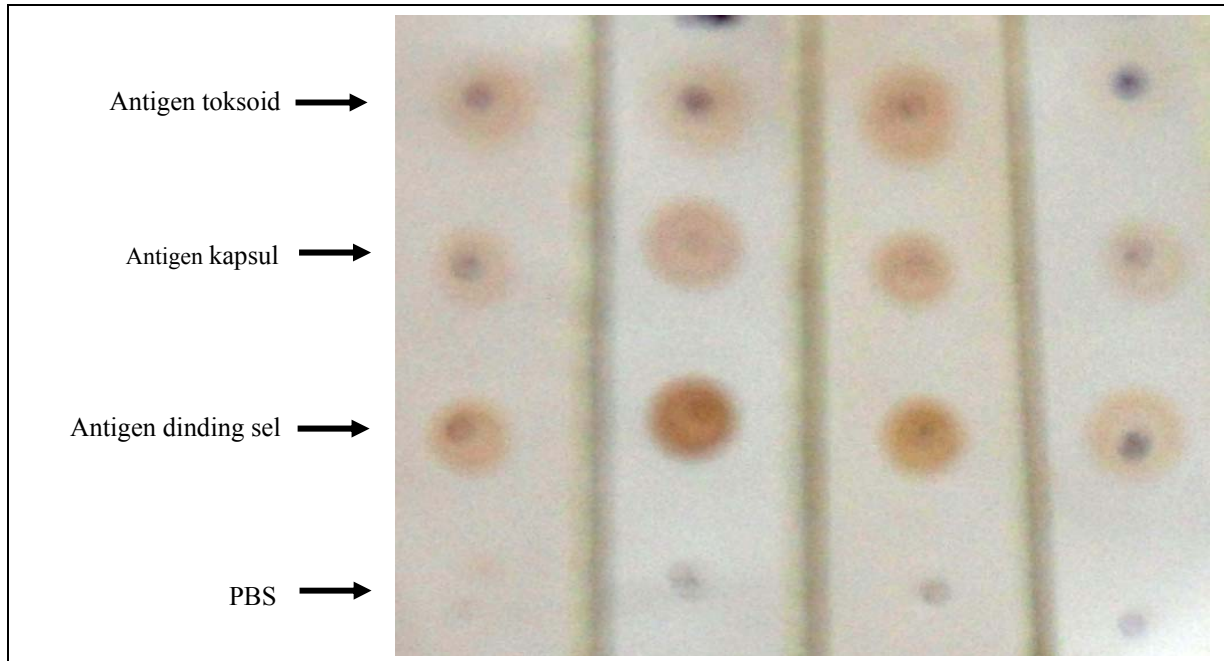
Pada hasil ELISA, terlihat kenaikan titer antibodi mulai minggu ke 2 pasca vaksinasi bila dibandingkan dengan kontrol (Gambar 5). Kenaikan titer antibodi sangat berkaitan dengan kandungan antigen dalam vaksin. Vaksin II yang mengandung antigen 2 kali lebih banyak dibanding vaksin I memberikan respon yang lebih tinggi. Hasil yang serupa juga disampaikan oleh XU dan ZENG (2008) yang mengamati bahwa vaksinasi secara intranasal dengan toksin PA dan LF. *B. anthracis* yang didetoksikasi dapat merangsang respon kekebalan sistemik dan mukosal dan dapat memproteksi mencit terhadap infeksi oleh spora *B. anthracis*.

Ujiantang

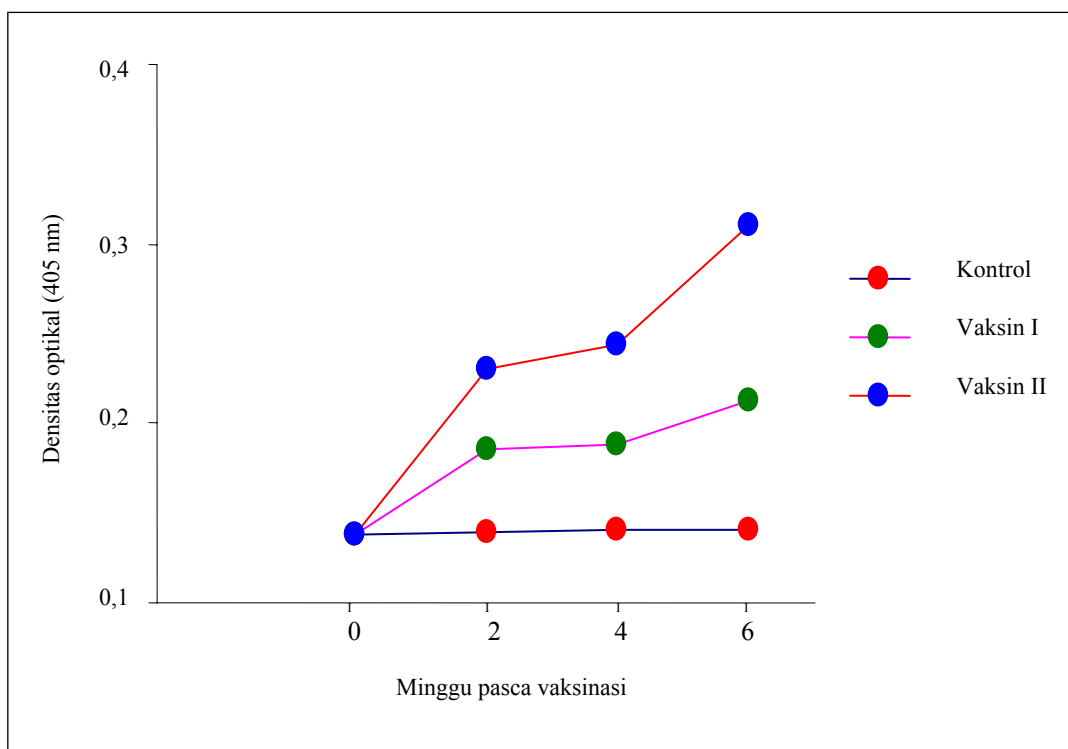
Setelah dilakukan ujiantang pada mencit yang telah divaksin dan juga tidak divaksin (kelompok kontrol), terlihat 4 ekor mencit di kelompok kontrol mulai menunjukkan gejala sakit (ada *oedema* yang nyata di *ventral abdomen*) pada hari kedua. Pada hari keempat semua mencit di kelompok kontrol mati, dan hasil isolasi kembali dari mencit kelompok kontrol yang mati menunjukkan adanya *B. anthracis* dalam jumlah banyak. Sehingga dapat dipastikan semua mencit dalam kelompok kontrol mati karena infeksi *B. anthracis*.



Gambar 3. Reaksi toksoid pada uji *dot-blot*



Gambar 4. Reaksi beberapa serum mencit yang dikoleksi pada 2 minggu pasca vaksinasi terhadap toksoid, kapsul dan dinding sel *B. anthracis* pada uji dot-blot



Gambar 5. Hasil uji ELISA *B. anthracis* serum mencit yang divaksinasi dengan vaksin I dan vaksin II yang diambil pada 0, 2, 4 dan 6 minggu pasca vaksinasi

Tabel 3. Pengamatan kondisi mencit pasca ujiantang dengan spora *B. anthracis*

Kelompok perlakuan	Kondisi mencit sesudah ujiantang pada hari ke-															
	0			2			4			6			8			Proteksi (%)
	N	S	M	N	S	M	N	S	M	N	S	M	N	S	M	
Vaksin I	10	-	-	10	-	-	10	-	-	8	-	2	6	-	4	60
Vaksin II	10	-	-	10	-	-	10	-	-	8	-	2	6	2	2	60-80
Kontrol	10	-	-	6	4	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	0

N = normal/sehat

S = sakit

M = mati

Jumlah mencit per kelompok = 10 ekor

Pada hari ke 8 setelah ujiantang, mencit yang divaksinasi dengan vaksin I telah mati sebanyak 4 ekor, atau menunjukkan bahwa vaksin I mampu melindungi 60% dari mencit (n = 10), sedangkan vaksin II mampu melindungi mencit dari kematian sebanyak 80%. Walaupun pada kelompok vaksin II tingkat perlindungan dapat mencapai 80%, ada 2 ekor yang menunjukkan gejala sakit dan mati pada hari ke 10 setelah ujiantang (Tabel 3). Semua mencit yang mati dikonfirmasi penyebab kematiannya dengan melakukan reisolasi *B. anthracis* dari tubuh mencit yang mati. Walaupun serum tidak diidentifikasi secara individual, kemungkinan bahwa kedua mencit yang mati pada hari ke 10 itu belum dapat menghasilkan antibodi yang melindungi.

Dari hasil yang diperoleh, terlihat adanya kecenderungan bahwa vaksin dengan kandungan antigen lebih tinggi (vaksin II) memberi perlindungan yang lebih baik. Penelitian ini menunjukkan bahwa vaksinasi dengan vaksin antraks yang mengandung komponen toksoid kapsul dan dinding *B. anthracis* dengan *adjuvant chitosan* yang diberikan secara intranasal mampu melindungi mencit dari tantangan spora antraks hingga 60-80%

Hasil penelitian terhadap vaksin mukosal antraks, seperti vaksin mukosal pada umumnya menunjukkan kemampuannya untuk menginduksi kekebalan mukosa dan juga kekebalan sistemik. Hal ini juga telah dinyatakan oleh BOYAKA *et al.* (2003), ZENG *et al.* (2007), MCGHEE *et al.* (1999) dan DAVIS (2001).

Dalam vaksin mukosal yang dikembangkan, terkandung toksin *B. anthracis* yang terdiri atas *protective antigen* (PA) *lethal factor* (LF) dan *edema factor* (EF), dinding sel dan kapsul. PA merupakan komponen penting untuk vaksin dalam menimbulkan imunitas. Meskipun EF dan LF juga mempunyai peranan penting dalam imunitas (PEZARD *et al.*, 1995). Kombinasi PA dan LF membuat toksin yang mematikan pada hewan percobaan dan makrofag yang

sensitif. PA dan EF akan meningkatkan konsentrasi AMP siklik dalam sel. EF diketahui juga sebagai *calcium* dan *calmodulin dependent adenylate cyclase*. LF diduga merupakan *Zn dependent metalloprotease* (KLIMPEL *et al.*, 1994). Dinding sel *B. anthracis* mengandung *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide* (EZZELL dan ABSHIRE, 1988, EZZELL *et al.*, 1990), yang diharapkan dapat memperkuat proteksi terhadap infeksi *B. anthracis*. SHIYAKOV *et al.*, (2004) menyatakan bahwa antigen dari dinding sel berperan dalam imunitas humoral dan seluler untuk antraks. Hasil imunisasi pada hewan marmot menunjukkan adanya peningkatan antibodi dan *in vitro T-cell response*. Kapsul *B. anthracis* yang mengandung *poly-D-glutamic acid* (PGA) yang merupakan salah satu faktor virulensi *B. anthracis*. PGA dari kapsul merupakan komponen yang mempunyai imunogenesitas rendah. Sifat ini kemungkinan disebabkan komponen ini resistensi terhadap proteolisis, mempunyai struktur yang sederhana, terulang sehingga membuatnya menjadi antigen yang *T cell independent*. PGA merupakan faktor virulensi utama dalam uji percobaan pada mencit, sedangkan vaksin yang hanya mengandung PA memperlihatkan efikasi yang berkurang. Jadi peranan antibodi anti PGA dalam imunitas protektif pada mencit merupakan strategi efektif untuk menginduksi antibodi tersebut (BROSSIER *et al.*, 2002; LEPLA *et al.*, 2002).

Hasil uji dot-blot menunjukkan bahwa antibodi yang terbentuk dari hasil vaksinasi ini bereaksi terhadap tiga komponen vaksin (Gambar 4). Respon antibodi ini membuktikan bahwa chitosan merupakan adjuvant yang baik untuk vaksin mukosal antraks. Penelitian pada kelinci menunjukkan bahwa vaksin antraks yang mengandung komponen PA dalam *adjuvant chitosan* yang diberikan secara intranasal dapat merangsang pembentukan antibodi dan memberikan perlindungan 100% sedangkan tanpa *chitosan* perlindungan hanya 83% (MIKSZTA *et al.*, 2005). Banyaknya komponen

dalam komposisi vaksin ini mungkin juga merupakan faktor yang mempertinggi respon pembentukan antibodi (XU dan ZENG, 2008).

Keefektifan vaksin mukosal intranasal juga telah diteliti di UNIVERSITY OF ROCHESTER MEDICAL CENTER (2008). Dalam penelitian ini juga dibuktikan keefektifan vaksin mukosal antraks inaktif aplikasi intranasal terhadap ujiantang dengan *B. anthracis* galur Sterne (34F2) yang disuntikkan secara sub kutan seperti yang telah dilakukan oleh ZENG *et al.* (2007) dan XU *et al.* (2008). *B. anthracis* galur Sterne ini terbukti merupakan penghasil toksin yang baik. Hal ini juga yang dicurigai menjadi penyebab adanya efek samping dari vaksin spora hidup antraks yang dibuat dari *B. anthracis* galur Sterne. Kemampuan vaksin mukosal antraks inaktif dari penelitian ini yang dapat melindungi 60% mencit terhadap ujiantang merupakan indikasi bahwa vaksin ini dapat digunakan pada ternak. Penelitian lebih lanjut dengan mengevaluasi formulasi dosis vaksin yang efektif untuk dapat diaplikasikan pada hewan ternak perlu dilakukan.

KESIMPULAN

Vaksin antraks inaktif intranasal yang mengandung komponen toksin, kapsul dan dinding sel *B. anthracis* beradjuvant *chitosan* telah dikembangkan. Hasil vaksinasi intranasal pada mencit menunjukkan bahwa vaksin ini dapat melindungi 60% mencit dari ujiantang menggunakan 2×10^5 spora *B. anthracis* galur Sterne per ekor secara sub kutan. Dari hasil ELISA dan uji *dot blot* terlihat bahwa vaksin dapat menginduksi timbulnya antibodi humoral pada mencit. Penelitian lebih lanjut mengenai formulasi dan dosis vaksin yang efektif untuk ternak perlu dilakukan. Uji efektifitas vaksin pada hewan ternak juga perlu diteliti lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- AZIS, S. 2004. Jumlah korban vaksinasi masih bertambah. *Kedaulatan Rakyat*, 11 Desember 2004. hlm. 5
- BIELINSKA, A.U., K.W. JANCZAK, J.J. LANDERS, P. MAKIDON, L.E. SOWER, J.W. PETERSON and J.R. BATER. 2007. Mucosal immunization with a novel nanoemulsion-based recombinant anthrax protective antigen vaccine protects against *Bacillus anthracis* spore challenge. *Infect. Immunol.* 75: 4020-4029.
- BOYAKA, P.N., A. TAFARO, R. FISCHER, S.H. LEPPLA, K. FUJHASHI and J.R. MCGHEE. 2003. Effective mucosal immunity to anthrax: neutralizing antibodies and Th cell responses following nasal immunization with protective antigen. *J. Immunol.* 170: 5636-5643.
- BROSSIER, F., M. LEVY and M. MOCK. 2002. Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Infect. Immunol.* 70: 661-664.
- DAVIS, S.S. 2001. Nasal vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51: 21-42.
- EZZELL, J.W. and T.A. ABSHIRE. 1988. Immunological analysis of cell-associated antigens of *Bacillus subtilis*. *Infect. Immunol.* 56: 249-356.
- EZZELL, J.W., T.G. ABSHIRE, S.F. LITTLE, B.C. LIDGERDING and C. BROWN. 1990. Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall galactose-N-acetylglucosamine polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 28: 223-231.
- 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. Immunol.* 49: 291-297.
- HARDJOUTOMO, S., M.B. POERWADIKARTA, B.E. PATTEN and K. BARKAH. 1993. The application of ELISA to monitor the vaccinal response of anthrax vaccinated ruminants. *Penyakit Hewan*. Ed khusus 46A. 25: 7-10.
- KLIMPEL, K.R., N. ARORA and S.H. LEPPLA. 1994. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal activity. *Mol. Microbiol.* 13: 1093-1100.
- LEPPLA, S.H., J.B. ROBBINS, R. SCHNEERSON and J. SHILOACH. 2002. Development of an improved vaccine for anthrax. *J. Clin. Invest.* 110: 141-144.
- MCGHEE, J.R., M.E. LAMM and W. STROBER. 1999. Mucosal immune responses: An overview. In *Mucosal Immunology*. Eds. OGRA, P.L., J. MESTECKY, M.E. LAMM, W. STROBER, J. BIENENSTOCK and J.R. MCGHEE. Academic press. New York. p. 485.
- MIKSZTA, J.A., V.J. SULLIVAN, C. DEAN, A.M. WATERSTON, J.B. ALARCON, J.P.R. DEKKER, J.M. BRITTINGHAM, J. HUANG, C.R. HWANG, M. FERRIER, G. JIANG, K. MAR, K.U. SAIKH, B.G. STILES, C.J. ROY, R.G. ULRICH and N.G. HARVEY. 2005. Protective immunization against inhalational anthrax: a comparison of minimally invasive delivery platforms. *J. Infect. Dis.* 191: 278-288.
- PEZARD, C., M. WEBER, J.C. SIRARD, P. BERCHE and M. MOCK. 1995. Protective immunity induced by *Bacillus anthracis* toxin deficient strains. *Infect. Immunol.* 63: 1369-1372.
- REUVENY, S., M.D. WHITE, Y.Y. ADAR, Y. KAFRI, Z. ALTBOM, Y. GOZES, D. KOBILER, A. SHAFFERMAN and B. VELAN. 2001. Search for correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect. Immunol.* 69: 2888-2893.
- 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.
- SHYAKOV, E., Y. SHOENFELD, I. GILBURG and E. RUBINSTEIN. 2004. Evaluation of *Bacillus anthracis* extractable antigen for testing anthrax immunity. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 421-424.
- 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. Bogor 17 Juli 2002. Balitvet, Bogor.
- SLOAT, B.R. and Z. CUI. 2006. Nasal immunization with a dual antigen anthrax vaccine induced strong mucosal and systemic immune responses against toxins and bacilli. College of Pharmacy, OSU, Corvallis, OR 97331. USA. p. 32-33.
- TURNBULL, P.C.B., R. BOHM, O. COSIVI, M. DOGANAY, M.E.H. 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.
- WIMER-MACKIN, S., M. HINCHCLIFFE, R. PETRIE, S.J. WARWOOD, W.T. TINO, M.S. WILLIAMS, J.P. STENZ, A. CHEFF and C. RICHARDSON. 2006. An intranasal vaccine targeting both the *Bacillus anthracis* toxin and bacterium provides protection against aerosol spore challenge in rabbits. *Vaccine* 24: 3953-3963.
- XU, Q. and M. ZENG. 2008. Detoxified lethal toxin as a potential mucosal vaccine against anthrax. *Clin. Vacc. Immunol.* 15: 612-616.
- ZENG, M., Q. XU and M.E. PICHICHERO. 2007. Protection against anthrax by needle-free mucosal immunization with human anthrax vaccine. *Vaccine* 25: 3588-3594.