

CATATAN PENELITIAN

Identifikasi Isolat *Clostridium botulinum* Asal Bogor

Identification of Clostridium botulinum Isolates from Bogor

ANJA MERYANDINI

Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16144, Tel. +62-251-633507, Fax. +62-251-345011

Diterima 3 Agustus 2001/Disetujui 8 September 2001

Clostridium botulinum is one of microorganisms that could cause serious food poisoning. Food contaminated with *C. botulinum* could not always be detected easily, because not all of *C. botulinum* strains are proteolytic and produce gas. From 31 soil samples we could identify 15 *C. botulinum* isolates through a series physiological characters, i.e. Gram stain, haemolytic, glucose and lactose fermentation tests, the presence of lecithinase, lipase and gelatin hidrolisis. One isolate from Bogor was shown to produce serotype D toxin and could degrade synaptobrevin2 (Syb2).

Keracunan makanan sering terjadi di Indonesia. Keracunan tersebut dapat disebabkan oleh adanya organisme penyebab keracunan makanan seperti misalnya *Clostridium botulinum*. Bakteri ini hidup di tanah, karenanya mudah sekali mengkontaminasi bahan makanan. *C. botulinum* dapat mengkontaminasi hampir semua jenis makanan, baik yang berkadar karbohidrat tinggi maupun yang berkadar protein tinggi (MacDonald *et al.* 1985). Melalui penampakkannya, makanan yang terkontaminasi *C. botulinum* sulit diketahui karena toksin dapat bersifat proteolitik dan nonproteolitik (Carlin & Peck 1995).

Clostridium botulinum menghasilkan spora yang tahan terhadap panas dan neurotoksin. Bakteri ini mempunyai morfologi koloni beragam, bersifat gram positif berbentuk batang dengan spora di daerah subterminal. Karakter yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri ini ialah kemampuan hemolitik (positif), pembentukan lesitinase (positif), pembentukan lipase (positif), hidrolisis gelatin (positif), fermentasi glukosa (positif), fermentasi laktosa (negatif). Neurotoksin yang dihasilkan galur ini terbagi dalam tujuh serotipe yang penyebarannya bersifat geografi spesifik (Hobbs *et al.* 1971, Levett 1991).

Di Amerika Serikat *C. botulinum* tipe A umumnya terdapat di tanah yang bersifat netral hingga basa (sekitar pH 7.5) dengan kondisi bahan organik rendah, sedangkan tipe B sering dijumpai pada tanah yang sedikit asam (pH 6.3) dengan kandungan bahan organik tinggi. Tipe A dan B itu jarang ditemui di perairan, namun di Inggris *C. botulinum* lebih banyak ditemukan di perairan dengan tipe B sebagai tipe yang dominan. Di Asia *C. botulinum* tipe A dan B tersebar luas. Dari sampel tanah daerah subtropik dan tropik sering ditemukan *C. botulinum* tipe A dan B. Daerah yang berpenduduk merupakan daerah yang lebih tinggi terkontaminasi bakteri ini dibandingkan daerah tidak berpenduduk. Sebanyak 12 sampel tanah dari Pulau Jawa yang

positif mengandung *C. botulinum*, sebanyak 73% mengandung toksin botulin tipe C dan D (Popoff 1995).

Di Amerika Utara penyebab botulismus umumnya ialah toksin tipe A, di Finlandia dan Alaska tipe E, sedangkan di Eropa Utara dan Tengah ialah toksin tipe B (Vaughan *et al.* 1979, Hielm *et al.* 1988, Wainwright *et al.* 1988).

Kerja ketujuh serotipe toksin ini ialah menghambat pelepasan neurotransmitter. Dalam melaksanakan fungsinya ketujuh serotipe ini memiliki substrat yang berbeda (Tabel 1).

Penelitian ini bertujuan mengetahui jenis *C. botulinum* yang ada di daerah Jabotabek.

Isolasi bakteri *Clostridium* dari sampel tanah dilakukan dengan menumbuhkannya pada media *Robertson's Cooked Meat Medium* (RCMM) pH 8.5 dengan penambahan antibiotik polimiksin sulfat 1%. Media ini terdiri atas protease pepton 1%, NaCl 0.5%, sukrosa 1%, ekstrak khamir 2%, seujung sudip CaCO₃ dan 10 g daging. Sebelum digunakan, media selalu dipanaskan dahulu dalam air mendidih selama 10 menit untuk mengeluarkan oksigen dari media. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 3 hingga 4 hari. Kemudian isolat dipindahkan ke media agar-agar darah yang terdiri atas *blood agar base* 4% dan darah domba 5% yang telah mengalami defibrinasi (Hobbs *et al.* 1971). Koloni yang dicurigai sebagai *C. botulinum* diuji beberapa karakter fisiologinya seperti pembentukan lesitinase dan lipase, fermentasi glukosa dan laktosa, pewarnaan Gram, dan degradasi gelatin.

Tabel 1. Lokasi gen dan substrat toksin botulin.

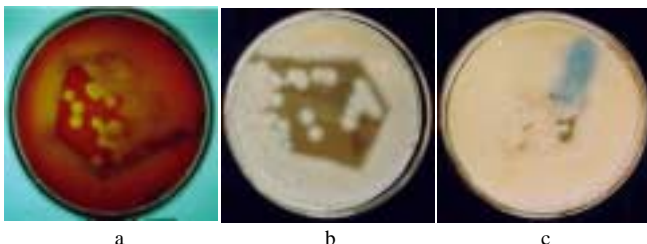
Toksin	Lokasi gen	Substrat	Pustaka
BoNT/A	kromosom	SNAP-25	Binz <i>et al.</i> 1994
BoNT/B	kromosom	Synaptobrevin 2	Schiavo <i>et al.</i> 1992
BoNT/C1	bakteriofag	Syntaxin, SNAP-25	Schiavo <i>et al.</i> 1995
BoNT/D	bakteriofag	Synaptobrevin 2	Hayashi <i>et al.</i> 1994
BoNT/E	kromosom	SNAP-25	Binz <i>et al.</i> 1994
BoNT/F	kromosom	Synaptobrevin 2	Hayashi <i>et al.</i> 1994
BoNT/G	plasmid	Synaptobrevin 2	Schiavo <i>et al.</i> 1994

Dari 31 sampel tanah diperoleh 603 isolat *Clostridium* dan 15 di antaranya ialah *C. botulinum* (1 isolat Bekasi, 3 isolat Tangerang, 9 isolat Jakarta, dan 2 isolat Bogor). Isolat *C. botulinum* yang diperoleh memperlihatkan karakter fisiologi sebagai berikut: berbentuk batang, Gram positif dengan spora subterminal, memproduksi lesitinase dan lipase, melisis eritrosit domba, mampu memfermentasi glukosa, tidak mampu memfermentasi laktosa (Gambar 1). Dari 15 isolat hanya 1 isolat yang memproduksi toksin, yaitu isolat Bg1 (isolat ke-1 asal Bogor). Produksi toksin memang ditentukan oleh berbagai faktor, seperti lama penyimpanan isolat, media yang digunakan, dan kemampuan galur untuk memproduksi toksin (Shone & Tranter 1995).

Untuk memurnikan toksin, *C. botulinum* Bg1 ditumbuhkan pada media RCMM selama 18 jam pada 37°C, kemudian ditumbuhkan pada media basal selama 18 jam pada 37°C. Toksin yang berada dalam supernatan diendapkan melalui penambahan amonium sulfat, kemudian didialisis dengan bufer garam fosfat (PBS) hingga dianggap bersih dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Setelah dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 25 000 g selama 30 menit, pelet diresuspensikan dalam trietanolamina 50 mM pH 8.0, dilalukan pada kolom kromatografi Q Sepharosa, dan dielusi dengan bufer trietanolamina dengan NaCl 100 mM. Pemurnian selanjutnya dilakukan dengan kolom mono S. Uji immunoblotting menunjukkan bahwa toksin ini adalah tipe D.

Jenis toksin ini diuji toksisitasnya dengan substrat Sinaptobrevin2. Sinaptobrevin2 (Syb2) diekspresikan oleh *Escherichia coli* BL21 (DE3) yang mengandung plasmid dengan vektor pET28a dan gen Synaptobrevin2. Sebagai starter *E. coli* ditumbuhkan pada media *terrific broth* (TB: 12 g Bakto tripton, 24 g ekstrak khamir, 4 ml gliserol ditambah 100 µg/ml ampisilin untuk satu liter larutan), dengan digoyang pada kecepatan 180 rpm pada suhu 37°C selama 18 jam.

Sebanyak 10 ml kultur starter diinokulasikan ke dalam 500 ml media *terrific broth*, diinkubasi dalam penggoyang dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 37°C. Setelah dicapai $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.7$, ditambahi 500 µl *isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid* (IPTG, konsentrasi akhir 0.5 mM) dan inkubasi dilanjutkan selama tiga jam. Sel dipanen dengan sentrifugasi 20 menit pada 8 000 g. Sel dilarutkan dalam larutan sonikasi (Tris 20 mM, NaCl 200 mM, Triton X - 100 1% pH 7.4, 250 µl Benzamidine 1M, 125 µl *phenylmethylsulfonylfluorid* 0.2 M dan 100 µl Pepstattin A 0.5 mg/ml). Lisis sel dilakukan melalui 3 x 1.5 menit sonikasi dengan interval satu menit. Supensi disentrifugasi pada 30 000 g selama 20 menit pada 4°C, supernatan diambil dan disentrifugasi pada

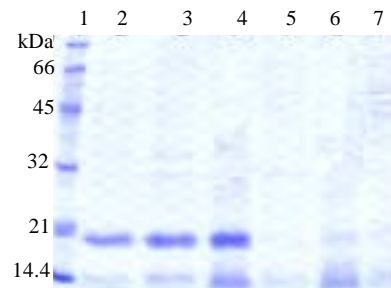


Gambar 1. Karakter fisiologi bakteri *Clostridium botulinum*. a. uji hemolisis, b. uji lipase, dan c. uji lesitinase.

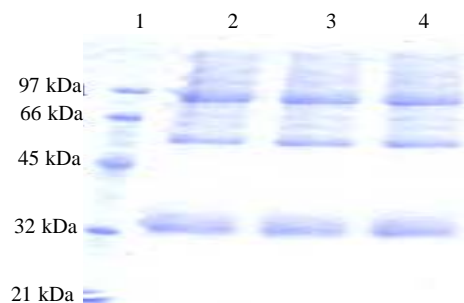
145 000 g selama 60 menit pada 4°C. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam kromatografi kolom yang mengandung Ni- Agarosa yang telah diekuilibrasi dengan larutan penyangga Tris/NaCl (Tris 20 mM, NaCl 200 mM, Triton X - 100 1%) pH 7.4. Pencucian dilakukan 2 kali dengan larutan penyangga Tris/NaCl pH 7.4 dan 1 kali dengan larutan imidazol 40 mM dalam Tris NaCl. Elusi dilakukan 6 x 1 ml larutan imidazol 240 mM dalam larutan penyangga Tris/NaCl. Penentuan konsentrasi Syb2 dilakukan melalui *sodiumdodecylsulfat polyacrylamid-gelelectroforesis* (SDS PAGE) menggunakan standar protein bovin serum albumin dengan program *imagemaster*.

Uji aktivitas toksin dilakukan dengan inkubasi substrat (6 µg ~ 7 µl) dengan toksin 0.1 µM (2.25 µl). Volume akhir 22.5 µl dicapai dengan penambahan larutan penyangga *hepes glutamic acid* pH 7.2 dan diinkubasi pada 37°C selama satu jam. Reaksi dihentikan dengan penambahan empat kali pelarut sampel SDS PAGE dan diinkubasi 20 menit pada 37°C, kemudian sebanyak 10 µl sampel yang diuji elektroforesis dalam SDS PAGE 12.5%.

Toksin yang tertelan oleh manusia akan diabsorpsi di dalam saluran pencernaan. Aktivitas toksin terhadap sel pertahanan tubuh dapat dilihat dari daya kerjanya pada uji terhadap Imunoglobulin G (Gambar 2). Toksin tipe D tidak mendegradasi IgG manusia, namun mendegradasi sinaptobrevin yang memang berfungsi sebagai substratnya (Gambar 3). Komunikasi antarsel saraf terjadi melalui pelepasan neurotransmitter secara eksositosis. Proses pelepasan neurotransmitter melalui fusi sel diregulasi oleh konsentrasi kalsium intraseluler. Fusi sel terjadi melalui pengenalan akseptor dan reseptor pada dua



Gambar 2. Uji bioaktivitas toksin *C. botulinum* D terhadap synaptobrevin2 pada SDS PAGE. Lajur 1. marker; lajur 2, 3, 4. Syb2 (80 µg, kontrol); lajur 5, 6, 7. Synaptobrevin (80 µg) dengan toksin *C. botulinum* D (8 µg) dengan waktu inkubasi 1jam pada suhu 37°C.



Gambar 3. Uji aktivitas toksin *C. botulinum* D terhadap Imunoglobulin G. Lajur 1. Marker; Lajur 2. IgG (80 µg); Lajur 3, 4. Ig G (80 µg), dengan toksin *C. botulinum* D (8 µg).

membran sel yang akan berfusi dan dikenal dengan hipotesis *soluble NSF attachment protein receptor* (SNARE). Sel saraf yang termasuk ke dalam SNARE adalah *vesicle associated membran protein* (VAM) yang dikenal juga dengan nama Sinaptobrevin, Sintaksin, dan SNAP-25 (*synapse associated protein* - 25 kDa).

Proses fusi sel saraf dimulai dengan asosiasi sinaptobrevin dengan sinaptofisin (protein pada vesikel sinapsis). Pada membran plasma, sintaksin terikat pada protein n-sec1. Sintaksin dan n-sec1 berdisosiasi melalui mekanisme yang belum diketahui dan mengizinkan pembentukan kompleks protein yang tersedimentasi pada 7S. Kompleks 7S ini mengandung sinaptobrevin, sintaksin, SNAP-25, dan Sinaptotagmin (protein vesikel sinapsis). Sinaptotagmin berdisosiasi dari kompleks 7S dan digantikan oleh protein *soluble NSF attachment* dan menyebabkan *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein* (NSF) bergabung dan membentuk kompleks 20S. NSF bersifat ATPase dan aktivitasnya menghasilkan fusi membran melalui intermediat yang diketahui (Bajjalech & Scheller 1995).

Satu isolat *Clostridium botulinum* asal Bogor menghasilkan toksin tipe D dan mendegradasi sinaptobrevin2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Kontrak No. 012/P2IPT/PHBVII. Ucapan terima kasih disampaikan pula kepada Heiner Niemann (Universitas Hannover, Jerman) yang telah membantu menyediakan fasilitas laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajjalech SM, Scheller RH. 1995. The biochemistry of neurotransmitter secretion. *J Biol Chem* 270:1971-1974.
- Binz T, Blasi J, Yamasaki S, Baumeister A, Links E, Suedhof TC, Jahn R, Niemann H. 1994. Proteolysis of SNAP-25 by types E and a botulin neurotoxins. *J Biol Chem* 269:1617-1620.
- Carlin F, Peck MW. 1995. Growth and toxin production by non-proteolytic and proteolytic *Clostridium botulinum* in cooked vegetables. *Appl Microbiol* 20:152-156.
- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Suedho TC, Niemann H. 1994. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO* 13:5051-5061.
- Hielm S, Bjorkroth J, Hyytia E, Korkeala H. 1998. Prevalence of *Clostridium botulinum* in finnish trout farms: pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Appl Environ Microbiol* 64:4161-4167.
- Hobbs G, Williams K, Willis AT. 1971. Basic Methods for the isolation of clostridia. Di dalam: Shapton DA, Board RG (ed). *Isolation of Anaerobes*. London Academic. hlm 1-23.
- Levett PN. 1991. *Anaerobic Microbiology. A Practical Approach*. Oxford: Oxford Univ.
- MacDonald KL, Spengler RF, Hatheway CL, Hargrett NT, Cohen ML. 1985. Type A botulism from sauteed onions. *JAMA* 253:1275-1278.
- Popoff MR. 1995. Ecology of neurotoxicogenic strains of Clostridia. Di dalam: Montecucco C. *Clostridial neurotoxins: the molecular pathogenesis of tetanus and botulism*. Berlin: Springer Verlag.
- Schiavo G, Benefenati F, Poulain B, Rossetto O, de Laureto PP, dasGupta BR, Montecucco C. 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxin block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359:832-835.
- Schiavo G, Malizio TWS, de Laureto PP, Milan G, Sugiyama H, Johnson EA, Montecucco C. 1994. Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single ala-ala Peptide bond. *J Biol Chem* 269:20213-20216.
- Schiavo G, Shones CC, Benneth MK, Scheller RH, Montecucco. 1995. Botulinum neurotoxin type C cleaves a single lys-ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J Biol Chem* 270:10566-10570.
- Shone CC, Tranter HS. 1995. Growth of clostridia and preparation of their neurotoxins. Di dalam: Montecucco C. *Clostridial neurotoxins: the molecular pathogenesis of tetanus and botulism*. Berlin: Springer Verlag.
- Vaughan VC, McKay RJJr, Behrman RE. 1979. Textbook of Pediatrics. W.B. Company Philadelphia.
- Wainwright RB, Heyward WL, Middaugh JP, Hatheway CL, Harpster AP, Bender TR. 1988. Food-borne botulism in Alaska, 1947-1985: epidemiology and clinical findings. *J Infects Dis* 157:1158-1162.