

Analisis Genetik Gen *Protective Antigenic* pada *Bacillus anthracis* Isolat Jawa Tengah dan Yogyakarta

(GENETIC ANALYSIS ON PROTECTIVE ANTIGENIC GENE OF
BACILLUS ANTHRACIS ISOLATES OF CENTRAL JAVA AND YOGYAKARTA)

**Maxs Urias Ebenhaizar Sanam¹, Widya Asmara²,
Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni², Michael Haryadi Wibowo²**

¹Lab Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana
Jl. Adi Sucipto, Penfui, Kupang, Nusa Tenggara Timur, 85001.

Telp (0380) 8850291, Email: maxi_sanam@yahoo.com

²Bagian Mikrobiologi, FKH Universitas Gadjah Mada

Jln. Fauna No 2, Kampus UGM, Karangmalang, Yogyakarta, 55281

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap keragaman sekuen dan genotipe gen *protective antigenic* (*pagA*) dari *Bacillus anthracis* isolat JawaTengandan Yogyakarta. Gen *pagA* menyandi pembentukan protein antigenik (PA), salah satu komponen toksin dan faktor virulensi utama *B. anthracis*. Sbanyaklima isolat kasus lapang asal Kabupaten Semarang, Sragen, dan Boyolali (Jawa Tengah) serta Sleman (Yogyakarta) digunakan dalam penelitian ini. Tiga pasang primer PA 1857/PA 2436, PA8/5 dan PA5F/5R digunakan dalam amplifikasi dan sekuensing. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa semua sekuen nukleotida gen *pagA* isolat yang diteliti dan dua strain rujukan *B. anthracis* *Ames Ancestor* dan *Sterne* adalah sangat identik, dan hanya berbeda satu nukleotida dengan sekuen pembanding *B. anthracis* strain *Sterne* M22589. Seluruh sekuen gen *pagA* yang diuji dikonfirmasi sebagai genotipe 1, tipe yang sama dengan sekuen *B. anthracis* strain '*Ames Ancestor*' dan *strain* *Sterne*. Disimpulkan bahwa seluruh isolat *B. anthracis* asal Jawa Tengah dan Yogyakarta dalam penelitian ini memiliki sekuen nukleotida gen *pagA* yang identik dan merupakan genotipe 1. Diperlukan penelitian lanjutan yang melibatkan lebih banyak isolat dari berbagai daerah dan beragam tahun isolasi untuk mengungkapkan keragaman sekuen dan genotipe gen *pagA* di Indonesia.

Kata-kata kunci : *pagA*, genotipe, *protective antigenic*, *Bacillus anthracis*

ABSTRACT

The aim of the study was to determine sequence and genotype diversity of protective antigenic gene of *Bacillus anthracis* isolated from Central Java and Yogyakarta. *Pag-A* gene which encodes for antigenic protein is one toxin component and the virulent factor of *B. anthracis*. As many as five isolates from Semarang, Sragen, and Boyolali (Central Java) and Sleman (Yogyakarta) were used. The gene was sequenced and amplified used three set of primers PA1857/PA2436, PA8/PA5, and PA-5F/PA-5R. The result showed that the nucleotide sequences of gene from five isolates were identical and only had one nucleotide difference as compared to *B. anthracis* *sterne* M22589. All isolates were confirmed as genotype based on *pag-A* sequence. It was concluded that all *B. anthracis* from Central Java and Yogyakarta have identical *pag-A* sequence and belong to genotyp-1. Further studies are needed to investigate *B. anthracis* isolates from other regions of Indonesia.

Key words : *pagA*, genotype, *protectiveantigenic*, *Bacillus anthracis*.

PENDAHULUAN

Bacillus anthracis adalah bakteri berbentuk batang, bersifat Gram positif, dan membentuk spora. Kuman *B. anthracis* merupakan agen penyebab penyakit antraks yang bersifat fatal pada hewan terutama ruminansia, baik yang didomestikasi maupun liar. Kuman antraks dapat menular kepada manusia melalui kontak kulit dengan spora, inhalasi, ataupun ingesti spora sehingga menimbulkan antraks kulit, antraks pencernaan, ataupun antraks paru (Turner, 1980; Zeina *et al.*, 2003; Guarner *et al.*, 2003).

Kejadian antraks di Indonesia pertama kali dilaporkan pada tahun 1884 terjadi pada kerbau di Teluk Betung, Lampung (Komnas Zoonosis, 2012). Sampai dengan tahun 2010 antraks telah menjadi endemis di 11 provinsi yaitu: DKI Jakarta, Jawa Barat, Jawa Tengah, Nusa Tenggara Timur, Nusa Tenggara Barat, Sulawesi Selatan, Sulawesi Utara, Jambi, Sumatra Barat, Papua, dan Papua Barat. Provinsi lain yang belum pernah dilaporkan telah terjadi kasus antraks adalah Nanggroe Aceh Darussalam, Riau, Kepulauan Riau, Bangka Belitung, Kalimantan Selatan, Gorontalo, dan Maluku, Maluku Utara (Komnas Zoonosis, 2012). Di Jawa Tengah, antraks terjadi di Kabupaten Semarang tahun 1990, Kabupaten Pati tahun 2007, Kabupaten Sragen tahun 2011 dan 2012, dan Kabupaten Boyolali tahun 2011 dan 2012. Kasus antraks dilaporkan terjadi setiap tahun, sejak 1990 (Sudarsono, 2013). Sementara itu, kasus antraks di Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY), dilaporkan satu kali terjadi di Kabupaten Sleman pada seekor sapi pada tahun 2003 (Sudarsono, 2013).

Virulensi *B. anthracis* ditentukan oleh keberadaan dua plasmid virulennya yaitu plasmid *pXO1* dan *pXO2*. Kehadiran kedua plasmid tersebut mutlak diperlukan dan ketiadaan salah satu plasmid akan menghilangkan virulensi dari strain bersangkutan (Keim *et al.*, 1997). Plasmid *pXO1* membawa tiga gen toksin yakni *pagA*, *lef*, dan *cya* yang masing-masing menyandi *protective antigen* (PA), *lethal factor* (LF), dan *edema factor* (EF) (Okinaka *et al.*, 1999). Sementara itu plasmid *pXO2* membawa tiga gen untuk pembentukan kapsula yakni gen *capA*, *capB*, dan *capC* (Ravel *et al.*, 2009; Koehler, 2009). Gen *pagA* menyandi protein PA yang berperan sebagai faktor pembawa salah satu dari dua toksin *anthrax* yaitu EF atau LF. Adanya kombinasi toksin

tersebut sangat meningkatkan kemampuan bakteri antraks untuk masuk ke dalam sel inang dan menimbulkan penyakit (Young dan Collier, 2007).

Analisis DNA pada kromosom maupun plasmid menunjukkan bahwa strain-strain *B. anthracis* bersifat monomorfik (Read *et al.*, 2002; Kolstø *et al.*, 2009). DNA *B. anthracis* bahkan memiliki homologi yang tinggi dengan *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis* (Ivanova *et al.*, 2003; Kolstø *et al.*, 2009). Analisis genetik gen *pagA* terhadap 26 strain *B. anthracis* dari berbagai negara ditemukan enam hingga delapan mutasi titik. Berdasarkan posisi mutasi atau *single nucleotide polymorphism* (SNP) tersebut, Price *et al.*, (1999) mengelompokkan sekuen gen *pagA* ke dalam delapan genotipe yaitu genotipe 1 - 8. Sue *et al.*, (2007) dalam analisisnya terhadap lebih dari 120 isolat *B. anthracis* dari berbagai negara, menemukan tiga genotipe *pagA* tambahan yaitu genotipe 9, 10, dan 11.

Sekuen dan genotipe gen *pagA* isolat asal Indonesia tidak banyak ditemukan dalam publikasi. Terdapat hanya satu isolat asal Indonesia yaitu isolat J611 yang dianalisis dalam penelitian Price *et al.*, (1999) dan teridentifikasi sebagai genotipe 1. Namun, apakah isolat-isolat Indonesia yang lain, termasuk yang berasal dari kasus antraks di Jawa Tengah dan Yogyakarta, tergolong ke dalam genotipe yang sama (genotipe 1), masih perlu dibuktikan.

Menyadari pentingnya PA dalam menentukan virulensi dan imunogenisitas *B. anthracis* pada inang, serta pentingnya pengetahuan akan keragaman sekuen gen *pagA* untuk digunakan sebagai *marker* epidemiologi, maka telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengungkapkan tingkat keragaman sekuen dan menentukan genotipe gen *pagA* isolat *B. anthracis* asal Jawa Tengah dan Yogyakarta.

METODE PENELITIAN

Isolat *B. anthracis*

Penelitian ini menggunakan lima isolat *B. anthracis* kasus lapang yang diisolasi dan dikoleksi oleh Balai Besar Penelitian Veteriner (BBVet Wates-Yogyakarta). Kelima isolat tersebut berasal dari kasus antraks yang terjadi di empat kabupaten di Jawa Tengah dan DIY yaitu Kabupaten Semarang pada tahun 1990, Sragen (2010 dan 2011), Boyolali (2011), dan

Sleman, DIY (2003). Konfirmasi fenotipik terhadap *B. anthracis* dilakukan melalui uji-uji karakteristik koloni dan sifat hemolitik pada *tripticase soy agar* (TSA) mengandung 5% darah domba, pertumbuhan pada kaldu alkalis, serta pewarnaan Gram, spora, dan kapsula. Pengujian kapsula dilakukan dengan menumbuhkan koloni bakteri pada media TSA mengandung sodium bikarbonat 0,8% dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan level CO₂ 5%. Seluruh prosedur pengujian ini mengacu pada panduan WHO (2008) dan dilakukan di ruangan *Biosafety Level* (BSL 2 plus), Laboratorium *Anthrax*, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA *B. anthracis* dilakukan dengan metode lisis panas (Keim *et al.*, 2000; Hoffmaster *et al.*, 2002). Kultur *B. anthracis* ditumbuhkan pada media TSA yang mengandung 5% darah domba dan diinkubasikan 16-18 jam. Pascainkubasi, diambil satu ose penuh (*loop full*) koloni dan dilarutkan ke dalam 250-500 µL *nuclease free water* kemudian divorteks sampai homogen. Suspensi tersebut dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit dan disentrifugasi selama dua menit dengan kecepatan 12.000-14.000 rpm. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai cetakan DNA, ditransfer ke dalam tabung mikrosentrifus baru dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Primer untuk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan Sekuensing Fragmen Gen *pagA*

Tiga pasang primer yang digunakan untuk amplifikasi dan sekuensing gen *pagA* dalam penelitian ini, dua pasang adalah primer universal, dan satu pasang hasil rancangan

peneliti atas dasar sekuen *pagA* yang dipublikasikan dalam *GenBank*, nomor akses M22589. Primer-primer tersebut (Tabel 1) disintesis oleh 1st BASE FBCO, Singapore.

PCR, Elektroforesis, dan Sekuensing

Metode amplifikasi PCR merujuk pada prosedur yang dijelaskan WHO (1998) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 50 µL campuran PCR berisi 5 µL PCR buffer 10x, 1,5 µL MgSO₄, 1 µL dNTP, 2 µL (10 pM) Primer R dan F, 0,25 µL *Tag DNA polymerase High Fidelity* 5 U/µL (Invitrogen), 5 µL DNA templat, dan 33,25 µL PCR *grade water*. Reaksi predenaturasi 94°C selama 2 menit dilanjutkan dengan 35 siklus, masing-masing terdiri atas denaturasi awal 94°C, 1 menit; *anealing* 52°C, 1 menit; *extension* 68°C, 1 menit. Prosedur ini diakhiri dengan *post extension* 68°C, 5 menit untuk menuntaskan pemanjangan primer, dan selanjutnya pendinginan pada 4°C.

Produk PCR yang terbentuk dievaluasi dengan elektroforesis. Sebanyak 10 µL produk PCR dicampur dengan 2 µL *loading dye* dan selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 1,5% yakni 1,5 gram *agarose* dalam 100 mL *Tris-Acetic acid- EDTA* (TAE) buffer yang ditambahkan *etidium bromide* 0,5 µg/mL bersama 100-bp *ladder* (Invitrogen) sebagai *marker*. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 120 volt selama 30 menit. Visualisasi DNA menggunakan *transluminator ultraviolet* (UV) dan hasilnya didokumentasikan dengan kamera.

Produk-produk PCR yang telah dikonfirmasi kesesuaian ukuran pitanya, dimurnikan dan disekuen menggunakan primer *forward* dan *reverse* yang juga digunakan untuk PCR. Proses pemurnian produk PCR dan sekuensing dilakukan oleh 1st BASE Laboratories Malaysia

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi dan sekuensing gen *pagA* (Pricet *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2004; Hoffmaster *et al.*, 2002)

Primer	F/R	Sekuen (5'! 3')	Tapak perlekatan ^a	Ukuran ampikon (bp)
PA1857 ^b	F	TCAAGCACAGGTAATTTAGAGG	1858-1879	580
PA2436 ^b	R	TTCCATCATTGTCACGGTCTG	2437-2417	580
PA8	F	GAGGTAGAAGGATATACGGT	2452-2471	597
PA5	R	TCCTAACACTAACGAAGTCG	3048-3029	597
PA-5F	F	ATCCTAGTGATCCATTAGAAACGAC	3416-3440	330
PA-5R	R	CTTCTCTATGAGCCTCCTTAACTACTG	3745-3719	330

Keterangan : a= sesuai posisi nukleotida Genbank nomor akses M22589; b= Primer rancangan peneliti sendiri menggunakan *software* Primer3Plus; F= *forward*; R= *Reverse*

melalui PT Genetika Science Indonesia (<http://www.ptgenetika.com>).

Analisis Data

Semua data sekuen baik *forward* maupun *reverse* disejajarkan terlebih dahulu agar didapatkan sekuen konsensus, selanjutnya sekuen-sekuen tersebut dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA versi 5 (Tamura *et al.*, 2011). Variabel yang dianalisis meliputi variabilitas dan genotipe sekuen, serta hubungan filogenetik menggunakan metode *neighbor-joining*.

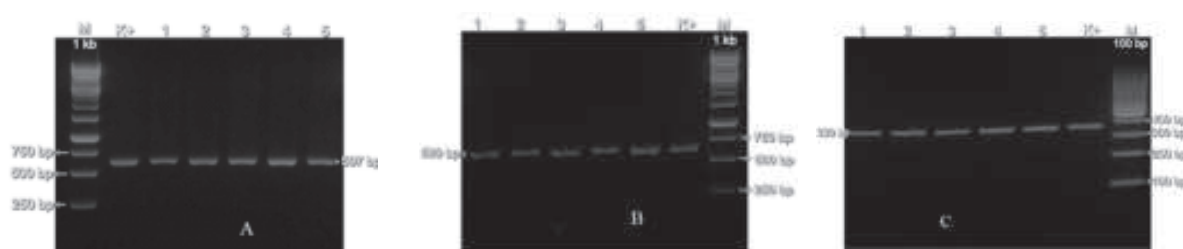
HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi PCR dengan menggunakan tiga pasang primer dalam tiga reaksi yang berbeda menghasilkan pita-pita DNA dengan ukuran pasang basa (bp) sebagaimana diharapkan (Gambar 1 A, B, dan C). Dua pasang primer universal dalam penelitian ini telah dipergunakan oleh para peneliti sebelumnya. Primer PA5/PA8 adalah pasangan primer universal yang direkomendasi untuk konfirmasi diagnosis antraks dengan membuktikan keberadaan fragmen gen *pagA* pada plasmid *pXO1 B. anthracis* (WHO, 1998; WHO, 2008). Sementara itu, pasangan primer 5F/5R digunakan dalam amplifikasi dan sekuensing fragmen 330 bp yang memiliki variabilitas nukleotida tinggi (Price *et al.*, 1999; Hoffmaster *et al.*, 2002). Pasangan primer PA 1857 dan PA 2436 dirancang untuk mengamplifikasi sekuen pada domain 1 yang dilaporkan memiliki SNP pada posisi nukleotida nomor 1998 dan 1999 (Price *et al.*, 1999; Sue *et al.*, 2007). Primer hasil rancangan ini secara konsisten mampu mengamplifikasi fragmen domain 1 tersebut. Hal ini mengindikasikan bahwa primer tersebut

berpotensi untuk digunakan sebagai primer diagnostik bagi *B. anthracis*.

Tiga sekuen gen *pagA* hasil amplifikasi dengan tiga pasang primer dianalisis dalam penelitian ini. Ketiga sekuen parsial tersebut masing-masing dibandingkan melalui penjajaran dengan sekuen *pagA* bakteri *B. anthracis strain* Sterne (Nomor akses GenBank M22589), sekuen yang digunakan oleh peneliti sebelumnya (Price *et al.*, 1999; Sue *et al.*, 2007; Hoffmaster *et al.*, 2002) sebagai sekuen standar dalam penentuan genotipe *pagA*. Dua sekuen rujukan NCBI yaitu *B. anthracis 'Ames Ancestor'* (NC_007322.2) dan *B. anthracis strain* Sterne (NC_001496.1) juga ikut dibandingkan. Sekuen rujukan utama dalam penelitian ini adalah sekuen *B. anthracis strain 'Ames Ancestor'*, yang telah direkomendasikan sebagai strain rujukan dalam semua studi perbandingan sekuen *B. anthracis* (NCBI, 2013; Ravel *et al.*, 2009).

Hasil penjajaran berpasangan maupun jamak semua sekuen uji dengan sekuen rujukan sepanjang 588 nt menggunakan program Clustal W MEGA5 diketahui bahwa antara sekuen uji yang satu dengan yang lainnya memiliki tingkat kesamaan 100%, sedangkan antara sekuen uji dengan sekuen rujukan hanya ditemukan satu SNP pada fragmen hasil amplifikasi pasangan primer PA8/PA5 pada posisi nukleotida nomor 2743 berdasarkan sekuen M22589 (Tabel 2). Tidak ditemukan SNP pada sekuen atau fragmen amplifikasi PCR oleh dua pasangan primer lainnya yakni pasangan primer PA 1846F/PA 2443R dan pasangan 5F/5R (Gambar hasil penjajaran sekuen tidak ditampilkan). Dengan kata lain, kedua sekuen gen *pagA* parsial tersebut masing-masing bersifat identik baik pada perbandingan antar isolat uji maupun antara sekuen isolat uji dan sekuen rujukan. Temuan ini hampir sama dengan yang



Gambar 1 : Pita-pita DNA hasil amplifikasi PCR dengan pasangan primer PA 1857/PA 2436 (A); Pasangan primer PA8/PA5 (B), dan pasangan primer 5F/5R (C). Amplifikasi PCR dengan pasangan primer tersebut berturut-turut menghasilkan pita DNA berukuran sekitar 580, 597, dan 330 bp. Keterangan: M= Marker DNA 1 kb atau 100 bp; K⁺ = kontrol positif; 1,2,3,4,5 = lajur pita DNA kelima isolat uji.

dilaporkan oleh Hoffmaster *et al.*, (2002) yang melaporkan tingkat homologi 100% dari total 42 sekuen gen *pagA* yang dibandingkan dengan sekuen M22589. Namun, berbeda dengan hasil penelitian Price *et al.*, (1999) yang menemukan

SNP terbanyak (5 dari 7 SNP) pada segmen sekuen sepanjang 152 nukleotida (nt) yang berada dalam segmen amplifikasi pasangan primer 5F/5R sepanjang 330 nt.

Tabel 2. Hasil penyejajaran sekuen-sekuen uji hasil amplifikasi primer PA8/PA5, dengan sekuen pembanding M22589 dan sekuen rujukan NCBI sepanjang 588 nt. Keterangan: (.) = nukleotida identik dengan nukleotida paling atas (Sekuen M22589); (C)= huruf-huruf yang dicetak tebal menunjukkan nukleotida pada posisi SNP; Ba_M = sekuen *B. anthracis* M22589; Ba_AA = *B. anthracis* Ames Ancestor; *B. anthracis* strain Sterne; Ba_Sm90= isolat semarang 1990; Ba_Sr10= isolat Sragen 2010; Ba_Sr11= isolat Sragen 2011; Ba_By11= isolat Boyolali 2011; Sl03= isolat Sleman 2003.

#Ba_M	GTA	GAA	GGA	TAT	ACG	GTT	GAT	GTC	AAA	AAT	AAA	AGA	ACT	TTT	CTT	[45]
#Ba_AA	[45]
#Ba_Str	[45]
#Ba_Sm90	[45]
#Ba_Sr10	[45]
#Ba_Sr11	[45]
#Ba_By11	[45]
#Ba_Sl03	[45]
#Ba_M	TCA	CCA	TGG	ATT	TCT	AAT	ATT	CAT	GAA	AAG	AAA	GGA	TTA	ACC	AAA	[90]
#Ba_AA	[90]
#Ba_Str	[90]
#Ba_Sm90	[90]
#Ba_Sr10	[90]
#Ba_Sr11	[90]
#Ba_By11	[90]
#Ba_Sl03	[90]
#Ba_M	TAT	AAA	TCA	TCT	CCT	GAA	AAA	TGG	AGC	ACG	GCT	TCT	GAT	CCG	TAC	[135]
#Ba_AA	[135]
#Ba_Str	[135]
#Ba_Sm90	[135]
#Ba_Sr10	[135]
#Ba_Sr11	[135]
#Ba_By11	[135]
#Ba_Sl03	[135]
#Ba_M	AGT	GAT	TTC	GAA	AAG	GTT	ACA	GGA	CGG	ATT	GAT	AAG	AAT	GTA	TCA	[180]
#Ba_AA	[180]
#Ba_Str	[180]
#Ba_Sm90	[180]
#Ba_Sr10	[180]
#Ba_Sr11	[180]
#Ba_By11	[180]
#Ba_Sl03	[180]
#Ba_M	CCA	GAG	GCA	AGA	CAC	CCC	CTT	GTG	GCA	GCT	TAT	CCG	ATT	GTA	CAT	[225]
#Ba_AA	[225]
#Ba_Str	[225]
#Ba_Sm90	[225]
#Ba_Sr10	[225]
#Ba_Sr11	[225]
#Ba_By11	[225]
#Ba_Sl03	[225]

Lanjutan Tabel 2

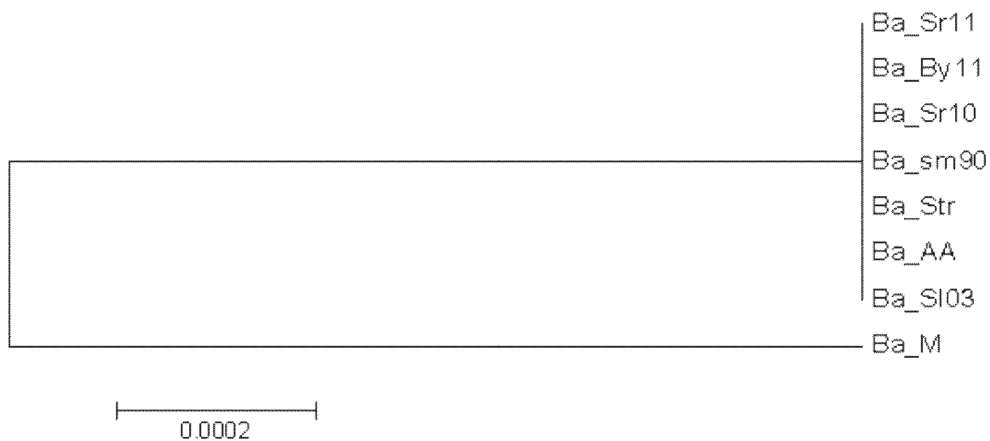
#Ba_M	GTA	GAT	ATG	GAG	AAT	ATT	ATT	CTC	TCA	AAA	AAT	GAG	GAT	CAA	TCC	[270]
#Ba_AA	[270]
#Ba_Str	[270]
#Ba_Sm90	[270]
#Ba_Sr10	[270]
#Ba_Sr11	[270]
#Ba_By11	[270]
#Ba_Sl03	[270]
#Ba_M	ACA	CAG	AAT	ACT	GAT	AGT	GAA	ACG	AGA	ACA	ATA	AGT	AAA	AAT	ACT	[315]
#Ba_AA	C	[315]
#Ba_Str	C	[315]
#Ba_Sm90	C	[315]
#Ba_Sr10	C	[315]
#Ba_Sr11	C	[315]
#Ba_By11	C	[315]
#Ba_Sl03	C	[315]
#Ba_M	TCT	ACA	AGT	AGG	ACA	CAT	ACT	AGT	GAA	GTA	CAT	GGA	AAT	GCA	GAA	[360]
#Ba_AA	[360]
#Ba_Str	[360]
#Ba_Sm90	[360]
#Ba_Sr10	[360]
#Ba_Sr11	[360]
#Ba_By11	[360]
#Ba_Sl03	[360]
#Ba_M	GTG	CAT	GCG	TCG	TTC	TTT	GAT	ATT	GGT	GGG	AGT	GTA	TCT	GCA	GGA	[405]
#Ba_AA	[405]
#Ba_Str	[405]
#Ba_Sm90	[405]
#Ba_Sr10	[405]
#Ba_Sr11	[405]
#Ba_By11	[405]
#Ba_Sl03	[405]
#Ba_M	TTT	AGT	AAT	TCG	AAT	TCA	AGT	ACG	GTC	GCA	ATT	GAT	CAT	TCA	CTA	[450]
#Ba_AA	[450]
#Ba_Str	[450]
#Ba_Sm90	[450]
#Ba_Sr10	[450]
#Ba_Sr11	[450]
#Ba_By11	[450]
#Ba_Sl03	[450]
#Ba_M	TCT	CTA	GCA	GGG	GAA	AGA	ACT	TGG	GCT	GAA	ACA	ATG	GGT	TTA	AAT	[495]
#Ba_AA	[495]
#Ba_Str	[495]
#Ba_Sm90	[495]
#Ba_Sr10	[495]
#Ba_Sr11	[495]
#Ba_By11	[495]
#Ba_Sl03	[495]
#Ba_M	ACC	GCT	GAT	ACA	GCA	AGA	TTA	AAT	GCC	AAT	ATT	AGA	TAT	GTA	AAT	[540]
#Ba_AA	[540]
#Ba_Str	[540]

Lanjutan Tabel 2

#Ba_Sm90	[540]
#Ba_Sr10	[540]
#Ba_Sr11	[540]
#Ba_By11	[540]
#Ba_Sl03	[540]
#Ba_M	ACT	GGG	ACG	GCT	CCA	ATC	TAC	AAC	GTG	TTA	CCA	ACG	ACT	TCG	TTA		[585]
#Ba_AA	[585]
#Ba_Str	[585]
#Ba_Sm90	[585]
#Ba_Sr10	[585]
#Ba_Sr11	[585]
#Ba_By11	[585]
#Ba_Sl03	[585]
#Ba_M	GTG																[588]
#Ba_AA	...																[588]
#Ba_Str	...																[588]
#Ba_Sm90	...																[588]
#Ba_Sr10	...																[588]
#Ba_Sr11	...																[588]
#Ba_By11	...																[588]
#Ba_Sl03	...																[588]

Ditemukannya SNP pada posisi 2743 (G[!]C) merupakan hal yang unik karena belum pernah dilaporkan dalam berbagai publikasi pada tahun-tahun sebelumnya. Namun, apakah SNP tersebut dapat dianggap sebagai suatu mutasi titik belum dapat dipastikan mengingat hasil penelitian Okinaka *et al.*, (1999) terhadap strain M22589 yang digunakan Price *et al.*, (1999) tersebut menemukan nukleotida C dan bukan G pada tapak 2743. Sekuen fragmen gen *pagA* yang dilaporkan Okinaka *et al.*, (1999) tersebut adalah sama dengan sekuen yang ditemukan dalam penelitian ini.

Analisis filogenetik menggunakan metode *neighbor-joining* menghasilkan dua kelompok sekuen yang menempatkan kelima sekuen uji dan dua sekuen rujukan dalam satu cabang yang sama dan terpisah dari sekuen pembanding M22589 pada cabang yang lain (Gambar 2). Terbentuknya dua cabang yang berbeda ini semata-mata karena adanya satu SNP pada posisi 2743. Konstruksi pohon filogeni tersebut menegaskan tingkat kekerabatan yang tinggi antara kelima isolat uji dan strain rujukan *B. anthracis strain 'Ames Ancestor'* serta *B. anthracis strain Sterne*.



Gambar 2. Konstruksi pohon filogeni dengan metode *neighbor joining* terhadap *Bacillus anthracis* isolat Sragen 2011 (Ba_Sr11), Boyolali 2011 (Ba_By11), Sragen 2011 (Ba_Sr11), Semarang 1990 (Ba_Sm90), Sleman 2003 (Ba_Sl03), *Bacillus anthracis Strain Sterne* (Ba_Str), *Bacillus anthracis Ames Ancestor* (Ba_AA).

Tabel 3. Posisi SNP pada sekuen komplit dan genotipe gen *pagA*^a

Sekuen	Posisi Nukleotida									Nomor akses GeneBank	Gt
	1998	1999	2743	2883	3481	3496	3602	3606	3672		
B.a_M	C	T	G	G	T	C	C	T	A	M22589	1
B.a_AA	C	T	C	G	T	C	C	T	A	AE017336.2	1
B.a_Str	C	T	C	G	T	C	C	T	A	AF065404.1	1
Sem_90	C	T	C	G	T	C	C	T	A	-	1
Srg_10	C	T	C	G	T	C	C	T	A	-	1
Srg_11	C	T	C	G	T	C	C	T	A	-	1
Byl_11	C	T	C	G	T	C	C	T	A	-	1
Slm_03	C	T	C	G	T	C	C	T	A	-	1

Keterangan : polimorfisme (SNP) ditandai dengan huruf yang dicetak tebal; a= posisi didasarkan pada koordinat sekuen M22589 (Price *et al.*, 1999); Gt= genotipe; - = belum terdaftar pada GenBank; B.a_M = sekuen M22589; B.a_AA= sekuen *pagA B. anthracis* 'Ames Ancestor'; B.a_Str= sekuen *pagA B. anthracis* strain Sterne; Sem_90= sekuen *pagA B. anthracis* isolat Semarang 1990;; Srg_10= sekuen *pagA B. anthracis* isolat Sragen 2011; Byl_11= sekuen *pagA B. anthracis* isolat Boyolali 2011; Slm_03= sekuen *pagA B. anthracis* isolat Sleman 2003

Bakteri *B. anthracis* adalah mikro-organisme dengan DNA yang bersifat monomorfik, tingkat kesamaan nukleotida di antara *strain* atau isolat dapat mencapai lebih dari 99% (Hoffmaster *et al.*, 2002; Read *et al.*, 2003; Kolstø *et al.*, 2009). Perbedaan hanya terjadi pada beberapa posisi SNP (Read *et al.*, 2003). Namun demikian, SNP pada gen *pagA* bersifat spesifik dan berdasarkan posisi dan kombinasinya, SNP dapat digunakan untuk mengelompokkan *pagA* ke dalam 11 tipe (Price *et al.*, 1999; Sue *et al.*, 2007). Pasangan-pasangan primer dalam penelitian ini dirancang untuk mengapit semua peluang SNP yang ada pada *pagA*, sebagaimana dilaporkan para peneliti sebelumnya (Price *et al.*, 1999; Hoffmaster *et al.*, 2002; Leendertz *et al.*, 2006; Sue *et al.*, 2007). Rekapitulasi jenis nukleotida pada posisi prediksi SNP, dan penentuan genotipe gen *pagA*, disajikan pada Tabel 3.

Pada Tabel 3 disajikan bahwa semua sekuen gen *pagA* asal kasus antraks Jawa Tengah dan Yogyakarta termasuk ke dalam genotipe 1. Fenomena dominasi genotipe 1 dalam total koleksi *B. anthracis* dalam penelitian ini sama dengan yang dilaporkan Hoffmaster *et al.*, (2002) menemukan 42 dari 42 strain atau 100% *pagA* adalah tipe 1. Tipe yang sama juga dilaporkan oleh Cheung *et al.*, (2005) pada satu kasus antraks manusia di Hong Kong. Berbeda dengan itu, Price *et al.*, (1999) menemukan dominasi genotipe 5 yaitu 14 dari 26 isolat atau 53%, sedangkan genotipe 1 kurang dari 20% (5/26). Sue *et al.*, (2007) dalam analisisnya

terhadap 124 sekuen *pagA* melaporkan dominasi sekuen tipe 6 sebesar 50%, diikuti tipe 5 (35%), dan tipe 1 (10%). Perbedaan dominasi genotipe ini sangat mungkin terkait dinamika mutasi dan perbedaan lokasi asal isolat atau strain *B. anthracis* yang diteliti. Perbedaan genotipe dapat saja berpengaruh terhadap perbedaan virulensi *B. anthracis* tetapi hingga saat ini belum ada data atau laporan perbandingan virulensi di antara genotipe gen *pagA* bakteri *B. anthracis* tersebut.

SIMPULAN

Isolat *B. anthracis* asal Jawa Tengah dan DIY memiliki sekuen gen *pagA* yang identik dengan sekuen rujukan utama dan mengindikasikan bahwa isolat-isolat tersebut belum mengalami mutasi dan masih mempertahankan sekuen alaminya. Sekuen gen *pagA* isolat uji asal kabupaten-kabupaten di Jawa tengah dan DIY adalah identik satu sama lain dan termasuk ke dalam genotipe 1. Mengingat sifat monomorfik atau homogenitasnya, gen *pagA* tidak dapat digunakan sebagai *marker* untuk menentukan asal geografis isolat *B. anthracis*.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut yang melibatkan isolat yang lebih banyak dan

bervariasi, baik dari aspek tahun isolasi maupun asal geografis, untuk mengungkapkan semua kemungkinan genotipe gen *pagA* di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Balai Besar Veteriner Wates, Yogyakarta dan Kepala Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor atas izin menggunakan koleksi isolat *B. anthracis*, dan kepada Dirjen Dikti melalui DP3M Dikti yang menyediakan dana penelitian Hibah Disertasi Doktor Tahun Anggaran 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Cheung DTL, Kam KM, Hau KL, Au TK, Marston CK, Gee JE, Popovic T, Van Ert MN, Kenefic L, Keim P, Hoffmaster AR. 2005. Characterization of a *Bacillus anthracis* isolate causing a rare case of fatal anthrax in a 2-year-old boy from Hong Kong. *J Clin Microbiol* 43: 1992–1994
- Guarner J, Jernigan JA, Shieh WJ, Tatti K, Flannagan LM, Stephens DS, Popovic T, Ashford DA, Perkins BA, Zaki SR. 2003. Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. *Am J Pathol* 163: 701–709.
- Hoffmaster AR, Fitzgerald CC, Ribot E, Mayer LW, Popovic T. 2002. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. *Emerg Infect Dis* 8: 1111-1116.
- Inoue S, Noguchi A, Tanabayashi K, Yamada A. 2004. Preparations of a positive control DNA for molecular diagnosis of *Bacillus anthracis*. *Jpn J Infect Dis* 57: 29-32.
- Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, Bhattacharyya A, Reznik G, Mikhallova N, Lapicius A, Chu L, Mazur M, Goltsman E, Larsen N, D'Souza M, Walunas T, Grechkin Y, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Ehrlich SD, Overbeek R, Kyrpides N. 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis *Bacillus anthracis*. *Nature* 423: 87-91.
- Keim P, Kalif A, Schupp JM, Hill KK, Travis SE, Richmond K, Adair DM, Hugh-Jones ME, Kuske CR, Jackson P. 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol* 179: 818-824.
- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones, ME. 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182: 2928-2936
- Koehler TM. 2009. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Mol Aspects Med* 30: 386-396.
- Kolstø AB, Tourasse NJ, Økstad OA. 2009. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu Rev Microbiol* 63: 451-476.
- Komnas Zoonosis RI. 2012. Kondisi Umum Pengendalian Zoonosis di Indonesia. Dalam Rencana Strategis Nasional Pengendalian Zoonosis Terpadu 2102-2017: Komnas Zoonosis RI Pp 10-23.
- Leendertz FH, Yumlu S, Pauli G, Boesch C, Couacy-Hymann E, Vigilant L, Junglen S, Schenk S, Ellerbrok H. 2006. A new *Bacillus anthracis* found in wild chimpanzees and a gorilla from West and Central Africa. *PLoS Pathog* 2(1): e8.
- NCBI. 2013. *Bacillus anthracis* str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO1, complete sequence. [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AE017336](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AE017336). Diakses Januari 2014.
- Okinaka RT, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster AR, Hill KK, Keim P, Koehler TM, Lamke G, Kumano S, Mahillon J, Manter D, Martinez Y, Ricke D, Svensson R, Jackson PJ. 1999. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J Bacteriol* 181: 6509-6515.
- Price LB, Hugh-Jones, M, Jackson, PJ, Keim P. 1999. Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 181: 2358-2362.

- Ravel J, Jiang L, Stanley ST, Wilson MR, Decker RS, Read TD, Worsham P, Keim PS, Salzberg SL, Fraser-Liggett CM, Rasko DA. 2009. The Complete Genome Sequence of *Bacillus anthracis* Ames "Ancestor". *J Bacteriol* 191: 445-446.
- Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, Fouts DE, Eisen, JA, Gill SR, Holtzapple EK, Økstad OA, Helgason E, Rilstone J, Wu M, Kolonay JF, Beanan MJ, Dodson RJ, Brinkac, LM, Gwinn M, DeBoy RT, Madpu R, Daugherty SC, Durkin AS, Haft DH, Nelson WC, Peterson JD, Pop M, Khouri HM, Radune D, Benton JL, Mahamoud Y, Jiang L, Hance IR, Weidman JF, Berry KJ, Plaut RD, Wolf AM, Watkins KL, Nierman WC, Hazen A, Cline R, Redmond C, Thwaite JE, White O, Salzberg SL, Thomasonq B, Friedlander AM, Koehler, Hannaq PC, Kolstø AB, Fraser CM. 2003. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 423: 81 -86.
- Read TD, Salzberg SL, Pop M, Shumway M, Umayam L, Jiang L, Holtzapple E, Busch JD, Smith KL, Schupp JM, Solomon D, Keim, P, Fraser CM. 2002. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* 296: 2028-2033.
- Sударsono I. 2013. Pengendalian anthrax dan keterkaitan perilaku masyarakat dengan perkembangan kasus anthrax di kabupaten Boyolali. Buletin Laboratorium Veteriner BBVet Wates Jogjakarta 13 (3): 10-12.
- Sue D, Marston CK, Hoffmaster AR, Patricia P, Wilkins PP. 2007. Genetic diversity in a *Bacillus anthracis* historical collection (1954 to 1988). *J Clin Microbiol* 45(6):1777-1782.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 10: 2731-2739.
- Turner M. Anthrax in Humans in Zimbabwe. 1980. *The Central African Journal of Medicine* 26:: 160-161
- WHO. 1998. *Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Human and Animals*. 3rd edition. <http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax/whoemczdi986text.pdf>. Diakses: 20 Desember 2013.
- WHO. 2008. *Anthrax in humans and animals – 4th ed*. http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax_webs.pdf. Diakses: 20 Desember 2013.
- Young JAT, Collier RJ. 2007. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem* 76: 243-265.
- Zeina A. Kanafani ZA, Ghossain A, Sharara AI, Hatem JM, Kanj SS. 2003. Endemic gastrointestinal anthrax in 1960s Lebanon: clinical manifestations and surgical findings. *Emerg Infect Dis* 9: 520–524.