

- BOTULINUM TOKSIN IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

101A  
101c  
615.37  
Wiq  
S

SIFAT DAN PERANAN TOKSIN BOTULINUM

Oleh:

NURUL WIQOYAH

3002031973111



FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
1997

DAFTAR ISI

Halaman

Pendahuluan .....	1
A. Botulismus pada manusia .....	1
B. Mekanisme reaksi toksin botulinum .....	3
C. Produksi toksin .....	4
D. Aktivasi toksin .....	5
E. Struktur dan sifat toksin .....	6
F. Analisis genetik toksin .....	9
G. Peranan toksin .....	12
H. Imunitas terhadap toksin .....	13

3002031973111



## SIFAT DAN PERANAN TOKSIN BOTULINUM

### Pendahuluan

Telah dilaporkan bahwa racun merupakan agent yang dapat digunakan untuk mengobati penyakit . Beberapa senyawa toksik dari hewan dan tumbuhan digunakan untuk mempelajari fisiologi hewan dan beberapa diantaranya berguna dalam aplikasi klinis.

*Clostridium botulinum* merupakan kuman penghasil neurotoksin yang paling poten. *Clostridium botulinum* dikelompokkan menjadi 7 tipe: A, B, C, D, E, F, dan G berdasarkan tipe toksin yang dan dikenal 8 tipe toksin botulinum (A,B,C1<C2,D,E,F,G) (1,29).

Bermacam-macam neurotoksin mikroba dapat digunakan untuk mengetahui fisiologi sistem syaraf dan pengobatan penyakit otot melalui modifikasi stimulasi syaraf dari aktifitas otot.

Toksin-toksin ini mempengaruhi aktifitas langsung pada sistem syaraf. Toksin ini berbeda dengan toksin mikroba lainnya seperti enterotoksin Cholera dan Dipteria dalam hal menunjukkan aktifitas sitotoksik atau sitolisis. Pada tulisan ini menjelaskan aspek dasar dari toksin botulinum dan dalam aplikasi klinis pada manusia.

#### A. Botulismus pada manusia.

Botulismus adalah suatu intoksikasi atau keracunan makanan karena memakan makanan yang mengandung toksin *Clostridium botulinum* (9) . Toksin yang masuk ke dalam sirkulasi, dapat menyebabkan paralisis berat. Toksin tipe A,B, dan E paling banyak menyebabkan botulismus pada manusia. Tingkat kematian dipengaruhi oleh tipe toksin , penyebaran toksin dalam makanan, kecepatan diagnosa dan terapi antibodi (39).

Botulismus yang disebabkan oleh tipe A sering menunjukkan gejala yang lebih berat dan mortalitas lebih tinggi daripada botulismus yang disebabkan oleh tipe lainnya (9). Botulismus pada umumnya menyebabkan paralisis neuromuskular simetris yang berkembang dengan cepat dan akhirnya terjadi gangguan pernafasan dan jantung yang dapat menyebabkan kematian, Botulismus paling

sering mempengaruhi otot mata dan syaraf otak yang ditandai dengan gejala penglihatan kabur dan ganda, mulut kering, sukar menelan, melemahnya otot leher, ekstremitas proksimal dan bawah. Gejala kadang-kadang berlangsung beberapa bulan. Kelemahan otot tersebut dapat berlangsung selama 1 sampai 2 tahun.

Pada infant botulismus dapat menyerang sistem syaraf pusat, dengan ciri-ciri lemah dan lesu, kesulitan makan, menangis pelan, paralisis flaksid akut yang ditandai dengan kelemahan otot kepala, muka, tenggorokan dan tangan. Hal ini terjadi cepat pada umur minggu pertama dan tertinggi pada umur satu sampai dua tahun (12,26).

Dosis toksin botulinum yang menyebabkan intoksikasi makanan pada manusia tergantung pada individu, sumber dan tipe toksin, jumlah toksin yang dimakan. 0,2 sampai 1 mikrogram toksin (100 sampai 1000 ng/3000-30,000 MLD50) dapat menunjukkan gejala-gejala dan kadang-kadang kematian. Bahkan kurang lebih 0,05 mikrogram toksin dapat menyebabkan kematian (9). Gejala-gejala yang timbul sangat bervariasi kemungkinan karena variasi individu dalam mengabsorpsi toksin dan stabilitas toksin dalam usus. Dosis letal toksin kristal tipe A pada tikus adalah 1,2-2,5 ng (0,03- 0,07 U)/kg (78,80) dan 0,5-0,6 ng/kg pada kelinci dan marmut.

Dosis letal pada macaca rhesus adalah 40 U/kg. Toksin botulinum adalah toksin paling poten untuk primata, dosis letal toksin tipe A pada kera adalah 0,5-0,7 ng/kg berat badan dan satu ng (30 U)/kg pada manusia, sedangkan dosis letal tipe C,D<E yang menyebabkan kematian kera adalah lebih besar dan dosis letal toksin tipe B adalah lebih kecil (9).

Botulismus jarang ditemukan sehingga sangat sulit untuk mendiagnosa dengan cepat. Elektromyograp adalah sangat berguna untuk mendeteksi secara potensial aksi otot. Botulismus dikonormasi dengan identifikasi toksin botulinum dalam serum tinja atau makanan yang dicurigai dengan uji toksisitas dan netralisasi dengan antitoksin tipe spesifik pada tikus. Uji netralisasi dengan antitoksin spesifik menunjukkan tipe toksin (26). Dalam serum penderita lebih banyak ditemukan botulismus tipe B dan E daripada tipe A.

## B. Mekanisme reaksi toksin botulinum

Neurotoksin botulinum A-G adalah berbeda dalam secara antigenik, mempunyai mekanisme dan struktur yang serupa, tetapi terlihat perbedaan yang jelas mekanisme reaksi neurotoksin pada daerah pengikatan, Toksin tipe A dan E, tipe B dan tipe F tampak terikat pada daerah aseptor berafinitas tinggi yang berbeda, dengan afinitas serupa dalam sinaptosom dan pada pertemuan neuro-muskular murine. Pengikatan dapat terjadi pada daerah yang tersusun atas residu sialosyl dan protein, Selain pengikatan dengan daerah aseptor yang berbeda pada permukaan syaraf, toksin botulinum tipe A dan B mempengaruhi pelepasan neurotransmitter secara berbeda. Studi elektrofisiologi menunjukkan bahwa tipe A mempengaruhi pelepasan neurotransmitter secara tidak serempak sedangkan tipe B menunjukkan sebaliknya,

Bentuk paling aktif adalah bila toksin berada dalam bentuk molekul dua rantai yang terikat dengan ikatan disulfida. Rantai berat (H) bertanggung jawab terhadap pengikatan toksin dengan ujung syaraf motorik dan proses internalisasi toksin. Sedangkan rantai ringan (L) berhubungan dengan penetrasi dan aktifitas toksin yang menggeblok pelepasan neurotransmitter acetylcholin melalui pemecahan komponen protein pada alat neurositositosis. Toksin mempunyai aktifitas ensimatis dan bertindak secara katalitik atau pemicu yang menurunkan pelepasan neurotransmitter(17).

Neurotoksin botulinum tipe B bertindak sebagai Zinc-dependent protease, D, F dan G memecah VAMP/ synaptobrevin tunggal yang berbeda. Toksin tipe G memecah VAMP pada ikatan peptida tunggal alanin-alanin (3,31).

Neurotoksin tipe A dan E memecah SNAP-25 yang merupakan suatu protein membran presinapsis pada dua ikatan peptida ckarboksil ujung yang berbeda, dan serotipe C memecah suatu protein plasmalema syaraf (syntaxin). Pemecahan terjadi karena interaksi langsung antara syntaxin dan rantai L toksin yang bertindak sebagai metaloendoprotease. Toksin botulinum menggeblok pelepasan bermacam-macam kelompok neurotransmitter pada syaraf perifer dan pusat (3,8,10,32,30).

Toksin yang masuk dalam tubuh diserap oleh lambung dan usus

kecil bagian atas dan perlahan-lahan diserap usus besar. Kemudian toksin masuk ke sistem syaraf perifer dan terjadi pengikatan sangat spesifik toksin dengan membran ujung presinapsis pada pertemuan neuromuskular, mengeblok pelepasan acetylcholin pada tempat pertemuan tersebut dan toksin mengeblok transmisi kolinergik pada semua sinapsis kolinergik pada sistem syaraf perifer tetapi konduksi sepanjang axon tidak terpenagruh sehingga menyebabkan flaccid paralysis (9,33).

### C. Produksi toksin.

Produksi toksin tipe A dibawah kondisi yang terkontrol dengan strain Hall menghasilkan toksin bentuk kristal dalam jumlah tinggi. Komplek toksin diperoleh dengan kultur dan pemurnian. Strain, komposisi medium dan kondisi kultur mempengaruhi hasil dan struktur toksin botulinum.

Pemeliharaan strain *Clostridium botulinum* yang menghasilkan toksin tinggi secara konsisten adalah penting untuk memperoleh jumlah dan kualitas toksin paling tinggi. Bakteri cenderung kehilangan kemampuan untuk menghasilkan tingkat toksin yang tinggi. Telah dilaporkan bahwa strain tipe A dan B banyak menjadi nontoksigenik selama dalam kultur.

Toksin tipe A (strain Hall) diproduksi dalam medium yang mengandung kasein, ekstrak yeast dan dekstrose dalam jumlah tinggi (1-4 juta MLD50/ml kultur cair). Sel mengalami lisis secara sempurna dalam waktu 2 sampai 3 hari dan toksin dibebaskan selama lisis.

Tingkat toksin tertinggi *Clostridium botulinum* kelompok I (strain proteolitik tipe A<B dan F) pada umumnya dihasilkan oleh populasi sel yang mengalami autolisis dengan cepat dan tidak membentuk spora, meskipun Siegel dan Meltzger memperoleh titer toksin strain Hall sebesar 6,3x100.000 U tidak mengalami lisis. Pembentukan toksin sangat sedikit selama sporulasi (6,9).

Pembentukan toksin pada *Clostridium botulinum* kelompok I dan II dikontrol oleh nutrisi. Arginin memperlambat autolisis, mempengaruhi sporulasi dan menekan pembentukan toksin pada *Clostridium botulinum* kelompok I. Pembentukan toksin ditekan kurang lebih 10.000 kali pada kelompok I ketika arginin terdapat

dalam medium.

Protease diturunkan oleh arginin pada *Clostridium botulinum* kelompok I. Triptofan menekan pembentukan toksin pada *Clostridium botulinum* kelompok II (strain non proteolitik serotipe B, E, dan F) yang kemungkinan juga terangsang terhadap nitrogen (18).

#### D> Aktivasi toksin

Kultur tipe A dan B biasanya menunjukkan potensi toksin lebih besar dari 1x 1.000.000 MLD50/ml, sedangkan tipe E pada tingkat 100 MLD50/ml. Tripsin mengaktivasi toksin tipe E. Penemuan aktivasi menjelaskan morbiditas dan mortalitas dari botulinum tipe E. Toksin progenitor tipe E teraktivasi dalam tractus digestivus inang. Toksin progenitor yang teraktivasi 500 kali lebih toksis dibandingkan toksin progenitor. Kedua toksin ini mempunyai komposisi asam amino dan berat molekul, antigenisitas dan imunogenisitas sama, dan identik dalam hal disosiasi dan reasosiasi molekular. Diperkirakan bahwa aktivasi toksin progenitor tipe E oleh enzim oleh enzim (protease, tripsin) terjadi karena pemecahan ikatan ester antara molekulnya. Toksin derivatif tipe E dengan berat molekul 150.000 Mr terdisosiasi menjadi dua subunit dengan subunit pertama berat molekul 100.000 Mr dan subunit kedua dengan berat molekul 50.00 Mr setelah ditripsinasi, direduksi dan diuji dengan SDS- Elektrofesis. Perlakuan dengan tripsin menyebabkan ikatan peptida dalam toksin progenitor tipe E pecah tetapi dua fragmen tetap terikat bersama oleh minimal satu ikatan disulfida. Tripsinisasi dari kultur *Clostridium botulinum* proteolitik yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung penicillin atau zat kimia atau dipanen pada fase inkubasi yang sangat dini akan meningkatkan toksisitas. *Clostridium botulinum* proteolitik strain C menghasilkan enzim yang mengaktivasi toksin dalam kultur. Enzim proteolitik yang dihasilkan dari tipe B mengaktivasi toksin progenitor tipe E. Aktivitas enzim ini tergantung pada gugus sulfhidril dan mempunyai spesifitas substrat sama dengan tripsin(18).

### E. Struktur dan sifat toksin

Toksin botulinum pada serotipe berbeda yang terbentuk dalam kultur merupakan komplek protein besar atau toksin progenitor yang berukuran besar : 12S (toksin M), 16S (toksin L) atau 19S (toksin LL) (9,10). Komplek toksin dengan berat molekul tinggi secara alami terdapat pada makanan. Tiap-tiap tipe toksin botulinum yang dihasilkan dalam makanan atau dalam kultur merupakan protein terkonjugasi yang mempunyai berat molekul 300.000-900.000 Mr yang terdiri dari molekul dengan satu atau dua unit neurotoksin terikat secara nonkovalen dengan protein nontoksis yang berukuran sama (6-7S) atau lebih besar (12-16S). Komponen toksis 7S lebih labil daripada toksin progenitor terhadap suhu tinggi, pH rendah dan enzim proteolitik (18). Protein nontoksis memainkan peranan penting dalam mempertahankan stabilitas unit neurotoksin yang terdapat pada komplek toksin (9,18). Komplek toksin yang lebih besar (16S dan 19S) lebih toksis secara oral dan lebih resisten terhadap asam dan pepsin daripada komplek toksin yang lebih kecil. Variasi toksigenitas strain yang berbeda kemungkinan tergantung pada perbedaan struktur komplek toksin.

Semua neurotoksin mempunyai toksisitas dengan spesifisitas tinggi dari 10000000 sampai 100000000 MLD<sub>50</sub>/mg protein, Semua tipe neurotoksin disintesa sebagai molekul protein rantai tunggal 150.000 Mr dengan toksisitas rendah. Protoksin dilepaskan dari bakteri selama kultur . Neurotoksin dari strain *Clostridium botulinum* kelompok I dipecah oleh protease ekstraseluler kedalam molekul dua rantai yang terdiri atas rantai H berat molekul 100.000 Mr dan rantai L berat molekul 50.000 Mr yang terikat secara kovalen oleh minimal satu ikatan disulfida dan ikatan non kovalen, dan kemungkinan komponen metal. Rantai H dan L neurotoksin dapat dipisahkan dengan kromatografi setelah perlakuan dengan dithiothreitol dan urea. Rantai yang terisolasi adalah tidak toksis, tetapi dapat direkombinasi pada kondisi terkontrol untuk memperoleh toksin aktiv. toksin kimer sekarang ini terbuat antara rantai L toksin tetanus dan rantai H toksin botulinum tipe A. Toksin kimer tersusun dari fragmen tertentu seperti rantai H dari toksin botulinum dan ranatai L dari recin.



Selama pemecahan proteolitik, neurotoksin mengalami perubahan molekular dalam bentuk yang meningkatkan toksisitas. Daerah patahan (nicking) mengandung sisi target banyak yang peka terhadap lebih dari satu protease. Pengendalian proteolisis meningkatkan stabilitas toksin (5,9,23).

Metal dalam neurotoksin mempengaruhi stabilitas toksin. Chelator besi dan mangan mengaktivasi toksin tipe A. Satu atom besi berada pada tiap-tiap molekul toksin, Metal tersebut kemungkinan terkait pada rantai H dan L pada neurotoksin. Besi penting untuk mempertahankan aktivitasnya (9).

Toksin progenitor terdisosiasi kedalam neurotoksin dan senyawa nontoksis. Purifikasi toksin tipe A dari kultur cair menunjukkan 90% toksin kasar dapat dipresipitasi dengan menambah asam sampai pH 3,5 dan terbentuk kristal dalam 0,9 M amonium sulfat. Kristal toksin A merupakan protein homogenous pada analisa ultrasentrifus dan elektroforesis. Kristal toksin tipe A mengandung 16,2% N dan hanya terdiri atas asam amino. Kristal toksin terdisosiasi kedalam dua komponen pada sentrifugasi dengan pH lebih dari 7,5 dan kekuatan ionik lebih dari 0,13. Komponen yang mempunyai sedimentasi rendah: 6,5-8S dengan berat molekul 40.000-100.000 Mr. Pada pH 9,2, kristal toksin terdisosiasi menjadi 14S dan 7S. Titik isoelektris kristal toksin A adalah 5,6. Pada kondisi sedikit asam, pH 3,5-6,8, komponen neurotoksin 150.000 Mr terikat secara nonkovalen dengan protein nontoksis yang membantu stabilisasi struktur sekunder dan tersier. Pada kondisi pH sedikit alkali (>pH 7,1) dalam darah dan jaringan hewan dan manusia, neurotoksin terlepas dari komplek toksin. Berat molekul toksin adalah 900.000 Mr pada analisis ultrasentrifus pada pH 3,8-4,4. Telah ditunjukkan bahwa toksin A merupakan substansi tunggal pada analisa sentrifus dengan koefisien sedimantasi 19S pada pH 5,6 tetapi pada pH 7,3, komponen toksin terdisosiasi dan merupakan molekul yang lebih kecil (7S) (9,18).

Toksin tipe A meliputi 1296 residu asam amino. Neurotoksin terdiri dari rantai ringan dan rantai berat. Dari sequens asam amino diperkirakan terdapat 9 residu sistein yang berada pada posisi 133,164,790,966 dan 1059 dalam bentuk sulfhidril, sistein

429 dan 453 terdapat ikatan disulfida yang menghubungkan rantai berat dan ringan, sistein 1234 dan 1279 berada diantara rantai ikatan disulfida dekat C terminal rantai berat (25).

Diketahui bahwa beberapa makanan seperti tumbuhan mempunyai sifat botulinogenik tinggi. Terdapat 3 bentuk molekular yang berbeda pada toksin A (10). *Clostridium botulinum* tipe A dan B menghasilkan kompleks 19S dan 16S pada tumbuhan, dan menghasilkan kompleks 12S yang lebih stabil pada ikan tuna. Neurotoksin dapat terpisah dari protein nontoksik dengan kolom kromatografi pada pH alkali.

Aktifitas biologi (toksisitas) toksin adalah karena struktur dari neurotoksin. Toksin terdenaturasi oleh panas pada suhu diatas  $40^{\circ}\text{C}$  terutama pada pH alkali. Pengenceran sampai konsentrasi sangat rendah juga menurunkan stabilitasnya (9).

Toksin dilarutkan dan disimpan dalam 0,05M bufer sodium asetat pH 4,2 pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  untuk mempertahankan sifat toksisitasnya selama 1 sampai 2 tahun. Sifat kristal toksin yang menunjukkan kualitas tinggi adalah absorbansi maksimum pada 278 nm ketika dilarutkan dalam 0,05 M bufer sodium pospat pH 6,8, b: ratio A260/A278 adalah 0,6 atau kurang, c: toksisitas spesifik untuk tikus  $3 \times 10^7$  MLD50/mg d: koefisien eksistensi sebesar 1,65 untuk 1 mg toksin/ml (9).

Toksin botulinum tipe B dari strain non proteolitik membentuk dua toksin (12S dan 16S). Toksin progenitor tipe C 16S dibentuk dari konjugasi neurotoksin dan senyawa nontoksik berupa hemaglutinin dan nonhemaglutinin (16). Strain *Clostridium botulinum* tipe D (CB 16) menghasilkan dua toksin progenitor dengan berat molekul berbeda yaitu 300 kDa dan 500 kDa (toksin M dan L). Toksin progenitor tipe E murni dengan berat molekul 300.000 Mr juga merupakan protein homogenous pada analisa ultrasentrifus Kromatografi ion-exchange dan PAGE pada pH kurang dari 6,8 dan terdisosiasi menjadi neurotoksin dan senyawa nontoksik pada pH 7,2 atau lebih (18). Toksin E membentuk dua garis presipitasi terhadap antitoksin tipe E pada agar gel dengan pH 6. Toksin progenitor F dengan berat molekul 238.000 Mr terdisosiasi menjadi dua komponen neurotoksin dan nontoksik (non hemaglutinin) dengan ukuran identik pada pH lebih dari 7,5.

Protein nontoksik dari kompleks toksin terdiri dari senyawa nontoksik nonhemaglutinin (NTNH) dan hemaglutinin (HA)(9,10). Toksin M terbentuk dari asosiasi neurotoksin dengan nonhemaglutinin dan toksin L terbentuk dari konjugasi toksin M dan hemaglutinin. Hemaglutinin terdiri dari beberapa subkomponen. Komplek toksin A mengandung minimal dua protein nontoksik yang salah satunya mempunyai sifat hemaglutinasi. Hemaglutinin toksin tipe A dan B tersusun dari agregasi dua unit kecil 15000 Mr dan 20.000 Mr. Protein nontoksik yang diisolasi dari tipe A, B, dan E mempunyai derajat aktivitas hemaglutinasi yang bervariasi (Hn+) sedangkan protein nontoksik dari tipe E tidak mempunyai aktivitas hemaglutinasi (Hn-). Tipe A Hn+ dan tipe B Hn- bereaksi silang secara serologis. Tipe A Hn-, tipe B Hn+, tipe C Hn+ terisolasi sebagai agregat besar (220.000-900.000 Mr) terpisah pada SDS-PAGE menjadi beberapa subunit dengan berat molekul lebih dari 17.000 Mr. tipe E Hn- dengan 116.000 Mr tidak dalam bentuk agregat. Hemaglutinin toksin A tersusun dari agregasi dua unit kecil berat molekul 15.000 dan 20.000 Mr (9).

#### F. Analisis genetik toksin

Gen yang mengkode neurotoksin botulinum tipe A, B, dan E berada dalam satu salinan pada kromosom strain. Willem A et al melakukan kloning gen neurotoksin *Clostridium botulinum* tipe A (BoNT/A) pada infant botulismus. Translasi sekuens nukleotida dari gen menunjukkan bahwa gen toksin mengkode protein dari 1296 asam amino (149,425 Mr atau 149,502) (9,38). Kesamaan sekuens antara BoNT/A infant botulismus dan BoNT/A pada food-borne botulismus klasik sebesar 94,9% untuk rantai ringan (perubahan 23 asam amino) dan 87,1% (perubahan 109 asam amino) (38). AUG dan UAA adalah kodon inisiasi dan kodon terminasi. Kandungan A+T pada ujung 5' "non coding region" gen toksin tipe A dan E lebih tinggi dibandingkan kandungan A+T pada "coding region". Kandungan A+T pada "noncoding region" tipe A dan E sebesar 80,4% dan 80,3%, sedangkan pada "coding region" sebesar 73,6% dan 72,1% (5).

Pengujian "upstream region" menunjukkan bahwa transkripsi dimulai dari nukleotida 118 dan 127 bagian upstream dari sisi inisiasi transkripsi. Neurotoksin botulinum tipe A ditranslasi

dari RNA monosistronik. "Open reading frame" (ORF) tunggal ditranslasi dan hanya menghasilkan protein neurotoksin. Sequen gen neurotoksin tipe A menunjukkan bahwa neurotoksin tipe tidak mempunyai signal peptida pada "terminal coding region". Residu sistein adalah conserved pada 1060 dan 1280 dari toksin botulinum dan sistein 454 terjadi pada posisi dalam toksin *Clostridium botulinum* tipe A, B dan E. Sistein 454 adalah residu sistein pada daerah N ujung rantai berat dan termasuk dalam jembatan disulfida rantai ringan dan berat. Sistein 430 juga terletak pada posisi identik pada rantai ringan toksin botulinum dan tetanus. Analisis sequen toksin botulinum tipe A menunjukkan bahwa rantai berat neurotoksin tipe A mempunyai 6 histidin yang tersusun dalam suatu motif yang kemungkinan berepran dalam aksi biologis toksin. Sequen asam amino toksin botulinum tipe A kira-kira mempunyai homologi 30% dengan toksin tetanus dan rantai berat (H) menunjukkan homologi lebih tinggi dari pada rantai ringan (9). Liu s et al melaporkan bahwa kandungan molekul G+C DNA *Clostridium botulinum* tipe A (As-3) sebesar 24,9%. Sequen nukleotida neurotoksin tipe B nonproteolitik menunjukkan bahwa gen toksin mengkode 1291 residu asam amino. Kesamaan sequen antara gen neurotoksin tipe A proteolitik dan nonproteolitik sebesar 97,7% pada rantai L (perubahan 10 asam amino) dan 90,2% pada rantai H (perubahan 81 asam amino). Perbedaan terbesar terdapat pada C ujung (37,20). Rantai L neurotoksin tipe B mempunyai tingkat homologi tertinggi dengan rantai L toksin tetanus (50%), sedangkan rantai H mempunyai tingkat homologi tertinggi dengan rantai H neurotoksin tipe A (51,6%) (37). Tingkat homologi rantai L neurotoksin tipe B dengan neurotoksin Clostridial lainnya tidak lebih dari 36,5%.

Dari hasil kloning gen yang mengkode komponen utama hemagglutinin (HA) dari *Clostridium botulinum* tipe C, sequen nukleotida dari gen menunjukkan bahwa gen tersebut mengkode protein 33.000 Mr. 62bp downstream dari kodon terminasi subunit 33.000 Mr tipe C Hn+ adalah kodon inisiasi yang diikuti dengan coding sequens minimal 34 asam amino. Sequen asama amino yang dihasilkan dari ORF ini mempunyai kesamaan sequen sebesar 73-84% dengan subunit 17.000 Mr dari tipe A Hn+ dan tipe B Hn+ dan



serupa dengan N ujung tipe E Hn- (9).

Gen nontoksis nonhemagglutinin (NTNH) tipe C adalah 17bp dari bagian upstream gen neurotoksin dan pada tipe E adalah 27bp. Gen-gen ini ditranskripsi menjadi mRNA polisistronik yang berawal dari promoter di ujung 5' "untranslated region" gen nonhemagglutinin. Cluster gen hemagglutinin (HA) terletak pada 262bp upstream-gen nonhemagglutinin dan ditranskripsi ke kiri dari ujung 5' daerah "noncoding" gen HA 33. Gen NTNH toksin progenitor tipe C adalah 7,8 dari DNA phage tipe C. Gen terletak antara gen neurotoksin dan HA (10,39). Hauser et al menunjukkan gen C1 neurotoksin botulinum dan gen nontoksis dari phage 1C *Clostridium botulinum* tipe C468. Locus toksin botulinum C1 meliputi 6 gen yang terorganisir kedalam 3 unit transkripsi. Cluster I terdiri dari gen neurotoksin C1 dan gen protein nontoksis dibagian upstream (Antp139/C1) dan membentuk operon. Gen neurotoksin C1 dapat ditranskripsi sendiri atau bersama dengan Antp139/C1. Cluster kedua terdiri dari 3 gen (Antp33/C1, Antp17/C1 dan Antp70/C1) yang membentuk operon. Unit transkripsi ke 3 terdiri atas ORF-22 yang mengkode protein dasar. ORF-22 merupakan efektor yang mengontrol ekspresi gen neurotoksin C1 dan gen protein nontoksis. Toksin C2 terdiri atas 2 protein yang tidak terkait, rantai L dan rantai H. Gen rantai L (bc21) dari strain tipe C (cf203028) terdiri dari ORF yang mengkode 431 residu asam amino (1293 nukleotida) dan tidak mempunyai sekuens signal peptida (15).

Gen NTNH dan HA terletak dibagian upstream gen neurotoksin pada tipe D (CB16). Strain C dan D menghasilkan neurotoksin dan C3 yang mempunyai aktifitas ADPribosyltransferase. Sekuens asam amino N ujung C3 menunjukkan homologi kecil dengan sekuens asam amino dari rantai L neurotoksin beberapa tipe ( ). Dari kloning gen neurotoksin tipe E (NCTC 11219) diperoleh translasi sekuens yang menunjukkan bahwa neurotoksin tipe E terdiri atas 1252 asam amino. Rantai L menunjukkan tingkat kesamaan sekuens tertinggi terhadap toksin tetanus (40%), rantai L neurotoksin botulinum tipe A dan tipe D (BoNT/D) mempunyai kesamaan 33% dengan neurotoksin botulinum tipe E (BoNT/E), sedangkan BoNT/C menunjukkan tingkat kesamaan 32%, rantai berat neurotoksin tipe A, C dan D menunjukkan tingkat kesamaan berturut-turut 46%, 36% dan



37% (36). Telah diklon gen neurotoksin. Sisi pemecahan rantai L dan H toksin tipe E terletak pada arginin 422. Rantai L terdiri dari 422 residu asam amino, 17 residu berbeda antara toksin *Clostridium botulinum* tipe E dan *Clostridium butyricum* (11). Gen nontoksik toksin progenitor terdiri dari 1 ORF yang mengkode 1162 residu asam amino atau 3486 basa nukleotida (13,14).

Analisis sekuen nukleotida gen yang mengkode neurotoksin tipe F strain nonproteolitik menunjukkan ORF yang mengkode protein dari 1274 asam amino yang serupa dengan neurotoksin botulinum lain. Bagian upstream gen toksin adalah akhir ORF yang mengkode C ujung protein yang homolog dengan komponen NTNH toksin progenitor tipe C (8).

Translasi sekuen nukleotida dari fragmen neurotoksin tipe G menunjukkan bahwa gen mengkode protein dari 1297 residu asam amino. Perbandingan sekuen BoNT/G dengan neurotoksin Clostridial lainnya menunjukkan hubungan sekuen tinggi dengan tingkat kesamaan asam amino sebesar 58% (4).

#### G. Peranan toksin.

Secara klinis telah menunjukkan bahwa injeksi toksin dapat meringankan gejala pada penyakit yang ditandai dengan gerakan otot tidak normal terutama yang termasuk dalam distonia segmental. Terdapat penyakit yang dikenal dengan "distonia musculorum deformans" pada anak-anak seperti jalan tidak normal dengan bagian torso kesleo dan bengkok dan spasma otot berat. Distonia adalah suatu sindrom kontraksi otot terus menerus.

Toksin botulinum dapat mengobati keadaan otot yang tidak normal. Toksin bereaksi secara langsung atau tidak langsung untuk mengurangi hiperreaktivitas otot. Injeksi toksin umumnya meringankan(menghilangkan) gerakan otot tidak normal selama beberapa bulan dengan injeksi secara berulang.

Pada strobismus toksin biasanya diinjeksikan kedalam otot rectum. Toksin menimbulkan otot melemah dan kembali normal. Toksin botulinum terutama digunakan untuk memperbaiki distonia focal dan penyakit kelainan otot lainnya seperti blepharospasma yang disertai gerakan otot leher tidak normal yang disebut Meige Syndrome. Injeksi toksin tipe A kedalam otot oculi orbicularis

telah menunjukkan keuntungan secara nyata sebesar 70-90%.

Rata-rata dosis adalah 20 U. Dalam beberapa pengobatan toksin berdifusi ke otot sebelahnya dan menyebabkan ptosis temporal. Beberapa penderita menerima injeksi berulang selama 7 tahun atau lebih. Injeksi toksin (umumnya 10-20 U) telah meringankan kira-kira 90% penderita spasma hemifacial, dan 50-90% penderita dari 1000 kasus Spasmodic torticollis (distonia cervic). Dosis besar toksin diinjeksikan pada beberapa tempat kelainan (9).

#### H. Imunitas terhadap toksin.

Terdapat kemungkinan bahwa penderita akan membentuk antibodi. Dosis toksin utuh memacu pembentukan antibodi pada manusia. Telah dikemukakan bahwa dosis toksin yang menyebabkan tanda-tanda klinis adalah sangat kecil untuk menstimulasi pembentukan antibodi. Dalam kasus tertentu, antitoksin tipe B/E meningkat setelah injeksi tunggal dengan toxoid polivalen yang diberikan 11-67 hari setelah menelan toksin (9,18). Dosis toksin yang tertelan dalam food borne botulism tidak cukup untuk membangkitkan antibodi. Diduga bahwa paparan toksin secara berulang memberi imunitas dalam jangka panjang.

Dosis minimum toxoid untuk memperoleh imunitas pada manusia bervariasi tergantung individu dan preparasi toxoid. Injeksi toxoid polivalen setelah 0,2, dan 12 minggu dan booster/tahun memberikan titer akhir 3,2 IU antibodi antiE/ml pada manusia. Netralisasi antibodi terhadap toksin tipe A dan B adalah rendah. Titer secara nyata ada setelah booster setiap tahun (9).

## Daftar pustaka

1. Alberto J; L.Macario; E.C. de Macario. 1985. Monoclonal Antibodies against Bacteria. Vol II. Academic Press Inc , London, Montreal, Sydney, Tokyo, Toronto:160-164.
2. Binz T; T. Blasi; T. Su; Y. Yamasaki; A. Baueister, E. Link; T.C. Sudhof; R. John; H. Niemann. 1994. Proteolysis of SNAP-25 by type E and A botulinum neurotoxins. J. Biol. Chem; 269 (3):1617-20
3. Blasi J; E.R. Chapman; S. Yamasaki; T. Binz; H. Niemann; R. John. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. EMBO-J, 12(12): 4821-8.
4. Campbell K; M.D. Collins; A.K. East. 1993. Nucleotide sequence of the gene coding for Clostridium botulinum (C. argentinense) type G neurotoxin: genealogical comparison with other Clostridium neurotoxins. Biochem-Biophys-Acta; 1216 (3):487-91.
5. Curtis D; M.O. Klaassem; M.O. Andur; D. John. 1986. Toxicology. The Basic Science of Poisons. 3<sup>th</sup> ed. Mac Millan Publishing Company, New York, Toronto, London.
6. Duda J.J., and J.M. Slack. 1969. Toxin production in Clostridium botulinum as demonstrated by electron microscopy. J. Bacteriol. 97:900-904.
7. Dubos J.R. Bacterial and Mycotic Infections of man. 3<sup>th</sup> ed. Montreal: J.B. Lippincott Company. 1958:359-61.
8. East A.K., P.T. Richardson, D. Allways, M.D. Collins, T.A. Roberts, D.E. Thompson. 1992. Sequence of the gene encoding type F neurotoxin of Clostridium botulinum. FEMS-Microbiol-Lett. 75:225-30.
9. Edward J.S., and E.A. Johnson. 1992. Properties and use of Botulinum Toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine. Microbiol. Rev. 56:80-89.
10. Fujii N., 1995. Structure and function of botulinum toxin. Hokkaido-IgakuZasshi. 70:19-20.
11. Fujii N., K. Kimura, T. Yashiki, K. Suzuki, K. Moriishi, N. Yukosawa, B. Syuto, K. Oguma. 1992. Cloning and whole nucleotide sequence of the gene for the light chain component of botulinum type E toxin from Clostridium butyricum strain BL6340 and Clostridium botulinum type E strain Mashike. Microbiol-Immunol. 36:213-20.
12. Finegold M.S., J.E. Baron, M.H. Wexler. 1992. A Clinical Guide to anaerobic Infections. Star Publishing Company:84.
13. Fujii N., K. Kimura, N. Yokusawa, T. Yashiki, K. Suzuki, K. Oguma. 1993. The complete nucleotide sequence of the gene encoding the nontoxic component of Clostridium botulinum type E progenitor toxin. J. Gen-Microbiol. 139:79.
14. Fujii N., K. Kimura, N. Yosokawa, K. Oguma, T. Yashiki, K. Takheshi, T. Ohyama, E. Tsogai, H. Isogai. 1993. Similarity in nucleotide sequence of the gene encoding nontoxic component of botulinum toxin produced by toxigenic Clostridium butyricum strain BL6340 and Clostridium botulinum type E strain Mashike. Microbiol-Immunol. 37:395-8.





15. Fujii.N., T. Kubota, S. Shirakawa, K. Kimura, I. Ohishi, K. Moriishi, E. Isogai, H. Isogai. 1996. Characterization of component I gene of botulinum C2 toxin and PCR detection of its gene in clostridial species. *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 220:353-9.
16. Fujinaga Y., K. Inoue, K. Takeshi, S. Shimazaki, K. Tomochika K. Tsuzuki, N. Fujii, T. Watanabe, T. Ohyama et al. Molecular construction of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin and its gene organization. *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 205:1291-8.
17. Hambleton P. 1992. *Clostridium botulinum* toxins: a general review of involvement in disease, structure, mode of action and preparation for clinical use. *J. Neurol.* 239:16-20.
18. Hans R., T.L. Bryan. 1979. *Food Science and Technology: a series of Monographs Food Borne Infectious and Intoxications.* 2<sup>nd</sup>ed. Academic Press, London, Sydney, Tokyo, Toronto:400-1,420-22.
19. Hauser D., MW. Klind, F. Boquet, MR. Popoff. 1994. Organization of the botulinum neurotoxin C1 gene and its associated nontoxic protein genes in *Clostridium botulinum* C468. *Mol-Gen-Genet.* 243:631-40.
20. Hutson RA., MD. Collins, AK. East, DE. Thmpson. 1994. Nucleotide sequence of the gene coding for non proteolytic *Clostridium botulinum* type B neurotoxin comparison with other Clostridial neurotoxins. *Curr-Microbiol.* 28:101-10.
21. Hutson RA., Y. Zhou, MD. Collins, EA. Johnson, CL. Hatheway, H. Sugiyama. 1996. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* type A containing silent type B neurotoxin gene sequence. *J. Biol-Chem.* 271:10786
22. Huntanen C. 1991. Nontoxic dissociants of *Clostridium botulinum* type A dan Bp.274, abstr P44. Abstr 91st Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1991. American Society for Microbiology, Washington DC.
23. James MJ. 1986. *Modern Food Microbiology.* 3<sup>rd</sup> edition. Van Nostrand, Reinhold, New York:469-70,475-6.
24. Jawetz E., LJ. Melnick, AE. Auelberg, FG. Brooks, SJ. Butel, N.L. Ornsion. 1989. *Medical Microbiology.* 8<sup>th</sup>ed., New Jersey. Prentice Hall International Inc:163.
25. Krieglstem KG., BR. Das Gupta, AH. Henschen. 1994. Covalent structure of botulinum neurotoxin type A: location of sulfhydryl groups, and disulfide bridge and identification of C termini of light and heavy chains. *J. Protein-Chem.* 13:49-57.
26. Levett PN. 1991. *Anaerobic Microbiology. A Practical Approach.* Oxford University Press, Tokyo:163.
27. Mackie T.T., WG. Hunter. 1945. *Manual of Tropical Medicine.* WB Saunders Company, London:102-5.
28. Montecucco C., G. Schiavo. 1994. Mechanism of action Tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol-microbiol.* 13:1-8.



29. Nobuhiro r., K. Kimura, N. Yosokawa, T. Murakani, T.Indoh, I.Ohishi, K. Oguma. 1991. Studies on Clostridium botulinum type E and C2 toxin genes. Jpn.J. Med. Sci. Biol.44
30. Schiavo G., O. Rossetto, F. Benfenati, B. Poulain, C. Mon Hcucco. 1994. Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases spesific for components of the neuroexocytosis apparatus.Am-NY-Acad.Sci. 710\*65-75.
31. Schiavo G., C. Malizio, wS. Trimble, P.Pblverino de Lai-reto, G. Milan, H. Sugiyama, EA. Johnson, C. Montecucco. 1994. Botulinum G neurotoxin cleave vAMP/synaptobrevin at a single ala-ala peptide bond. J.Biol.Chem. 269:20213
32. Rossetto D., F. Deloye, B. Poulain, R. Pellizzari, G. Schiavo, C. Montecucco. 1995. The methallo-proteinase activity of Tetanus and Botulinum neurotoxins. J. Physiol - Paris.89:43-50.
33. Schiavo G., O. Rossetto, F. Benfenati, B. Poulain, C. Montecucco. 1994. Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc for components of the neuroexocytosis apparatus. Ann-NY-Acad. Sci.710:65-75.
34. Sakaguchi G.,1983. Clostridium botulinum toxins. Pharmacol. Ther. 19:165-194.
35. Sugiyama H. 1980. Clostridium botulinum neurotoxin. Microbiol. Rev.44:419-48.
36. Whelan SM., MJ. Elmore, NJ. Bodsworth, T. Atkinson, NP. Minton. 1992. The complete Amino Acid sequence of the Clostridium botulinum type E neurotoxin: derived by nucleotide sequence analysis of the encoding gene. Eur.J. Biochem. 204:657-67.
37. whelan SM., MJ. Elmore, H. Bodsvor, NJ. Brehm, T. Atkinson NP. minton. 1992. Molecular cloning of the Clostridium botulinum structural gene encoding the type B neurotoxin and determination of its entire nucleotide sequence. Appl Environ. Microbiol. 58:2345-54.
38. willems A., AK. East, FA. Lawson, MD.Collins. 1993. Sequence of the gene coding for the neurotoxin of Clostridium botulinum type A associated with infant botulism: Comparison with other Clostridial neurotoxins. Biochem. Biophys. Acta. 1216:487-91.
39. Tsuzuki K., K. Kimura, Nf. Fujii, N. Yokosawa, K. Oguma. 1992. The complete nucleotide sequence of the gene coding for the nontoxic nonhemagglutinin component of Clostridium botulinum type C progenitor toxin. Biochem-Biophys-Res- Commun. 183:1273-9.
40. Willis TA.1977. Anaerobic Bacteriology, Clinical and Laboratory Practical. 3<sup>th</sup>ed. Butterworths, Toronto:315-23.

29. ...  
 30. ...  
 31. ...  
 32. ...  
 33. ...  
 34. ...  
 35. ...  
 36. ...  
 37. ...  
 38. ...  
 39. ...  
 40. ...