

MENCIT BALB/C DAPAT DIGUNAKAN SEBAGAI HEWAN MODEL PENELITIAN VIRUS PENYAKIT JEMBRANA

(The use of Balb/c for the Animal Model to Study of Jembrana Disease Virus)

I Ketut Berata

Laboratorium Patologi FKH Unud

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mempelajari mencit Balb/c sebagai hewan model penelitian virus penyakit Jembrana. Penelitian menggunakan 32 ekor mencit yang dibagi atas 2 kelompok perlakuan. Kelompok 1 digunakan sebagai kontrol (placebo), sedangkan kelompok 2 divaksin dengan vaksin limpa (JD.vacc.sp.15). Masing-masing mencit disuntikkan 0,2 ml vaksin JD secara intraperitoneal, setiap dua minggu sekali sampai 4 kali. Seminggu pasca vaksinasi ke-4, semua mencit dinekropsi dan limfosit dari limpa diisolasi untuk uji respon kekebalan seluler dengan uji MTT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa respon kekebalan seluler akibat divaksin dengan vaksin limpa lebih tinggi (rata-rata = 1,3819) dari pada kontrol (placebo) (rata-rata = 1,2194). Analisis statistik diperoleh bahwa perbedaan tersebut bermakna ($p < 0,05$). Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa mencit BALB/c dapat digunakan sebagai hewan model penelitian virus penyakit Jembrana.

Kata Kunci : Mencit Balb/c, Hewan model, Antigen JDV

ABSTRACT

The presents study axamines the use of Balc/c mice for the animal model to study of Jembrana disease virus. Thirsty two mice were devided in two group (Treated and control group). Mice in the treated group were injected 0,2 cc spleen vaccine (JD Vacc. sp.15). The mice were injected by intra peritoneal route, for every two week until 4 time of treatment. The celluler immune response of treated mice was significantly hygest that the control mice. The result of the study indicated that the Balb/c mice is useful for the animals models to study of Jembrana disease virus.

Key words : BALB/c mice, animal model, JDV-antigen

PENDAHULUAN

Penelitian virus penyakit Jembrana atau *Jembrana disease virus* (JDV) terhambat hambatan karena sulitnya mencari hewan model. Hal ini disebabkan oleh karakteristik JDV yang dilaporkan hanya tumbuh dalam limfosit sapi Bali dan tidak membunuh hewan kecil seperti mencit, marmut dan kelinci (Kertayadnya, *et al.*, 1996). Penelitian suatu agen penyakit dapat lebih intensif

apabila dapat dilakukan pada hewan model yang kecil, tetapi memiliki efek penyakit yang mirip dengan hospes definitifnya.

Penelitian pendahuluan dengan menginokulasikan antigen JDV pada mencit BALB/c yang dilakukan oleh Mantik Astawa (2005, belum dipublikasi), menunjukkan adanya respon positif dibandingkan pada kelinci. Hasil uji ELISA dan *Westernimmunoblotting*

tampak adanya antibodi akibat inokulasi JDV pada mencit BALB/c. Hasil penelitian ini perlu ditindaklanjuti dengan teknik-teknik lain. Jika penelitian diatas digunakan antigen JDV dari limfosit sapi terinfeksi penyakit Jembrana sebagai inokulat, maka penelitian dengan menggunakan antigen dalam vaksin limpa (*JD Vacc sp.15*) perlu dilakukan. Penelitian respon terhadap bahan vaksin ini perlu dilakukan pada mencit, dalam upaya pengembangan uji bahan vaksin alternatif terhadap penyakit Jembrana.

Infeksi Lentivirus umumnya bersifat kronis. Tetapi JDV merupakan Lentivirus yang menyebabkan infeksi akut pada sapi Bali (Campbell, 1977). Jika fase akut terlewati, biasanya terjadi kesembuhan apabila melewati fase akut. Proses kesembuhan ini dilaporkan akibat dari peran respon kekebalanseluler (Dharma, 1996). Oleh karena itu, penelitian pemberian vaksin penyakit Jembrana pada mencit diarahkan pada uji respon kekebalan seluleryang ditimbulkan.

MATERI DAN METODE

Penyiapan Mencit

Mencit yang digunakan sebanyak 32 ekor dari strain BALB/c, betina, umur 2 bulan dan berat badan 20-30 gr. Mencit diperoleh dari Balai Besar VeterinerDenpasar. Mencit dipelihara dalam kandang kawat berukuran 30×40 cm. Setiap kandang ditempatkan 4 ekor mencit. Alas kandang adalah sekam padi.

Makan berupa pelet dan minum air PDAM, diberikan *ad libitum*.

Pembuatan Vaksin Limpa.

Vaksin limpa dibuat sesuai standar pembuatan vaksin yang dilakukan di laboratorium Bioteknologi BBV Denpasar. Sapi diinokulasi dengan JDV isolat Tabanan-87 (koleksi BBV Denpasar). Pada demam hari kedua, sapi dinekropsi dan limpa diambil secara aseptis. Sel limfosit dalam limpa dikeluarkan dan dicuci dengan PBS (Ph 7,2-7,4) steril. Sel limfosit asal limpa tersebut disuspensikan dengan PBS yang mengandung 1% triton-X-100 sampai konsentrasi limfositnya 15%. Triton X-100 dipakai untuk menginaktifkan JDV yang ada dalam sel limfosit. Setelah dihomogenkan dengan blender, ditambahkan adjuvan minyak mineral (produksi Vaksindo, Jakarta). Campuran suspensi sel limfosit dan adjuvan ini diemulsikan dengan mesin emulgator. Proses emulsi dilakukan sampai terbentuk emulsi yang sempurna antara fase air (suspensi limfosit limpa dalam PBS) dan fase minyak (adjuvan). Emulsi air dalam minyak yang sempurna ditandai dengan tidak pecahnya campuran tersebut bila diteteskan di permukaan air.

Imunisasi pada Mencit

Pada penelitian ini 32 ekor mencit dibagi atas 2 kelompok secara acak. Kelompok I terdiri dari 16 ekor mencit, disuntikkan PBS 0,2 ml secara intraperitoneal sebagai kontrol dan kelompok II terdiri dari 16

ekor mencit, disuntikkan dengan vaksin limpa. Masing-masing mencit disuntikkan 0,2 ml vaksin secara intraperitoneal, sebanyak 4 x, yang berselang waktu 2 minggu. Mencit tetap dipelihara dalam kandang dan diberi makan dan minum *ad libitum*.

Pengukuran Respon Kekebalan Seluler

Respon kekebalan seluler diukur berdasarkan daya proliferasi sel limfosit mencit setelah diperlakukan sesuai kelompok perlakuan. Daya proliferasi sel limfosit mencit diukur dengan menggunakan reagen (3-dimethyl thiazole-2,y 2,5 diphenyltetrazolium bromide), yang sering disingkat dengan uji MTT. Mitogen yang digunakan pada uji MTT adalah *whole protein virus* asal limpa sapi bali terinfeksi JDV. *Whole protein virus* disiapkan dari sel limfosit asal limpa sapi Bali yang terinfeksi JDV. Limpa seberat 0,2 gram ditampung dalam cawan petri yang berisi 1,5 ml PBS. Limpa kemudian dikorek-korek untuk menguraikan sel limfositnya dengan jarum suntik 23 G yang ujungnya telah dibengkokkan. Sel limfosit yang keluar dari limpa sapi ditampung dalam tabung sentrifus, dan dicuci satu kali dalam PBS dengan cara sentrifus 3.000 rpm selama 5 menit. Cairan supernatan dibuang dan diganti dengan larutan NH₄Cl 0,8% (Sigma, USA) sampai semua sel darah merah mengalami lisis. Setelah sentrifus 900 rpm selama 5 menit, sel limfosit dilisiskan dengan penambahan 0,5 ml

triton X-100 1% dalam PBS, dan inkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C. Campuran kemudian disentrifus 3.000 rpm selama 10 menit. Supernatan ditampung ke dalam tabung sentrifus 10 ml. Protein dalam cairan supernatan dipresipitasi dengan penambahan alkohol absolut (perbandingan : 1 bagian supernatan, 5 bagian alkohol absolut). Presipitasi protein dalam supernatan kemudian disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang dan endapan kemudian dikeringkan sampai semua bagian alkoholnya menguap. Endapan protein kemudian dilarutkan kembali dalam PBS, dan disterilkan dengan cara filtrasi dengan milipore filter 0,22 µm.

Seminggu pasca vaksinasi ke-4, mencit dinekropsi dan secara aseptis limpa diambil. Limpa dari setiap mencit ditampung dalam cawan petri steril yang berisi 1,5 ml media DMEM tanpa serum. Sel limfosit kemudian dipisahkan dari limpa mencit, menggunakan 2 jarum suntik yang dibengkokkan, dengan jarum 23 G. Satu jarum digunakan untuk memegang limpa dan satu jarum lagi digunakan untuk mengorek kontrol limpa. Pengorekan dilakukan sampai semua sel limfosit dalam limpa keluar dan bercampur homogen dengan media DMEM. Sel limfositnya dihomogenkan dalam media dengan cara penyedotan dan pengeluaran secara berulang menggunakan pipet Pasteur steril. Sel limfosit dalam cawan petri kemudian

dipindahkan ke dalam tabung steril dan dicuci 1 kali dengan 10 ml media DMEM steril. kontrol dihitung dengan hemositometer, maka sel limfosit mencit disuspensikan dalam media DMEM yang mengandung 15% FCS. Sel limfosit mencit kemudian ditumbuhkan dalam mikroplat 96 sumuran, yang telah diisi mitogen dengan tingkat kepadatan sekitar 2×10^6 sel/ ml media.

Sel limfosit dari setiap individu mencit, diinkubasikan dalam mikroplat yang berisi antigen JDV (*whole protein virus*), dengan konsentrasi akhir masing-masing $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ media. Campuran sel limfosit mencit dan mitogen diinkubasikan bersama-sama selama 3 hari pada suhu 37°C dalam lingkungan lembab yang mengandung 5% CO_2 . kontrol inkubasi selama 3 hari, ke dalam setiap sumuran ditambahkan 25 μl MTT 5% (Sigma, USA). Sel kembali diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C . Sebagian media kemudian dibuang dan sel kemudian dilisiskan dengan *lysis buffer* dimethyl sulfoxide atau DMSO 5% (Analar, USA)

Tingkat kepekatan warna biru dalam setiap sumuran dibaca dengan *multi scan spectrophotometer*, dengan $\lambda = 595 \text{ nm}$. Nilai absorbannya dari masing-masing sumuran kemudian dicatat. Tingkat warna biru merupakan hasil perubahan sodium MTT menjadi formazan akibat aktivitas oleh enzim mitokondria sel limfosit yang hidup. Semakin banyak sel yang hidup, semakin pekat pula warna

biru. Nilai ini menunjukkan tingkat daya proliferasi sel limfosit sebagai manifestasi dari tingkat respon kekebalan seluler.

Analisis Data

Data respon kekebalan seluler berdasarkan nilai uji MTT dianalisis dengan uji oneway anova (SPSS for Window's)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji respon kekebalan seluler berdasarkan daya proliferasi limfosit dengan uji MTT diperoleh nilai rata-rata seperti tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji Respon Kekebalan Seluler Berdasarkan nilai MTT

	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error
placebo	16	1,2194	0,24393	0,06098
divaksin	16	1,3819	0,26496	0,06624
jd.vacc.sp 15				
Total	32	1,3006	0,26377	0,04663

Dari Tabel 1 tampak bahwa respon kekebalan seluler akibat divaksin dengan vaksin limpa lebih tinggi dari pada kontrol. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan tersebut bermakna ($p < 0,05$) (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Analisis dengan Oneway Anova (SPSS For WINDOW'S)

Perlakuan	Jumlah kuadrat	derajat bebas	Kuadrat tengah	F	Signifikansi
Antar Group	0,211	1	0,211		
Dalam Group	1,946	30	0,065	3,257	0,051
Total	2,157	31			

Analisis data dari hasil penelitian menunjukkan bahwa mencit BALB/c memiliki kepekaan respon kekebalan seluler yang bermakna akibat divaksin dengan vaksin limpa dari pada tidak

divaksin (placebo). Hal ini berarti mencit BALB/c dapat digunakan sebagai hewan model untuk uji vaksin penyakit Jembrana. Penelitian sebelumnya yang menguji Lentivirus penyebab HIV (*human immunodeficiency virus*) dilaporkan bahwa mencit sangat cocok digunakan sebagai hewan model. Walaupun HIV tidak bereplikasi dalam sel mencit, tetapi mencit yang dibuat imunodefisiensi kemudian diinokulasi monosit orang terinfeksi HIV, merupakan model yang sangat bagus untuk HIV encephalitis (HIVE) (Nesbit and Schwartz, 2002). Penelitian lain juga melaporkan bahwa mencit BALB/c dikenal sebagai hewan immunokompromis, sangat baik untuk dipakai model infeksi terhadap virus penyakit pernafasan (Kong, *et al.*, 2005). Virus penyakit Jembrana mungkin juga tidak bereplikasi dalam limfosit mencit, tetapi respon yang bermakna dari penelitian ini membuktikan bahwa mencit BALB/c dapat digunakan dalam penelitian-penelitian JDV khususnya uji kandidat vaksin penyakit Jembrana sapi Bali.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Respon kekebalan seluler pada mencit BALB/c akibat pemberian vaksin lebih tinggi dari pada kontrol (placebo). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mencit BALB/c dapat digunakan sebagai hewan model untuk uji respon kekebalan seluler antigen virus penyakit Jembrana

Saran

Perlu dilakukan penelitian serupa dengan menggunakan hewan model yang lain seperti marmot dan hewan kecil lainnya, sehingga diperoleh hewan model yang paling tepat untuk penelitian kandidat vaksin penyakit Jembrana.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih penulis ucapkan kepada Prof. drh. Nyoman Mantik Astawa, PhD., drh.Hartaningsih, MV.Sc.PhD., atas fasilitas dan dukungan selama pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Campbell, R.S.F. 1996. The Comparative Pathology of the Lentiviruses. In: Wilcox, G.E., Soeharsono, S., Dharma, D.M.N., Copland, J.W. Editors. Jembrana Disease and the Bovine Lentiviruses. ACIAR Proceeding No.75. p.115-123
- Dharma, D.M.N. 1996. The Pathology of Jembrana Disease. In : Wilcox, G.E., Soeharsono, S., Dharma, D.M.N., Copland, J.W., Editors. Jembrana Disease and The Bovine Lentiviruses. ACIAR Proceedings No. 75. p. 26-28
- Kertayadnya, G., Soeharsono, S., Hartaningsih, N., and Wilcox, G.E. 1996. Physicochemical Characteristics of A Virus Associated with Jembrana Disease. Workshop on Jembrana Disease and the Bovine Lentivirus. Denpasar Bali. ACIAR Proceeding No.75. p.43-48
- Kong, X., Hellermann, G.R., Patton, G., Kumar, M., Behera, A., Randall, T, Zhang, J., Lockey, R.F., and Mohapatra, S.S. 2005. An Immunocompromised BALB/c Mouse Model for Respiratory Syncytial Virus Infection. Virology Journal. Vol.2:3. p.1186-1197
- Nesbit, C.E. and Schwartz, S.A. 2002. In Vitro and Animal Models of Human Immunodeficiency Virus Infection of the Central Nervous System. Clinical and Diagnostic Lab. Immunol.Vol.9.No.3.p.515-524