

## Viroterapi Virus Penyakit Tetelo pada Tikus Penderita Fibrosarkoma Tidak Berpengaruh terhadap Histopatologi Limpa

(NEWCASTLE DISEASE VIRUS VIROTHERAPY IN FIBROSARCOMA-BEARING  
RATS DOES NOT AFFECT SPLENIC HISTOPATHOLOGY)

An'nisafitri Lutviana<sup>1</sup>,  
Anak Agung Ayu Mirah Adi<sup>2</sup>, Ida Bagus Oka Winaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan

<sup>2</sup>Laboratorium Patologi Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,  
Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234  
Email: [aaa\\_mirahadi@unud.ac.id](mailto:aaa_mirahadi@unud.ac.id)

### ABSTRAK

Fibrosarkoma merupakan salah satu kanker yang berasal dari jaringan ikat fibrosa dan umumnya tumbuh pada jaringan lunak bagian dalam atau subkutan. Kanker saat ini merupakan penyebab utama kematian pada manusia di seluruh dunia karena kurangnya modalitas terapi yang efisien. Pendekatan terapi untuk kanker saat ini banyak diteliti salah satunya yaitu viroterapi menggunakan virus onkolitik. Virus onkolitik yang digunakan salah satunya adalah virus penyakit tetelo atau *Newcastle Disease* (ND). Virus ND digunakan sebagai viroterapi kanker berdasarkan replikasi selektif pada sel tumor dan segi keamanannya, potensi virus onkolitik, serta dapat menstimulasi sistem imun. Untuk mengetahui pengaruh terapi virus ND terhadap gambaran histopatologi limpa tikus, dilakukan penelitian dengan menggunakan sembilan ekor tikus galur *Sprague Dawley* yang terdiri dari tiga ekor tikus tanpa fibrosarkoma dan enam ekor tikus dengan fibrosarkoma yang diinduksi dengan benzo(a)piren. Pemberian benzo(a)piren 0,3 mg/0,1 mL dalam *oleum olivarium* diinjeksikan secara subkutan. Tumor muncul lima bulan pasca-injeksi. Dari sembilan ekor tikus tersebut dikelompokkan menjadi tiga perlakuan yaitu perlakuan kontrol (P0) yang tidak diberi perlakuan, perlakuan P1<sub>A</sub> yaitu perlakuan pada tikus dengan fibrosarkoma yang diinjeksi *phosphate buffer saline* 0,1 mL sebanyak empat kali dalam empat hari berturut-turut, dan perlakuan P1<sub>B</sub> yaitu perlakuan pada tikus dengan fibrosarkoma yang diterapi menggunakan virus ND patotipe velogenik. Tikus dinekropsi setelah dua minggu pasca-perlakuan. Organ limpa yang telah diambil, diproses di Laboratorium Patologi Balai Besar Veteriner Denpasar untuk dibuat preparat histopatologi. Hasil pemeriksaan histopatologi memperlihatkan tidak terjadinya proliferasi limfosit pulpa putih pada perlakuan kontrol (P0), sedangkan pada kelompok perlakuan P1<sub>A</sub> dan P1<sub>B</sub> terjadi proliferasi limfosit pada pulpa putih. Pada ketiga perlakuan tidak terjadi adanya perubahan histopatologis yang spesifik pada limpa seperti tidak adanya deplesi, nekrosis, dan hemoragi. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa viroterapi dengan virus ND isolat Tabanan-1/ARP/2017 tidak memengaruhi gambaran histopatologi jaringan limpa dan aman digunakan sebagai agen viroterapi kanker.

Kata-kata kunci: fibrosarkoma; limpa; virus *Newcastle Disease*; tikus galur *Sprague Dawley*

### ABSTRACT

Fibrosarcoma is cancer that originates from fibrous connective tissue and generally grows on the inner soft tissue or subcutaneous. Cancer is currently the leading cause of death in humans worldwide due to a lack of efficient therapeutic modalities. The therapeutic approach for cancer has recently been researched, one of which is virotherapy using oncolytic viruses. One of the oncolytic viruses used is the Newcastle Disease (ND) virus. ND virus is used as cancer virotherapy based on selective replication of tumor cells, its safety, and can stimulate the immune system. To determine the effect of ND virus therapy on the histopathological features of the spleen, a study was conducted using

nine rats strain Sprague Dawley consisting of three rats without fibrosarcoma and six fibrosarcoma-bearing rats induced by benzo(a)pyrene. Benzo(a)pyrene administrated at a dose 0.3 mg/0.1 mL in *oleum olivarum*, injected subcutaneously. The tumor appeared five months post-injection. Of the nine rats, they were grouped into three treatments, i.e. control treatment (P<sub>0</sub>) which was not given any treatment, P<sub>1A</sub> treatment, which was fibrosarcoma-bearing rats that were injected with 0.1 mL phosphate buffer saline four times in four consecutive days, and P<sub>1B</sub> treatment, which was the fibrosarcoma-bearing rats treated using velogenic pathotype ND virus. The rats were necropsied after two weeks post-treatment. Spleen organs that have been taken are processed at the Laboratory of Veterinary Pathology of the Disease Investigation Center Denpasar to make histopathological preparations. The results of the histopathological examination showed no proliferation of white pulp lymphocytes in the control treatment (P<sub>0</sub>), whereas in the P<sub>1A</sub> and P<sub>1B</sub> treatment groups there was the proliferation of lymphocytes in the white pulp. In the three treatments, there were no specific histopathological changes in the spleen such as the absence of depletion, necrosis, and hemorrhage. It can be concluded that virotherapy using ND virus isolate Tabanan-1/ARP/2017 may not affect the histopathological changes of the spleen tissue and was safe to use as a cancer virotherapy agent.

Keywords: fibrosarcoma; spleen; *Newcastle Disease* virus; Sprague Dawley rats

## PENDAHULUAN

Neoplasma merupakan kelainan yang melibatkan pertumbuhan sel abnormal yang diakibatkan oleh mutasi sel, yang tumbuh secara terus menerus dan tidak terkendali, serta tidak bermanfaat bagi tubuh (Ramesh, 2016; Gorda, 2019). Fibrosarkoma merupakan neoplasma ganas yang terdiri dari fibroblas pembentuk serat kolagen dan berasal dari sel mesenkim. Fibrosarkoma biasanya tumbuh di jaringan lunak bagian dalam atau subkutan (Augsburger *et al.*, 2017). Neoplasma ganas atau kanker saat ini merupakan penyebab utama kematian pada manusia di seluruh dunia karena kurangnya modalitas terapi yang efisien. Maka dari itu, pendekatan terapi untuk kanker akhir-akhir ini banyak diteliti, salah satunya yaitu viroterapi yang merupakan salah satu terapi pada pasien kanker menggunakan virus onkolitik (Bonab dan Khansari, 2017).

Virus penyakit tetelo atau *Newcastle Disease* (ND) merupakan salah satu agen terapi yang menjanjikan untuk viroterapi (Yurchenko *et al.*, 2015). Virus ND atau yang dulu disebut *avian paramyxovirus serotype 1* (APMV-1), namun saat ini berdasarkan taksonomi terbaru disebut dengan *avian orthoavulavirus 1* (AOAV-1) diklasifikasikan sebagai famili *paramyxoviridae* genus *orthoavulavirus* (Amarasinghe *et al.*, 2019). Virus penyakit tetelo merupakan virus RNA beramplop dan bersifat patogen terhadap unggas di seluruh dunia, namun tidak patogen terhadap mamalia (Motalleb, 2013; Yurchenko *et al.*, 2018). Galur virus penyakit tetelo yang dilemahkan secara alami, bernama PV701 dan 73-T telah terbukti menunjukkan adanya selektivitas melawan tumor manusia dan menginduksi regresi tumor

dalam sel kanker yang berbeda dan fibrosarkoma, neuroblastoma, serta karsinoma prostat dan ambing pada tikus percobaan (Motalleb, 2013).

Virus penyakit tetelo memiliki kemampuan replikasi lebih cepat pada sel tumor dibandingkan dengan sel normal (Schirmacher, 2017). Infeksi virus penyakit tetelo pada sel tumor dapat menstimulasi respons imun bawaan, meningkatkan respons limfosit T, mengaktifasi sel *Natural Killer* (NK), dan meningkatkan jumlah *tumor necrosis factor* (TNF) (Jarahian dan Watzl, 2009). Limfosit memiliki peran utama dalam imunitas adaptif yang memediasi perlindungan terhadap infeksi, kanker, dan berfungsi sebagai imunopatologi pada inflamasi (Qiu dan Sheridan, 2018). Sel-sel limfosit diproduksi oleh organ limfoid primer dan akan mengalami pematangan di organ limfoid sekunder (Stewart, 2004). Termasuk organ limfoid sekunder adalah limpa, limfonodus, dan *peyer's patches* (Ruddle dan Akirav, 2009). Limpa memiliki peran penting dalam sistem pertahanan terhadap mikroorganisme ataupun antigen yang masuk ke dalam tubuh (Lewis dan Adam, 2019; Kobayashi *et al.*, 2019). Fournier dan Schirmacher (2013) menyatakan bahwa virus penyakit tetelo merupakan agen yang menjanjikan sebagai viroterapi kanker karena tiga faktor yaitu berdasarkan replikasi selektif pada sel tumor dan segi keamanannya, potensi virus onkolitik, serta dapat menstimulasi sistem imun.

Secara histologis limpa memiliki parenkim yang terdiri dari pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa putih merupakan tempat diferensiasi sel T dan sel B, serta kaya akan limfosit sebagai respons imun terhadap antigen yang terbawa oleh darah (Mebius dan Kraal, 2005; Eurell dan Frappier, 2006). Pada pulpa putih terdapat *germinal center* berwarna terang terdiri dari *periarterial lymphoid sheath* atau PALS (Yanti *et al.*, 2019). Pada limpa terdapat zona marginalis yang dipenuhi oleh limfosit B (Rousdy dan Wardoyo, 2018). Zona marginalis merupakan bagian yang terpisah dari pulpa putih yang berfungsi menyaring antigen dan patogen dalam sirkulasi sistemik, dan memainkan peran penting dalam pemrosesan antigen (Cesta, 2006). Peningkatan aktivitas imun dapat ditandai dengan perubahan diameter pulpa putih dan *germinal center*. Pembesaran pulpa putih dapat disebabkan oleh adanya reaksi inflamasi. *Germinal center* akan aktif dan membesar bila terjadi proses imunostimulasi pada sistem imun (Tasminatun *et al.*, 2017; Kalia *et al.*, 2016).

Berdasarkan uraian tersebut, maka studi tentang gambaran histopatologi limpa tikus galur *Sprague Dawley* yang menderita fibrosarkoma pasca terapi menggunakan virus penyakit tetelo atau ND penting dilakukan bertujuan pengembangan onkolitik viroterapi terhadap penderita fibrosarkoma dan untuk mengetahui pengaruh viroterapi virus penyakit tetelo

terhadap histopatologi limpa yang dapat diamati dari rerata diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan sembilan ekor tikus galur *Sprague Dawley* berjenis kelamin jantan dan berumur kurang lebih tiga bulan. Tikus yang digunakan terdiri dari tiga ekor tikus tanpa fibrosarkoma dan enam ekor tikus yang sudah mengalami fibrosarkoma berdiameter 1-1,5 cm pascainduksi benzo(a)piren (Sewoyo *et al.*, 2021a; Sewoyo *et al.*, 2021b). Tikus tersebut dipelihara dan diberikan perlakuan di Laboratorium Patologi Veteriner, Universitas Udayana. Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penggunaan Hewan untuk Edukasi dan Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan dengan nomor 61/UN.14.29/PT.01.04/2021. Penelitian ini terdiri atas tiga kelompok perlakuan dengan jumlah ulangan pada masing-masing perlakuan sebanyak tiga ulangan. Perlakuan pertama (P<sub>0</sub>), kelompok tikus yang tidak mengalami fibrosarkoma digunakan sebagai kontrol. Perlakuan kedua (P<sub>1A</sub>) merupakan kelompok tikus dengan fibrosarkoma yang diinjeksi menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) dan perlakuan ketiga (P<sub>1B</sub>) merupakan kelompok tikus dengan fibrosarkoma yang diberikan terapi menggunakan virus penyakit tetelo isolat Tabanan-1/ARP/2017 (Adi *et al.*, 2019; Adi *et al.*, 2020). Pemberian terapi virus penyakit tetelo pada perlakuan P<sub>1B</sub> dilakukan sebanyak empat kali secara intratumoral, diinjeksikan dalam sehari selama empat hari berturut-turut (Yurchenko *et al.*, 2018) dengan dosis 0,5 mL/2<sup>9</sup> HA Unit setiap tikus (Rakhmawati *et al.*, 2022; Sewoyo *et al.*, 2021b). Semua hewan coba dikorbankan nyawanya menggunakan anestesi *ketamine* dan *xylazine* lima kali dosis normal (dosis normal pada tikus masing-masing 50 mg/kg BB dan 5 mg/kg BB) secara intraperitoneal dua minggu pasca diberikan perlakuan. Organ limpa dari sampel hewan ketiga perlakuan tersebut diambil dan direndam dalam *neutral buffered formalin* (NBF) 10%. Preparat histopatologi dibuat di Laboratorium Patologi Balai Besar Veteriner Denpasar. Selanjutnya dilakukan pengamatan gambaran histopatologi limpa menggunakan *carlzeiss teaching microscope*. Variabel yang diamati pada jaringan limpa adalah diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis. Semua diameter pada folikel limpa dihitung pada area lima lapang pandang dengan pembesaran objektif 20 kali dan 40 kali. Pengukuran diameter pada setiap lapang pandang diambil satu folikel normal, kemudian diukur lebarnya menggunakan *carlzeiss teaching microscope* dan ukuran yang didapat pada lima lapang pandang dirata-ratakan. Data

yang diambil dalam penelitian ini bersifat kuantitatif yang dianalisis menggunakan uji stastistika parametrik *Analysis of Variance* menggunakan perangkat lunak SPSS versi 25.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pemeriksaan histopatologi memperlihatkan terjadinya proliferasi limfosit pada pulpa putih pada kelompok perlakuan yang diinjeksi PBS (P1<sub>A</sub>) dan yang diterapi menggunakan virus penyakit tetelo (P1<sub>B</sub>). Tidak terlihat adanya perubahan patologis lainnya, seperti nekrosis, deplesi, radang, maupun hemoragi pada gambaran histopatologi limpa (Gambar 1). Gambaran yang sama juga terlihat pada kelompok perlakuan lainnya.

Rerata diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis pada perlakuan P1<sub>B</sub> lebih besar dibanding perlakuan P1<sub>A</sub> dan P0 (Tabel 1). Tikus yang diterapi dengan virus penyakit tetelo (P1<sub>B</sub>) memiliki rerata diameter pulpa putih yakni  $430 \pm 18,49 \mu\text{m}$ , sedangkan tikus P1<sub>A</sub> memiliki rerata  $354 \pm 134,34 \mu\text{m}$  dan tikus kontrol  $245,61 \pm 11,03 \mu\text{m}$ .

Rerata diameter *germinal center* pada limpa tikus dengan fibrosarkoma yang diberikan terapi virus penyakit tetelo (P1<sub>B</sub>) lebih besar, yakni  $226,06 \pm 22,15 \mu\text{m}$  dibanding dengan tikus pada perlakuan (P1<sub>A</sub>) yang diinjeksi menggunakan PBS yakni  $203,49 \pm 80,94 \mu\text{m}$  sedangkan pada kontrol (P0) yakni  $108,07 \pm 16,84 \mu\text{m}$ . Kemudian rerata diameter zona marginalis pada limpa tikus dengan fibrosarkoma yang diberikan terapi virus penyakit tetelo (P1<sub>B</sub>) yakni  $113,19 \pm 7,08 \mu\text{m}$  lebih besar dibanding dengan tikus pada perlakuan (P1<sub>A</sub>) yang diinjeksi menggunakan PBS yakni  $99,80 \pm 37,32 \mu\text{m}$  sedangkan pada perlakuan kontrol (P0) yakni  $79,07 \pm 6,71 \mu\text{m}$ .

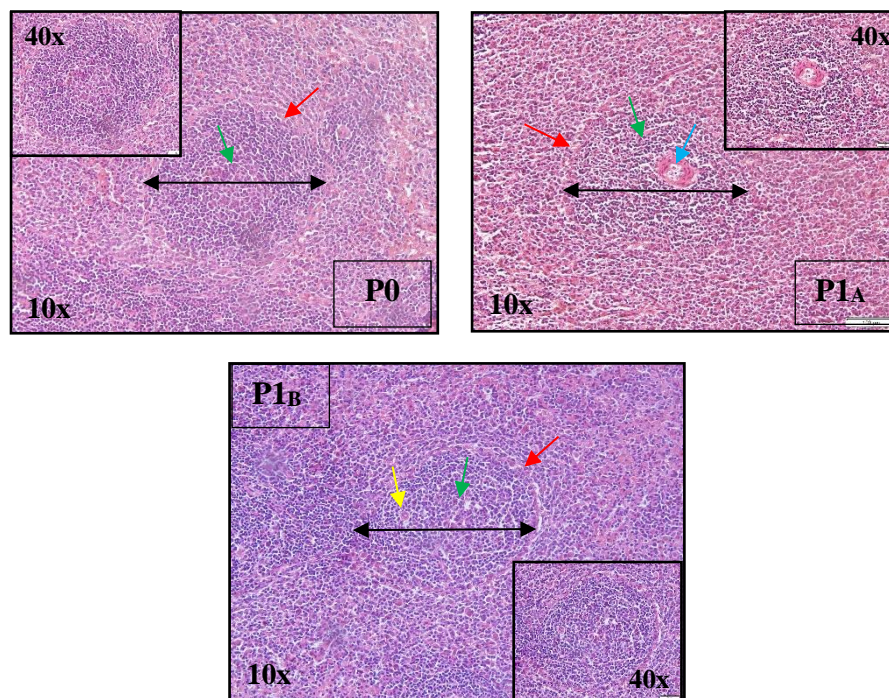
Hasil perhitungan rata-rata diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis limpa tikus setelah dilakukan uji statistik parametrik ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ ) dari masing-masing perlakuan baik pada tikus dengan fibrosarkoma yang diberikan terapi menggunakan virus penyakit tetelo, diinjeksi dengan PBS, maupun pada kontrol. Jika dilihat dari perbedaan rerata diameter baik pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis limpa pada semua perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan yang diterapi menggunakan virus penyakit tetelo (P1<sub>B</sub>) lebih besar dibanding dengan perlakuan yang diinjeksi menggunakan PBS (P1<sub>A</sub>) maupun pada perlakuan kontrol (P0).

Data hasil pengukuran diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis pada limpa disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata dan standar deviasi diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis limpa

Perlakuan	Diameter pulpa putih ( $\mu\text{m}$ )	Diameter <i>germinal center</i> ( $\mu\text{m}$ )	Diameter zona marginalis ( $\mu\text{m}$ )
P0	245,71 $\pm$ 11,03 <sup>a</sup>	108,07 $\pm$ 16,84 <sup>a</sup>	79,07 $\pm$ 6,71 <sup>a</sup>
P1 <sub>A</sub>	354 $\pm$ 134,34 <sup>a</sup>	203,49 $\pm$ 80,94 <sup>a</sup>	99,80 $\pm$ 37,32 <sup>a</sup>
P1 <sub>B</sub>	430 $\pm$ 18,49 <sup>a</sup>	226,06 $\pm$ 22,15 <sup>a</sup>	113,19 $\pm$ 7,08 <sup>a</sup>

Keterangan: Huruf *superscript* yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ( $P>0,05$ ), sebaliknya huruf yang tidak sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P<0,05$ ).



Gambar 1. Histopatologi limpa tikus (*Sprague Dawley*). (P0) Kontrol; (P1<sub>A</sub>) Perlakuan pada tikus dengan fibrosarkoma diinjeksi PBS; (P1<sub>B</sub>) Perlakuan pada tikus dengan fibrosarkoma diterapi virus penyakit tetelo (HE, 20x, 40x). Keterangan: (→) *germinal center*; (→) *central arteriole*; (→) zona marginalis; (→) *periarteriolar lymphatic sheath* (PALS); (→) pulpa putih.

Hasil pengamatan histopatologi limpa tikus tidak memperlihatkan adanya perubahan yang spesifik seperti deplesi, nekrosis, hemoragi, dan radang. Namun, tampak adanya proliferasi limfosit pada pulpa putih di jaringan limpa dari kelompok perlakuan yang diinjeksi PBS (P1<sub>A</sub>) dan yang diberikan terapi menggunakan virus penyakit tetelo (P1<sub>B</sub>). Hal ini menunjukkan bahwa terapi virus penyakit tetelo tidak berpengaruh terhadap histopatologi limpa tikus penderita fibrosarkoma.

Seperti yang dijelaskan sebelumnya, fibrosarkoma merupakan salah satu neoplasma ganas atau kanker yang biasanya tumbuh di daerah subkutan (Augsburger *et al.*, 2017). Neoplasma ganas dapat bermetastasis ke organ lain dengan cepat dan merusak fungsi organ tersebut hingga menyebabkan kematian pada hospes (Ranasasmita *et al.*, 2008). Terlepasnya sel-sel kanker dari tumor primer menyebabkan terjadinya metastasis karena sel-sel yang terlepas dapat menyebar melalui sirkulasi menuju jaringan jauh dan membentuk tumor sekunder (Febriani dan Furqon, 2018).

Pada penelitian ini hasil pemeriksaan histopatologi limpa menunjukkan bahwa tidak terjadi metastasis pada organ limpa yang berasal dari fibrosarkoma terlihat dengan tidak adanya sel kanker dan tidak terjadi perubahan patologis yang spesifik pada gambaran histopatologi limpa. Pemberian viroterapi menggunakan virus penyakit tetelo pada tikus dengan fibrosarkoma tidak berpengaruh terhadap histopatologi limpa sehingga penggunaan viroterapi menggunakan virus penyakit tetelo relatif aman untuk digunakan sebagai viroterapi pada sel kanker.

Limpa merupakan organ limfoid sekunder yang memproduksi sel-sel limfosit dan berperan penting dalam menahan antigen yang berhasil mencapai sirkulasi darah guna menahan invasi organisme atau toksin sebelum menyebar lebih luas di dalam tubuh (Nofantri *et al.*, 2017). Parenkim limpa tersusun dari pulpa merah dan pulpa putih yang dipisahkan oleh zona marginalis yang dipenuhi oleh limfosit B. Pulpa putih merupakan kumpulan sel limfosit, terutama jenis limfosit T yang menyelubungi *central arteriole*. Tidak semua pulpa putih memiliki *germinal center*. *Germinal center* akan aktif dan membesar bila terjadi proses imunostimulasi pada sistem imun (Rousdy dan Wardoyo, 2018). Seperti pada kelompok kontrol yang tidak diberikan terapi apapun (P0), pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis pada limpa yang diamati lebih kecil dari kelompok perlakuan lainnya yaitu  $245,71 \pm 11,03$ ;  $108,07 \pm 16,84$ ;  $79,07 \pm 6,71 \mu\text{m}$  (Tabel 1).

Aktivitas sistem imun pada limpa dapat diketahui dari ukuran diameter pulpa putih. Pembesaran diameter pulpa putih limpa terjadi akibat respons antigen yang masuk sehingga mengaktifasi sistem imun. Pada pulpa putih terdapat zona sel limfosit T dan sel B serta memungkinkan munculnya respons imun spesifik terhadap antigen yang melindungi tubuh dari infeksi virus, bakteri, dan fungi yang terbawa dalam darah (Makiyah dan Wardhani, 2017). Berdasarkan uji statistik ANOVA, rata-rata diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis dari P1<sub>B</sub> lebih lebar dari perlakuan lainnya karena stimulasi dari pemberian virus velogenik yang dapat mengaktifasi proses maturasi dari limfosit. Namun bisa saja terjadi

kelainan pertumbuhan pada jaringan limpa, sehingga diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis melebar, tapi tidak ada proses pembentukan atau maturasi limfosit normal di dalamnya.

Pada perlakuan (P<sub>1B</sub>) yaitu pada tikus (*Sprague Dawley*) dengan fibrosarkoma yang diberikan terapi virus penyakit tetelo menunjukkan rerata diameter pulpa putih limpa paling besar (430  $\mu\text{m}$ ) serta diameter *germinal center* dan zona marginalis yang lebih besar (226,06 dan 113,19  $\mu\text{m}$ ) ( $P > 0,05$ ) dibanding dengan tikus pada perlakuan (P<sub>1A</sub>) yang diinjeksi menggunakan PBS dengan diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis (354; 203,49; 99,80  $\mu\text{m}$ ) dan pada perlakuan kontrol (P<sub>0</sub>) (245,71; 108,07; 79,07  $\mu\text{m}$ ) (Tabel 1).

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa secara angka, diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis limpa pada perlakuan P<sub>1B</sub> memiliki rerata diameter yang paling besar dibanding dengan kelompok perlakuan lainnya. Akan tetapi, jika dilihat secara statistik pada semua kelompok perlakuan didapatkan hasil tidak berpengaruh signifikan yaitu  $p > 0,05$ . Hal tersebut dapat terjadi kemungkinan diakibatkan karena faktor jumlah hewan coba yang terlalu sedikit sehingga memengaruhi hasil analisis statistik. Selain itu, dapat diakibatkan karena efek samping dari induksi benzo(a)piren. Benzo(a)piren merupakan zat kimia bersifat karsinogenik yang memiliki efek immunosupresif sehingga dapat menekan respons sistem imun (Carlson *et al.*, 2002). Jika respons sistem imun tertekan maka perubahan rerata diameter pada pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis pada limpa secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ ).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Fournier dan Schirrmacher (2013) menyatakan bahwa virus penyakit tetelo merupakan agen yang menjanjikan sebagai viroterapi kanker dikarenakan tiga faktor yaitu berdasarkan replikasi selektif pada sel tumor dan segi keamanannya, potensi virus onkolitik, serta dapat menstimulasi sistem imun. Pemberian terapi menggunakan virus penyakit tetelo pada tikus penderita fibrosarkoma dapat menstimulasi respons imun hospes. Respons imun pada limpa terhadap virus penyakit tetelo dapat ditandai dengan adanya peningkatan aktivitas proliferasi sel-sel limfosit pada pulpa putih sehingga terjadi peningkatan ukuran diameter pulpa putih. Virus penyakit tetelo dapat merangsang pelepasan '*danger signal*' selama replikasi virus dalam sitoplasma sel tumor dan menstimulasi sistem imun tubuh yang menghasilkan sitokin, seperti interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ , dan interleukin (IL)-1, yang nantinya akan mengaktifasi sel NK, makrofag, dan sel T, monosit, merangsang imun bawaan dan adaptif (Lam *et al.*, 2011; Ortega-Rivera *et al.*, 2018).



Proliferasi limfosit merupakan penanda adanya fase aktivasi dari respons imun tubuh. Proliferasi limfosit ini berupa peningkatan produksi limfoblas, yang kemudian membelah, mengalami proliferasi dan menghasilkan penambahan jumlah sel yang memiliki sifat-sifat yang sama (Sari, 2012; Schook dan Laskin, 1994). Proliferasi limfosit pulpa putih yang menyebabkan terjadinya peningkatan diameter pulpa putih ini diakibatkan karena adanya respons dari dalam tubuh terhadap virus penyakit tetelo yang merangsang sel-sel limfosit untuk membentuk antibodi dalam melawan infeksi virus penyakit tetelo (Etriwati *et al.*, 2017).

Virus penyakit tetelo merupakan agen anti-neoplastik yang mampu melakukan replikasi dan proliferasi pada sel kanker, yang dapat menyebabkan sel kanker mati pada akhir siklus replikasi melalui lisis atau aktivasi respons imun antitumor, dengan meminimalisir terjadinya kerusakan pada sel normal (Lin *et al.*, 2018). Mekanisme aktivitas onkolitik pasca terapi menggunakan virus penyakit tetelo pada tikus dengan fibrosarkoma terdapat dua mekanisme utama yaitu lisis secara langsung pada sel yang terinfeksi dengan menginduksi sitokin seperti IFN dan TNF. Virus penyakit tetelo menginfeksi dan bereplikasi di dalam sel tumor. Kemudian virus penyakit tetelo mengaktifkan adanya makrofag, kemudian makrofag tersebut juga menginduksi terbentuknya ligan apoptosis. Ketika makrofag yang aktif menempel di permukaan sel tumor maka menyebabkan TNF yang telah diaktifkan oleh makrofag saling berikatan dengan ligan apoptosis sehingga menyebabkan tumor mengalami lisis. Selain efek sitopatik langsungnya, aktivitas anti-neoplastik virus penyakit dikaitkan dengan aktivasi respons imun bawaan dan adaptif (Adi *et al.*, 2006; Davola *et al.*, 2019; Zamarin dan Palese, 2012).

Imunitas adaptif, yang melibatkan antibodi dan limfosit T sitotoksik, terstimulasi oleh virus penyakit tetelo setelah infeksi pada hospes baik unggas ataupun mamalia. Setelah virus penyakit tetelo secara selektif menginfeksi sel tumor, antigen virus muncul pada sel tumor yang akan bekerjasama dengan antigen tumor. Selain itu, infeksi virus penyakit tetelo menghasilkan peningkatan regulasi *Major Histocompatibility Complex* (MHC) I, sehingga antigen virus dan antigen tumor dikenali oleh sistem imun tubuh. Sel tumor yang terinfeksi kemudian dikenali dan dihancurkan, terutama oleh sel NK dan limfosit T sitotoksik CD8<sup>+</sup> (Tayeb *et al.*, 2015). Studi awal yang dilakukan oleh Sewoyo *et al.* (2022) menunjukkan adanya kenaikan total leukosit pada model tikus fibrosarkoma setelah dilakukan terapi dengan virus penyakit tetelo isolat Tabanan-1/ARP/2017.

Pemberian viroterapi virus penyakit tetelo pada tikus penderita fibrosarkoma dengan dosis 0,5 mL/2<sup>9</sup> HA Unit setiap tikus dilakukan sebanyak empat kali secara intratumoral,

diinjeksikan dalam sehari selama empat hari berturut-turut (Yurchenko *et al.*, 2018). Volume fibrosarkoma antara perlakuan yang diinjeksi PBS (P1<sub>A</sub>) dengan perlakuan yang diberikan terapi menggunakan virus penyakit tetelo (P1<sub>B</sub>) berbeda signifikan mulai dari hari ke-12 pasca injeksi. Berdasarkan hasil yang diperoleh, durasi waktu viroterapi berperan penting dalam menekan pertumbuhan tumor. Dalam penelitian ini, waktu evaluasi hanya 15 hari pasca terapi, di masa depan mungkin diperlukan evaluasi sedikit lebih lama (Sewoyo *et al.*, 2021b).

### **SIMPULAN**

Viroterapi menggunakan virus penyakit tetelo atau *Newcastle Disease* pada tikus galur *Sprague Dawley* penderita fibrosarkoma tidak mempengaruhi histopatologi pada limpa dan tidak berpengaruh terhadap diameter pulpa putih, *germinal center*, dan zona marginalis limpa.

### **SARAN**

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui korelasi bobot limpa dengan terapi virus penyakit tetelo atau *Newcastle Disease* pada tikus penderita fibrosarkoma dengan adanya peningkatan sistem imun yang distimulasi oleh virus ini.

### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Tikus yang digunakan untuk penelitian dipelihara dan diberikan perlakuan di Laboratorium Patologi Veteriner, Universitas Udayana. Pembuatan dan pemeriksaan preparat dilakukan di Balai Besar Veteriner Denpasar. Untuk itu semua, penulis mengucapkan terima kasih. Penulis mengucapkan pula terima kasih kepada grup penelitian serta pihak-pihak yang telah membantu proses penelitian sampai penelitian ini selesai dan berjalan dengan baik.

### **DAFTAR PUSTAKA**

- Adi AAAM, Astawa NM. 2006. Potensi Virus *Newcastle Disease* sebagai Agen Anti-Kanker pada Manusia. *Jurnal Veteriner* 7(4): 185-188.
- Adi AAAM, Astawa NM, Putra IGAA. 2019. The efficacy of BEI-inactivated vaccines of Gianyar-1/AK/2014 virulent strain in protecting chickens against Tabanan-1/ARP/2017 virulent *Newcastle Disease* isolates. *Veterinary World* 12(6): 758-764.
- Adi AAAM, Astawa NM, Putra IGAAP, Kardena IM, Suarsana IN. 2020. The Evaluation of Anti-NDV Hyperimmune Sera for Serotherapy in Chickens Infected with *Newcastle Disease Virus* Field Isolate. *International Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry* 5(4): 125-131.
- Amarasinghe GK, Ayllon MA, Bao Y, Basler CF, Bavari S. 2019. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2019. *Arch Viral* 164(7): 1967-1980.

- Augsburger D, Nelson PJ. 2017. Current diagnostic and treatment of fibrosarcoma-perspectives for future therapeutic targets and strategies. *Impact Journal* 8(61): 104638-104653.
- Bonab SF, Khansari N. 2017. Virotherapy with Newcastle Disease Virus for Cancer Treatment and Its Efficacy in Clinical Trials. *MOJ Immunology* 5(6): 00176.
- Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT. 2002. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquatic Toxicology* 56: 289-301.
- Cesta MF. 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic Pathology* 34(5): 455-465.
- Davola ME, Mossman KL. 2019. Oncolytic viruses: how “lytic” must they be for therapeutic efficacy? *ONCOIMMUNOLOGY* 8(6): 1-7.
- Etriwati, Ratih D, Handharyani E, Setiyaningsih S. 2017. Studi Histopatologi Limpa dan Bursa Fabricius Ayam Berpenyakit Tetelo (*Newcastle Disease*) pada Kasus Lapang. *Jurnal Veteriner* 18(4): 510-515.
- Eurell JA, Frappier BL. 2006. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. 6<sup>th</sup> Ed. Victoria (AUS). Blackwell Publishing. Hlm. 147-150.
- Febriani A, Furqon A. 2018. Metastasis Kanker Paru. *Jurnal Respirasi* 4(3): 94-101.
- Fournier P, Schirrmacher V. 2013. Oncolytic Newcastle Disease Virus as Cutting Edge between Tumor and Host. *Biology Journal* 2: 936-975.
- Gorda IW, Putri RK. 2019. Studi Kasus: Fibrosarkoma Kelenjar Mammaria pada Anjing Golden Retriever. *Indonesia Medicus Veterinus* 8(3): 404-413.
- Jarahian M, Watzl C. 2009. Activation of Natural Killer Cells by Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase. *Journal of Virology* 83(16): 8108-8121.
- Kalia P, Kumar N, Harjai K. 2016. Effect of Propolis Extract on Hematotoxicity and Histological Changes Induced by *Salmonella Enterica* Serovar *Typhimurium* In BALB/c Mice. *Arch Biol Sci* 68(2): 385-391.
- Kobayashi N, Takahashi D, Takano S. 2019. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* 10: 1-15.
- Lam HY, Yeap SK, Rasoli M, Omar AR, Yusoff K, Suraini AA, Alitheen NB. 2011. Safety and Clinical Usage of Newcastle Disease Virus in Cancer Therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 1-13.
- Lewis SM, Adam W. 2019. Structure-function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol* 4(33): 1-25.
- Lin C, Xiang G, Zhu X, Xiu L, Sun J, Zhang X. 2018. Advances in the mechanisms of action of cancer-targeting oncolytic viruses. *Oncology Letters* 15: 4053-4060.
- Makiah SNN, Wardhani UH. 2017. Potensi Ekstrak Etanol Buah *Citrullus lanatus* sebagai Agen Imunosupresi melalui Pengamatan Histologi Limpa Mencit BALB/c. *Majalah Kedokteran Bandung* 49(4): 245-251.
- Mebius RE, Kraal G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5: 606-616.
- Motalleb G. 2013. Virotherapy in Cancer. *Iran J Cancer Prev* 6(2): 101-107.
- Nofantri L, Berata IK, Adi AAAM. 2017. Studi Histopatologi Limpa dan Otak Ayam Terinfeksi Penyakit Tetelo. *Indonesia Medicus Veterinus* 6(5): 417-427.
- Ortega-Rivera OA, Quintanar JL, Toro-Arreola SD, Alpuche-Solis AG, Esparza-Araiza MJ, Salinas E. 2018. Antitumor and immunostimulatory activities of a genotype V recombinant attenuated veterinary Newcastle disease virus vaccine. *ONCOLOGY LETTERS* 15: 1246-1254.
- Qiu Z, Sheridan BA. 2018. Isolating Lymphocytes from Mouse Small Intestinal Immune System. *Journal of Visualized Experiments* 132: 1-9.

- Rakhmawati I, Adi AAAM, Winaya IBO, Sewoyo PS. 2022. *In Vivo* Oncolytic Potency of Newcastle Disease Virus Gianyar-1/AK/2014 Virulent Strain Against Mice Fibrosarcoma Models. *Revista Electronica de Veterinaria* 23(1): 56-63.
- Ramesh GVR. 2016. Types of Cancer and Surgery in Rats (*Rattus novergicus*). *Journal of Veterinary Sciences* 3(1): 4-9.
- Ranasmita R, Roswien AP, Wibowo AE. 2008. Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun *Aglaia elliptica Blume* Pada Tikus Betina Yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz( $\alpha$ )Antrasena. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor. Indonesia. <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/18002>.
- Rousdy DW, Wardoyo ERP. 2018. Histologi Limpa Dan Hematologi Mencit yang Diinfeksi *Escherichia coli* Setelah Pemberian Asam Humat gambut Kalimantan. *Journal Bioteknologi dan Biosains Indonesia* 5(2): 168-176.
- Ruddle NH, Akirav EM. 2009. Secondary Lymphoid Organs: Responding to Genetic and Environmental Cues in Ontogeny and the Immune Response. *The Journal of Immunology* 183: 2205-2212.
- Sari CDRP, Estuningsih S, Subangkit M. 2012. Pengaruh Pemberian Ekstrak Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Organ Limfoid Sekunder Mencit (*Mus musculus*). Fakultas Kedokteran Hewan. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor. Indonesia. <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/56404>.
- Schirmacher V. 2017. Immunobiology of Newcastle Disease Virus and Its Use for Prophylactic Vaccination in Poultry and as Adjuvant for Therapeutic Vaccination in Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 1-20.
- Schook BL, Laskin LD. 1994. *Xenobiotics and Inflammation*. California (USA). Academic Press. Hlm. 184-188.
- Sewoyo PS, Adi AAAM, Winaya IBO. 2021a. Profil Bobot Badan dan Tingkat Mortalitas Tikus Jantan Galur Sprague Dawley Selama Pembentukan Fibrosarkoma yang Dipicu oleh Benzo(a)piren. *Indonesia Medicus Veterinus* 10(1): 1-11.
- Sewoyo PS, Adi AAAM, Winaya IBO, Sampurna IP, Bramardipa AAB. 2021b. The Potency of Virulent Newcastle Disease Virus Tabanan-1/ARP/2017 as Virotherapy Agents in Rat Fibrosarkoma Models. *Journal of Advanced Veterinary Research* 11(2): 64-68.
- Sewoyo PS, Adi AAAM, Setiasih NLE, Dewi IGAMA. 2022. Haematological Profile of Rat Fibrosarcoma Models After Virulent Newcastle Disease Virus Virotherapy: A Pilot Study. *Revista electronica de Veterinaria* 23(1): 47-55.
- Stewart G. 2004. *The immune System*. Texas. Chelsea House Pub. Hlm. 7-10.
- Tasminatun S, Pravitasari R, Makiyah SN. 2017. Potential ethanol of *Carica papaya* L. extract as immunomodulatory through histology observation at mice balb/C spleen. *Berkala Kedokteran* 13(2): 205-210.
- Tayeb S, Zakay-Rones Z, Panet A. 2015. Therapeutic potential of oncolytic Newcastle disease virus: a critical review. *Oncolytic Virotherapy* 4: 49-62.
- Yanti TUA, Suwiti NK, Setiasih NLE. 2019. Gambaran Histologi dan Histomorfometri Limpa Kambing Peranakan Etawah. *Buletin Veteriner Udayana* 11(2): 121-127.
- Yurchenko K, Glucshchenko A, Belgogorodtsev S. 2015. A138 In vitro oncolytic effects of wild Newcastle disease virus strains and results in vivo virotherapy. *European Journal of Cancer Supplements* 13(1): 67-68.
- Yurchenko KS, Zhou P, Kovner AV, Zavjalov EL, Shestopalova LV, Shestopalov AM. 2018. Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines in vitro and in vivo on xenograft model. *PLoS ONE* 13(4): 1-19.
- Zamarin D, Palese P. 2012. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol* 7(3): 347-367.