

Identifikasi Ekspresi Glikokonjugat pada Jaringan Limfonodus Sapi Bali yang Terinfeksi Virus Penyakit Jembrana Secara Eksperimental

THE LYMPHONODES OF BALI CATTLE EXPERIMENTALLY INFECTED
WITH JEMBRANA VIRUS DISEASE

Ida Bagus Oka Winaya[✉], Anak Agung Ayu Mirah Adi

Laboratorium Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Udayana Jalan PB. Sudirman Denpasar, Bali
Telp/Fax : 0361-223791/0361-701808. Email: Okawinaya@gmail.com.

ABSTRACT

The aim of this study is to compare glycoconjugate expression in the lymphonodes between bali cattle experimentally infected with jembrana virus disease and non infected cattle. The biotinylated lectins used in this study were *Concavalina ensiformis* (ConA), *Arachis hypogaea* (WGA), *Triticum vulgare* (PNA), *Ulex europeus* (UEA-1), and *Sambucus nigra* (SNA), respectively. The expression of lectin binding glycoconjugate exhibit differences between the lymphonodes of infected and non infected cattle. Con A, WGA, and SNA were found be bound to lymphocytes whereas in infected cattle it was less intensive, repectively. More over, PNA and UEA were found strongly bound to the either lymphocytes of either infected and non infected cattle.

Key words : glycoconjugate, lymphonodes, lectin, bali cattle

PENDAHULUAN

Lektin adalah protein non imun yang tersebar luas di alam serta dapat berikatan dengan residu karbohidrat. Lektin merupakan glikoprotein asal tumbuhan dan hewan yang dapat berikatan secara spesifik dengan residu glikokonjugat pada permukaan sel (Lis dan Sharon, 1993., Vorki, 1993). Semua molekul lektin memiliki dua atau lebih tempat ikatan dengan karbohidrat, oleh karenanya sangat memungkinkan lektin untuk mengaglutinasi sel darah merah dan bereaksi dengan struktur glikoprotein atau glikolipid pada keadaan fisiologi mau pun patologi (Spicer dan Schulte, 1992.; Danguy *et al.*, 1994.). Terganggunya glikosilasi pada suatu sel mengindikasikan adanya suatu keadaan patologi pada organ. Glikosilasi merupakan proses penambahan gula pada rantai oligosakarida yang terjadi pada retikulum endoplasma dan badan golgi dengan bantuan enzim glikosiltransferase, misalnya transfer gula dari suatu nukleotida pembawa gula seperti UDP-N-asetilglukosamin ke residu manosa.

Salah satu penyakit infeksi yang dapat menyerang sapi bali adalah penyakit jembrana.

Virus penyakit jembrana termasuk famili *Retrovirus*, subfamili *lentivirus*. Sifat virus penyakit jembrana hanya menyerang limfosit jenis tertentu, yaitu diduga kuat sebagai limfosit T bermarker CD4 (Dharma, 1996). Virus penyakit jembrana tidak sama seperti *Lentivirus* pada umumnya karena dapat menyebabkan penyakit yang bersifat kronis. Penyakit tersebut di dahului oleh adanya perubahan yang bersifat limfoproliperatif yang ditandai oleh adanya pembesaran pada jaringan limfonodus subkutan (Wilcox, 1997).

METODE PENELITIAN

Hewan Percobaan dan Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan dua ekor sapi bali dewasa. Satu ekor sapi diinfeksi virus jembrana dan satu ekor lagi tidak diinfeksi. Sapi bali yang tidak diinfeksi virus jembrana berasal dari Kecamatan Nusa Penida, Kabupaten Klungkung. Sapi donor asal Nusa Penida diinokulasi dengan 1 ml suspensi 10% limpa sapi isolat virus jembrana asal Tabanan. Dua hari setelah temperatur rektum melewati 39,5 °C, sapi dikorbankan nyawanya/dietanasi dan

dinekropsi. Organ limfonodus preskapularis diambil kemudian masukkan ke dalam pot yang sudah mengandung *netral buffer formalin* 10 % untuk diproses menggunakan teknik histologi.

Lektin yang Digunakan

Semua lektin yang digunakan pada penelitian ini adalah: *Canavalia ensiformis* agglutinin (Con A), *Arachis hypogea* agglutinin (PNA), *Triticum vulgare* agglutinin (WGA), *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-1) dan *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) (Sigma Chemical Co. St Lois MO). Spesifisitas lektin ditampilkan pada tabel 1.

Pembuatan Sediaan Histologi

Sampel jaringan limfonodus dipotong kecil-kecil sesuai ukuran dan didehidrasi di dalam larutan alkohol bertingkat mulai konsentrasi 70%, 95% dan absolut, kemudian dijernihkan dalam larutan xylol, dilanjutkan dengan infiltrasi menggunakan *paraffin* cair dan diembedding dalam blok *paraffin*. Blok *paraffin* kemudian dipotong dengan ketebalan 5 *micron* menggunakan *microtom*, sayatan yang sudah diperoleh letakkan di atas objek gelas yang sudah direndam dalam larutan *Poly-L Lysine*. Setelah proses defaraffinisasi dengan *xylol*, selanjutnya dilakukan rehidrasi dengan alkohol I,II, III, masing-masing selama tiga menit. Sesudah itu sediaan jaringan dibilas dengan aquabides selama lima menit. Sediaan kemudian siap diproses secara histokimia lektin.

Deteksi Glikokonjugat Secara Histokimia Lektin

Kotak lembab untuk menampung sediaan jaringan, disiapkan dengan cara membasahi beberapa lembar kertas tissue dan diletakkan dalam kotak tertutup. Sediaan jaringan kemudian dicuci dengan larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dalam waktu 15 menit dalam suhu ruang. Sediaan jaringan dikeringkan di bagian pinggirnya lalu teteskan 0,01% tripsin selama 30 menit. Cuci sediaan jaringan dengan PBS dalam waktu 15 menit, keringkan lalu teteskan dengan larutan 0,03 % H₂O₂ diamkan selama 15 menit dalam suhu ruang. Agar proses pencucian berlangsung optimal dapat dibantu dengan alat *shaker*. Setelah 15 menit sediaan jaringan kemudian dikeringkan, masing-masing sediaan ditetesi dengan 30 µl larutan lektin berlabel biotin. Sediaan jaringan yang sudah ditetesi lektin kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama dua jam. Setelah dua jam

cuci sediaan dengan PBS sebanyak tiga kali, masing-masing lima menit.. Keringkan sediaan dan teteskan masing-masing dengan ABC kit (Avidin–Biotin Peroksidase Komplek), biarkan selama 30 menit pada suhu ruang. Cuci sediaan dengan PBS selama 15 menit, keringkan kemudian tetesi dengan larutan *diamino benzidine tetrahidroklorida* (DAB), diamkan 30 menit sambil amati di bawah mikroskop untuk melihat reaksi larutan substrat dengan enzim. Apabila terjadi reaksi maka akan terlihat warna kecoklatan pada permukaan sel. Terakhir cuci sediaan jaringan dengan PBS selama 15 menit dan tetesi dengan *counterstain* menggunakan pewarna meyer-hematoksilin. Setelah *counterstain*, sediaan didehidrasi, *clearing* dan *mounting*.

Analisis Data

Pengamatan terhadap sediaan jaringan limph node dilakukan di bawah mikroskop. Sediaan jaringan limph node masing-masing diwakili oleh lima serial preparat. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif kualitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Histokimia Lektin

Data ekspresi glikokonjugat pada permukaan sel limfosit sapi bali terinfeksi dan tidak terinfeksi virus penyakit jembrana pada jaringan limfonodus terlihat pada Tabel 2 Ditemukan adanya ikatan glikokonjugat dengan lektin *Canavalia ensiformis* (Con A), *Triticum vulgare* (WGA) dan *Sambucus nigra* (SNA) pada permukaan sel limfosit sapi bali yang terinfeksi dan tidak terinfeksi virus jembrana. Tidak ditemukan adanya ikatan glikokonjugat dengan lektin *Arachis hypogea* (PNA) dan *Ulex europaeus* (UEA) pada permukaan sel limfosit sapi bali yang terinfeksi dan tidak terinfeksi virus penyakit jembrana. Reaksi ikatan lektin dengan glikokonjugat dapat dilihat pada Gambar 1.

Tempat ikatan yang umum antara protein dengan rantai oligosakarida terjadi pada grup amida dari asam amino asparagin. Ini dikenal sebagai kelompok N-glikosilasi dan berhubungan dengan residu gula asetilglukosamin. Hubungan pada gugus hidroksil asam amino serin atau theorenin menghasilkan O-glikosilasi, biasanya pada asetil galaktosamin. Ikatan-ikatan ini tampaknya mempenagruhi ikatan lektin (Agungpriyono, 2003). Proses glikosilasi

Tabel 1. Jenis lektin, sumber dan afinitasnya terhadap karbohidrat

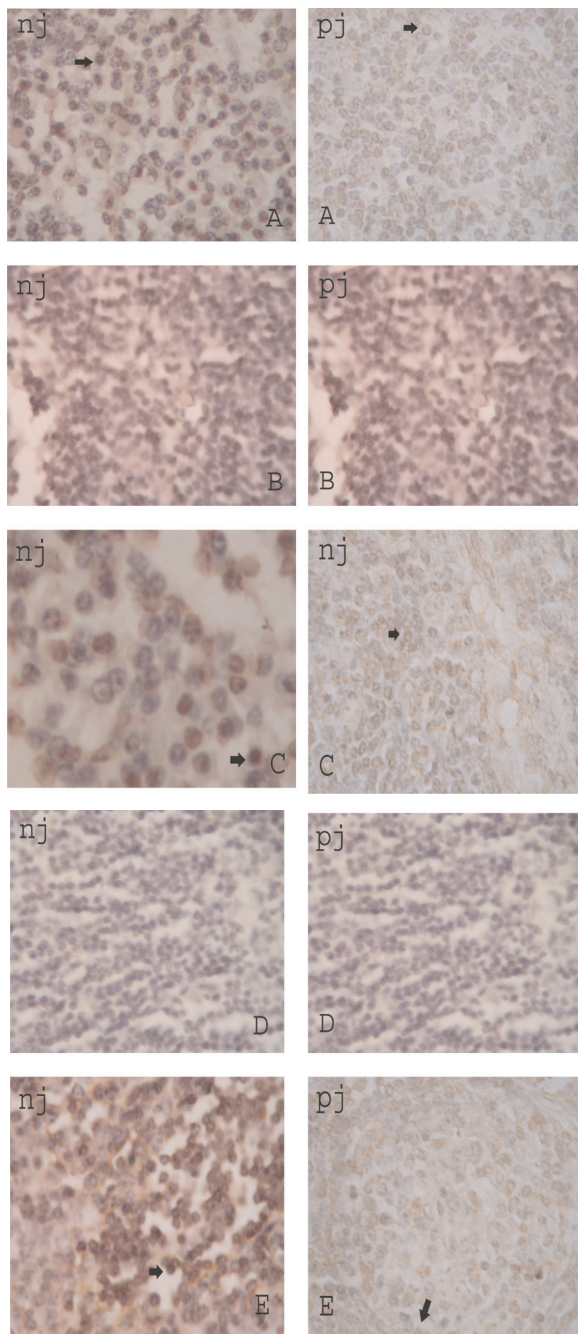
Tabel 2. Perubahan ekspresi glikokonjugat permukaan sel limfosit sapi bali terinfeksi dan tidak terinfeksi virus jembrana pada jaringan limfonodus

Hewan coba	Perlakuan lektin				
	Con A	PNA	WGA	UEA-1	SNA
Sapi bali diinfeksi virus jembrana	Lemah	Negatif	Lemah	Negatif	Lemah
Sapi bali tidak diinfeksi Virus jembrana	Kuat	Negatif	Kuat	Negatif	Kuat

adalah proses yang kompleks yang terjadi pada tiga lokasi yang berbeda di dalam sel seperti : sitoplasma, membran retikulum endoplasma, dan kompleks golgi. Protein glikosilasi pada sel eukariotik dapat disamakan dengan N dan O-glikosilasi. Proses ini diawali dengan adanya penyusupan N-asetilglukosamin dan lima manosa ke dolisilfosfat yang ada di permukaan retikulum endoplasma. Dipicu oleh mekanisme yang belum diketahui kompleks tersebut kemudian menembus dinding membran, di dalam lumen selanjutnya empat manosa dan tiga glukosa disisipkan. Karena dolisilfosfat dilepaskan, oligosakarida kemudian ditransfer ke asparagin, suatu residu asam amino rantai polipeptida. Proses tersebut merupakan proses perakitan untuk menjadi protein kompleks. Terjadi pemotongan terhadap tiga glukosa dan satu manosa pada rangkian protein oleh enzim yang berbeda. Glikoprotein kemudian berpindah menuju ke golgi kompleks untuk mengalami remodifikasi. Disini terjadi pemotongan terhadap manosa dan penyisipan tiga N-asetilglukosamin. Terakhir kompleks yang terbentuk menjadi komplet yang terdiri dari satu molekul fukosa, tiga galaktosa dan asam sialat. Komplek tersebut kemudian siap diekspor ke permukaan sel, ke dalam sitoplasma dan matrik ekstraseluler. Kelainan pada biosintesis glikoprotein berhubungan erat dengan mekanisme infeksi (Spiro, 2003).

Deteksi reaksi lektin *Canavalia ensiformis* (Con A) pada permukaan sel limfosit jaringan

limfonodus sapi bali yang terinfeksi dan tidak terinfeksi virus penyakit jembrana menunjukkan adanya ikatan. Ikatan antara lektin Con A dengan glikokonjugat pada permukaan sel limfosit menunjukkan intensitas kuat pada sapi yang tidak terinfeksi virus jembrana dan intensitas lemah pada sapi terinfeksi virus penyakit jembrana. Adanya ikatan ini juga menunjukkan bahwa pada sel limfosit sapi bali ditemukan adanya manosa (Man) dan glukosa (Glc). Deteksi reaksi lektin *Triticum vulgare* (PNA) pada permukaan sel limfosit jaringan limfonodus sapi bali yang terinfeksi dan tidak terinfeksi virus penyakit jembrana tidak menunjukkan adanya ikatan. Negatifnya reaksi ini menunjukkan bahwa pada sel limfosit sapi bali tidak ditemukan adanya N-asetilgalaktosamin. Deteksi reaksi lektin *Arachis hypogea* (WGA) pada permukaan sel limfosit jaringan limfonodus sapi bali yang terinfeksi dan tidak terinfeksi virus jembrana menunjukkan adanya ikatan. Ikatan antara lektin WGA dengan glikokonjugat pada permukaan sel limfosit menunjukkan intensitas kuat pada sapi yang tidak terinfeksi virus penyakit jembrana dan intensitas lemah pada sapi terinfeksi virus penyakit jembrana. Reaksi positif ini menunjukkan pada sel limfosit sapi bali ditemukan adanya N-asetilglukosamin. Deteksi reaksi lektin *Ulex europaeus* (UEA-1) pada permukaan sel limfosit jaringan limfonodus sapi bali yang terinfeksi dan tidak terinfeksi virus jembrana tidak menunjukkan adanya ikatan.



Gambar 1. Hasil histokimia lektin Con A (A), PNA (B), WGA (C), UEA-1 (D) dan SNA (E) pada sel limfosit jaringan limfonodus sapi bali tidak terinfeksi dan terinfeksi virus jembrana. Terjadi ikatan lektin dengan glikokonjugat pada sel limfosit ditunjukkan oleh tanda panah. (NJ = negatif jembrana dan PJ = positif jembrana)

Negatifnya reaksi ini mengindikasikan pada permukaan sel limfosit sapi bali tidak ditemukan adanya L-fukosa. Deteksi reaksi lektin *Sambucus nigra* (SNA) pada permukaan sel limfosit jaringan limfonodus sapi bali yang terinfeksi dan tidak terinfeksi virus jembrana menunjukkan adanya ikatan. Ikatan antara lektin SNA dengan glikokonjugat pada permukaan sel limfosit menunjukkan intensitas kuat pada sapi yang tidak terinfeksi virus jembrana dan intensitas lemah pada sapi yang terinfeksi virus penyakit jembrana. Reaksi ikatan lektin di permukaan sel limfosit sapi bali disajikan pada Gambar 1.

Lemahnya ekspresi ikatan lektin *Canavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogea* (WGA) dan *Sambucus nigra* (SNA) pada permukaan sel limfosit jaringan limfonodus sapi bali yang terinfeksi virus penyakit jembrana kalau dibandingkan dengan ekspresi ikatan lektin pada permukaan sel limfosit sapi bali yang tidak terinfeksi virus jembrana disebabkan oleh adanya gangguan pada proses biosintesis glikoprotein. Pada penelitian ini tidak diketahui dimana di dalam sel proses biosintesis glikoprotein tersebut mengalami hambatan. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan temuan Lanteri *et al.*, (2003) yang melaporkan bahwa terjadi perubahan atau gangguan pada biosintesis glikoprotein pada permukaan sel khususnya asam sialat pada permukaan sel limfosit yang terinfeksi oleh *human immunodeficiency virus* (HIV tipe 1). Hal yang sama juga ditemukan oleh Gary *et al.*, (1997) yang melaporkan *human immunodeficiency virus* dapat mengambil alih biosintesis glikoprotein dengan cara memanfaatkan glikan permukaan sel limfosit bagi kepentingan glikoproteinnnya. Hal tersebut berakibat pada tumbuhnya respon imun yang menyimpang. Penurunan daya tahan tubuh juga terjadi pada sapi yang terinfeksi virus penyakit jembrana yang ditandai oleh tertekannya respon imun humoral setelah ditantang dengan *ovalbumin* ayam dan *Brucella abortus* strain 19 (Wareing *et al.*, 1999)).

SIMPULAN

Dengan menggunakan histokimia lektin Con A, PNA, WGA, UEA-1 dan SNA dapat diketahui bahwa pada permukaan sel limfosit sapi terinfeksi dan tidak terinfeksi virus

penyakit jembrana ditemukan adanya manosa atau glukosa, N-asetilglukosamin dan asam sialat atau karbohidrat dari kelompok N-oligosakarida.

Ekspresi glikokonjugat permukaan sel limfosit sapi bali tidak terinfeksi virus penyakit jembrana lebih kuat jika dibandingkan dengan sel limfosit terinfeksi virus jembrana. Terjadi hambatan glikosilasi pada permukaan limfosit sapi bali yang diinfeksi oleh virus penyakit jembrana.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen Dikti Departemen Pendidikan Nasional atas bantuan dana penelitian melalui proyek Hibah Penelitian No 045/SP2H/DP2M/III/2007. Tanggal 29 Maret 2007.

DAFTAR PUSTAKA

- Agungpriyono S. 2003. Glikobiologi dan Lektin. Dalam Modul : *Pemanfaatan Kultur Jaringan dan Histokimia*. Pelatihan Dosen Universitas Perguruan Tinggi 16 – 26 Juni 2003. Kerjasama Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia. Dikti Depdiknas dengan Bagian Anatomi FKH IPB.
- Danguy A, Afik, Pajak B, Gabius HJ. 1994. Contribution of Carbohydrate. *Histochemistry to Glycobiology. Histol and Histopathol* 9: 155-171.
- Dharma DMN. 1996. The Pathology of Jembrana Disease. In : Wilcox, G.E., Soeharsono, Dharma, D.M.N., Copland, J.W. Editor Jembrana Disease and The Bovine Lentivirus. ACIAR Proceeding No 75, p 26–28.
- Gary FC, Deel A, Morris HR, Patankar M, Oehninger S, Seppala M. 1997. Viewing AIDS from A Glycobiological Perspective ; Potensial Linkage to the Human Fetoembryonic Defence System Hypothesis. *Mol Human Reprod* 3(1): 5 – 13.
- Lis J, Sharon N. 1993. Protein Glycosylation. Structural and Functional Aspect. *Eur J Biochem* 218 : 1–27.
- Lanteri M, Girdanengo V, Hiraoka N, Fusibert JG, Auberger P, Fukuda M, Baun LG Lefebure JC. . 2003. Altered T Cells Surface Glycosylation in HIV -1 Infection result in Increased Susceptibility to Galectin 1–Induced Cell Death. *Glycobiology* 13(12): 908 –918.
- Spicer SS, Schulte DA. 1992. Diversity of cell Glycoconjugates shown histochemically : a perspective. *J Histochem Cytochem* 40 : 1–38.
- Spiro RG. 2002. Protein Glycosylation : nature, distribution, enzymatic formation and disease implication of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12 (4): 43–56.
- Vorki A. 1993. Biological Role of Oligosaccharides All Theories are Correct. *Glycobiology* 3: 97–107.
- Wilcox GE. 1997. Jembrana Disease. *Aust Vet J* 75: 492–497.
- Wareing N, Hartaningsih N, Wilcox GE, Panhale WJ. 1996. Evidence for Immunosuppression Associated with Jembrana Disease Virus Infection of Cattle. *Vet Microbiol* 68: 179–185.