

Respon Antibodi Antikapsid pada Mencit yang Divaksin Vaksin Limpa dan Vaksin Kultur Virus Penyakit Jembrana

(*ANTICAPSID ANTIBODY RESPONSE OF BALB/C MICE VACCINATED WITH SPLEEN AND TISSUE CULTURE VACCINE OF JEMBRANA DISEASE VIRUS*)

Ni Luh Putu Manik Widiyanti^{1✉}, Ketut Suata²,
Nyoman Mantik Astawa³, Hartaningsih⁴

¹Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Pendidikan Ganesha, Jl Udayana Singaraja-Bali
Telp. 08124665149, Fax : (0362) 25335
Email : Manikwidiyanti@yahoo.com

²Lab Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Denpasar

³Lab Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan Unud, Denpasar

⁴Balai Besar Veteriner, Pegok Sesetan Denpasar

ABSTRACT

Bali cattle are one of Indonesia national asset which need to be conserved as they have many advantages. They are however susceptible to many infections diseases such as jembrana disease. Currently, the disease is prevented by vaccination using vaccine derived from jembrana disease virus (JDV)-infected bali cattle. An alternative vaccine using JDV-infected lymphocyte culture is expected to increase the virus yield and is therefore likely to increase the antibody response in the vaccinated animals. A study therefore was therefore conducted to compare the anti-capsid antibody response of Balb/c mice immunized with vaccine derived from the spleen of infected cattle (spleen vaccine) and those immunized with vaccine derived from infected lymphocyte culture (culture vaccine). As many as 16 female Balb/c mice were divided into two groups, Each group was vaccinated 4 times weekly respectively with spleen and culture vaccines. The antibody response against the capsid protein of JDV was determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the absorbance reading of mice sera from each group was compared. T-student and univariate analysis showed that the average absorbance reading sera of sera derived from mice vaccinated with spleen vaccine (0.15) was not significantly different from those vaccinated with culture vaccine (0.18). It appears that culture vaccine is able to induce anti-capsid antibody response as high as spleen vaccine.

Key words : Anticapsid antibody, spleen vaccine, tissue culture vaccine, jembrana disease virus

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara yang kaya akan plasma nutfah, baik flora mau pun fauna dan salah satu di antaranya adalah sapi bali (*Bos javanicus*) yang perlu dilindungi dari kepunahan. Pusat domestikasi sapi (*Bibos*) adalah Indo-China dan Malaysia kemudian menyebar ke Bali (Copland, 1996).

Sapi bali merupakan ternak yang sangat diminati petani karena tenaga kerja yang tangguh, memiliki adaptasi lingkungan yang tinggi, dan fertilitas yang tinggi, yaitu rata-rata 83%. Selain itu, sapi bali juga sangat diminati oleh konsumen karena memiliki pertumbuhan badan yang kompak, persentase karkas yang tinggi (56%), dan lemak sekitar 3%, sehingga

sangat baik untuk dikembangkan sebagai sapi potong (Darmadja, 1981). Keunggulan yang dimiliki oleh sapi bali, menyebabkan penyebarannya hampir ke seluruh pulau-pulau yang ada di Indonesia.

Salah satu kelemahan penting yang dimiliki oleh sapi bali adalah kerentanannya terhadap penyakit Jembrana (*Jembrana Disease/JD*). Penyakit tersebut hanya ditemukan di Indonesia dan secara klinis hanya menyerang sapi bali (Ramachandran, 1981., Teuscher *et al.*, 1981., Soeharsono *et al.*, 1990)

Upaya pengendalian penyakit Jembrana di Indonesia terus dilakukan. Salah satu di antaranya adalah dengan vaksinasi. Vaksin yang telah terbukti dapat menurunkan tingkat kematian sapi bali yang terserang *Jembrana*

Disease Virus (JDV), yang dipakai secara luas di lapangan adalah vaksin yang dibuat dari limpa sapi bali terinfeksi *JDV* (vaksin limpa). Vaksin jenis tersebut hanya mampu menginduksi kekebalan dengan tingkat proteksi sekitar 70% (Hartaningsih *et al.*, 2000)

Tingkat proteksi yang rendah oleh vaksin limpa disebabkan oleh sedikitnya sel yang terinfeksi *JDV* dalam limpa yang digunakan untuk membuat vaksin yaitu berkisar 10-15% sel limfosit di daerah parafolikel (daerah sel T) dan kurang dari 1% limfosit di daerah folikel (daerah sel B) (Chadwick *et al.*, 1997; Dharma, 1997). Karena tingkat proteksi yang diinduksi oleh vaksin limpa masih jauh memadai dan permintaan akan vaksin *JDV* yang bermutu lebih baik makin meningkat serta produksinya yang mahal, maka perlu dicari vaksin alternatif yang mampu meningkatkan kualitas vaksin. Salah satu cara meningkatkan kualitas vaksin adalah meningkatkan jumlah sel-sel terinfeksi yang bisa dibuat pada kultur jaringan sel limfosit.

Dalam mengkultur sel limfosit sapi bali, diperlukan bantuan mitogen tertentu yaitu interleukin-2 (*IL-2*). Dari penelitian Astawa *et al.*, (2005), terbukti bahwa *JDV* dapat bereplikasi pada kultur limfosit darah tepi, sehingga berpeluang untuk dijadikan vaksin kultur.

Potensi dari vaksin kultur tersebut dalam merangsang terbentuknya antibodi belum pernah dilaporkan. Untuk mendeteksi protein *JDV* tersebut digunakan antigen rekombinan kapsid (*Ca*) yang difusikan dengan *histidine* (Barboni *et al.*, 2000). Vaksin kultur adalah vaksin yang berasal dari kultur jaringan limfosit sapi bali. Pada lentivirus, penggunaan mencit untuk pertumbuhan virus telah banyak dilakukan antara lain mencit betina DBA₂ pada *Polycythemia-inducing Friend Leukemia Virus (FLV-P)* (Iffa Credo Laboratories, Grenoble, France) Launay *et al.* (1990), mendeteksi jumlah protein virus p24 dari medium kultur dari serum dengan *immunosorben assay* (ZeptoMetrix, Buffalo, N.Y) Cui *et al.*, (2002), dan penanganan hewan coba mencit (Keddie, 1990).

Khusus mencit yang biasa digunakan untuk penelitian adalah mencit balb/c, karena hewan tersebut mudah untuk ditangani (Newell *et al.*, 1988). Pada penelitian *Respiratory Syncytial Virus (RSV)* digunakan untuk studi imunopatologi, dan untuk mendeteksi peningkatan produksi imunoregulator sitokin antara lain *IL-12* (Kong *et al.*, 2005

Berdasarkan penelitian tersebut di atas, maka untuk mengetahui potensi vaksin kultur *JDV* dilakukan pada mencit balb/c dengan mendeteksi respon kekebalan humoral terhadap protein *Ca JDV*. Pada umumnya, protein *Ca* adalah protein yang pertama kali terdeteksi (Barboni *et al.*, 2000) dan merupakan imunodominan terhadap infeksi *JDV* (Kertayadnya *et al.*, 1993). Untuk mendeteksi antibodi terhadap protein *Ca*, digunakan protein rekombinan *Ca* yang dibuat dengan mengklon rangkaian nukleotida yang mengkode protein *Ca JDV* (nt 605-1282) dengan *PCR* dari plasmid *pT7T3* klon 139 (Chadwick *et al.*, 1995) menggunakan *Taq polimerase* dan primer *CAF* dan *CAR JDV* (Barboni *et al.*, 2000). Produk *PCR* itu, diklon dalam vektor *pGEM-T* (Promega) dan diferifikasi sebelum disubkloning ke dalam *pTRCHisB* (Invitrogen) untuk diekspresikan oleh bakteri *E. coli* strain TOP 10 (Invitrogen), sebagai protein fusi dengan *histidine* (Barboni *et al.*, 2000).

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap. Rancangan eksperimental menggunakan *Randomized Post Test Only Control Group Design*.

Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit balb/c. Sedangkan sampel penelitian adalah mencit balb/c betina, berumur 2 bulan, dengan berat badan 20-30 gram (Malole, 1989).

Kultur Sel Limfosit

Limfosit normal sapi bali diperoleh dari *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) yang kemudian disentrifugasi sehingga didapatkan endapan limfosit. Endapan limfosit normal ditambahkan media *DMEM* yang mengandung 10% *FCS*, 2 mg *ConA* dan *IL-2*. Kultur ini diinfeksi *JDV* yang diperoleh dari sel limfosit terinfeksi *JDV* dari limpa pada demam hari kedua pasca inokulasi. Suspensi sel dimasukkan ke dalam biakan sel 96 sumuran dan diinkubasikan pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Identifikasi protein *JDV* dari sel limfosit terinfeksi pada kultur sel dilakukan dengan uji *Westernimmunoblotting*.

Nilai Absorban Antibodi Mencit balb/c dengan ELISA

Pemeriksaan *Enzym Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dilakukan dengan cara : melapisi lempengan sumuran dengan antigen *Ca JDV*. Dilakukan bloking dengan susu 3%, ditambahkan serum, *antimouse IgG* yang dilabel dengan enzim *horseradish peroxidase* dan antibodi monoklonal terhadap antigen *Ca JDV* serta terakhir ditambahkan substrat TMB. Reaksi dihentikan dengan penambahan asam asetat 10%. Pemeriksaan ELISA dibaca dengan ELISA Reader/Titertek Multiskan/Biorad 550 menggunakan filter dengan panjang gelombang 405 nm.

Perbandingan Nilai Absorban Antibodi Vaksin Limpa dan Vaksin Kultur terhadap Protein *Ca*

Untuk membandingkan nilai absorban antibodi mencit balb/c yang divaksinasi dengan vaksin limpa dan vaksin kultur penyakit Jembrana terhadap protein *Ca* dilakukan dengan uji t (Sugiyono, 2007) dan analisis univariat (Trihendradi, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Karakteristik Kultur Limfosit yang Terinfeksi *JDV* pada Media Kultur

Untuk melihat pertumbuhan sel limfosit, limfosit sapi bali normal yang ditumbuhkan pada media *RPMI-1640* yang mengandung *concanavalin A* sebagai mitogen. Dalam penelitian ini ditemukan bahwa terjadi pertumbuhan dengan cepat. Pertumbuhan sel tersebut dapat dipertahankan dengan mengganti *Con-A* dengan *IL-2* konsentrasi 5 unit per mililiter medium. Morfologi limfosit yang ditumbuhkan dengan cara tersebut tampak sedikit berubah dengan munculnya sel berbentuk lonjong dan berukuran yang lebih besar dari normal. Sampai hari ke 21 pasca ko-infeksi tidak ditemukan adanya efek sitopatik pada kultur, ditandai dengan sel-sel limfosit dalam pertumbuhan masih rapat dan sel yang berinti banyak. Jumlah sel-sel limfosit terinfeksi yang terhitung pada kultur sel limfosit adalah 57,43%. Sedangkan sel-sel limfosit terinfeksi *JDV* pada limpa sebesar 9,5%.

Hasil penelitian dengan uji imuno-peroksidase menggunakan antigen *Ca*, yang sudah dikarakterisasi, ditemukan sitoplasma sel limfosit sapi bali terinfeksi *JDV* berwarna coklat dan nukleus berwarna ungu. Sedangkan

sitoplasma sel tidak terinfeksi *JDV* ditemukan berwarna transparan dengan nukleus berwarna ungu kebiruan.

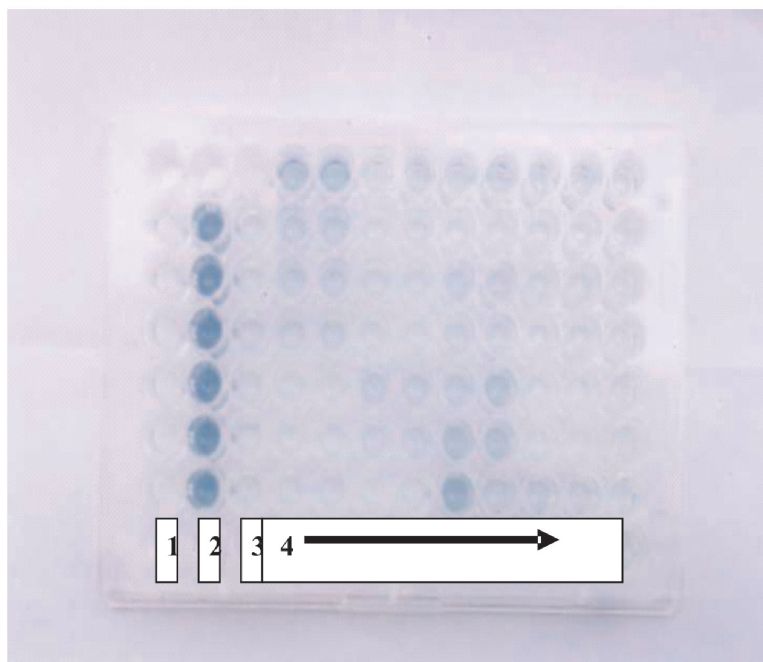
Uji *westerimmunoblotting* menggunakan antibodi monoklonal, endapan medium kultur *PBMC* dan plasma sapi bali terinfeksi *JDV* teridentifikasi protein dengan berat molekul 16 kDa dan 26 kDa. Sedangkan dengan menggunakan antibodi poliklonal, dari medium kultur *PBMC* dan endapan plasma sapi bali terinfeksi *JDV*, teridentifikasi protein dengan berat molekul 16 kDa, 21,5 kDa, 26 kDa, 29,7 kDa, 40 kDa, dan 50 kDa.

2. Respon Kekebalan Humoral Mencit Balb/c yang Divaksinasi dengan Vaksin Limpa dan Vaksin Kultur Terhadap Protein *Ca* Virus Penyakit Jembrana

Nilai absorban antibodi mencit balb/c yang divaksinasi dengan vaksin limpa dan vaksin kultur penyakit Jembrana dilakukan dengan uji (ELISA), menggunakan protein *Ca*. Reaksi biokimia dari uji ELISA ini adalah reaksi warna, dimana reaksinya memperlihatkan warna biru jika terjadi reaksi enzim dengan substrat (Gambar 1).

Tabel 1. Nilai absorban antibodi terhadap antigen *Ca, JDV* pada mencit balb/c yang divaksinasi dengan vaksin limpa dan vaksin kultur penyakit Jembrana

Mencit	Vaksin limpa <i>Ca</i>	Vaksin kultur <i>Ca</i>
M1	0,377	0,203
M2	0,123	0,090
M3	0,274	0,253
M4	0,148	0,503
M5	0,094	0,692
M6	0,036	0,069
M7	0,099	0,058
M8	0,125	0,402
M9	0,226	0,098
M10	0,086	0,089
M11	0,065	0,048
M12	0,489	0,113
M13	0,094	0,043
M14	0,037	0,211
M15	0,078	0,025
M16	0,088	0,060
X	2,44	2,95
x	0,15	0,18
K(+)	2,29	2,29
K(-)	0,08	0,08
Blank	0,15	0,15



Gambar 1. Contoh hasil *ELISA* serum mencit balb/c yang divaksinasi terhadap antigen *Ca*.

Keterangan :

Lubang sumuran 1 : Blanko

Lubang sumuran 2 : Kontrol positif (dari hiperimun sapi)

Lubang sumuran 3 : Kontrol negatif (mencit tanpa vaksinasi)

Lubang sumuran 4 : Serum mencit balb/c yang divaksinasi

Nilai absorbansi antibodi mencit balb/c dibaca menggunakan *ELISA Reader Type Model 550* dengan panjang gelombang 405 nm. Rata-rata nilai absorbansi antibodi mencit balb/c yang divaksinasi dengan vaksin limpa terhadap antigen *Ca* penyakit jembrana, adalah sebesar 0,15. Sedangkan rata-rata nilai absorbansi antibodi menggunakan vaksin kultur terhadap antigen *Ca* sebesar 0,18 (Tabel 1)

Uji *ELISA* menunjukkan bahwa hewan coba mencit balb/c mampu membentuk antibodi terhadap *JDV*. Dari penelitian Wilcox *et al.*, (1993), Kertayadnya *et al.*, (1993), dan Chadwick *et al.*, (1995) didapatkan bahwa salah satu sifat *JDV* sulit hidup pada hewan percobaan kecil dan tidak membunuh mencit. Tetapi dalam penelitiannya tidak meneliti apakah terbentuk antibodi pada hewan percobaan kecil yang terinfeksi *JDV*.

Dari uji *t* menurut Sugiyono (2007), rata-rata nilai absorbansi antibodi mencit yang divaksinasi dengan vaksin limpa penyakit Jembrana terhadap antigen *Ca* sebesar 0,152, dengan $S_1^2 = 0,0163$. Sedangkan rata-rata nilai absorbansi antibodi mencit yang divaksinasi dengan vaksin kultur penyakit jembrana terhadap antigen *Ca* sebesar 0,185, dengan $S_1^2 = 0,0368$, dengan varian sebesar 2,2576. Dengan uji *t*, $t_{hitung}(0,405) < t_{tabel} 5\% (2,042)$ sehingga

tidak terdapat perbedaan yang signifikan nilai absorbansi antibodi mencit balb/c yang divaksinasi dengan vaksin limpa dan vaksin kultur terhadap antigen *Ca JDV*. Analisa univariat pada mencit balb/c yang divaksinasi dengan vaksin limpa dan vaksin kultur terhadap antigen *Ca JDV* juga menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p > 0,05$). Menurut Sullivan *et al.*, (1998); dan Kortrikis *et al.*, (1996) bahwa antibodi terhadap *HIV-1* dapat meningkatkan replikasi virus dalam model sel kultur. Dalam penelitian ini diperoleh hasil nilai absorbansi antibodi yang tidak berbeda nyata antara mencit yang divaksinasi dengan vaksin limpa dan vaksin kultur. Ini dimungkinkan karena dilihat dari struktur *JDV* dan patogenesisnya pada waktu menginfeksi sel, antigen yang terluar adalah *surface unit (SU)*.

SIMPULAN

Respon antibodi antikapsid yang ditimbulkan vaksinasi dengan vaksin kultur sama dengan vaksin limpa. Vaksin kultur mampu menggertak antibodi antikapsid dengan titer setara dengan yang ditimbulkan vaksin limpa.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui respon kekebalan humoral mencit balb/c yang divaksinasi dengan vaksin limpa dan vaksin kultur terhadap antigen yang lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ACIAR, Balai Besar Veteriner (BBVet) Denpasar, dan semua pihak yang telah membantu sehingga terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. USA : W.B. Saunders Company
- Astawa NM, Hartaningsih N, Dharma DMN, Tenaya WM, Budiantono dan Ekaana, W. 2005. Replikasi Virus Penyakit Jembrana pada Kultur Limfosit Darah Tepi Asal Sapi Bali. *J Vet.* 6 (4) : 132-142.
- Astawa NM, Hartaningsih N, Agustini LP, Tenaya WM, Berata K, Widiyanti LPM. 2006. Detection of Jembrana Disease Viral Antigen in Peripheral Blood Lymphocytes by Monoclonal Antibodies. *Media Kedokteran Hewan.* 22 : (3)
- Barboni P, Thompson I, Brownlie J, Hartaningsih N, Collins ME 2001. Evidence for the Presence of Two Bovine Lentiviruses in the Cattle Population of Bali. *Vet. Microbiol.* 80 :313-327
- Chadwick BJ, Coelen RJ, Samuels LM, Kertayadnya G, Wilcox GE. 1995. Genomic Sequence Analysis Identifies Jembrana Disease Virus as a New Bovine Lentivirus. *J Gen Virol.* 76 (1): 189-192
- Chadwick BJ, Desport M, Dharma DMN, Brownlie J, Wilcox GE. 1996. Detection of Jembrana Disease Virus in Paraffin-embedded Tissue Sections by In Situ Hybridization. In Wilcox GE, Soeharsono S, Darma DMN, Copland JW. 1997. ACIAR Proceeding : 75: 66-71
- Copland J. 1996. Bali Cattle : Origins in Indonesia. In Wilcox GE, Soeharsono S, Darma DMN, Copland JW . 1997. :ACIAR Proseeding. 75:29-33.
- Cui Y, Golob J, Kelleher E, Ye Z, Pardoll D, Cheng L. 2002. Targeting Transgene Expression to Antigen-Presenting Cells Derived from Lentiviruses Transduced Engrafting Human Hemapoietic Stem/ Progenitor Cells. *American Society of Hematology* : 99 (2) : 399-408
- Darmadja D. 1981. Masalah Peningkatan Potensi Produksi Ternak Sapi di Indonesia. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Dalam Ilmu Produksi Ternak. Denpasar : Universitas Udayana
- Dharma DN, Putra AAG. 1997. Penyidikan Penyakit Hewan. Denpasar. CV Bali Media Adhikarsa.
- Hartaningsih N, Tenaya IWM, Agustini NLP. 2000. Infeksi Dua Lentivirus Pada Populasi Sapi Bali. *Bull. Vet. BPPH Wilayah VI.* 56 (12): 2-4
- Keddie JR. 1990. *Safety in the Use of Animal Models for AIDS.* Elsevier Pub B.V (Biomedical Division).
- Kertayadnya G, Wilcox GE, Soeharsono S, Hartaningsih N, Coelen RJ, Cook RD, Collins ME, Brownlie J. 1993. Characteristics of a Retrovirus Associated with Jembrana Disease in Bali Cattle. *J Gen. Virol.* 74 : 1765-1773
- Kostrikis LG, Cao Y, Ngai H, Moore JP, Ho DD. 1996. Quantitative Analysis of Serum Neutralization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from Subtypes A,B,C,D,E,F and I: Lack of Direct Correlation Between Neutralization Serotypes and Genetic Subtype and Evidence for Prevalent Serum-Dependent Infectivity Enhancement. *J Virol.* 70 : 445-458
- Kong X, Hellermann GR, Patton G, Kumar M, Behera A, Randall TS, Zhang J, Lockey RF, Mohapatra SS. 2005. An Immunocompromised Balb/c Mouse Model for Respiratory Syncytial Virus Infection. *J Virol* 2. (3).
- Launay O, Sinet M, Varlet P, Pocard JJ. 1990. *Mouse Model of Retroviral Infection : Early Combination Therapy of Azidothymidine with Synthetic Double-Stranded RNA (Poly I) (Poly C).* Elsevier Sci.Pub. (Biomedical Division).
- Newel DG, McBride BW, Clark SA. 1988. *Making Monoclonals* : Salisbury. The Laverham Press

- Ramachandran S. 1981. Final Report to the Project Manager UNDP/FAO Project : Strengthening of Animal Health Services in the Eastern Island of Indonesia, Bali Indonesia.
- Soeharsono S, Hartaningsih N, Soetrisno M, Kertayadnya G, Wilcox GE. 1990. Studies of Experimental Jembrana Disease in Bali Cattle. Transmission and Persistence of the Infectious Agent in Ruminant and Pigs, and Resistance of Recovered Cattle to Reinfection. *J Comparative Pathol.* 103 : 61-69
- Soeharsono S, Putra AA, Hartaningsih N, Sulistyana K, Tenaya M, Wilcox GE. 1996. *The Transmission and Persistence of Jembrana Disease Virus in Cattle.* In Wilcox GE, Soeharsono S, Darma DMN, Copland, JW. 1997: 75: 76-78. ACIAR Proceeding
- Sugiyono. 2007. *Statistika untuk Penelitian.* Bandung : Alfabeta
- Sullivan N, Sun Y, Li J, Hofmann W, Sodroski J. 1995. Replicative Function and Neutralization Sensitivity of Envelope Glycoproteins from Primary and T-Cell Line-Passaged Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates. *J Virol.* 69 : 4413-4422
- Teuscher E, Ramachandran S., Harding HP. 1981. Observation on the Pathology of Jembrana Disease in Bali Cattle. *Zentralblatt fuer Veterinaermedizin Reihe A.* 28. 608-622
- Wilcox GE, Kertayadnya G, Hartaningsih N, Dharma DMN, Soeharsono S, Robertson T. 1992. Evidence for Viral Aetiology of Jembrana Disease in Bali Cattle. *Vet Microbiol.* 33 : 367-374