

UMUR SAPI BALI BERPENGARUH PADA RESPON KEKEBALAN SELULER TERHADAP VIRUS PENYAKIT JEMBRANA PASCA VAKSINASI

I KETUT BERATA

LAB. PATOLOGI FKH UNIVERSITAS UDAYANA
JL. PB. SUDIRMAN DENPASAR BALI, E-mail: iketutberata@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mempelajari umur sapi Bali yang terbaik untuk divaksinasi agar respon kekebalan selulernya optimal terhadap virus penyakit Jembrana. Penelitian ini menggunakan 3 ekor sapi Bali betina yang berumur 7, 9 dan 12 bulan. Masing-masing sapi diadaptasikan 2 minggu dan diberikan obat cacing. Pemberian pakan 3 kali sehari dan air minum secara *ad libitum*. Vaksinasi dilakukan dengan vaksin JD.Vacc.sp.15 (produksi BBVet Denpasar) pada masing-masing sapi sebanyak 3 ml secara intramuskuler, satu bulan kemudian dilakukan *booster* dengan dosis dan rute yang sama. Seminggu pasca vaksinasi *booster*, darah perifernya diambil untuk mengisolasi limfosit dengan teknik *picoll-paque gradient*. Limfosit dikultur dalam media DMEM tanpa serum untuk selanjutnya dilakukan uji MTT. Uji MTT digunakan untuk menguji respon kekebalan seluler. Mitogen yang digunakan adalah protein virus Jembrana. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan respon kekebalan seluler yang bermakna ($p < 0,05$) antara sapi umur 7 bulan dengan 9 dan 12 bulan. Tidak terdapat perbedaan respon kekebalan seluler yang bermakna ($p > 0,05$) antara sapi umur 9 bulan dengan 12 bulan. Hasil ini menunjukkan bahwa umur sapi 12 bulan merupakan umur tepat mulai diberikan vaksinasi, karena respon kekebalan selulernya optimal.

Kata kunci: umur, respon kekebalan seluler, uji MTT

AGE OF BALI CATTLE IS TO INFLUENCE ON THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE AGAINST JEMBRANA DISEASE VIRUS POST VACCINATION

ABSTRACT

The aim of this research is to study the accurately age of Bali cattle vaccination so that could obtained the optimal cellular immune response against Jembrana virus disease. In this research was used three Bali cattles i.e. 7, 9 and 12 month of age respectively. Each of the cattles were adapted in two weeks and were given the anthelmintic treatment. The feeding was given three times daily and the drinking water *ad libitum*. The vaccine was inoculated by 3 ml JD.vacc.sp.15 vaccine (BBVet Denpasar production) by intramuscular route respectively. One month after first vaccination, was conducted booster by

similarly dose and route respectively. One week after the booster, from the each cattle was taken its peripheral blood cells for to isolated their lymphocytes by picoll-paque gradient method. Each of this lymphocyte cells were cultured in non serum DMEM media for the MTT assay. MTT assay was used for to determine the cellular immune response. The mitogen was used whole protein of Jembrana disease virus. Result of the research showed significantly difference ($p < 0,05$) of cellular immune response among the age 7 month with 9 and 12 month of cattles. There were not significantly difference ($p > 0,05$) of the response between 9 with 12 month of age. This result indicated that the cattle which 9 month of age is the good timing to start the vaccination, because its cellular immune response is optimal.

Key words: age, cellular immune response, MTT assay

PENDAHULUAN

Sapi Bali seperti sapi pada umumnya peka terhadap berbagai penyakit baik *infeksius* maupun *non infeksius*. Sebagai pencegahan penyakit yang paling umum dilakukan adalah dengan cara vaksinasi. Vaksinasi terhadap sapi-sapi di lapangan sering dilakukan tanpa memperhatikan umurnya. Pada hal sistem kekebalan tubuh sapi sangat dipengaruhi oleh umur. Tidak adanya patokan pasti tentang umur yang terbaik untuk melakukan vaksinasi, maka perlu dilakukan penelitian tentang hal tersebut.

Sapi Bali paling peka terhadap penyakit Jembrana. Penyakit ini ditengarai menyebabkan kerugian yang tinggi pada peternakan sapi Bali, karena angka morbiditas dan mortalitasnya dapat mencapai 17% (Dharma, 1996). Pencegahan terhadap penyakit Jembrana saat ini dilakukan dengan cara vaksinasi. Vaksin yang digunakan adalah vaksin JD Vacc.sp.15 produksi Balai Besar Veteriner Denpasar. Tetapi daya proteksi vaksin ini dilaporkan sekitar 70% (Hartaningsih *et al*, 2001). Belum ada laporan tentang penyebab masih rendahnya daya proteksi vaksin ini. Tidak tercapainya daya proteksi vaksin secara optimal, kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor. Salah satu faktor tersebut adalah tidak optimalnya respon

kekebalan tubuh sapi terhadap vaksin untuk menimbulkan sel-sel memori. Oleh karena itu penelitian kaitan umur dengan respon kekebalan tubuh sapi perlu dilakukan.

Pengukuran respon kekebalan tubuh meliputi respon kekebalan seluler dan respon kekebalan humoral. Kesembuhan sapi Bali yang terinfeksi virus Jembrana dilaporkan didominasi akibat respon kekebalan seluler (Dharma *et al.*, 1996). Penyakit Jembrana pada sapi Bali merupakan penyakit akut, dimana masa inkubasi virus Jembrana adalah 7-12 hari (Kertayadnya *et al.*, 1993). Oleh karena itu penelitian tentang kaitan umur dengan uji respon kekebalan seluler merupakan fokus yang akan diteliti. Respon kekebalan seluler adalah mengukur daya proliferasi limfosit sapi yang sebelumnya diinokulasikan vaksin Jembrana. Penentuan daya proliferasi limfosit ini dapat dilakukan dengan uji MTT (methylthiazole tetrazoleum) sesuai dengan prosedur Wareing (1996). Prinsip dari uji MTT adalah mengukur tingkat warna biru yang dibaca dan ditransfer ke nilai absorban oleh *multiscan spectrophotometer*. Tingkat warna biru merupakan hasil perubahan sodium MTT menjadi formazan akibat aktivitas oleh enzim mitokondria limfosit yang hidup. Semakin banyak sel yang hidup, semakin pekat pula warna biru. Nilai absorban ini menunjukkan tingkat daya proliferasi limfosit sebagai manifestasi dari tingkat respon kekebalan seluler.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Lokasi dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner Denpasar, selama 5 bulan.

Materi dan Alat-alat Penelitian

Pada penelitian ini diperlukan materi dan alat-alat : 3 ekor sapi Bali, EDTA 5%, media DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*), dimethyl sulfoxide (DMSO), kit MTT : (3- [Dimethylthiazole -2,y]) 2,5 diphenyl Tetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co USA), alkohol, Phosphat buffer saline (PBS), tabung 40 ml penampung darah steril alat timbang, pipet Pasteur, pipet transfer, mikropipet 50 ul, mikropipet 100 ul , venoject, sentrifuse, tabung reaksi, kotak inkubasi, gelas objek, *coverslip* dan mikroskop binokuler, ELISA reader (*multiscan spektrophotometer*).

Penyiapan Sapi Bali

Pada penelitian ini digunakan 3 ekor sapi Bali betina yang berumur 7, 9 dan 12 bulan. Sapi dipelihara oleh peternak, pakan yang diberikan adalah berupa rumput potong dan juga digembalakan, sedangkan air minum diberikan secara *ad libitum*. Sapi diadaptasikan selama 2 minggu dan diberikan obat cacing sebelum diimunisasi dengan vaksin Jembrana.

Pembuatan Vaksin Jembrana

Pembuatan vaksin dilakukan sebagaimana standar pembuatan vaksin di Balai Besar Veteriner Denpasar. Jaringan limpa sapi Bali yang terinfeksi JDV, diambil secara *aseptis* dan ditampung pada tempat steril, setelah dinekropsi pada demam hari kedua. 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 (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 Sapi

Sapi diperiksa kesehatannya sebelum dilakukan imunisasi dengan vaksin Jembrana. Masing-masing sapi disuntikkan 3 ml vaksin JD.Vacc.sp.15 secara intramuskuler. Satu bulan kemudian disuntikkan lagi vaksin dengan dosis yang sama, sebagai *booster*.

Isolasi Limfosit Sapi

Seminggu pasca vaksinasi yang kedua, darah perifernya diambil dari vena jugularis dengan tabung steril yang telah diberikan EDTA 5%. Darah ini disentrifus 2500 rpm selama 10 menit. Lapisan putih (*buffy coat*) di antara sel darah merah dan plasma diambil dan disuspensikan dengan media DMEM tanpa serum. Sel limfosit dipisahkan dari *buffy coat* dengan cara *ficoll-paque gradient* yaitu disentrifus 3.000 rpm selama 30 menit. Lapisan sel limfosit diambil dan dicuci 3 x dengan media DMEM tanpa serum. Sel limfosit yang diperoleh, selanjutnya dikultur (metode Liddell and Cryer, 1991) dengan modifikasi (Astawa *et al.*, 2005) untuk uji MTT.

Pengukuran Respon Kekebalan Seluler dengan Uji MTT

Limfosit masing-masing sapi dikultur untuk pemeriksaan respon kekebalan seluler dengan uji MTT. Uji MTT (Methylthiazole tetrazolium) merupakan uji untuk mengukur daya proliferasi limfosit sebagai manifestasi dari respon kekebalan seluler. Mitogen yang digunakan pada uji MTT adalah protein virus Jembrana. Protein virus Jembrana disiapkan dari limfosit asal limpa sapi Bali yang terinfeksi virus penyakit Jembrana, sesuai Astawa *et al.* (2005). Limpa seberat 0,2 gram ditampung dalam cawan petri yang berisi 1,5 ml PBS. Limpa kemudian dipilih untuk menguraikan limfositnya dengan jarum suntik 23 G yang ujungnya telah dibengkokkan. Limfosit yang keluar dari limpa ditampung dalam tabung 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, limfosit dilisiskan dengan penambahan 0,5 ml triton X-100 1% dalam PBS, dan inkubasi selama 1 jam pada suhu -20^oC. 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.

Setelah mitogen disiapkan, maka seminggu pasca vaksinasi ke2, limfosit darah perifer secara aseptis diambil dan ditampung dalam cawan petri berisi

media DMEM. Limfositnya dihomogenkan dalam media dengan cara penyedotan dan pengeluaran secara berulang menggunakan pipet Pasteur steril. Limfosit dalam cawan petri kemudian dipindahkan ke dalam tabung steril dan dicuci 1 kali dengan 10 ml media DMEM steril. Setelah dihitung dengan hemositometer, maka limfosit disuspensikan dalam media DMEM yang mengandung 15% FCS. Limfosit kemudian ditumbuhkan dalam mikroplat 96 sumuran, yang telah diisi mitogen dengan tingkat kepadatan 2×10^6 sel/ml media.

Limfosit dari setiap sapi, diinkubasikan dalam mikroplat yang berisi mitogen berupa protein virus Jembrana dengan konsentrasi 2 μ g/ml media. Sedangkan sebagai kontrol negatif digunakan media tanpa mitogen. Masing-masing limfosit sapi dilakukan pada 10 sumuran sebagai ulangan. Campuran limfosit dan mitogen diinkubasikan bersama selama 3 hari pada suhu 37°C dalam lingkungan lembab yang mengandung 5% CO₂. Setelah inkubasi selama 3 hari, ke dalam setiap sumuran ditambahkan 25 μ l MTT 5% (Sigma). 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)

Tingkat kepekatan warna biru dalam setiap sumuran dibaca dengan *multiscan spectrophotometer*, dengan $\lambda = 595$ nm. Nilai absorbannya dari masing-masing sumuran kemudian dicatat. Tingkat warna biru merupakan hasil perubahan sodium MTT menjadi formazan akibat aktivitas oleh enzim mitokondria limfosit yang hidup. Semakin banyak sel yang hidup, semakin pekat pula warna biru. Nilai ini menunjukkan tingkat daya proliferasi limfosit sebagai manifestasi dari derajat respon kekebalan seluler.

Analisis Data

Data berupa nilai absorban ditabulasi dan dianalisis dengan program SPSS 11 for Windows.

HASIL

Sebelum sapi diimunisasi dengan vaksin Jembrana, ketiga sapi tampak sehat dan tidak menunjukkan gejala penyakit. Pasca imunisasi pertama maupun kedua (booster), sapi tidak mengalami demam karena suhu rektal sapi berkisar 37,5 sampai 38°C. Sebagaimana pada penelitian-penelitian tentang penyakit Jembrana, kriteria demam pada sapi adalah jika suhu rektal menunjukkan 39,5°C keatas (Hartaningsih, *et al.*, 2001).

Hasil pemeriksaan respon kekebalan seluler berdasarkan daya proliferasi limfosit dengan uji MTT menunjukkan bahwa terdapat kecenderungan peningkatan nilai rata-rata absorban sesuai dengan umur sapi seperti tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1 Data Nilai Absorban pada Uji MTT Tiga Sapi Percobaan

No.Ulangan	Sapi 1	Sapi 2	Sapi 3
1	0,028	0,943	0,674
2	0,647	0,503	0,764
3	0,542	0,656	0,503
4	0,652	1,311	1,635
5	0,027	0,546	0,618
6	0,575	0,567	0,887
7	0,845	0,233	0,599
8	0,262	0,917	0,683
9	0,036	0,817	0,798
10	0,412	0,876	0,890
	4,026	7,369	8,051

Hasil analisis dengan sidik ragam (Tabel 2) diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antar ketiga sapi. Sapi umur 7 bulan memiliki

respon kekebalan seluler terendah dibandingkan sapi umur 9 dan 12 bulan, dimana perbedaan ini bermakna ($P < 0,05$), sesuai uji Duncan (Tabel 3). Sedangkan respon kekebalan seluler sapi umur 9 bulan tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) dengan sapi umur 12 bulan.

Tabel 2. Sidik Ragam

	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat tengah	P
Antar grup	0,849	2	0,424	0,032
Inter grup	2,930	27	0,109	
Total	3,778	29		

Data dianalisis dengan program SPSS 11 for Window

Tabel 3. Uji Duncan

Sapi	N	Subset alfa = 0,05	
		1	2
Sapi 7 bulan	10	0,4024	
Sapi 9 bulan	10	0,6927	0,6927
Sapi 12 bulan	10		0,8007
Significant		0,059	0,470

Nilai pada kolom yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Data dianalisis dengan program SPSS 11 for windows

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian tersebut di atas, maka tampak respon kekebalan seluler umur 9 bulan cukup tinggi dan terbaik umur 12 bulan. Hal ini menunjukkan bahwa vaksinasi terhadap penyakit Jembrana pada umur kurang dari 9 bulan tidak akan maksimal daya proteksinya. Walaupun umur sapi yang disapih rata-rata 4 bulan, tetapi pada tubuhnya masih mengandung kekebalan dari induknya jika mendapat kolostrom pada 3 hari pertama kelahirannya (Setiadi, 2001). Sampai umur berapa kemampuan kekebalan dari induk (maternal antibodi) tersebut dapat protektif, belum ada yang melaporkan. Dari hasil penelitian respon

kekebalan seluler tampak bahwa sistem kekebalan tubuh sapi sampai umur dibawah 9 bulan belum matang. Mulai umur 9 bulan dan bahkan pada umur 12 bulan merupakan fase dimana sistem kekebalan tubuh sapi telah siap merespon antigen virus Jembrana. Oleh karena itulah pada pemilihan sapi untuk donor vaksin penyakit Jembrana, diupayakan yang berumur antara 1,5 tahun sampai 2 tahun (Hartaningsih *et al.*, 1996). Masih rendahnya daya proteksi vaksin penyakit Jembrana JD.Vacc.sp.15 yaitu 70%, mungkin akibat dari faktor ketidaktepatan waktu vaksinasi. Hal ini sering terjadi pada saat vaksinasi secara masal sapi-sapi yang masih muda juga ikut divaksinasi. Selain dari kesalahan peternak melaporkan umur sapi, sering petugas vaksinasi kesulitan menyeleksi sapi berdasarkan umur di lapangan. Oleh karena itu perlu adanya evaluasi menyeluruh baik terhadap peternak untuk membuat catatan tentang umur sapi dan petugas vaksinasi di lapangan agar lebih selektif melakukan vaksinasi. Hal ini dilakukan untuk mengurangi pemborosan vaksin penyakit Jembrana serta penghematan tenaga.

Variasi respon kekebalan seluler terhadap antigen umumnya disebabkan oleh banyak faktor diantaranya belum adanya sel memori yang cukup dalam tubuh untuk merespon antigen tersebut (Aster, 2003). Sel memori terbentuk apabila hewan pernah terpapar oleh antigen yang homolog. Faktor rendahnya respon kekebalan seluler juga dapat disebabkan oleh *faktor* umur hewan yang memang belum optimal sistem kekebalan tubuhnya.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa umur sapi 9 dan 12 bulan memiliki respon kekebalan seluler yang lebih baik dari pada sapi umur 7 bulan. Oleh karena itu vaksinasi terhadap penyakit Jembrana sebaiknya dilakukan pada

umur 9 bulan keatas. Perlu penelitian dengan jumlah sampel umur yang lebih banyak untuk memperoleh validitas tentang umur optimal yang menimbulkan respon kekebalan seluler yang terbaik untuk pencegahan penyakit Jembrana.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Prof. drh. Nyoman Mantik Astawa, PhD., dan drh. N. Hartaningsih, MVSc., PhD (Kepala Lab. Biotek BBVet Denpasar) atas bantuan bahan dan fasilitas untuk penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Astawa, NM., Hartaningsih, N., Dharma, DMN., Tenaya, WM., Budiantono, dan Ekaana, W. 2005. Replikasi Virus Jembrana pada Kultur Limfosit Darah Tepi asal Sapi Bali. *J.Vet.*6(4).p.135-142.
- Aster, J. 2003. The Hematopoietic and Lymphoid Systems. In :Kumar, V., Cotran, R.S. and Robins, S.L. Editors. *Robins Basic Pathology*. 7thEd. Tokyo. Saunders. p.395-452.
- Berata, IK dan Astawa, NM. 2007. Protein kapsid virus penyakit Jembrana menginduksi kekebalan seluler pada mencit. *J. Vet.*8(3):147-154
- Berata, IK. 2009. Mencit BALB/c Dapat Digunakan sebagai Hewan Model Penelitian Virus Penyakit Jembrana. *Buletin Vet.Udayana*.1(1):7-11 ISSN:2085-2495
- Dharma, DMN., Ladds, PW., Wilcox, GE., and Campbell, RSF. 1994. Immunology of Experimental Jembrana Disease in Bali Cattle. *Vet.Immunol. and Immunopathol.* 44: p. 31-44
- Dharma, DMN. 1996. The Pathology of Jembrana Disease. In : Wilcox, GE., Soeharsono, S., Dharma, DMN., Copland, JW., Editors. *Jembrana Disease and The Bovine Lentiviruses*. ACIAR Proceedings No. 75. p. 26-28
- Hartaningsih, N., Soeharsono, S., Dharma, DMN., Kertayadnya, G., Sulistyana, K., Budiantono, A., and Wilcox, G.E. 1996. In : Wilcox, G.E., Soeharsono, S., Dharma, DMN., Copland, JW., Editors. *The Development and Use of A Vaccine for The Control of Jembrana Disease*. ACIAR No.75. p. 85-89

- Hartaningsih, N., Dharma, DM.N., Soeharsono, S., and Wilcox, GE.. 2001. The Induction of Protective Immunity Against Jembrana Disease in Cattle by Vaccination With Inactivated Tissue-Derived Virus Antigens. *Vet. Immunol. And Immunopathol.* 78.p.163-176.
- Kertayadnya, G., Wilcox, GE., Soeharsono, S., Hartaningsih, N., Coelen, RJ., Cook, RD., Collins, ME., and Brownlie, J. 1993. Characteristics of A Retrovirus Associated With Jembrana Disease in Bali Cattle. *J.of.Gen.Virol.* 74:1765-1773
- Liddell, JE., and Cryer, A. 1991. *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies.* England. John Wiley & Sons. p.1-154.
- Wareing, S. 1996. Investigation of The Cell Mediated Immune Response to Jembrana Disease Virus Proteins in Cattle. In. Wilcox, G.E., Soeharsono, S., Dharma, D.M.N., Copland, J.W. Editors. *Jembrana Disease and Bovine Lentiviruses.* ACIAR Proceedings No.75. p.83-84.