

ISOLASI VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA SEL PRIMER CHICKEN EMBRYO FIBROBLAST (CEF) DAN SEL KULTUR MARDIN-DARBY BOVINE KIDNEY (MDBK)

Desi Puspita Sari¹, Sri Handayani Irianingsih¹, M. Afdhal Darul²

¹Medik Veteriner di Laboratorium Virologi BBVet Wates

²Paramedik di Laboratorium Virologi BBVet Wates

ABSTRAK

Pada awal tahun 2018, banyak kasus penurunan produksi telur dan kematian pada unggas komersial yang dilaporkan di wilayah kerja BBVet Wates, sehingga jumlah permintaan uji isolasi virus AI bertambah dan berimplikasi pada peningkatan kebutuhan Telur Ayam Berembrio SAN. Kajian isolasi virus Avian Influenza pada sel primer *Chicken Embryo Fibroblast* (CEF) dan sel kultur *Mardin-Darby Bovine Kidney* (MDBK) telah dilakukan di Laboratorium Virologi BBVet Wates. Kajian ini bertujuan untuk melihat perubahan dan respon titer HA sel primer CEF dan sel kultur MDBK yang diinokulasi virus Avian Influenza. Kajian ini dilakukan dengan metoda inokulasi virus AI pada media pertumbuhan sel primer CEF P2 dan sel kultur MDBK P142. Sel CEF dibuat dari 2 telur ayam berembrio (TAB) umur 10 hari. Setelah 24 jam 1 flask sel CEF dilakukan *split* ke *microplate* 24 well, sedangkan sel MDBK dikultur ke *microplate* 24 well dan flask 25 cm². Isolat virus yang digunakan adalah A/Chicken/Sleman/BBVW-242/2017 dengan titer virus 16HA. Isolat virus diencerkan bertingkat dari 10⁻² sampai 10⁻⁵ dan diinokulasikan pada sel CEF dan sel MDBK dengan 3 kali ulangan. Sel MDBK yang dikultur pada flask 25 cm² diinokulasi virus enceran 10⁻². Sel diinkubasi selama 4 hari pada suhu 37°C. Sel primer CEF dan sel kultur MDBK setelah 1 jam post infeksi tampak adanya perubahan sel (cytopathic effect/cpe). Virus AI dapat diisolasi pada sel primer CEF dengan titer virus 4HA pada inokulasi virus enceran 10⁻² dan titer 2HA pada virus enceran 10⁻³. Pada sel kultur MDBK di *microplate* 24 well virus AI diidentifikasi pada pengenceran 10⁻² dengan titer virus 2HA dan 10⁻³ dengan titer 4HA sedangkan sel kultur MDBK di flask 25 cm² diperoleh titer virus lebih tinggi 64HA. Berdasarkan hasil kajian ini dapat disimpulkan bahwa sel primer CEF dan sel kultur MDBK dapat digunakan sebagai media pertumbuhan untuk isolasi virus AI.

Kata kunci : sel CEF, sel MDBK, inokulasi

PENDAHULUAN

Avian influenza (AI) disebut juga flu burung, fowl pest, fowl plaque atau avian flu dapat terjadi dalam 2 bentuk, yakni *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) atau fowl plaque dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) yang keduanya disebabkan oleh virus Influenza tipe A. Virus ini termasuk famili Orthomyxoviridae, yang berukuran 80-120 nm, dan berdasarkan karakter protein M nya dibedakan menjadi 3 tipe yang sangat berbeda secara antigenik yaitu virus Influenza tipe A, B, dan C. Tipe B dan C hanya ditemukan pada manusia dan kasusnya bersifat ringan. Sedang tipe A yang utama adalah menyerang unggas, walaupun juga ditemukan pada manusia, kuda, babi dan terkadang pada spesies mamalia lainnya. Berdasarkan “spike” haemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) pada amplop (pembungkus luar virus) maka virus influenza ditentukan subtipenya. Virus influenza A memiliki 15 HA (H1-H15) dan 9 NA (N1-N9) yang berbeda secara antigenik. Hingga saat ini, Semua wabah penyakit HPAI yang sangat patogen pasti disebabkan subtype H5 atau H7, namun tidak sebaliknya (SWAYNE and SUAREZ, 2000)

Kasus AI H5N1 di Indonesia pertama kali dilaporkan pada bulan Agustus 2003, menyerang beberapa peternakan ayam ras komersial di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Direktur Jenderal Peternakan pada tanggal 25 Januari 2004 dan dengan Surat Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 96/KPTS/PP.620/2/2004 tanggal 3 Pebruari 2004 tentang Pernyataan Berjangkitnya Wabah Penyakit Hewan Menular Influenza pada Unggas (Avian Influenza) di beberapa provinsi di wilayah Indonesia, sebagaimana telah diubah terakhir dengan Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 393/Kpts/PD.620/7/2007, menetapkan bahwa Indonesia telah terjangkit wabah penyakit AI pada unggas yang disebabkan oleh virus influenza tipe A subtipe H5N1 yang tergolong Highly Pathogenic Avian Influenza (Ditjennak 2008).

Virus influenza A mempunyai sifat mudah berubah. Antigen permukaan yang dimiliki virus influenza tersebut dapat berubah secara periodik yang lebih dikenal dengan istilah antigenic drift (mutasi titik/minor) dan antigenic shift (pergeseran genetik/mutasi mayor). Antigenic drift merupakan perubahan yang terjadi akibat mutasi genetik struktur protein permukaan virus, sehingga antibodi yang telah terbentuk oleh tubuh akibat vaksinasi sebelumnya tidak dapat mengenali keberadaan virus tersebut, sedangkan antigenic shift merupakan perubahan genetik virus yang memungkinkan virus ini menginfeksi secara lintas spesies. Mutasi mayor merupakan keunikan virus influenza karena genom virus itu terdiri atas delapan potong RNA, sehingga ketika virus influenza dengan tipe berbeda menginfeksi sel yang sama akan terjadi pertukaran segemen RNA dalam sel. Kedua sifat tersebut dapat menyebabkan kejadian pandemi (Stohr 2005).

Mekanisme infeksi virus influenza dimulai dengan perlekatan virus pada permukaan membran plasma. Reseptor untuk virus influenza adalah sialoglycolipid atau gangliosides atau sialoglycoprotein. Terminal sialic acid akan dikenali oleh hemagglutinin (HA) yang berperan dalam perlekatan virus. Kedudukan reseptor virus pada bagian distal globular hemagglutinin, yaitu daerah molekul yang menunjukkan sedikit perbedaan yang dikelilingi oleh 3 tempat antigen yang berbeda. Virus akan masuk ke dalam sel dengan bantuan ikatan paku HA pada mukoprotein yang mengandung terminal N-acetyl neuraminic acid (NANA = sialic acid) (Manugerra & Hannoun 1999).

Isolasi virus Influenza tipe A pada telur embrio bertunas SPF atau kultur sel sangat penting untuk epidemiologi investigasi wabah dan untuk beberapa tujuan lainnya. Karena spektrum susseptibilitas viral mereka mirip dengan hospes alaminya, sel primer seperti chicken embryo fibroblast (CEF) dan chicken embryo kidney (CEK) sering digunakan oleh laboratorium untuk pertumbuhan virus influenza (Lee et al, 2008), sedangkan sel line yang biasa digunakan adalah sel MDCK. Sel CEF dibuat di laboratorium dengan menggunakan telur ayam yang Spesifik Antibodi Negatif (SAN) berembrio umur 9-10 hari. Sel CEF bisa digunakan untuk menumbuhkan berbagai virus yang menyerang pada unggas salah satunya adalah virus AI.

TUJUAN

Kajian ini bertujuan untuk melihat perubahan dan respon titer HA pada sel primer CEF dan sel kultur MDBK yang diinokulasi virus Avian Influenza.

MATERI DAN METODA

Materi

Bahan yang digunakan dalam kajian ini adalah Telur Ayam Berembrio umur 9-11 hari, Sel MDBK P142, Sel CEF, Isolat Virus AI A/Chicken/Sleman/BBVW-242/2017, Media esensial (MEM), Antibiotik Gentamicyn, Penicilin Streptomycin, Gentamicin, Hepes, Fetal Bovine Serum, Fungizone, PBS steril, Trypsin, Methylene blue

Peralatan yang digunakan dalam kajian ini adalah Flask 25 cm², Tabung steril, Mikroplate tissue culture 24 well, ependorf steril, Pipet dan tips filter steril, Sentrifuge, Mikroskop, Inkubator CO₂

Metoda

1. Persiapan Sel CEF

Proses ini dilakukan di Laminar Flow di laboratorium Virologi BBV Wates. Sel CEF dipreparasi dari 2 embrio ayam umur 10 hari. Embrio ayam berasal dari telur *Specific Antibody Negatif* (SAN) milik IKHP BBV Wates. Sel CEF ditumbuhkan ke dalam flask 25 cm² menggunakan media GM 7%. Pada hari kedua sel CEF yang telah konfluen di split pada mikroplate tissue culture 24 well menggunakan media pertumbuhan 7%.

2. Persiapan Biakan Sel MDBK

Sel MDBK P142 yang telah konfluen dalam flask 25 cm² lalu displit dalam mikroplate tissue culture 24 well dan diberi media pertumbuhan 7%.

3. Inokulasi Virus AI pada Sel CEF dan Sel MDBK

Isolat virus yang digunakan untuk inokulasi pada sel CEF dan sel MDBK adalah A/Chicken/Sleman/BBVW-242/2017 dengan titer virus 16HA. Isolat virus diencerkan bertingkat dari 10⁻² sampai 10⁻⁵ dan diinokulasikan pada sel CEF dan sel MDBK dengan 3 kali ulangan pada mikroplate 24 well dan sel MDBK di flask 25 cm² dengan isolat virus yang diencerkan 10⁻³. Pada masing-masing mikroplate 24 well baik untuk sel CEF maupun sel MDBK digunakan 4 well untuk kontrol negatif dan 4 well untuk kontrol sel. Sel diinkubasi menggunakan inkubator CO₂ selama 4 hari dengan suhu 37°C. Pengamatan dilakukan selama 4 hari dengan melihat perubahan pada sel dengan terbentuknya *Cytopathic effect* (CPE).

4. Panen Virus dan Uji HA

Setelah inkubasi 4 hari post inokulasi, sel CEF dan sel MDBK yang telah diinokulasi isolat virus AI dilakukan proses pemanenan dengan cara koleksi cairan sel dengan masing-masing pengenceran dan dilanjutkan dengan pengujian HA.

HASIL

Tabel 1. Rekaman Inokulasi Isolat A/Chicken/Sleman/BBVW-242/2017 pada sel CEF

| | | | | | |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 1. 10^{-2} + CPE | 1. 10^{-2} + CPE | 2. 10^{-2} + CPE | 3. 10^{-2} + CPE | 4. Kontrol Sel - CPE | 5. Kontrol negatif - CPE |
| 6. 10^{-3} + CPE | 7. 10^{-3} + CPE | 8. 10^{-3} + CPE | 9. 10^{-3} + CPE | 10. Kontrol Sel - CPE | 11. Kontrol negatif - CPE |
| 12. 10^{-4} + CPE | 13. 10^{-4} + CPE | 14. 10^{-4} + CPE | 15. 10^{-4} + CPE | 16. Kontrol Sel - CPE | 17. Kontrol Negatif - CPE |
| 18. 10^{-5} + CPE | 19. 10^{-5} + CPE | 20. 10^{-5} + CPE | 21. 10^{-5} + CPE | 22. Kontrol Sel - CPE | 23. Kontrol Negatif - CPE |

Tabel 2. Rekaman Inokulasi Isolat A/Chicken/Sleman/BBVW-242/2017 pada sel MDBK

| | | | | | |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 2. 10^{-2} + CPE | 24. 10^{-2} + CPE | 25. 10^{-2} + CPE | 26. 10^{-2} + CPE | 27. Kontrol Sel - CPE | 28. Kontrol negatif - CPE |
| 29. 10^{-3} + CPE | 30. 10^{-3} + CPE | 31. 10^{-3} + CPE | 32. 10^{-3} + CPE | 33. Kontrol Sel - CPE | 34. Kontrol negatif - CPE |
| 35. 10^{-4} + CPE | 36. 10^{-4} + CPE | 37. 10^{-4} + CPE | 38. 10^{-4} + CPE | 39. Kontrol Sel - CPE | 40. Kontrol Negatif - CPE |
| 41. 10^{-5} + CPE | 42. 10^{-5} + CPE | 43. 10^{-5} + CPE | 44. 10^{-5} + CPE | 45. Kontrol Sel - CPE | 46. Kontrol Negatif - CPE |

Tabel 3. Hasil Pengujian Titer HA

| No | Isolasi Virus A/Chicken/Sleman/BBVW-242/2017 | Titer HA | | |
|----|--|----------|-----------------------|--------------------------------------|
| | | Sel CEF | Sel MDBK (mikroplate) | Sel MDBK (flask 25 cm ²) |
| 1 | 10 ⁻² | 4 HA | 2 HA | 64 HA |
| 2 | 10 ⁻³ | 2 HA | 4 HA | - |
| 3 | 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | - |
| 4 | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | - |



Gambar 1. Sel CEF 1 jam post inokulasi



Gambar 2. Sel CEF hari ke 2 post inokulasi (enceran 10⁻²)



Gambar 3. Sel MDBK hari ke 2 post inokulasi (enceran 10⁻²)

PEMBAHASAN

Keterbatasan ketersediaan telur Spesifik Antibodi Negatif (SAN) di BBV Wates pada awal tahun 2018 dan dengan banyaknya laporan kematian dan penurunan produksi telur yang menyerang unggas komersial di wilayah kerja BBV Wates merupakan salah satu alasan dilakukannya kegiatan kajian ini.

Sel CEF dan sel MDBK yang diinokulasi dengan Isolat virus A/Chicken/Sleman/BBVW-242/2017, setelah dilakukan pengamatan selama 4 hari inkubasi post inokulasi menunjukkan perubahan sel dengan ditemukannya *cytopathic effect* (CPE). Hal ini menunjukkan bahwa isolat virus A/Chicken/Sleman/BBVW-242/2017 diindikasikan termasuk ke dalam kelompok HPAI. Cytopathic virus membunuh sel di mana mereka bereplikasi. Ketika kultur sel yang diinokulasi dengan cytopathic virus, maka infeksi virus menyebar melalui media untuk menginfeksi mulai dari sel yang berdekatan hingga akhirnya semua sel dapat terinfeksi. Hasil dari kerusakan sel tersebut adalah *cytopathic effect* (CPE) (Murphy et al., 1999). CPE dapat diamati secara langsung dengan mikroskop. Adanya bentukan CPE baik pada sel CEF maupun sel MDBK yang sudah diinokulasi virus AI. Bentukan CPE ini tampak terlihat mulai hari ke 1 post inokulasi. Dan pada hari ke 2 post

inokulasi baik pada sel CEF maupun sel MDBK sudah mulai rusak karena adanya CPE dan sel terus mengelupas. Setelah diinkubasi selama 4 hari cairan sel dipanen dan dikoleksi berdasarkan pengencerannya dan dilanjutkan dengan melakukan pengujian HA untuk menentukan titer virus.

Setelah hari ke 4 post inokulasi baik sel CEF maupun sel MDBK di panen. Dengan cara sel CEF dan sel MDBK dalam mikroplate dan flask 25 cm² di freez thaw sebanyak 3 kali kemudian cairan tissue culture bisa dipanen dan dilanjutkan dengan pengujian titer HA. Cairan sel CEF dan sel MDBK di panen dengan cara dikoleksi cairannya sesuai dengan tingkat enceran pada saat inokulasi. Cairan sel tersebut dikoleksi pada ependorf steril. Untuk kemudian dilanjutkan untuk pengujian titer HA. Pada saat dilakukan pengujian HA ternyata hanya pada pengenceran 10⁻² dan 10⁻³ yang ada titer virusnya. Sedangkan pada pengenceran 10⁻³ dan 10⁻⁴ keduanya menunjukkan titer virus 0. Hal ini disebabkan karena kandungan virus yang terlalu sedikit pada saat proses pengenceran isolat yang digunakan untuk inokulasi. Pada inokulasi isolat AI dengan pengenceran 10⁻² pada sel MDBK yang di flask 25 cm² titer virusnya menunjukkan hasil 64 HA. Hal ini tampak berbeda dengan titer virus di mikroplate yang lebih rendah, hal ini disebabkan karena jumlah luasan sel dalam flask 25 cm² lebih banyak dibandingkan dalam mikroplate sehingga virus dalam flask dapat berkembang lebih banyak dan titer virus pun lebih tinggi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil dari kajian yang dilakukan ini dapat disimpulkan bahwa sel primer CEF dan sel kultur MDBK dapat digunakan sebagai media pertumbuhan untuk isolasi virus AI. Hal ini dibuktikan dengan perubahan sel dan adanya titer virus pada cairan tissue culture yang dipanen dan dilakukan pengujian titer HA. Luasan sel yang akan diinokulasi juga mempengaruhi titer virus, semakin banyak luasan sel yang diinokulasi maka titer virus juga akan semakin tinggi. Ketersediaan bahan-bahan dan peralatan laboratorium yang memenuhi syarat dalam pengujian sangat dibutuhkan untuk mendukung dalam percepatan pengujian dan diagnosa penyakit.

KETERBATASAN ATAU LIMITASI

Inkubator CO₂ yang tidak memenuhi syarat, karena rusaknya katub selang gas CO₂ sehingga inkubator yang digunakan tidak dapat mensuplai CO₂ sesuai kebutuhan sel. Sel diinkubasi tanpa memakai gas CO₂. Dan inkubator yang tersedia di laboratorium Virologi hanya tersedia 1 sehingga inkubator digunakan secara bersamaan untuk sel yang sedang ditumbuhkan atau dikembangkan dengan sel yang telah diinokulasi dengan virus.

DAFTAR PUSTAKA

- [DITJENNAK] Direktorat Jendral Peternakan. 2008. *Prosedur Operasional Standar Pengendalian Penyakit Avian Influenza*. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian.
- Lee, C-W, Jung, K., Jadhao, S.J. dan Suarez, D.L. (2008). *Evaluation of Chicken Origin (DF-1) and Quail Origin (QT-6) Fibroblast Cell Lines For Replication of Avian Influenza Viruses*. *J Viral Methods* 153, 22-28.
- Mannugerra JC, Hannoun C. 1999. *Influenza and Other Viral Respiratory Diseases*. Paris: Institute Pasteur.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. dan Studdert, M.J. 1999. *Veterinary Virology, Third Edition*. Academic Press. 81-82.
- Stohr K. 2005. *Avian influenza and pandemics-research needs and opportunities*. *N Engl J Med* 352:405-407.
- SWAYNE, D.E. and SUAREZ DL. 2000. *Highly pathogenic avian influenza*. In: *Diseases of Poultry: world trade and public health implications*. BEARD CW and MCNULTY MS (Eds.). *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19(2): 463-482.