

Peran Sel Imunologi Domba Ekor Tipis dalam Membunuh Cacing Hati *Fasciola gigantica* secara *In Vitro*

S. E. ESTUNINGSIH¹, S. WIDJAJANTI¹, S. PARTOUTOMO¹, T. SPITHILL², H. RAADSMA³ dan D. PIEDRAFITA⁴

¹Balai Penelitian Veteriner, PO BOX 151, Bogor 16114, Indonesia

²Mc. Gill University, Canada

³Genetic and Reproduction Dept. Sydney University, Australia

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Australia

(Diterima dewan redaksi 31 Oktober 2002)

ABSTRACT

ESTUNINGSIH, S. E., S. WIDJAJANTI, S. PARTOUTOMO, T. SPITHILL, H. RAADSMA and D. PIEDRAFITA. 2002. *In vitro* studies: The role of immunological cells in Indonesian thin tail sheep in the killing of the liver fluke, *Fasciola gigantica*. *JITV* 7(2): 124-129.

Previous studies have shown that Indonesian Thin Tail (ET) sheep exhibit high resistance to challenge with *Fasciola gigantica* when compared with Merino sheep, and this resistance is expressed in early infection. In order to study the role of the immune system in this resistance to ET sheep, *in vitro* studies were undertaken in the laboratory. *In vitro* study to confirm the ability of immune cells from ET sheep in the killing of *F. gigantica* larvae has been done by incubating immune cells and *F. gigantica* larvae together with immune sera or normal sera. The viability of the larvae was observed over a period 3 days incubation by observing their motility. The results showed that the cells isolated from *F. gigantica*-challenged ET sheep in the presence of immune sera from ET were able to kill 70% of the larvae. In contrast, cells from infected Merino were unable to kill a significant number of *F. gigantica* using the same sera source. It seems that the cytotoxicity was dependent on the presence of immune sera and ET peritoneal cells, suggesting the potential role of an antibody-dependent cell cytotoxic (ADCC) mechanism in the resistant ET sheep.

Key words: *In vitro*, *Fasciola gigantica*, peritoneal cell, sheep

ABSTRAK

ESTUNINGSIH, S. E., S. WIDJAJANTI, S. PARTOUTOMO, T. SPITHILL, H. RAADSMA dan D. PIEDRAFITA. 2002. Peran sel imunologi domba ekor tipis dalam membunuh cacing *Fasciola gigantica* secara *in vitro*. *JITV* 7(2): 124-129.

Domba Ekor Tipis (ET) telah diketahui memperlihatkan resistensi lebih tinggi terhadap infeksi *Fasciola gigantica* dibandingkan dengan domba Merino, dan resistensinya terlihat terutama pada awal infeksi. Untuk mengetahui peran sel imun dalam resistensi pada domba ET, beberapa uji *in vitro* dilakukan di laboratorium. Uji *in vitro* untuk membuktikan kemampuan sel imun domba dalam membunuh larva *F. gigantica* dilakukan dengan menginkubasikan sel imun dan larva *F. gigantica* bersamaan dengan penambahan serum kebal ataupun serum normal. Viabilitas larva diamati selama 3 hari inkubasi dengan melihat pergerakan daripada larva *F. gigantica*. Hasilnya menunjukkan bahwa sel yang diisolasi dari rongga peritoneum domba ET yang terinfeksi *F. gigantica* saat diinkubasikan dengan larva *F. gigantica* dengan penambahan serum kebal dari domba ET mampu membunuh larva cacing sampai 70%. Sebaliknya, sel yang diisolasi dari rongga peritoneum domba Merino tidak mampu membunuh larva *F. gigantica* walaupun disertai dengan penambahan serum kebal dari domba ET maupun serum kebal dari Merino. Hal ini menunjukkan bahwa proses sitotoksitas pada larva tergantung pada keberadaan serum kebal dan sel peritoneum dari domba ET, dan hal ini membuktikan pula bahwa resistensi pada domba ET melalui mekanisme *antibody-dependent cell cytotoxic (ADCC)*.

Key words: *In vitro*, *Fasciola gigantica*, sel peritoneum, domba

PENDAHULUAN

Domba Ekor Tipis (ET) telah diketahui mempunyai daya resistensi yang tinggi terhadap infeksi cacing hati *Fasciola gigantica* dibandingkan dengan domba impor seperti Merino dan *St. Croix*. Resistensi tersebut terjadi pada awal infeksi yaitu antara minggu ke 2 sampai minggu ke 6 setelah infeksi (ROBERTS *et al.*, 1997 a, b) Dalam periode awal infeksi tersebut kelihatannya bahwa parasit mati/terbunuh pada saat parasit tersebut

masih berada di dalam usus atau telah menembus dinding usus dan berada dalam rongga peritoneum. Larva cacing *F. hepatica* banyak yang mati/terbunuh setelah disuntikkan secara intra peritoneal pada tikus yang resisten, dan diduga bahwa di dalam rongga peritoneum ada suatu mekanisme yang berperan dalam membunuh larva cacing tersebut (DAVIES dan GOOSE, 1981).

BURDEN *et al.* (1983) melaporkan bahwa pada saat cacing hati masih berada di dalam usus atau setelah

menembus dinding usus dan mencapai rongga peritoneum cacing tersebut banyak yang mati karena dilapisi oleh antibodi beserta sel peritoneum yang diantaranya adalah sel makrofak, eosinofil dan sel mast yang merupakan sel-sel pertahanan di dalam tubuh. Larva parasit yang mati di dalam usus atau di dalam rongga peritoneum sebelum mencapai organ hati menandakan bahwa sel yang berada dalam rongga peritoneum seperti makrofak berperan dalam kematian larva *Fasciola* melalui suatu mekanisme yang sangat tergantung dengan adanya parasit dan antibodi yang spesifik (ARMOUR dan DARGIE 1974; DAVIES dan GOOSE, 1981; HUGHES, 1987).

Dari hasil-hasil penelitian tersebut, diduga kemungkinan besar rongga peritoneum merupakan tempat yang penting dalam mencegah kelangsungan hidup cacing yang masuk ke dalam tubuh. Oleh sebab itu perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui peran sel imun (makrofak dan eosinofil) yang berada di dalam rongga peritoneum domba ET dalam membunuh larva cacing hati *F. gigantica*.

MATERI DAN METODE

Isolasi sel

Dalam isolasi sel diperlukan 1 ekor domba ET dan 1 ekor domba Merino yang diinfeksi dengan \pm 300 metaserkaria *F. gigantica*. Empat minggu setelah infeksi, sel yang berada di rongga peritoneum domba tersebut diisolasi dengan teknik yang telah dilaporkan oleh ESTUNINGSIH *et al.* (1999) dengan modifikasi sebagai berikut: Domba yang telah dipuaskan semalam dibunuh, kemudian segera dilakukan insisi (\pm 5 cm memanjang) di daerah linea alba sampai mencapai rongga perut, yang sebelumnya daerah tersebut telah dibersihkan dahulu dengan larutan etanol 70% untuk menghindari terjadinya kontaminasi.

Melalui lubang pada linea alba tersebut dimasukkan \pm 2 liter Phosphate Buffer Saline (PBS) steril yang mengandung 6 mM Ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) ke dalam rongga peritoneum domba, kemudian dilakukan pemijatan/pengocokan di daerah perut domba selama 3 menit, supaya sel-sel yang berada di dalam rongga peritoneum terlepas. Setelah 3 menit larutan PBS yang berada di rongga peritoneum dikoleksi kembali dengan menggunakan spuit steril ukuran 60 ml dan ditampung dalam botol steril. Larutan tersebut disentrifuse dengan kecepatan 1.500 rpm selama 5 menit dan supernatannya dibuang. Endapan dicuci dengan PBS steril kemudian ditampung dalam 10 ml larutan RPMI-1640 (GIBCO, cat. # 12385-019) yang mengandung 10 μ g/ml gentamisin, 2 μ g/ml fungison dan 10% *Foetal Calf Serum* (FCS). Sebelum ditampung dalam larutan RPMI, campuran yang mengandung sel

tersebut dibuat preparat ulas tipis untuk dilakukan penghitungan diferensial sel dengan pewarnaan Giemsa.

Selanjutnya, estimasi jumlah sel yang masih hidup dihitung dengan menggunakan alat penghitung sel darah (*haemocytometer*). Sampel sel yang akan dihitung diwarnai dengan *trypan blue*. Kematian sel ditandai dengan terserapnya warna biru dari *trypan blue*, sedangkan sel yang masih hidup tidak berwarna.

Isolasi larva *F. gigantica*

Larva cacing *F. gigantica* diperoleh dengan cara menetasakan metaserkaria *F. gigantica* di laboratorium. Adapun prosedurnya mengikuti prosedur yang telah diuraikan oleh ESTUNINGSIH *et al.* (1999) dengan modifikasi sebagai berikut: Metaserkaria dicuci dengan akuades steril kemudian direndam dalam larutan 1% pepsin dan 0,4% HCl, lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 45 menit. Setelah diinkubasi metaserkaria dicuci dengan akuades steril sebanyak 2 kali, kemudian direndam dalam larutan 1% NaHCO₃; 0,8% NaCl; 0,2% asam taurokholat; 0,02 M Na hidrosulfit dan 50 μ l HCl, dan diinkubasikan lagi pada suhu 37°C selama 1 jam 45 menit. Kemudian metaserkaria dicuci lagi dengan akuades steril 2 kali dan diikuti pencucian dengan larutan RPMI sebanyak 2 kali. Setelah pencucian metaserkaria tersebut ditempatkan pada saringan yang berukuran 100 μ m dan direndam dalam larutan RPMI yang mengandung 10% FCS. Setelah diinkubasikan lagi selama 2 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ maka larva *F. gigantica* yang menetas atau keluar dari cangkangnya akan menembus saringan dan berkumpul dalam larutan yang berada dibawah saringan tersebut, dan siap digunakan untuk uji *in vitro*.

Uji *in vitro*

Dalam uji *in vitro* digunakan cawan kultur jaringan dengan 96 lubang yang berdasar datar. Dalam uji ini dilakukan 2 percobaan yang berbeda.

Percobaan I

Baris B, C dan D kolom 2, 3, 4 dan 5 pada cawan kultur jaringan diisi sel peritoneum dan larva *F. gigantica* dengan perbandingan bertingkat 50x10³:1; 100x10³:1; 150x10³:1 dan 200x10³:1 pada masing-masing kolom. Setiap lubang cawan berisi 4 ekor larva *F. gigantica* dalam 200 μ l larutan RPMI-1640 yang mengandung 2 μ g/ml fungizone, 10 μ l/ml gentamycin dan 20% FCS. Pada baris C dan D masing-masing ditambahkan 10% serum normal dan serum kebal dari domba ET. Sementara itu, pada baris B tidak dilakukan penambahan serum sebagai kontrol. Kemudian cawan yang sudah berisi sel domba dan larva *F. gigantica* diinkubasikan pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂

selama 3 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan memantau motilitas larva cacing dengan menggunakan mikroskop inversi, kemudian dihitung persentase motilitas dan kematiannya. Percobaan tersebut dilakukan dalam lingkungan yang steril dengan 3 kali ulangan.

Percobaan II

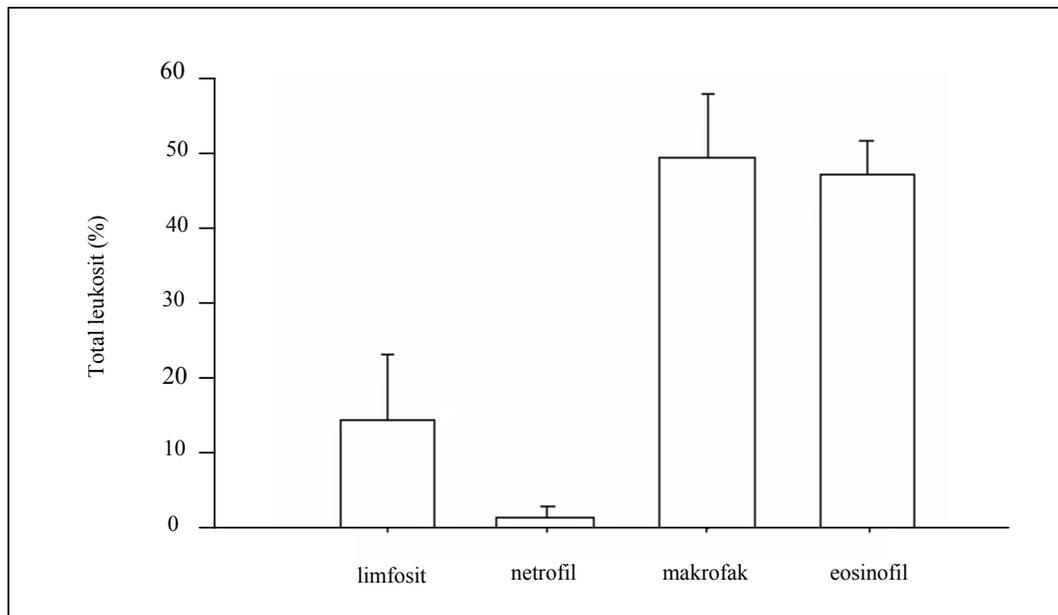
Empat lubang pada baris B dan C diisi dengan sel peritoneum domba ET dan larva *F. gigantica* dengan perbandingan $200 \times 10^3 : 1$ dan setiap lubangmya berisi 4 ekor larva *F. gigantica* dalam 200 μ l larutan RPMI-1640 seperti pada percobaan I. Setiap lubang yang sudah berisi sel dan larva pada baris B ditambahkan 10% serum kebal domba ET dan pada baris C ditambahkan 10% serum kebal domba Merino. Kemudian, 4 lubang pada baris D dan E diisi dengan sel peritoneum domba Merino dan larva *F. gigantica* dengan perbandingan $200 \times 10^3 : 1$ dan setiap lubang berisi 4 ekor larva *F. gigantica* dalam 200 μ l larutan RPMI-1640 seperti tersebut diatas. Selanjutnya, setiap lubang yang sudah berisi sel dan larva ditambahkan 10% serum kebal domba Merino pada baris D dan 10% serum kebal domba ET pada baris E. Inkubasi juga dilakukan selama 3 hari pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 dan pengamatannya sama seperti pada

percobaan I dan percobaan ini juga dilakukan ulangan sebanyak 3 kali.

Serum kebal diperoleh dari domba ET dan domba Merino yang telah diinfeksi dengan metaserkaria *F. gigantica*. Pada minggu ke 8 setelah infeksi serum dikoleksi dan disimpan dalam suhu -20°C sampai digunakan dalam uji *in vitro*, sedangkan serum normal diperoleh dari domba ET yang bebas fasciola.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan preparat ulas sel memperlihatkan bahwa sel yang dikoleksi dari rongga peritoneum domba yang terinfeksi *F. gigantica* yang paling dominan adalah sel makrofak dan eosinofil seperti yang terlihat pada Gambar 1. Sel-sel makrofak, eosinofil dan sel mast merupakan sel imun yang berfungsi sebagai sel pertahanan tubuh. Menurut ARMOUR dan DARGIE (1974) sel makrofak merupakan sel pertahanan yang paling banyak terdapat dalam rongga peritoneum dan mampu memfagositosis cacing *Fasciola* yang diinfeksi ke dalam rongga peritoneum tikus. Dari penelitian terdahulu dilaporkan bahwa sel makrofak dari domba ET yang bebas *Fasciola* mampu membunuh cacing *F. gigantica* dengan adanya penambahan antibodi yang homolog (ESTUNINGSIH et al., 1999).

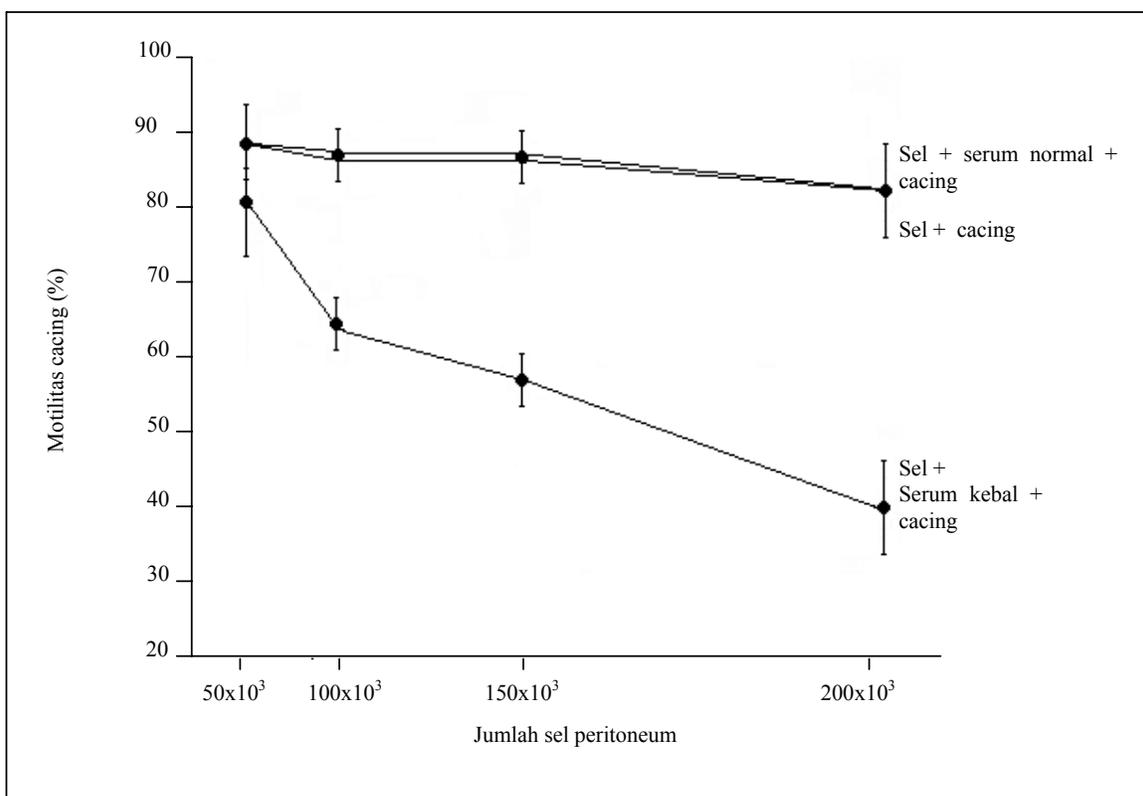


Gambar 1. Diferensial sel yang dikoleksi dari rongga peritoneum domba ekor tipis yang terinfeksi *Fasciola gigantica*

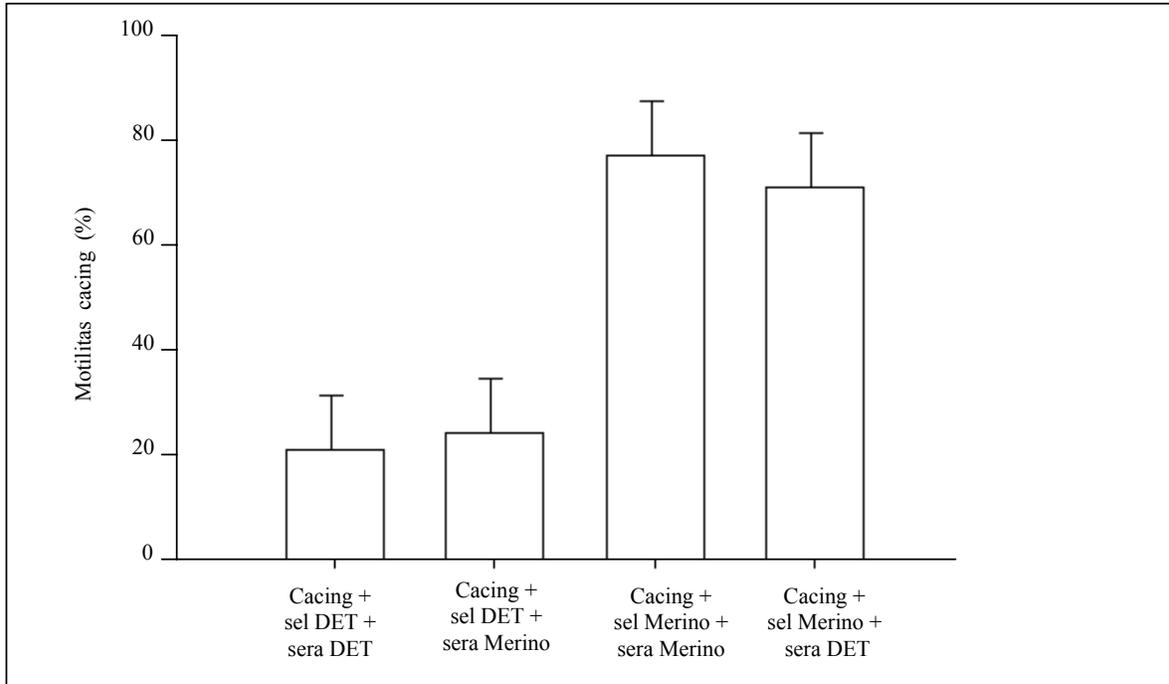
Dalam penelitian ini peran sel imun dari domba ET terhadap keberadaan larva cacing *F. gigantica* dipaparkan pada Gambar 2 dan Gambar 3. Gambar 2 memperlihatkan bahwa jumlah sel imun dari domba ET yang diinkubasikan dengan larva cacing *F. gigantica* dengan penambahan serum kebal berpengaruh terhadap motilitas larva cacing *F. gigantica*. Makin banyak jumlah sel yang diinkubasikan dengan larva cacing *F. gigantica* dengan adanya serum kebal menyebabkan makin rendah tingkat motilitas dari larva cacing tersebut. Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa 2×10^5 sel imun dari domba ET merupakan jumlah sel yang maksimum dan mampu membunuh larva cacing *F. gigantica* sampai 70% dengan adanya serum kebal. Akan tetapi, pada saat sel imun domba ET diinkubasikan dengan larva cacing *F. gigantica* dengan penambahan serum normal tidak terjadi penurunan motilitas dari larva cacing. Demikian juga pada saat inkubasi antara sel imun domba ET dengan larva cacing *F. gigantica* tanpa penambahan serum kebal ataupun serum normal motilitas dari larva cacing *F. gigantica*

masih tetap tinggi ($\pm 90\%$). Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya antibodi yang terdapat di dalam serum, sel imun domba ET mampu membunuh larva *F. gigantica* dan ada ketergantungan yang spesifik antara sel imun dan antibodi dalam kematian larva *F. gigantica* tersebut.

Selanjutnya, hasil inkubasi antara sel imun domba ET dan domba Merino dengan larva cacing *F. gigantica* dapat dilihat pada Gambar 3. Dengan penambahan serum kebal dari domba ET ataupun serum kebal domba Merino, sel imun domba ET masih tetap mampu membunuh larva cacing *F. gigantica* sebesar 70%. Sebaliknya, sel imun domba Merino tidak mampu membunuh larva cacing *F. gigantica* walaupun diinkubasi bersama dengan penambahan serum kebal dari domba ET ataupun serum kebal dari domba Merino. Hasil ini menunjukkan bahwa sel imun dari domba ET mempunyai kemampuan yang lebih efektif dalam membunuh larva cacing *F. gigantica* dibandingkan dengan sel imun domba Merino.



Gambar 2. Tingkat kematian larva cacing *Fasciola gigantica* setelah penambahan sel peritoneum domba ekor tipis



Gambar 3. Tingkat kematian larva cacing *Fasciola gigantica* setelah penambahan sel peritoneum domba ekor tipis dan domba Merino

Kematian larva cacing *F. gigantica* dapat dilihat dengan adanya degranulasi sel yang menyelubungi permukaan larva cacing dan menyebabkan erosi pada tegumen sehingga cacing tidak dapat bergerak. Kematian cacing *Fasciola* pada umumnya terjadi karena sel imun menyelubungi permukaan cacing bersamaan dengan adanya antibodi sehingga akan terlihat degranulasi sel pada permukaan cacing yang menyebabkan hancurnya cacing tersebut (DOY dan HUGHES, 1982; BURDEN *et al.*, 1983). Dalam hal ini sel imun mempunyai peran yang sangat penting dalam membunuh cacing dengan cara mengeluarkan suatu zat yang toksik yang berbahaya bagi tubuh cacing sehingga menyebabkan kematian cacing (SMITH *et al.*, 1992). Pada tikus, daya tahan terhadap infeksi *Fasciola* terlihat setelah mendapat suntikan secara intra peritoneal sera dari domba, sapi atau tikus yang diinfeksi *F. hepatica*. Hal ini memberi kesan bahwa mekanisme kematian cacing sangat tergantung pada keberadaan antibodi yang spesifik terhadap cacing tersebut (RAJASEKARIAH dan HOWELL, 1979; MITCHELL *et al.*, 1981; BOYCE *et al.*, 1986). Dalam sistem kekebalan seluler, sel T diaktifkan oleh interleukin-1 (IL-1) yang dilepaskan oleh antigen presenting cell (APC), kemudian, sel T akan melepaskan berbagai limfokin seperti IL-2 dan tumor necrosis factor (TNF) yang akan mengaktifkan makrofak, selanjutnya makrofak akan memfagositosis mikroorganisme. Sementara itu,

dalam sistem kekebalan humoral yang berperan adalah sel B. Apabila sel B dirangsang oleh benda asing maka sel tersebut akan membentuk antibodi (BARATAWIDJAJA, 2000).

Hasil uji *in vitro* ini memberi petunjuk tentang mekanisme terjadinya resistensi pada domba ET yang pada giliran selanjutnya akan berguna untuk menentukan apakah resistensi pada domba ET tersebut terjadi secara genetik atau tidak.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dalam uji *in vitro* ini terbukti bahwa sel imun yang dikoleksi dari rongga peritoneum domba ET mampu membunuh larva cacing *F. gigantica* secara efektif. Namun kemampuan untuk membunuh cacing tergantung pada keberadaan serum kebal dari domba ET yang terinfeksi *Fasciola*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa resistensi dari domba ET melalui mekanisme *antibody-dependent cell cytotoxic (ADCC)*.

Untuk mengetahui apakah sel imun tersebut makrofak atau eosinofil yang berperan dalam membunuh larva cacing *F. gigantica* perlu dilakukan uji *in vitro* lanjutan dengan memisahkan antara sel makrofak dan sel eosinofil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada ACIAR yang telah membiayai penelitian ini. Terima kasih juga disampaikan kepada tehniisi Parasitologi terutama Suharyanta, Sudrajat dan Yayan Daryani yang telah membantu dalam koleksi sel.

DAFTAR PUSTAKA

- ARMOUR, J. and J.D. DARGIE. 1974. Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. *Exp. Parasitol.* 35:381-388.
- BOYCE, W.M., C.H. COURTNEY, and M. THIBIDEAU. 1986. Heterologous resistance to *Fasciola hepatica* conferred upon rats by passive transfer of serum from different breeds of sheep. *Vet. Parasitol.* 22:259-266.
- BURDEN, D.J., A.P. BLAND, N.C. HAMMET and D.L. HUGHES. 1983. *Fasciola hepatica*: migration of newly excysted juveniles in resistant rats. *Exp. Parasitol.* 56(2):277-288.
- BARATAWIDJAJA, K.G. 2000. *Imunologi Dasar*, edisi 4. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- DAVIES, C. and J. GOOSE. 1981. Killing of newly excysted juvenile of *Fasciola hepatica* in sensitized rats. *Parasite Immunology.* 3:81-96.
- DOY, T.G. and D.L. HUGHES. 1982. *In vitro* cell adherence to newly excysted *Fasciola hepatica*: failure to affect their subsequent development in rats. *Res. Vet. Sci.* 32(1):118-120.
- ESTUNINGSIH, S.E., S. WIDJAJANTI, S. PARTOUTOMO dan T.W. SPITHILL. 1999. Uji *In-Vitro* Daya Bunuh Antiserum Antibodi Domba Pasca Infeksi *Fasciola gigantica* dengan Adanya Sel Makrofak Terhadap Cacing Hati Homolog dan Heterolog. *JITV.* 4(3):196-201.
- HUGHES, D.L. 1987. *Fasciola* and *Fascioloides*. In: Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis. Volume II: *Trematodes and Cestodes*, E.J.L. Soulsby, (ed). p. 91. CRC Press, Florida, USA.
- MITCHELL, G.B.B., J. ARMOUR and J.G. ROSS. 1981. Successful passive transfer of resistance to *Fasciola hepatica* infection in rats by immune serum and transfer factor. *Res. Vet. Sci.* 30:246-247.
- RAJASEKARIAH, G.R. and M.J. HOWELL. 1979. *Fasciola hepatica* in rats: transfer of immunity by serum and cells from infected to *Fasciola hepatica* naive animals. *J. Parasitol.* 65:289-294.
- ROBERTS, J.A., S.E. ESTUNINGSIH, S. WIDJAJANTI, E. WIEDOSARI, S. PARTOUTOMO and T.W. SPITHILL. 1997a. Resistance of Indonesian thin tail sheep against *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 68:69-78.
- ROBERTS, J.A., S.E. ESTUNINGSIH, E. WIEDOSARI and T.W. SPITHILL. 1997b. Acquisition of resistance against *Fasciola gigantica* by Indonesian thin tail sheep. *Vet. Parasitol.* 73:215-224.
- SMITH, N.C., K.S. OVINGTON and J.C. BORAY. 1992. *Fasciola hepatica*: free radical generation by peritoneal leukocytes in challenged rodents. *Int. J. Parasitol.* 22:281-286.