

PENELITIAN PENDAHULUAN PROPAGASI SEL BHK-21 PADA *MICROCARRIER* MENGGUNAKAN BIOREAKTOR UNTUK MENINGKATKAN KAPASITAS PRODUKSI VAKSIN RABIES PUSVETMA

Diah Pancawidiana, Wringati, Evy Indah Setyorinie, Kiki Dwi Restika
Pusat Veteriner Farma

email: diahpanca3101@gmail.com

ABSTRAK

Rabies merupakan penyakit zoonosis fatal yang disebabkan oleh virus Rabies. Vaksinasi adalah metode yang efektif untuk mengontrol penyakit Rabies. Peningkatan kapasitas produksi Pusvetma sebagai produsen vaksin Rabies sangat diperlukan untuk memenuhi permintaan vaksin di lapangan. Propagasi sel BHK-21 sebagai media pertumbuhan virus Rabies pada *microcarrier* menggunakan Bioreaktor mempunyai banyak keuntungan dibandingkan dengan metode konvensional menggunakan botol roller. Tujuan penelitian ini membandingkan efektifitas propagasi sel BHK-21 pada sistem *microcarrier* menggunakan Bioreaktor dengan sistem konvensional pada botol roller sebagai pengembangan metode untuk peningkatan kapasitas produksi vaksin rabies Pusvetma. Sel BHK-21 di propagasi menggunakan dua sistem yaitu sistem *microcarrier* menggunakan bioreaktor dan metode konvensional menggunakan botol roller. Pada sistem *microcarrier* menggunakan bioreaktor Sel BHK-21 sebanyak 2×10^8 sel dalam 120 ml media dimasukkan ke dalam botol CelCradle-500 yang berisi 850 carier. Metode konvensional dilakukan dengan cara melakukan propagasi pada 30 botol roller dengan jumlah sel 5×10^7 sel per botol roller. Propagasi virus rabies strain Pasteur dilakukan dengan menginokulasi inokulasi botol CelCradle-500 sebanyak 65 ml dan botol roller sebanyak 5 ml dengan titer virus 10^4 LD_{50/ml}. Parameter yang dibandingkan adalah pertumbuhan sel BHK-21, penggunaan media Eagle dan titer virus Rabies strain Pasteur yang dihasilkan Hasil yang diperoleh pada sistem *microcarrier* menggunakan Bioreaktor pertumbuhan sel BHK-21 sebanyak 1.296×10^6 sel, media Eagle yang digunakan 500 ml, dan titer virus yang diperoleh $10^{6.7}$, sedangkan pada sistem konvensional menggunakan botol roller diperoleh pertumbuhan sel BHK-21 sebanyak 13×10^8 sel, media Eagle yang digunakan 5.200 ml dan titer virus yang diperoleh 10^6 . Kesimpulan dari penelitian ini adalah penggunaan sistem *microcarrier* menggunakan Bioreaktor lebih efektif dan efisien daripada metode konvensional menggunakan botol roller.

Kata kunci: Bioreaktor, CelCradle, rabies, vaksin rabies, sel BHK-21, Pusvetma

PENDAHULUAN

Rabies merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus Rabies yang termasuk dalam genus Lyssavirus dan keluarga Rhabdoviridae. Klasifikasi taksonomi Lyssavirus berdasarkan perbedaan antigenik pada protein nukleoprotein (N). Terdapat 6 genotipe dan virus rabies termasuk dalam genotipe 1 (Natih *et al.*, 2012). Rabies menyebabkan 40.000–70.000 kematian tahunan di seluruh dunia (WHO, 1999). Kematian pada manusia akibat penyakit rabies lebih dari 99% terjadi di negara berkembang, terutama di Afrika dan Asia. Reservoir dan vektor utama penyakit rabies ini adalah Anjing dan kejadian rabies pada manusia lebih dari 99% disebabkan karena gigitan Anjing. Pada sebagian negara maju, kasus rabies bisa dieliminasi tetapi kasus rabies masih tersebar di lebih dari 80 negara berkembang (WHO, 2005; Kallel *et al.*, 2006).

Vaksinasi adalah metode yang efektif untuk mengontrol penyakit ini dan mencegah penularan ke manusia (WHO, 2005; Kallel *et al.*, 2006). Program vaksinasi merupakan pilihan utama dalam pengendalian dan pemberantasan penyakit rabies di Indonesia dengan didukung oleh kegiatan penunjang lain untuk memastikan bahwa program vaksinasi berjalan dengan baik, seperti survei pasca vaksinasi, respons cepat terhadap laporan gigitan, penanganan rantai dingin vaksin dan juga kegiatan eliminasi terarah yang memperhatikan aspek kesejahteraan hewan, serta penanganan obat hewan yang baik dan mekanisme koordinasi dan pelaporan dalam pelaksanaan program vaksinasi yang dimaksud (Ditkeswan, 2015).

Vaksin rabies telah dikenal sejak tahun 1879 dibuat pertama kali oleh Victor Galtier. Selanjutnya pada tahun 1884 vaksin tersebut dikembangkan oleh Louis Pasteur membuat vaksin rabies menggunakan virus yang berasal dari sumsum tulang belakang anjing yang terkena rabies kemudian dilintaskan pada otak kelinci dan diatenuasikan dengan pemberian KOH. Pada tahun 1958 Kissling membiakan virus rabies CVS pada biakan sel ginjal anak hamster. Selanjutnya pada tahun 1963 Kissling dan Reese berhasil membuat vaksin rabies inaktif menggunakan virus rabies yang dibiakan pada sel ginjal anak hamster (BHK) (CIVAS, 2014). Istilah sel pertama kali digunakan oleh Robbert Hooke (1635-1703) untuk menyatakan satuan dasar minimum suatu jasad hidup yang mampu melakukan perbanyakan sendiri (Yuwono, 2005).

Sistem microcarrier pada awalnya dikembangkan untuk propagasi sel suspensi, dapat dengan mudah diaplikasikan dalam tangki bioreaktor berpengaduk, dapat diukur dan efektivitasnya mudah divalidasi. Sistem sel *microcarrier* mempunyai banyak keuntungan dibanding sistem konvensional menggunakan botol yaitu bisa mengurangi jumlah botol dan bisa meningkatkan densitas sel. Sistem sel microcarrier ini telah digunakan untuk industri pembuatan vaksin polio dan vaksin rabies (Sub-Chin Wu, 2004).

Penelitian ini dilakukan sebagai pengembangan metode untuk peningkatan kapasitas produksi vaksin rabies di pusvetma dengan membandingkan propagasi sel BHK-21 pada *microcarrier* menggunakan Bioreaktor dengan sistem konvensional menggunakan botol roller.

TUJUAN

Untuk membandingkan efektifitas propagasi sel BHK-21 pada sistem *microcarrier* menggunakan Bioreaktor dengan sistem konvensional pada botol roller sebagai pengembangan metode untuk peningkatan kapasitas produksi vaksin rabies Pusvetma.

MATERI DAN METODE

Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan adalah Biosafety Cabinet Class II, Clean Room, Bioreaktor *CelCradle*TM, Botol *CelCradle-500*, Botol Roller, Inkubator CO₂, Hot room, Centrifuge, Hemocytometer, pipet, bulb, pinset, botol laboratorium, pH meter, transferpipet, *GlucCell* Monitor Meter, *GlucCell* Test Strips, Mikroskop inverted, maxi mixer, dan spuit disposable.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah sel BHK-21, virus rabies strain Pasteur, Media Eagle, Serum darah sapi, PBS⁻, Versen Trypsin, Trypane blue, sarung tangan, masker, kain kassa, Spuit disposable, kertas tissue, tabung centrifuge, dan vintip.

Persiapan Sel BHK-21 pada Botol Cradle

Sel BHK sebanyak 4 botol roller dicuci dengan larutan PBS, ditambahkan 5 ml Versen Trypsin dan diratakan. Selanjutnya dilakukan homogenisasi dengan 20 ml media bersama sel dengan menggunakan pipet sehingga sel terpisah satu dengan yang lain dilanjutkan penghitungan jumlah sel dengan menggunakan Haemocytometer.

Sebanyak 2×10^8 sel dalam 120 ml media dimasukkan ke dalam botol *CelCradle*TM -500 yang berisi 850 carier, dilakukan penggoyangan secara perlahan setiap 15 menit pada 1 jam pertama dan setiap 30 menit pada 3 jam selanjutnya dan diukur kadar glukosa dan pH media. Setelah lebih dari 90% sel BHK-21 menempel pada carier maka ditambah media hingga 500 ml. Memasang botol pada *CelCradle* yang diletakkan dalam inkubator 37 °C dengan konsentrasi CO₂ 0,5%.

Parameter *CelCradle*TM Up rate : 1 mm/sec

Top holding time : 10 sec

Down rate : 1 mm/sec

Bottom holding time : 30 sec

Monitoring pH media dan glukosa dilakukan setiap hari dan jika kadar glukosa kurang dari 100 mg/dL maka dilakukan penambahan glukosa dan L-glutamine.

Persiapan Sel BHK-21 pada Botol Roller

Melakukan propagasi sel BHK-21 dari botol roux ke botol roller, disiapkan sebanyak 30 botol roller dengan jumlah $5-10 \times 10^7$ sel per botol roller.

Persiapan Seed Virus Rabies

Seed virus rabies strain Pasteur dengan titer virus 10^7 LD_{50/ml} yang tersimpan dalam *Ultra Low Freezer* -80 °C, seed virus siap diinokulasikan pada sel BHK-21.

Parameter <i>CelCradle</i> TM Up rate	: 1 mm/sec
Top holding time	: 30 sec
Down rate	: 1 mm/sec
Bottom holding time	: 10 sec

Propagasi Virus Rabies pada Sel BHK-21 Botol Roller

Seed virus rabies diinokulasikan dengan dosis 5 ml per botol roller berisi 5-10 x 10⁷ sel BHK-21. Kemudian diinkubasi pada suhu 33 °C selama 1 jam dan dilakukan penambahan 200 ml media pertumbuhan virus, inkubasi selama 4 hari dan dilanjutkan panen virus. Penghitungan titer virus rabies menggunakan metode Spearman-Kärber, minimal titer virus yang diharapkan adalah 10⁶ LD_{50/ml}.

Propagasi Virus Rabies pada Sel BHK-21 Botol *Cradle*

Melakukan inokulasi seed virus rabies dengan volume 65 ml pada sel BHK 21 botol *cradle* yang berisi 129,6 x 10⁷ sel BHK-21, diinkubasi pada suhu 33 °C selama 1 jam dan ditambahkan media pertumbuhan virus hingga 500 ml, inkubasi selama 4 hari dan dilakukan panen suspensi virus rabies. Penghitungan titer virus rabies menggunakan metode Spearman-Kärber, minimal titer virus yang diharapkan adalah 10⁷ LD_{50/ml}.

Pengukuran Titer Virus Rabies

Pengenceran sampel hasil panen virus rabies dari botol *cradle* dan botol roller dengan pengenceran 10⁻¹ sampai dengan 10⁻⁶, kemudian diinokulasi pada 10 ekor mencit dengan berat badan 18–20 gram secara intra cerebral 0,03ml/ekor, dilakukan pengamatan selama 14 hari. Penghitungan titer virus menggunakan metode Spearman-Kärber. Titer virus rabies yang diharapkan minimal 10⁶ LD_{50/ml}.

HASIL

Pertumbuhan sel menunjukkan penurunan dan peningkatan seperti yang tertulis pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Sel BHK-21 pada Botol Cel Cradle I

No.	Hari ke-	pH	Glukosa (mg/dL)	Jumlah sel	Sampel	Carrier	Jumlah Sel/Carrier
1	0	7,3	345	200 x10 [□]	0	850	235,294
2	1	7,0	271	-			
3	2	7,0	255	65 x10 [□]	10	850	76,470
4	3	7,0	170	165 x10 [□]	10	840	196,428
5	4	7.1	213	300 x10 [□]	10	830	361,445
6	5	6,7	132	458 x10 [□]	10	820	558,536
7	7	6,4	78	1296 x10 [□]		810	1.600.000
		7,0	364	129,6 x10 [□]		810	1.600.000

Tabel 2. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Sel BHK-21 pada Botol Cel Cradle II

No.	Hari ke-	Ph	Glukosa (mg/dL)	Jumlah sel	sampel	carrier	Jumlah sel/ carrier
1	0	6,7	147	9,18 X 10 [□]	0	850	108.000
2	2	6,7	.-	13,158 x 10 [□]	10	850	154.800
3	4	6,8	181	26,46 x 10 [□]	10	840	315.000
4	5	6,7	87	32,569 X 10 [□]	10	830	392.400
5	7	6,4	48	70,716 x 10 [□]	10	820	862.400

Sel awal yang dimasukkan dalam botol *CelCradle*TM I dan II adalah 235.934 dan 108.000 per carier, dalam masa pertumbuhan selama 7 hari didapatkan jumlah sel BHK-21 adalah 1.600.000 dan 862.400 per carier, terdapat kenaikan secara cepat sebanyak 678% dan 798%. Untuk kebutuhan produksi vaksin rabies maka dilanjutkan dengan inokulasi virus rabies pada botol cel cradle. Pengukuran titer virus rabies dari sampel panen hari ke 1 sd 4 pada mencit adalah sebagai berikut :

	Titer Virus CC	Titer Virus Botol Roller
Panen - H1	< 10 [□] '°	.-
Panen - H2	10 [□] '° LD 50/ml	.-
Panen - H3	10 [□] '□ LD 50/ml	.-
Panen - H4	10 [□] '□ LD 50/ml	10 [□] '° LD 50/ml

PEMBAHASAN

Roux flask, botol roller atau bioreactor adalah metode yang sering digunakan untuk menghasilkan produk-produk sel kultur. Penggunaan mikrokarier menggunakan Bioreaktor bisa meningkatkan densitas sel (Trabelsi, 2006). Menurut Yuwono(2005) ada 3 fase pertumbuhan sel yaitu fase lag (fase adaptasi) pada fase ini sel masih beradaptasi dengan media pertumbuhannya sehingga

relatif datar, fase logaritmik (fase eksponensial) sel sudah dapat beradaptasi secara baik dengan lingkungan pertumbuhannya sehingga mempunyai waktu penggandaan (doubling time) lebih singkat dari fase sebelumnya, fase stationer jumlah sel yang hidup seimbang dengan sel yang mati karena konsentrasi nutiren yang ada semakin berkurang jika diteruskan akan memasuki fase kematian.

Hasil propagasi sel hingga hari ke tujuh mendapatkan hasil $129,6 \times 10^6$ sel per botol cradle. Jumlah tersebut setara dengan sel BHK21 monolayer pada 26 botol roller dengan jumlah kurang lebih 5×10^6 sel per botol. Berdasarkan Manual *CelCradle*TM Sistem bioreactor dirancang berdasarkan prinsip gerakan pasang surut dimana hembusan kompresi dan dekompresi memungkinkan pemaparan secara berselang antara nutrisi dan udara terhadap sel. Hal ini membuat pergeseran menjadi rendah, aerasi yang tinggi serta lingkungan kultur yang bebas busa sehingga memaksimalkan serapan nutrisi dan transfer oksigen. Karena nutrisi dan transfer oksigen yang efisien, satu botol *CelCradle*TM dapat memproduksi sel yang sebanding dengan 18 hingga 20 botol roller. Penggunaan *microcarrier* menyediakan luas permukaan yang lebih besar kurang lebih sebesar 15.000 cm² dan hal ini memungkinkan pertumbuhan lebih dari 1010 sel dalam 4 botol berukuran 8.6" x 11.7".

Efisiensi propagasi sel BHK21 dengan sistem microcarrier terdapat pada jumlah media Eagle yang digunakan yaitu 1000 ml dengan satu kali penggantian media sebanyak 500 ml di banding dengan 26 botol x 175 ml yaitu sebanyak 4550 ml media. Membutuhkan hanya satu (1) kali propagasi sel dibandingkan dengan 13 kali split dari botol roux untuk mendapatkan 26 botol roller, Beberapa efisiensi lain yang diperoleh antara lain adalah penghematan bahan, penghematan waktu persiapan peralatan mulai dari proses pencucian, sterilisasi, filtrasi media dan serum serta dalam hal waktu penyediaan peralatan beserta prosesnya dan tentunya ini dapat dimanfaatkan untuk mengalihkan sumber daya manusia pada kegiatan proses produksi selanjutnya.

Kadar glukosa dan pH sangat mempengaruhi pertumbuhan sel (Trabelsi, 2006) Kontrol pH dan konsentrasi kadar glukosa selalu dipantau menggunakan pH meter dan GluCell karena nutrient media Eagle akan semakin menurun seiring metabolisme sel yang semakin meningkat. Jika pH media semakin asam maka perlu dilakukan penambahan Natrium bicarbonas dan jika kadar glukosa dibawah 100 mg/dl maka perlu dilakukan penambahan glukosa dan glutamine agar media pertumbuhan sesuai dan propagasi sel dapat terus berlangsung.

Hasil titer virus yang didapat dari sampel Cel Cradle yang dipanen pada hari ke-4 adalah $10^{6,7} LD_{50/ml}$. Sedangkan titer virus yang didapat dari sampel botol roller adalah $10^{6,0} LD_{50/ml}$. Ini mungkin karena keterbatasan transfer oksigen yang mungkin muncul selama langkah adsorpsi yang mempengaruhi metabolisme sel dan pengembangan sel selanjutnya, (Souza dkk. 2009)

KESIMPULAN

Propagasi sel BHK-21 pada sistem *microcarrier* menggunakan Bioreaktor lebih efektif karena menghasilkan sel densitas tinggi sehingga bisa mengurangi penggunaan botol roller, media dan reagen dibandingkan dengan sistem konvensional menggunakan botol roller sehingga dapat menyediakan sistem yang lebih efisien untuk produksi vaksin rabies dengan skala besar.

SARAN

Untuk melengkapi grafik propagasi sel BHK-21 pada *microcarrier* masih perlu mengulang sistem ini dengan selalu memantau pH dan kadar glukosa agar didapat titer virus rabies yang lebih tinggi sehingga dapat mendukung peningkatan kapasitas produksi vaksin rabies Pusvetma

KETERBATASAN

Sistem *microcarrier* mini bioreaktor ini adalah langkah awal menuju sistem tangki bioreaktor yang diharapkan dapat menyediakan suspensi virus dengan skala produksi yang lebih besar. Pada penelitian ini belum semua peralatan dimiliki oleh pusvetma antara lain CelCradle dan GluCell.

DAFTAR PUSTAKA

- Center for Indonesian Veterinary Analytical Studies. 2014. Rabies [internet]. [diunduh 2019 Mei 31]. Tersedia pada: <http://civas.net/2014/02/24/rabies/5/>
- Chin Wu S, Chyi Liu C, dan Cheng Lian W. 2004. Optimization of Microcarrier Cell Culture Process for the Inactivated Enterovirus Type 71 Vaccine Development. *Vaccine* 22: 3858 – 3864. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.05.037.
- Direktorat Kesehatan Hewan. 2015. Pedoman Pengendalian dan Penanggulangan Rabies. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Natih, Nyanakumari KK, Yupiana Y, Hermawan D, Djusa ER. Analisis Gen Nukleoprotein Virus Rabies Bali (Cv751). 0852-9612. *Buletin Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunung Sindur, Bogor*.
- Nor YA, Sulong NH, Mel M, Salleh HM, Sopyan I. 2010. The Growth Study of Vero Cells in Different Type of Microcarrier. *Materials Sciences and Applications* 1: 261 – 266. doi: 10.4236/msa.2010.15038.

Souza MCO, Freire MS, Schulze EA, Gaspar LP, Castilho LR. 2009. Production of Yellow Fever Virus in Microcarrier-based Vero Cell Cultures. *Vaccine* 27: 6420 – 6423. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.06.023.

Trabelsi K, Rourou S, Loukil H, Majoul S, Kallel H. 2006. Optimization of Virus Yield as A Strategy to Improve Rabies Vaccine Production by Vero Cells in A Bioreactor. *Journal of Biotechnology* 121: 261–271. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.07.018.

Yuwono T. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.