

KATA PENGANTAR

Diagnosa Veteriner Vol. 17, No. 1, Tahun 2018

Alhamdulillah, segala puji bagi Tuhan Yang Maha Kuasa. Atas rahmat dan karuniaNya Buletin Diagnosa Veteriner Vol. 17, No. 1, Tahun 2018 dapat diterbitkan. Buletin edisi ini kami menyajikan artikel hasil “Investigasi Gigitan Hewan Penular Rabies (HPR) ke Manusia di Kabupaten Donggala, Propinsi Sulawesi Selatan”. Artikel kedua berupa review literatur “Imunitas Terhadap Infeksi Brucella”. Tulisan terakhir adalah “Pengaruh Vaksinasi SLPS Brucella abortus terhadap Tingkat sekresi IL-2 dan IFN Gamma pada Mencit (*Mus musculus*)”

Redaksi membuka kesempatan kepada semua pihak yang berkepentingan dengan dunia veteriner dan peternakan untuk menyampaikan ide atau gagasan berupa karya ilmiah populer pengamatan lapangan, hasil penelitian atau review melalui buletin ini.

Redaksi mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca sebagai bahan pembelajaran untuk pengembangan Buletin Diagnosa Veteriner volume selanjutnya.

Maros, 24 April 2018

Redaksi

DIAGNOSA VETERINER

Buletin Informasi Kesehatan Hewan dan
Kesehatan Masyarakat

International Standard Serial Number (ISSN) : 0216 – 1486

Volume : 17

No : 1

Tahun : 2018

SUSUNAN REDAKSI

Penanggung Jawab : Kepala Balai Besar Veteriner Maros

Pemimpin Redaksi : Kepala Seksi Informasi Veteriner

Penyunting/ editor : Kepala Bidang Pelayanan Veteriner
drh. Dini Marmansari
drh. Saiful Anis, M.Si
drh. Titis Furi Djatmikowati

Sekretariat : Suryani Gesha Utami, A.Md
Marwati, S. Sos

DAFTAR ISI

Diagnosa Veteriner Vol. 17, No. 1, Tahun 2018

	Halaman
Kata Pengantar	i
Susunan Redaksi	ii
Daftar Isi	iii
Investigasi Gigitan Hewan Penular Rabies (HPR) ke Manusia di Kabupaten Donggala, Propinsi Sulawesi Selatan.....	1
Imunitas Terhadap Infeksi <i>Brucella</i>	7
Pengaruh Vaksinasi SLPS <i>Brucella abortus</i> terhadap Tingkat sekresi IL-2 dan IFN Gamma pada Mencit (<i>Mus musculus</i>)	11

Pengaruh Vaksinasi SLPS *Brucella abortus* terhadap Tingkat Sekresi IL-2 dan IFN Gamma pada Mencit (*Mus musculus*)

Saiful Anis

Medik Veteriner Muda, Balai Besar Veteriner Maros

Intisari

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan respon imun selular (IL-2 dan Interferon gamma) dengan metode ELISA pada kelompok mencit yang divaksinasi menggunakan vaksin subunit *Brucella* SLPS dengan adjuvant Al(OH)₃ dan montanide dan vaksin *Brucella* RB51. Dua puluh delapan mencit *Mus musculus* divaksinasi dengan vaksin subunit *Brucella* SLPS, vaksin *Brucella* SRB51 dan satu kelompok sebagai kontrol. Kelompok I sebagai kontrol diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml NaCl fisiologis steril; kelompok II diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml suspensi dengan kandungan SLPS 10 µg dengan adjuvant Al(OH)₃; kelompok III diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml suspensi dengan kandungan SLPS 10 µg dengan adjuvant Montanide; dan kelompok IV diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml vaksin SRB51 mengandung 10⁵ CFU *Brucella*. Sampel darah diambil dan dikoleksi pada hari ke 14 pasca vaksinasi. Serum darah digunakan untuk uji Sandwich ELISA untuk menentukan kadar IL-2 dan IFN gamma. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksin subunit *Brucella* SLPS dengan adjuvant Al(OH)₃ dan montanide dapat menginduksi sekresi IL-2 dengan kadar yang sebanding dengan vaksin *Brucella* SRB51, dengan tingkat sekresi IFN gamma tertinggi dihasilkan oleh induksi vaksin *Brucella* RB51, vaksin subunit *Brucella* SLPS dengan adjuvant montanide dan vaksin subunit *Brucella* SLPS dengan adjuvant Al(OH)₃ secara berurutan.

Pendahuluan

Vaksin live attenuated, baik strain 19 ataupun RB51, terbukti dapat memberikan imunitas protektif terhadap infeksi *Brucella* yang diperantarai oleh kedua jenis mekanisme respon imun, baik humoral maupun seluler, terutama cell mediated immunity yang diperankan oleh IFN gamma dan IL-2 adalah sangat kritis dalam memproteksi hospes terhadap pathogen intraseluler seperti *Brucella*, namun demikian terdapat potensi resiko berupa kemungkinan kembali menjadi virulen, menyebabkan abortus pada hewan bunting dan shedding bakteri vaksin melalui susu, juga berpotensi berbahaya bagi manusia, bahkan *Brucella* spp. dianggap berpotensi sebagai agen bioterrorisme dan diklasifikasikan ke dalam kategori patogen B oleh NIAID (Schurig et al., 2002; Perkins et al., 2010; Avila-Calderón et al., 2013; Skendros and Boura, 2013; Jain et al., 2014).

Vaksin yang ideal digunakan untuk manusia atau hewan harus bersifat efektif, avirulent dan menginduksi proteksi jangka panjang, bentuk sediaan vaksin yang sesuai dengan kriteria ini salah satunya adalah vaksin subunit (Avila-Calderón et al., 2013). Outer membrane, yang dimiliki bakteri Gram negatif, dilaporkan oleh beberapa peneliti bersifat imunogen. Derivatnya terdiri atas outer membrane proteins, LPS dan beberapa phospholipida. LPS yaitu endotoksin yang dihasilkan oleh bakteri Gram negatif merupakan pathogen associated molecular pattern (PAMP) yang paling banyak diteliti dari *Brucella*. LPS merupakan produk bakteri Gram negatif yang bersifat sebagai imunostimulan sangat berpotensi sebagai kandidat vaksin subunit (Simborio et al., 2014).

Pengenalan keberadaan LPS oleh sel seperti monosit dan makrofag telah berkembang selama berabad-abad memungkinkan hospes mamalia mengenali dengan cepat dan memberikan reaksi terhadap infeksi oleh bakteri Gram negatif. Respon cepat bawaan terhadap LPS ditandai dengan keterlibatan pelepasan mediator proinflamasi, seperti TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12 dan IL-1, pada lokasi infeksi dengan tingkat moderat yang akan menguntungkan hospes dengan timbulnya inflamasi dan diikuti dengan priming sistem imun untuk mengeliminasi organisme penyerang (Cardoso et al., 2006).

IFN- γ mengaktifkan bactericidal machinery dari makrofag, meningkatkan ekspresi antigen-presenting dan sebagai molekul costimulatory pada APC, menstimulasi CTL-mediated cytotoxicity dan meningkatkan potensi kematian makrofag yang terinfeksi melalui apoptosis (Baldwin dan Goenka, 2006).

LPS *Brucella* juga memiliki kemampuan untuk membangkitkan sekresi IL-2. IL-2 adalah glicoprotein yang pada awalnya dikenal dengan T cell growth factor (TCGF). Interleukin ini terutama disekresi oleh sel T helper teraktivasi, bertindak sebagai growth factor/activator bagi sel T, sel NK dan sel B serta membantu perkembangan dari sel-sel lymphokine-activated killer (LAK). Oleh karena itu IL-2 memegang peranan penting dalam mengatur respon inflamasi kronis baik seluler ataupun humoral. Ikatan IL-2 ke reseptor IL-2 pada limfosit T menyebabkan proliferasi sel, peningkatan sekresi limfokin dan penguatan ekspresi molekul MHC II (Shaikh, 2011; Golding et al., 2001; Jiang and Baldwin, 1993).

Materi dan Metode Penelitian

Materi penelitian

Isolat isolat lapang *B. abortus* diperoleh dari Balai Besar Veteriner Maros, vaksin RB51, vaksin subunit *Brucella* dengan adjuvant Al(OH)₃ (SLPS Al(OH)₃) dan vaksin subunit *Brucella* dengan adjuvant Montanide (SLPS montanide) diperoleh dari Prof. Suwarno dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, mencit (*Mus musculus*) BALB/C, PBS steril, Elisa Kit Mouse IL-2 Platinum ELISA[®] catalog number BMS 601, Elisa Kit Mouse IFN Platinum ELISA[®] catalog number BMS606, TMB substrat, 1M phosphoric acid, di ethyl ether, crystal violet 0.05%, hydrogen peroxide 3%, dryslide-oxidase, lead acetate paper, methanol, thionin, thionin blue, safranin O, basic fuchsin, sheep Blood Agar, MacConkey Agar, Nutrient Agar, Urea broth/ slope, Serum Dextros Agar microplate dan slope, Dextrose Agar Base.

Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

28 ekor mencit (*Mus musculus*) dikelompokkan dalam empat kelompok dengan tiap kelompok terdiri atas tujuh ekor mencit. Kelompok I sebagai kontrol diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml NaCl fisiologis steril; kelompok II diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml SLPS Al(OH)₃ (kandungan SLPS 10 µg); kelompok III diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml SLPS montanide (kandungan SLPS 10 µg); dan kelompok IV diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml vaksin RB51 mengandung 10⁵ CFU (OIE, 2009).

Serum darah diambil pada hari ke 14 pasca vaksinasi untuk mengetahui tingkat sekresi IL-2 dan IFN. Prosedur anestesi umum dilakukan terlebih dahulu pada mencit sebelum dilakukan pengambilan darah, menggunakan Zoletil[®] dengan dosis 60 mg/kg BB secara *intraperitoneal*.

Evaluasi respon imun

Evaluasi sekresi IL-2 dan IFN dalam serum mencit menggunakan teknik sandwich ELISA dengan kit Mouse IL-2 Platinum Elisa[®] dan Mouse IFN Platinum Elisa. Tiap-tiap pengujian dilakukan sesuai dengan protokol manufaktur.

Analisis Data

Data eksperimental yang diperoleh dianalisa menggunakan ANOVA *single factor* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan, kemudian dilanjutkan dengan *Least Significant Different* (OIE, 2009; Grillo *et.al.*, 2012; Jain *et al.*, 2014).

Hasil Penelitian

Respon *cell mediated immunity* ditentukan melalui pengujian profil cytokine pada serum mencit yang diimunisasi menggunakan SLPS Al(OH)₃, SLPS montanide dan vaksin RB51. Tingkat sekresi IL-2 pada serum mencit 14 hari pasca vaksinasi ditunjukkan pada tabel 2. Terdapat perbedaan tingkat sekresi IL-2 yang nyata ($p < 0.05$) antara kelompok mencit yang divaksinasi menggunakan SLPS Al(OH)₃ dan SLPS montanide serta vaksin RB51 dengan kelompok control, sedangkan perbedaan antar kelompok perlakuan tidak nyata.

Tabel 2.Kadar IL-2 dalam serum *Mus musculus* 14 hari pasca vaksinasi*

Group	Vaksin	IL-2 serum (rata-rata ± SD)
1	NaCl fisiologis	32,04 ^a ± 8,76
2	SLPS Al(OH) ₃	50,06 ^b ± 12,03
3	SLPS Montanide	51,40 ^b ± 4,20
4	RB51	50,79 ^b ± 8,79

*dinyatakan dalam pg/ml

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Sementara itu, serum mencit yang diimunisasi memiliki kandungan IFN- yang lebih tinggi dibandingkan dengan mencit kontrol ($P < 0.05$). mencit yang divaksinasi menggunakan vaksin RB51 menghasilkan sekresi IFN- tertinggi (428.28 ± 58.40 pg / ml) diikuti dengan kelompok vaksin subunit LPS dengan adjuvant montanide (315.96 ± 81.50 pg/ml) dan Al(OH)₃ (253.41 ± 36.88 pg/ml). Perbedaan tingkat sekresi IFN diantara kelompok perlakuan adalah nyata ($p < 0.05$) (tabel 3).

Tabel 3.Kadar IFN dalam serum *Mus musculus* 14 hari pasca vaksinasi*

Group	Vaksin	IFN serum (rata-rata ± SD)
1	NaCl fisiologis	117,53 ^a ± 24,00
2	SLPS Al(OH) ₃	253,41 ^b ± 36,88
3	SLPS Montanide	315,96 ^c ± 81,50
4	RB51	428,28 ^d ± 58,40

*dinyatakan dalam pg/ml

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Diskusi

Montanide merupakan adjuvant dalam bentuk emulsi yang telah digunakan untuk beberapa jenis antigen derivat *Plasmodium falciparum* dan HIV. Montanide tersusun atas *natural metabolizable oil* dan emulsifier dari famili mono-oleat (Kurella *et.al.*, 2000). Montanide menghasilkan sekresi antibody yang kuat, proliferasi sel T dan profil sitokinyang seimbang antara Th1/Th2. Montanide juga diketahui menghasilkan efek depot, merekrut, mengaktifasi dan menginduksi migrasi dari APC ke kelenjar limfa dan lebih dari itu montanide juga berinteraksi dengan membran sel untuk membantu *uptake* antigen (Mata *et.al.*, 2013).

Beberapa penelitian tentang penggunaan adjuvant montanide dalam vaksin terhadap *Schistosoma* telah dilakukan. Pan *et al.*, melakukan penelitian efek adjuvant terhadap tingkat proteksi oleh antigen S_j26GST (S_jGP-3). Hasil yang diperoleh adalah S_j26GST (S_jGP-3) yang diformulasikan dengan adjuvant ISA 70M mampu menginduksi respon imun sel Th1 (Xu *et.al.*, 2009).

Sekresi IL-2 merupakan indikator yang dapat digunakan untuk menganalisis respon proliferasi sel Th limfosit terhadap rangsangan antigen spesifik secara tidak langsung (Wyckoff, 2002). Pada penelitian ini tingkat sekresi IL-2 dalam serum *Mus musculus* yang divaksinasi menggunakan ketiga jenis vaksin, SLPS Al(OH)₃, SLPS montanide dan RB51 tidak berbeda secara nyata. Hal ini mengindikasikan adanya potensi yang sama untuk menghasilkan respon imun humoral yang diperantarai sel Th2 maupun respon imun seluler oleh efektor sel Th1 oleh ketiga jenis vaksin ini.

Respon imun Th1 terhadap *Brucella* menyebabkan sekresi IFN oleh antigen-specific T lymphocytes. Hampir semua penelitian mengindikasikan bahwa CD4⁺ T lymphocytes adalah penghasil utama IFN, meskipun subset sel yang lain misalnya CD8⁺ T lymphocytes, T lymphocytes dan NK juga menghasilkan IFN (Baldwin dan Goenka, 2006). Peran utama sel T dalam imunitas terhadap *Brucella* adalah sekresi IFN, untuk mengaktifasi fungsi bakterisidal makrofag dan aktivitas sel T sitotoksik, demikian pula dengan IgG2a dan IgG3 *isotype switching* (Ko and Splitter, 2003; Skendros and Boura, 2013).

Induksi system imun oleh vaksin RB51 menimbulkan respon sekresi IFN tertinggi yang berbeda nyata dibandingkan dengan penggunaan vaksin SLPS montanid, SLPS Al(OH)₃ dan kontrol secara berurutan. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Yang *et.al.*, 2013. Tingkat

sekresi IFN yang dihasilkan oleh perlakuan dalam penelitian ini berkorelasi positif dengan *bacterial clearance* pada limpa mencit, hal ini menunjukkan pentingnya IFN untuk mengeliminasi mikroorganisme dari tubuh hospes. Fakta ilmiah ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Pasquali *et.al.*(2001), bahwa mencit yang divaksinasi dengan RB51 terlindungi oleh infeksi *B. abortus* 2308 sejak tiga hari pasca infeksi.

Hasil evaluasi tingkat efikasi protektif vaksin yang dilakukan pada penelitian ini memperkuat teori tentang peran utama imunitas seluler, terutama diperankan oleh IFN dalam resistensi terhadap infeksi *B. abortus*. Tingkat sekresi IFN berkorelasi positif dengan *bacterial clearance* pada limpa mencit. Terdapat perbedaan yang sangat signifikan tingkat colony forming unit pada limpa mencit pasca uji tantang menggunakan isolate *B. abortus* virulen antara vaksinasi menggunakan RB51, SLPS montanide, SLPS Al(OH)₃ dan kontrol, secara berurutan. Hasil serupa juga dijumpai pada penelitian Pasquali *et.al.*(2001) yang menyatakan responses proteksi yang diinduksi oleh vaksinasi menggunakan vaksin *B. abortus* RB51 lebih didasarkan pada *cell-mediated immunity* dan antibodi memegang peranan minor.

Kesimpulan

Vaksin berbasis SLPS dengan dua adjuvant yang berbeda mampu menginduksi sel T untuk mensekresi IL-2 dan IFN gamma lebih tinggi dibandingkan kelompok control, namun dengan tingkat sekresi di bawah RB51.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini terlaksanakan atas pendanaan dari DIPA tahun 2014 Balai Besar Veteriner Maros, Kementerian Pertanian Republik Indonesia. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Suwarno, M.Si atas bantuan vaksin dan fasilitas penelitian.

Daftar Pustaka

- Al-Mariri, A. and A. Q. Abbady. 2013. Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy in mice of a DNA vaccine encoding SP41 from *Brucella melitensis*. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7(4):329-337.
- Avila-Calderón, E.D. , A. L. Merino, N. Sriranganathan, S. M. Boyle and A. Contreras-Rodríguez. 2013. Review Article: A History of the Development of *Brucella* Vaccines. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed. Res. Inter.*
- Baldwin, C.L. and R. Goenka. 2006. Host immune responses to the intracellular bacterium *Brucella*: does the bacterium instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit. Rev. Immunol.* 26: 407-442.
- Cardoso, P. G., G. C. Macedo, V. Azevedo and S. C. Oliveira. 2006. *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *J. Microbial Cell Factories.* 5:13.
- Fernandes, D.M., X. Jiang, J. H. Jung, C. L. Baldwin. 1996. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 16: 193-203.
- Goel, D., V Rajendranb, P. C. Ghosh and R Bhatnagar. 2013. Cell mediated immune response after challenge in Omp25 liposome immunized mice contributes to protection against virulent *Brucella abortus* 544. *Vaccine* 31:1231- 1237. www.elsevier.com/locate/vaccine.
- Golding, B., D. E. Scotta, O. Scharf, L. Y. Huang, M. Zaitseva, C. Lapham, N. Ellera and H. Golding. 2001. Immunity and Protection Against *Brucella abortus*. *J. Microb. Infect.* 3: 43-48

- Grilló, M.J., J.M. Blasco, J.P. Gorvel, I. Moriyón and E. Moreno. 2004. What have we learned from brucellosis in the mouse model?. *Veterinary Research*.43: 29. <http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/29>.
- Jain, S., P. Afley, S.K. Dohre, N. Saxena and S. Kumar. 2014. Evaluation of Immunogenicity and Protective Efficacy of Plasmid DNA Vaccine Encoding Ribosomal Protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/C Mice. *J. Vacc.* 32:4537-4542. www.elsevier.com/locate/vaccine.
- Ko, J. and A.G. Splitter. 2003. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(1): 65–78.
- Kurella, S., M. Manocha, L.Sabhnani, B. Thomas and D. N. Rao. 2000. New Age Adjuvant and Delivery System for Subunit Vaccines. *Indian J. Clin.Bio.* 15(suppl): 83-100.
- Kurtz, R.S. and D.T. Berman. 1986. Influence of Endotoxin-Protein in Immunoglobulin G Isotype Responses of Mice to *Brucella abortus* Lipopolysaccharide. *J. Infect and Immun.* 54(3): 728-734.
- Mata, E.; Salvador, A.; Igartua, M.; Hernandez, R.M.; Pedraz, J.L. 2013. Malaria vaccine adjuvants: Latest update and challenges in preclinical and clinical research. *Biomed.Res. Int.* doi:10.1155/2013/282913.
- OIE. 2009. Bovine Brucellosis. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health Chapter 2.4.3.
- Oliveira, S. C., G. C. Macedo, L. A. de Almeida, F. S. de Oliveira, A. Oñate, J.Cassataro and G. H. Giambartolomei. 2010. Recent Advances in Understanding Immunity Against Brucellosis: Application for Vaccine Development. *The Open Veterinary Science Journal*.4: 102-108.
- Pasquali, P., R. Adone, L. C. Gasbarre, C. Pistola and F. Ciuhini. 2001. Mouse Cytokine Profiles Associated with *Brucella abortus* RB51 Vaccination or *B. abortus* 2308 Infection. *J. Infect and Immun.* 69(10): 6541-6544.
- Pellegrino, P., E. Clementi and S. Radice. 2015. Review: On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. *J. Autoimmun.Rev.* Journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev.
- Perkins, S.D., S.J. Smither and H.and S. Atkins. 2010. Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS. Microbiol. Rev.* vol. 34(3): 379–394.
- Petrovsky, N. and J. C. Aguilar. 2004. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *J. Immun. Cell Biolo.* 82:488–496.
- Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume. 2004. Interferon Gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leuko. Biol.* 75.
- Schurig, G.G., N. Sriranganathan and M.J. Corbel. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90: 479-496.
- Simborio, H.L.T., A. W. B. Reyes, H. T. Hop, L. T. Arayan, W. Min, H.J. Lee, H. H. Chang and S. Kim. 2014. Strategies for the development of an effective vaccine against Brucellosis *J. Prev. Vet. Med.* Vol. 38(2): 53-60. <http://dx.doi.org/10.13041/jpvm.2014.38.2.53>
- Skendros, P. and P. Boura. 2013. Immunity to Brucellosis. *Rev. sci. tech. Off. int.*
- Xu, X.D.; Zhang, D.M.; Sun, W.; Zhang, Q.F.; Zhang, J.J.; Xue, X.Y.; Shen, L.H.; Pan, W.Q. 2009. A *Schistosoma japonicum* chimeric protein with a novel adjuvant induced a polarized Th1 immune response and protection against liver egg burdens. *BMC Infect. Dis.* doi:10.1186/1471-2334-9-54.