

Pengaruh Vaksinasi Dengue Multivalen terhadap Ekspresi *Toll-Like Receptor* dan Sel T Cd4+ Pada Kelinci (*White New Zealand*)

The Influence of *Toll-Like Receptor* and Cd4+ T Cell Expression in Rabbit (White New Zealand) with Vaccination Using *Dengue Multivalent*

¹Arifanti Budi H, ²Fedik Abdul Rantam, ²Lianny Nangoi, ³Helen Susilowati, ³Erik H

¹ PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

² Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

³ Institut Tropik Disease Universitas Airlangga

Kampuc C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya – 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

Abstract

The aim of this research was knowed the influence of *Toll-Like Receptor* and CD4+ T cell expresion in (*white new zealand rabbit*) with vaccination using *dengue multivalent*, was used PBMC isolation and *direct immunofluorescence test*. This research have used dengue multivalent vaccine which consist of four serotypes dengue viruses. This research used to a fully randomized design with three treatments, there are P0, P1 and P2. The group P0 as control was injected with physiology NaCl, the group P1 with *dengue Multivalent vaccine* 0,5 ml and group P2 with *dengue Multivalent* 0,3 ml. The analysis data used to Analysis of Variance (ANOVA) followed by Honestly Significant Difference (HSD). The result was different between control group with treatment group. This research was showed that *dengue Multivalent vaccine* 0,5 ml is more effective than *dengue Multivalent vaccine* 0,3 ml to induce *Toll-Like Receptor* and CD4+ expression in White New Zealand rabbit.

Keywords : *Toll-Like Receptor*, *Dengue Multivalent Vaccine*, White New Zealand.

Pendahuluan

Toll-like receptor merupakan kelompok reseptor protein pada permukaan sel yang dapat mengenali ligan dari banyak patogen dan memberikan sinyal dalam sel untuk aktivasi, sebagai respon terhadap produk mikroorganisme yang dapat ditemukan pada makrofag, monosit dan sel endotel merupakan komponen penting dalam sistem imun bawaan (Pusparini *et al*, 2007). Reseptor ini mulai sering diperhatikan beberapa tahun terakhir untuk mengetahui efektifitas vaksin, tetapi pengaruh ekspresi dari TLR sebagai signaling yang berperan dalam internalisasi antigen patogen belum banyak diketahui oleh khalayak.

Reseptor ini dapat mempengaruhi respon kekebalan tubuh melalui respon innate antibakterial dan respon inflamasi, selain itu berperan sebagai *CD-14 assosiated signal transducer* dan melakukan kaskade signal yang dapat membantu menjembatani sistem imun *innate* ke sistem imun *adaptive* dengan

menginduksi berbagai molekul efektor dan co-stimulator (Zhang and Ghosh, 2001).

Respon imun dapat diinduksi oleh antigen yang secara alami masuk dalam tubuh maupun melalui vaksinasi. Vaksin merupakan sediaan biologis yang mengandung antigen baik berupa mikroorganisme yang mati atau dilemahkan tanpa merusak potensi antigen itu sendiri. Jika diberikan pada hewan akan merangsang kekebalan untuk membentuk zat kebal atau antibodi dalam jangka waktu tertentu (Allan *et al.*, 1978).

Syarat vaksin *dengue* yang baik adalah murah, mencakup 4 serotipe, efektif menimbulkan *serokonversi* dan kekebalan, cukup diberikan sekali, efek samping minimal, memberikan kekebalan jangka panjang, stabil pada penyimpanan, secara genetis dan antigenetis (Sutaryo *et al.*, 2003). Vaksin *dengue multivalen* yang akan diujicobakan pada kelinci *White New Zealand* memiliki beberapa kelebihan antara lain mengandung empat serotipe antigen *dengue*, *long-acting* dan dapat

menimbulkan netralisasi antibodi yang tinggi (Rantam, 2010).

Perubahan ekspresi dari TLR dan ekspresi signaling kaskade protein yang berhubungan dengan peran stimulasinya tidak hanya untuk patologi respon inflamasi infeksi tetapi juga dapat memberikan aksi perlindungan (Slotwinski *et al.*, 2009). Selain itu signaling melalui TLR tidak hanya menginduksi produksi sitokin tetapi juga dapat menginduksi maturasi sel imun, berkontribusi sebagai perlawanan terhadap agen patogen (Krishnan *et al.*, 2007).

Meninjau peran penting dari TLR yang telah diuraikan sebelumnya, maka perlu adanya uji coba vaksinasi yang dapat menginduksi ekspresi dari TLR. Menurut data penelitian terkait menyatakan bahwa perubahan ekspresi dari TLR diperkirakan mempengaruhi kerentanan individu terhadap penyakit (Runtuwene L *et al.*, 2009). Oleh karena itu, pada penelitian kali ini akan difokuskan untuk mengetahui pengaruh vaksin *dengue* multivalen yang dikembangkan oleh *Institute Tropical Disease* (ITD), Universitas Airlangga terhadap ekspresi *Toll-Like Receptor* pada kelinci *white new zealand* dengan menggunakan metode imunofluorescen. Diharapkan kelinci sebagai hewan coba menunjukkan peningkatan ekspresi dari TLR2 (*Toll-Like Receptor* 2) akibat vaksinasi *dengue* multivalen.

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Kandang Hewan Coba Fakultas Farmasi untuk pemeliharaan hewan coba kelinci dan Laboratorium DHF, *Institute of Disease Center*, Universitas Airlangga untuk isolasi PBMC, pemeriksaan TLR2 dan sel T CD4+ menggunakan metode imunofluorescen yang dilaksanakan pada Juli 2010 - Januari 2011.

Penelitian ini menggunakan kelinci jenis *White New Zealand* sebagai hewan coba sebanyak 9 ekor dengan umur 2,5 bulan dan berat 1 kg. Kelinci dibagi menjadi 3 kelompok yaitu Kelompok kontrol (P0) diinjeksi dengan PZ 0,5 ml/ekor, Kelompok perlakuan pertama (P1) diinjeksi vaksin *dengue* multivalen 0,5 ml/ekor dan kelompok perlakuan kedua (P2) diinjeksi dengan vaksin *dengue* multivalen 0,3 ml/ekor secara intramuskuler.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah vaksin *dengue* multivalen yang diperoleh dari *Institute of Tropical Disease* (ITD), Universitas Airlangga, alkohol 70%, PBS 1X, Histopaque, freezing media, anti-

TLR2 yang dilabel FITC, methanol, larutan FBS 1%, Antikoagulan EDTA, reagen anti-CD4 (monoclonal mouse anti-human CD4/FITC), sedangkan peralatan yang digunakan adalah disposable spuit 3cc, spuit tuberculin, ice pack, ice box, tabung blue cap, sentifus, pipet dropper dan tipsnya, eppendorf tube, vortex, refrigerator, mikroskop fluorescen, inkubator, obyek glass, glove.

Vaksinasi

Vaksin yang digunakan pada penelitian ini adalah vaksin *dengue* multivalen. Vaksinasi dilakukan secara injeksi intramuskuler di paha kelinci *white new zealand* sebanyak dua kali. Vaksinasi pertama dilakukan pada hari ke-0 dan Booster pada hari ke-14. Perlakuan yang diberikan pada kelinci dibagi menjadi tiga yaitu Pemberian PZ pada perlakuan kontrol (P0), vaksinasi dengan dosis 0,5ml/ekor untuk kelompok P1 dan 0,3 ml/ekor untuk P2.

Pengambilan darah

Pengambilan darah dilakukan sebanyak 5x yaitu pada hari 0, 7, 14, 21 dan 28. Darah diambil dari pembuluh darah di telinga (*V. Auricularis*). Darah diambil sebanyak 3cc/ekor. Darah yang diambil dimasukkan ke dalam tabung blue tube cap yang telah diisi dengan EDTA. Masukkan ke dalam ice box kemudian dilakukan isolasi PBMC.

Isolasi *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMCs)

Darah disentrifuge selama 5 menit pada kecepatan 1500 rpm. Lalu supernatan ditambah PBS 1X sebanyak 2cc dan di resuspensi. Siapkan blue tube cap baru, isi dengan histopaque. Supernatan yang telah diresuspensi dimasukkan ke dalam histopaque, lalu disentrifus 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Siapkan blue tube cup baru, kemudian PBMC diambil. Tambahkan PBS 1X sampai volume menjadi 8cc. Sentrifuge selama 10 menit pada kecepatan 2500 rpm. Buang filtrat dan tambahkan PBS 1X dan sentrifuge lagi selama 5 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Buang filtrat dan tambahkan freezing media sebanyak 1cc, lakukan resuspensi kemudian pindahkan ke eppendorf tube.

Pemeriksaan imunofluorescen

PBMC disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Buang media dan

tambahkan PBS 1X lalu di resuspensi. Lakukan sentrifugasi lagi (3000 rpm selama 5 menit). Tambahkan media lalu di resuspensi. Teteskan pada objek glass dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Kemudian fiksasi dengan methanol dan ruang. Setelah kering, tambahkan reagen anti-TLR2 maupun reagen anti-CD4+ (

lakukan pada ruangan gelap). Inkubasi pada suhu 37 °C selama 45 menit. diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Cuci dengan PBS dan inkubasi dalam larutan FBS 1% selama 15 menit. Cuci dengan PBS lagi dan biarkan kering pada suhu ruang, kemudian dibaca dengan menggunakan mikroskop *fluorescen*.

Hasil dan Pembahasan

Toll-Like Receptor

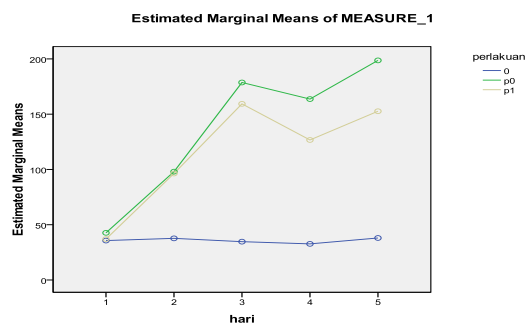
Tabel 1. Nilai Rata-rata dan Simpangan Baku Sel TLR2 pada Kelinci yang Divaksinasi *Dengue* Multivalen dengan Dosis yang Berbeda

Hari ke-	0	7	14	21	28
P0	35,67 ^a ± 4,726	37,67 ^b ± 6,028	34,67 ^c ± 1,528	32,67 ^c ± 3,786	38,00 ^d ± 2,646
P1	42,67 ^a ± 6,028	98,00 ^b ± 5,000	178,87 ^c ± 12,342	163,67 ^c ± 10,970	198,67 ^d ± 16,010
P2	37,00 ^a ± 6,557	96,33 ^b ± 10,263	159,33 ^c ± 19,655	126,67 ^c ± 38,436	152,67 ^d ± 33,650

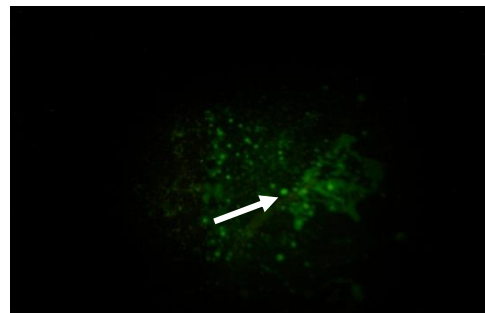
a,b,c,d : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$). Keterangan : P0 adalah kelompok Kontrol, P1 adalah kelompok perlakuan yang diinjeksi Vaksin *Dengue* Multivalen 0,5 ml, P2 kelompok perlakuan yang diinjeksi Vaksin *Dengue* Multivalen 0,3 ml

Penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan ekspresi TLR2 pada kelompok perlakuan baik kelompok perlakuan vaksinasi 0,5ml maupun 0,3 ml. Hal ini dapat dilihat pada tabel baik dari analisa TLR2 maupun sel T CD4+. Jumlah total rata-rata TLR2 dan sel T CD4+ yang merespon baik pemberian vaksin

adalah kelompok kelinci yang diberikan vaksin *dengue* multivalen 0,5 ml, hal ini menunjukkan bahwa vaksin *dengue* multivalen dengan dosis 0,5 ml menghasilkan ekspresi yang lebih tinggi pada tiap harinya, hal tersebut dapat dilihat pada gambar 4.3 berikut :



Gambar A



Gambar B

Gambar 1. Grafik hasil ekspresi TLR2 pada hari ke 0,7,14,21 dan 28 akibat vaksinasi *dengue* multivalen, B.) Gambaran ekspresi TLR2 melalui imunofluorescen.

Keterangan : Warna biru menunjukkan P0, warna hijau menunjukkan P1 dan warna kuning menunjukkan P2.

Berdasarkan grafik di ekspresi TLR2 di atas, perlakuan kontrol menunjukkan gambaran ekspresi yang datar dan paling rendah dibandingkan kelompok perlakuan vaksinasi baik P1 maupun P2, hal tersebut disebabkan karena PZ yang diinjeksikan pada kelinci tidak dapat menginduksi peningkatan ekspresi TLR, pemberian PZ pada hewan coba hanya

digunakan untuk memberikan stress yang sama pada kelinci.

Kelompok perlakuan vaksin *dengue* multivalen 0,5 ml dan kelompok perlakuan vaksin *dengue* multivalen 0,3 ml terjadi peningkatan ekspresi TLR2 dari hari ke hari, namun mengalami penurunan pada hari ke-21 yang disebabkan karena proses signaling membutuhkan waktu untuk dapat menimbulkan

ekspresi TLR2 dan peningkatan puncak terjadi pada hari ke-28, hal tersebut disebabkan karena sel memori yang telah terproduksi setelah vaksinasi pertama menimbulkan proses signaling berjalan lebih efektif ketika kelinci dipapar kedua kalinya dengan antigen yang sama. Kelompok P1 menunjukkan peningkatan ekspresi TLR2 lebih tinggi dari kelompok perlakuan P2, hal tersebut menunjukkan vaksinasi *dengue* multivalen dengan dosis 0,5 ml lebih efektif menginduksi ekspresi TLR2 pada kelinci.

TLR akan melakukan signaling yang berguna dalam aktivasi sel T CD4⁺ atas induksi dari IL-1. Setelah sel T CD4⁺ aktif, akan memproduksi IL-2 yang menginduksi sel T CD4⁺ lainnya untuk berproliferasi dan berdeferensiasi serta memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-6 yang nantinya akan menginduksi proliferasi dan berdeferensiasi sel B untuk menghasilkan antibodi. Sehingga dapat dikatakan peningkatan ekspresi dari TLR akan mengaktifasi makrofag agar lebih efektif dalam mengenal, menangkap, mengolah dan mempresentasikan antigen pada sel T CD4.

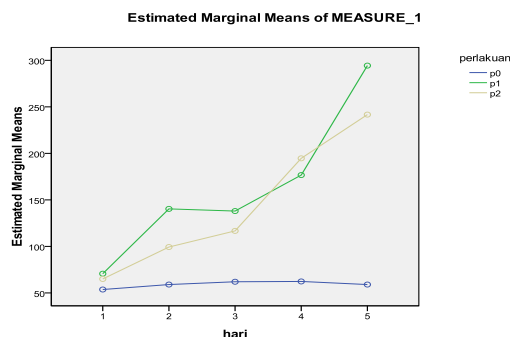
Sel T CD4⁺

Tabel 2. Nilai Rata-rata dan Simpangan Baku CD4⁺ pada Kelinci yang Divaksinasi *Dengue* Multivalen dengan Dosis yang Berbeda

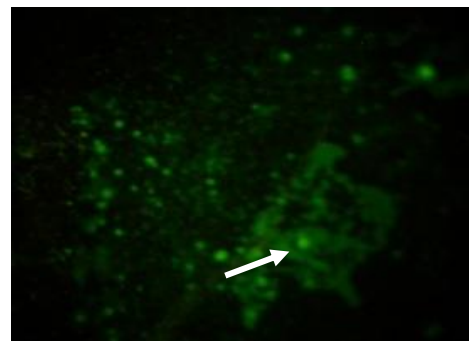
Hari ke-	0	7	14	21	28
P0	53,67 ^a ± 4,726	59,00 ^b ± 7,937	62,00 ^c ± 3,000	62,33 ^c ± 7,638	59,00 ^d ± 2,000
P1	70,67 ^a ± 6,028	140,33 ^b ± 1,528	138,00 ^c ± 3,606	176,67 ^c ± 23,459	294,33 ^d ± 6,807
P2	65,00 ^a ± 6,557	99,33 ^b ± 6,110	116,67 ^c ± 10,693	194,67 ^c ± 38,109	241,67 ^d ± 34,775

a,b,c,d : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$). Keterangan : P0 adalah kelompok Kontrol, P1 adalah kelompok perlakuan yang diinjeksi Vaksin *Dengue* Multivalen 0,5 ml, P2 kelompok perlakuan yang diinjeksi Vaksin *Dengue* Multivalen 0,3 ml.

Gambaran grafik ekspresi sel T CD4⁺ pada tiap harinya dan gambaran sel T CD4⁺ aktif melalui imunofluoresen, dapat dilihat pada gambar 4.4 :



Gambar A



Gambar B

Gambar 2. Grafik hasil ekspresi TLR2 pada hari ke 0,7,14,21 dan 28 akibat vaksinasi *dengue* multivalen, B.) Hasil imunofluoresen Sel T CD4⁺ yang aktif pada sel limfosit berupa bintik-bintik sel yang berpendar hijau fluoresen (tanda panah)

Keterangan : Warna biru menunjukkan P0, warna hijau menunjukkan P1 dan warna kuning menunjukkan P2.

Berdasarkan grafik ekspresi sel T CD4⁺, perlakuan kontrol menunjukkan gambaran ekspresi yang paling rendah dibandingkan kelompok P1 maupun P2, hal tersebut disebabkan karena PZ yang diinjeksikan pada kelinci tidak dapat menginduksi peningkatan

ekspresi sel T CD4⁺, pemberian PZ pada hewan coba hanya digunakan untuk memberikan stress yang sama pada kelinci.

Kelompok perlakuan vaksin *dengue* multivalen 0,5 ml dan kelompok perlakuan vaksin *dengue* multivalen 0,3 ml terjadi

peningkatan ekspresi sel T CD4⁺ dari hari ke hari, namun P1 menurun pada hari ke-14 yang disebabkan karena proses signaling membutuhkan waktu untuk dapat menimbulkan proses internalisasi antigen yang nantinya akan diekspresikan pada sistem imun adaptif.

Peningkatan puncak terjadi pada hari ke-28 yang disebabkan karena sel memori yang telah terproduksi setelah vaksinasi pertama menimbulkan proses signaling berjalan lebih efektif ketika kelinci dipapar kedua kalinya dengan antigen yang sama. Kelompok P1 menunjukkan peningkatan ekspresi sel T CD4⁺ lebih tinggi dari kelompok perlakuan P2, hal tersebut menunjukkan vaksinasi *dengue* multivalen dengan dosis 0,5 ml lebih efektif menginduksi ekspresi sel T CD4⁺ pada kelinci sehingga proses internalisasi antigen dapat bekerja efisien.

Hasil penelitian memperlihatkan adanya peningkatan ekspresi dari sel T CD4⁺ yang signifikan dengan ekspresi TLR2 setelah diberi perlakuan vaksinasi *dengue* multivalen dari hari ke hari. Hal tersebut menunjukkan korelasi antara TLR2 yang berperan dalam proses signaling pada sel T CD4⁺ yang nantinya akan berperan dalam proses internalisasi antigen. Hal tersebut sesuai dengan pendapat yang dikemukakan oleh (Schjetne *et al.*, 2003) bahwa TLR2 menunjukkan kemampuan dalam internalisasi antigen untuk mempresentasikan pada sel imun adaptif, dan hal itu dapat menjadi target vaksin yang efisien.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Vaksinasi *dengue* multivalen dapat meningkatkan ekspresi *Toll-Like Receptor* dan Sel T CD4⁺ pada Kelinci *White New Zealand* dan Dosis vaksin *dengue* multivalen 0,5 ml lebih efektif merangsang peningkatan ekspresi *Toll-Like Receptor* dan Sel T CD4⁺ dibandingkan dengan dosis vaksin *dengue* multivalen 0,3 ml.

Daftar Pustaka

- Abbas AK, Lichtman AH. 2007. *Basic Immunology function & disorder of the immune system*. Saunders, an imprint of Elsevier Inc. Philadelphia.
- Darmowandodo, Widodo. 2006. *Infeksi Virus Dengue*. Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga. Surabaya : 2-15
- Isbagio, DW. 2005. *Masa Depan Perkembangan Vaksin Baru*. Jakarta : Cermin Dunia Kedokteran (148) : 12-16

- Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuciya, M., Lee G dan Choi, S. 2007. *Toll-Like Receptor Signal Transduction*. Exp. Mol. Med. 39 (4) : 421-438
- Lestari, Keri. 2007. *Epidemiologi dan Pencegahan Demam Berdarah Dengue di Indonesia*. Jatinangor. Farmaka 5 (3) : 12-29
- Novrianti, Harli. 2002. *Respon Imun dan Derajat Kesakitan Demam Berdarah Dengue dan Dengue Shock Syndrome*. Jakarta : Cermin Dunia Kedokteran (134) : 46-48
- Runtuwene, Lily., Damondoro N, Sekar R. 2009. *Peranan Toll like receptor terhadap Terjadinya Meningitis Tuberkulosis*. Berkata Neurosains 10(2) : 45-53
- Shizuo A. 2003. *Role of adapters in Toll-like receptor signalling*. Department of Host Defense, Research for Microbial Diseases. Osaka University and ERATO of Japan Science and Technology Corporation. Yamada-oka. Suita. Osaka. Japan.
- Shizuo A. 2003. *Toll-like Receptor Signaling*. Department of Host Defense, Research for Microbial Diseases. Osaka University and ERATO of Japan Science and Technology Corporation. Yamada-oka. Suita. Osaka. Japan.

