

ANALISA MOLEKULER SISTIM IMUNITAS PENYAKIT JEMBRANA

(Molecular analysis of immune system of Jembrana Disease)

Drh. I Wayan Masa Tenaya, M.Phil, PhD dan Drh. I Ketut Diarmita, M.P

Balai Besar Veteriner Denpasar

ABSTRAK

Real-time (RT)-PCR digunakan untuk mendeteksi adanya ekspresi sitokin pro-infeksi IL-2, INF-gamma, dan TNF-alfa pada infeksi virus penyakit Jembrana (VPJ). Di ketahui bahwa terjadi peningkatan regulasi ekspresi mRNA INF-alfa selama fase demam, dan terjadinya peningkatan kadar sitokin IL-2 ($p < 0.05$) dan INF-gamma ($p < 0.001$) yang terjadi segera setelah turunnya demam, yang diikuti oleh penurunan secara signifikan RNA VPJ ($P < 0.001$) sampai dengan tingkat yang tidak bisa dideteksi pada fase ini. Hal ini menandakan bahwa sitokin mempunyai peran besar dalam proses kesembuhan akibat infeksi VPJ. Peningkatan tajam gen IL-2 dan INF-gamma berkorelasi dengan peningkatan sel-sel CD8⁺ T-cells secara signifikan pada fase demam dan awal kesembuhan. Hal ini mendukung hipotesa bahwa *cell-mediated immune response* merupakan salah satu faktor penentu kesembuhan pada penyakit Jembrana terutama pada fase akut.

Kata kunci: *Real-time (RT)-PCR, sitokin, IL-2, INF-gamma, dan TNF-alfa*

ABSTRACT

Real-time (RT)-PCR was used to investigate the expression of pro-inflammatory cytokines IL-2, INF- γ , and TNF-alfa following JDV infection. There was an up-regulation of INF-alfa mRNA expression during the febrile fase, and there was significant up-regulation of both IL-2 ($P < 0.05$) and INF- γ ($p < 0.001$) cytokines during the post-febrile fases that coincided with the significant reduction of JDV RNA ($P < 0.001$) to undetectable values in this fase, suggesting these sitokin may have a significant role in the recovery process. The up-regulation of IL-2 and INF-gamma genes correlated with a significant increase of CD8⁺ T-cells during the febrile and immediate post-febrile fases of Jembrana disease and support a hypothesis that the cell-mediated immune response is a significant factor in recovery of animals.

Key words: *Real-time (RT)-PCR, sitokin, IL-2, INF-gamma, and TNF-alfa*

PENDAHULUAN

Patogenesis infeksi virus penyakit Jembrana (VPJ) yang menyebabkan infeksi akut pada sapi Bali belum diketahui secara baik. Perjalanan infeksi VPJ merupakan penyakit yang tidak lazim untuk lentivirus dimana sebagian besar lentivirus menyebabkan infeksi kronis. Sedangkan VPJ menyebabkan proses penyakit yang sangat akut penyakit setelah periode inkubasi yang singkat, derajat kesembuhan besar (~ 80%) hewan namun tidak kambuh berikutnya dari infeksi ulangan oleh VPJ. Ada respon antibodi tertunda virus sampai beberapa minggu setelah proses penyakit akut (Dharma *et al.*, 1994; Hartaningsih *et al.*, 1994.). Hal ini mungkin karena terserangnya sel-sel B, yakni sel penghasil antibodi pada infeksi VPJ pada fase akut tersebut (Desport *et al.*, 2009). Tidak adanya respon antibodi sampai beberapa minggu namun sebagian besar hewan dapat bertahan hidup, mengindikasikan adanya peran sel-sel T dalam proses kesembuhan. Sebuah peningkatan yang signifikan dari CD8 + T-sel dalam fase pasca-demam itu menunjukkan bahwa sel-sel T berperan dalam proses kesembuhan penyakit Jembrana (Tenaya, *et al.*, 2009).

Sitokin memegang peran penting dalam pengaturan respon imun secara alamiah dan, sel-sel T merupakan sumber sitokin yang sangat penting terkait respon imun primer dan memori. Sel-sel T CD4⁺ adalah sumber utama sitokin sel T dan berdasarkan profile sitokinnya sel-sel T CD4⁺

ini dibagi menjadi type Th1 (menghasilkan IL-2, IFN- γ and TNF- α) dan type Th2 (menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10) (Mosmann and Sad, 1996; Mosmann *et al.*, 1986). Kebanyakan penelitian terkait respon antivirus sel-sel T CD8⁺ menitikberatkan pada kemampuan sel-sel ini dalam melisis sel-sel yang terinfeksi (Binder and Kundig, 1991; Kagi *et al.*, 1994; Lukacher *et al.*, 1984). Akan tetapi, seperti halnya sel-sel T CD4⁺, sel-sel T CD8⁺ juga di duga sebagai sumber utama sitokin seperti IFN- γ , TNF- α , IL-2, GM-CSF, RANTES, MIP-1 α dan MIP-1 β selama infeksi viral (Kristensen *et al.*, 2004; Paliard *et al.*, 1988). Tiga dari sitokin ini yaitu IFN- γ , TNF-ALFA dan IL-2, sudah diteliti secara luas terkait dengan banyak aspek infeksi. IFN- γ juga diproduksi oleh sel *natural killer* (NK) dan sel-sel NK ini merupakan sebagai awal respon imun dalam banyak rekasi yang meliputi penghambatan replikasi virus, pengontrolan tumor, aktivasi makropag dan pengaktifan histocompatibility complex (MHC) kelas I dan II (Boehm *et al.*, 1997; Rosenzweig and Holland, 2005). sitokin pro-infeksi TNF-alfa utamanya diproduksi oleh makropag dan *mast cells* dan sel-sel T, dengan fungsi utama dalam pengaturan sel-sel imun, merangsang kematian sel akibat apoptosis, aktivasi makropag dan sel-sel sitotoksik, mengawali peradangan dan penghambatan pembentukan tumor dan replikasi virus (Corral *et al.*, 1999; Locksley *et al.*, 2001). Peningkatan kadar TNF-alfa diduga berkaitan dengan adanya demam, menggigil, dan

penurunan berat badan yang menyertai infeksi kronis, dan penurunan kadar TNF-alfa umumnya berbarengan dengan penurunan gejala klinis dan sejumlah status penyakit (Moreland et al., 1997). Sitokin pro-infeksi seperti IL-2 dibuat oleh sel-sel T adalah sangat penting untuk perbanyakan dan aktivasi khususnya sel-sel T CD8⁺ sitotoksik dan juga sel-sel T CD4⁺ dan sel-sel B-cells; semua sel-sel tersebut memaksimalkan daya bunuh makropag pengaturan pendewasaan dan pengaturan sel-sel T (Karasuyama et al., 1989; Roitt et al., 2001b).

Dalam kaitannya dengan infeksi virus, keturunan sel-sel T mempunyai banyak jalan terkait cara aktivasi. Dalam infeksi virus *lymphocytic choriomeningitis*, sel sel T CD4⁺ tidaklah penting dalam peradangan yang melibatkan sel-sel T (Marker et al., 1995). Dalam infeksi HIV, penurunan sel-sel T CD4⁺ T menyebabkan tidak berpungsiya sel-sel T CD8⁺, sel-sel NK dan sel-sel B yang menyebabkan tingginya produksi virus dalam status dan tahap terjadinya AIDS (Flint et al., 2004b). Dalam infeksi lentivirus, sel-sel T CD8⁺ memegang peranan yang sangat penting dalam fase awal infeksi (Jin et al., 1999; Matano et al., 1998; Pantaleo et al., 1997a) dan juga selama fase akhir pada infeksi dengan gejala klinis yang tidak nampak, hal ini menandakan bahwa sel-sel tersebut mengeluarkan zat-zat antivirus (Copeland et al., 1995; Migueles et al., 2002; Zagury et al., 1998).

Didalam infeksi virus Jembrana (JDV) , walaupun populasi sel-sel T CD4⁺ juga menurun, jumlah sel-sel T CD8⁺ meningkat tajam selama fase penyakit akut/demam dan karena kebanyakan dari sapi yang terinfeksi JDV akhirnya sembuh dari fase akut tanpa timbulnya kembali gejala klinis hal ini menandakan bahwa sel-sel T CD8⁺ sangatlah berperan dalam proses kesembuhan. Sel sel ini juga bersamaan dengan sel-sel lainnya seperti sel-sel *natural killer* dan makropag, mungkin juga menghasilkan zat-zat sitokin pro-infeksi dan *sitokin* ini mungkin dapat berperan selama proses infeksi dan atau kesembuhan.

Hasil penelitian dalam tulisan ini dikerjakan dalam rangka membuktikan ada/tidaknya ekspresi sitokin IL-2 , IFN-gamma and TNF-alfa oleh sel-sel darah putih tepi pasca infeksi JDV pada sapi Bali dan menentukan hubungan antara respon ini dengan adanya peningkatan jumlah sel-sel T (CD3⁺) dalam jaringan limfoid yang diobservasi selama dan pasca demam berlangsung, dan peningkatan tajam sel-sel T CD8⁺ dalam darah selama dan pasca fase demam berlangsung sebagai yang didemonstrasikan oleh uji flow sitometrik.

MATERI DAN METODA

Hewan percobaan, koleksi sampel dan persiapan PBMC.

Lima ekor sapi Bali diinfeksi dengan JDV_{Tab/87} dengan dosis 10³ titer virus/ml. Darah diambil sejak sebelum diinfeksi dan selama percobaan berlangsung, untuk pengambilan sel-sel darah

putih (PBMC) untuk deteksi mRNA sitokin. Darah diambil dari semua hewan selama 19 hari menggunakan tube berisi EDTA (Greiner Bio-One). Sampel darah disentrifuse untuk mendapatkan PBMC dan plasma, dan disimpan pada suhu -80°C sampai dilakukan ekstraksi RNA.

Primers

Primer Oligonukleotida untuk gen sitokin IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α and IFN- γ , dan *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) sebagai kontrol internal seperti sebelumnya dipublikasi (Konnai et al., 2003; Leutenegger et al., 2000). Semua sekuen primer (Table 1) sudah di konfirmasi dengan program BLASTIN (Zhang and Madden, 1997). Primer Oligonukleotida untuk kuantitasi JDV RNA digunakan sesuai publikasi sebelumnya (Stewart et al., 2005).

Ekstraksi RNA

Untuk analisa sitokin, total RNA (tRNA) diekstraksi dari PBMC

menggunakan kit RNeasy Plus dilengkapi *genomic DNA (gDNA) eliminator columns* (Qiagen), digunakan sesuai saran perusahaan. Untuk menghilangkan sisa gDNA, tRNA dinetralkan dengan 1 U of DNAase (Promega) per 1 μg tRNA direaksikan pada suhu 37°C selama 30 menit kemudian dilakukan inaktivasi enzyme ini dengan DNAase Stop solution pada suhu 65°C selama 10 menit. Konsentrasi dari tRNA kemudian diukur dengan spectrometer (Nano-drop 1000), sample akhirnya disimpan pada es sampai diuji pada hari yang sama, dan tidak di simpan beku agar tidak terjadi kerusakan RNA. Suatu prosedur normalisasi digunakan untuk mengoreksi kesalahan selama proses ekstraksi RNA, sebagai dilaporkan sebelumnya (Bustin, 2000, 2002; Bustin and Nolan, 2004). Selanjutnya 40 ng per reaksi tRNA yang telah diberikan perlakuan enzim digunakan sebagai *template* untuk uji RT-PCR.

Tabel .1.

Sekuen Primer oligonukleotida untuk real-time RT-PCR.

Gene	Sequences premer (5'-3') (forward & reverse)	Panjang	
		Primer(bp) ^a	Hasil (bp)
IL-1 α ^b	GATGCCTGAGACACCCAA	18	173
	GAAAGTCAGTGATCGAGGG	19	
IL-2 ^b	TTTT TAC GTC CCC AAG GTT AA	20	217
	CGT TTA CTG TTG CATCATCA	20	
IL-6 ^b	TCCAGAACGAGTATGAGG	18	236
	CATCCGAATAGCTCTCAG	18	
TNF- α ^c	TCTTCTAAGCCTCAAGTAACAAGT	N/A	103
	CCATGAGGGCATTGGCATAAC		

INF- γ^c	TGGATATCATCAAGCAAGACATGTT ACGTCATTCATCATCACTTTTCATGAGT TC	N/A	151
GAPDH ^c	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA CCCTCCACGATGCCAAAGT	N/A	120
JDV <i>pol^d</i>	GGGAGACCCCGTCAGATGTGGA TGGGAAGCATGGACAATCAG	N/A	121

^a bp: base pairs; ^b Konnai *et al* (2003).; ^c Leutenegger *et al.* (2000); ^d Stewart *et al.* (2005).

RNA virus diekstraksi dari plasma beku menggunakan kit *QIAamp Viral Mini* (Qiagen) sesuai prosedur dari perusahaan tersebut. Sebelum dilakukan ekstraksi, sample plasma dibersihkan dengan mensentrifusanya pada 8,000 x *g* selama 5 min). RNA virus kemudian diekstraksi dari 140 μ l plasma, diencerkan menjadi volume akhir 150 μ l dari buffer (AVE buffer; QIAGEN), dan disimpan pada suhu -80°C sampai diuji.

Sintesa cDNA dari RNA

Sejumlah 1 μ g sampel tRNA dirubah menjadi cDNA menggunakan SuperScript III RT (Invitrogen) diproses sesuai saran perusahaan. Pasangan primer seperti pada Tabel 1 digunakan untuk membuat cDNA dan hasil PCRnya disequencing untuk verifikasi spesifisitasnya menggunakan prosedur sequencing standard (Applied Biosystems 3730 DNA sequencer).

Cloning cDNA

DNA sampel yang tersisa setelah analisis sequennya dielektroforesis dalam gel agarosa 2,5% selama 2 jam pada 65 band V. DNA divisualisasikan dengan

pewarnaan dengan SYBR hijau (Promega) dan dipotong dari gel dan DNA diekstraksi menggunakan Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) mengikuti instruksi dari pabriknya. Produk PCR dimurnikan diklon ke pCR 2.1 menggunakan TA Cloning System (Invitrogen) seperti yang direkomendasikan oleh produsen. Setelah transformasi *E. coli*, koloni putih nya dikultur di YT media pH 7,2 yang mengandung 10 g ekstrak bacto-ragi dan 5 g NaCl dalam 1 L aquabides. Plasmid DNA kloning dimurnikan dari sel bakteri menggunakan Kit QIAamp DNA Mini (Qiagen) sesuai dengan instruksi pabrik. Plasmid disaring untuk menyisipkan sesuai dengan Eco RI pencernaan (Promega), sesuai dengan petunjuk pabrik.

Untuk analisis sequence lebih lanjut dan untuk membuat kurva standar, kloning plasmid DNA yang telah dimurnikan diamplifikasi dengan PCR. Secara singkat, 2 μ l dari plasmid DNA dicampur dengan 2,5 μ l 10X penyangga, 1,25 μ l dari 25 mM MgCl₂, 0,2 μ l 2,5 mM dNTP, 1 μ l dari 20 pM primer *forward* dan *reverse*, 0.125 μ l Taq polimerase (5.5 Unit / μ l) dan dibuat hingga total 25 μ l dengan penambahan air khusus

PCR. Pengujian PCR dilakukan menggunakan tahapan: denaturasi 3 menit pada 94°C, 35 siklus 94°C selama 30 detik, 52°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit, 72°C selama 10 menit, dan kemudian dihentikan pada suhu 14°C. Setelah visualisasi dari produk dalam gel agarosa seperti dijelaskan di atas, pita DNA diekstraksi dari gel dan konsentrasi DNA diekstraksi ditentukan secara spektrofotometri pada 260 nm, dan konsentrasi disesuaikan untuk 1 µg DNA/ml. DNA yang telah dimurnikan, kemudian disekuense kembali untuk menentukan identitas hasil PCR tersebut.

Pembuatan Kurve Standard untuk Analisis Kuantitatif.

Untuk mendeteksi jumlah ekspresi sitokin mRNA, kurva kalibrasi dibuat menggunakan fluoresensi diukur dari

pengenceran seri 10 kali lipat 10^{-2} (0.01 ng / ml) sampai 10^{-6} dari cDNA dengan konsentrasi 1 µg DNA / ml sebagai dijelaskan di atas, dan konsentrasi yang diperoleh ekstrapolasi dari kurva standar. Massa setiap plasmid (Tabel 2) dikonversi ke mol dan dikalikan dengan bilangan Avogadro, untuk memperkirakan jumlah salinan sitokin dalam setiap campuran reaksi. Jumlah sitokin salinan terdeteksi di setiap reaksi otomatis ditentukan dengan menggunakan paket perangkat lunak (SYBR-hijau, Corbett Research). Generasi kurva standar dan analisis regresi dilakukan dengan menggunakan program Rotor-Gene (Corbett Research). Kurve standard untuk kuantitasi RNA JDV dibuat sesuai dilaporkan sebelumnya (Stewart et al., 2005).

Tabel 2.

Berat molekul plasmid digunakan untuk mengestimasi jumlah sitokin.

Gene	Gene size (bp)	Vector size (bp)	Total size (bp)	RNA copy number ($\times 10^8/\mu\text{l}$)
IL-1	173	3015	3188	2.91
IL-2	217	3015	3232	2.87
IL-6	236	3015	3251	2.85
INF-gamma	151	3015	3166	2.93
TNF-alfa	103	3015	3118	2.97
GAPDH	120	3015	3136	2.96

Analisis sitokin yang diekspresikan dengan real-time PCR.

Uji RT-PCR dilakukan menggunakan Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) sesuai dengan instruksi pabrik. Reaksi SYBR Hijau RT-PCR dilakukan dengan 2 μ l RNA yang mengandung 40 ng DNAase-diperlakukan RNA sebagai template. 2 μ l sampel RNA ditambahkan ke dalam campuran reaksi 8 μ l terdiri dari 5 μ l dari campuran reaksi 2X SYBR Hijau RT-PCR (Bio-Rad), 1 μ l 300 nM primer masing-masing, 0,2 μ l iScript RT untuk satu langkah RT-PCR (Bio-Rad) dan 0,8 μ l air nuklease bebas (Bio-Rad). Campuran PCR dilakukan masing-masing 2 tetapi standar dilakukan dalam tiga ulangan.

Analisis Statistik

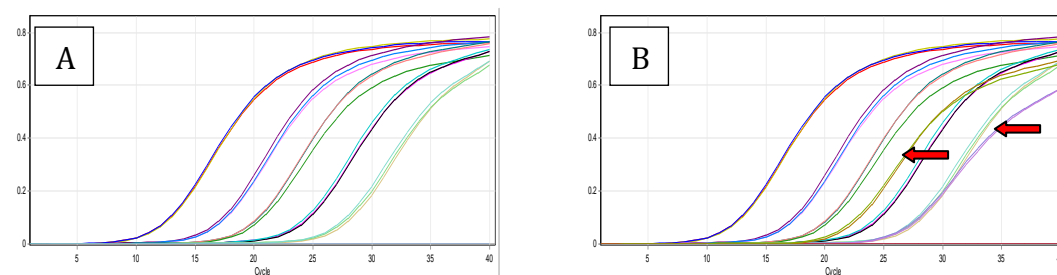
Analisis ANOVA satu arah (SPSS® 17,0) digunakan untuk

menilai perbedaan kelompok dalam ekspresi sitokin, dan perbedaan antara titik waktu selama infeksi penyakit Jembrana dianalisis dengan menggunakan beberapa perbandingan Bonferroni. Sebuah nilai $p \leq 0.05$ dianggap signifikan untuk semua analisis.

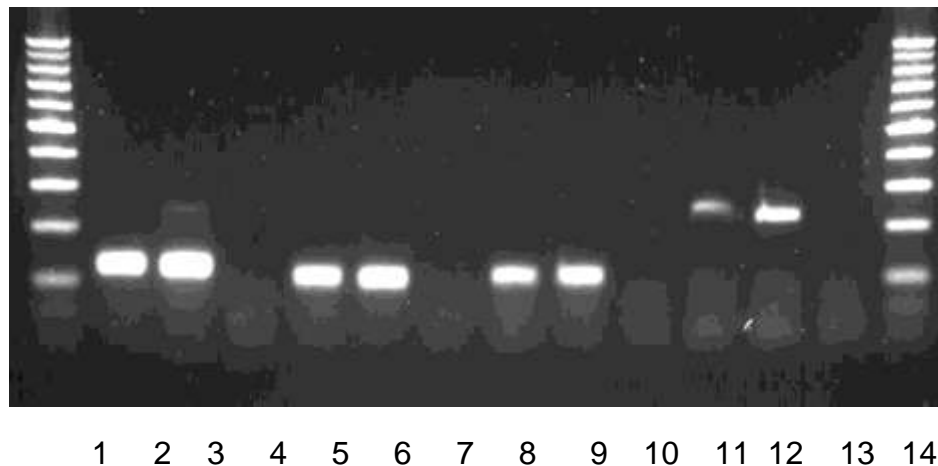
HASIL

Penyiapan RNA

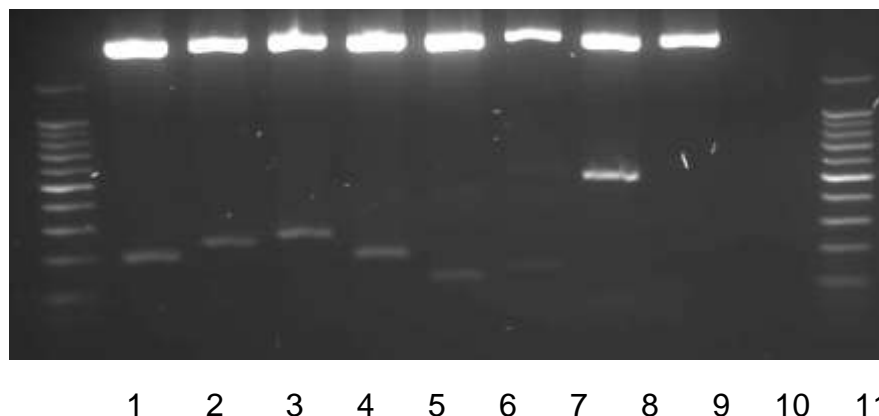
Dalam reaksi RT-PCR menggunakan total RNA (tRNA) yang diisolasi dari sel, akan mengandung kontaminan gDNA. Hal ini sangat mengganggu spesifisitas RT-PCR, oleh karena itu harus dieliminasi. Seperti pada gambar 1 dan 2, dengan penambahan 40 ng DNAase per reaksi, secara komplit dapat menghilangkan gDNA dari sampel tRNA.



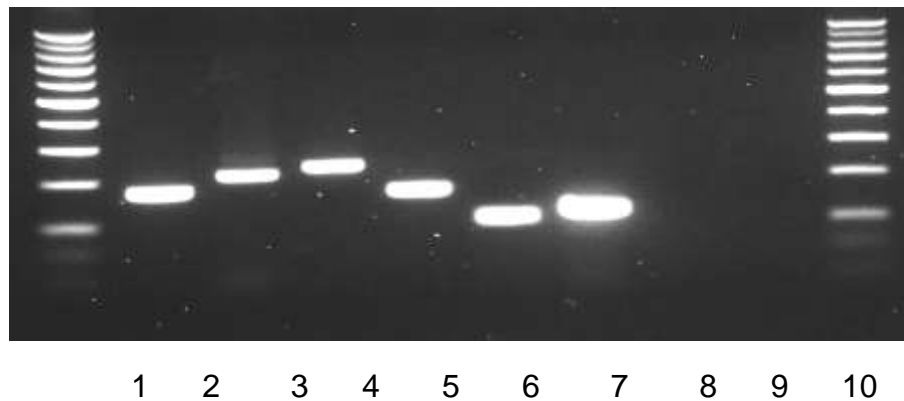
Gambar 1. Analisis reaksi Real-time RT-PCR dari gen TNF-alfa menunjukkan hilangnya kontaminan gDNA dari sampel tRNA. A. Contoh kurve standard dari gen TNF-alfa, menunjukkan konfigurasi lenier yang hampir sempurna. B. Sampel tRNA terkontaminasi gDNA(panah kiri) yang memberikan kuantitas DNA lebih tinggi, dan sampel tRNA tanpa gDNA menunjukkan hasil dengan kuantitas DNA yang lebih rendah namun murni (panah kanan). Tidak ada hasil RT-PCR terdeteksi apabila RT dihilangkan, menandakan gDNA sudah tereliminasi secara komplit. Profile dari gen-gen yang lain menunjukkan reaksi yang sama..



Gambar 2. *Agarose gel electrophoresis* dari hasil RT-PCR menunjukkan tereliminasi secara komplit kontaminan gDNA dari sampel RNA dan hasil PCR memakai 4 pasang primer yang berbeda. Kolum 1 and 14: 100 bp DNA marker (Promega); kolum 2, 5, 8, dan 11 berturut-turut adalah RNA tanpa gDNA dari gen GAPDH, TNF-alfa, INF-gamma and IL-2; Kolum 3, 6, 9 dan 12 berturut-turut adalah RNA terkontaminasi gDNA dari gen GAPDH, TNF-alfa, INF-gamma dan IL-2; Kolum 4,7,10 dan 13 berturut-turut adalah kontrol RT⁻ untuk gen GAPDH, TNF-alfa, INF-gamma dan IL-2. Hasil PCR gen GAPDH: ~120bp, TNF-alfa: ~103 bp, INFgamma: ~151 bp dan IL-2 ~217 bp. Jelas terlihat bahwa hasil PCR RNA tanpa gDNA (lebih tipis karena murni amplifikasi dari RNA) dibandingkan RNA terkontaminasi gDNA (lebih tebal).



Gambar 3. *Agarose gel electrophoresis* dari DNA plasmid konstruksi (bukan hasil PCR), yang dicerna dengan enzymeEcoR1, untuk membuktikan keberhasilan kloning. Kolum 1 dan 11: 100 bp DNA ladder (Promega); Kolum 2, IL-1 (173 bp), lane 3, IL-2 (217 bp), kolum 4, IL-6 (236 bp), kolum 5, IFN-gamma (151 bp); kolum 6, TNF-alfa (103 bp); kolum 7, GAPDH (120 bp); kolum 8, kontrol plasmid dilengkapi DNA insert dari pabrik (dari koloni warna putih); kolum 9, kontrol plasmid (dari koloni warna biru tanpa DNA insert; kolum 10, control air.



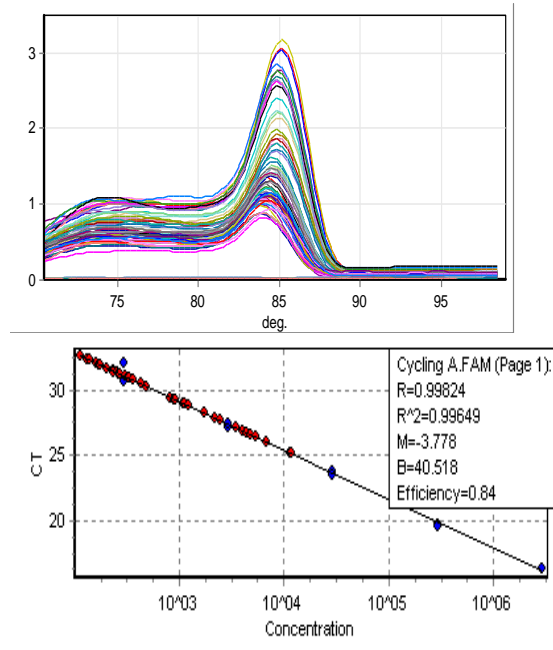
Gambar 4. *Agarose gel electrophoresis* hasil PCR seperti pada Gambar.3. Kolum 1 dan 10, 100 bp. DNA ladder (Promega); kolum 2, IL-1 (173 bp), kolum 3, IL-2 (217 bp), kolum 4, IL-6 (236 bp), kolum 5, IFN-gamma (151 bp); kolum 6, TNF-alfa (103 bp), kolum 7, GAPDH (120 bp), kolum 8, kontrol primer (IL-1 DNA) dan lane 9, control air. Catatan: Hasil DNA sesuai dengan DNA plasmid konstruksi seperti Gambar 3.

Konfirmasi Klon dan yang sukses.

Hasil DNA menggunakan primer sitokin (Table .1) dapat di klon secara sukses ke dalam pCR 2.1 (Gambar 3). Sisipan dari DNA yang terisolasi di amplifikasi dengan PCR untuk menghasilkan sampel DNA untuk selanjutnya di sequencing dan pembuatan kurve standard (Gambar .4). Hasil analisis sequencing dari hasil PCR terbukti menunjukan sifat-sifat identitasnya sebagai sitokin sapi (Gambar 5).

Gejala Klinis, RNA Virus Jembrana dan Respon Sitokin pada Sapi terinfeksi Virus Jembrana

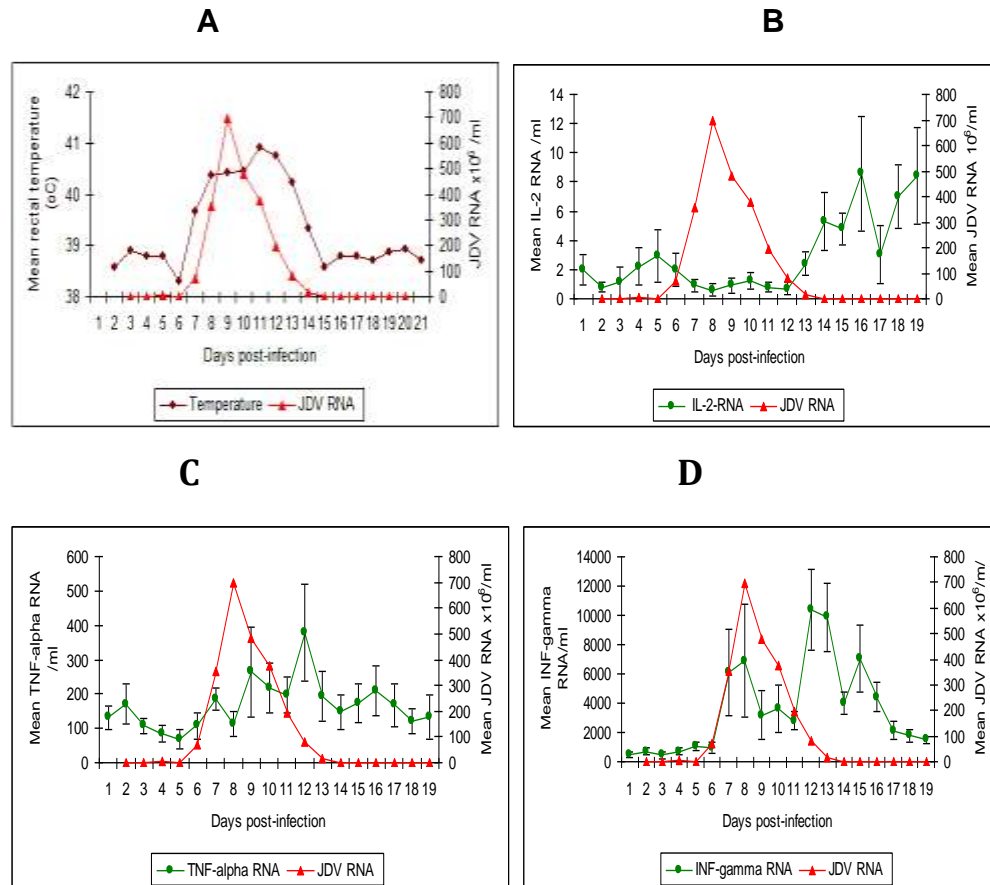
Uji RT-PCR digunakan untuk mengetahui ekspresi total RNA virus Jembrana dalam plasma darah dan ekspresi sitokin IL-2, TNF-alfa dan INF-gamma dalam PBMC. Sebuah kurve analisis *melting* dari uji RT-PCR untuk IFN-gamma dengan korelasi koefisien yang hampir sempurna (0.998) ditunjukan pada Gambar 5, dan hasil yang sama diperoleh dari semua sampel yang diuji dengan uji RT-PCR.



Gambar 5. Analisis kurve melting (kiri) dan korelasi koefisien (kanan) uji RT-PCR untuk ekspresi gene IFN-gamma dari seekor hewan (CB5), menunjukkan sebuah puncak murni sebagai pertanda reaksi PCR yang sangat spesifik, dan nilai R (regresi) serta nilai M (korelasi) mendekati nilai sempurna 4. Gambaran untuk semua uji RT-PCR terhadap semua sitokin dari semua hewan percobaan memberikan hasil profile yang sama.

Ekspresi total RNA virus Jembrana, mengalami peningkatan secara sangat signifikan selama periode demam yang berkisar selama 4 sampai 7 hari (Gambar 7A). Puncak tertinggi RNA virus Jembrana JDV RNA dalam plasma terdeteksi 9 hari pasca infeksi, kemudian terus menurun sampai dengan tingkat tidak terdeteksi setelah masa demam (Gambar 6A). Ekspresi titer RNA IL-2 mula-mula rendah sebelum dan selama demam, tetapi meningkat tajam secara signifikan ($p < 0.05$) setelah masa demam dan bertahan diatas rata-rata nilai normal sampai hari ke 21 pada saat hewan sudah di bunuh.

(Gambar 6B). Kadar ekspresi TNF-alfa tidak meningkat secara signifikan ($p = 0.284$) sebelum dan pada awal demam tetapi meningkat tajam pada akhir dan pasca demam (Gambar 6C). Ekspresi IFN-gamma mengalami model biphasic: meningkat diawal demam, kemudian menurun tetapi tetap diatas kadar normal dan meningkat tajam lagi secara signifikan ($p < 0.001$) pada akhir fase demam (Gambar 6D).



Gambar 6. Ekpresi RNA virus Jembrana dan sitokin selama infeksi virus Jembrana pada sapi Bali percobaan.

PEMBAHASAN

Metodelogi uji RT-PCR yang digunakan dalam penelitian ini sebelumnya sudah digunakan untuk mendeteksi ekspresi sitokin pada sapi secara *in vivo* (Konnai et al., 2003; Usui et al., 2007; Waldvogel et al., 2000; Zaros et al., 2007). Teknik ini sangat sensitif, sederhana dan memiliki banyak keunggulan dibandingkan dengan teknik lain untuk mendeteksi kuantitas sitokin (Blaschke et al., 2000). Sebelumnya dalam studi pendahuluan, terbukti bahwa INF-gamma protein dalam plasma dapat terdeteksi menggunakan Kit ELISA dan berkorelasi baik dengan INF-gamma yang dideteksi memakai uji RT-PCR, menandakan bahwa mRNA INF gamma mengalami translasi menjadi protein secara *in vivo*. Gen GAPDH dipilih sebagai kontrol umum *housekeeping gene* untuk memverifikasi kualitas RNA yang diekstraksi serta dipakai untuk menstandarkan sistim uji; hal ini sudah digunakan secara luas di dunia penelitian sebagai kontrol gen secara *endogenous* dalam mengkuantifikasi ekspresi sitokin (Dheda et al., 2004). Dalam penelitian ini alasan untuk mendeteksi sitokin pro-infeksi seperti IL-2, INF-gamm and TNF-alfa adalah untuk mengkonfirmasi apakah perubahan ekspresi sitokin tersebut ada hubungannya dengan perubahan patogenesis dan gejala klinis selama proses penyakit Jembrana. Peningkatan secara signifikan ekspresi sitokin IL-2 dan INF-gamma

berkorelasi positif terhadap peningkatan jumlah sel-sel T CD8 seperti yang dilaporkan oleh Tenaya et al., 2010, menandakan bahwa sitokin ini diyakini besar diproduksi oleh sel-sel T CD8⁺ dalam keadaan tidak adanya antibody yang spesifik melawan infeksi virus Jembrana sampai kesembuhan total, kejadian ini merupakan keadaan yang sangat krusial dalam penyembuhan mayoritas sapi yang terinfeksi virus Jembrana.

Peranan type sel-sel lainnya yang mungkin mengekspresikan sitokin yang sama adalah juga mungkin terjadi akan tetapi kecil kemungkinan dari sel-sel T CD4⁺ Th1 karena jumlah sel-sel T CD4⁺ ini sangat menurun tajam sampai kesembuhan (Tenaya, et al 2009). Alasan terhadap penurunan sel-sel T CD4⁺ selama masa demam pada infeksi virus Jembrana tidak diketahui secara pasti, tetapi dalam infeksi HIV-1, penambahan jumlah sel-sel ini bisa akibat dari pengaruh sirkulasi IL-2 (Stapleton et al., 2009). Akan tetapi, walaupun kuantitas IL-2 secara signifikan meningkat tajam setelah fase demam pada infeksi virus Jembrana, namun jumlah sel-sel CD4⁺ T-cell dalam darah tetap rendah.

Sitokin pro-infeksi seperti IL-2 and INF-gamma, terkenal memegang peran penting dalam patogenesis infeksi viral. IFN-gamma utamanya diproduksi oleh sel NK, sel T CD4⁺ Th1 dan sel T CD8⁺ *cytotoxic T-lymphocyte effector T-cells* seketika terjadi *antigen-specific immunity develops* (Schoenborn and Wilson, 2007). Gen IFN-gamma juga memegang peranan penting dalam proses kekebalan, meningkatkan daya makan makropag dan menstimuli produksi IgG (Schoenborn and Wilson, 2007). Kenaikan konsentrasi IFN-gamma selama fase demam, dan fungsinya sebagai anti-viral berkorelasi dengan turunnya jumlah virus pada fase pasca demam.

IL-2 dikenal sebagai factor pertumbuhan *autocrine*, diproduksi oleh semua sel T pada awal aktivasinya dan adalah sangat penting dalam memacu pertumbuhan sel-sel T-cell dan aktivasi makropag dan sel-sel T CD8⁺ sitotoksik, serta memaksimalkan daya bunuh sel-sel ini (Karasuyama et al., 1989; Roitt et al., 2001). Ketika kadar ekspresi IL-2 rendah selama fase demam, dimana jumlah virus dalam darah sangat tinggi, diikuti oleh rendahnya konsentrasi sel-sel T CD4⁺ CD8⁺ dalam plasma selama fase ini. Sebaliknya, naiknya ekspresi IL-2 pasca demam berbarengan dengan tingginya sel-sel T CD8⁺ (Tenaya, et al 2009) hal mana menandakan bahwa peran IL-2 sangat nyata dalam merangsang peningkatan jumlah sel-sel T CD8⁺ yang sangat berperan penting dalam proses kesembuhan dan kehidupan mayoritas sapi yang terinfeksi virus penyakit Jembrana.

Peran TNF-alfa dalam penyakit Jembrana adalah tidak jelas. TNF-alfa diduga bertanggung jawab untuk *cell-mediated immunity* atau *delayed-type hypersensitivity*, yang meliputi reaksi akut, merangsang kematian sel secara apoptosis dan penghambatan replikasi virus (Abbas et al., 1996). Dalam hewan yang terinfeksi virus penyakit Jembrana, TNF-alfa hanya meningkat sedikit selama fase demam dan segera setelah demam hal mana mungkin memicu munculnya gejala klinis dan sangat minimal dalam menurunkan titer virus.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

tulisan ini adalah laporan pertama kalinya tentang ekspresi sitokin expression pada kasus penyakit Jembrana. Hasil menunjukan peningkatan ekspresi IL-2 dan INF-gamma yang sejalan dengan peningkatan jumlah sel-sel T CD8⁺ dalam periode ini, kejadian ini mungkin berperan dalam membersihkan titer virus dan kesembuhan. Penelitian lebih lanjut untuk membuktikan peran sitokin yang lain sangat diperlukan untuk mengungkap perannya dalam fase akut penyakit Jembrana.

Saran

perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan peran interferon gamma untuk menetralisasi virus penyakit Jembrana secara in vivo.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Murphy, K. M. and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- Binder, D. and Kundig, T. M. (1991). Antiviral protection by CD8+ versus CD4+ T cells. CD8+ T cells correlating with cytotoxic activity in vitro are more efficient in antivaccinia virus protection than CD4-dependent IL. *J Immunol* 146, 4301-4307.
- Blaschke, V., Reich, K., Blaschke, S., Zipprich, S. and Neumann, C. (2000). Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology. *J Immunol Methods* 246, 79-90.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.
- Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29, 23-39.
- Bustin, S. A. and Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 15, 155-166.
- Copeland, K. F., McKay, P. J. and Rosenthal, K. L. (1995). Suppression of activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is not lentivirus specific. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11, 1321-1326.
- Corral, L. G., Haslett, P. A., Muller, G. W., Chen, R., Wong, L. M., Ocampo, C. J., Patterson, R. T., Stirling, D. I. and Kaplan, G. (1999). Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* 163, 380-386.
- Desport, M., Ditcham, W. G., Lewis, J. R., McNab, T. J., Stewart, M. E., Hartaningsih, N. and Wilcox, G. E. (2009). Analysis of Jembrana disease virus replication dynamics in vivo reveals strain variation and atypical responses to infection. *Virology* 386, 310-316.
- Dharma, D. M., Ladds, P. W., Wilcox, G. E. and Campbell, R. S. (1994). Immunopathology of experimental Jembrana disease in Bali cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 44, 31-44.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G. and Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37, 112-114, 116, 118-119.
- Hartaningsih, N., Wilcox, G. E., Kertayadnya, G. and Astawa, M. (1994). Antibody response to Jembrana disease virus in Bali cattle. *Vet Microbiol* 39, 15-23.
- Jin, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C. E., Safrit, J. T., Mittler, J. and other authors (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 189, 991-998.

- , K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-37.
- Karasuyama, H., Tohyama, N. and Tada, T. (1989). Autocrine growth and tumorigenicity of interleukin 2-dependent helper T cells transfected with IL-2 gene. *J Exp Med* 169, 13-25.
- Kristensen, N. N., Madsen, A. N., Thomsen, A. R. and Christensen, J. P. (2004). Cytokine production by virus-specific CD8(+) T cells varies with activation state and localization, but not with TCR avidity. *J Gen Virol* 85, 1703-1712.
- Leutenegger, C. M., Alluwaimi, A. M., Smith, W. L., Perani, L. and Cullor, J. S. (2000). Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 77, 275-287.
- Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Lukacher, A. E., Braciale, V. L. and Braciale, T. J. (1984). In vivo effector function of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte clones is highly specific. *J Exp Med* 160, 814-826.
- Marker, O., Scheynius, A., Christensen, J. P. and Thomsen, A. R. (1995). Virus-activated T cells regulate expression of adhesion molecules on endothelial cells in sites of infection. *J Neuroimmunol* 62, 35-42.
- Matano, T., Shibata, R., Siemon, C., Connors, M., Lane, H. C. and Martin, M. A. (1998). Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol* 72, 164-169.
- Miguelles, S. A., Laborico, A. C., Shupert, W. L., Sabbaghian, M. S., Rabin, R., Hallahan, C. W., Van Baarle, D., Kostense, S., Miedema, F. and other authors (2002). HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 3, 1061-1068.
- Moreland, L. W., Baumgartner, S. W., Schiff, M. H., Tindall, E. A., Fleischmann, R. M., Weaver, A. L., Ettlinger, R. E., Cohen, S., Koopman, W. J. and other authors (1997). Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 337, 141-147.
- Mosmann, T. R. and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17, 138-146.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mossmann, S. P., Bex, F., Berglund, P., Arthos, J., O'Neil, S. P., Riley, D., Maul, D. H., Bruck, C., Momin, P. and other authors (1996). Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki Forest virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine. *J Virol* 70, 1953-1960.

- Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chretien, I., Abrams, J., de Vries, J. and Spits, H. (1988). Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol* 141, 849-855.
- Pantaleo, G., Soudeyns, H., Demarest, J. F., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Paolucci, S., Daucher, M., Cohen, O. J., Denis, F. and other authors (1997a). Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8+ T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9848-9853.
- Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. (2001b). Cell-Mediated Cytotoxicity. In *Immunology*, 6 edn, pp. 163-172. Mosby: Elsevier Limited.
- Rosenzweig, S. D. and Holland, S. M. (2005). Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev* 203, 38-47.
- Schoenborn, J. R. and Wilson, C. B. (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96, 41-101.
- Stapleton, J. T., Chaloner, K., Zhang, J., Klinzman, D., Souza, I. E., Xiang, J., Landay, A., Fahey, J., Pollard, R. and other authors (2009). GBV-C viremia is associated with reduced CD4 expansion in HIV-infected people receiving HAART and interleukin-2 therapy. *Aids* 23, 605-610.
- Stewart, M., Desport, M., Hartaningsih, N. and Wilcox, G. (2005). TaqMan real-time reverse transcription-PCR and JDVp26 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay to quantify Jembrana disease virus load during the acute phase of in vivo infection. *J Clin Microbiol* 43, 5574-5580.
- Tenaya, I.W.M, Kathy Hell, Philip A. Stumbles and Graham Wilcox (2009). Flow cytometri analysis of lymphocyte subset kinetic in Bali cattle experimentally infected with Jembrana disease virus. *Vet. Imm. And Immunopathol. J.* 149, 167-176.
- Zagury, D., Lachgar, A., Chams, V., Fall, L. S., Bernard, J., Zagury, J. F., Bizzini, B., Gringeri, A., Santagostino, E. and other authors (1998). C-C chemokines, pivotal in protection against HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3857-3861.