

Analisis Infektivitas *Simian-Human Immunodeficiency Virus* pada *Peripheral Blood Mononuclear Cell Macaca fascicularis* dan *M. nemestrina* Secara *In Vitro*

(*IN VITRO INFECTIVITY ANALYSIS OF SIMIAN-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL MACACA FASCICULARIS AND M. NEMESTRINA*)

**Gede Eko Darmono^{1*}, Silvia Triwidyaningtyas², Budiman Bela^{2,3},
Diah Iskandriati^{1,4}, Dondin Sajuthi^{1,4,5}, Joko Pamungkas^{1,4,6**}**

¹Program Studi Primatologi
Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
Jl. Lodaya II No. 5, Babakan, Kecamatan Bogor Tengah
Kota Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16151

²Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi, ³Departemen Mikrobiologi,
Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia
Jl. Salemba Raya No. 6, Kenari, Kecamatan Senen
Kota Jakarta Pusat, DKI Jakarta, Indonesia 10430

⁴Pusat Studi Satwa Primata
Jl. Lodaya II No. 5, Babakan, Kecamatan Bogor Tengah
Kota Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16151

⁵Departemen Reproduksi Klinik Veteriner dan Patologi,

⁶Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

*Email: g.e.darmono@gmail.com, **Email: jpi-pssp@indo.net.id

ABSTRACT

Development of *human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) vaccines and anti-retroviral treatment is currently hindered by the lack of models representing prominent symptoms of HIV-1 infections seen in humans. *Simian-human immunodeficiency virus* (SHIV) was constructed to resolve the limitations of SIV_{mac} model and has been used in nonhuman primate model of viral infections, particularly infections by the close relatives of HIV-1. *Macaca fascicularis* and *M. nemestrina* are being developed as model HIV/AIDS, by using chimeric virus SHIV produced by replacing the nucleotide structure of cyclophilin A binding region, vif gene and nef of HIV-1 with cyclophilin A binding region, vif gene and nef from SIV. The research aims to study the model of HIV/AIDS on nonhuman primates PBMC in vitro using SHIV. In particular, the study aims to obtain information about the capability of SHIV replication in PBMC of *M. fascicularis* and *M. nemestrina*. Results showed a cytopathic effect (CPE) in the form of multinucleated giant cells and expression of p24 protein in PHA-stimulated PBMC cultures of *M. fascicularis* and *M. nemestrina* after SHIV infection. The conclusion of this study is that SHIV can infect PBMC *M. fascicularis* and *M. nemestrina* in vitro based on CPE and expression of p24 protein.

Keywords: HIV/AIDS; *M. fascicularis*; *M. nemestrina*; SHIV

ABSTRAK

Keterbatasan utama dalam upaya pengembangan vaksin dan pengobatan *anti-retroviral* terhadap infeksi *human immunodeficiency virus type-1* (HIV-1) antara lain adalah ketiadaan model hewan yang dapat menunjukkan semua gejala menonjol infeksi HIV-1 seperti pada manusia. *Simian-human immunodeficiency virus* (SHIV) dikonstruksi untuk mengatasi keterbatasan model SIV_{mac} dan telah dimanfaatkan pada banyak penelitian menggunakan satwa primata untuk mempelajari virus yang

memiliki kedekatan dengan HIV-1 pada manusia. Satwa primata *Macaca fascicularis* dan *M. nemestrina* digunakan sebagai hewan coba penelitian HIV/AIDS dengan memanfaatkan virus kimera SHIV yang dihasilkan melalui penggantian susunan nukleotida bagian *cyclophilin A binding region*, gen *vif* dan gen *nef* HIV-1 dengan bagian *cyclophilin A binding region*, gen *vif* dan gen *nef* dari SIV. Penelitian bertujuan untuk mengkaji model HIV/AIDS pada PBMC satwa primata secara *in vitro* menggunakan SHIV. Secara khusus, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi mengenai kemampuan atau daya replikasi dan kinetika SHIV pada kultur sel PBMC asal *M. fascicularis* dan *M. nemestrina* secara *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan gambaran *cytopathic effect* (CPE) berupa *multinucleated giant cell* dan ekspresi protein p24 pada kultur PHA-stimulated PBMC *M. fascicularis* dan *M. nemestrina* setelah infeksi SHIV. Kesimpulan penelitian ini SHIV dapat menginfeksi PBMC *M. fascicularis* dan *M. nemestrina* secara *in vitro* berdasarkan gambaran CPE dan ekspresi protein p24.

Kata-kata kunci: HIV/AIDS; *M. Fascicularis*; *M. Nemestrina*; SHIV

PENDAHULUAN

Peningkatan jumlah orang dengan *Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immuno-deficiency Syndrome* (HIV/AIDS) setiap tahunnya memberikan tantangan tersendiri dalam pengobatan dan pencegahan HIV/AIDS. Pengembangan vaksin HIV/AIDS menjadi salah satu alternatif pencegahan HIV/AIDS. Penelitian pengembangan vaksin HIV/AIDS menunjukkan belum ada vaksin HIV yang benar-benar efektif dan aman. Beberapa vaksin HIV tidak dapat mencegah dan mengontrol infeksi HIV (Corey *et al.*, 2011). Keterbatasan utama dalam pengobatan dan pengembangan vaksin HIV-1 antara lain kurangnya model hewan yang dapat menunjukkan semua gejala yang menonjol dari infeksi HIV-1 seperti pada manusia. Sementara model tantang *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) dosis rendah yang diulang dalam pengembangan vaksin berbasis sel T menunjukkan kegagalan mengendalikan infeksi HIV (Koff, 2012). Perbedaan yang mendasar antara SIV dan HIV-1 membatasi penggunaan model SIV dalam penelitian tertentu, misal uji tantang vaksin HIV dan pengujian obat antiretroviral yang dirancang menghambat enzim protease, *reverse transcriptase* dan integrase HIV-1 (Hatziioannou dan Evans, 2012).

Simian-Human Immunodeficiency Virus (SHIV) dikonstruksi untuk mengatasi keterbatasan model SIV_{mac} dan telah digunakan dalam banyak penelitian menggunakan satwa primata untuk mempelajari virus yang memiliki kedekatan dengan HIV-1 pada manusia. Penelitian mengenai konstruksi SHIV diharapkan dapat menghasilkan strain yang tidak hanya secara maksimal meniru penularan HIV-1, tetapi dapat diinfeksi secara *in vivo* pada satwa primata (Tang dan Chan, 2018).

Simian Immunodeficiency Virus (SIV) pertama berasal dari SIV_{mac} yang mengandung gen *transactivation (tat)*, gen *regulatory of virus (rev)*, gen *viral protein u (vpu)* dan gen *envelope (env)* HIV-1 (Ambrose *et al.*, 2007). Secara umum, SHIV memiliki bagian gen *env* HIV-1 dan bagian *backbone* SIV_{mac}. Meskipun penggunaan SHIV yang beragam dan penting dalam penelitian HIV/AIDS, mayoritas SHIV yang dikembangkan memiliki kekurangan yang signifikan sebagai model untuk infeksi HIV-1 pada manusia. Keterbatasan ini sering dikaitkan dengan sifat gen *env*, yang di sebagian besar SHIV tidak menggambarkan HIV-1 (Li *et al.*, 2016).

Simian Immunodeficiency Virus (SIV) yang dikonstruksi Bela dan Triwidyaningtyas (2017) dari Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi (PRVKP) FKUI-RSCM merupakan kimera SIV yang mengandung susunan nukleotida HIV-1 NL4-3 dengan bagian *cyclophilin A binding region*, gen *viral infectivity factor (vif)* dan gen *negative factor (nef)* berasal dari SIV. Penggantian beberapa asam amino HIV-1 dengan asam amino SIV yang sesuai dan berperan dalam interaksi dengan protein inang diharapkan SHIV dapat menginfeksi dan bereplikasi pada satwa primata. Konstruksi SHIV dilakukan tanpa mengganti gen *env* HIV-1, karena gen *env* HIV-1 merupakan target beberapa obat dan vaksin HIV pada manusia. Tidak adanya gen HIV-1 dalam SHIV menghambat pengujian vaksin terhadap epitop yang hanya ditemukan pada HIV-1 (Thippeshappa *et al.*, 2011).

Penggantian asam amino pada bagian *cyclophilin A binding region* HIV-1 dengan asam amino bagian *cyclophilin A binding region* SIV, berkaitan dengan peran *cyclophilin A binding region* sebagai penentu ikatan poliprotein *gag* dan *cyclophilin A* (CypA). *Cyclophilin A binding*

region berfungsi sebagai situs pengikatan untuk *cyclosporin* dan gen *gag* HIV-1. Poliprotein *gag* HIV-1 mengikat sebagian besar anggota famili *cyclophilin* dari *peptidyl-prolyl isomerase*, dalam hal ini CypA menjadi fokus penyidikan, karena terdeteksi pada virion HIV-1. Pengikatan CypA dengan kapsid HIV-1 merupakan langkah awal dalam siklus replikasi HIV-1 pada sel tertentu, antara lain sel T CD4. Ikatan antara *gag* dengan CypA menentukan keberhasilan proses *uncoating* virus pada awal infeksi HIV dan proses transkripsi balik (*reverse transcription*) (Kamada *et al.*, 2006). Penelitian menunjukkan CypA mengatur stabilitas kapsid HIV-1 dan gangguan pada interaksi CypA dan kapsid menghasilkan *uncoating* dini (De Iaco dan Luban, 2014).

Penggantian asam amino pada gen *vif* HIV-1 dengan asam amino gen *vif* SIV diharapkan dapat meningkatkan kemampuan SHIV untuk menginfeksi satwa primata. Secara alami, sel manusia mengekspresikan protein virus alami, yaitu APOBEC3G (A3G), anggota famili APOBEC3 dari tujuh *cytidine deaminase* (A3A-A3H) yang berpotensi membatasi replikasi HIV-1. Protein A3G merupakan senyawa yang berperan sebagai anti HIV-1 melalui induksi hipermutasi genom HIV-1. Hipermutasi menyebabkan tidak dihasilkan virus infeksi pada akhir fase replikasi virus (Thippeshappa *et al.*, 2011). Kemampuan protein *vif* untuk memblokir aktivitas antivirus APOBEC3G bersifat *specific-species*. Protein *vif* HIV-1, SIV_{agm} dan SIV_{mac} dapat menghambat APOBEC3G pada spesies yang sama, tetapi tidak menghambat spesies lain. Protein *vif* HIV-1 gagal menetralkan aktivitas antivirus APOBEC3G dari *African green monkey* atau *rhesus macaque*. Protein *vif* SIV_{agm} tidak dapat menetralkan APOBEC3G manusia dan kera. Akan tetapi, protein *vif* SIV_{mac} dapat menghambat APOBEC3G manusia dan *African green monkey* serta menghambat APOBEC3G yang tidak homogen (Schrofelbauer *et al.*, 2004).

Penggantian asam amino pada gen *nef* HIV-1 dengan asam amino gen *nef* SIV diharapkan dapat meningkatkan kemampuan SHIV menginduksi AIDS pada satwa primata. Gen *nef* merupakan protein non-struktural pada HIV-1 yang penting dalam patogenesis AIDS secara *in vivo*. Protein *nef* HIV-1 atau SIV diperlukan dalam replikasi virus yang tinggi dan perkembangan AIDS yang cepat pada manusia dan monyet. Peningkatan infektivitas dan replikasi HIV-1 bergantung pada gen *nef*, serta

aktivasi sel T CD4 secara *in vivo* (Bouchet *et al.*, 2011). Protein *nef* SIV merupakan antagonis terhadap tetherin dan bersifat spesies-spesifik. Tetherin merupakan protein inhibitor dalam sel manusia yang menghambat pelepasan partikel HIV-1 baru dari sel yang terinfeksi (Zhang *et al.*, 2009). *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) yang diinokulasi pada monyet dan membawa gen *nef* SIV menunjukkan peningkatan *viral load* yang signifikan dibandingkan SHIV yang mengandung gen *nef* HIV-1. Monyet yang diinokulasi dengan SHIV yang mengandung gen *nef* SIV menunjukkan kehilangan langsung limfosit CD4 dalam darah perifer dan kelenjar getah bening/limfonodus inguinalis (Shibata *et al.*, 1997).

Satwa primata menjadi salah satu kelompok hewan besar yang dipergunakan untuk mempelajari infeksi HIV-1 secara *in vivo*. Penelitian dengan satwa primata difokuskan pada penggunaan SIV atau rekombinan SHIV (Hatzioannou dan Evans, 2012). Infeksi strain SIV tertentu pada monyet asia sangat mirip dengan infeksi HIV-1 pada manusia dan penggunaan SHIV rekombinan menjadikan monyet asia paling umum digunakan sebagai model untuk HIV/AIDS. Tiga spesies secara rutin digunakan sebagai hewan model untuk AIDS, yaitu monyet rhesus (*Macaca mulatta*), beruk (*M. nemestrina*) dan monyet ekor panjang/MEP (*M. fascicularis*). Monyet rhesus merupakan model satwa primata yang paling banyak digunakan untuk penelitian HIV/AIDS, karena kesamaan fisiologis, anatomis dan imunologis dengan manusia (Veazey dan Lackner, 2017). Namun, patogenesis dari strain SIV dan SHIV yang umum diadaptasi untuk replikasi pada monyet rhesus asal India berbeda dengan yang berasal dari Cina dan Burma. Beruk juga merupakan model satwa primata yang paling umum digunakan untuk AIDS. Meskipun *viral load* dan laju penurunan sel T CD4+ tidak berbeda secara substansial dengan monyet rhesus, namun perkembangan AIDS pada beruk lebih cepat. Sementara itu, MEP belum digunakan secara luas dalam penelitian AIDS karena alasan historis yang berkaitan dengan isolasi SIV dan karakterisasi imunogenetik yang kurang luas dari spesies ini (Hatzioannou dan Evans, 2012).

Berdasarkan uraian tersebut, pengembangan satwa primata MEP dan beruk sebagai model HIV/AIDS berbasis SHIV yang mengalami perubahan susunan nukleotida pada bagian *cyclophilin A binding region*, gen *vif* dan gen

nef yang berasal dari SIV. Perubahan susunan nukleotida diharapkan dapat menghasilkan SHIV yang dapat menginfeksi dan bereplikasi pada *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) MEP dan beruk secara *in vitro*. Keberhasilan pengembangan MEP dan beruk sebagai model HIV/AIDS berbasis SHIV diharapkan dapat meningkatkan penelitian-penelitian yang berkaitan dengan pengembangan vaksin dan obat antiretroviral HIV-1 berbasis *gen env*.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi dan Laboratorium Bioteknologi, Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) LPPM IPB, Bogor, pada bulan Juli sampai bulan September 2019.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *biosafety cabinet* (Nuare), penangas air, rak tabung, *vortex*, sentrifus, hemositometer, mikroskop cahaya, mikroskop fluoresen atau mikroskop konfokal, *hand tally counter*, mikropipet (Gilson Biorad, *Thermoscientific*) dan komputer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas supernatan kultur sel transfektan mengandung SHIV, *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) dari darah MEP dan beruk, medium *ficoll-paque* (Histopaque), *phosphate buffer saline* (PBS), *phytohemagglutinin* (PHA), medium RPMI 1640, etanol, antibodi terhadap protein p24, konjugat *anti-rabbit IgG* serum kelinci, tabung *vacutainer* EDTA, *microtube* 1,5 mL, tabung sentrifus 15 mL, tabung *cryvial*, *cell culture plate 24 well*, pipet ukur 1 mL, 5 mL dan 10 mL dan pipet pasteur 3 mL, gelas objek imunofluoresen, gelas objek dan kaca penutup.

Prosedur Penelitian

Simian-Human Immunodeficiency Virus (SHIV). *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) yang dipergunakan dalam penelitian ini merupakan hasil konstruksi Bela dan Triwidyningtyas (2017) dari Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi (PRV KP), Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia dalam bentuk supernatan kultur sel transfektan yang mengandung SHIV dan penggunaannya diatur dalam *material transfer agreement* (MTA). Penggunaan SHIV telah mendapatkan persetujuan Komisi Biorisiko PSSP LPPM-IPB University Nomor: 006-PL-PSSP-03-2019.

Pengambilan Darah *M. fascicularis* dan *M. Nemestrina*. Sampel darah diambil dari MEP dan beruk dewasa, umur 4-6 tahun, jenis kelamin jantan masing-masing tiga ekor pada vena femoralis dengan volume darah masing-masing sebanyak 10 mL dan 15 mL per ekor. Monyet ekor panjang dan beruk dibius dengan menggunakan ketamine. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung vakum dengan antikoagulan *ethylene diamine tetra aceti acid* (EDTA). Penggunaan beruk dan MEP telah mendapatkan persetujuan Komisi Pengawasan Kesejahteraan dan Penggunaan Hewan Penelitian, Pengujian, Penangkaran dan Pendidikan (KPKPHP4) PSSP LPPM-IPB University Nomor ACUC No. IPB PRC-19-A003.

Isolasi *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC). Isolasi PBMC diawali dengan *whole blood* disentrifus dengan kecepatan 1.500 RPM selama 15 menit. *Buffy coat* diambil dan diencerkan dengan PBS (1:1). Medium *ficoll paque* dimasukkan kedalam tabung sentrifus 15 mL sesuai dengan jumlah campuran *buffy coat* dan PBS. *Buffy coat* dimasukkan ke dalam tabung berisi medium *ficoll paque* secara pelan-pelan dengan teknik *over layer* melalui dinding tabung. Tabung disentrifus dengan kecepatan 2.750 RPM selama 30 menit. Supernatan dibuang dan diambil *layer* kemudian dipindahkan pada tabung lain serta ditambahkan PBS sebanyak 5 mL. Tabung disentrifus kembali dengan kecepatan 2.000 RPM selama 15 menit. Supernatan dibuang dan ke dalam tabung dimasukkan kembali PBS sebanyak 5 mL. Tabung disentrifus kembali dengan kecepatan 2.000 RPM selama 15 menit. Senyawa PBMC diambil dan dimasukkan dalam tabung *cryovial* serta disimpan dalam nitrogen cair.

Aktivasi *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC). Aktivasi PBMC dilakukan dengan penambahan PHA 5 mg. *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) sebanyak 1 mL dimasukkan dalam sumuran/*well* yang mengandung media stimulasi dasar. *Phytohemagglutinin* (PHA) sebanyak 0,5 µg/mL dimasukkan ke dalam *well* dan diinkubasi selama 72 jam.

Perhitungan *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC). Jumlah PBMC dihitung dengan menggunakan hemositometer. Pelet PBMC ditambah dengan 10 mL PBS dan dihomogenkan. Larutan diambil sebanyak 10 iL dan ditambahkan 90 iL asam asetat 3%. Larutan diambil sebanyak 10 iL dan diletakkan pada hemositometer. Pengamatan jumlah PBMC

dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali. Jumlah PBMC dihitung dengan rumus, Jumlah sel = [(Jumlah sel dalam 4 lapang pandang) x (4⁻¹)] x volume hemositometer x faktor pelarutan

Infeksi SHIV pada PHA-stimulated PBMC. PHA-stimulated PBMC beruk dan MEP sebanyak 500.000 sel/mL dimasukkan kedalam well. PHA-stimulated PBMC diinfeksi dengan supernatan kultur sel transfektan yang mengandung SHIV dengan perbandingan 1:10. PHA-stimulated PBMC yang diinfeksi dengan supernatan yang mengandung HIV sebagai pembanding dan kontrol negatif berupa PHA-stimulated PBMC tanpa perlakuan apapun. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂.

Pemeliharaan dan Koleksi Supernatan Kultur PHA-stimulated PBMC. Pemeliharaan kultur sel PHA-stimulated PBMC beruk dan MEP yang diinfeksi dengan supernatan dari kultur sel transfektan yang mengandung SHIV dilakukan setiap satu minggu sekali, yaitu hari ke-7 dan ke-14. Pemeliharaan dilakukan dengan penambahan media atau *re-feeding* PHA-stimulated PBMC sebanyak 500.000 sel. Supernatan dikoleksi setiap hari dan disimpan di dalam freezer dengan suhu -80°C.

Pengamatan cytopathic effect (CPE). Pengamatan *cytopathic effect* (CPE) dilakukan setiap hari dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 160x. Interpretasi pengamatan CPE dilakukan dengan memberikan nilai ada atau tidaknya CPE pada kultur PHA stimulated PBMC beruk dan MEP.

Pemeriksaan Imunofluoresen. Pelet PHA-stimulated PBMC beruk dan MEP diresuspensi dengan 100 µL PBS, kemudian diambil 25 µL dan diletakkan di gelas objek. Gelas objek kemudian didiamkan hingga kering dan difiksasi dengan aseton selama dua menit dan dicuci dengan PBS. Pelet kemudian ditetesi dengan 10 µL antibodi terhadap protein p24 dan inkubasi selama 60 menit. Gelas objek kemudian dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Pelet kemudian ditetesi masing-masing dengan 10 µL konjugat anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich) dan inkubasi selama 60 menit. Gelas objek kemudian dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Pelet kemudian ditetesi dengan *evans blue* secukupnya dan inkubasi selama dua menit. Gelas objek kemudian dicuci dengan akuades sebanyak tiga kali masing-

masing selama lima menit. Gelas objek kemudian diamati dengan mikroskop fluoresen. Interpretasi jumlah sel yang terwarnai dilakukan dengan memberikan nilai berdasarkan interpretasi yang dimodifikasi dari DeRycke *et al.* (2009) sebagai berikut: (-) tidak ada pewarnaan, (+) <10% sel terwarnai, (++) 10%-50% sel terwarnai, dan (+++) >50% sel terwarnai.

Analisis Data

Data hasil penelitian berupa pengamatan CPE pada kultur PHA-stimulated PBMC beruk dan MEP dianalisis secara kualitatif deskriptif. Sementara itu, hasil pengamatan ekspresi protein p24 pada kultur PHA-stimulated PBMC beruk dan MEP dianalisis secara semi kuantitatif berdasarkan nilai yang diperoleh dari hasil rerata pengamatan semua lapang pandang.

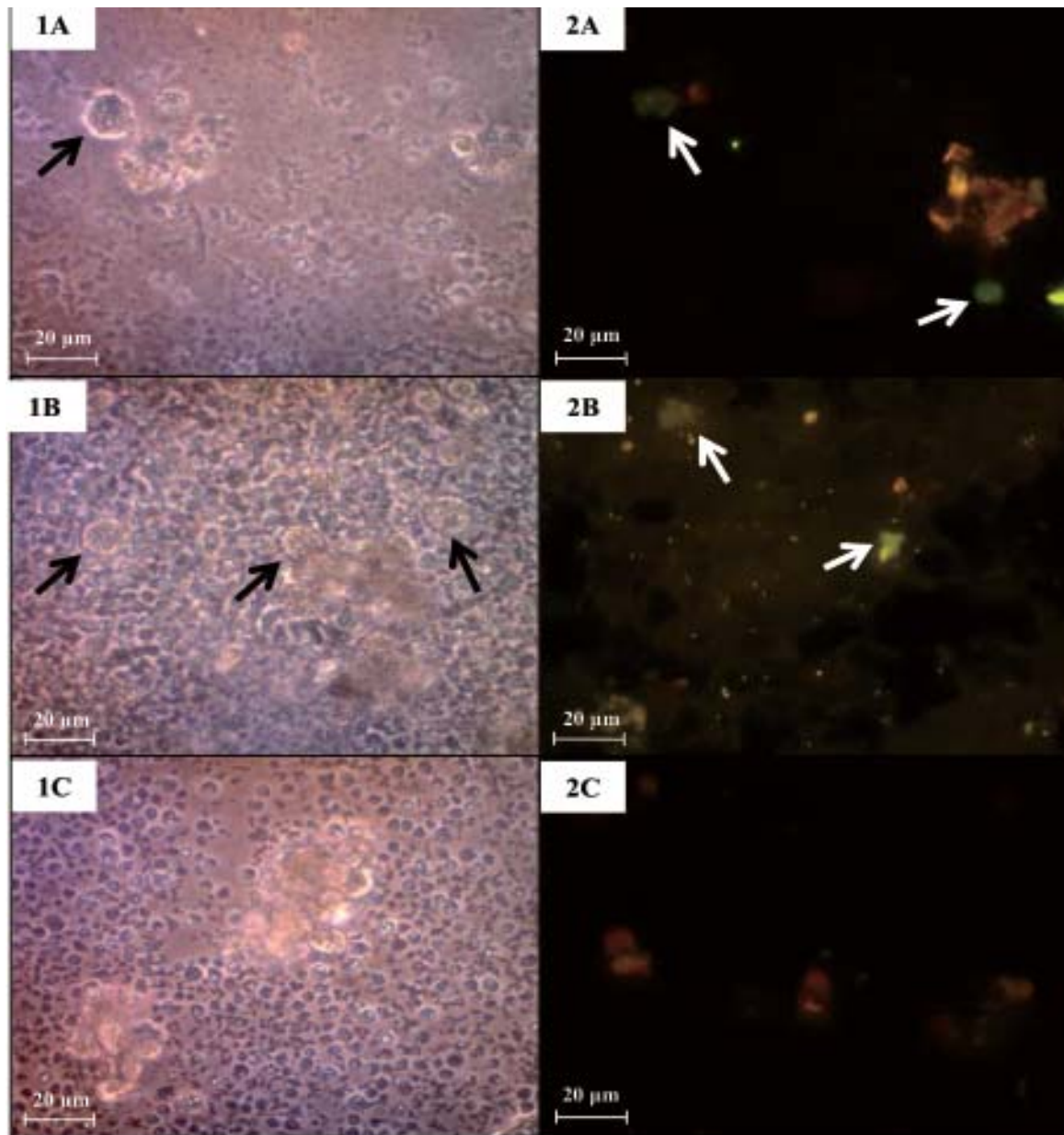
HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran utama dari *Acquired Immuno-deficiency Syndrome* (AIDS) adalah penipisan limfosit T, yang sebagian disebabkan oleh *cytopathic effect* (CPE) atau efek sitopatik langsung dari virus. *Cytopathic effect* (CPE) merupakan istilah yang sering diterapkan pada perubahan seluler yang diinduksi virus yang terlihat pada pengamatan menggunakan mikroskop cahaya. *Cytopathic effect* (CPE) terlihat ketika sel-sel memburuk akibat infeksi virus. Perubahan ini termasuk pembesaran atau penyusutan ukuran sel, pembentukan sel raksasa berinti banyak (*syncytia*) dan produksi inklusi (pewarnaan tertentu) dalam nukleus atau sitoplasma sel yang terinfeksi. CPE antara lain dapat berupa: pembulatan (*rounding*), penempelan (*plaques*), penggumpalan (*clumping*), sel raksasa (*ballooning* atau *giant cell*), fusi (*syncytium formation*) dan badan inklusi (Dilnessa dan Zeleke, 2017). Infeksi HIV secara *in vitro* menyebabkan pembentukan dua jenis CPE, yaitu *syncytia* dan lisis sel tunggal (Costin, 2007). *Syncytia* juga ditemukan pada sel-sel monyet yang diinfeksi SHIV (Etemad-Moghadam *et al.*, 2001).

Pengamatan CPE pada kultur PHA-stimulated PBMC-SHIV beruk dan MEP ditemukan gambaran CPE berupa *multinucleated giant cells* (MGCs) sebagaimana Gambar 1 dan Gambar 2. *Multinucleated giant cells* (MGCs) merupakan fusi berbagai sel seperti makrofag, sel epitel, monosit dan lainnya serta berinti banyak dan berukuran besar (Gupta *et al.*,

2014). Pembentukan MGCs pada kultur PHA-stimulated PBMC-SHIV beruk dan MEP menunjukkan bahwa SHIV dapat menginfeksi PBMC beruk dan MEP secara *in vitro*. *Multinucleated giant cells* (MGCs) juga ditemukan pada sel manusia yang terinfeksi HIV. Pembentukan MGCs diawali dengan kontak antara limfosit T yang terinfeksi dengan makrofag atau virus dengan makrofag atau

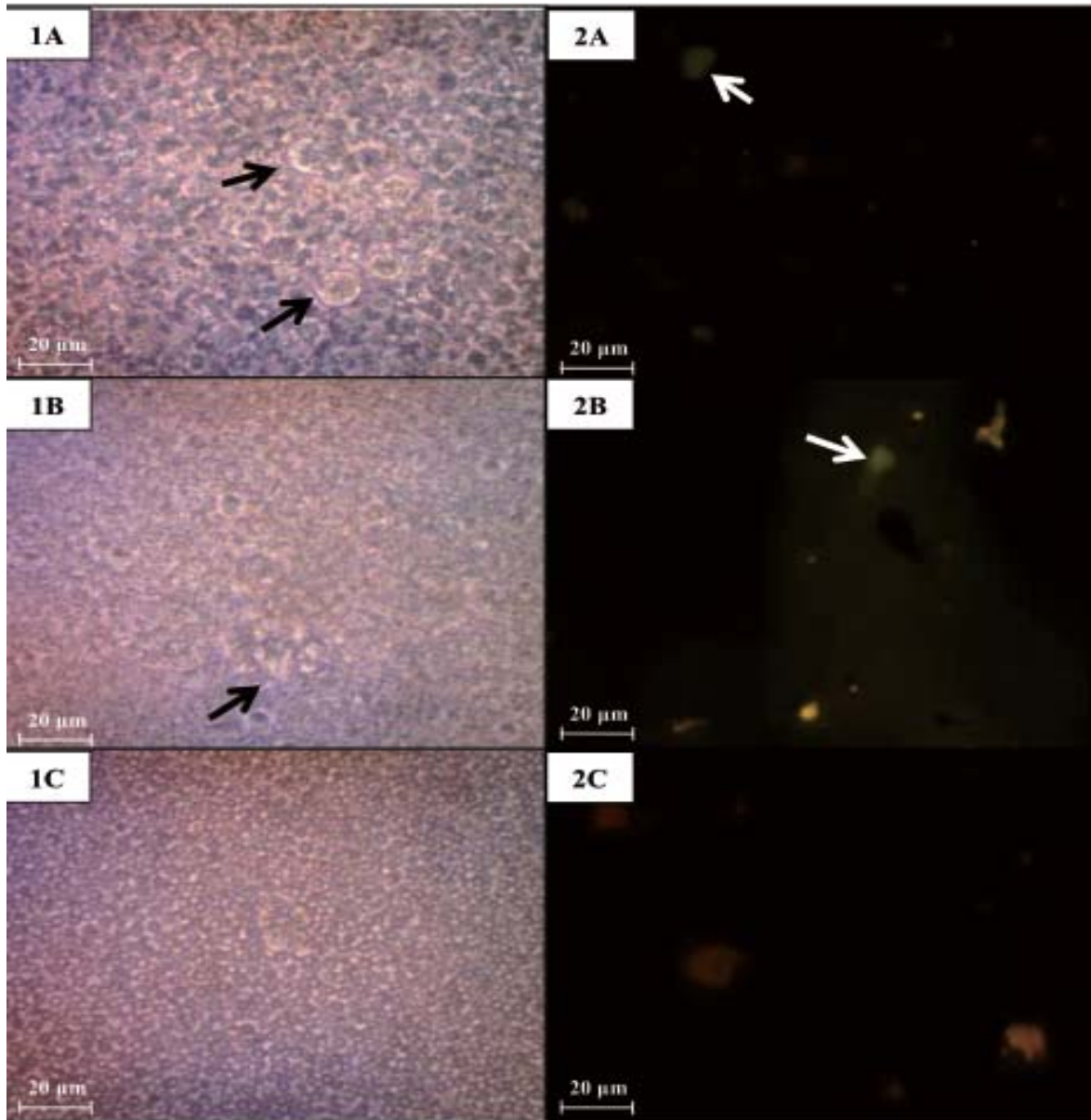
limfosit T dengan reseptor primer CD4 dan koreseptornya, baik CXCR4 atau CCR5, perubahan konformasi yang disebabkan oleh pengikatan *surface glycoprotein* (SU) dan mengekspos peptida TM yang memicu fusi langsung HIV dan membran sel inang (Costin, 2007). Proses fusi sel menyebabkan membran kedua sel bergabung dan membentuk sel raksasa dengan inti banyak (Bracq *et al.*, 2017).



Gambar 1. Gambaran CPE berupa *multinucleated giant cells* (tanda panah hitam) pada kultur PBMC terstimulasi PHA beruk yang diinfeksi SHIV (1A), HIV-1 (1B) dan kontrol negatif (1C) serta ekspresi protein p24 (tanda panah putih) pada kultur PBMC terstimulasi PHA beruk yang diinfeksi SHIV (2A), HIV-1 (2B) dan kontrol negatif (2C). Pewarnaan imunofluoresen terhadap protein p24 dengan konjugat *-anti-rabbit IgG* (Sigma-Aldrich) (perbesaran 400x).

Pembentukan CPE pada kultur PHA-*stimulated* PBMC beruk dan MEP dikonfirmasi dengan pemeriksaan imunofluoresen terhadap protein p24. Pemeriksaan imunofluoresen merupakan teknik pewarnaan berdasarkan pada interaksi antibodi-antigen dalam jaringan atau cairan tubuh, dalam hal ini antibodi spesifik dilabel dengan fluorofor (Im *et al.*, 2020). Protein p24 atau *capsid* (CA) merupakan antigen utama (*core*) membentuk struktur pelindung di sekitar asam nukleat dan untuk memperkenalkan

genom virus ke dalam sel inang (Kartikeyan *et al.*, 2007). Ekspresi protein p24 pada kultur PHA-*stimulated* PBMC beruk dan MEP ditandai dengan pendaran warna hijau sebagaimana Gambar 1 dan Gambar 2. Pendaran warna hijau menunjukkan adanya ikatan antigen-antibodi homolog yang sudah dilabel. Ekspresi protein p24 pada kultur PHA-*stimulated* PBMC menunjukkan ++ atau 10-50% sel terwarnai pada beruk dan + atau <10% sel terwarnai pada MEP sebagaimana Tabel 1.



Gambar 2. Gambaran CPE berupa *multinucleated giant cells* (tanda panah hitam) pada kultur PBMC terstimulasi PHA MEP yang diinfeksi SHIV (1A), HIV-1 (1B) dan kontrol negatif (1C) serta ekspresi protein p24 (tanda panah putih) pada kultur PBMC terstimulasi PHA MEP yang diinfeksi SHIV (2A), HIV-1 (2B) dan kontrol negatif (2C). Pewarnaan imunofluoresen terhadap protein p24 dengan konjugat *-anti-rabbit IgG* (Sigma-Aldrich) (perbesaran 400x).

Tabel 1. Nilai ekspresi protein p24 pada kultur PHA-*stimulated* PBMC beruk dan MEP yang diinfeksi SHIV

Perlakuan	<i>Macaca fascicularis</i> (N = 3)	<i>Macaca nemestrina</i> (N = 3)
SHIV	+	++
HIV	+	++
Kontrol negatif	-	-

Perbedaan nilai ekspresi protein p24 pada kultur PHA-*stimulated* PBMC beruk dan MEP berbanding lurus dengan pembentukan CPE pada beruk dan MEP. Ekspresi protein p24 menunjukkan banyaknya PHA-*stimulated* PBMC beruk dan MEP yang terinfeksi dengan SHIV. Ekspresi protein p24 pada PHA-*stimulated* PBMC beruk lebih banyak dibandingkan MEP, dalam hal ini CPE yang terbentuk juga lebih banyak pada PHA-*stimulated* PBMC beruk dibandingkan MEP. Ekspresi protein p24 yang rendah berkaitan dengan kemampuan SHIV dalam menginfeksi PHA-*stimulated* PBMC MEP.

Pembentukan CPE dan ekspresi protein p24 pada kultur PHA-*stimulated* PBMC menunjukkan bahwa penggantian asam amino pada bagian *cyclophilin A binding region*, gen *vif* dan gen *nef* HIV-1 dengan asam amino pada bagian *cyclophilin A binding region*, gen *vif* dan gen *vif* SIV mampu meningkatkan kemampuan SHIV dalam menginfeksi beruk dan MEP. Penggantian ketiga bagian tersebut berkaitan dengan fungsi masing-masing yang bersifat spesies-spesifik. *Cyclophilin A binding region* pada HIV-1 berfungsi sebagai situs pengikatan untuk *cyclosporin* dan gen *gag* HIV-1. Pengikatan CypA dengan kapsid HIV-1 merupakan langkah awal dalam siklus replikasi HIV-1 pada sel. Ikatan antara *gag* dengan CypA menentukan keberhasilan proses *uncoating* virus pada awal infeksi HIV dan proses transkripsi terbalik (Kamada *et al.*, 2006). Perubahan *cyclophilin A binding region* HIV-1 dengan *cyclophilin A binding region* SIV meningkatkan keberhasilan ikatan antara *gag* SIV dengan CypA sel satwa primata.

Protein *vif* merupakan protein aksesoris pada HIV yang berperan sebagai faktor virulensi untuk mendorong replikasi dan persistensi virus serta penting untuk infektivitas virus dalam sel

target (Sharkey *et al.*, 2019). *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) menyandikan gen aksesoris sebagai pertahanan balik terhadap A3G yang berpotensi membatasi replikasi HIV-1. Protein A3G merupakan senyawa protein yang berperan sebagai anti HIV-1 melalui induksi hipermutasi genom HIV-1. Hipermutasi menyebabkan tidak dihasilkan virus infeksi pada akhir fase replikasi virus (Thippeshappa *et al.*, 2011). Kemampuan protein *vif* untuk memblokir aktivitas antivirus A3G bersifat *specific-species*. Protein *vif* HIV-1, SIV_{agm} dan SIV_{mac} dapat menghambat A3G pada spesies yang sama, tetapi tidak menghambat spesies lain (Schrofelbauer *et al.*, 2004).

Gen *nef* menjadi faktor virulensi yang penting untuk perkembangan AIDS. Selama fase awal infeksi HIV *Nef* diekspresikan dalam jumlah besar bersama dengan gen *tat* dan gen *rev*. Protein *nef* memainkan peran sentral dengan menurunkan ekspresi protein permukaan CD4, *major histocompatibility complex* (MHC) I, MHC II dan CD28 yang penting untuk pembentukan sinaps imun. Protein *nef* juga meningkatkan kelangsungan hidup sel yang terinfeksi dengan menghambat sinyal kematian (Das dan Jameel, 2005). Protein *nef* SIV merupakan antagonis terhadap tetherin dan bersifat *specific-species*. Tetherin merupakan protein inhibitor dalam sel manusia yang menghambat pelepasan partikel HIV-1 baru dari sel yang terinfeksi (Zhang *et al.*, 2009). *Simian-human immunodeficiency virus* (SHIV) yang diinfeksi pada monyet dan membawa gen *nef* SIV menunjukkan peningkatan *viral load* yang signifikan dibandingkan SHIV yang mengandung gen *nef* HIV-1 (Shibata *et al.*, 1997).

Perbandingan jumlah CPE dan ekspresi protein p24 beruk dan MEP secara kualitatif berbeda, dalam hal ini CPE dan ekspresi protein p24 pada beruk lebih banyak ditemukan dibandingkan pada MEP. Perbedaan jumlah CPE dan ekspresi protein p24 pada beruk dan MEP berkaitan dengan kemampuan SHIV menginfeksi PBMC beruk dan MEP. Pembentukan CPE dan ekspresi protein p24 yang terbatas pada PHA-*stimulated* PBMC MEP berkaitan dengan protein *tripartite motif containing 5* (TRIM5). Protein TRIM5 merupakan faktor restriksi yang mengenali dan menonaktifkan kapsid yang mengelilingi dan melindungi inti retrovirus yang masuk (Ganser-Pornillos dan Pornillos, 2019). Protein TRIM5 menjadi salah satu alasan yang mendasari

ketidakmampuan HIV-1 untuk bereplikasi pada sel satwa primata (Hatzioannou *et al.*, 2009).

Protein TRIM5 dari monyet dunia lama, seperti monyet rhesus dan membatasi retrovirus pada manusia (HIV-1 dan HIV-2) serta retrovirus hewan, seperti *equine infectious anemia virus* (EIAV) dan *N-tropic murine leukemia virus* (NMLV). Sementara itu, monyet dunia baru umumnya tidak membatasi HIV-1 (Jimenez-Moyano *et al.*, 2016). Beruk tidak mengekspresikan protein TRIM5, tetapi beruk memiliki protein TRIMCyp, yaitu famili protein TRIM5 yang tidak menghambat infeksi HIV-1. Alel TRIMCyp pada monyet rhesus dan beruk membatasi HIV-2 dan *feline immunodeficiency virus* (FIV), sedangkan alel TRIMCyp pada MEP membatasi replikasi HIV-1 atau HIV-2 (Dietrich *et al.*, 2011). Meskipun MEP memiliki keterbatasan dibandingkan dengan beruk, namun MEP masih dapat dipergunakan sebagai alternatif model HIV/AIDS berbasis SHIV.

SIMPULAN

Simian-Human Immunodeficiency Virus (SHIV) dapat menginfeksi dan bereplikasi pada PBMC beruk dan MEP secara *in vitro*. Infeksi SHIV pada PHA-stimulated PBMC beruk dan MEP ditandai dengan CPE berupa *giant cell*. *Cytopathic effect* (CPE) pada PHA-stimulated PBMC beruk dan MEP mengekspresikan protein p24 masing-masing dengan nilai ++ (10-50% sel terwarnai) dan + (<10% sel terwarnai). Beruk memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan MEP sebagai model HIV/AIDS berbasis SHIV secara *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Republik Indonesia melalui skema Penelitian Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) Tahun Anggaran 2018-2020. Terima kasih kepada semua pihak yang sudah membantu dan memfasilitasi dalam penelitian ini, yaitu Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi (PRVKP) FKUI-RSCM, Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) LPPM IPB University dan PT. Wanara Satwaloka, Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambrose Z, KewalRamani VN, Bieniasz PD, Hatzioannou T. 2007. HIV/AIDS: in search of an animal model. *Trends Biotechnol* 25(8): 333-337. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.05.004.
- Bela B, Triwidyaningtyas S., penemu; Universitas Indonesia. 2017 Mei 17. Konstruksi virus kimera simian tropic recombinan *human immunodeficiency virus* (stHIV). Paten Indonesia ID P00201602882.
- Bouchet J, Basmaciogullari SE, Chrobak P, Stolp B, Bouchard N, Fackler OT, Chames P, Jolicoeur P, Benichou S, Baty D. 2011. Inhibition of the nef regulatory protein of HIV-1 by a single-domain antibody. *Blood* 117(13): 3559-3568. doi: 10.1182/blood-2010-07-296749. Epub 2011 Feb 3.
- Bracq L, Xie M, Lambele M, Vu L, Matz J, Schmitt A, Delon J, Zhou P, Randriamampita C, Bouchet Benichou S, Sundquist WI. 2017. T Cell-Macrophage Fusion Triggers Multinucleated Giant Cell Formation for HIV-1 Spreading. *Journal of Virology* 91(24): e01237-17. doi: 10.1128/JVI.01237-17
- Corey L, Nabel GJ, Dieffenbach C, Gilbert P, Haynes BF, Johnston M, Kublin J, Lane HC, Pantaleo G, Picker LJ, Fauci AS. 2011. HIV-1 vaccines and adaptive trial designs. *Science Translational Medicine* 3(79): 79ps13 DOI: 10.1126/scitranslmed.3001863 PMID: 21508308 PMCID: PMC3616511
- Costin J.M. Cytopathic Mechanisms of HIV-1. *Virol J* 4: 100 <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-100>
- Das SR, Jameel S. 2005. Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res* 121: 315-332.
- De Iaco A, Luban J. 2014. Cyclophilin A promotes HIV-1 reverse transcription but its effect on transduction correlates best with its effect on nuclear entry of viral cDNA. *Retrovirology* 11: 11. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-11>
- DeRycke MS, Andersen JD, Harrington KM, Pambuccian SE, Kalloger SE, Boylan KLM,

- Argenta PA, Skubitz APN. 2009. S100A1 expression in ovarian and endometrial endometrioid carcinomas is a prognostic indicator of relapse-free survival. *The American Journal of Clinical Pathology* 132: 846-856.
- Dietrich EA, Brennan G, Ferguson B, Wiseman RW, O'Connor D, Hu S. 2011. Variable Prevalence and Functional Diversity of the Antiretroviral Restriction Factor TRIM5 in *Macaca fascicularis*. *Journal of Virology* 85(19): 9956-9963. doi: 10.1128/JVI.00097-11. Epub 2011 Jul 27
- Dilnessa T, Zeleke H. 2017. Cell Culture, Cytopathic Effect and Immunofluorescence Diagnosis of Viral Infection. *J Microbiol Modern Tech* 2(1): 102.
- Etemad-Moghadam B, Rhone D, Steenbeke T, Sun Y, Manola J, Gelman R, Fanton JW, Racz P, Tenner-Racz K, Axthelm MK et al. 2001. Membrane-Fusing Capacity of the Human Immunodeficiency Virus Envelope Proteins Determines the Efficiency of CD4+ T-Cell Depletion in Macaques Infected by a Simian-Human Immunodeficiency Virus. *J Virol* 75(12): 5646-5655.
- Ganser-Pornillos BK, Pornillos O. 2019. Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. *Nature Reviews Microbiology* 17: 546-556.
- Gupta G, Athanikar SB, Pai VV, Naveen KN. 2014. Giant Cells in Dermatology. *Indian J Dermatol* 59(5): 481-484.
- Hatzioannou T, Ambrose Z, Chung NPY, Piatak M, Yuan F, Trubey CM, Coalter V, Kiser R, Schneider D, Smedley J et al. 2009. A macaque model of HIV-1 infection. *PNAS* 106(11): 4425-4429.
- Hatzioannou T, Evans DT. 2012. Animal models for HIV/AIDS research. *Nat Rev Microbiol* 10(12): 852-867.
- Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. 2020. An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol* 1897: 299-311.
- Jimenez-Moyano E, Ruiz A, Kloverpris HN, Rodriguez-Plata MT, Pena R, Blondeau C, Selwood DL, Izquierdo-Useros N, Moris A, Clotet B, Goulder P, Towers GJ, GJ 2016. Nonhuman TRIM5 Variants Enhance Recognition of HIV-1-Infected Cells by CD8+ T Cells. *Journal of Virology* 90(19): 8552-8562.
- Kamada K, Igarashi T, Martin MA, Khamsri B, Hatcho K, Yamashita T, Fujita M, Uchiyama T, Adachi A. 2006. Generation of HIV-1 derivatives that productively infect macaque monkey lymphoid cells. *PNAS* 103(45): 16959-16964.
- Kartikeyan S, Bharmal RN, Tiwari RP, Bisen PS. 2007. *HIV and AIDS: Basic Elements and Priorities*. Netherland. Springer. .
- Koff WC. 2012. HIV vaccine development: Challenges and opportunities towards solving the HIV vaccine-neutralizing antibody problem. *Vaccine* 30: 4310-4315.
- Li H, Wang S, Kong R, Ding W, Lee F, Parker Z, Kim E, Learn GH, Hahn P, Policicchio B et al. 2016. Envelope residue 375 substitutions in simian-human immunodeficiency viruses enhance CD4 binding and replication in rhesus macaque. *The Journal of Infectious Disease* 176: 362-73.
- Mandell CP, Reyes RA, Cho K, Sawai ET, Fang AL, Schmidt KA, Luciw PA. 1999. SIV/HIV nef recombinant virus (SHIVnef) produces simian AIDS in rhesus macaques. *Virology* 265: 235-251.
- Schrofelbauer B, Chen D, Landau NR. 2004. A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (vif). *PNAS* 101(11): 3927-3932.
- Sharkey M, Sharova N, Mohammed I, Huff SE, Kummetha IR, Singh G, Rana TM, Stevenson M. 2019. HIV-1 Escape from Small-Molecule Antagonism of Vif. *mBio* 10(1): e00144-19.
- Shibata R, Maldarelli F, Siemon C, Matano T, Parta M, Miller G, Fredrickson T, Martin MA. 1997. Infection and pathogenicity of chimeric simian-human immunodeficiency viruses in macaques: determinants of high virus loads and CD4 cell killing. *J Infect Dis* 176(2): 362-73. doi: 10.1086/514053.
- Tang JW, Chan PKS. 2018. Virology of Human Immunodeficiency Virus. <https://www.aids.gov.hk/pdf/g190htm/01.htm>. [24 Oktober 2018].

- Thippeshappa R, Polacino P, Kimata MTY, Siwak EB, Anderson D, Wang W, Sherwood L, Arora R, Wen M, Zhou P *et al.* 2011. Vif Substitution Enables Persistent Infection of Pig-Tailed Macaques by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* 85(8): 3767-3779 DOI: [10.1128/jvi.02438-10](https://doi.org/10.1128/jvi.02438-10) PMID: 21289128 PMCID: PMC3126129
- Veazey RS, Lackner AA. 2017. Nonhuman Primate Models and Understanding the Pathogenesis of HIV Infection and AIDS. *ILAR Journal* 58(2): 160-171.
- Zhang F, Wilson SJ, Langford W, Virgen B, Gregory D, Johnson M, Munch J, Kirchhoff F, Bieniasz PD, Hatziioannou T. 2009. Nef protein from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonist. *Cell Host Microbe* 6(1): 54-67.