

ARTIKEL

## PENAPISAN MODEL HEWAN PRIMATA *Macaca fascicularis* UNTUK UJI VAKSIN *Human Papilloma Virus*

[*Screening of Macaca fascicularis as Animal Model for Vaccine tested of Human papilloma virus*]

Isti Kartika Sari<sup>\*1</sup>, Silmi Mariya<sup>1</sup>, Dyah Setyawaty<sup>1</sup>, Irma H. Suparto<sup>1,2</sup> Apon Z. Mustopa<sup>3</sup>, Huda Salahudin Darusman<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Pusat Studi Satwa Primata LPPM IPB, Jalan Lodaya 2 No. 5 Bogor 16151

<sup>2</sup>Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB, Jl. Raya Dramaga Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

<sup>3</sup>Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Jl. Raya Jakarta Bogor KM 46 Cibinong, Bogor 16911, Indonesia

<sup>4</sup>Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Jl. Raya Dramaga Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

### ABSTRAK

Pemanfaatan hewan primata dalam hal ini monyet ekor panjang (MEP) atau *Macaca fascicularis* sebagai hewan model untuk uji vaksin *Human Papilloma Virus* (HPV) harus melalui penapisan untuk mendapatkan hewan yang tepat. Tujuan dari penelitian ini untuk menapis dan memvalidasi kecocokan MEP sebagai hewan model vaksin papillomavirus. Jenis vaksin yang akan di uji menentukan jenis penapisan yang dilakukan. Metode penapisan dilakukan dengan uji serologis, molecular dan patologi serta validasi dengan histopatologi. Vaksin pencegahan atau profilaksis memerlukan hewan yang bebas dari virus-virus penekan kekebalan tubuh (*immunosuppressive virus*) dan HPV nya sendiri agar antibodi yang terbentuk benar-benar berasal dari vaksin yang diujikan, vaksin terapeutik memilih hewan dengan positif MfPV khususnya MfPV3. Hasil penapisan dari 136 ekor hewan diperoleh 42 (30%) ekor hewan dengan negatif antibodi serta diperoleh 39 (28%) ekor MEP positif MfPV diantaranya yaitu sebanyak 24 (17%) ekor positif MfPV-3. Hewan dengan positif MfPV3 selanjutnya akan digunakan untuk uji vaksin terapeutik HPV. Adanya perubahan abnormal sel-sel epitel serviks pada hewan dengan positif MfPV yang menuju pada pembentukan sel kanker (*Carcinoma Intra epithelial Neoplasia/CIN*) juga semakin menguatkan kemiripan model MEP dengan manusia.

Kata kunci: HPV, hewan model, primata, monyet ekor panjang, vaksin

## ABSTRACT

The use of primates, specifically the long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*), as an animal model to evaluate the effectiveness of the Human Papillomavirus (HPV) vaccine requires a screening process to select suitable candidates. This study aims to assess and confirm the suitability of long-tailed macaques as a model for testing the papillomavirus vaccine. The vaccine choice dictates the specific screening procedures, which typically include serological, molecular, and pathological tests, along with validation through histopathology. For preventative or prophylactic vaccines, it is essential to use animals free from immunosuppressive viruses and HPV to ensure that the antibodies produced originate solely from the vaccine being tested. Therapeutic vaccines, however, target animals with positive MfPV, particularly MfPV3. The screening of 136 animals resulted in 42 (30%) animals with negative antibody levels, while 39 (28%) long-tailed macaques tested positive for MfPV, with 24 (17%) testing positive for MfPV-3. Animals exhibiting positive MfPV3 status will be selected to evaluate the therapeutic HPV vaccine. Additionally, observing abnormal changes in cervical epithelial cells in MfPV-positive animals, leading to the development of precancerous cells (Carcinoma Intra epithelial Neoplasia/CIN), reinforces the similarity of the long-tailed macaque model to humans.

**Keywords:** HPV, animal models, Primates, Long-tailed Macaque, Vaccines

## PENDAHULUAN

Kanker leher rahim atau kanker serviks merupakan penyebab kematian terbesar kedua pada wanita setelah kanker payudara. Menurut data WHO 2018, lebih dari 570.000 wanita di seluruh dunia didiagnosis menderita kanker serviks dan 311.000 diantaranya meninggal dunia. Di negara-negara maju, vaksinasi Human Papilloma Virus (HPV) untuk mencegah kanker serviks umum dilakukan, tetapi di negara berkembang, vaksinasi HPV jarang dilakukan karena harganya yang mahal. Vaksinasi ini dapat mengurangi kejadian kanker serviks sampai dengan 70%. Pengembangan vaksin HPV produk dalam negeri tengah dikembangkan untuk menyediakan produk vaksin yang dapat dijangkau masyarakat secara luas. Kegiatan ini tentu tidak terlepas dari kebutuhan akan hewan model untuk uji pre-klinis. *Non-human primate* atau satwa primata dapat dikembangkan sebagai hewan model papilloma virus dengan berbagai kelebihan dibandingkan hewan lainnya.

Monyet ekor panjang (MEP) atau *Macaca fascicularis* memiliki kemiripan alat reproduksi dengan manusia. MEP secara alami terinfeksi *Macaca fascicularis Papilloma Virus* (MfPV). (Ragonnaud *et al.*, 2017), berbagai jenis MfPV telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dan beberapa tipe MfPV ditemukan pada mukosa vagina. Secara filogenetik, virus tersebut memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan HPV onkogenik pada manusia (HPV-16 dan HPV-34), yaitu genus *alpha papilloma virus* (Chen *et al.*, 2019). Virus ini dapat berkembang menjadi *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN), yaitu pertumbuhan abnormal sel-sel di permukaan serviks yang berpotensi memicu terjadinya kanker serviks (Wood *et al.*, 2007). Hal ini sangat menguntungkan untuk mewakili model eksperimental yang mempelajari penyakit vagina dan serviks dan kesempatan untuk mempelajari cara penularan virus ini melalui interaksi seksual secara alami.

Saat ini tengah dikembangkan vaksin HPV untuk pencegahan (profilaksis) dan vaksin untuk pengobatan (terapeutik), untuk kedua jenis vaksin tersebut hewan model yang diperlukan tentu berbeda. Pertama seluruh hewan yang akan dijadikan model harus bebas dari bakteri tuberculosis. Untuk pengembangan vaksin profilaksis dibutuhkan hewan dengan antibodi negatif terhadap virus-virus penekan kekebalan tubuh seperti Simian type D retroviruses (SRV), Simian immunodeficiency viruses (SIV) dan Simian T-lymphotropic viruses (STLV) selain itu juga di tapis dengan Elisa antibodi HPV untuk memastikan hewan tersebut tidak mempunyai antibodi terhadap HPV. Sedangkan untuk vaksin terapeutik, hewan yang terinfeksi oleh MfPV dan MfPV3 dipilih melalui metode PCR dan RT PCR, untuk selanjutnya hewan-hewan tersebut diperiksa sitologi ulas serviksnya dan beberapa hewan juga diperiksa histopatologi jaringan serviksnya, untuk mengetahui perubahan sel epitel serviks akibat infeksi MfPV3. Tujuan dari penelitian ini adalah selain menapis *M. fascicularis* betina dewasa yang sesuai untuk uji vaksin papilloma virus serta menunjukkan keuntungan penggunaan MEP sebagai hewan model untuk penyakit dan kanker didaerah genital.

Penggunaan *M. fascicularis* sebagai hewan model vaksin telah digunakan sejak tahun 2011 di Indonesia (Ragonnaud *et al.*, 2017).

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian deskripsi ini menggunakan sampel yang berasal dari darah dan ulasan serviks 136 ekor *M. fascicularis* betina dewasa, berusia lebih dari 3 tahun yang dipelihara di fasilitas penangkaran hewan Dramaga Pusat Studi Satwa Primata IPB. Penggunaan sampel tersebut telah disetujui oleh Komite Etik Pusat Studi Satwa Primata, Institut Pertanian Bogor dengan mengikuti adendum No IPBPRC-19-A012 tanggal 4 Agustus 2020. Semua prosedur dilakukan oleh dokter hewan pendamping fasilitas.

### Uji Serologi

Uji dilakukan pada virus-virus yang menekan kekebalan (*immunosuppressive viruses*) yaitu SRV (*Simian Retrovirus*), SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) dan STLV (*Simian T-Lymphotropic Virus*) dan uji antibodi pada papillomavirus. Western blot dilakukan dengan memisahkan protein SIV (SIV strain 251 cat#810011) dan SRV (produksi in-house) berdasarkan berat molekulnya dengan gel SDS konsentrasi 7,5% sd 17,5% (30% Acrylamide/Bis Solution, Biorad cat #1610158), 10% SDS Biorad cat#161-301, Temed Biorad cat#1610800 dan Ammonium Persulfate (APS) Biorad cat#1610700 ke membran nitrocelulosa 0,45µm (biorad). Serum dari hewan di inkubasi *overnight* dengan membrane, dicuci 3 kali dengan PBS tween 0,1%. Diinkubasi 1 jam dengan konjugat  $\alpha$  Hu IgG alkaline phosphatase (Sigma AP113A), dicuci kembali dengan PBS tween 3 kali dan diwarnai dengan substrat BCIP-NBT (Thermo cat#34042). Uji antibodi HTLV (HTLV I-II MP Diagnostik cat# 23080096) dan antibodi HPV (Creative Diagnostik ELISA kit cat#DEIA-F678S) dilakukan dengan kit komersial sesuai petunjuk perusahaan.

### Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ekstraksi DNA dari sel epitel serviks dengan menggunakan QIAmp DNA Blood mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) sesuai dengan petunjuk perusahaan. Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR Biorad. Reagen mastermix PCR yang terdiri dari 1µl primer forward (konsentrasi 10 pMol) *Mac26. MY11 5'GCCCAAGGCCACAACAATGG3'* dan reverse (konsentrasi 10 pMol) *Mac26. MY09 5'CGACCCAAGGGAAACTGGTC3'*, 12,5 µl *Go Taq green mastermix* (Taq DNA Polymerase, dNTP, MgCl dan bufer pereaksi) 5,5 µl *free nuclease water* dan 5 µl DNA (konsentrasi 100-200 ng) hasil ekstraksi. Visualisasi produk PCR dilakukan dengan SYBR safe gel stain (Invitrogen #33102) menggunakan 1.8% gel agarose yang mengandung 1 µg/ml dalam TAE buffer (980 ml ddH<sub>2</sub>O dan 20 ml TAE buffer). Primer yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Primer Mac26 MY 09 dan Mac26 011 (*Primers Mac26 MY 09 and Mac26*)

Primer	Runutan Nukleotida
Mac 26 MY 09	5'CGACCCAAGGGAAACTGGTC3'
Mac 26 MY 011	5'GCCCAAGGCCACAACAATGG3'

### Realtime PCR

Reaksi semi kuantitatif Realtime PCR akan dilakukan dengan SensiFast™ Probe No-Rox Kit (Meridian Bioscience, Tennessee, USA). Sebanyak 1 µl primer dengan konsentrasi akhir 3.2 pmol ditambahkan dengan Sensifast Probe Master Mix 10 µl, dan 2 µl cDNA (konsentrasi 10 ng). Siklus RT-qPCR yang digunakan adalah aktivasi enzim 95°C selama 30 detik, denaturasi 95°C selama 1 menit, dan *annealing/extension* 56°C selama 1 menit. Tahapan denaturasi dan *annealing/extension* diulang hingga 40 siklus. Data Realtime PCR dievaluasi dengan quantifikasi absolut menggunakan

standar hpv dari konsentrasi 12500 U/uL sampai 195 U/uL. Primer yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2.** Primer's yang digunakan untuk uji HPV dengan RT-qPCR (*Primers used to test HPV viremia by RT-qPCR*)

Primer	Runutan Nukleotida
LEV65	5' - GGG AAC CAC CTG AAT GGA TA-3'
LEV66	5' -GGC GCA ATC CTT CAC ATA TT-3'
LEV67	5'FAM-AAA TGG TGC AGT GGG CAT ACG ACC 3'

### **Pembuatan Preparat Sitologi**

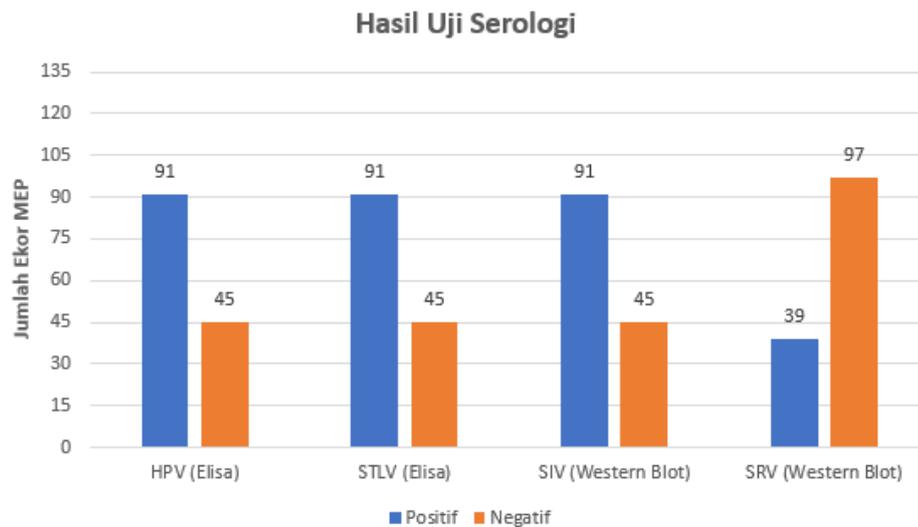
Ulasan serviks diambil dengan menggunakan *cytobrush* dan dikoleksi dalam TEN Bufer (2 ml Tris HCl 1M pH 7.5; 0.2 ml EDTA 0.5M; 0.2 ml NaCl 5M dan 97.6 ml akuades). Proses pewarnaan papanicolaou diawali dengan proses perendaman dalam alcohol 96% dan 70% kemudian dimasukkan kedalam hematoksilin mayer selama 7 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir selama 3 menit. Bluing Reagent (BRT999) kemudian dibilas dengan air dan kembali dimasukkan ke dalam alcohol 70% dan 96% masing-masing selama 1 menit. Dimasukkan ke dalam larutan OG-6 (OGA999) kemudian dilanjutkan direndam dengan alcohol 96% selama 1 menit. Perendaman dalam larutan EA-50 (EAC999) dilanjutkan dalam alcohol 96% masing-masing selama 1 menit. Tahapan selanjutnya adalah perendaman dalam alcohol absolut dan xylol sebanyak dua kali pengulangan masing-masing selama satu menit, dan dilanjutkan dengan *mounting*.

### **Pembuatan Preparat Histologi**

Pada 3 ekor hewan positif HPV dilakukan nekropsi oleh ahli patologi PSSP. Jaringan serviks dipisahkan dan dimasukkan dalam larutan fiksasi paraformaldehida 4% selama 4 hari kemudian dimasukkan dalam larutan alcohol 70%. Proses pembuatan preparat histologi diawali dengan penarikan air dari jaringan (dehidrasi) dengan merendam jaringan dalam alkohol dengan konsentrasi bertingkat menaik (70%, 80%, 90%, 95%, dan absolut), masing-masing selama 3 menit, penjernihan (*clearing*) dengan larutan xylol selama 10 menit. Infiltrasi parafin dengan memasukkan jaringan dalam parafin cair dilanjutkan dengan penanaman (*embedding*) dalam parafin cair untuk dicetak hingga menjadi blok parafin (*blocking*), blok parafin dipotong (*sectioning*) dengan ketebalan 5 µm menggunakan mikrotom dan diletakkan pada gelas obyek untuk kemudian diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin selama 10 menit dan eosin selama 1 menit.

### **HASIL**

Penapisan antibodi terhadap virus seperti SRV, SIV, STLV, dan HPV bertujuan untuk memastikan hewan yang digunakan dalam uji bersih dari antibodi virus yang dapat mengganggu uji sehingga hewan-hewan ini dimasukkan dalam kategori hewan yang bebas dari patogen tertentu (SPF atau *Specific Pathogen Free*). Penapisan ini menggunakan metode seperti ELISA atau Western Blot untuk mendeteksi keberadaan antibodi terhadap virus yang menunjukkan infeksi atau paparan sebelumnya. PCR (Polymerase Chain Reaction) memperbanyak DNA spesifik untuk mendeteksi virus, sedangkan RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) digunakan untuk mendeteksi RNA virus dengan mentranskripsinya menjadi DNA terlebih dahulu. Kedua teknik ini sangat sensitif dan spesifik, memungkinkan deteksi dini dan akurat terhadap infeksi virus. Berikut ini hasil penapisan antibody antibody SRV, SIV, STLV, PCR, RT-PCR dan HPV (grafik 1) dan Hasil penapisan ulasan serviks dengan metode PCR untuk MfPV dan RT-PCR untuk MfPV3 (tabel 3).

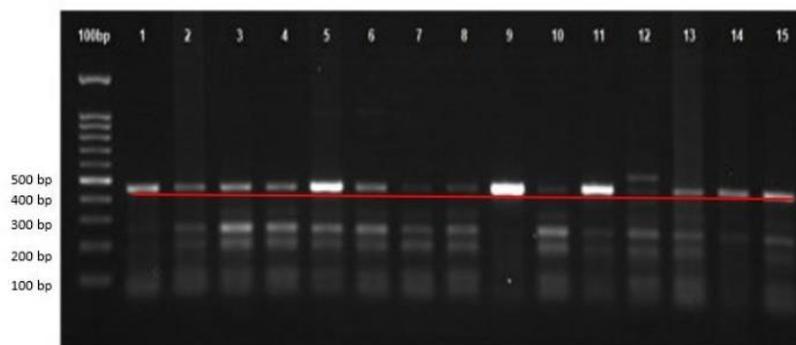


**Grafik 1.** Hasil penapisan antibody SRV, SIV, STLV, PCR, RT-PCR dan HPV (*Antibody screening results for SRV, SIV, STLV, PCR, RT-PCR and HPV*)

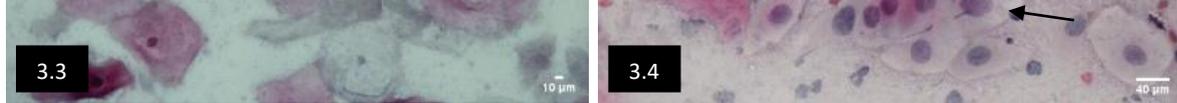
**Tabel 3.** Hasil penapisan ulasan serviks dengan metode PCR untuk MfPV dan RT-PCR untuk MfPV3 (*Results of cervical review screening by PCR method for MfPV and RT-PCR for MfPV3*)

Uji (Test)	Positif (Positive)	Jumlah Sample (Sample Number)	Persentase (Percentage)
PCR	39	136	28%
RT-PCR	24	136	17%

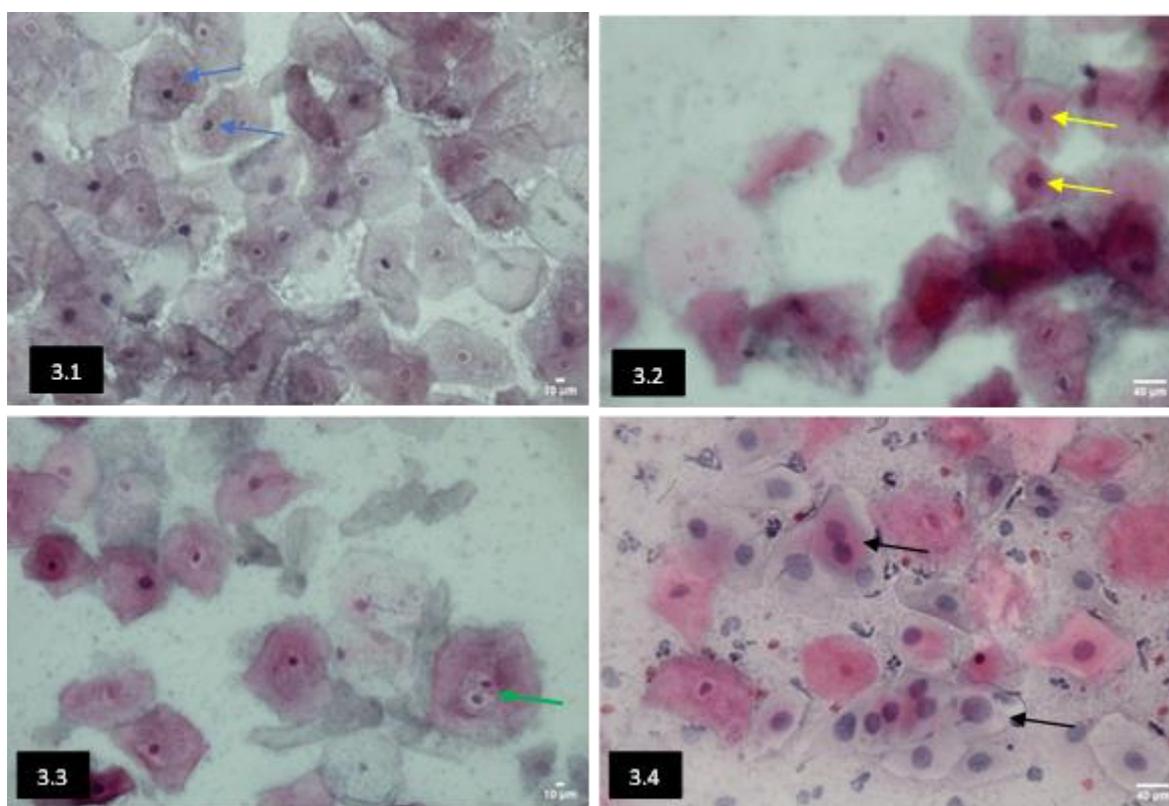
Uji serologis terhadap virus-virus penekan kekebalan menghasilkan 45 ekor MEP negatif antibodi terhadap SIV, SRV dan STLV atau 30% (45 dari 136). Hasil uji PCR dan real time PCR yang bertujuan mendapatkan hewan dengan hasil positif virus HPV adalah 39 ekor dari 136 (28%), hewan dengan negatif HPV dapat digunakan untuk uji vaksin profilaksis dimana diharapkan hewan-hewan tersebut dapat menghasilkan antibodi yang berasal dari vaksinasi. Selain itu pengujian juga dilakukan dengan menggunakan PCR. Berikut ini adalah hasil PCR daerah L1 (Gambar 1).



**Gambar 1.** Hasil PCR daerah L1 berukuran 450 Bp. L1 Open reading frame (ORF) adalah gen yang paling terkonservasi di dalam genom dan karena itu telah digunakan untuk identifikasi jenis PV baru selama 15 tahun terakhir. (*PCR results for L1 area measuring 450 Bp. L1 ORF is the most conserved gene in the genome and has therefore been used to detect new strains of PV for the past 15 years.*)



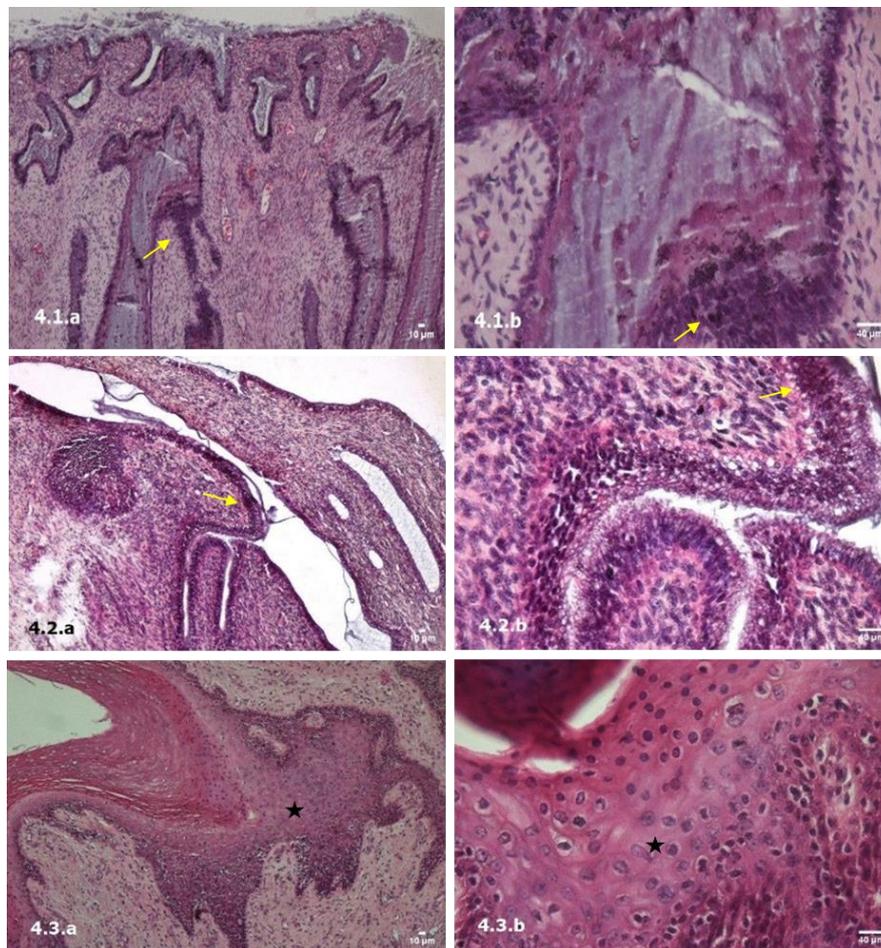
Hewan dengan positif MfPV3 hasil realtime PCR adalah sebanyak 24 ekor dari 136 (17%) dapat digunakan untuk uji vaksin terapeutik karena mereka telah terinfeksi secara alami oleh virus papiloma. Hasil menunjukkan ada 39 (28%) sampel positif terhadap MfPV dan 24 (62%) diantaranya positif terhadap MfPV3, hasil peruntukan DNA sample yang lainnya adalah jenis MfPV 4, 6, 9, 10 dan RhPV L1. Hasil ini menunjukkan bahwa MfPV3 merupakan virus yang paling umum menginfeksi MEP. Hasil uji sitologi dengan pewarnaan papanicolou merujuk pada pemeriksaan sitologi yang biasa dilakukan pada manusia, ada 4 kategori perubahan sel epitel setelah diwarnai (gambar 3) yaitu 3.1. Negatif artinya tidak ada perubahan pada sel epitel serviks, 3.2. ASC-US (*Atypical squamous cell of undetermined significance*) dimana sel atipikal tunggal mempunyai inti dua atau tiga kali lebih besar dari normal dan konturnya sedikit tidak beraturan, 3.3. LSIL.s (*Low-grade squamous intraepithelial lesions*) adanya pembesaran inti, hiperkromasia (warna yang lebih gelap dari sel normal), ukuran sel besar secara keseluruhan, sitoplasma yang terdefinisi dengan baik, dan multinukleasi (inti sel lebih dari satu) dan 3.4. HSIL.s (*High-grade squamous intraepithelial lesions*). Pembesaran inti, multinukleasi dan hiperkromasia dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Gambaran sitologi ulas serviks dengan pewarnaan papanicolaou (*Cytology picture of cervical smear with Papanicolaou staining*).

Keterangan: Pembesaran 400x. 3.1 Negatif artinya tidak ada perubahan pada sel epitel serviks (panah biru). 3.2 ASC-US (*Atypical squamous cell of undetermined significance*) dimana sel atipikal tunggal mempunyai inti dua atau tiga kali lebih besar dari normal dan konturnya sedikit tidak beraturan (panah kuning). 3.3 LSIL.s (*Low-grade squamous intraepithelial lesions*) adanya pembesaran inti, hiperkromasia (warna yang lebih gelap dari sel normal), ukuran sel besar secara keseluruhan, sitoplasma yang terdefinisi dengan baik, dan multinukleasi (panah hijau) dan 3.4 HSIL.s (*High-grade squamous intraepithelial lesions*) Pembesaran inti, hiperkromasia dan multinukleasi (panah hitam). (Notes: Magnification 400x. 3.1 Negative means there is no change in the cervical epithelial cells (blue arrow). 3.2 ASC-US (*Atypical squamous cell of undetermined significance*) where a single atypical cell has a nucleus two or three times larger than normal and its contour is slightly irregular (yellow arrow). 3.3 LSIL.s (*Low-grade squamous intraepithelial lesions*) the presence of nuclear enlargement, hyperchromasia (darker color than normal cells), overall large cell size, well-defined cytoplasm, and multinucleation (green arrow) and 3.4 HSIL.s (*High-grade squamous intraepithelial lesions*) Nuclear enlargement, hyperchromasia and multinucleation (black arrow))

Hasil menunjukkan pada 39 ekor MEP dengan positif MfPV, 13 ekor (33,3%) negative, 15 ekor (38,5%) ASC-US adanya perubahan bentuk pada sel epitel dimana ukuran inti sel berukuran 2 atau 3 kali lebih besar dengan bentuk sel tidak beraturan dan 11 ekor (28,2%) LSIL yaitu perubahan sel epitel tingkat rendah. Tidak ditemukan hewan dengan perubahan HSIL. Hasil analisa histopatologi untuk mengetahui, apakah terdapat perubahan displasia serviks yang disebut *Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)*. Neoplasia intraepitel serviks dapat diklasifikasikan berdasarkan seberapa banyak jaringan epitel terpengaruh, perubahan ini mirip dengan yang terjadi pada manusia dimana CIN dikategorikan dalam 3 kategori yaitu : Neoplasia tingkat rendah (CIN 1) dimana dysplasia terjadi pada sepertiga ketebalan sel epitel, Neoplasia tingkat sedang (CIN 2) dimana sel epitel yang berubah sekitar sepertiga sampai dengan dua pertiga ketebalan dan kondisi terparah adalah CIN 3 dimana abnormalitas terjadi pada lebih dari dua pertiga ketebalan sel. Dari ketiga MEP tersebut seluruhnya mengalami perubahan sel-sel epitel mengarah carcinoma dua ekor CIN 1 (gambar 4.1 dan 4.2) dan satu ekor CIN 3 (gambar 4.3). Secara histologis, lesi CIN menunjukkan berbagai perubahan morfologi yang serupa dengan CIN manusia, termasuk atipia dan pembesaran pada inti sel epitel, hilangnya polaritas, koilositis, dan ekspansi variabel spinosum (CIN1) dan epitel basal (CIN2 / 3).



**Gambar 4.** Gambaran histopatologi serviks dengan pewarnaan hematoksin-eosin (HE) (*Cervical histopathology with hematoxylin-eosin (HE) staining*).

Keterangan: 4.1.a *Cervical intraepithelial neoplasm (CIN) 1*, hiperkromasia sel epitel (panah kuning), pembesaran 100x. 4.1.b CIN 1, hiperkromasia sel epitel (panah kuning), pembesaran 400X. 4.2.a CIN 1, hiperkromasia sel epitel (panah kuning), pembesaran 100x. 4.2.b CIN 1, hiperkromasia sel epitel (panah kuning), pembesaran 400X. 4.3.a CIN 3, displasia dan proliferasi sel epitel (bintang), pembesaran 100x. 4.3.b CIN 3, displasia dan proliferasi sel epitel (bintang), pembesaran 400X. (Notes: 4.1.a *Cervical intraepithelial neoplasm (CIN) 1*, epithelial cell hyperchromasia (yellow arrow), 100x magnification. 4.1.b CIN 1, epithelial cell hyperchromasia (yellow arrow), 400x magnification. 4.2.a CIN 1, epithelial cell hyperchromasia (yellow arrow), 100x magnification. 4.2.b CIN 1, epithelial cell

*hyperchromasia (yellow arrow), 400x magnification. 4.3.a CIN 3, epithelial cell dysplasia and proliferation (asterisk), 100x magnification. 4.3.b CIN 3, epithelial cell dysplasia and proliferation (asterisk), 400x magnification).*

## PEMBAHASAN

Vaksin adalah senyawa yang digunakan untuk menghasilkan kekebalan terhadap suatu penyakit. Istilah vaksin selalu dihubungkan dengan pencegahan penyakit (vaksin profilaksis), tetapi akhir-akhir ini juga dikembangkan vaksin sebagai pengobatan penyakit (vaksin terapeutik). Vaksin terapeutik akan menstimulasi respon imun penderita untuk melawan penyakit tersebut, sehingga pengobatan terjadi karena adanya peningkatan respon imun penderita. Vaksin terapeutik banyak dikembangkan dalam pengobatan kanker termasuk kanker serviks. Hewan model memiliki peran penting dalam uji coba berbagai kandidat vaksin manusia karena memiliki kemiripan fisiologi dengan manusia, sehingga hewan model akan memberikan berbagai informasi mengenai sistem fisiologi manusia. Pemilihan hewan model yang sesuai sangat penting agar tujuan penelitian dapat tercapai (Gupta *et al.*, 2016). Hewan model digunakan di dalam setiap tahap uji vaksin, baik pada tahap pengembangan, pembuatan dan kualitas. Pada tahap pengembangan, hewan digunakan untuk menyeleksi ajuvan, uji imunogenitas dan keamanan, uji metode aplikasi dan dosis formula vaksin. Pada tahap pembuatan, hewan digunakan untuk menyeleksi vaksin. Pada tahap kontrol kualitas, hewan digunakan untuk uji nomor batch yang merupakan tahap terpenting untuk uji toksisitas dan potensi (Novita, 2015).

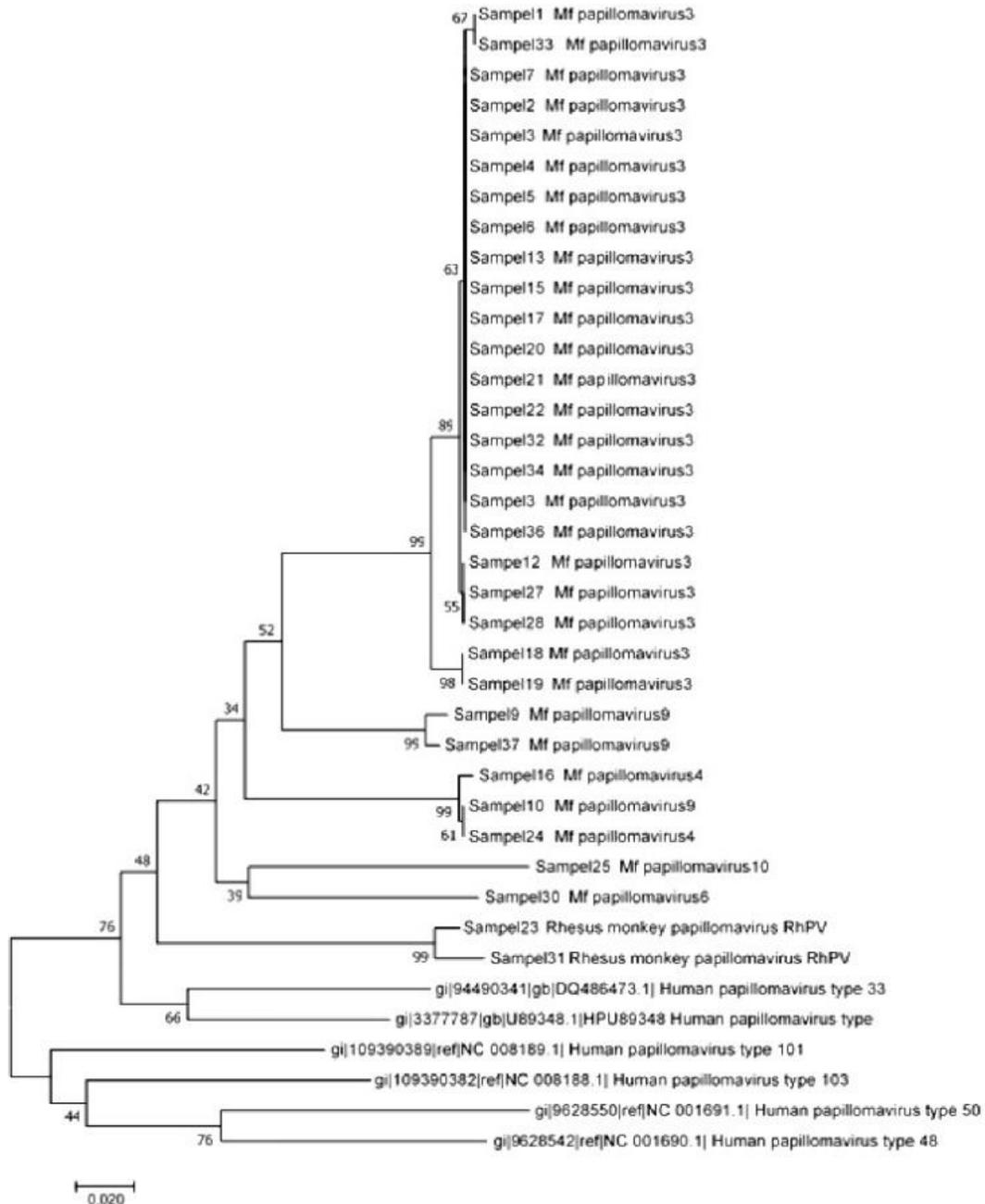
Pengujian vaksin yang efektif menggunakan hewan model melibatkan beberapa tahap untuk memastikan keamanan dan efektivitas vaksin sebelum diuji pada manusia. Proses ini dimulai dengan pemilihan hewan model yang tepat, seperti tikus, kelinci, atau primata, yang memiliki sistem imun yang cukup mirip dengan manusia. Pada tahap awal, vaksin yang dikembangkan akan diberikan kepada hewan model ini, dan respons imun mereka akan diamati. Parameter yang dianalisis mencakup produksi antibodi, aktivasi sel T, dan respons imun keseluruhan. Pengujian ini juga mencakup pengamatan terhadap efek samping dan toksisitas untuk memastikan bahwa vaksin tidak menyebabkan reaksi berbahaya. Setelah tahap awal ini, uji tantangan dilakukan di mana hewan yang divaksinasi akan terpapar dengan patogen yang sebenarnya. Ini dilakukan untuk menilai efektivitas vaksin dalam memberikan perlindungan nyata terhadap infeksi. Pengamatan mencakup apakah hewan yang divaksinasi tetap sehat dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak divaksinasi. Selain itu, berbagai tes laboratorium dilakukan untuk mengukur tingkat patogen dalam tubuh dan respons imun yang terlibat. Data dari uji tantangan ini memberikan indikasi yang jelas tentang potensi vaksin dalam melindungi terhadap penyakit sebelum melanjutkan ke tahap uji klinis pada manusia. Proses ini sangat penting untuk memastikan bahwa vaksin aman dan efektif sebelum diberikan kepada populasi manusia ((Bigay *et al.*, 2022); (Choy *et al.*, 2022); (Gong *et al.*, 2020)

Kesulitan utama dalam penelitian HPV dan kanker serviks adalah sulitnya memilih hewan model yang tepat (Ault *et al.*, 2011) karena virus ini sangat spesies spesifik. Penelitian ini bertujuan memvalidasi MEP sebagai hewan model untuk uji vaksin Human Papilloma Virus (HPV). Penapisan terhadap virus-virus spesifik oportunistik patogen seperti SIV, SRV dan STLV, meskipun tidak terinfeksi secara alami, infeksi *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) dapat menyebabkan penekanan kekebalan dan disregulasi yang akan menghasilkan faktor perancu untuk sebagian besar penelitian. Virus ini berkerabat erat dengan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) sehingga MEP yang terinfeksi akan sangat mudah mengalami penurunan kekebalan tubuh. *Simian Retro Virus* tipe 2 (SRV-2) tidak hanya menyebabkan imunosupresi fatal, namun juga diikuti dengan proliferasi sel vaskuler dan mesenkimial yang disebut *fibromatosis retroperitoneal* (RF). Infeksi SRV tidak menunjukkan aktivasi imunitas yang tinggi pada awal terjadinya infeksi, namun virus ini menyerang berbagai sel pertahanan tubuh seperti sel T CD4+ dan sel T CD8, sel B, makrofaga, dan sel epitelial di saluran pencernaan, kelenjar saliva, dan choroid plexus. Pada tahap akhir infeksi SRV, terjadi penurunan limfoid pada kelenjar limfoid. *Simian T-lymphotropic virus*

(STLV) sangat mirip dengan *Human T-cell leukemia virus* (HTLV). Infeksi STLV pada MEP tidak berhubungan dengan manifestasi penyakit umum, tetapi efek virus pada sel inang dan sifat laten Infeksi membuat virus ini menjadi perhatian serius bagi kesehatan dan keamanan serta faktor komplikasi pada MEP (Morton *et al.*, 2008) Ketiga virus tersebut dapat menjadi factor perancu (*confounding factor*) bagi uji coba vaksin yang bertujuan meningkatkan kekebalan tubuh.

Metode yang digunakan pada penapisan terhadap antibodi HPV untuk memastikan bahwa hewan model benar-benar mendapatkan antibodi HPV dari vaksin yang di uji cobakan bukan antibodi yang dibawa sebelumnya. Setelah ditapis Ke 4 agen di atas, SIV, SRV, STLV dan PV kita mendapatkan hewan *spesifik pathogen free* (SPF) yang siap digunakan untuk menguji vaksin pencegahan atau profilaksis vaksin. Hewan-hewan ini berasal dari kandang penangkaran dan akan dipindahkan ke laboratorium hewan penelitian dengan proses adaptasi selama 2 minggu. Uji coba vaksin terapan, diperlukan hewan model MEP yang terinfeksi oleh *Macaca fascicularis papillomavirus type 3* (MfPV3). Hasil PCR konvensional dengan primer daerah L1 menunjukkan bahwa ada 39 ekor dari 136 ekor MEP betina (28,7%) terinfeksi oleh MfPV, dimana 24 (61%) diantaranya adalah jenis MfPV 3. MfPV 3 adalah jenis yang paling umum dari *papillomavirus* genital pada MEP. MfPV 3 mempunyai kekerabatan yang sangat dekat dengan HPV 16 karsinogenik penyebab kanker serviks (Chen *et al.*, 2019) dimana HPV 16 dan HPV 18 berkontribusi pada 70% kanker serviks pada wanita di dunia. Mayoritas HPV diklasifikasikan dalam 3 genera,  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$  papilloma virus, dimana PV genital karsinogenik seluruhnya berada pada genus  $\alpha$ -papilloma virus (Chen *et al.*, 2019). Selain pada manusia, beberapa MfPV yang diisolasi dari daerah genital juga termasuk dalam genus  $\alpha$ -Papilloma Virus termasuk MfPV 3 dan terkait erat dengan kanker serviks (Wood *et al.*, 2007) (Chen *et al.*, 2009).

HPV dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori utama berdasarkan potensi onkogeniknya yaitu *Low Risk-HPV* (LR-HPV), *potential High Risk-HPV* (pHR-HPV), dan *High Risk-HPV* (HR-HPV). LR-HPV, seperti tipe 6 dan 11, dikenal terutama karena kemampuannya menyebabkan kutil kelamin dan lesi hiperproliferatif jinak lainnya, seperti papilloma laring. Lesi-lesi ini biasanya tidak berkembang menjadi kondisi ganas dan lebih dianggap sebagai masalah kesehatan yang mempengaruhi kualitas hidup daripada ancaman serius. Meski begitu, lesi yang disebabkan oleh LR-HPV dapat menyebabkan ketidaknyamanan yang signifikan dan memerlukan perawatan medis untuk penghilangan atau manajemen gejala. Potential High Risk-HPV (pHR-HPV) mencakup tipe-tipe yang memiliki potensi untuk menjadi onkogenik, tetapi risiko transformasi ganasnya lebih rendah dibandingkan dengan HR-HPV. Tipe-tipe HPV dalam kategori ini masih membutuhkan pemantauan karena dapat menyebabkan lesi yang, dalam kondisi tertentu, mungkin berisiko lebih tinggi untuk berkembang menjadi kanker dibandingkan dengan LR-HPV. Namun, risiko transformasi ini secara signifikan lebih kecil dibandingkan dengan HR-HPV. High Risk-HPV (HR-HPV), terutama tipe 16 dan 18, adalah penyebab utama kanker serviks invasif serta lesi pra-ganas yang dikenal sebagai neoplasia intraepitelial serviks (CIN). Infeksi oleh HR-HPV mengganggu mekanisme seluler normal, menyebabkan mutasi dan perubahan dalam siklus sel yang bisa mengarah pada transformasi ganas. HPV tipe 16 dan 18 bertanggung jawab atas sekitar 70% kasus kanker serviks di seluruh dunia. Selain itu, HR-HPV juga berkontribusi pada beberapa jenis kanker lainnya, termasuk kanker anus, penis, vagina, vulva, dan orofaring. Oleh karena itu, deteksi dini melalui skrining rutin seperti Pap smear dan tes HPV, serta vaksinasi terhadap HPV tipe 16 dan 18, sangat penting dalam upaya pencegahan dan pengendalian kanker terkait HPV. Vaksinasi HPV telah terbukti sangat efektif dalam mengurangi insiden infeksi oleh tipe HPV yang paling berisiko tinggi, dan dengan demikian, menurunkan angka kejadian lesi pra-ganas dan kanker serviks (Agustini *et al.*, 2024) (Alarcón-Romero *et al.*, 2022); (Gonçalves *et al.*, 2021); (Lynge *et al.*, 2020)



**Gambar 5.** Hasil analisis Mega X menunjukkan dari 37 sample yang di sekuens , 23 diantaranya adalah MfPV3 (*The results of the Mega X analysis show that of the 37 samples sequenced, 23 of them were MfPV3*).

Hasil menunjukkan 39 ekor MEP postif MfPV menunjukkan adanya perubahan pada sel epithelial serviks yang menuju pada pembentukkan carcinoma meskipun masih pada tingkat awal. Berdasarkan pembacaan Sistem Bethesda (Nayar, 2015) menunjukkan adanya perubahan pada sel epitel serviks MEP yang menuju pada pembentukkan carcinoma pada tingkat 2 yaitu perubahan ukuran inti sel menjadi lebih besar dan perubahan bentuk sel menjadi tidak beraturan dan pada tingkat 3 dimana terbentuk Lesi intraepitel skuamosa tingkat rendah (LSIL). Perubahan tersebut meliputi *kavitasi perinuclear* yaitu adanya area yang jelas disekitar nukleus, *multinukleasi* dimana inti sel epitel menjadi lebih dari satu, dan *hiperkromasia* yaitu warna sel menjadi lebih gelap daripada warna asalnya. Pemeriksaan sitologi hasilnya terbatas pada gambaran sel secara umum. Untuk mendapatkan gambaran lebih jelas tentang struktur jaringan pada organ, dilakukan nekropsi

untuk melihat perubahan pada organ serviks MEP. Hasil histologi pada serviks 3 ekor MEP positif MfPV yang di nekropsi menunjukkan perubahan pada serviks yaitu 2 ekor CIN 1 dan 1 ekor CIN 3. CIN 1 menunjukkan perubahan awal menuju dysplasia dimana terjadi perubahan pada sepertiga dari ketebalan sel epitel. Sedangkan CIN 3 merupakan perubahan paling parah. Secara histologis perubahan morfologis lesi CIN serupa dengan yang terjadi pada manusia, seperti adanya perubahan perinuclear dan adanya perubahan epitel basal menjadi CIN 1 dan 3 (Setyawaty *et al.*, 2024) serta adanya penanda proliferasi sel KI67 yang meningkat. (Darusman *et al.*, 2022).

## **KESIMPULAN**

Dari 136 MEP yang di tapis untuk hewan model vaksin HPV diperoleh 42 (30%) ekor hewan dengan negatif antibodi terhadap SRV, SIV, STLV dan HPV (SPF 5) yang siap digunakan sebagai model untuk vaksin profilaksis HPV. Didapatkan juga 39 ekor MEP positif MfPV diantaranya 24 ekor positif MfPV-3 dengan variasi hasil antibodi tergantung pada kebutuhan studi yang akan dilakukan. Hewan-hewan positif tersebut selain menunjukkan hasil positif secara molekuler juga menunjukkan hasil positif secara sitologi dan histologi yang semakin menguatkan kemiripan model MEP dengan manusia. Hasil dari penelitian ini semakin menunjukkan bahwa *Macaca fascicularis* dapat digunakan sebagai model hewan untuk menguji vaksin HPV baik vaksin terapeutik maupun profilaksis.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Penelitian ini merupakan bagian dari Prioritas Riset Nasional (PRN-Vaksin) dan didanai oleh Lembaga Pengelola Dana Pendidikan Departemen Keuangan LPDP.

## **KONTRIBUSI PENULIS**

IKS: Membuat draft artikel, membuat rencana penelitian, mengerjakan penelitian, SM: Kepala laboratorium tempat dilakukan penelitian, mengkoordinasikan kegiatan, DSW : patologist, mengerjakan uji histopat, co-author, IHS: Principal Investigator penelitian , AZM: Promotor penulis, HSD: Promotor penulis, Kepala Fasilitas

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Agustini, R., Yasmon, A. 2024. High Risk Papillomavirus & Risk Factors for Cervical Cancer. *Jurnal Ners*, 8, pp. 1399–1410.
- Alarcón-Romero, L. del C., Organista-Nava, J., Gómez-Gómez, Y., Ortiz-Ortiz, J., Hernández-Sotelo, D., del Moral-Hernández, O., Mendoza-Catalán, M. A., Antaño-Arias, R., Leyva-Vázquez, M. A., Sales-Linares, N., Antonio-Véjar, V., Illades-Aguilar, B. 2022. Prevalence and Distribution of Human Papillomavirus Genotypes (1997–2019) and Their Association With Cervical Cancer and Precursor Lesions in Women From Southern Mexico. *Cancer Control*, 29, pp. 1–21. doi: 10.1177/10732748221103331.
- Ault, K. A., Brown, D. R. (2011). Advancing human papillomavirus research with a rhesus monkey model. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(9), 703. doi: 10.1093/jnci/djr125. pp 8
- Bigay, J., Le Grand, R., Martinon, F., Maisonnasse, P. 2022. Vaccine-associated enhanced disease in humans and animal models: Lessons and challenges for vaccine development. *Frontiers in Microbiology*, 13(August), pp. 1–23. doi: 10.3389/fmicb.2022.932408.
- Chen, Z., Long, T., Wong, P. Y., Ho, W. C. S., Burk, R. D., Chan, P. K. S. 2019. Non-human Primate Papillomaviruses Share Similar Evolutionary Histories and Niche Adaptation as the Human Counterparts. *Frontiers in Microbiology*, 10(9), 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2019.02093. pp. 9
- Chen, Z., van Doorslaer, K., DeSalle, R., Wood, C. E., Kaplan, J. R., Wagner, J. D., Burk, R. D. 2009. Genomic diversity and interspecies host infection of  $\alpha 12$  *Macaca fascicularis* papillomaviruses (MfPVs). *Virology*, 393(2), pp. 304–310. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.012.

- Choy, R. K. M., Bourgeois, A. L., Ockenhouse, C. F., Walker, R. I., Sheets, R. L., Flores, J. 2022. Controlled Human Infection Models To Accelerate Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews*, 35(3), pp.1–163. doi: 10.1128/cmr.00008-21.
- Darusman, H. S., Mariya, S. S., Sari, I. K., Nisa, M. A., Sari, K., Mariya, S., Mustopa, A. Z., Saepuloh, U. 2022. Spontaneous expression of the gene of KI67 and P53 in cynomolgus monkeys infected with papillomavirus. *Veterinary World*, 15(4), pp.962–967. doi: 10.14202/vetworld.2022.962-967.
- Gonçalves, H. M., Silva, J., Pintado Maury, I., Tavares, A., Campos, C., Sousa, H., Jacinto, A., Aguiar, P., Caldeira, L., Medeiros, R. 2021. The prevalence and risk-factors of oral HPV DNA detection among HIV-infected men between men who have sex with men and heterosexual men. *Infectious Diseases*, 53(1), pp.19–30. doi: 10.1080/23744235.2020.1811373.
- Gong, W., Liang, Y., Wu, X. 2020. Animal Models of Tuberculosis Vaccine Research: An Important Component in the Fight against Tuberculosis. *BioMed Research International*, 2020(3). doi: 10.1155/2020/4263079.
- Gupta, G., Giannino, V., Rishi, N., Glueck, R. 2016. Immunogenicity of next-generation HPV vaccines in non-human primates: Measles-vectored HPV vaccine versus *Pichia pastoris* recombinant protein vaccine Gaurav. *Vaccine*, 34(1), pp. 4724–4731.
- Lynge, E., Thamsborg, L., Larsen, L. G., Christensen, J., Johansen, T., Hariri, J., Christiansen, S., Rygaard, C., Andersen, B. 2020. Prevalence of high-risk human papillomavirus after HPV-vaccination in Denmark. *International Journal of Cancer*, 147(12), pp. 3446–3452. doi: 10.1002/ijc.33157.
- Morton, W. R., Agy, M. B., Capuano, S. V., Grant, R. F. 2008. Specific pathogen-free macaques: Definition, history, and current production. *ILAR Journal*, 49(2), pp. 137–144. doi: 10.1093/ilar.49.2.137.
- Nayar, R. 2015. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. In D. C. Wilbur (Ed.), *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (Third)*. London: Springer International Publishing Switzerland 2015. doi: 10.1007/978-3-319-11074-5.
- Novita, R. 2015. Pemilihan Hewan Coba pada Penelitian Pengembangan Vaksin Tuberculosis. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 4(1), 15–24. doi: 10.22435/jbmi.v4i1.4209.15-24. pp. 8
- Ragonnaud, E., Andersson, A. M. C., Mariya, S., Pedersen, A. G., Burk, R. D., Folgori, A., Colloca, S., Cortese, R., Nicosia, A., Pamungkas, J., Iskandriati, D., Holst, P. J. 2017. Therapeutic Vaccine Against Primate Papillomavirus Infections of the Cervix. *Journal of Immunotherapy*, 40(2), pp. 51–61. doi: 10.1097/CJI.0000000000000153.
- Setyawaty, D., Mariya, S., Prabandari, S. A., Boillessen, D. R. 2024. Immunohistochemical Characterization of Integrin Alfa 6 in Uterus and Cervix of the Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) with MfPV3 Infection. *Journal of Medical Primatology*, pp.1–9.
- Wood, C. E., Chen, Z., Cline, J. M., Miller, B. E., Burk, R. D. 2007. Characterization and Experimental Transmission of an Oncogenic Papillomavirus in Female Macaques. *Journal of Virology*, 81(12), pp. 6339–6345. doi: 10.1128/jvi.00233-07.