

# PERBANDINGAN KEAMANAN DAN POTENSI VAKSIN *SEPTICAEMIA EPIZOOTICA* MENGGUNAKAN ANTIGEN *CRUDE PRODUCT* DAN ANTIGEN MURNI

Evy Indah Setyorinie<sup>1</sup>, A.E.T.H Wahyuni<sup>2</sup>, Widya Asmara<sup>2</sup>

1. Pusat Veterinaria Farma  
2. Universitas Gadjah Mada  
evyindah.setyorinie@gmail.com

## ABSTRAK

Vaksin ajuvan minyak merupakan vaksin yang poten tetapi vaksin ajuvan minyak mempunyai viskositas yang tinggi, kadang menyebabkan kebengkakan, nekrosis serta *shock* sesudah vaksinasi. Usaha pengembangan vaksin ajuvan minyak diperlukan untuk mengurangi reaksi sesudah vaksinasi. Tujuan dari penelitian ini untuk membandingkan viskositas, keamanan dan potensi dari vaksin SE antigen *crude product* dan vaksin SE antigen murni dengan menggunakan ajuvan Montanide ISA 50. Kultur kuman disiapkan dari *Pasteurella multocida* strain Katha, yang di kultur pada media *Casein Sucrose Yeast* (CSY) kemudian di inaktivasi menggunakan formalin 0.5%. Antigen murni disiapkan dengan metode sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit, supernatan dibuang dan diganti dengan NaCl 0.9%. Antigen *crude product* disiapkan dengan tidak ada pemisahan antara antigen dan media cair. Kedua suspensi kemudian diformulasi dengan menggunakan ajuvan montanide ISA 50 dengan perbandingan 1:1. Vaksin diukur viskositasnya menggunakan viskometer, di uji keamanan dan potensi pada mencit. Uji potensi dilakukan dengan *Active mouse protection test* (AMPT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa viskositas vaksin SE antigen murni yaitu 200 cP dan vaksin SE antigen *crude product* 440 cP. Uji keamanan menunjukkan bahwa tidak ada kejadian syok sesudah vaksinasi, kematian pada mencit ataupun gejala SE pada mencit, tetapi pada satu mencit dari kelompok vaksin *crude product* terdapat kemerahan pada bekas tempat suntikan. Uji potensi dilakukan dengan metode AMPT dan didapatkan potensi vaksin SE antigen murni 5.2 log unit dan vaksin SE antigen *crude product* 4.2 log unit. Penelitian ini menunjukkan bahwa kedua vaksin baik itu vaksin SE antigen murni ataupun vaksin *crude product* aman digunakan, tetapi vaksin SE antigen murni mempunyai viskositas yang lebih rendah dan potensi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan vaksin SE antigen *crude product*.

*Kata kunci* : *Septicaemia epizootica*, vaksin ajuvan minyak, Montanide ISA 50

## PENDAHULUAN

*Haemorrhagic septicaemia* atau *Septicaemia epizootica* (SE) di Indonesia dikenal juga dengan penyakit ngorok adalah penyakit sepsis akut dan fatal yang menyerang sapi dan kerbau yang disebabkan oleh spesifik serotipe *Pasteurella multocida*. Kejadian SE di negara Asia disebabkan oleh serotipe B:2 sedangkan di negara-negara Afrika disebabkan serotipe E:2. Penyakit SE ditandai dengan septisemia akut dan fatal dengan mortalitas dan morbiditas yang tinggi dimana secara umum kerbau lebih peka dari pada sapi dan hewan muda lebih rentan dari pada hewan dewasa (De Alwis, 1999).

Pengobatan SE dengan antibiotik hanya efektif jika hewan diobati pada awal stadium sedangkan pengendalian penyakit ini melalui pengendalian faktor pemicu stres adalah sangat sulit dilakukan (Moustafa *et al.*, 2015). Metode yang efektif dan murah untuk mengendalikan wabah SE yaitu dengan cara vaksinasi (Ahmed *et al.*, 2014). Menurut De Alwis (1999)

program vaksinasi massal pada populasi sapi dan kerbau, biayanya jauh lebih kecil dibandingkan dengan kerugian yang ditimbulkan akibat penyakit SE. Metode vaksinasi sebagai metode pengendalian yang efektif dapat dibuktikan dengan bebasnya Pulau Lombok dari penyakit SE pada tahun 1985 dengan peningkatan daerah cakupan vaksinasi selama 3 tahun berturut-turut (Syamsudin, 1992).

Vaksin SE yang ideal mempunyai karakteristik mudah dan ekonomis dalam produksinya, stabil, mudah aplikasi di lapangan, tidak ada reaksi sesudah vaksinasi dan memberikan imunitas yang tinggi sekurangnya satu tahun (De Alwis, 1999). Vaksin ajuvan minyak mempunyai efikasi yang tinggi jika dibandingkan dengan jenis vaksin lainnya (Bain *et al.*, 1982). Perlindungan yang diberikan vaksin ajuvan minyak hampir satu tahun tetapi meskipun begitu vaksin ajuvan minyak memiliki beberapa kelemahan. Vaksin jenis ini memiliki viskositas yang tinggi sehingga susah diaplikasikan di lapangan. Reaksi sesudah vaksinasi seperti pembengkakan lokal, abses dan *shock* juga dilaporkan terjadi pada beberapa hewan yang divaksin dengan vaksin ajuvan minyak (Bain *et al.*, 1982)

Reaksi *shock* yang timbul sesudah vaksinasi SE menurut Bain (1982) bisa disebabkan karena adanya endotoksin bebas yang berada di dalam vaksin. Menurut Jabbari dan Moazeni Jula (2002), fase cair dalam vaksin SE merupakan penyebab terjadinya *shock* anafilaksis sesudah vaksinasi SE. Jabbari and Moazeni Jula dalam penelitiannya melakukan modifikasi pembuatan vaksin SE untuk meningkatkan keamanannya dengan cara memisahkan antigen *pasteurella* dari *broth media* (media cair) dengan cara disentrifus kemudian supernatan dibuang digantikan oleh NaCl 0.9%. Sotoodehnia *et al.* (2005) menyatakan pembuatan vaksin dengan cara ini bisa mengurangi reaksi *shock* sesudah vaksinasi.

Penelitian untuk memperoleh vaksin SE yang ideal dengan memperbaiki kualitas vaksin SE dan mengurangi *side effect* sesudah vaksinasi terus dilakukan. Pada penelitian ini akan membandingkan metode modifikasi dalam penyiapan antigen yang dapat digunakan dalam produksi vaksin SE. Vaksin SE disiapkandengan menggunakan dua jenis antigen, yaitu antigen *crude product* dan antigen murni. Antigen *crude product* merupakan keseluruhan *product* dari antigen vaksin SE dimana dalam penyiapannya tidak dipisahkan antara antigen dan supernatannya, sedangkan antigen murni dalam penyiapannya digunakan metode sentrifugasi sehingga terpisah antara antigen dan supernatannya kemudian supernatandiganti dengan NaCl 0.9%. Ajuvan yang dipakai dalam penelitian ini yaitu Montanide ISA 50 dikarenakan dalam vaksin ini membutuhkan fase antigenik yang tinggi yaitu 50%. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang perbandingan antara vaksin SE menggunakan antigen *crude product* dan antigen murni.

## TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan viskositas, keamanan dan potensi yang ditimbulkan antara vaksin SE antigen *crude product* dan vaksin SE antigen murni.

## MATERI DAN METODE

### Preparasi Bakteri Untuk Vaksin

*Seed* vaksin *Pasteurella multocida* strain Katha dikultur padamediaHIA kemudian diinkubasi di inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Satu koloni murni diambil untuk dikultur pada 400 ml CSY broth. Kultur bakteri ini kemudian diinkubasi di inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri diinaktifasi menggunakan formalin 0.5%.

### Formulasi Vaksin

**Vaksin SE antigen *crude product*.**Suspensi kuman yang sudah inaktif dan sudah diuji sterilitasnya diambil sebanyak 200 ml kemudian ditambahkan ajuvan Montanide ISA 50 dengan perbandingan 1:1.

**Vaksin SE dengan antigen murni.**Suspensi kuman sebanyak 200 ml disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit untuk mendapatkan pellet bakteri. Supernatan dibuang dan pellet bakteri dicuci dengan cara ditambahkan NaCl 0.9% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Proses ini diulang tiga kali. Suspensi yang sudah dicuci kemudian ditambah ajuvan Montanide ISA 50 dengan perbandingan 1:1. Vaksin antigen murni didapat dengan menambahkan suspensi bakteri tersebut diatas dengan ajuvan Montanide ISA 50 dengan perbandingan 1:1. Kedua formula vaksin tersebut kemudian dibuat emulsi dengan menggunakan emulsifier. Formula vaksin ditempatkan di gelas baker kemudian diemulsifikasi selama lima menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu ruang. Proses emulsifikasi tersebut dilakukan empat siklus dengan interval antar siklus lima menit.

### Pengukuran Viskositas Vaksin

Viskositas vaksin diukur menggunakan viskometer Brookfield. Masing-masing formulasi vaksin di tuang ke dalam gelas baker, spindle dipasang sampai spindle terendam sesuai batas spindle. Viskositas sampel vaksin dihitung dan dinyatakan dalam *centipoises* (cp)

## Uji Keamanan

Lima mencit diinokulasi secara intramuscular dengan 0.5 ml masing-masing vaksin kemudian diamati kematiannya selama lima hari. Vaksin dinyatakan aman apabila semua mencit tersebut dalam keadaan hidup tanpa menunjukkan gejala abnormal. Gejala abnormal yang dimaksud yaitu demam, depresi, anoreksia, ataksia dan sianosis pada ekstremitas dan kerak pada sekitar hidung dan mata.

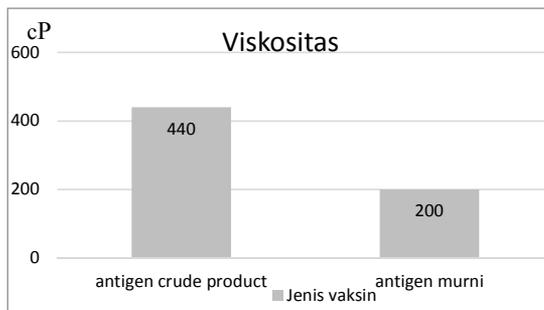
## Uji Potensi

Uji potensi menggunakan *Active Mouse Protection Test* yang dilakukan berdasarkan metode Ose and Muenster (1968). Penghitungan Uji Potensi pada kelompok vaksin SE antigen *crude product* dan vaksin SE dengan antigen murni dihitung menggunakan metode Spearman Karber.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji Viskositas

Uji viskositas dilakukan untuk mengukur kekentalan vaksin. Hasil pengukuran viskositas vaksin SE antigen *crude product* dan vaksin SE antigen murni dengan viskometer Brookfield menunjukkan viskositas vaksin SE antigen *crude product* adalah 440 Cp sedangkan vaksin SE antigen murni adalah 200 Cp. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin SE antigen murni yang disiapkan dengan tehnik pemisahan antigen dengan supernatan mempunyai viskositas yang lebih rendah dibandingkan dengan vaksin SE antigen *crude product* yang tidak dipisah antigen dengan supernatannya.



Gambar 1. Viskositas vaksin SE antigen *crude product* dan SE antigen murni

Vaksin SE antigen *crude product* disiapkan tanpa mengganti media cair, dimana didalam media tersebut terdapat karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, vitamin, pepton dan asam amino, serum serta logam dan garam-

garam anorganik sebagai *trace elements* seperti Ca, Mn, Na, Mg, Zn, Co, Fe, Cu (Sutarma, 2000). Zat-zat tersebut mempengaruhi viskositas yang menyebabkan viskositas vaksin SE antigen *crude product* menjadi lebih tinggi jika dibandingkan dengan vaksin SE antigen murni yang hanya berisi antigen dan NaCl.

Viskositas vaksin juga berhubungan dengan struktur surfaktan yang digunakan dan nilai *hydrophilic/lipophilic balance* (HLB). Nilai HLB memberikan informasi tentang afinitas antara fase antigenik dan fase minyak. Nilai HLB yang rendah akan membuat fase minyak mempunyai afinitas yang tinggi dan emulsi cenderung menjadi *water in oil* (W/O) dimana fase antigenik akan terdispersi dalam fase minyak (Aucounturier *et al.*, 2001). Semakin tinggi fase antigenik akan menyebabkan peningkatan fase terdispersi dan membuat peningkatan viskositas pada emulsi. Pada vaksin SE antigen murni penggantian supernatan dengan NaCl 0.9% dapat menurunkan fase terdispersi sehingga menyebabkan viskositasnya menjadi lebih rendah dibandingkan dengan vaksin SE antigen *crude product*.

Pembuatan vaksin SE dengan cara dipisah antara antigen dengan supernatannya dandigantikan dengan NaCl 0.9%, dapat mengurangi viskositas vaksin. Rendahnya viskositas menyebabkan vaksin lebih mudah disedot ke dalam spuit, mempermudah aplikasi di lapangan dan mengurangi efek kebengkakan lokal pada daerah suntikan.

## Uji Keamanan

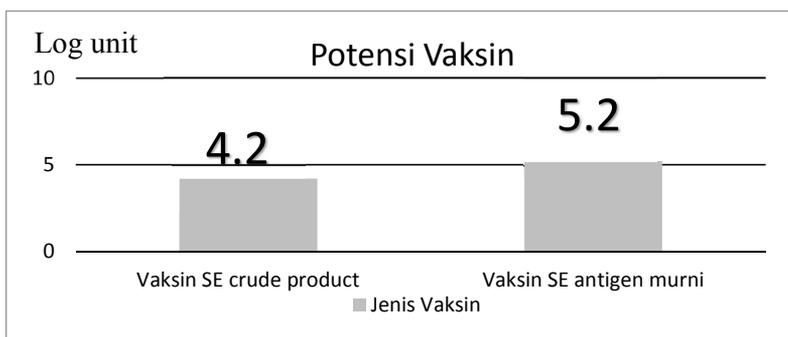
Pada penelitian ini pengamatan pada uji keamanan didapatkan hasil bahwa tidak ditemukan reaksi *shock* anafilaksis, demam, depresi ataupun kematian pada seluruh kelompok mencit. Reaksi di tempat suntikan diamati terdapat pada satu mencit dari kelompok vaksin SE antigen *crude product* sedangkan pada kelompok mencit antigen murni tidak terdapat reaksi di tempat penyuntikan.

*Pasteurella multocida* merupakan bakteri gram negatif dimana dinding sel nya terdapat LPS yang merupakan endotoxin yang bisa menyebabkan reaksi anafilaksis pada hewan (Harper *et al.*, 2011). Media cair dari kultur berisi nutrisi-nutrisi yang sudah tidak diperlukan, sel-sel yang lisis, LPS bebas dan juga formalin yang digunakan sebagai inaktivan (Jabbari dan Moazeni Jula, 2002). LPS yang terdapat pada dinding sel menjadi agen yang akan akan menginduksi produksi IgE. Antibodi ini ditampilkan pada permukaan sel mast dan basophil, sehingga akan dilepaskan mediator anafilaksis, karena itu kadang terjadi reaksi *shock* anafilaksis setelah pemberian vaksin SE (Morrison dan Rayan, 1987). Metode pemisahan antara media cair dan antigen dengan sentrifugasi kemudian mengganti dengan NaCl 0.9% dapat memisahkan dan membuang komponen-komponen

tersebut sehingga bisa meningkatkan keamanan vaksin dan mengurangi reaksi *shock* anafilaksis setelah vaksinasi. Hal ini dibuktikan dengan tidak adanya kematian atau reaksi anafilaksis pada mencit. Hasil dari penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Jabbari dan Moazeni Jula (2002) yaitu dengan metode pemisahan antigen dan media cair dapat meningkatkan keamanan vaksin dan tidak menimbulkan reaksi *shock* anafilaksis atau inflamasi lokal pada daerah suntikan.

## Uji Potensi

Uji potensi AMPT dilakukan berdasarkan metode Ose and Muenster (1968). Uji potensi vaksin dilakukan dengan uji AMPT. Penghitungan LD<sub>50</sub> dilakukan menggunakan metode Spearman dan Karber. Hasil penghitungan LD<sub>50</sub> terdapat pada Tabel 6. Hasil uji AMPT perbedaan log unit antara mencit yang divaksin dan tidak divaksin adalah 4.2 untuk vaksin SE antigen *crude product* dan 5.2 untuk vaksin SE antigen murni. Hasil uji potensi menggunakan metode AMPT disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil potensi vaksin SE antigen *crude product* dan antigen murni

Uji AMPT merupakan uji yang praktis untuk menguji vaksin SE (De Alwis, 1999), uji AMPT ini dipertimbangkan digunakan untuk menggambarkan imunogenitas dari *batch* vaksin yang diproduksi. Vaksin SE dipersyaratkan memenuhi perbedaan nilai LD<sub>50</sub> antara kelompok mencit yang di vaksin dengan tidak divaksin tidak kurang dari 10<sup>4.0</sup>. Potensi vaksin bisa dipengaruhi oleh beberapa hal, termasuk ajuvan yang digunakan. Ajuvan akan mempengaruhi keefektifan vaksin. Ajuvan mempunyai *depot effect* pada tempat suntikan yang akan melepaskan antigen secara perlahan-lahan dan akan menstimulasi respon imun untuk memproduksi antibodi secara terus-menerus (Sivakumaret al., 2011).

Potensi vaksin dipengaruhi juga oleh kestabilan emulsi vaksin. Pada penelitian ini digunakan ajuvan minyak yang merupakan emulsi *water in*

*oil* dimana fase air akan terdispersi di dalam fase minyak. Emulsi vaksin yang stabil akan menjaga fase air akan tetap terdispersi didalam fase minyak sehingga ketika disuntikkan antigen dalam vaksin akan dilepaskan secara perlahan-lahan. Pada penelitian ini vaksin SE antigen *crude product* dan vaksin SE antigen murni mempunyai perbedaan LD<sub>50</sub> antara mencit yang divaksin dan tidak divaksin diatas standar minimal potensi yang berarti kedua jenis vaksin ini memenuhi syarat minimal potensi yang dipersyaratkan.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Vaksin SE antigen *crude product* dan vaksin SE antigen murni aman digunakan pada hewan. Vaksin SE antigen murni mempunyai viskositas yang lebih rendah daripada vaksin SE antigen *crude product* tetapi potensi vaksin SE antigen murni lebih tinggi dibandingkan dengan vaksin SE antigen *crude product*

### Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui perbandingan durasi imunitas dan titer antibodi yang ditimbulkan oleh vaksin SE antigen *crude product* dan vaksin SE antigen murni.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aucouturier, J., Dupuis, L., Ganne, V., 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19. 2666-2672.
- Bain, R.V.S., De Alwis, M.C.L., Carter, G.R and Gupta, B.K. 1982. Haemorrhagic Septicaemia. In: *FAO Animal Production and Health Paper 33*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Italy. 11-33
- De Alwis M.C.L .1999. Haemorrhagic septicaemia. *ACIAR Monograph no 57*. Australian Centre for International Agriculture Research. Canberra. Australia.
- Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid 1 (Sediaan Biologik). 2013. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Jakarta.
- Harper, M., Cox, A.D., Adler, B., Boyce, J.D. 2011. *Vet Microbiol* 153:109-115.

- Jabbari, A.R., Moazeni Jula, G.R., 2002. Improvement of haemorrhagic septicaemia vaccine by removing of anaphylactic agents. *Arch Razi Ins*; 54: 85-89.
- Morrison, D.C., Rayan, J.L., 1987. Endotoxins and disease mechanism. *Annual review of medicine*. 38:417-432.
- Moustafa, A.M., Ali, S.N., Bennett, M.D., Hyndyman, T.H., Robertson, I.D. 2015. A case-control study of heamorrhagic septicemia in buffaloes and cattle in Karachi, Pakistan, in 2012. *Trans Emerg Dis*, doi: 10.1111/tbed.12393.
- Ose, E.E., and Muenster, O.A., 1968. A method of evaluating vaccines containing *Pasteurella multocida*. *American Journal of Veterinary Research*, 29, 1863-1866.
- Sivakumar, S.M., Safhi, M.M., Kannadasan, M., Sukumaran, N., 2011. Vaccine adjuvants-current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi pharmaceutical journal* 19:197-206.
- Sotoodehnia , A., Moazeni, G., Ataei, S., Omid, B. Study on Immunity of an Experimental Oil Adjuvant Haemorrhagic Septicaemia Vaccine in Cattle. 2005. *Arch. Razi Ins*. 59 95-101.
- Sutarma. 2000. Kultur media bakteri. *Temu tehnis fungsional non peneliti*. 52-57.
- Syamsudin, A. 1992. In: B.E. Patten, TL. Spencer, R.B. Johnson, D. Hoffmann and L. Lehane (eds), *Pasteurellosis in Production Animals*, An international workshop held at Bali, Indonesia, 10-13 August 1992. *ACIAR Proceedings No. 43*, 180.