

DETEKSI VIRUS *HOG CHOLERA* DENGAN *END METHOD*

KETUT KARUNI NYANAKUMARI NATIH, NENI NURYANI,
DODO HERMAWAN, DAN JARULALAM

Unit Uji Virologi

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor 16340

ABSTRAK

Telah dilakukan pengujian kandungan virus vaksin *Hog Cholera* aktif dengan *END method* di Balai Besar Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH). Metode ini merupakan salah satu cara untuk identifikasi virus *Hog Cholera* (HC) yang bersifat non sitopatik pada biakan sel PK-15. Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan vaksin yang diencerkan secara seri dengan kelipatan 10 kali pada sel PK-15. Empat hari setelah inkubasi sel ditambahkan virus ND strain Myadera. Pengamatan terhadap terjadinya proses netralisasi virus HC oleh virus ND dilakukan sampai hari ke-7. Hasil terlihat terjadi netralisasi pada pengenceran vaksin 10 kali yang ditandai dengan tidak terbentuknya efek sitopatik pada sel.

Kata kunci: *Hog Cholera*, *END Method*, PK-15

ABSTRACT

Viral content Assay of Hog Cholera viral using END method has been done in National Veterinary Drug Assay Laboratory. This method is one of tools to identify Hog Cholera (HC) virus which is non cytopathic in PK-15 culture. This assay was done by inoculating 10-time serial diluted vaccine to PK-15 culture. Four days after incubating, ND virus strain Myadera was added. Observation of HC virus neutralization against ND virus was done until day of 7. The result indicated neutralization of 10- time serial diluted vaccine by showing non cytopathic effect in culture cell

Key words: *Hog Cholera*, *END Method*, PK-15

PENDAHULUAN

Hog Cholera (HC) disebut juga *classical swine fever*, *peste du porc*, *colera porcina*, dan *Virusschweinepest* adalah penyakit viral pada babi yang sangat menular. Infeksi dapat terjadi dalam keadaan akut, sub akut, menahun, dan atipikal atau sub klinis. *Hog cholera* disebabkan oleh virus virulen yaitu *Virus Hog Cholera* (VHC) yang termasuk dalam genus *Pestivirus* famili *Flaviviridae*. Virus HC yang menyerang semua golongan umur babi ini, mempunyai hubungan antigenik yang dekat dengan *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) dan *Border Disease Virus* (BDV). Virus HC memiliki ukuran 40-50 nm, dengan nukleokapsid berukuran 29 nm. Virus HC merupakan virus RNA rantai tunggal bersifat infeksius dan memiliki dua macam glikoprotein yang terletak pada selubung virus. Penyakit HC biasanya menyebabkan angka kesakitan dan kematian tinggi, sedangkan infeksi dengan virus virulensi rendah dapat tidak teramati (2,13).

Masa inkubasi penyakit HC biasanya antara 3 sampai 4 hari tapi umumnya antara 2 sampai 14 hari. Gejala klinis HC dibagi 3 fase, yaitu: fase 1 atau akut, yang ditandai

anoreksia, depresi, lesu, malas bergerak, demam tinggi, radang selaput lendir mata disertai eksudat serous atau mukopurulen, gangguan pencernaan berupa konstipasi kemudian diare kekuningan, gerakan tubuh sempoyongan, timbulnya bercak-bercak merah keunguan pada daun telinga, abdomen dan kaki bagian medial dan terjadinya leukopenia. Tingkat kematiannya sangat tinggi dan biasanya terjadi antara 10-20 hari. Gejala klinis bentuk fase 2 atau sub akut hampir sama dengan gejala bentuk akut, tetapi lebih ringan dan penyakitnya berjalan lebih lambat. Bila hewan dapat bertahan hidup lebih dari 30 hari, penyakitnya akan berjalan secara kronis. Fase 3 atau kronis, ditandai dengan membaiknya kondisi, nafsu makan, suhu tubuh normal atau sedikit meningkat dan leukopenia. Pada fase 3 ini, hewan juga bisa kembali tampak menderita, anoreksia, depresi, suhu meningkat dan akhirnya mati (3,13,16). Virus HC yang virulensinya rendah dapat menimbulkan gangguan reproduksi, karena virus tersebut dapat mencapai fetus sehingga mengakibatkan abortus, mumifikasi, atau lahir dalam keadaan lemah (13,15).

Hog Cholera saat ini tersebar luas di seluruh dunia, tetapi ada beberapa negara yang dinyatakan bebas HC

yaitu Australia, Kanada, Inggris, Islandia, Irlandia, Selandia Baru, negara-negara Skandinavia, Swiss, dan Amerika Serikat (15).

Kejadian HC di Indonesia dimulai pada awal tahun 1995 menyerang ternak babi di Sumatera Utara, Sumatera Barat, Riau, Jambi, DKI, Jawa Tengah, Kalimantan Barat, Bali, Sulawesi Utara, Sulawesi Selatan, Nusa Tenggara Timur dan Timor Timur. Sarosa dkk. (1998) berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi virus HC terhadap wabah penyakit di Sumatera, DKI, Kalimantan dan Sulawesi (8).

Wabah HC sangat merugikan perekonomian karena pemberantasan penyakit ini memerlukan biaya yang sangat besar. Pemberantasan penyakit umumnya dilakukan dengan sistem *stamping out*, disertai dengan penerapan Undang-Undang Veteriner dan sanitasi lingkungan yang ketat. Pengendalian HC di Indonesia dengan melakukan vaksinasi secara rutin dengan menggunakan vaksin yang sudah dilemahkan melalui pasase berulang-ulang pada kelinci (galur C) atau dilemahkan melalui biakan sel secara berulang-ulang (galur *Japanese GPE*) (13).

BBPM SOH telah melakukan pengujian mutu vaksin HC aktif, salah satunya adalah menguji kandungan virus dalam vaksin. Kandungan virus dititrasikan pada biakan jaringan yang peka (1). Virus HC tidak menyebabkan kerusakan pada biakan jaringan atau sel (non sitopatik) sehingga diperlukan suatu metoda yang dapat mengukur titer virus pada biakan jaringan.

Telah dikembangkan suatu metode untuk mendeteksi virus HC pada biakan jaringan dengan *END Method* (metoda *Exalting Newcastle Disease*) yang pada prinsipnya apabila biakan sel diinfeksi dengan virus HC, tidak timbul kerusakan sel atau efek sitopatik (CPE), kemudian bila dilakukan infeksi tambahan dengan virus ND maka akan timbul kerusakan sel/CPE (12).

MATERI DAN METODE

Materi

Materi yang digunakan adalah vaksin HC aktif strain LOM, biakan jaringan PK-15, Media L-15, *Penicillin* dan *Streptomycin* (PS), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Fetal Bovine Serum* (FBS), dan virus *New Castle Disease* (ND) strain Myadera.

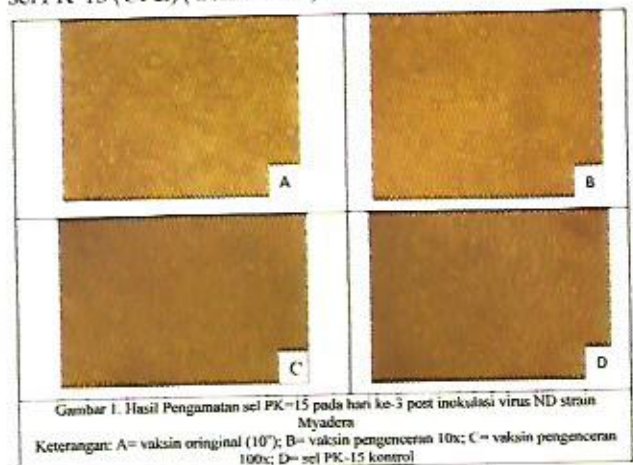
Peralatan yang digunakan adalah *microplate* 96 well steril, pipet volumetrik, pipet *single channel*, botol duran, tabung sentrifus, tabung titrasi, rak titrasi, wadah dan es, sentrifus, mikroskop *inverted*, dan *Biosafety Cabinet* (BSC).

Metode

Metode yang digunakan adalah pengembangan metode dari Sasahara (1971). Vaksin HC 1 dosis diencerkan secara seri kelipatan 10 dari 10^{-1} sampai 10^{-8} dengan media tanpa FBS, kemudian masukkan masing-masing pengenceran sebanyak 25 μ l per lubang *microplate*, kemudian ditambahkan sel PK sebanyak 100 μ l per lubang. Setelah inkubasi selama 4 hari dalam inkubator suhu 37°C dengan 5% CO_2 , ditambahkan virus ND strain Myadera (200 TCID_{50}) sebanyak 100 μ l per lubang. Inkubasi dilanjutkan sampai 7 hari dan dilakukan pengamatan dengan terjadinya kerusakan pada sel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan titrasi virus vaksin HC pada sel PK-15 selama 4 hari tidak ditemukan adanya CPE. Pengamatan hari ke-3 setelah penambahan virus ND strain Myadera terlihat bahwa pada vaksin original (10^0) (Gambar 1A) dan pengenceran vaksin $10 \times$ (Gambar 1B) kondisi sel PK-15 masih sama seperti pada sel PK-15 kontrol (Gambar 1D). Sedangkan pada pengenceran $100 \times$ terlihat ada perubahan sel PK-15 (CPE) (Gambar 1C).



Secara konvensional, diagnosa HC dibuat berdasarkan gejala klinis, perubahan gambaran darah dan patologi. Diagnosa HC dapat dilakukan tidak hanya berdasarkan pada gejala klinis yang timbul, tetapi juga harus didukung dengan analisis laboratorium yaitu isolasi dan identifikasi virus, sehingga akan diperoleh hasil yang lebih baik dan akurat. Menurut Pearson (1992), gejala klinis hanyalah sebagai langkah awal penetapan diagnosa HC. Metoda konvensional masih menjadi *gold standard* untuk isolasi dan identifikasi virus HC, walaupun metoda cepat seperti teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah dikembangkan oleh Liu dkk. (1991).

Diagnosis secara laboratorium terhadap penyakit HC dapat dilakukan dengan teknik *Fluorescent Antibody Technique* (FAT) pada preparat jaringan yang terserang atau isolasi virus pada biakan sel lestari PK-15 yang juga diwarnai dengan *fluorescent conjugated HC antiserum* (7,15). Sarosa dkk (1998) berhasil mengisolasi virus HC dari wabah penyakit babi yang menyerang daerah Kapuk (Jakarta), Pontianak (Kalimantan Barat), Palopo dan Toraja (Sulawesi Selatan), Pekanbaru (Riau) dan Jambi. Identifikasi virus dilakukan dengan teknik *Immunoperoxidase Monolayer Assay* (IPMA). Hasil isolasi dan identifikasi virus ini juga didukung deteksi antigen dengan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), gejala klinis, perubahan patologik serta morbiditas dan mortalitas yang cukup tinggi. Teknik IPMA tidak memerlukan mikroskop *fluorescent*, cukup dengan mikroskop biasa, bahkan kalau hasilnya bagus dapat dilihat tanpa mikroskop (dapat dilihat dengan kasat mata). Teknik pewarnaan immunoperoxidase memang merupakan teknik diagnosis yang praktis untuk mendeteksi, terutama sekali untuk beberapa jenis virus yang tidak menimbulkan kerusakan pada biakan sel (non sitopatik), tetapi diperlukan antibodi monoklonal.

Selain itu, deteksi virus pada biakan sel juga dapat dilakukan dengan metoda *Exalting Newcastle Disease* (END), yang dikembangkan pertama kali oleh Shimizu dkk. (1964) yang pada prinsipnya apabila biakan sel diinfeksi dengan virus HC (tidak timbul kerusakan sel atau efek sitopatik), kemudian dilakukan infeksi tambahan dengan virus ND maka akan timbul kerusakan sel.

Menurut Sasahara (1970), metode biakan jaringan dalam bidang virologi untuk pengembangan *END method* sebagai dasar pengujian secara *in vitro*. Virus HC dipropagasi pada sel original dari babi. Walaupun virus HC dapat memperbanyak diri pada sel non babi, sel ginjal babi adalah yang paling sering dipergunakan untuk pertumbuhan virus. Umumnya virus HC tidak menimbulkan efek sitopatik pada biakan jaringan, sehingga diperlukan suatu indikator untuk menunjukkan keberadaan virus HC tersebut. *Exaltation phenomenon*, *interference phenomenon* dan FAT adalah metode untuk mendeteksi virus HC pada biakan jaringan. Mekanisme untuk meningkatkan replikasi virus ND virus pada sel *swine testicle* (ST) yang diinfeksi dengan virus HC dengan *END phenomenon* juga diteliti dan dikembangkan oleh Toba dkk (1971). *END Method* juga digunakan pertama kali oleh Inaba dkk (1963) untuk mendeteksi keberadaan virus diare pada sapi karena kurangnya patogenitas hewan laboratorium dan tidak ada efek sitopatik pada sel. Lima strain sapi END (BEND) diisolasi sapi dan sifat virusnya menimbulkan efek sitopatik pada sel. *END method* ini

ternyata berhasil diaplikasikan untuk mendeteksi dan mengukur virus BEND sama halnya seperti pada HC (4).

Informasi saat ini sebagai upaya pengendalian penyakit HC, telah dilakukan dengan cara vaksinasi menggunakan vaksin aktif. Strain vaksin yang beredar di Indonesia adalah strain Cina, Kitasato, GPE, dan LOM. Strain China termasuk strain HC yang ganas seperti strain Weybridge (Inggris), Diepholz/1969 (Jerman), Brescia (Brazil), ALD, Nigata/1966, Hokkaido/1966, Yamanashi/1969, dan Fukuoka/1977 (Jepang) (6), strain HC yang tidak ganas adalah strain Baker A (Amerika Serikat), NSW (Australia), 333, GPE (Jepang) (6,11). Sehingga BBPMSOH harus mampu melakukan perannya untuk menjamin kualitas vaksin HC yang beredar di Indonesia.

KESIMPULAN

Pengujian mutu kandungan virus vaksin Hog Cholera aktif dengan *END Method* dapat digunakan selain metoda FAT dan IPMA.

DAFTAR PUSTAKA

1. [Ditjennak]. Direktorat Jendral Peternakan. 2007. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid I (Sediaan Biologik). Edisi 3. Departemen Pertanian Republik Indonesia. Hlm: 111-112.
2. Dulac GC. 2004. Hog Cholera. http://www.vet.uga.edu/vpp/gray_book/Hand-held/hoc.htm [diunduh 3 Mei 2004]
3. Harkness JW. 1985. Classical swine fever and its diagnosis: A current review. *Vet. Rec.* 116: 288-293.
4. Inaba Y, Omori T, Kumagai T. 1963. Detection and measurement of noncytopathogenic strains of virus diarrhea of cattle by the END method. *Archives of Virology*. 13 (4): 425-429.
5. Liu ST, Li SN, Wang DC, Chang SF, Chiang SC, Ho WC, Chang YS, Lai SS. 1991. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*. 35(2): 227-236.
6. Nakamura S, Sahara J, Shimizu M, Shimizu Y. 1983. Replication of Hog Cholera virus in porcine alveolar macrophage cultures. *Vet. Bull.* 54(7):57-
7. Pearson JE. 1992. Hog Cholera diagnostic technique. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15(3): 213-222.

8. **Pudji Kurniadhi. 2000.** Teknik Pewarnaan immunoperoxidase untuk diagnosis penyakit Hog Cholera. Temu Teknis Bon Peneliti Fungsional. Hlm 24-28.
9. **Sahara J. 1970.** Hog Cholera: Diagnosis and prophylaxis. Nat. Inst. Animal. Hlth Quart. 10, supp. Page: 57-81.
10. **Sarosa A, Tarigan S, Syaffriati T, S. Bahri S. 1998.** Isolasi dan identifikasi virus penyebab wabah penyakit hog cholera dari beberapa daerah di Indonesia 1995-1998. Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner Puslitbang Peternakan. Hlm: 896-903.
11. **Shannon AD, Morrissy C, Mackintosh SG, Westbury HA. 1993.** Detection of Hog Cholera antigen in experimentally infected pigs using an antigen capture ELISA. Ve
12. **Shimizu T, Kumagai T, S. Ikeda S, M. Matumoto M. 1964.** A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HIC virus on Newcastle Disease virus in swine tissue culture. III END netralization test. *Arch. Ges. Virusforsch.* 14: 215-226.
13. **Terpstra C. 1991.** Hog Cholera: An update of pesent knowledge. *Br. Vet. J.* 147: 397-406.
14. **Toba M, Matumoto M. 1971.** Mechanism of enhancement of newcastle disease virus growth in cultured cells by co-infecting hog cholera virus. *Archives of Virology.* 34(4): 310-322,
15. **Van Oirschot JT. 1986.** Hog cholera. In: Diseases of Swine. 6 b Ed. Iowa State University Press. Page: 247-285.
16. **Williams DR, Matthews D. 1988.** Outbreaks of classical swine fever in Great Britain in 1986. *Vet. Rec.* 122: 479-483.