

## PENGAJIAN PEMBUATAN VAKSIN *INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS (IBR)* KERJASAMA ALIH TEKNOLOGI DENGAN BALAI BESAR PENELITIAN VETERINER

Sri Susila A<sup>1</sup>, Rosmalina S.D.D<sup>1</sup>, Sri Sugiharti<sup>1</sup>, Muharam S<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Veteriner Farma

<sup>2</sup>Balai Besar Penelitian Veteriner

### ABSTRAK

Pusat Veteriner Farma (Pusvetma) melakukan kerjasama alih teknologi produksi vaksin *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) dengan Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLitvet). Virus IBR isolat lokal BHV-1.1 (N60521T/Jabar/07) dibiakkan pada sel *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK) dan dinaktifasi dengan *Sodium Askorbat* dan Tembaga (II) Sulfat. Vaksin berbentuk emulsi mengandung virus IBR minimal 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml dengan ajuvan *Montanide*. Hasil uji sterilitas menunjukkan bahwa vaksin steril terhadap bakteri, jamur dan mikoplasma. Hasil uji toksisitas abnormal pada hewan coba tidak menunjukkan gejala gangguan syaraf atau tremor. Hasil uji potensi menunjukkan bahwa tidak kurang dari 80% hewan coba mengandung titer antibodi lebih dari pengenceran 1:2. Hasil uji stabilitas vaksin pada suhu 37°C selama 1 minggu menunjukkan bahwa tidak kurang dari 80% hewan coba mengandung titer antibodi lebih dari pengenceran 1:2. Vaksin IBR yang diproduksi Pusvetma sudah memenuhi syarat dan akan dilakukan uji lapang terhadap hewan target yaitu sapi.

Kata kunci : Vaksin IBR, uji sterilitas, uji toksisitas abnormal, uji potensi, uji stabilitas

### PENDAHULUAN

Dalam rangka pengembangan ternak sapi di Indonesia, penyakit hewan yang bersifat menular dan mengganggu sistem reproduksi ternak merupakan kendala yang harus segera diatasi karena dapat mengakibatkan keguguran, penurunan fertilitas, bahkan kemajiran ternak. Menurut Surat Keputusan Menteri Pertanian No. 4026/Kpts/OT.140/3/2013, penyakit IBR termasuk 22 Penyakit Menular Strategis. Secara serologik telah terbukti penyakit ini tersebar hampir di seluruh propinsi di Indonesia dengan *sero prevalensi* 5-72,9 % dan telah menginfeksi sapi perah, sapi potong, dan kerbau di Indonesia (Sarosa, 1985). Penyakit IBR/IPV akan lebih mudah menyebar pada sapi yang sedang ditransportasikan serta yang dikandangkan secara padat/ berdesak-desakan, seperti yang dilaporkan oleh *Van Donkersgoed* and *Babiuk* (1991). Pada pengendalian penyebaran penyakit IBR, pemusnahan hewan secara serologik positif terhadap IBR merupakan langkah yang seringkali digunakan, tetapi pemusnahan terhadap sapi bibit akan mengakibatkan populasi sapi di Indonesia terus menurun sehingga untuk mencegah terjadinya penyebaran penyakit IBR yaitu dengan cara vaksinasi. Pemakaian vaksin inaktif dapat menghambat *re-ekskresi* virus pada saat terjadinya re-aktifasi dan infeksi laten. Pencegahan penularan terhadap penyakit ini dilakukan dengan program vaksinasi. Vaksin digunakan untuk mencegah perkembangan gejala klinis dan mengurangi *shedding* virus setelah infeksi (OIE, 2010). Pusat Veteriner Farma (Pusvetma) bekerjasama dengan Balai Besar Penelitian Veteriner (BBalitvet) dalam pembuatan vaksin IBR dan telah dilakukan alih teknologi dalam pembuatan vaksin.

## TUJUAN

Pengkajian ini bertujuan untuk menghasilkan vaksin *IBR* isolat lokal yang dibuat oleh Pusvetma. Sebelum dilakukan uji pada hewan target (sapi), sangat perlu dilakukan uji toksisitas abnormal dan potensi pada hewan coba seperti mencit dan marmut terhadap vaksin tersebut. Bibit vaksin (seed vaksin) dan metoda pembuatan serta pengujian berasal dari BBLitvet.

## MATERI DAN METODE

### Materi

1. Sampel  
Sampel adalah suspensi virus *IBR* isolat lokal BHV-1.1 (N60521T/Jabar/07) sebagai bahan untuk membuat vaksin.
2. Bahan dan alat  
Alat yang dipakai meliputi botol roux disposable, pipet, tabung sentrifus, inkubator suhu 37°C, Biosafety Cabinet Class II (BSC), deep freezer suhu minus 80°C, serta kandang hewan coba. Hewan coba yang digunakan adalah mencit dan marmut. Bahan yang dipakai meliputi Sel Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), media DMEM, Foetal Bovine Serum, Asam askorbat, Tembaga (II) sulfat, thiomersal, antibiotik.

### Metoda

1. Uji sterilitas  
Media, dan suspensi virus diuji menggunakan *thyoglicolate*
2. Pengembangan sel *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK)  
Sel yang akan diperbanyak dibuang medianya lalu dicuci dengan PBS-sebanyak 2 kali, selanjutnya ditambahkan *versen trypsin*. Setelah sel lepas dari botol, kemudian dihomogenisasi dengan media penumbuh. Sel dibagi ke dalam botol *roux* yang baru dan diberi media baru, kemudian sel diinkubasi ke dalam inkubator 37°C, selanjutnya kultur jaringan diamati tiap hari dibawah mikroskop.
3. Pengembangan virus BHV-1.1  
*Working seed* virus *IBR* BHV- 1.1 disiapkan untuk inokulasi pada sel MDBK untuk pengembangbiakan virus. Virus *IBR* diinokulasikan ke dalam kultur sel MDBK, dengan ditambahkan FBS sebagai media suplemen pada media pertumbuhan virus kemudian diinkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 4-5 hari, dan diamati setiap hari.. Hal ini ditandai dengan adanya sel berkelompok seperti anggur yang mengelilingi sel monolayer, terkadang terbentuk sel raksasa.

4. Panen virus  
Virus dipanen dengan cara *freeze-thaw* sebanyak 3 kali, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya ditampung pada botol laboratorium.
5. Titrasi virus IBR  
Virus yang telah dipanen diencerkan  $10^1$  sampai  $10^{10}$ , Selanjutnya masing masing pengenceran diinokulasikan ke dalam sel MDBK. Kemudian diamati selama 4 hari. Perhitungan titer berdasarkan adanya *Cytophatic Effect* (CPE) pada sel MDBK.
6. Inaktifasi Suspensi Virus BHV- 1.1  
Suspensi virus IBR perlahan-lahan ditambah dengan larutan *Natrium askorbat* dan larutan Tembaga (II) sulfat kemudian diinkubasi didalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 72–80 jam sambil terus diaduk. Selanjutnya suspensi virus tersebut didinginkan pada suhu  $1,5-7^{\circ}\text{C}$  dan pH diatur hingga 7,2-7,4. Tahap berikutnya adalah penambahan larutan *Saponin* dan larutan *Thymerosal* perlahan-lahan setetes demi setetes kemudian dimasukkan dalam *cool room* atau *refrigerator* selama 72–80 jam sambil terus diaduk. Suspensi tersebut dapat disimpan pada suhu  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
7. Pengujian suspensi virus yang telah diinaktifasi  
Suspensi virus yang telah inaktif, dilakukan dialisa. Setelah itu dilakukan inokulasi pada sel MDBK. Suspensi virus telah inaktif, jika pada sel MDBK tidak ditemukan CPE.
8. Penambahan adjuvan  
Suspensi virus yang sudah inaktif ditambahkan *Adjuvant Montanide ISA 70* dengan konsentrasi 70% sambil terus diaduk dengan kecepatan 1000 rpm kemudian ditambahkan antibiotik dengan konsentrasi  $50\ \mu\text{g/ml}$  dan diputar dengan kecepatan 2000 rpm.
9. Pembotolan vaksin  
Pembotolan siap dilakukan pada vaksin serta akan dilakukan beberapa pengujian dengan hewan percobaan.
10. Penyimpanan vaksin  
Vaksin harus disimpan pada suhu  $2-8^{\circ}\text{C}$
11. Pengujian Vaksin Pada Hewan Coba
  - a. Uji Toksisitas abnormal  
Sepuluh ekor mencit disuntik dengan vaksin IBR sebanyak 0,5 ml tiap ekor secara *intraperitoneal*. Pengamatan dilakukan selama 7 hari terhadap gejala abnormal pada mencit.  
Dua ekor marmut dengan berat badan tidak kurang dari 300 gram disuntik dengan vaksin IBR sebanyak 2 ml secara *intramuscular*. Pengamatan dilakukan selama 7 hari terhadap gejala abnormal pada marmut.
  - b. Uji Serum Netralisasi  
Serum marmut yang telah diinaktifasi, diencerkan 1:2. 1:4. 1: 8. 1:16. Setelah itu ditantang dengan virus IBR, menggunakan titer 100  $\text{TCID}_{50}/50\ \mu\text{l}$ . Diinkubasi selama 1 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Kemudian

diinokulasikan pada sel MDBK yang telah ditumbuhkan di mikroplate 96 well. Kemudian diamati selama 7 hari pada suhu 37°C.

- c. Uji Stabilitas dan potensi  
Vaksin IBR dimasukan kedalam inkubator pada suhu 37°C selama tujuh hari. Kemudian vaksin tersebut disuntikkan pada 5 ekor marmut dengan berat badan tidak kurang dari 300 gram, sebanyak 0,5 ml pada secara *intramuscular*. Setelah tiga minggu dilakukan *booster* dengan menyuntik marmut tersebut sebanyak 0,5 ml secara *intramuscular*. Setelah tujuh hari tiap hewan marmut diambil darahnya untuk dilakukan Serum Netralisasi Tes.
- d. Uji Sterilitas  
Vaksin IBR diinokulasikan sebanyak 1 ml ,masing masing pada empat tabung yang berisi 20 ml media TGC. Dua tabung TGC yang telah diinokulasi, diinkubasikan pada suhu 22°C selama 14 hari dan 2 tabung media TGC lainnya diinkubasikan pada 37°C selama 14 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14.

Media HIA yang telah diinokulasikan, semua diinkubasikan pada suhu 37°C selama 7 hari. Sediaan biologik dinyatakan memenuhi persyaratan apabila tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan fungi dalam media yang digunakan.

## HASIL

Sel *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK) yang dipakai untuk menumbuhkan virus IBR dengan media penumbuh sel (media DMEM). Sebagai media suplemen ditambah *Foetal Bovine Serum* 5 % dari jumlah media yang digunakan. Hasil inokulasi virus IBR ke dalam kultur sel MDBK yang diinkubasi pada inkubator suhu 37°C, dengan pengamatan setiap hari *Cytophatic Effect* (CPE) muncul pada hari kedua dan ketiga. Timbulnya CPE ditandai dengan adanya sel yang berkelompok seperti anggur yang mengelilingi sel monolayer, kadang kadang terbentuk sel giant. Titer dari virus IBR yang telah dipanen adalah  $10^{6.3}$  TCID 50/ml. Virus dipanen dengan cara melakukan *freeze dan thaw* sebanyak tiga kali , kemudian disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya supernatan yang mengandung virus IBR ditampung.

Inaktifasi virus dilakukan dengan ditambah larutan *Natrium askorbat* sambil terus diaduk dan larutan *Tembaga (II) sulfat*. Selanjutnya dilakukan penambahan larutan *Saponin* dan larutan *Thymerosal* dan terakhir ditambahkan Gentamicin. Suspensi virus yang sudah diinaktifasi dilakukan uji inaktifasi dengan diinokulasikan pada sel *MDBK* dan diamati selama 7 hari, hasil uji inaktifasi ditandai dengan tidak adanya CPE. Setelah dilakukan formulasi, vaksin diuji sterilitas dengan menggunakan media *Thyoglicolate* dan HIA. Dengan pengamatan selama 14 hari. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa vaksin tersebut steril, dan untuk selanjutnya akan dilakukan uji laboratorium

dengan melakukan uji toksisitas abnormal pada mencit dan marmut serta uji potensi dan stabilitas vaksin pada marmut. Uji toksisitas abnormal pada mencit dan marmut menunjukkan bahwa tidak ada gejala abnormal seperti gangguan syaraf atau tremor.

Uji inaktivasi pada suspensi virus IBR yang telah diinaktivasi dilakukan pada sel *MDBK*. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa virus telah inaktif, hal ini ditandai dengan tidak adanya CPE pada sel tersebut selama 7 hari, maka virus tersebut telah inaktif sempurna dan dapat dilanjutkan proses formulasi dengan *Adjuvant Montanide ISA 70*. Penggunaan *Montanide ISA 70* sebagai ajuvan adalah untuk meningkatkan respon tanggap kebal seluler. Formula vaksin IBR inaktif isolat lokal ini (N6052IT/Jabar/07) mempunyai syarat titer virus minimal  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml. Setelah dilakukan uji titrasi terhadap virus IBR hasil panen didapatkan titer sebesar  $10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml sehingga virus IBR yang dihasilkan sudah memenuhi syarat untuk diformulasi sebagai vaksin

Tabel 1. Hasil Uji Sterilitas

Media	Pengamatan Hari Ke-															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Thyoglicolate 22°C			-				-							-		Bakteri Jamur
			-				-							-		
Thyoglicolate 37°C			-				-							-		Bakteri Jamur
			-				-							-		
HIA 37°C			-				-							-		Bakteri
			-				-							-		

Tabel 2. Hasil Titer Antibodi Serum Marmut Pada Uji Potensi Vaksin IBR (SNT)

Marmut	Pengenceran Serum					Titer
	1:2	1:4	1:8	1:16		
1	+	-	-	-	2	
2	+	+	+	-	8	
3	+	+	+	-	8	
4	+	+	+	-	8	

Tabel 3. Hasil Titer Antibodi Serum Marmut Pada Uji Stabilitas Vaksin IBR (SNT)

Marmut	Pengenceran Serum					Titer
	1:2	1:4	1:8	1:16		
1	+	+	-	-	4	
2	+	+	+	-	8	
3	+	+	+	+	16	
4	+	+	+	+	16	
5	+	+	+	+	16	

Tabel 4. Hasil Titer Antibodi Pada Serum Marmut Kontrol (SNT)

Marmut	Pengenceran Serum				Titer
	1:2	1:4	1:8	1:16	
1	-	-	-	-	0
2	-	-	-	-	0
3	-	-	-	-	0
4	-	-	-	-	0
5	-	-	-	-	0

Keterangan :

(+) = positif Antibodi

(-) = negatif Antibodi

## PEMBAHASAN

Pada hasil uji sterilitas menunjukkan bahwa vaksin tersebut steril, tidak mengandung bakteri dan jamur (Tabel 1). Hasil uji toksisitas abnormal, hewan tidak menunjukkan gejala abnormal seperti adanya gangguan syaraf dan tremor. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin tersebut tidak mengandung bahan yang toksik.

Hasil titer antibodi serum marmut pada uji potensi dan stabilitas menunjukkan bahwa tidak kurang dari 80% hewan coba mengandung titer antibodi lebih dari pengenceran 1:2. Pada sel MDBK tidak menunjukkan adanya *Cytophatic Effect (CPE)*. Hal ini bisa dinyatakan bahwa vaksin IBR yang telah diformulasi memenuhi syarat dan stabil pada penyimpanan suhu 37°C selama satu minggu (Tabel 2 dan 3).

Hasil titer antibodi serum marmut kontrol tidak menunjukkan adanya antibodi. Karena marmut tidak divaksinasi sehingga antibodi tidak terbentuk, hal ini ditunjukkan dengan adanya kerusakan pada sel MDBK (Tabel 4).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Pusvetma telah membuat formula vaksin IBR inaktif isolat lokal BHV-1.1 (N6052IT/Jabar/07) sebanyak 200 ml (40 dosis) dengan titer virus  $10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Dan telah diuji sterilitas dengan media *Thyoglicolate* dan HIA dalam skala laboratorium. Hasil uji menunjukkan bahwa vaksin steril dari kontaminan bakteri dan jamur sehingga akan dilanjutkan untuk uji laboratorium yaitu uji toksisitas abnormal pada mencit dan marmut serta uji potensi pada marmut.

Dari hasil pengujian vaksin IBR yang terdiri dari uji toksisitas abnormal, pada hewan coba mencit dan marmut tidak menunjukkan gejala abnormal, sedangkan pada uji potensi dan uji stabilitas menunjukkan bahwa tidak kurang dari 80% hewan coba mengandung titer antibodi lebih dari pengenceran 1:2 maka vaksin yang telah diproduksi skala kecil di Pusvetma dinyatakan memenuhi syarat. Pengujian vaksin IBR lanjutan, akan dilakukan pada hewan target (sapi).

## DAFTAR PUSTAKA

- Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian Republik Indonesia. 2007. *Farmakope Obat Hewan Indonesia*. Jilid 1 Edisi 3.
- Enquist LW, Tomishima MJ, S Gross and Smith GA. 2002. *Directional spread of an alphaherpesvirus in the nervous system*. Vet. Microbiol. 86 : 5-16.
- Grom JE, Hostnik P, Toplak I and Maganja DB. 2006. *Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethazone*. Vet.J. 171 : 539-544.
- Mars MH, De Jong MC, Van Maanen C, Hage JJ and Van Oirschot JT. 2000. *Airborne transmission of Bovine Herpesvirus I infection in calves under field conditions*. Vet.Microbiol. 76 : 1-13.
- Gassmann U, Engels M, Wyler R. 1985. *European isolates of bovine herpesvirus 1 : a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoklonal antibodies*. Arch. Virol ( 1985) 85 : 57-69.
- Miller JM, Whetstone CA and Van der Maaten MJ. 1991. *Abortifacient property of Bovine herpesvirus type 1 isolate that represent three subtype determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA*. Am. J.Vet Res.52 : 458-378.