

# ANTISIPASI PENGUJIAN BEBERAPA VAKSIN VIRUS SAPI DAN DATA SEROLOGISNYA DI BEBERAPA WILAYAH DI INDONESIA

Gatot M. Moedijono & Ketut Karuni N Natih  
Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur

## PENDAHULUAN

Pengujian vaksin virus mengacu pada farmakope atau aturan dinegara vaksin itu dibuat. Beberapa negara mempunyai aturan sendiri-sendiri seperti British Veterinary Pharmacopeia (Inggris), Code of Federal Regulation Animal (Amerika Serikat) dan Minimum Requirement for Biological Products for Veterinary Use (Japan) dan sebagainya. Di Indonesia telah disiapkan farmakope Indonesia, yang mengacu pada aturan yang telah ada yang kemudian disesuaikan dengan standar Indonesia. Organisasi internasional seperti Office International des Epizooties (OIE), World Health Organization (WHO) juga merupakan lembaga yang membuat aturan tentang bagaimana melaksanakan pengujian produk obat hewan maupun obat manusia.

Pengujian vaksin untuk hewan besar (ruminansia/sapi), tata cara pengujiannya telah disiapkan guna mengantisipasi vaksin yang akan beredar. Metoda pengujian dan persyaratannya mengacu pada standar Jepang, berkaitan dengan proyek ATA-297 perihal pengujian obat hewan. Standar pengujian serta metoda yang digunakan tidak berbeda jauh dengan standar lain yang telah ada, dan perbedaan hanya terletak pada masalah teknis pelaksanaannya, yaitu pemakaian bahan yang sedikit berbeda namun tujuannya sama.

Dalam tulisan tersebut telah dilakukan pengujian pada beberapa vaksin virus yaitu Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease (BVD-MD), Infectious Bovien Rhinotracheitis (IBR) Bovine Herpesvirus-1, Bovine Parainfluenza-3 (BPI-3), dan beberapa penyakit yang disebabkan oleh virus Athropod-borne yaitu Bovine Ephemeral Fever (BEF), Akabane dan Ibaraki. Pengujian secara serologis terhadap penyakit tersebut telah pula dilaksanakan di Balai Penelitian Veteriner dan beberapa BPPH di Indonesia. Kajian Seroepidemiologi dilakukan untuk menunjang data

yang telah ada yang dilakukan oleh peneliti terdahulu<sup>1,2,3,4,5</sup>. Dari data yang telah ada menunjukkan bahwa upaya pencegahan dan pemberantasan penyakit dengan jalan vaksinasi perlu menjadi pemikiran bersama.

## MATERI DAN METODA

Sediaan vaksin virus hewan besar (sapi) dapat berupa kering beku atau cairan dan bersifat aktif/atenuasi/hidup maupun inaktif/mati. Pengujian vaksin meliputi, uji umum dan uji khusus. Uji umum yaitu uji sterilitas, uji kelembaban (untuk vaksin kering beku), uji kandungan protein, uji kontaminan mikoplasma (untuk vaksin aktif). Uji khusus dilakukan baik pada vaksin aktif ataupun vaksin mati. Pada tulisan ini pengujian hanya dibatasi pada uji khusus. Prinsip pengujian didasarkan pada karakter virus. Virus dapat menimbulkan efek sitopatik pada biakan jaringan, atau menimbulkan hemaglutinasi. Efek sitopatik timbul setelah dilakukan uji intereferen dan dipakai sebagai parameter.

Pengujian vaksin aktif meliputi uji identitas, uji kandungan virus, uji kontaminan virus asing, uji potensi, uji toksisitas abnormal, sedangkan pengujian vaksin inaktif meliputi uji inaktivasi, uji keamanan dan uji potensi serta uji toksisitas abnormal.

### *Uji identitas.*

Uji tersebut dilakukan pada biakan jaringan dimana virus ditumbuhkan. Virus vaksin dinetralisasi setelah dicampur dengan serum anti spesifik dan diinkubasikan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 60 menit, kemudian di inokulasi pada biakan jaringan. Untuk vaksin kombinasi, masing-masing virus harus dilakukan netralisasi. Sampel yang diinkubasikan diamati terhadap perubahan yang terjadi dan perubahan ini bersifat spesifik. Bila diperlukan uji fluoresensi dilakukan.

### *Uji kandungan virus.*

Vaksin diencerkan secara seri (x 10). Kemudian diinokulasikan pada biakan jaringan. Titer vaksin ditetapkan dengan menggunakan metoda Spearman & Karber atau Reed & Muench. Untuk vaksin kombinasi, terlebih dahulu dilakukan netralisasi terhadap virus yang tidak diperuntukkan pengujiannya.

### *Uji kontaminan virus asing.*

Uji tersebut dilakukan dengan menetralkan virus yang terkandung didalam vaksin dan kemudian diinokulasikan pada biakan jaringan yang spesifik. Pasase ulang (blind passage) dilakukan sebanyak tiga kali. Diamati terhadap timbulnya efek sitopatik. Biakan jaringan dibuang dan dilakukan uji hemaglutinasi dengan penambahan 0,3% sel darah merah marmut, human=O atau babi.

### *Uji potensi.*

Uji potensi dilakukan pada hospesnya (sapi)<sup>a</sup> atau dengan menggunakan hewan laboratorium<sup>b</sup> dan mengikuti prosedur yang dibuat oleh produsen. Pengamatan dilakukan terhadap gejala klinis yang timbul. Secara periodik sampel darah diambil untuk dilakukan pengujian titer antibodi.

### *Uji inaktivasi.*

Uji inaktivasi untuk vaksin yang mengandung adjuvan dan tidak mengandung adjuvan dilakukan secara berbeda. Uji inaktivasi pada vaksin yang tidak mengandung adjuvan dilakukan pada media biakan jaringan. Vaksin terlebih dahulu didialisa untuk menghilangkan zat pencampur selama pembuatan vaksin. Kemudian vaksin diinokulasikan pada biakan jaringan dan diamati. Virus vaksin tidak menimbulkan perubahan pada biakan jaringan. Uji inaktivasi untuk vaksin yang mengandung adjuvan, pengujian dilakukan dengan menggunakan hewan percobaan. Vaksin disuntikkan pada tikus putih

umur 1-3 hari sebanyak 0,01 - 0,03 ml secara intraserebral dan pengamatan dilakukan setiap hari selama 10-14 hari.

### *Uji keamanan/toksisitas abnormal*

Apabila dilakukan pada hewan percobaan (mencit/marmut) disebut uji toksisitas abnormal. Adapun pelaksanaan pengujian adalah dengan menyuntikkan vaksin sebanyak 0,5 ml pada tikus putih secara intra peritoneal. Pada marmut, vaksin disuntikkan sebanyak 5 ml secara intraperitoneal, dan pengamatan dilakukan setiap hari selama 10-14 hari. Uji keamanan dilakukan pada sapi dengan menyuntikkan sejumlah vaksin pada dosis tertentu dan perubahan klinis diamati selama 10-14 hari.

### *Uji serologis untuk determinasi antibodi pada pengujian potensi dan serum sapi lapangan.*

Uji serologis dilakukan dengan metode serum netralisasi terhadap penyakit BVD-MD, IBR, BEF, Akabane dan Ibaraki. Serum anti IBR disamping uji serum netralisasi juga dilakukan uji reduksi plaque. Sedangkan untuk penyakit PI-3 dilakukan uji hambatan hemaglutinasi. Survey serologis sapi lapangan dilakukan terhadap sera yang berasal dari beberapa wilayah Indonesia tahun 1994/1995 dan 1995/1996.

### *Uji serum netralisasi.*

Uji tersebut dilakukan sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan. Setelah serum diinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit, kemudian diencerkan secara seri dua kali pada mikroplat 96-well dengan medium Eagle's yang ditambahkan dengan tryptose phosphat broth, L-glutamin, antibiotika. Virus sebanyak 100-200 TCID<sub>50</sub>/ml ditambahkan dengan volume yang sama. Proses netralisasi dilakukan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 60 menit. Setelah netralisasi, suspensi biakan jaringan ditambahkan. Mikroplate diinkubasikan kembali selama 5-7 hari sambil diamati timbulnya efek sitopatik. Titer antibodi ditetapkan berdasarkan pada enceran tertinggi yang masih dapat menghambat timbulnya efek sitopatik. Titrasi ulang (back titration) dibuat sebagai kontrol virusantang.

a Sapi umur 4-6 bulan atau dengan berat badan 150 kg, bebas antibodi.

b Tikus putih umur 4-6 minggu.  
Marmut umur 3-4 bulan atau berat 350-400 g.

### Uji hambatan hemaglutinasi (HI).

Sebelum uji hemaglutinasi dilakukan terlebih dahulu serum diinaktifasi pada suhu 56°C selama 30 menit untuk menghilangkan reaksi yang non spesifik. Serum ditambahkan kaolin 25% (1:4), diinkubasikan sambil digoyang pada suhu kamar selama 20 menit. Serum dan kaolin dipisahkan dengan sentrifugasi dan pada supernatannya ditambahkan suspensi sel darah merah marmut. Setelah dicampur dan didiamkan selama 20 menit pada suhu kamar, serum dipisahkan untuk dilakukan uji HI. Uji HI dilakukan terhadap antigen virus 4 HAU pada mikroplat 96-well tipe-V. Pembacaan

hasil dilakukan setelah mikroplate diinkubasikan pada suhu 4°C selama 24 jam. Titer antibodi ditetapkan berdasarkan pada enceran tertinggi yang masih dapat menghambat terjadinya hemaglutinasi. Titrasi ulang dibuat sebagai kontrol antigen.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Prosedur pengujian vaksin virus dan kebutuhan standar minimum dapat dilihat pada tabel 1. Uji keamanan dilakukan bersamaan dengan uji potensi. Pada uji potensi vaksin aktif, titer antibodi ditetapkan setelah 3-4 minggu penyuntikan, kecuali untuk

Tabel 1. Prosedur Pengujian dan Kebutuhan Standar Minimum Vaksin

Toksisitas abnormal		Keamanan	Potensi	Kandungan virus
IBR	Marmut (2) 5 dosis i.p. observasi 2 mg Tikus putih (10) 0,5 ml i.p. observasi 2 mg	Sapi (1) 1 dosis obs. 2 mg	uji SN* sera 4 mg > 2	sel BT > 10 <sup>4.0</sup> /dosis
BVD	s.d.a.	Sapi (1) 1 dosis obs. 2 mg	uji SN sera 3 mg > 8	sel BT > 10 <sup>3.0</sup> /dosis
PI-3	s.d.a.	Tikus 1-3 hari 0,01 ml i.c. obs. 2 mg	uji HI Marmut (5) sera 3 mg 0,2 ml i.n > 8 (80%)	sel BK > 10 <sup>5.0</sup> /dosis
B E F	s.d.a.	Sapi (1) 2 dosis Obs. 2 mg	uji SN sera 5 mg > 1	sel HmLu > 10 <sup>3.0</sup> /dosis
Akabane	s.d.a.	Sapi (1) 1 dosis obs. 2 mg	uji SN sera 4 mg > 2	sel HmLu > 10 <sup>5.0</sup> /dosis
Ibaraki	s.d.a.	Sapi (1) 1 dosis obs. 2 mg	uji SN sera 3 mg > 2	sel HmLu > 10 <sup>3.5</sup> /dosis

\* Uji reduksi plaque  
SN : serum netralisasi  
HI : Hambatan hemaglutinasi  
BT : Bovine testicle

BK : Bovine kidney  
HmLu : Hamster lung

vaksin BEF (5 minggu). Titer virus pada uji kandungan virus juga mengacu pada dokumen yang terdapat saat aplikasi kecuali telah ditetapkan sebelumnya.

Kebutuhan standar minimum vaksin berbeda-beda, tetapi umumnya hampir mendekati sama. Demikian pula bahan/biakan jaringan yang digunakan. Pada pengujian potensi vaksin PI-3, dapat dilaksanakan pada hewan percobaan, dikarenakan hewan tersebut cukup responsif sehingga hospes aslinya tidak diperlukan kecuali untuk vaksin kombinasi.

Pada pengujian vaksin inaktif khususnya uji potensi, tetap mengacu pada pengujian vaksin aktif. Hanya jumlah vaksinasi yang diperlukan sesuai dengan anjuran produsen vaksin. Pengujian vaksin mati yang mengandung adjuvan, vaksin BVD, mulai dikembangkan secara *in vitro*<sup>11</sup>.

Pengujian vaksin yang dilakukan selain mengacu pada standar yang ada juga mengacu pada pembuat vaksin. Pengujian bahan virus (master/working-seed), biakan jaringan dan bahan penunjang lain dalam proses produksi merupakan uji yang harus dilakukan oleh produsen. In-process control, dan pengujian produk akhir adalah merupakan rangkaian pengujian yang dilakukan oleh produsen untuk memenuhi GMP/GLPnya.

Pengujian vaksin virus lainnya, seperti vaksin Penyakit Mulut & Kuku, Rinderpest, pelaksanaan uji keamanan merupakan prioritas. Indonesia merupakan salah satu negara yang bebas dari penyakit tersebut. Pada pengujian vaksin aktif swine fever/hog cholera, uji keamanan dilakukan dengan penyuntikan sebanyak 100 kali dosis yang dianjurkan, untuk memastikan keamanan vaksin tersebut. Pada uji potensi ujiantang tidak dilakukan. Ujiantang hanya dilakukan pada vaksin rabies dengan menggunakan hewan laboratorium.

Uji serologis beberapa penyakit sapi dan persentasenya dapat dilihat pada tabel 2.

Secara serologis terlihat persentase kejadian penyakit Akabane pada tahun 1995/1996 adalah yang tertinggi (75,27%), kemudian diikuti masing-masing penyakit Ibaraki (46,67%), bEF (40,64%), PI-3 (35,79%), BVD (28,8%) dan IBR (10,16%). Data serologis tahun 1994/1995 untuk beberapa penyakit

persentasenya lebih tinggi/rendah adalah tidak menggambarkan situasinya, tetapi dikarenakan daerah pengambilan yang berbeda. Angka infektifitas tinggi pada penyakit virus Arbo, menunjukkan bahwa peranan vektor (beberapa jenis lalat) dalam transmisi virus perlu menjadi perhatian. Penelitian pengaruh musim terhadap prevalensi penyakit BEF telah dipelajari polanya di Indonesia<sup>2</sup>. Peneliti lain memberikan data lengkap perihal infeksi virus arthropod-borne di daerah Jawa Timur<sup>5</sup> dan Bali. Pada infeksi penyakit Akabane sekalipun gejala klinis adalah bersifat sub klinis dan pada sapi yang bunting dapat menyebabkan keguguran, terlihat dari hasil pemeriksaan serologis adalah yang tertinggi. Data serologis infeksi penyakit Akabane di Jawa Timur pada tahun 1979 sebesar 80%, data sekarang mendekati seratus persen di daerah pengambilan sampel. Pola penyebaran penyakit Akabane tersebut telah dipelajari di daerah Lampung<sup>4</sup>. Wabah penyakit Ibaraki yang menyebabkan gejala klinis beruap demam dan gangguan respirasi telah dilaporkan pertama kali di propinsi Ibaraki Jepang pada tahun 1987<sup>6</sup>. kejadian di Indonesia berdasarkan pemeriksaan serologis di Jawa Timur tahun 1979 sebesar 72,2 %.

Telah diketahui bahwa beberapa virus Arbo menyebabkan gangguan reproduksi pada sapi, demikian pula yang terjadi oleh penyakit yang disebabkan oleh virus BVD dan IBR<sup>7,8</sup>. Infeksi laten pada penyakit IBR dan dampak gangguan imunotoleran/infeksi persisten/imunosupresif pada infeksi BVD<sup>9</sup> sangat dikhawatirkan. Pemeriksaan serologis penyakit IBR menunjukkan persentase positif rendah dan merata di beberapa daerah. Gejala akut timbul jika terjadi stres pada sapi yang terinfeksi secara kronis dan dapat merupakan sumber penularan/reaktor<sup>10</sup>. Prevalensi penyakit BVD berdasarkan tahun 1994-1996 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan persentase yang berarti. Angka infeksi rata-rata 30% adalah cukup tinggi. Persentase tertinggi infeksi BVD terjadi pada tahun terakhir dari beberapa wilayah pengambilan sampel seperti Kalimantan Selatan dan Sulawesi Selatan, yakni masing-masing 72,73% dan 79,2%. Mengingat propinsi Sulawesi Selatan adalah daerah hulu ternak, tingginya persentase penyakit BVD perlu mendapat perhatian yang serius. lebih lanjut, akibat infeksi biotipe *non-sitopatogenik* BVD akan menjadi

Tabel 2. Data Serologis Penyakit Virus pada Sapi di beberapa wilayah di Indonesia TA. 1995/1996 & (1994/1995)

No.	ASAL SERUM	Titer antibodi positif																	
		BVD			IBR			PI-3			BEF			AKABANE			BARAK		
		n=serum	> 1:2	%	n=serum	> 1:2	%	n=serum	> 1:4	%	n=serum	> 1:2	%	n=serum	> 1:2	%	n=serum	> 1:2	%
1.	DIACEH	9 (20)	1 (1)	11,11 (50)	9	2	22,22	9	0	0	9	3	33,33 (60)	9	9	100	9	5 (10)	55,56 (62,63)
2.	Sumatera Utara	6 (13)	0 (0)	0 (0)	6	0	0	6	1	16,67	6	0 (13)	0 (53,85)	6	0	0	6	1	16,67
3.	Jawa Barat	12	3	25	12	1	8,33	12	7	58,33	12	0	0	12	8	66,67	12	1	8,33
4.	Jawa Tengah	13	1	7,7	13	1	7,7	13	3	23,08	13	7	45,85	13	11	84,62	12	11	91,67
5	Jawa Timur	34 (21)	13 (4)	41,18 (19,0)	33	5	15,15	34 (21)	17 (0)	50 (0)	34 (21)	28 (12)	82,35 (57,14)	33	32	96,97	34 (21)	17 (13)	50 (61,9)
6.	Kalimantan Selatan	11 (32)	8 (6)	72,73 (18,75)	11	1	9,1	11 (32)	1	9,1 (3,12)	11 (32)	2 (1)	18,18 (3,12)	11	10	90,9	10 (27)	6 (11)	60 (47,37)
7.	Kalimantan Timur	13 (19)	7 (8)	53,85 (42,1)	10	0	0	13	10	76,92	13 (19)	1 (4)	7,7 (21,05)	9	1	11,11	9 (19)	0 (9)	0 (47,37)
8.	Sulawesi Selatan	24 (25)	19 (22)	79,2 (88)	24	4	16,67	24 (18)	9 (16)	37,5 (88,87)	24 (25)	10 (13)	41,67 (52)	24	15	62,5	21	16	76,2
	BPPH-Maros	30	2	6,67	30	1	3,33	29	7	24,14	26	12	46,15	27	24	88,89	30	18	60
9.	Sulawesi Tenggara	21	1	4,76	-	-	-	20	7	23,33	20	9	45	-	-	-	-	-	-
10.	NTT P. Timor Barat	39	0	0	39	4	10,26	39	13	33,33	39	13	33,33	38	27	71,05	37	9	24,32
	Jumlah	191 (151)	55 (51)	28,8 (33,77)	187	19	10,16	190 (101)	68 (24)	35,79 (23,76)	187 (150)	76 (58)	40,64 (38,67)	182	137	75,27	180 (86)	84 (43)	46,67 (50)

Keterangan :  
( ) serum tahun 1994/1995.

potensial terhadap terjadinya penyakit akut Mucosal Disease (MD) akibat mutasi virus atau superinfeksi virus BVD dan sangat fatal.

### KESIMPULAN DAN SARAN

Pengujian vaksin hewan besar/sapi telah dipersiapkan dengan prosedur dan kebutuhan standar yang diperlukan, dan juga pelaksanaannya telah mengacu seperti yang dilakukan produsen vaksin. Sebagian besar pengujian dilakukan pada hospesnya untuk mendapatkan data yang akurat, namun demikian pengujiannya cukup mahal dan memakan waktu lama. Prosedur pengujian belum banyak dikembangkan secara *in vitro*, kecuali bahan biologik selama proses pembuatan. Produk akhir vaksin, pengujiannya tetap dilaksanakan secara *in vivo*.

Survey secara serologis terhadap beberapa penyakit sapi perlu dilakukan, di samping memberikan data yang informatif dapat pula digunakan untuk memantau perkembangan penyakit sehingga usaha penanggulangan serta pemberantasannya dapat dilakukan sendiri mungkin. Laboratorium di daerah merupakan lembaga pemberi informasi terpenting bagi instansi terkait terhadap kejadian penyakit sehingga upaya melaksanakan kebijakan selanjutnya dapat dilakukan.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Disampaikan kepada S. NAKAMURA dan Y. INOUE (NVAL-Tokyo) yang telah membimbing pelaksanaan uji vaksin hewan besar selama menjalani pelatihan, dan para asisten yang telah membantu pelaksanaan uji serologis.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Daniels PW, E. Soleha, I Sendow and Sukarsih. 1991. Bovine Ephemeral Fever in Indonesia. ACIAR Proceeding.
2. Soleha E, PW Daniels, Sukarsih and I Sendow. 1991. A Study of Bovine Ephemeral Fever Group Rhabdoviral Infection in West Java, Indonesia. ACIAR Proceeding.
3. Rahadjo E, G Mudiarto, MAR Noor and SB Siregar. 1991. Detection of Antibody Against BVD-MD in Cattle in Indonesia. Pada Abstract Ilmiah Nasional V, PDHI 1991. Yogyakarta 12-13 Juli 1991.
4. I Sendow, S Marfiatiningsih dan Sukarsih. 1991. Prevalensi Reaktor Virus Akabane di propinsi Lampung. Pada Prosiding Seminar Nasional Teknologi Veteriner Untuk Meningkatkan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak, Cisarua, Bogor 22-24 Maret 1994, Balitvet, Bogor
5. Miura Y, Y Inaba, T Tsuda, S Tokumisa, K Sato, H Akashi and M Matumoto. 1982. A Survey Antibodies to Arthropod-Borne Viruses in Indonesia Cattle. Jpn.J. Vet. Sci., 44(6):857.
6. Iwasaki S, Y Goto, Y Miura, M Nagatomo and Y Kono. 1990. An Outbreak of Ibaraki disease in Cattle. Jpn. J. Vet. Med. Assc., 43(4):244.
7. Reed DE, EJ Bicknell, CA Larson, WU Knudtson and CA Kirkbridge. 1971. Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus-Induced Abortion: Rapid Diagnosis by Fluorescence Antibody Technique. Am. J.V.R. 32(9):1424.
8. John A Perdrizet, WC Rebhun, EJ Dubovi and RO Donis. 1986. Bovine Virus Diarrhea-Clinical Syndromes in Dairy Herds. Cornell Vet. 77:46.
9. Joe Brownlie. 1990. Pathogenesis of Mucosal Disease and Molecular Aspects of Bovine Virus Diarrhea Viurs. Vet. Microbiol. 23:371.
10. Ackermann M, S Belak, V Bitsch, S Edwards, A Moussa, G Rockborn and E Thirry. 1990. Round table on Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis Virus Infection Diagnosis and Control, Vet. Microbiol. 23:361.
11. LR. Luderman and JB Katz. 1994. Enzyme-linked Immunosorbent Assay Assessment of Bovine Viral Diarrhea Virus Antigen in Inactivated Vaccines using Polyclonal or Monoclonal Antibodies. Biological. 22:21.