

Induksi Sistem Kekebalan Seluler Khas Rabies dengan Vaksin Rabies Peroral dan Perinjeksi pada Anjing Kampung

Faizah¹, Putra, A.A.G², Yudianingtyas, D.W.¹, H. Ferra¹, Ratna¹, Suanti¹

¹⁾ Balai Besar Veteriner Maros, Sulawesi Selatan

²⁾ Balai Besar Veteriner Denpasar, Bali

Intisari

Penyakit rabies merupakan penyakit zoonosis dan bersifat fatal pada hewan berdarah panas termasuk manusia. Pengenalan penggunaan vaksin oral di Indonesia diharapkan dapat meningkatkan cakupan vaksinasi. Penelitian pada tingkat laboratorium telah dilakukan mengenai tantangan uji keamanan, efikasi, kemampuan memakan umpan dan mengunyah vaksin, titer antibodi humoral, dan *cell mediated immunity* dalam hal ini produksi sitokin berupa interferon gamma dan interleukin-2.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran respon kekebalan seluler (IFN- γ dan IL-2) pada anjing yang telah divaksin dengan vaksin oral SAG2 dan vaksin parenteral Rabisin dan Rabivet Supra 92. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kekebalan seluler (interleukin-2 dan interferon gamma) hasil induksi dari vaksin oral SAG2 pada anjing lokal tidak berbeda nyata dengan vaksin parenteral Rabisin dan Rabivet Supra 92.

Kata kunci: *Rabies, Cell Mediated Immunity, titer antibodi, interleukin-2, interferon gamma.*

Pendahuluan

Latar Belakang

Penyakit rabies atau yang dikenal masyarakat sebagai penyakit anjing gila merupakan penyakit zoonosis. Rabies sangat berbahaya baik bagi hewan maupun bagi manusia, karena selalu menyebabkan kematian bila gejala klinisnya telah muncul. Rabies pada anjing, secara geografi, terus menyebar dan mengancam kesehatan masyarakat, utamanya di negara-negara yang sedang berkembang. Di dunia, diperkirakan terdapat 55.000 kasus kematian karena rabies pada manusia setiap tahunnya dan hampir 95% terjadi di kawasan Asia dan Afrika (Song *et al.*, 2009). Kematian akibat rabies hampir sekitar 60% terjadi di kawasan Asia Timur Selatan. Dari prosentase sebesar 60%, diperkirakan terdapat 25.000 kasus kematian karena rabies terjadi di kawasan Asia Timur Selatan, kasus tertinggi kematian karena rabies pada manusia adalah di India yaitu sekitar 19.000 kasus dan Bangladesh yaitu sekitar 2000 kasus. Untuk Myanmar, Nepal, Indonesia, Sri Lanka, dan Thailand diperkirakan kasus kematian karena rabies pada manusia rata-rata kurang dari 100 kasus setiap tahunnya (WHO, 2005b).

Indonesia merupakan salah satu dari beberapa negara yang sedang berkembang dan belum bebas dari rabies. Selain kucing dan kera, anjing merupakan hewan penular rabies utama di Indonesia yaitu sekitar lebih dari 95% (Warman, 1984; Putra, 2009). Hampir di banyak daerah di Indonesia, diketahui bahwa ada hubungan yang erat antara masyarakat dengan anjing. Hubungan ini nampak begitu intens di beberapa daerah di Indonesia seperti di Bali, Flores, Sulawesi Utara, Sumatera Utara, Sumatera Barat, dan mungkin di beberapa daerah lainnya (Hardjosworo, 1984; Putra dan Gunata, 2009). Secara umum anjing berfungsi sebagai: penjaga rumah, penjaga kebun, hewan kesayangan, dan hewan untuk berburu. Di beberapa tempat, bahkan daging anjing dikonsumsi oleh masyarakatnya sehingga anjing menjadi komoditi perdagangan (Hardjosworo, 1984; Putra, 2009). Di beberapa daerah tertentu seperti di Bali (Dharmawan, 2009; Putra, 2009) dan Flores (Putra, 2009) anjing dengan tanda-tanda tertentu digunakan sebagai sarana upacara tradisional.

Sekalipun ada pertalian yang erat antara anjing dalam suatu masyarakat, anjing umumnya dipelihara secara dilepas sehingga sulit dipegang, tidak jarang anjing harus mencari makan sendiri dan beberapa di antaranya memiliki status kesehatan yang kurang memadai (Putra dan Gunata, 2009; Putra, 2009). Apabila virus rabies menulari populasi anjing seperti yang telah disebutkan, maka penanggulangan rabies akan menjadi sangat sulit, karena sulit melakukan vaksinasi lewat suntikan, seperti sekarang dialami di Bali (Putra, 2009) dan di Flores (Bingham, 2001) yang memiliki densitas populasi anjing per km² sangat tinggi. Banyak pendapat yang menyatakan bahwa strategi penanggulangan rabies yang utama adalah dengan melakukan vaksinasi (Putra, 2009; WHO, 2005a). Vaksin yang beredar di Indonesia untuk penanggulangan rabies adalah vaksin yang aplikasinya lewat suntikan (parenteral). Menghadapi pola umum cara pemeliharaan anjing yang dilepas (*free range dog*) sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya, nampak jelas bahwa cara pemeliharaan anjing tersebut sangat mempengaruhi capaian *coverage* vaksinasi yang telah

ditetapkan, yaitu minimal 70%. Hambatan lainnya adalah jika harus melakukan *booster* vaksinasi tiga sampai dengan empat bulan dari vaksinasi pertama (Putra *et al.*, 2009).

Kesulitan dalam memegang anjing yang juga berdampak pada sulitnya membawa anjing ke tempat vaksinasi. Dengan demikian, untuk melakukan vaksinasi terhadap jenis anjing seperti ini, umumnya dilakukan pendekatan vaksinasi "*door to door*" (dari rumah ke rumah) sehingga membutuhkan jumlah vaksinator lebih banyak serta waktu yang lebih lama.

Perumusan Masalah

Sampai saat ini vaksin yang digunakan untuk mengendalikan kasus rabies di Indonesia, termasuk di Pulau Flores dan Bali, adalah vaksin jenis parenteral. Vaksin ini diketahui mampu mengendalikan kasus rabies di Pulau Flores dan Bali pada *captive dog*, tetapi kurang efektif penggunaannya pada *free range dog*. Di Pulau Flores, cakupan vaksinasi rabies tidak pernah mencapai target yang diharapkan, yaitu minimal kurang dari atau sama dengan 70% (Dibia, 2007). Hal yang sama juga terjadi di Bali, dimana cakupan vaksinasi diperkirakan baru mencapai sekitar 45% (Putra *et al.*, 2009)

Vaksin oral umumnya dibuat dan berasal dari virus aktif yang dilemahkan atau virus rekombinan aktif. Vaksin jenis ini umumnya diproduksi dalam bentuk cair yang dimasukkan ke dalam kapsul/*sachet* kemudian dimasukkan ke dalam suatu umpan. Pada saat hewan mengunyah umpan yang berisi kapsul, cairan vaksin akan keluar dan vaksin menyebar di daerah mukosa mulut dan tonsil. Saat ini *World Health Organization* (WHO) telah merekomendasikan dua jenis vaksin oral yaitu *Street Alabama Dufferin* (SAD) *Mutant Gif* (SAG2) dan *Vaccinia-Rabies Glycoprotein Recombinant* (VRG) yang digunakan untuk memvaksinasi hewan liar.

Di Indonesia, sampai saat ini penggunaan vaksin oral untuk mengendalikan rabies pada *free-range dogs* belum pernah dilaporkan. Efikasi vaksin diukur dengan mengamati terbentuknya titer antibodi protektif pada periode tertentu, antibodi netralisasi terhadap virus rabies, dan protektivitasnya terhadap ujiantang.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran respon kekebalan seluler (IFN- γ dan IL-2) pada anjing yang telah divaksin dengan vaksin oral SAG2 dan vaksin parenteral Rabisin dan Rabivet Supra 92.

Materi dan Metoda

Spesimen

Jumlah spesimen untuk penelitian kajian uji coba aplikasi vaksin oral dan injeksi sebanyak 36 ekor. Masing-masing perlakuan diulang dengan menggunakan rumus *Federer* (Montgomery, 2001) sebagai berikut:

$$(t - 1)(n - 1) \geq 15$$

Keterangan:

- t : banyaknya perlakuan sebanyak 4
n : banyaknya replikasi (ulangan)

Berdasarkan rumus perhitungan jumlah ulangan maka dapat dijabarkan sebagai berikut:

$$(4 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$n - 1 \geq 15/3$$

$$n \geq 5 + 1$$

$$n \geq 6$$

Jadi, berdasarkan perhitungan rumus di atas, maka jumlah anjing pada setiap perlakuan adalah paling sedikit enam ekor anjing. Penelitian terbagi menjadi 4 perlakuan dimana masing-masing perlakuan menggunakan 9 ekor anjing. Perlakuan terdiri atas: sembilan ekor anjing untuk kontrol, sembilan ekor anjing untuk vaksin oral, sembilan ekor anjing untuk vaksin injeksi Rabisin, dan sembilan ekor anjing untuk vaksin injeksi Rabivet Supra 92.

Sebelum dibagi menjadi empat perlakuan, spesimen untuk IFN- γ , dan IL-2 pada anjing kampung, dilakukan dengan teknik alokasi secara acak menggunakan bilangan *random*.

Bahan kultur sel limfosit

Spesimen darah utuh dikoleksi dengan menggunakan tabung *heparin lithium* (Sarstedt, Orsay, France). *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) yang diisolasi dengan menggunakan *Ficoll-Hypaque* (Pharmacia, Roosendaal, The Netherland). PBMC telah disuspensikan pada media RPMI 1640 (Gibco BRL.,

Gent, Belgium) kemudian ditambahkan asam amino nonesensial 1% (Gibco), ditambahkan 1 mM *sodium pyruvat* (Gibco), 100 IU/ml *penicillin* (Gibco), 100 ug/ml *streptomycin* (Gibco), 5×10^{-5} Molar *2-mercaptoethanol* (Gibco) dan 10% *heat-inactivated foetal bovine serum* (Gibco). *Pythohemagglutinin* dan virus rabies ditambahkan pada kultur limfosit yang dilakukan selama dua hari sampai dengan tiga hari.

PBS buffer (Gibco), pH 7.2 tanpa Ca^{2+} dan Mg^{2+} (Gibco), disimpan pada suhu 4°C ; *Trypsin* (Sigma) *ethylene diamine tetraacetic acid* (Merck); *High grade acetone 80%* (Merck) (dilarutkan dengan akuades yang telah dihilangkan ion-ionnya), disimpan pada suhu 4°C ; *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco) dengan 10% *heat inactivated Foetal Calf Serum* (FCS) (Gibco) (OIE, 2008).

Virus rabies

Jenis virus rabies yang digunakan diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma di Surabaya. Titer virusnya adalah $10^{7.2}$ MLD₅₀/ml. Virus ini digunakan sebagai sumber antigen pada pengujian Elispot.

Bahan untuk pengukuran sitokin

Kadar IL-2 dalam kultur limfosit anjing yang divaksinasi dengan vaksin rabies ditentukan dengan *Quantikin canine IL-2 assay kit* (R and D system^R). Sementara, kadar IFN- γ ditentukan dengan *Quantikin canine IFN- γ assay kit* (R and D system^R).

Virus rabies untuk ujiantang

Ujiantang menggunakan virus rabies isolat lapangan yang dikoleksi oleh Balai Besar Veteriner Maros.

Jenis vaksin

Vaksin yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas tiga jenis vaksin yaitu:

- 1) Vaksin oral merek Rabigen SAG2 berbentuk cair yang dikemas dalam sachet aluminium bersama-sama dengan umpan yang bentuk sediaannya *lyophilized* (kering beku), dan campuran ikan. Bahan aktifnya mengandung strain virus rabies yang telah dimodifikasi yang dinamakan SAG2. Ukuran diameter umpannya 3,7 cm dan tinggi umpannya 1,9 cm. Vaksin ini berbentuk cair dan mengandung virus rabies yang dilemahkan (*live attenuated*), diproduksi oleh *Virbac*, Prancis. Kandungan titer virus blister $10^{8.6}$ DITC50/ml sedangkan kandungan titer virus umpan $10^{8.4}$ DITC50/ml (nomor batch DI159), yang rute pemberiannya melalui oral. Vaksin ini diproduksi oleh perusahaan *Virbac* di Prancis. Rute pemberiannya melalui oral.
- 2) Vaksin injeksi merek Rabisin, berbentuk cair yang dikemas dalam botol ampul diproduksi oleh perusahaan *Meril*, Prancis. Bahan aktifnya mengandung glikoprotein virus rabies sebanyak lebih dari atau sama dengan satu IU. Kandungan yang lain *Thiomersal* 0,1 mg dan *Aluminium hydroxide* 1,7 mg. Rute pemberiannya intramuskuler dengan volume satu ml.
- 3) Vaksin injeksi merek Rabivet Supra 92 diproduksi oleh Pusat Veterinaria Farma Surabaya di Indonesia, rute pemberiannya melalui intramuskuler.

Uji Elispot

Menggunakan Kit Canine IL-2 dan IFN- γ (R & D System^R) untuk melihat produksi sitokin berupa IFN- γ dan IL-2. Elispot merupakan metode Elisa yang dapat digunakan untuk mendeteksi sel penghasil sitokin atau antibodi. Konfigurasi pada Elispot pada prinsipnya mirip dengan *sandwich-Elisa*, tetapi yang diuji bukan sitokin atau antibodi dalam serum melainkan sel penghasil bahan tersebut, seperti sel mononuklear penghasil sitokin atau sel B penghasil imunoglobulin.

Sel limfosit mononuklear diisolasi terlebih dahulu dari darah tepi (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Sel limfosit atau mononuklear penghasil sitokin yang akan diperiksa kemudian dikultur secara *in vitro* dengan kepadatan 4×10^6 sel/ml ke dalam mikroplat Elisa yang sebelumnya telah dilekatkan antibodi spesifik. Sel kemudian dirangsang dengan menggunakan *phytohemagglutinin* (PHA) atau peptida tertentu dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 sampai dengan 40 jam dalam inkubator CO₂. Pasca perangsangan mikroplat dicuci dan ditambahkan konjugat berbiotin, serta diinkubasi pada suhu ruang. Setelah pencucian ditambahkan substrat *streptavidin alkaline fosfatase* dan diinkubasikan di ruang gelap sampai timbul *spot*. Reaksi dihentikan dengan jalan pencucian menggunakan akuades dan mikroplat dikeringkan.

Pembacaan dilakukan dengan cara menghitung *spot* pada *dissection microscope* atau menggunakan mesin otomatis. Pembacaan *spot* dapat dilihat dengan menggunakan *dissection microscope* dibandingkan dengan kontrol negatif.

Pra-perlakuan hewan percobaan

Hewan percobaan yang berjumlah 36 ekor anjing kampung di karantina selama dua minggu, kemudian dicek kondisi kesehatannya, diberikan vitamin, obat cacing, dan diberikan vaksinasi untuk pencegahan terhadap penyakit distemper, *parvovirus*, hepatitis, dan parainfluenza.

Pengambilan pra-perlakuan

Hewan percobaan yang berjumlah 36 ekor anjing kampung diambil spesimen berupa:

1. Darah utuh (dengan antikoagulan), untuk mengetahui produksi sitokin dan pemeriksaan terhadap parasit darah.
2. Feses, untuk pemeriksaan parasit gastrointestinal.

Vaksinasi, ujiantang dan pengambilan

Dari 36 ekor anjing yang telah dibagi menjadi empat perlakuan yaitu untuk perlakuan kontrol sebanyak sembilan ekor, perlakuan kedua pemberian vaksin oral sebanyak sembilan ekor, perlakuan ketiga dengan pemberian vaksin parenteral Rabisin sebanyak sembilan ekor, dan perlakuan keempat dengan pemberian vaksin parenteral Rabivet Supra 92 sebanyak sembilan ekor.

Masing-masing perlakuan ditempatkan dalam kandang individu. Dosis vaksinasi untuk perlakuan vaksinasi per oral sebanyak 1,75 ml, sedangkan perlakuan dengan injeksi diberi vaksinasi per injeksi sebanyak 0,5 ml, disuntik secara intramuskuler pada otot paha. Untuk kelompok kontrol tidak diberikan perlakuan vaksinasi tetapi diberikan *placebo* berupa aquades steril atau PBS steril. Waktu pemberian vaksinasi adalah hari ke-0, sedangkan ujiantang dilaksanakan pada hari ke-152 (minggu ke-21) pasca vaksinasi. Lokasi penyuntikan untuk ujiantang yaitu di bagian otot *masseter* pada bagian kiri dan kanan.

Pengambilan setelah perlakuan

Pengambilan serum darah untuk pengujian titer antibodi dilakukan pada minggu ke-3 (hari ke-21), ke-8 (hari ke-56), ke-12 (hari ke-84), ke-17 (hari ke-119), ke-21 (hari ke-147), ke-23 (hari ke-161) ke-25 (hari ke-175), dan ke-27 (hari ke-189). Pengamatan proliferasi limfosit dan produksi sitokin (IFN- γ dan IL-2) dengan melakukan pengambilan spesimen darah utuh dengan EDTA dilakukan pada minggu ke-4 (hari ke-28), ke-12 (hari ke-84), dan ke-25 (hari ke-175). Bagan alur penelitian seperti digambarkan pada Gambar 3.

Uji Elispot

Cara kerja:

1. Encerkan antibodi anti-IFN- γ dan IL-2 masing-masing 0,2 ml dalam 10 ml PBS.
2. Tambahkan 100 μ l *capture antibody* (anti-IFN- γ dan IL-2) kedalam plate 96 well (sumuran replace semua).
3. Inkubasikan semalam pada suhu 4^oC.
4. Buang cairan.
5. Blocking 200 μ l/well (larutan blocking: 1 % BSA, 5 % sukrosa dalam PBS steril).
6. Cuci PBS steril sebanyak tiga kali.
7. Tambahkan 50 μ l media tanpa mitogen pada 1 well, tambahkan 50 μ l virus (mitogen) pada 2 well, dan 50 μ l dengan mitogen PHA satu well.
8. Tambahkan 50 μ l sel limfosit dengan konsentrasi 100.000 sel/well
9. Inkubasikan selama 18 sampai dengan 20 jam pada suhu 37^oC dengan konsentrasi CO₂ 5 %.
10. Buang sel limfosit beserta cairannya.
11. Cuci dengan PBS 0,05% Tween-20 sebanyak tiga kali.
12. Encerkan *detection antibody* dengan 1 % BSA (0,2 ml dalam PBS 1% BSA 10 ml)
13. Tambahkan 100 μ l setiap well
14. Inkubasikan semalam pada suhu 4^oC.
15. Cuci dengan PBS 0,05% Tween-20 sebanyak tiga kali.
16. Encerkan konjugat *Streptavidin Alkaline Phosphatase* (1:60 dalam PBS 1% BSA).
17. Tambahkan 100 μ l setiap well.
18. Inkubasikan selama dua jam pada suhu kamar.

19. Cuci dengan PBS 0,05% Tween-20 sebanyak tiga kali. Kemudian cuci satu kali dengan aquadest (air suling) steril.
20. Tambahkan 100 µl ke semua well BCIP/NBT. Tutup plate dan inkubasikan di temperature ruangan selama 30 menit. Cuci satu kali dengan aquades steril kemudian keringkan plate pada suhu 37°C.
21. Kalkulasikan *spot* yang terbentuk dengan menggunakan *microscope dissection*.

Analisis Data

Setelah data terkumpul, lebih dahulu dilakukan pemeriksaan/validasi data, kemudian dianalisis sebagai berikut:

1. Uji statistik deskriptif untuk menggambarkan karakteristik perlakuan dan distribusi frekuensi berbagai variabel.
2. Uji normalitas variabel perlakuan dengan metode Shapiro-Wilk.
3. Uji homogenitas varians antar perlakuan dengan uji Levene, untuk melihat homogenitas varians.
4. Uji komparasi varians perlakuan dengan menggunakan Fisher test (uji F). Apabila F test signifikan maka dilanjutkan dengan uji beda rata-rata.
5. Uji komparasi perlakuan dilakukan dengan membandingkan rata-rata perlakuan. Untuk menguji efek/pengaruh vaksinasi terhadap respons perlakuan dilakukan dengan LSD (Steel and Torrie, 1989; Trihendradi, 2005).
6. Analisis statistik tersebut di atas menggunakan nilai $p \leq 0,05$ sebagai batas kemaknaan dan memakai perangkat lunak statistika atau computer yaitu Program *SPSS for Windows Version 13,0*. Prosedur analisis statistik tersebut akan diolah di Pusat Komputer Universitas Udayana.

Hasil dan Pembahasan

Respon kekebalan seluler diukur berdasarkan sekresi interferon gamma dan interleukin-2 yang dihasilkan oleh limfosit. Tingkat sekresi interferon Gamma dan interleukin-2 pada anjing yang divaksinasi dengan tiga jenis vaksin ditentukan dengan menghitung jumlah limfosit (teknik Elispot). Hasil pengujian disajikan dalam Tabel 1. untuk interferon gamma, Tabel 2. untuk interleukin-2, serta visualisasinya sebagaimana nampak dalam Gambar 1. Sekresi interferon gamma dari anjing setelah divaksinasi dengan ketiga jenis vaksin nilainya sangat rendah sehingga tidak dapat dianalisis dengan statistik. Namun demikian, tampak bahwa vaksin oral mampu menstimulasi sekresi sitokin (interferon gamma) meskipun nilainya sangat rendah yaitu 1,44 spot pada hari ke-28, selanjutnya menghilang pada hari ke-84 (0,00) dan muncul lagi pada hari ke-175 (2,11) pasca vaksinasi atau hari ke-23 pasca *tantang*.

Berdasarkan rerata nilai hasil perhitungan spot yang merupakan indikator limfosit penghasil sitokin interleukin-2, terlihat bahwa antara sekresi interleukin-2 pada hari ke-28 dan hari ke-84 pasca vaksinasi terlihat tidak berbeda nyata ($p = 0,700$; $df = 23$; $p > 0,05$) dan ($p = 0,474$; $df = 25$; $p > 0,05$) di antara ketiga kelompok oral SAG2, kelompok Rabisin, dan kelompok Rabivet Supra 92. Demikian halnya pada hari ke-175 pasca vaksinasi (atau 23 hari pasca *tantang*), produksi interleukin-2 pada kelompok Oral SAG2, kelompok Rabisin dan kelompok Rabivet Supra 92 tidak menunjukkan perbedaan nyata ($p = 0,537$; $df = 25$; $p > 0,05$) (Tabel 2).

Tabel 1. Rerata Nilai Sekresi Interferon Gamma Anjing yang Divaksinasi dengan Vaksin Oral SAG2, Vaksin Injeksi Rabisin dan Vaksin Injeksi Rabivet Supra 92 pada Hari ke-28 dan 84 Pasca Vaksinasi (Sebelum Uji *tantang*), dan Hari ke-175 Pasca Vaksinasi atau Hari ke-23 Pasca Uji *tantang*.

Kelompok vaksinasi	Sekresi Interferon Gamma pasca vaksinasi, hari ke		Sekresi Interferon Gamma pasca uji <i>tantang</i> hari ke:
	28	84	
A.SAG2	1.44*	0	2.11
B.Rabisin	0	0.375	0
C.Rabivet Supra 92	0	0	0

Keterangan:

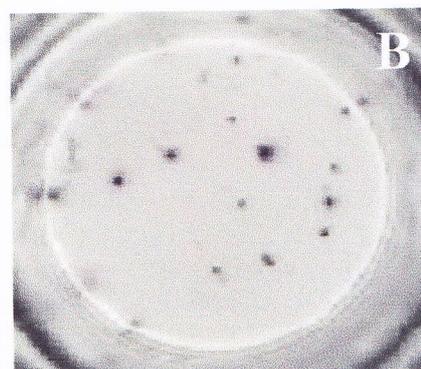
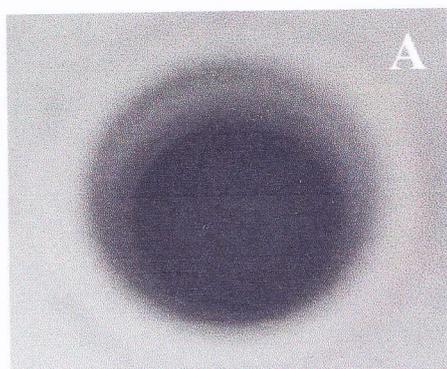
*) Sekresi interferon gamma dinyatakan sebagai jumlah limfosit yang menghasilkan sitokin setelah dikultur bersama virus rabies.
 Karena nilainya kecil, rerata sekresi interferon gamma tidak dapat dianalisis dengan statistik.

Tabel 2. Rerata Nilai Sekresi Interleukin-2 Anjing yang Divaksinasi dengan Vaksin Oral SAG2, Vaksin Injeksi Rabisin dan Vaksin Injeksi Rabivet Supra 92 pada Hari ke-28 dan 84 Pasca Vaksinasi (Sebelum Uji Tantang), dan Hari ke-175 Pasca Vaksinasi atau Hari ke-23 Pasca Uji tantang

Kelompok vaksinasi	Nilai rerata sekresi IL-2 pasca vaksinasi hari ke:		Nilai rerata sekresi IL-2 pasca <i>tantang</i> hari ke:
	28	84	23
A.SAG2	45,80* a	52,25 a	40,06 a
B.Rabisin	43,50 a	56,78 a	43,50 a
C.Rabivet Supra 92	46,70 a	52,50 a	46,73 a
D.Kontrol	0,00	0,00	0,00
LSD 5%	7,859	8,305	10,961

Keterangan:

- *) Sekresi interleukin-2 dinyatakan sebagai jumlah limfosit yang menghasilkan sitokin setelah dikultur bersama virus rabies.
 Nilai rerata dengan notasi huruf yang sama dalam satu kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).



Gambar 1. A. Variasi Warna Biru Keunguan Hasil Uji Elispot pada Mikroplat; B. Spot-spot yang terbentuk oleh karena sel limfosit yang menghasilkan sitokin berupa interleukin-2

Tingkat warna biru keunguan antar sumuran mikroplat, menunjukkan variasi Jumlah *Spot*. Limfosit dikultur secara *in vitro* bersama mitogen berupa virus rabies sendiri (*test*), *pythohemagglutinin* (kontrol positif sekresi) atau tanpa mitogen (kontrol negatif). Keberadaan virus rabies dalam kultur limfosit akan memicu timbulnya sitokin berupa interferon gamma atau interleukin-2. Sitokin yang disekresi akan ditangkap oleh antibodi dan tampak sebagai bintik (*spot*) setelah diwarnai. Karena itu, setiap *spot* mewakili satu limfosit yang menghasilkan sitokin khas virus rabies. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa respons kekebalan seluler yang diinduksi oleh ketiga jenis vaksin didominasi oleh interleukin-2 dan sedikit berupa interferon gamma.

Sekresi IL-2 yang diinduksi oleh limfosit anjing yang divaksin dengan ketiga jenis vaksin pada hari ke-28 dan ke-84 tidak berbeda nyata satu sama lainnya. Hanya saja pada hari ke-175 pasca vaksinasi atau hari ke-23 pasca uji tantang, sekresi IL-2 oleh limfosit anjing yang divaksin dengan vaksin injeksi Rabivet Supra 92 sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan yang divaksin dengan vaksin oral dan vaksin injeksi Rabisin. Hasil ini menunjukkan bahwa ketiga jenis vaksin mampu menginduksi kekebalan seluler yang relatif sama dan tampaknya lebih stabil jika dibandingkan dengan kekebalan humoral.

Untuk interferon gamma, kit yang digunakan pada prinsipnya sama dengan pengujian interleukin-2, tetapi antibodi yang digunakan berbeda yaitu spesifik terhadap interferon gamma. Sekresi interferon gamma pada anjing yang divaksin dengan ketiga jenis vaksin tersebut relatif rendah sehingga tidak dapat dianalisa secara statisti. Sekresi interferon gamma hanya muncul pada vaksin oral hari ke-28 dan ke-175 dan vaksin Rabisin hari ke-84 dengan tingkat sekresi yang sangat rendah. Hasil ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Lambot *et al.*, (2001) bahwa interferon gamma dapat dihasilkan dalam jumlah besar secara *in vivo* dengan vaksin rabies lebih awal setelah vaksinasi pertama.

Kesimpulan Dan Saran

Vaksin oral SAG2, vaksin parenteral Rabisin dan Rabivet Supra 92 mampu membentuk respons kekebalan seluler yaitu interleukin-2 dan interferon gamma. Vaksin oral SAG2 lebih banyak menghasilkan Interleukin-2 daripada vaksin parenteral Rabisin dan Rabivet Supra 92. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap metode dan cara pemberian vaksin oral pada tingkat lapangan untuk mengetahui efektivitasnya pada penanggulangan rabies di Indonesia.

Daftar Pustaka

- Bingham, J. 2001. *Rabies on Flores Island, Indonesia: is Eradication Possible in The Near Future?. In: Rabies Control in Asia*. Prosedings of the Fourth International Symposium organized by Merieux Foundation, with the co-sponsorship of the World Health Organization. Hanoi, Vietnam: 5-9 Maret. John Libbey Eurotext. p. 148 – 155.
- Dharmawan, N.S. 2009. *Anjing Bali dan Rabies, Pertama*. Denpasar: Buku Arti, Arti Foundation. p. 21 – 22.
- Dibia, I. N. 2007. *Evaluasi Pemberantasan Rabies di Pulau Flores Provinsi Nusa Tenggara Timur: Kajian Surveilans Tahun 2006*. Denpasar: Bulletin Veteriner Balai Besar Veteriner Denpasar 19 (70):6-13.
- Fekadu, M., Nesby, S.L., Shaddock, J.H., Schumacher, C.L., Linhart, S.B., Sanderlin, D.W. 1996. *Immunogenicity, efficacy and safety of an oral rabies vaccine (SAG2) in dogs*. Vaccine. 14:465-468.
- Follmann, E.H., Ritter, D.G., Hartbauer, D.W. 2004. *Oral Vaccination of Captive Arctic Foxes with Lyophilized SAG2 Rabies Vaccine*. Journal of Wildlife Disease, 40 (2):328-334.
- Hardjosworo. S. 1984. *Penanggulangan Rabies di Jawa Barat*. Dalam Rangka Kumpulan Makalah Symposium Nasional Rabies. Diselenggarakan oleh PDHI Cabang Bali di Hotel Pertamina Cottage Denpasar pada tanggal 10-11 September 1984. p. 109-126.
- Montgomery, D.C. 2001. *Design and Analysis of Experiments* (5th Edition). John Wiley and Sons, Inc., New York. 382 p.
- Orciari, L.A., Niezgod, M., Hanlon, C.A., Shaddock, J.H., Sanderlin, D.W., Yager, P.A., Rupprecht, C.E. 2001. *Rapid Clearance of SAG2 Rabies Virus from Dogs after Oral Vaccination*. Vaccine 19:4511-4518.
- Putra, A.A.G. 2009. *Tinjauan Ilmiah Upaya Pemutusan Rantai Penularan Rabies dalam Rangka Menuju Indonesia Bebas Rabies 2015*. Makalah disampaikan pada Workshop Rabies Dalam Rangka Pertemuan Tikor Rabies Pusat, diselenggarakan oleh Ditjen P2&PL DEPKES, di Modern Golf Raya Tangerang, tanggal 14 – 17 Desember 2009.
- Putra, A.A.G., Gunata, I.K., Faizah., Dartini, N.L., Hartawan, D.H.W., Setiaji, G., Putra, A.A.G.S., Soegiarto., dan Orr, H.S. 2009. *Situasi Rabies di Bali: Enam Bulan Pasca Program Pemberantasan*. Buletin Veteriner Balai Besar Veteriner Denpasar. 21 (74):13-25.
- Putra, A.A.G dan Gunata, I.K. 2009. *Epidemiologi Rabies: Suatu Kajian Terhadap Wabah Rabies di Bali*. Makalah disajikan dalam Workshop Kesehatan Hewan Regional VI, yang diselenggarakan oleh Balai Besar Veteriner Denpasar bekerjasama dengan Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Propinsi NTB, di Mataram pada tanggal 9 Juni 2009.
- Rupprecht, C.E., Blass, L., Smith, K., Orciari, L.A., Niezgod, M., Withfield, S.G., Gibbons, R.V., Guerra, M., Hanlon, C.A. 2001. *Human Infection Due To Recombinant Vaccinia-Rabies Glycoprotein*. N Engl J Med. 345, (8):582-586.

- Risni, I. 2003. *Essential Immunology*. Edisi 8 Terj. A. Harahap., L. Kurniawan., S. Djauzi., S.B. Kresno dan Y.P. Dachlan. Widya Medika.
- Steel, R.G.D dan Torrie, J.H. 1989. *Principles and Prosedures of Statistics*. Mc. Graw Hill Inc.
- Song, M., Tang, Q., Wang, D.M., Mo, Z.J., Guo, S.H., Li, H., Tao, H.L., Rupprecht, C.E., Feng, Z.J., Liang, G.D. 2009. *Epidemiological Investigations of Human Rabies in China*. Biomed Central infectious Disease. 9 (210): 1-8.
- Trihendradi, C. 2005. *Step by Step SPSS 13. Analisis Data Statistik*. Jogjakarta: Andi
- WHO. 2005a. *Report of WHO Expert Consultation on Rabies*. First Report. WHO Technical Report Serirs 931.
- WHO, 2005b. *Rabies Elimination in South-East Asia*. Report of Workshop. Colombo, Sri Lanka. 10-12 Nopember 2005.
- Warman, A.R. 1984. *Penanggulangan Rabies di Jawa Barat*. Dalam Rangka Kumpulan Makalah Symposium Nasional Rabies. Diselenggarakan oleh PDHI Cabang Bali di Hotel Pertamina Cottage Denpasar pada tanggal 10-11 September 1984. p.109-126.