

## **Penentuan Kandungan Virus Vaksin *Newcastle Disease* Dari Dua *Poultry Shops* Yang Berbeda Pada Kultur Sel Primer Fibroblast Embrio Ayam**

*(ASSESSMENT OF VIRAL CONTENT IN NEWCASTLE DISEASE VACCINE OBTAINED  
FROM TWO DIFFERENT POULTRY SHOPS USING PRIMARY CHICKEN FIBROBLAST  
CELL CULTURE)*

**Gusti Ayu Yuniati Kencana**

Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Udayana, Denpasar

Email: [yuniatikencana@gmail.com](mailto:yuniatikencana@gmail.com)

### **ABSTRAK**

Penyakit *Newcastle Disease* (ND) telah bersifat endemis di Indonesia, yang ditandai dengan munculnya kasus sepanjang tahun. Berbagai program telah dilakukan oleh pemerintah Indonesia dalam upaya mencegah penyebaran penyakit ND, seperti vaksinasi, baik menggunakan vaksin aktif maupun vaksin inaktif. Mutu vaksin yang digunakan ditentukan oleh kandungan virusnya. Hal ini sangat berpengaruh terhadap keberhasilan vaksinasi pada peternakan ayam. Titer virus yang terkandung di dalam vaksin semestinya tetap dipertahankan sejak dari produsen vaksin sampai kepada konsumen. Kandungan virus ND ditentukan dengan satuan *eggs lethal dose-50* (ELD<sub>50</sub>) atau *Tissue Culture Infective Dose-50* (TCID<sub>50</sub>) dengan standar minimal untuk virus vaksin ND strain LaSota adalah 6<sup>6,5</sup>/dosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah kandungan virus vaksin yang dijual di pasaran/*poltry shop* masih tetap berada dalam batas standar minimal. Hal ini dimaksudkan agar kegagalan vaksinasi akibat mutu vaksin yang tidak memadai dapat diminimalkan. Sampel vaksin ND strain LaSota diperoleh dari dua *poultry shop* yang berbeda dan kandungan virusnya diuji dengan TCID<sub>50</sub> pada kultur primer fibroblast embrio ayam (*Chicken embryo fibroblast*=CEF) dengan empat kali ulangan. Vaksin ND diencerkan secara seri berkelipatan 10 dengan pengencer vaksin dan setiap pengenceran diinokulasikan pada 4 sumuran plat mikro 96 sumuran. Titer virus (TCID<sub>50</sub>) dihitung dengan metode Reed-Muench. Setiap vaksin diuji 4 kali (4 kali ulangan). Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer virus dari kedua vaksin adalah 6<sup>6,7</sup> dan 6<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> per dosis yang berarti masih berada dalam kisaran standar minimal yang dianjurkan.

**Kata kunci:** vaksin ND, TCID<sub>50</sub>, CEF primer.

### **ABSTRACT**

*Newcastle Disease* (ND) is still endemic in Indonesia, characterized by its year-round occurrence. Many measures have been adopted by the government to prevent the spread of the disease including vaccination using both active and inactive vaccine. The quality of vaccine is influenced by its viral content which determines the success of ND vaccination in chicken flock. The viral content in ND vaccine can be determined by measuring its eggs lethal dose-50 (ELD<sub>50</sub>) or Tissue Culture Infective Dose-50 (TCID<sub>50</sub>) and the minimum viral content considered to be appropriate for active ND vaccine is 6<sup>6,5</sup>/single dose. This study was

conducted to find out the viral content of ND vaccine marketed in some poultry shops. ND vaccine of LaSota strain were obtained from 2 different poultry shops and the viral content was determined in *Chicken embryo fibroblast* (CEF). The vaccines were reconstituted vaccine diluent and diluted serially in 10-fold diluted. Each dilution was inoculated into 4 wells of confluent CEF cultured in 96 well microplate. The TCID<sub>50</sub> was then calculated by Reed and Muench method. The TCID<sub>50</sub> of each vaccine was determined 4 times (4 replications). The result showed that the titer of the virus in the vaccine were 6<sup>6,7</sup> and 6<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/per dose which mean that both vaccines were still above the minimum standard of viral content recommended by some workers.

**Kata kunci:** ND vaccine, TCID<sub>50</sub>, CEF.

## PENDAHULUAN

Dewasa ini kebutuhan masyarakat akan protein hewani sudah semakin meningkat. Salah satu sumber protein hewani yang banyak dikembangkan oleh masyarakat luas adalah ternak ayam karena cara pemeliharaannya yang relatif mudah. Di samping itu hasilnya dapat diperoleh dalam kurun waktu yang relatif singkat baik berupa telur maupun daging.

Selain faktor-faktor yang menguntungkan di atas, ternak ayam mempunyai kelemahan karena sangat peka terhadap beberapa penyakit menular. Salah satu penyakit menular yang sering menyerang ternak ayam adalah *Newcastle Disease* (ND). Penyakit ini disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus type-1* (APMV-1), genus *Avulavirus*, familia *Paramyxoviridae* (Al-Garib *et al.*, 2003). Avian Paramyxovirus terdiri dari sembilan serotype yakni APMV-1 sampai APMV-9 (OIE, 2009). Virus ND termasuk kelompok virus RNA dengan genom berserat tunggal

(*single stranded/ss*) dan berpolaritas negatif, berbentuk bulat dengan diameter 100-500 nm, beberapa di antaranya berbentuk filament, dan beramplop (Fenner *et al.*, 1995).

Virus ND dikelompokkan menjadi tiga pathotype yaitu: *lentogenik*, *mesogenik* dan *velogenik*. Pengelompokkan tersebut berdasarkan atas waktu kematian embrio, yakni: *lentogenik* adalah strain virus yang kurang ganas ditandai dengan kematian embrio lebih dari 90 jam, *mesogenik* antara 60-90 jam, sedangkan *velogenik* kurang dari 60 jam (Saif, 2003). Gejala penyakit yang ditimbulkan oleh virus ND tipe *lentogenik* pada ternak ayam bersifat ringan atau tanpa gejala klinis. Virus ND tipe *mesogenik* dengan virulensi moderat (sedang) menimbulkan gejala yang dari ringan sampai sedang. Sementara itu, virus ND *velogenik* adalah tipe yang sangat ganas ditandai dengan penyakit yang bersifat akut dan kematian yang tinggi sampai 100%. Berdasarkan atas predileksinya dan gejala klinis yang ditimbulkan, virus ND *velogenik*

dibedakan lagi menjadi bentuk *neurotrofik* dengan gejala gangguan syaraf, *pneumotrofik* dengan kelainan pada sistim pernafasan, dan *viscerotrofik* dengan kelainan pada sistima pencernaan (Aldous and Alexander, 2001).

Di Indonesia, penyakit ND bersifat endemis, yang ditandai dengan kejadian penyakit yang ditemukan sepanjang tahun. Penyakit ND bersifat akut sampai kronis ditandai dengan angka sakit (morbiditas) maupun angka kematian (mortalitas) yang sangat tinggi. Pada kelompok ayam yang peka kejadian penyakit berlansung cepat ditandai dengan mortalitas maupun morbiditasnya tinggi, dapat mencapai 100% terutama akibat infeksi NDV strain velogenik, dan 30-50% pada strain mesogenik (Tabbu, 2000). Sementara virus ND lentogenik umumnya menimbulkan gejala klinis yang ringan atau tanpa gejala klinis sehingga banyak yang dipakai untuk vaksin.

Penularan ND umumnya terjadi melalui kontak langsung antara ayam sakit dan ayam sehat, atau kontak tidak langsung melalui pakan, air minum, udara, maupun melalui pekerja dan peralatan kandang yang telah tercemar virus. Beberapa faktor yang mempengaruhi patogenisitas virus ND adalah galur virus, rute infeksi, umur ayam, lingkungan serta status kebal ayam saat terinfeksi virus. Selama sakit, ayam

mengeluarkan virus dengan konsentrasi yang tinggi melalui feses maupun lendir dari mukosa mata maupun mukosa hidung yang merupakan sumber penularan.

Pencegahan terhadap penyakit ND dilakukan dengan cara vaksinasi di samping menjaga sanitasi lingkungan dengan baik. Berbagai macam vaksin telah beredar di pasar, baik vaksin aktif, vaksin inaktif maupun vaksin rekombinan (Alexander, 2001; Morgan, 2007). Vaksinasi dapat dilakukan melalui berbagai cara sesuai dengan anjuran dari produsen vaksin, seperti dengan cara tetes mata, tetes hidung, disuntikkan pada urat daging, dicampurkan dengan pakan, air minum, maupun dengan cara disemprotkan (*spraying*). Walaupun program vaksinasi dan sanitasi lingkungan telah dijalankan dengan baik namun penyakit ND belum dapat diberantas secara tuntas di Indonesia, bahkan kasus ND pada ayam buras juga ditemukan di Bali (Kencana and Kardenia, 2011).

Timbulnya kasus ND pada kelompok ternak ayam yang telah divaksinasi dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti karena faktor genetik, akibat kualitas vaksin yang kurang baik, atau akibat kesalahan vaksinatornya. Kualitas vaksin dipengaruhi oleh beberapa hal seperti kandungan virus vaksin, cara penyimpanan vaksin di *poultry shop*, atau rantai pendingin vaksin (*cold chain*) saat transportasi dari *poultry shop* ke

peternakan. Atas dasar permasalahan tersebut, penulis melakukan penelitian tentang mutu vaksin ND berdasarkan atas kandungan virus vaksin yang diuji secara Quantal (Mahy, 1985), yakni dengan menentukan *Tissue Culture Infective Dose-50* (TCID<sub>50</sub>) pada kultur sel fibroblast primer embrio ayam sebagai media isolasi virus vaksin.

## METODE PENELITIAN

### Vaksin

Vaksin yang dipakai dalam penelitian ini adalah vaksin ND aktif strain LaSota dari galur lentogenik yang diperoleh dari dua *poultry shop* yang berbeda.

### Penyiapan kultur sel primer fibroblast embrio ayam

Kultur sel primer fibroblast embrio ayam disiapkan dari telur ayam bertunas berumur 10 hari yang bebas pathogen. Sel disiapkan dalam plat mikro 96 sumuran dengan media *minimal essential medium* (MEM) yang mengandung 10% *foetal calf serum* (FCS), 100 IU/ug penisilin/streptomisin. Sel kemudian dikultur pada suhu 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub> sampai mencapai konfluen, ditandai dengan pertumbuhan sel yang sehat dan memenuhi sumuran plat mikro.

### Penentuan TCID<sub>50</sub> virus vaksin

Vaksin diencerkan berseri kelipatan 10 dengan MEM steril dan setiap pengenceran mulai 10<sup>-4</sup> sampai 10<sup>-8</sup> diinokulasikan ke dalam 5 sumuran plat mikro 96 sumuran. Setelah inkubasi selama 1 jam inokulum dibuang, sel dicuci dengan PBS steril dan ditambah medium MEM yang mengandung 5% FCS, 100 IU/ug penisilin/streptomisin per ml. Sel diinkubasikan kembali pada suhu 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 2 hari. Setiap vaksin diuji dengan 4 kali ulangan. Pertumbuhan virus diamati dengan efek sitopatik dan uji hemadsorpsi menggunakan sel darah merah ayam konsentrasi 1%. Jumlah sumuran yang terinfeksi dan tidak terinfeksi virus ND dicatat dan titer virus (TCID<sub>50</sub>) dihitung dengan metode Reed *and* Muench (1938).

### Karakteristik CEF terinfeksi virus vaksin ND

Selain untuk menentukan TCID<sub>50</sub> dari vaksin ND strain LaSota, dalam penelitian ini juga diamati terjadinya kerusakan sel akibat terinfeksi oleh virus vaksin ND. Pengamatan sel terinfeksi tanpa pewarnaan dilakukan di bawah mikroskop *phase-contrast*.

### Analisis data

Tolok ukur yang dianalisis adalah kandungan virus vaksin ND yang

dinyatakan dalam satuan TCID<sub>50</sub> per dosis. Data yang diperoleh dihitung dengan metode Reed *and* Muench (1938), selanjutnya dianalisis dengan uji t (Steel *and* Torrie, 1980) pada taraf signifikansi 5 % dan 1 %.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

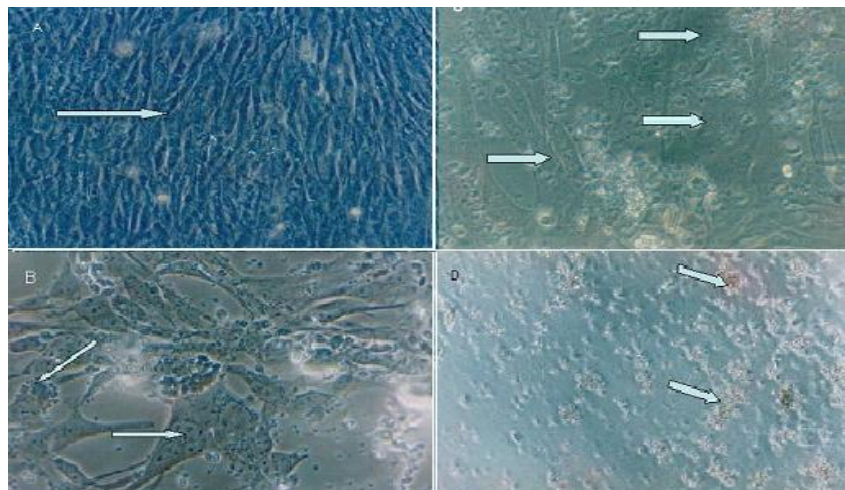
Hasil perhitungan dengan statistik tentang kandungan virus vaksin ND

didapatkan hasil bahwa titer vaksin ND strain LaSota dari *poultry shop* X tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan titer vaksin ND strain LaSota dari *poultry shop* Y. Rerata titer (TCID<sub>50</sub>) vaksin ND strain LaSota dari *poultry shop* X adalah sebesar  $10^{6,8} \pm 0,24$ , sedangkan TCID<sub>50</sub> dari *poultry shop* Y adalah sebesar  $10^{6,7} \pm 0,14$ . Hasil perhitungan statistik TCID<sub>50</sub> per dosis vaksin ND LaSota dari *poultry shop* X dan Y dimuat pada Tabel 1

Tabel 1. TCID<sub>50</sub> per dosis vaksin ND dari *poultry shop* X dan Y

No	<i>Poultry shop</i> X		<i>Poultry shop</i> Y
1	7,0		6,5
2	6,6		6,7
3	7,1		6,8
4	6,7		6,8
Total	27,4		26,8
Rerata	6,68		6,7
SD	0,24		0,14
T hitung	1,082		
T tabel 5 %	2,447	NS	
T tabel 1 %	3,707		

Keterangan: NS = *non sigifikans* ( $P > 0,05$ )  
SD= standar devias



Gambar 1. Karakteristik sel fibroblast embrio ayam yang terinfeksi virus vaksin ND galur Lasota. Sel fibroblast embrio ayam normal (A). Sinsitium (B). Efek sitopatik (C). Hemadsorpsi (D).

## PEMBAHASAN

### Karakteristik CEF terinfeksi virus vaksin ND

Sebelum diinkolusi dengan virus vaksin ND, sel CEF yang konfluen tampak lonjong dan beraturan. Sehari setelah infeksi tampak mulai terbentuk sinsitia (sel besar berinti banyak) dalam skala kecil dengan 5-10 inti per sinsitium dan tampak makin jelas pada hari ke 2 dan ke 3 pasca infeksi. Sementara itu, efek sitopatik yang lain berupa lepasnya sel dan tampak maksimal pada hari ke-3. Adanya sel terinfeksi virus vaksin ND juga terbukti pada uji hemadsorpsi yang ditandai dengan menempelnya sel darah merah ayam pada sel terinfeksi. Gambar sel fibroblast primer embrio ayam normal (kontrol) dan terinfeksi virus vaksin ND dimuat pada Gambar 1.

Rerata kandungan TCID<sub>50</sub> per dosis dari kedua vaksin pada penelitian ini adalah 6<sup>6,7</sup> dan 6<sup>7</sup>. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa kedua sampel vaksin LaSota yang digunakan sebagai sampel penelitian memiliki kandungan virus yang standar, karena kandungan minimal virus vaksin LaSota adalah 6<sup>6,5</sup>/dosis (Hofacre, 1986). Kandungan virus vaksin berpengaruh terhadap respon imun dan akan memberikan perlindungan protektif pada ternak ayam yang divaksinasi (Spradbrow *et al*, 1988).

Penyimpanan vaksin komersial seperti pada *poultry shop* yang menempatkan vaksin dalam pendingin bersuhu 18-22°C, ternyata masih bersifat stabil selama kurun waktu 3 bulan. Penurunan infekritas vaksin sebesar 1 log akan terjadi apabila vaksin disimpan pada suhu 30-35°C selama 24 jam (Tu *et al*, 1998). Hal ini telah dibuktikan oleh Abbas *et al* (2006) pada vaksin LaSota dengan suhu penyimpanan 4, 25 dan 40°C selama 24 jam, ternyata tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap penurunan titer HA, meskipun telah terjadi penurunan sebesar 2 log unit pada EID<sub>50</sub> dari semua vaksin yang diteliti.

Replikasi virus ND pada kultur sel yang diinfeksi virus vaksin LaSota, ditandai dengan terjadinya berbagai kerusakan sel seperti efek sitopatik (*cytophatic effect/CPE*) dan bentukan sinsitium. Timbulnya bentukan CPE dan sinsitium pada kultur sel akibat adanya peran hemaglutin-neuraminidase (HN), dan *fusion* protein (F) yang dimiliki oleh virus Paramyxovirus (Morrison *and* Portner, 1991). Ekspresi protein F dan HN pada permukaan sel terinfeksi virus ND menyebabkan penyatuan sel terinfeksi dengan sel normal di sekitarnya sehingga terbentuk sel besar dengan inti banyak yang disebut sinsitium. Sinsitium tersebut semakin lama semakin membesar dan akhirnya mati sehingga

terlepas dari dinding plat mikro (Horvath *et al*, 1992).

Selain mengamati adanya kerusakan sel, deteksi pertumbuhan virus vaksin pada kultur sel juga dapat dibuktikan dengan melakukan uji hemadsorpsi (Alexander, 2001), yakni menambahkan sel darah merah ayam konsentrasi 1 % pada kultur sel yang telah diinfeksi virus vaksin ND. Pertumbuhan virus vaksin pada kultur sel ditandai dengan adanya ikatan antara sel darah merah ayam dengan sel terinfeksi virus (Gambar.1D ).

Proses pengikatan sel darah merah 1 % dengan sel terinfeksi virus ND terjadi karena adanya aktivitas hemaglutinasi yang disebabkan oleh kandungan hemaglutinin pada amplop virus familia Paramyxoviridae. Namun aktivitas hemaglutinasi virus ND biasanya berlangsung maksimal selama satu jam akibat peran enzim neuraminidase yang akan merusak ikatan antara reseptor eritrosit dengan protein hemaglutinin yang dimiliki oleh virus familia Paramyxoviridae (Alexander, 2001).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan virus vaksin ND strain LaSota dari dari *poultry shop* X tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan kandungan vaksin ND strain LaSota dari *poultry shop* Y. Disamping itu kandungan virus vaksin ND strain LaSota dari kedua *poultry shop* yang diteliti masih dalam batas

standar seperti yang dianjurkan. Replikasi virus vaksin ND pada kultur sel primer fibroblast embrio ayam ditandai dengan adanya sinsitium dan efek sitopatik lainnya (Gambar. 1B dan Gambar.1C)

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa titer virus dari kedua vaksin adalah  $6^{6,7}$  dan  $6^7$  TCID<sub>50</sub> per dosis yang berarti masih berada dalam kisaran standar minimal yang dianjurkan.

### Saran

Uji kandungan virus vaksin mutlak diperlukan untuk menentukan kualitas vaksin sebelum dipasarkan, oleh karena itu untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan sampel dan ulangan yang lebih banyak.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan dalam rangka kursus Tehnik Pembuatan Kultur Jaringan Hewan di Lab Hayati PAU UGM, oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih atas segala biaya dan fasilitas yang telah diberikan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas T, Muneer MA, Ahmed MD, Khan MA, Andi MY, Kan I. 2006. Comparative Efficacy of Five Different Brands of Commercial Newcastle Disease LaSota Virus Vaccines in Broilers. *Pakistan Vet. J.* 26(2): 55-58.
- Allan W. H. and R. E. Gough, 1974. A standard haemagglutination test for Newcastle Disease. A comparison of macro and micro methods. *Vet. Rec.*, 95: 120–123.
- Al-Garib, S. O., A. L. J. Gielkens, E. Gruys and G. Koch, 2003. Review of Newcastle disease virus with particular reference to immunity and vaccination. *World's Poult. Sci. J.* 59: 185-200.
- Aldous, E.W. dan Alexander, D.J. 2001. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type1). *Avian Pathol.*, 30: 117–128
- Alexander, D.J. 2001. Newcastle Disease. The Gordon Memorial Lecture. *Br. Poult. Sci.* 42, 5-22.
- Fenner, F.J., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Root, R., Studdert, M.J. dan White, D.O. 1995. *Veterinary Virology*
- Horvath, CM, Ray G, Paterson, Margaret A, Shaughnessy, Rosemary W and Lamb RA. 1992. Biological Activity of Paramyxovirus Fusion Proteins: Factors Influencing Formation of Syncytia. *J Virol.* 66 (7): 4564-4569
- Kencana, G.A.Y. & Kardena, I.M. 2011. Gross pathological observation of acute Newcastle Disease in domestic chicken. Disampaikan pada Seminar Internasional Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI) dan International Union of Microbiological Societies (IUMS) di Denpasar, 22-24 Juni 2011.
- Mahy BWJ., *Virology. A practical approach*, IRL Press, Oxford.
- Morgan R., W. 2007. Proceeding of the 42<sup>nd</sup>. National Meeting, Poultry Health and Processing 67-72.
- Morrison, T., and A. Portner. 1991. Structure, function, and intracellular processing of the glycoproteins of paramyxoviridae, p. 347-382. In D. W. Kingsbury (ed.), *The paramyxoviruses*. Plenum Press, New York.
- OIE. 2010. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010. [www.oie.int](http://www.oie.int). Akses tanggal 11 Mei 2011.
- Reed, L.J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene*, 27, 493-497
- Saif, Y.M., 2003. *Disease of Poultry*. 11<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press, USA
- Spradbrow, P. B., J. L. Samuel and A. L. Ibrahim, 1988. Serological response of chickens to oral vaccination with Newcastle disease virus. *J. Vet. Microbiol.*, 16: 255-262.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H., 1995. Prinsip dan Prosedur Statistik, Terjemahan : B. Sumantri. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Tabbu, C.R. 2000. *Penyakit Ayam dan Penaggulangannya*. Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral. 1 : 232–244. Kanisius, Yogyakarta



Tu, T. D., K. V. Phuc., N. T. K. Dinh, D. N. Quoc and P. B. Spradbrow, 1998. Vietnamese trials with a thermostable Newcastle disease vaccine (strain I2) in experimental and village chickens. *Prev. Vet. Med.*, 34: 205-214.