

PENGEMBANGAN VAKSIN KOLERA UNGGAS: I. PROTEKSI VAKSIN *PASTEURELLA MULTOCIDA* ISOLAT LOKAL PADA AYAM TERHADAP UJI TANTANG GALUR HOMOLOG DAN HETEROLOG

SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH,
BHAKTI POERWADIKARTA, dan SJAFEI

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 2 Nopember 2000)

ABSTRACT

SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH, BHAKTI POERWADIKARTA, and SJAFEI. 2001. Development of fowl cholera vaccine: I. Protection of *Pasteurella multocida* local isolate vaccine against challenge of homologous and heterologous strains. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(1):59-67.

Pasteurella multocida locally isolated from chicken and ducks (BCC 299, BCC 2331, DY1, DY2, 12TG, 15TG) and imported strains (BCC 1359, 1362; HEDDLESTON group 1 and 6 respectively) had been tested for its pathogenicity in the previous study. The aims of this experiment were to study the preparation of local isolate pasteurization vaccines and to determine the protective effect of that vaccines in chicken against the highly pathogenic local isolates of *P. multocida*. Killed monovalent, bivalent and polyvalent pasteurization vaccines were prepared and each was adjuvanted with aluminum hydroxide gel at a final concentration of 1.5% and the cell concentration was equal to the No 10 of MacFarland tube standard. Each of the vaccine prepared was used to vaccinated on a group of six week old of layer chicken (8 per group). Each chicken was subcutaneously injected with 0.2 ml of vaccine, four weeks later each was boosted with similar vaccine with the same dose. Two weeks after giving the boosted vaccine each group of chicken were challenged, half with live bacterium of *P. multocida* BCC 2331 and other with DY2. Any chick which survive after challenge was designated as protected by vaccination. Before vaccination 1 ml of blood was drawn from each of chicken and then two weeks apart up to challenge. Serum from each sample was separated and kept in deep freeze until tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Chicken vaccinated with killed whole cell *P. multocida* vaccines of monovalent (BCC 2331 or DY2) and bivalent (BCC 2331 + DY2) were protected against challenge with live bacterium of either BCC 2331 or DY2 at rate 67-100%. There was no protection in chicken vaccinated with either BCC 299, DY1, 12TG, 15TG, BCC 1359, or 1362 killed vaccine. Similarly no protection of chicken vaccinated with either DY1 + BCC299, 12TG + 15TG or BCC 1359 + BCC 1362 bivalent vaccines. The protection rate of the polyvalent local isolate vaccine was at average 50-75%. All vaccinated chicken showed the presence of antibody responses against the extract cell and whole cell antigens of either *P. multocida* BCC 2331 or DY2 local isolate as detected by ELISA. The antibody responses from vaccinated chicken against extra cellular antigens prepared from broth cultures of BCC 2331 and DY2 were detected only from vaccinated chicken with vaccine containing killed antigen of BCC 2331 and/or DY2 isolate. It is likely, the local isolate of *P. multocida* BCC 2331 and DY2 would be benefit for producing inactive fowl cholera vaccine use in Indonesia, but the protective antigen that enhances immune protection should be determined by means of immunoblotting techniques.

Key words: *Pasteurella multocida*, fowl cholera, vaccine, protection

ABSTRAK

SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH, BHAKTI POERWADIKARTA, dan SJAFEI. 2001. Pengembangan vaksin kholera unggas: I. Proteksi vaksin *Pasteurella multocida* isolat lokal pada ayam terhadap uji tantang galur homolog dan heterolog. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(1):59-67.

Isolat lokal *Pasteurella multocida* dari ayam dan itik (BCC 299, BCC 2331, DY1, DY2), galur acuan impor (BCC 1359 dan 1362) yang tersimpan pada Balitvet culture collection (BCC) dan isolat lokal asal itik (12TG, 15TG) telah diuji patogenitasnya pada mencit dan ayam. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pembuatan vaksin kolera unggas dan menguji sifat proteksinya pada ayam. Vaksin monovalen, bivalen dan polivalen inaktif dibuat dari bakteri tersebut diemulsikan dalam gel aluminium hidroksida pada konsentrasi akhir 1,5%, dan konsentrasi sel setara dengan kekeruhan tabung standar MacFarland No 10. Tiap kelompok ayam (8 ekor/kelompok) diinjeksi dengan vaksin dosis 0,2 ml secara subkutan dan diinjeksi dengan vaksin booster 4 minggu berikutnya dengan dosis yang sama. Dua minggu setelah injeksi vaksin booster, separuh ayam dari tiap kelompok ditantang dengan bakteri hidup BCC 2331 dan separuhnya lagi dengan isolat DY2. Sebelum vaksinasi pertama, sebelum vaksin booster atau setiap selang waktu 2 minggu, darah ayam diambil, serum dipisahkan dan disimpan pada -20°C sampai pemeriksaan respon antibodi secara *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) dilakukan. Antigen ELISA dibuat dari ekstrak sel, endapan supernatan (antigen ekstraselular) dan antigen sel utuh (*whole cell*) BCC 2331 dan DY2. Hasil uji tantang

pada ayam yang diinjeksi dengan vaksin monovalen BCC 2331, DY 2, bivalen (BCC 2331 + DY2) menunjukkan adanya proteksi 67-100%. Tidak ada proteksi pada kelompok ayam yang diinjeksi vaksin (galur impor, DY1, BCC299, 12TG, 15TG). Proteksi silang hanya terjadi pada isolat BCC 2331 dan DY2 antara 33-67%. Proteksi pada kelompok ayam yang diinjeksi dengan vaksin polivalen 50-75%. Respon antibodi pada kelompok ayam tersebut terhadap antigen ekstraselular dan antigen *wole cell* BCC 2331 dan DY2 cukup tinggi. Akan tetapi respon antibodi terhadap antigen ekstraselular relatif rendah dan untuk galur impor hampir tidak ada respon. Dari penelitian vaksin ini diketahui isolat lokal *P. multocida* BCC 2331 dan DY2 dapat dipakai untuk kandidat vaksin pasterellosis inaktif untuk ayam pada waktu yang akan datang di Indonesia, tetapi masih perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui imun proteksi secara *immunoblotting*.

Kata kunci: *Pasteurella multocida*, kolera unggas, vaksin, proteksi

PENDAHULUAN

Galur *Pasteurella multocida* serogroup A merupakan penyebab kholera ayam atau itik (RHOADES dan RIMLER, 1990). Kasus penyakit kolera ayam atau itik di lapangan dapat terjadi dalam bentuk akut dan kronis dengan morbiditas dan mortalitas dapat mencapai 30-50% (POERNOMO, 1980; SINURAT *et al.*, 1992).

Pengendalian dan pengobatan kolera unggas di Indonesia masih mengandalkan pada pemakaian obat-obatan antibiotika. Penanggulangan kolera unggas dengan antibiotika tidak efektif, meningkatkan resistensi kuman dan menimbulkan masalah residu pada produk ternak atau daging (RHOADES dan RIMLER, 1987). Obat antibiotika masih diimpor, harganya cukup mahal dan tidak terjangkau oleh peternak. Vaksin kolera ayam impor, biasanya dipakai pada peternak *breeder*, akan tetapi kurang cocok, karena serotipenya berbeda dengan serotipe lokal. Dari penelitian sebelumnya dilaporkan tidak ada reaksi proteksi silang antara galur vaksin pasterellosis unggas dan yang lain (CHOI *et al.*, 1989; MATSUMOTO *et al.*, 1991; COY *et al.*, 1997).

Pada penelitian tahap awal telah dilakukan untuk mengetahui patogenisitas isolat lokal *P. multocida* dari ayam dan itik (BCC 299, BCC 2331, DY1, DY2), galur impor (BCC 1359 dan BCC 1362) yang disimpan kering beku pada Balitvet *culture collection* (BCC) dan isolat 12TG, 15TG dari Jawa Tengah (SUPAR *et al.*, 2000). Dari 6 isolat lokal dan 2 galur impor tersebut hanya isolat BCC 2331 dan DY2 yang dapat membunuh hewan mencit dan ayam percobaan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pembuatan vaksin *P. multocida* isolat lokal, daya proteksi terhadap isolat lokal yang bersifat patogenik dan respon antibodi pada ayam yang diinjeksi vaksin terhadap antigen isolat yang dipakai untuk uji tantang.

MATERI DAN METODE

Bakteri *Pasteurella multocida*

P. multocida isolat lokal yang akan digunakan untuk pembuatan vaksin berasal dari ayam dan itik yaitu: BCC 299 (ayam), BCC 2331 (itik), DY1 (ayam), DY2

(itik), 12TG dan 15TG (itik) dan galur impor BCC 1359 (ayam) dan BCC 1362 (ayam). Sifat fenotipik dan patogenisitas telah diuji dalam penelitian sebelumnya (SUPAR *et al.*, 2000). Isolat lokal BCC 2331 dan DY2 dipakai untuk uji tantang vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen.

Pembuatan antigen *P. multocida* untuk vaksin

Isolat atau galur yang dipakai untuk produksi antigen untuk vaksin sama dengan untuk uji patogenitas yaitu (BCC 299, BCC 2331, DY1, DY2, 12TG, 15TG) dan galur impor (BCC 1359 dan BCC 1362). Kultivasi isolat mengacu pada penelitian sebelumnya (SUPAR *et al.*, 2000) secara singkat sebagai berikut: Tiap isolat ditumbuhkan pada medium cair *brain heart infision* (BHI), diinkubasikan di dalam inkubator pada suhu 37°C selama satu malam (16 jam). Kultur cair tersebut diinokulasikan pada media agar darah 5% (darah domba) yang disiapkan pada cawan petri (tiap isolat 10 media agar darah). Media agar darah yang sudah diinokulasi diinkubasikan seperti sebelumnya. Bakteri yang tumbuh pada permukaan agar dibilas dengan larutan NaCl (5 ml per cawan) yang mengandung formalin 0,1%, disimpan dalam lemari es selama satu malam. Suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang, endapan sel (pelet sel) dicuci dengan NaCl fisiologis steril 2 kali, sel diperoleh kembali dengan sentrifugasi seperti sebelumnya. Perlakuan ini bertujuan menghilangkan formalin dan sisa-sisa media. Endapan sel terakhir dilarutkan dalam larutan garam NaCl fisiologis non pirogenik steril sebanyak 1/5 dari larutan aslinya. Suspensi sel terakhir yang diperoleh disimpan dalam lemari es (sebagai sel stok) untuk pembuatan vaksin dan antigen ELISA.

Vaksin monovalen

Vaksin monovalen dibuat dari suspensi sel yang dibuat seperti tersebut di atas, sebanyak 8 macam (BCC 299, BCC 2331, DY1, DY2, 12TG, 15TG) dan galur impor BCC 1359 dan BCC 1362). Sejumlah volume sel stok tersebut diemulsikan dalam gel aluminium hidroksida (Merk 1088) dengan konsentrasi akhir 1,5%

dan kandungan sel bakteri *P. multocida* setara dengan tabung MacFarland No 10 (SUPAR dan HIRST, 1990).

Vaksin bivalen galur impor

Cara pembuatan vaksin bivalen seperti pada pembuatan monovalen. Dalam vaksin bivalen mengandung 2 komponen antigen, yaitu galur acuan impor BCC 1359 dan BCC 1362. Konsentrasi sel dari kedua jenis antigen disetarakan dengan tabung MacFarland No 10, antigen sel bivalen diemulsikan dalam gel aluminium hidroksida dengan konsentrasi akhir 1,5%, cara pembuatannya seperti pada pembuatan vaksin monovalen.

Vaksin bivalen isolat lokal

Vaksin bivalen dibuat 3 macam terdiri atas (BCC 2331 + DY2), (BCC 299+DY1), dan (12TG dan 15TG). Masing-masing vaksin bivalen dibuat dari tiap suspensi sel stok vaksin tersebut dengan perbandingan sama sehingga konsentrasi sel akhir setara dengan tabung MacFarland No 10. Tiap vaksin bivalen dibuat sebanyak 20 ml dan diemulsikan dalam gel aluminium hidroksida pada konsentrasi akhir 1,5%, cara pembuatannya seperti pada pembuatan vaksin monovalen.

Vaksin polivalen isolat lokal

Vaksin dibuat dari 6 isolat (BCC 299, BCC 2331, DY1, DY2, 12TG, 15TG). Masing-masing komponen antigen sel dicampur, sehingga campuran sel tersebut mengandung proporsi sel yang sama dari tiap jenis antigen dari sel stok. Volume vaksin dibuat menurut keperluan, yaitu 20 ml dan diemulsikan dalam aluminium hidroksidgel pada konsentrasi akhir 1,5% dan konsentrasi sel setara dengan kekeruhan tabung MacFarland No 10. Pembuatannya mengacu pada perhitungan kekeruhan sel pada vaksin monovalen.

Uji vaksin pada ayam dan ujiantang

Tiap ayam percobaan (umur 6 minggu) sebelum diinjeksi vaksin diambil darahnya melalui vena sayap sebanyak 1 ml, ayam dibagi dalam kelompok (8 ekor/kelompok). Sampel serum dipisahkan dan disimpan di dalam *frezeer* -20°C sampai uji *enzyme linked-immunosorbent assay* (ELISA) dan setiap 2 minggu darah diambil seperti sebelumnya. Tiap vaksin (monovalen, bivalen, atau polivalen) diinjeksikan pada sekelompok ayam (8 ekor), dipelihara dalam kandang individu (baterai). Dosis 0,2 ml/injeksi, aplikasi secara subkutan. Satu kelompok tidak divaksin untuk kontrol. Empat minggu berikutnya setelah diambil darahnya seperti sebelumnya disuntik vaksin *booster*, dosis dan

aplikasi seperti sebelumnya. Dua minggu setelah disuntik vaksin *booster* darah diambil. Lima hari berikutnya separuh dari setiap kelompok ayam suntikan vaksin (monovalen, bivalen, atau polivalen) ditantang dengan bakteri hidup BCC 2331, separuh yang lain ditantang dengan isolat DY2 pada enceran 10⁻⁶ atau setara dengan 560-620 *colony forming unit* per mililiter, injeksi secara subkutan dengan dosis 0,1ml/ekor.

Pengamatan pasca ujiantang dilakukan untuk mengetahui adanya ayam yang mati. Ayam yang disuntik vaksin dan bertahan hidup (terproteksi), dan ayam yang mati tidak terproteksi. Pengamatan dihentikan setelah ayam percobaan tersebut tidak ada yang mati (2 minggu sesudah ditantang).

Pemeriksaan respon antibodi

Sifat antigenisitas, imunitas, dan proteksi vaksin diuji pada ayam di bawah kondisi laboratorium. Respon antibodi pada darah ayam diperiksa secara ELISA, dengan menggunakan antigen untuk pelapisan cawan ELISA berupa ekstrak sel yang disonikasi, endapan supernatan cair (antigen ekstraselular) dan antigen sel utuh (*whole cell*). Antigen ELISA dibuat dari isolat *P. multocida* yang dipakai untuk ujiantang (BCC 2331 dan DY2).

Antigen ekstrak sel

Antigen ELISA dibuat dari sel utuh secara singkat sebagai berikut. Sebanyak 10 ml suspensi sel stok dari isolat lokal BCC 2331 dan DY2 dibuat suspensi dengan kekeruhan setara tabung MacFarland No 6. Suspensi disonikasi dengan alat sonikasi (Soniprep UK) pada skala kecepatan 6 selama 3 menit, pada suhu es mencair. Setelah sonikasi suspensi disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan pada tabung sentrifuse yang lain, endapan sel utuh disimpan dalam lemari es sampai proses berikutnya untuk antigen ELISA sel utuh. Fraksi supernatan ditambah 10 ml larutan amonium sulfat jenuh, disimpan di dalam lemari es. Selanjutnya disentrifuse seperti sebelumnya. Supernatan dibuang, endapan dilarutkan dalam 5 ml NaCl fisiologis, dimasukkan dalam kantong dialisis dan selanjutnya didialisis melawan larutan garam sejenis selama satu malam di dalam lemari es. Larutan ekstrak dikeluarkan dari dalam kantong dialisis, dimasukkan dalam botol yang bersih dan disimpan pada suhu -20°C sampai pelaksanaan uji ELISA.

Antigen ELISA dari endapan supernatan (ekstraseluler)

Isolat *P. multocida* yang dipakai untuk pembuatan vaksin (BCC 2331 dan DY2), masing-masing

ditumbuhkan pada media cair BHI (Difco) yang disiapkan dalam botol bervolume 200 ml dengan isi media 50 ml. Setelah sterilisasi dengan *autoclave* ditambah suplemen *foetal calf* serum (FCS) pada konsentrasi akhir 1%. Setelah inokulasi diinkubasikan dalam inkubator bersuhu 37°C selama satu malam, sambil digoyang. Cara pembuatan antigen ekstraselular untuk uji ELISA mengacu pada penelitian antigen *E. coli* verotoksik (SUPAR *et al.*, 1999), secara singkat sebagai berikut: Sebanyak 15 ml kultur dimasukkan dalam tabung sentrifuse dan dipusingkan pada kecepatan 8.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipisahkan dan dipindahkan pada tabung sentrifuse yang lain, kemudian ditambah amonium sulfat dengan volume yang sama. Dikocok sampai merata dan didiamkan dalam lemari es selama satu malam. Esok harinya disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang, endapan atau pelet yang terbentuk dilarutkan dalam 5 ml larutan garam NaCl fisiologis, dimasukan dalam kantong didialisis. Selanjutnya didialisis melawan NaCl selama satu malam di dalam lemari es. Setelah dialisis disimpan pada suhu -20°C sampai saatnya untuk ELISA.

Antigen sel utuh

Endapan sel dari penyiapan antigen ekstrak sel yang disimpan di dalam lemari es dicuci dengan larutan garam NaCl fisiologis 3 kali. Sel diperoleh kembali dengan sentrifugasi pada suhu 4°C. Endapan sel dilarutkan dalam *phosphate buffered saline* (PBS) dengan kekeruhan sel setara dengan tabung MacFarland No 2, selanjutnya disimpan dalam lemari es sampai uji ELISA dilakukan.

Konjugat enzim

Dalam deteksi antibodi pada serum ayam percobaan ini digunakan imunoglobulin (IgG) kelinci anti imunoglobulin ayam yang dikonjugasikan dengan enzim *horseradish peroxidase* (Sigma, USA). Enceran enzim ditentukan dengan cara titrasi terhadap serum ayam suntikan antigen *P. multocida* yaitu pada enceran 1:24.000 dan dibandingkan dengan serum ayam normal (tidak disuntik vaksin).

Prosedur ELISA

ELISA untuk deteksi respon antibodi sampel serum yang diambil dari hewan percobaan mengacu pada prosedur sebelumnya (SUPAR *et al.*, 1999), dengan sedikit modifikasi, secara singkat sebagai berikut: Antigen ekstrak sel yang disiapkan dari isolat (BCC 2331 dan/atau DY2) dititrasi untuk menentukan enceran yang optimal dipakai dalam uji respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin bivalen (BCC 2331+DY2)

dan ayam tanpa divaksinasi (prevaksinasi) sebagai kontrol negatif. Antigen ekstrak sel yang dibuat di atas diencerkan dengan *buffer carbonate-bicarbonate* (pH 9,6) 1:100, antigen endapan supernatan (ekstra selular) 1:25 dan antigen sel utuh diencerkan 1:200. Tiap lubang cawan ELISA dengan dasar lengkung dilapisi (*coating*) masing-masing dengan antigen tersebut dengan volume 50 mikroliter. Cawan ditutup, dimasukkan dalam kantong plastik dan diinkubasikan dalam lemari es pada suhu 4-6°C selama satu malam.

Setelah inkubasi, esok harinya tiap lubang cawan dicuci 4 kali dengan larutan *phosphate buffered saline* yang mengandung tween 20 sebanyak 0,05% (PBST) masing-masing pencucian 4 menit. Serum yang akan diperiksa diencerkan 1:200 dalam PBST, sebanyak 50 mikroliter dimasukkan kedalam lubang secara duplikat (satu sampel 2 lubang). Serum kontrol negatif selalu disertakan dalam tiap cawan. Serum sampel positif dimasukkan kedalam lubang (A 11, 12) diencerkan *in situ* mulai dari 1/200 dengan faktor pengenceran 1/2 sampai pada lubang (G 11, 12), sedangkan lubang H 11, 12 berisi PBST. Setelah itu, cawan ditutup dan dibungkus kertas saring yang dibasahi air, dimasukkan dalam kantong plastik dan diinkubasikan suhu 37°C selama satu jam. Setelah inkubasi, cawan dicuci seperti sebelumnya. Tiap sampel serum ayam diuji pada 3 jenis antigen (ekstrak sel, endapan supernatan, dan sel utuh). Sebanyak 50 mikroliter konjugat enzim anti ayam IgG *horseradish peroxidase* (Sigma, USA) yang diencerkan dalam PBST yang mengandung *bovine serum albumin* (BSA 0,02%) dimasukkan kedalam tiap lubang cawan. Cawan dibungkus dan diinkubasikan seperti sebelumnya selama 1 jam. Cawan dicuci dengan PBST 4 kali seperti sebelumnya. Seratus mikroliter substrat yang terdiri atas 200 mikroliter dari 1 mM 2,2-azino di 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) (Sigma, USA) yang dilarutkan dalam air dimasukkan ke dalam 10 ml 0,1M *citrate-phosphate buffer* pH 4,2 mengandung 2,5 M H₂O₂ dimasukkan kedalam tiap lubang cawan. Cawan ditutup, dibungkus dan diinkubasikan seperti sebelumnya selama 1 jam.

Pembacaan reaksi enzim yang terikat pada kompleks reaksi antigen-antibodi terhadap substrat dibaca dengan alat pembaca ELISA (Titertek Multiskan) dengan panjang gelombang 414 nm. Data dari pembacaan berupa optikal desitas (OD). Data pembacaan OD tersebut dikonversikan kedalam ELISA unit berdasarkan pada hasil pembacaan serum kontrol positif yang diencerkan pada kolom cawan ELISA A11, 12 sampai pada G 11, 12, berturut-turut tertinggi 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 ELISA unit. Selanjutnya, hasil pembacaan dari kelompok ayam yang divaksinasi dengan satu jenis vaksin nilai tengah (rata-rata). Dari hasil tersebut kemudian dibuat grafik, untuk mempermudah dan memperjelas terjadinya perubahan respon antibodi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji daya proteksi vaksin *P. multocida* monovalen, bivalen, dan polivalen pada ayam terhadap ujiantang dengan isolat lokal (BCC 2331 dan DY2) dapat dilihat pada Tabel 1. Pada kelompok ayam yang diinjeksi dengan vaksin monovalen yang dibuat dari isolat lokal (DY1, BCC299, 12TG, 15TG) dan galur impor (BCC 1359 dan BCC 1362) tidak ada ayam yang terproteksi terhadap bakteri yang dipakai untuk ujiantang BCC 2331 atau DY2. Ayam dari kelompok tersebut mati dalam waktu 1-2 hari pasca tantang. Keadaan serupa pada kelompok ayam yang diinjeksi vaksin bivalen (BCC299 + DY1, 12TG + 15TG dan vaksin dari galur luar negeri BCC 1359 + BCC 1362). Vaksin yang tidak mengandung antigen dari isolat BCC 2331 dan/atau DY2 tidak terjadi proteksi terhadap galur penantang baik terhadap isolat homolog maupun yang heterolog.

Pada kelompok ayam yang diinjeksi dengan vaksin monovalen BCC 2331 dan DY2 ditantang dengan isolat homolog terdapat proteksi 50-67%. Pada vaksin isolat DY2 yang ditantang dengan isolat BCC 2331 terjadi proteksi silang 100%, namun pada kelompok ayam

yang diinjeksi vaksin isolat homolog hanya menunjukkan proteksi 67%. Dari 2 jenis vaksin isolat lokal ini terjadi proteksi silang 67-100%, pada kondisi jumlah hewan yang sangat terbatas.

Uji vaksin bivalen isolat lokal (BCC 2331 + DY2) menunjukkan adanya proteksi 75-100%, pada kelompok ayam yang diinjeksi dengan vaksin bivalen yang lain (DY1+ BCC 299; 12TG + 15TG; BCC 1359 + BCC 1362) tidak terjadi proteksi, ayam pada kelompok tersebut mati dalam waktu 1-2 hari pasca tantang. Pada kelompok ayam yang diinjeksi dengan vaksin polivalen dan ditantang dengan isolat lokal BCC 2331 atau DY2 hanya menunjukkan proteksi 50-75% (Tabel 1). Dari hasil percobaan vaksin tersebut di atas hanya *P. multocida* isolat lokal BCC 2331 dan DY 2 yang dapat memberikan proteksi. Kedua isolat ini dapat memberikan proteksi terhadap isolat homolog dan heterolog pada ayam yang diinjeksi dengan vaksin mati. Temuan ini berlainan dengan yang pernah dilaporkan peneliti sebelumnya, yang menyatakan bahwa proteksi silang hanya terjadi pada vaksin *P. multocida* aktif atau hidup (BROGDEN dan RIMLER, 1982).

Tabel 1. Proteksi vaksin pasteurellosis monovalen, bivalen, dan polivalen terhadap ujiantang galur lokal patogenik pada ayam

Jenis vaksin isolat lokal/ impor	Banyak ayam divaksin		Tantang dengan BCC 2331		Ditantang dengan DY2	
	Pre vaksin	Post vaksin	Banyaknya ayam di-tantang	Banyaknya ayam hidup proteksi (%)	Banyaknya ayam di-tantang	Banyaknya ayam hidup proteksi (%)
Monovalen						
1. BCC 299	8	7	3	0 (0)	4	0 (0)
2. BCC 2331	8	5	2	1 (50)	3	2 (67)
3. DY1	8	8	4	1 (25)	4	1 (25)
4. DY2	8	5	2	2 (100)	3	2 (67)
5. 12TG	8	7	3	0 (0)	4	0 (0)
6. 15TG	8	7	3	0 (0)	4	0 (0)
7. Impor 1359	8	8	4	0 (0)	4	0 (0)
8. Impor 1362	8	8	4	0 (0)	4	0 (0)
Bivalen impor 1359 dan 1362	10	10	5	0 (0)	5	0 (0)
Bivalen lokal						
BCC 2331 dan DY2	8	8	4	4 (100)	4	3 (75)
BCC 299 dan DY1	8	8	4	0 (0)	4	0 (0)
12TG dan 15TG	8	8	4	0 (0)	4	0 (0)
Polivalen isolat lokal	8	8	4	2 (50)	4	3 (75)
Polivalen isolat lokal (ulangan)	10	10	5	3 (60)	5	3 (60)
Kontrol non vaksinasoi	8	8	4	0 (0)	4	0 (0)

Proteksi silang tidak terjadi pada isolat yang lain, walaupun ayam diinjeksi dengan vaksin hidup non patogenik ditantang dengan isolat BCC 2331 atau DY 2 (data tidak dipresentasikan). Kedua isolat ini dapat diharapkan sebagai kandidat vaksin di waktu yang akan datang, namun masih perlu penelitian lebih lanjut.

Pengamatan respon antibodi pada ayam yang diinjeksi dengan vaksin *P. multocida* monovalen, bivalen, dan polivalen terhadap antigen ekstrak sel, endapan supernatan (ekstraseluler) dan sel utuh isolat yang dipakai untuk uji tantang dapat dilihat pada Gambar 1 s/d Gambar 10. Respon antibodi pada ayam divaksinasi dengan vaksin monovalen terhadap antigen ekstrak sel isolat BCC 2331 cukup baik, kecuali untuk isolat 12TG, 15TG dan 1362. Demikian halnya terhadap antigen ekstrak sel DY2 (Gambar 1 dan Gambar 2). Bila dilihat pada saat uji tantang (2 minggu pasca injeksi vaksin *booster*) tidak ada kenaikan respon antibodi yang berarti terhadap antigen tersebut pada perlakuan vaksin DY1, BCC 299, 12TG, 15TG, BCC 1359, dan BCC 1362. Hal yang berhubungan dengan tingkat proteksi *in vivo* belum dapat diketahui.

Gambar 1. Respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin pasteurellosis monovalen galur impor dan isolat lokal terhadap antigen ekstrak sel BCC 2331

Pada ayam yang diinjeksi dengan vaksin bivalen galur *P. multocida* impor (BCC 359 + BCC 1362) dan polivalen terhadap antigen ekstraseluler tertera pada Gambar 3 dan Gambar 4. Respon antibodi terhadap antigen dari bakteri penantang lebih baik. Akan tetapi daya proteksi pada kelompok vaksin bivalen impor tidak ada proteksi terhadap bakteri penantang.

Gambar 2. Respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin pasteurellosis monovalen galur impor dan isolat lokal terhadap antigen ekstrak sel DY2

Gambar 3. Respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin pasteurellosis bivalen galur impor dan isolat lokal dan polivalen terhadap antigen ekstrak sel BCC 2331

Respon antibodi terhadap antigen supernatan (ekstra seluler BCC 2331 dan DY2) dari serum ayam yang diinjeksi dengan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen dapat dilihat pada Gambar 5 s/d Gambar 8. Dari gambar tersebut tampak bahwa ayam yang diinjeksi dengan vaksin galur impor BCC 1362 tidak terjadi kenaikan respon antibodi, sedangkan pada ayam suntikan galur impor BCC 1359 dapat menunjukkan sedikit kenaikan respon antibodi. Akan tetapi, semua ayam yang diinjeksi dengan vaksin dari galur impor

tersebut tidak memberikan proteksi terhadap ujiantang isolat lokal BCC 2331 dan DY2. Demikian halnya kelompok ayam yang diinjeksi dengan vaksin bivalen (BCC 1359 + BCC 1362), hal ini diduga dengan tidak adanya antibodi terhadap ekstraseluler. Hanya ayam suntikan vaksin bivalen BCC 2331 + DY2 yang memberikan proteksi 50-100%.

Gambar 4. Respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin pasteurellosis bivalen galur impor dan isolat lokal dan polivalen terhadap antigen ekstrak sel DY2

Gambar 5. Respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin pasteurellosis monovalen galur impor dan isolat lokal terhadap antigen endapan supernatan (ekstraseluler) BCC 2331

Gambar 6. Respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin pasteurellosis monovalen galur impor dan isolat lokal terhadap antigen endapan supernatan (ekstraseluler) DY2

Gambar 7. Respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin pasteurellosis bivalen galur impor dan isolat lokal dan polivalen terhadap antigen supernatan (ekstraseluler) BCC 2331

Uji respon antibodi terhadap antigen sel utuh BCC 2331 atau DY2 menunjukkan bahwa semua kelompok ayam yang divaksinasi memberikan kenaikan titer antibodi yang cukup baik (Gambar 9 dan Gambar 10). Walaupun respon antibodi vaksin bivalen yang dibuat dari galur *P. multocida* impor serupa dengan vaksin bivalen lokal (BCC 2331 dan DY2), pada kelompok ayam yang diinjeksi vaksin galur impor tidak

memberikan proteksi terhadap ujiantang. Dari hasil pemeriksaan respon antibodi tersebut di atas, kelihatannya antibodi terhadap somatik antigen (*whole cell*) bukan antigen protektif yang utama. Atas dasar itu untuk menentukan antibodi protektif berkaitan dengan proteksi secara *in vivo* masih perlu pengamatan lebih lanjut pada level molekular antigen ekstraseluler. Untuk itu masih perlu pengamatan secara *immunoblotting* terhadap serum ayam divaksinasi terhadap antigen ekstraseluler bakteri *P. multocida* isolat lokal (BCC 2331 dan DY2).

Gambar 8. Respon antibodi ayam yang diinjeksi vaksin pasteurellosis bivalen galur impor dan isolat lokal dan polivalen terhadap antigen supernatan (ekstraseluler) DY2

Gambar 9. Respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin pasteurellosis bivalen galur impor dan isolat lokal dan polivalen terhadap antigen *whole cell* BCC 2331

Gambar 10. Respon antibodi ayam yang diinjeksi dengan vaksin pasteurellosis bivalen galur impor dan isolat lokal dan polivalen terhadap antigen *whole cell* DY2

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian uji proteksi vaksin inaktif *P. multocida* isolat lokal disimpulkan, vaksin inaktif monovalen isolat lokal BCC 2331 dan DY2 memberikan proteksi 50-75% terhadap ujiantang isolat homolog dan proteksi silang terhadap isolat heterolog, vaksin bivalen dari kedua isolat tersebut memberikan proteksi 75-100% dan vaksin polivalen memberikan proteksi 50-75%. Vaksin dari isolat lokal yang lain dan dari galur impor tidak memberikan proteksi terhadap ujiantang isolat lokal BCC 2331 dan DY2. Isolat BCC 2331 dan DY2 dapat dijadikan kandidat vaksin, dan vaksin bivalen dari isolat tersebut memberikan proteksi yang efektif.

Aplikasi vaksin inaktif pada ayam merangsang timbulnya respon antibodi terhadap antigen ekstrak sel dan sel utuh. Untuk vaksin BCC 2331 dan DY2 menimbulkan respon antibodi terhadap antigen supernatan atau ekstraseluler yang diduga menentukan sifat imunoproteksi, tetapi masih perlu pengamatan lebih lanjut secara *immunoblotting*.

DAFTAR PUSTAKA

- BROGDEN, K.A. and R.B. RIMLER. 1982. Lysate of Turkey ground *Pasteurella multocida*: Partial solubilization of cross-protection factor(s). *Am. J. Vet. Res.* 43:1781-1785.
- CHOI, K.H., M.S. MAHESWARAN, and L.J. FELICE. 1989. Characterisation of outer membrane protein enriched extract from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Am. J. Vet. Res.* 50:676-683.

- COY, S.L., M.D. LEE, and J. SAUNDER. 1997. Intrastrain variation of lipopo-lysaccharide of *Pasteurella multocida* in Turkey. *Am. J. Vet. Res.* 58(7):755-759.
- MATSUMOTO, M.J.G., J.G. DTRAIN, and H.M. ENGEL. 1991. The fate of *Pasteurella multocida* after intratracheal inoculation into Turkey. *Poultry Scie.* 70:2259-2266.
- POERNOMO, S. 1980. Kasus *Pasteurella multocida* pada itik. *BULLETIN LPPH* 12(19):42-56.
- RHOADES, K.R. and R.B. RIMLER. 1987. Effect of *Pasteurella multocida* endotoxin on Turkey poults. *Avian Dis.* 31:523-526.
- RHOADES, K.R. and R.B. RIMLER. 1990. Somatic serotypes of *Pasteurella multocida* strains isolates from avian hosts (1976-1988). *Avian Dis.* 34:193-195.
- SINURAT, A.P., WIBOWO, MIFTAH, dan T. PASARIBU. 1992. Pemanfaatan itik jantan lokal untuk produksi daging. Pros. Lokakarya Penelitian Komoditas dan Studi Khusus. Departemen Pertanian dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi-Departemen Pertanian. Vol. I:395-412.
- SUPAR and R.G. HIRST. 1990. Development of a whole cell vaccine from *Escherichia coli* bearing K88, K99, f41, and 987P fimbrial antigens. Vaccine field trials to control piglet neonatal colibacillosis. *Penyakit Hewan* XXII(40):69-75.
- SUPAR, B. POERWADIKARTA, NINA KURNIASIH, dan DJAENURI. 1999. Pengembangan vaksin *Escherichia coli* alfa hemolitik, verotoksigenik: Respon antiverotoksik antibodi pada hewan percobaan mencit, kelinci, dan sapi perah. *J. Ilmu Ternak Vet.* 4(1):35-47.
- SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH, dan BHAKTI POERWADIKARTA. 2000. Patogenesis *Pasteurella multocida* isolat lokal pada mencit dan ayam. *J. Ilmu Ternak Vet.* 5(1):59-64.