

PENGGUNAAN MENCIT UNTUK PEMERIKSAAN POTENSI TOKSOID DIFTERI

Muljati Prijanto*, Rini Pangastuti*, Dyah W. Isbagio*,
dan Eko Suprijanto*

ABSTRACT

At present, the potency test of diphtheria toxoid is carried out on guinea pigs as experimental animals. Production of a large number of guinea pigs suitable for experiment is still considered to be a substantial problem, especially in some developing countries, due to the economical and environmental difficulties of the breeding and maintenance of the animals.

The antibody induction (A.I.) assays in mice instead of guinea pigs, for testing the potency of diphtheria toxoid were carried out in this study. The neutralizing antibody levels in the sera from immunized mice were measured by cell culture method using vero cells.

The results of 7 batches of DPT and DT vaccines obtained by AI best in mice were correlated significantly with the lethal challenge test in guinea pigs.

More data are still required to confirm this observation, before the test can be applied routinely.

PENDAHULUAN

Penyakit difteri adalah penyakit infeksi saluran pernafasan atas yang dapat dicegah dengan imunisasi DPT pada bayi dan DT pada anak-anak atau orang dewasa. Vaksin tersebut harus memiliki potensi yang memenuhi syarat tertentu agar dapat terjadi pembentukan kekebalan yang melindungi tubuh terhadap penyakit yang bersangkutan.

Imunogenisitas dari vaksin difteri dipengaruhi oleh adsorben dan pertusis komponen di dalam campuran vaksin. Oleh sebab itu potensi hanya dapat diketahui dengan menguji efek vaksin pada hewan percobaan secara *in vivo*.

Pemeriksaan potensi vaksin difteri dapat dilakukan pada marmut dengan 2 cara yaitu : (1) pengujian *antibody induction* (AI) dan (2) cara *lethal challenge* (LC).

Pada saat ini pemeriksaan potensi toksoid difteri dilakukan dengan menggunakan marmut yang umur dan beratnya sama sebanyak 30-70 ekor tergantung cara pemeriksaan yang digunakan. Lama

pemeriksaan adalah 5 minggu.

Penyediaan hewan dengan persyaratan teknis tertentu dalam jumlah yang banyak merupakan masalah bagi Laboratorium Kontrol Kualitas Vaksin terutama di negara berkembang. Hal ini dikarenakan (1) pengembang-biakan marmut dalam jumlah yang banyak di laboratorium hewan percobaan belum mampu dilakukan, karena ruangan yang terbatas. (2) khusus di Jakarta pembelian marmut dari luar Jakarta memerlukan waktu karantina hewan yang lama sebelum digunakan untuk percobaan, lagi pula angka kematian karena pengangkutan cukup tinggi (3) belum adanya perusahaan swasta yang bergerak di bidang penyediaan hewan percobaan seperti halnya di negara maju. Akibat kesulitan pengadaan hewan tersebut dan dana yang tersedia terbatas maka perlu dicari cara lain yang lebih mudah, sensitif dan murah.

Mencit adalah hewan yang tidak sensitif terhadap toksin difteri, sehingga tidak dapat digunakan untuk cara LC.

Pada penelitian pendahuluan oleh

* Pusat Penelitian Penyakit Menular, Badan Litbang Kesehatan.

Kemeyama¹ telah diketahui bahwa mencit dapat dipergunakan untuk pemeriksaan vaksin difteri dengan cara AI, yaitu dengan mengumpulkan sera setelah diimunisasi dan diukur zat anti netralisasinya (*neutralizing antibody*) pada biakan jaringan sel vero. Selain itu mencit lebih mudah dikembang-biakkan di Laboratorium karena siklus hidupnya pendek dan biaya pemeliharaan lebih murah. Keuntungan pemeriksaan dengan menggunakan mencit yaitu jumlah vaksin yang dapat diperiksa akan lebih banyak.

Tujuan penelitian ini adalah mencari cara pemeriksaan potensi toksoid difteri yang lebih mudah, sensitif dan murah dibandingkan dengan pemeriksaan yang digunakan sekarang, dalam rangka menunjang keberhasilan Program Imunisasi di Indonesia.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini meliputi : (1) penentuan dosis imunisasi optimal, (2) mencari waktu optimal pembentukan zat anti pada mencit, (3) pemeriksaan potensi toksoid difteri pada mencit dan marmut.

Pemeriksaan potensi dengan menggunakan mencit dilakukan terhadap 7 Batch vaksin yaitu: DPT 86151, DPT 86150, DT 85408, DT 85291, DT 85302, DT 85361, dan DT. 85415, buatan Perum Bio Farma, Bandung. Pemeriksaan potensi juga dilakukan dengan cara LC pada marmut terhadap 2 batch yaitu DPT 86150 dan DT 85361.

Percobaan untuk mencari dosis optimal yang memenuhi syarat untuk dapat melakukan penghitungan statistik selanjutnya, menggunakan 100 ekor mencit dan 30 ekor marmut. Kelompok mencit sedikitnya terdiri dari 20 ekor dengan berat 10–14 gram dan umur 4 minggu dan

kelompok marmut sedikitnya terdiri dari 10 ekor dengan berat 250–350 gram diimunisasi dengan berbagai dosis pengenceran vaksin. Pada minggu ke-5 setelah imunisasi, darah mencit dan marmut diambil dari jantung dan diukur kadar zat anti dalam serum. Selanjutnya hanya dipilih 3 dosis yang dapat membentuk suatu kurva linier dan optimal.

Pengujian dilakukan untuk mencari waktu optimal pembentukan zat anti setelah diimunisasi menggunakan toksoid difteri. Seratus ekor mencit dengan berat 10–14 gram dibagi dalam 5 kelompok. Selanjutnya 4 kelompok diimunisasi dengan toksoid serap difteri 2 IU/ml setiap ekornya dan kelompok kelola tidak diimunisasi. Pada waktu 4, 5, 6 minggu setelah imunisasi setiap kelompok mencit diambil darahnya dan diperiksa kadar zat antinya terhadap difteri. Lama waktu untuk mencapai kadar zat anti tertinggi akan digunakan sebagai waktu untuk pengambilan darah pada pemeriksaan selanjutnya.

Cara pemeriksaan potensi pada mencit (A1) menggunakan 910 ekor mencit. Enam kelompok mencit yang masing-masing terdiri dari 20 ekor dengan berat 10–14 gram diimunisasi dengan 3 macam dosis vaksin standar yang sudah diketahui unitnya (3 kelompok) dan 3 kelompok lain dengan vaksin yang akan diperiksa. Dosis ditentukan dari percobaan sebelumnya. Setelah beberapa minggu (ditentukan dari percobaan sebelumnya) semua mencit diambil darahnya dan diperiksa kadar zat anti difterinya. Pemeriksaan kadar zat anti dilakukan dengan menggunakan cara netralisasi pada biakan jaringan sel-vero menurut metoda Miyamura^{2,3}. Penghitungan potensi dilakukan dengan membandingkan hasil dari vaksin yang diperiksa terhadap vaksin standar dengan cara *Parallel line assay*.⁴

Cara pemeriksaan potensi pada marmut (LC) menggunakan 140 ekor marmut untuk 2 kali pemeriksaan. Enam puluh ekor marmut dengan berat 250–350 gram dibagi dalam 6 kelompok masing-masing terdiri dari 10 ekor. Tiga kelompok diimunisasi dengan 3 macam pengenceran vaksin Standar dan 3 kelompok lain dengan vaksin yang akan diperiksa. Kontrol terdiri dari 10 ekor marmut dan tidak diimunisasi. Setelah 4 minggu marmut disuntik dengan toksin difteri sebanyak 100 LD₅₀ per ekor. Pemberian imunisasi dan challenge dilakukan secara subkutan. Pengamatan dilakukan terhadap hewan yang mati/sakit selama 6 hari. Penghitungan potensi dilakukan dengan membandingkan hasil antara vaksin yang diperiksa terhadap vaksin standar Nasional dengan cara analisa Probit. Vaksin memenuhi syarat bila potensinya 60 IU/ml atau lebih⁵.

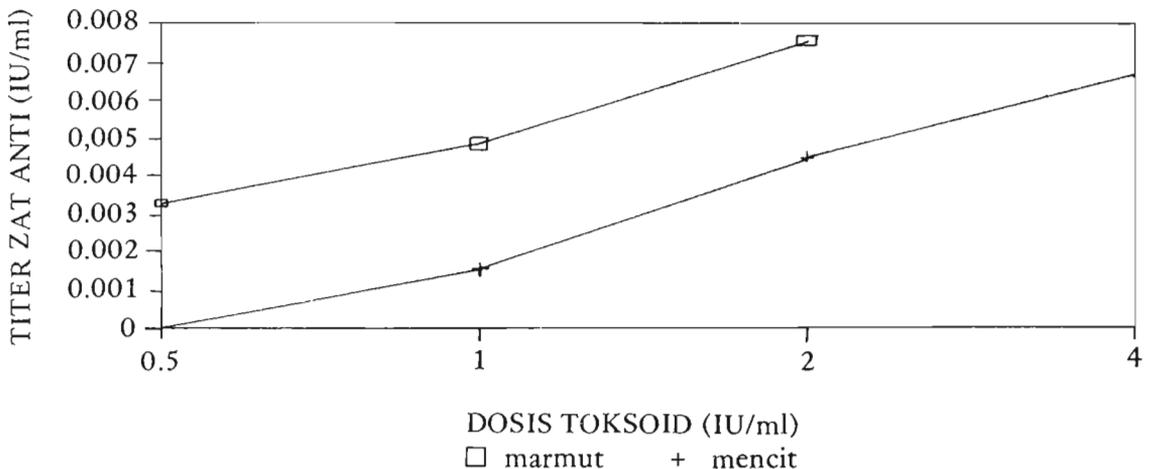
HASIL

Gambar 1 menunjukkan pembentukan zat anti pada mencit dan marmut

setelah pemberian imunisasi toksoid serap difteri dengan dosis 4, 2, 1 IU pada mencit dan 2, 1, dan 2, 1, dan 0,5 IU pada marmut. Dengan faktor pengenceran 2 kali terlihat adanya korelasi antara dosis yang diberikan dengan zat anti yang terbentuk pada mencit. Dosis sama ternyata menimbulkan pembentukan zat anti yang lebih tinggi pada marmut dari pada mencit.

Waktu pembentukan zat anti setelah pemberian toksoid difteri 2 IU/mencit ditunjukkan pada Gambar 2. Respon maksimal dicapai pada minggu ke 4, dan selanjutnya mulai menurun pada minggu ke-5. Pada pemeriksaan potensi selanjutnya digunakan waktu 4 minggu setelah imunisasi untuk mengambil darah mencit.

Tabel 1 menunjukkan hasil pemeriksaan potensi dari 7 Batch toksoid difteri yang diperiksa pada mencit, 2 Batch yang diperiksa pada marmut dan hasil pemeriksaan yang berasal dari Perum Bio Farma yang diperiksa pada marmut dengan cara AI. Pemeriksaan dengan menggunakan marmut maupun mencit ternyata memberi hasil yang sama yaitu vaksin tersebut memenuhi syarat.



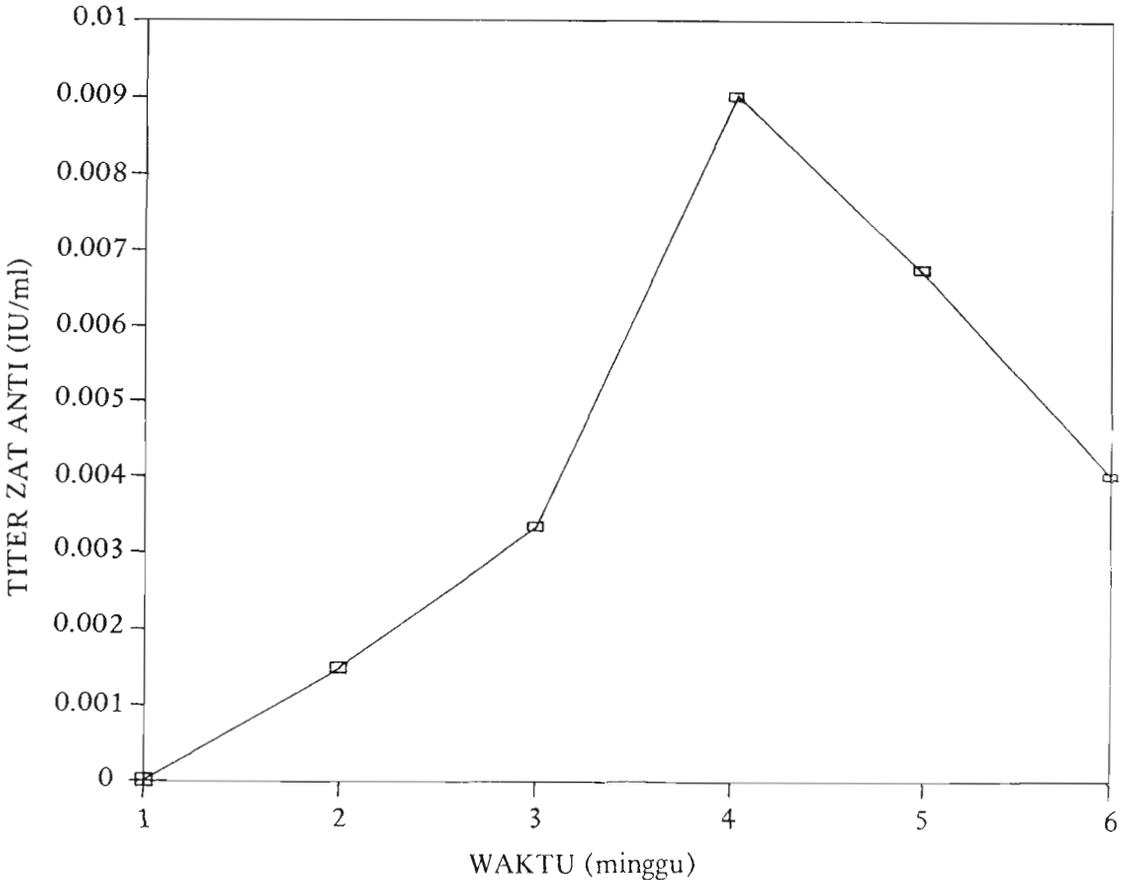
Gambar 1. Pembentukan zat anti difteri pada marmut dan mencit.

PEMBAHASAN

Pada penelitian terdahulu¹ dosis yang diberikan sangat tinggi yaitu 5–47 IU/mencit, sehingga pada pelaksanaan pemeriksaan diperlukan bahan pemeriksaan vaksin dalam jumlah yang besar. Hal ini akan menimbulkan kesulitan bila sampel vaksin yang diterima berasal dari lapangan dengan jumlah sangat terbatas. Pada penelitian ini digunakan dosis yang lebih kecil yaitu 4.2.1. IU/mencit. Ternyata dosis ini masih dapat menimbulkan respon yang linier walaupun titer zat anti yang ter-

bentuk rendah, dan masih memenuhi syarat untuk perhitungan statistik selanjutnya.

Pembentukan zat anti secara maksimal pada mencit setelah imunisasi dengan dosis 2 IU/mencit terjadi dalam waktu 4 minggu. Dengan demikian minggu keempat dan selanjutnya digunakan sebagai waktu pengambilan darah mencit. Penelitian serupa dari Nyerges⁶ yang menggunakan mencit berat 12–14 gram juga menggunakan waktu 4 minggu untuk pengambilan darah mencit.



Gambar 2. Waktu optimal untuk pembentukan zat anti difteri pada mencit setelah diimunisasi secara subkutan dengan toksoid difteri sebanyak 2 IU/ml.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan potensi toksoid difteri pada mencit dan marmut.

VAKSIN	HASIL PEMERIKSAAN POTENSI PADA		
	M A R M U T		M E N C I T ** (IU/ml)
	CARA AI* (AU/ml)	CARA LC** (IU/ml)	
DT 85291	2,00	—	104,60
DT 85302	6,65	—	72,03
DT 85361	8,00	108,86	72,94
DT 85408	5,62	—	75,48
DT 85415	9,49	—	80,14
DPT 86150	6,70	114,89	108,23
DPT 86151	8,00	—	70,29

* Diperiksa oleh Perum Bio Farma. Memenuhi syarat bila potensinya 2 IU/ml atau lebih.

** Toksoid memenuhi syarat bila potensinya 60 IU/ml atau lebih.

Sedangkan Kreeftenberg⁷ yang menggunakan mencit dengan berat 10–14 gram memakai waktu 5 minggu untuk pengambilan darah mencit. Hal ini tergantung pada umur, berat hewan yang digunakan, dan dosis yang diberikan. Makin pendek waktu pengambilan darah berarti makin cepat lama pemeriksaan dan akan lebih menguntungkan.

Hasil pemeriksaan potensi oleh Perum Bio Farma menunjukkan bahwa semua vaksin yang diperiksa memenuhi persyaratan. Demikian pula 2 dari 7 batch yang diperiksa pada marmut dengan cara LC. Menggunakan kriteria yang sama dengan pemeriksaan cara LC pada marmut (yaitu potensi serendah-rendahnya 60 IU/ml), diketahui bahwa ke 7 batch toksoid yang diperiksa pada mencit juga memenuhi persyaratan.

Titer zat anti difteri diukur secara *in vitro* menggunakan sel vero. Tes ini mendeteksi *neutralizing antibody* yang esensial untuk

perlindungan terhadap toksin difteri. Tes *in vitro* lain seperti ELISA dan hemaglutinasi juga mendeteksi *non-neutralizing antibody* selain *neutralizing antibody*. Pada penelitian terdahulu dilakukan pula pemeriksaan dengan cara hemaglutinasi pasif sebagai pembanding. Penelitian Nyerges juga menggunakan cara hemaglutinasi⁶.

Pemeriksaan zat anti dengan menggunakan cara netralisasi pada biakan jaringan sel vero menunjukkan sensitivitas yang tinggi.

Keuntungan cara pemeriksaan potensi dengan menggunakan mencit ialah lebih mudah, murah dan sensitif. Hal ini disebabkan karena pemeliharaan dan penyediaan mencit dalam jumlah yang besar lebih mudah, cepat dan murah dibandingkan dengan marmut, karena mencit memiliki siklus hidup yang lebih pendek dari pada marmut. Data hasil pemeriksaan potensi vaksin yang lebih banyak masih

diperlukan sebelum cara ini dapat digunakan atau menjadi pilihan untuk pemeriksaan potensi toksoid difteri di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dr. Iskak Koiman, Kepala Puslit Penelitian Penyakit Menular atas segala saran dan petunjuk yang diberikan selama dilaksanakannya penelitian ini. Terima kasih disampaikan pula kepada semua tehniisi dari Puslit Penyakit Menular yang membantu pelaksanaan pemeriksaan pada penelitian ini.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Kameyama. S. M Prijanto, A Ito, F Nagaoka, K. Yamauchi. (1983). Potency test of diphtheria toxoid on mice. *Jap J Bacteriol*, 38(1) ; 466.
2. Miyamura K, E Tajiri, A Ito, R Murata, R Kono. (1974). Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J. Biol Stand* 2; 189--201.
3. Miyamura K, E Tajiri, A Ito, R. Murata, R Kono. (1974). Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. II. Comparison with the rabbit skin method and practical application for sero-epidemiological studies. *J. Biol Stand* 2 203--209.
4. Finney D J (1964). Statistical method in Biological Assay. 2nd ed, Charles Griffin, London; 72--102.
5. WHO. (1982). Manual of detail of test required on final vaccines used in the WHO Expanded programme of immunization. 53 - 76.
6. Nyerges G, E Virag, J Lutter. (1983) The potency testing of diphtheria and tetanus toxoid as determined by the induction of antibody in mice. *J. Biol Stand*, 11; 99--103.
7. Kreeftenberg JG., J van der Gun. FR Marsman, VM Sekhuis, SK Bhandari, SC Maheshwari. (1983). Investigations on a mouse model to estimate the potency of the diphtheria component in vaccinnes. (Unpublished).

