

SKRIPSI :

MOCHAMAD LAZUARDI

**PERBANDINGAN EFEKTIFITAS FORMALIN 0,05 %
DENGAN ACETYLETHYLENEIMINE (AEI) 0,05 %
SEBAGAI INAKTIFAN TERHADAP VIRUS
PENYAKIT MULUT KUKU (PMK) O JAVA 83**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1984**

PERBANDINGAN EFEKTIFITAS FORMALIN 0,05 % DENGAN
ACETYLETHYLENEIMINE (AEI) 0,05 % SEBAGAI
INAKTIFAN TERHADAP VIRUS PENYAKIT MULUT
KUKU (PMK) O JAVA 83

SKRIPSI

DISERAHKAN KEPADA FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA UNTUK MEMENUHI
SEBAGIAN SYARAT GUNA MEMPEROLEH
GELAR DOKTER HEWAN

OLEH

MOCHAMAD LAZUARDI
BANDUNG -- JAWA BARAT



DRH. SOELISTYANTO,

PEMBIMBING UTAMA



DRH. RANAYU ERNAWATI M.Sc.,

PEMBIMBING KEDUA



DRH. AGUSTINUS WIRYO

PEMBIMBING KETIGA

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1984

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik skope maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar Dokter Hewan

Panitia Penguji :

Ketua

Sekretaris

Anggauta

Anggauta

Anggauta

KATA PENGANTAR

Perkenankanlah kami mengucapkan syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, yang telah berkenan memberikan petunjuk dan Rahmatnya didalam menyelesaikan skripsi ini. Skripsi ini dibuat sebagai salah satu tugas kurikuler guna memenuhi syarat ujian Dokter Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua civitas academica Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, karena atas suatu kerja sama yang baiklah maka penulis dapat mengenyam pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Bersama ini pula kami mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Bapak Drh. Ahmad Mahjudin sebagai Direktur Pusat Veterinaria Farma Surabaya, yang banyak memberikan saran maupun bantuan fasilitas laboratorium hingga selesainya penelitian ini.
2. Bapak Drh. Soelistyanto sebagai Dosen luar biasa Bagian Ilmu Penyakit Viral Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang banyak memberikan pengarahan serta dorongan hingga tersusunya penulisan skripsi ini.
3. Drh. Rahayu Ernawati M.Sc., sebagai Kepala Laboratorium Virologi dan Immunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang banyak memberikan bimbingan, pengarah

an serta dorongan hingga tersusunnya skripsi ini.

3. Bapak Drh. Agustinus Wiryono sebagai staff pada Bidang Laboratorium Penyakit Mulut Kuku Pusat Veterinaria Farma Surabaya, yang banyak memberikan bimbingan teknis maupun pengarahan langsung dalam pelaksanaan penelitian.

4. Staff dan Karyawan Laboratorium Penyakit Mulut Kuku Pusat Veterinaria Farma yang telah banyak membantu kelancaran kerja dalam pelaksanaan penelitian tersebut.

5. Semua pihak yang telah membantu penulis baik secara langsung maupun tak langsung sehingga dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Semoga atas segala budi dan kebaikan semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini Tuhan akan memberikan balasan yang setimpal.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kesempurnaan, maka kritik yang membangun akan penulis perhatikan .

Surabaya, Juli 1984

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GRAFIK	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
1. Latar belakang masalah	1
2. Tujuan penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
1. Kejadian PMK di Indonesia ...	5
2. Klasifikasi virus ...	6
3. Bentuk, ukuran dan susunan virus ...	6
4. Sifat-sifat virus ...	7
5. Isolasi ...	9
6. Identifikasi ...	10
7. Penggunaan Formalin sebagai inaktifan ...	13
8. Penggunaan AEI sebagai inaktifan ...	14
BAB III BAHAN DAN CARA	16
1. Bahan penelitian	16
2. Cara penelitian	19
BAB IV HASIL	25

	Halaman
1. Pengamatan pencapaian harga titer TCID ₅₀ /ML	25
2. Analisa data dan analisa korelasi	26
BAB V PEMBAHASAN	32
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	34
BAB VII RINGKASAN	36
DAFTAR KEPUSTAKAAN	38
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Harga titer \log_{10} TCID ₅₀ /ml dan pH setiap pengamatan dengan interval 12 jam	27
2. Harga titer \log_{10} TCID ₅₀ /ml dan pH setiap pengamatan dengan interval 12 jam berdasarkan kelompok contoh	28

DAFTAR GRAFIK

Grafik	Halaman
1. Perbandingan kecepatan pencapaian harga titer 0 TCID ₅₀ /ml antara Formalin dan AEI dengan interval 12 jam	29
2. Persamaan garis koefisien regresi	45
3. Diagram pancar	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Acetyleneimine	3
2. Pengamatan 12 jam setelah inaktivasi dengan pemberian Formalin	30
3. Pengamatan 12 jam setelah inaktivasi dengan pemberian AEI	30
4. Pengamatan 24 jam setelah inaktivasi dengan pemberian Formalin	31
5. Pengamatan 24 jam setelah inaktivasi dengan pemberian AEI	31
6. Sel kontrol	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Uji perbedaan dua rata rata, uji satu pihak titer log virus TCID ₅₀ /ml	41
2. Rata simpang titer log virus TCID ₅₀ /ml Formalin dan AEI	42
3. Analisa korelasi	43
4. Koefisien regresi	45
5. Analisa data antara penurunan titer dengan lamanya inaktivasi	47
6. Diagram pancar	48
7. Hasil titrasi	49
8. Kegiatan kerja	50

BAB I

P E N D A H U L U A N

1. Latar belakang masalah

Dibeberapa bagian propinsi Indonesia, hingga tahun tahun terakhir ini masih belum terbebaskan dari Penyakit Mulut Kuku (PMK). Seperti diketahui bahwa akibat timbulnya PMK dapat mengakibatkan kerugian besar bila ditinjau dari segi ekonomi (Sukobagyo, 1976). Usaha pencegahan serta pembrantasan sajalah yang dapat menanggulangi masalah PMK di Indonesia. Salah satu cara pencegahan yang banyak dipakai hingga saat ini adalah vaksinasi.

Menurut Sukobagyo (1976), Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) yang diresmikan oleh Pemerintah pada tahun 1979, merupakan kelanjutan dari Lembaga Penelitian Penyakit Mulut dan Kuku yang didirikan pada tahun 1959, telah banyak memproduksi vaksin untuk keperluan penanggulangan PMK dengan berbagai macam formula. Tetapi tentunya kapasitas produksi PUSVETMA sendiri terbatas, sehingga perlu memasukkan vaksin PMK dari luar Negri untuk memenuhi target kebutuhan Dalam Negri. Terbatasnya kapasitas produksi PUSVETMA tentu disebabkan beberapa faktor utama yang mana sukar untuk dipecahkan, salah satu faktor teknis yang sangat berpengaruh adalah lamanya tahap pembuatan vaksin (Partadiredja, 1974). Berbagai cara pembuatan vaksin baik aktif maupun inaktif berpengaruh pula disamping hal lainnya, dan ini semua tak lepas dari masalah inaktifan itu

sendiri. Salah satu cara inaktivasi yang sering digunakan adalah dengan menambahkan bahan kimia pada suspensi vi
rus (Anonymous, 1982)

Beberapa bahan kimia yang sering digunakan antara la
in Formalin, Beta-propiolactone, Hydroxylamine, Acetyleneimine (AEI), Glycidaldehyde (GDA), Etyleneimine (EEI). Jenis jenis inaktifan tersebut sangat berla
inan tingkat inaktifasinya tergantung jenis virus yang akan diinaktifkan dan ini sering menjadi salah satu sebab lamanya tahap pembuatan vaksin (Simms, 1971 dan Anoni
mous, 1982).

Formalin atau Formol atau Formaldehyde Solution (CH_2O), sebagai inaktifan adalah yang pertama kali digu
nakan. Tetapi pada dasa warsa ini sudah jarang digunakan mengingat daya inaktifasinya yang lambat hanya dengan ban
tuan konsentrasi tinggi disamping suhu inkubasi tinggi mem
percepat kematian virus. Formalin sendiri merupakan suatu larutan yang mengandung 37 % Formaldehyde gas dalam laru
tan 10 % - 15 % Methanol, untuk menjaga terjadinya poli
merisasi. Tak berwarna, berbau merangsang, cepat terurai menjadi trioxymethylene precipitat pada suhu kamar dan ce
pat menguap sehingga teroksidasi menjadi Asam format. For
malin merupakan asam kuat (pH 2,8 - pH 4,0) dengan E.B.M 30,3 yang mudah bercampur dengan air, alkohol dan acetone.

Formalin pada konsentrasi rendah sering digunakun
tuk desinfektansia. Sebagai inaktifan virus PMK pertama kali diteliti pada tahun 1925 dengan berbagai tingkat ko-

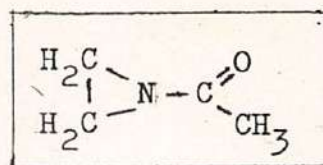
sentrasi (Simms, 1971). Oleh karena daya kerja Formalin sangat lemah sehingga sering digunakan kombinasi dengan cara inaktivasi fisis misal mempertinggi suhu inkubasi.

Menurut Dimmock (1967) dan Simms (1971), dengan pemusingan tinggi (3000 rpm - 5000 rpm), thawing berulang ulang maupun suhu inkubasi yang tinggi disamping pengaturan pH yang tinggi dapat membantu daya inaktivasi Formalin.

Alternatif menggunakan jenis inaktifan lain mulai dikenal sejak tahun 1950, sehingga Formalin jarang digunakan lagi. AEI sebagai inaktifan mulai dipopulerkan sekitar tahun 1959 yang mana hingga saat itu mulai diproduksi vaksin dengan menggunakan inaktifan AEI.

AEI (C_4H_7NO) adalah suatu larutan derivat Aziridin yang tergolong senyawa alkali keras (pH 9,2 - pH 10). Cepat sekali mengalami polimerisasi, dengan alkohol mudah larut, warna kuning transparant, cepat menguap dengan bau ammonia dan terkenal sebagai karsinogenik kuat. Sebagai inaktifan digunakan konsentrasi 0,01 % - 0,05 %.

Gambar 1.



ACETYLETHYLENEIMINE

Penggunaan AEI hingga saat ini masih dipercaya bahkan disebutkan bahwa formula vaksin dengan inaktifan AEI

hampir tidak pernah mengakibatkan timbulnya wabah ulang, disamping adanya efisiensi waktu dalam kaitannya terhadap produksi vaksin (Anonimous, 1982).

Virus PMK O Java 83 merupakan jenis baru hasil letupan wabah pada bulan Juli tahun 1983 di Pulau Jawa, secara serologis mempunyai beberapa perbedaan dibandingkan dengan strain lainnya (Anonimous, 1984). Ulasan secara monografis tentang virus ini dengan kedua jenis inaktifan tersebut sangat jarang, sehingga diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan masukan untuk pihak-pihak yang bekerja dengan masalah yang berhubungan.

2. Tujuan penelitian

Bertitik tolak dari permasalahan diatas, maka penelitian ini bertujuan :

1. Untuk mengetahui kecepatan pencapaian harga titer $0 \text{ TCID}_{50} / \text{ML}$ dari suspensi virus akibat penambahan Formalin dan AEI pada konsentrasi dan suhu inkubasi yang sama (37°C).
2. Untuk mengetahui pengaruh lamanya waktu inaktifasi terhadap penurunan titer log virus $\text{TCID}_{50} / \text{ml}$.

Landasan teori untuk mengembangkan rancangan penelitian ini, penulis dapatkan dari tinjauan pustaka, seperti diuraikan pada Bab berikut.

BAB II

T I N J A U A N P U S T A K A

1. Kejadian PMK di Indonesia

Letupan wabah PMK pertama di Indonesia dilaporkan oleh Bosma (1887 dikutip Partadiredja, 1974) didaerah Malang dan Pasuruan. Letupan wabah selanjutnya terjadi tahun 1889, 1892, 1907 dan 1911 di Jakarta, Banten dan Aceh, Madura dan Kalimantan, Sulawesi dan Medan, Lombok serta Bali. Wabah PMK terjadi kembali pada tahun 1913, 1914, 1920 dan 1926 di Jawa Timur dan Madura, Malang dan Pasuruan, dilombok, Kalimantan dan Sulawesi, dan disusul Kedu, Wonosobo, Bagelan pada tahun 1929 (Partadiredja, 1974 dan Sukobago, 1976).

Menurut Arrowsmith (1976), wabah PMK yang terjadi tahun 1962 di Bali dikenal sebagai type O subtype O₁₁. Tahun 1971 di Sumatra Utara dan tahun 1973 di Sulawesi Selatan timbul kembali wabah PMK, kemudian setiap tahun dilaporkan selalu terjadi hingga tahun 1975 (Sukobago , 1976).

Wabah PMK timbul lagi pada tahun 1978 bulan April hingga September di Jawa Tengah, D.I Yogyakarta dan Jakarta. Pada tahun 1979 timbul lagi di Jawa Tengah (Temangung dan Pemalang) pada bulan Januari dan April . Kejadian PMK tak pernah lagi sejak tahun 1979 (Mei) hingga tah

hun 1983 (Juni). Letupan wabah PMK terjadi lagi pada bulan Juli 1983 yang dimulai di Jawa Tengah kemudian meluas hampir ke seluruh Pulau Jawa.

2. Klasifikasi virus

Virus PMK termasuk dalam kelompok virus :

Ordo : Virales

Family : Borreliota

Genus : Hostis

Species : Hostis pecoris (Merchant dan Packer , 1961).

Klasifikasi berdasarkan bentuk, susunan, ukuran, maka virus PMK digolongkan sebagai Pico Ribo Nucleic Acid Virus (Pico RNA), termasuk virus yang mempunyai susunan asam inti RNA single-stranded dan berkapsid (Brown, 1962 dan McCahon, 1981). Menurut Gloster et al. (1982), terdapat bermacam macam strain virus PMK secara serologis tersebar di penjuru dunia.

3. Bentuk, ukuran dan susunan virus

Bentuk virus PMK adalah spherical dengan diameter antara 22 - 25 mili mikron, merupakan virus berukuran kecil dan sanggup menembus membrane filter (Milipore filter unit 0.22 mikron). Susunan virus PMK sendiri, terdiri dari kapsid dan berasam inti RNA yang terdiri substrat protein (Garland et al. 1976). Menurut McCahon (1981), su-

nit protein asam inti merupakan internal antigen (B.M $2,8 \times 10^6$) yang akan menginfeksi sel sehat sewaktu replikasi.

4. Sifat-sifat virus

4.1. Sifat Fisik dan Kimiawi

Asam inti virus mengandung lipid sehingga virus ini peka terhadap pelarut lemak seperti Formalin, Alkohol, Ether, Chloroform yang mana menyebabkan turunnya titer bahkan dapat mematikan virus. Pada suasana alkalis (pH diatas 9) dan pada suasana asam (pH dibawah 6), akan mengakibatkan kematian virus, disamping perlakuan ultra sonik, pendinginan dan thawing berulang ... ulang, akibat penyinaran ultra violet (Andrewes, 1964 dan McCahon, 1981).

Menurut Merchant dan Packer (1961), virus tidak tahan terhadap pendinginan dan kekeringan. Virus akan mati pada suhu 85° C dalam waktu 1 menit sedang pada suhu 60° C, virus akan mati dalam waktu 15 menit. Pada suhu 70° C dibawah 0, dengan penambahan 20 % - 40 % serum sapi dan 10 % glycerol akan bertahan selama beberapa bulan. Pertumbuhan virus yang baik pada suhu 37° C, sedang pada suhu 4° C dengan pH 7,4 - pH 7,5 virus dapat tahan selama 18 minggu (Doel dan Baccarini, 1981).

Formalin 0,05 % dan Phenol 0,5 % dengan suhu inkubasi 37° C dapat menginaktifkan virus dalam waktu 5 - 6 hari, sedang dengan pemberian NaOH atau KOH 2 % - 4 %

dan Na_2CO_3 4 % dapat mematikan virus dalam waktu beberapa jam (Andrewes, 1964).

Menurut Brown dan Newman (1963), AEI 0,05 % yang ditambahkan pada suspensi virus kemudian diinkubasikan pada suhu 26°C , dapat membunuh virus dalam waktu 3 hari.

4.2. Sifat biologis pada perbenihan jaringan

Virus PMK dapat ditumbuhkan dengan baik pada sel embrional sapi, domba, babi, tikus sedang penanaman di laboratorium digunakan sel ginjal anak hamster (Baby Hamster Kidney) baik monolayer atau suspensi (Lenette dan Schimdt, 1969).

Penggunaan primary monolayer, sel ginjal embrio sapi untuk biakan jaringan, pertama kali dilakukan di Italy tahun 1957 dimana akan terjadi Cyto Pathogenic Effect (CPE) yang tak karakteristik (Mowat et al. 1978).

Menurut Brown (1962), pertumbuhan virus pada media biakan jaringan ginjal babi dengan inkubasi 37°C , dapat menghasilkan harga titer tinggi. Penanaman virus pada primary monolayer sel thyroid anak sapi, dengan penambahan 3 % calf serum dapat menghasilkan titer tinggi (Hedger, 1968).

Pembentukan CPE terjadi 24-48 jam setelah penanaman pada sel monolayer Baby Hamster Kidney (BHK₂₁ clone 13), sedang pada sel primary monolayer thyroid anak

sapi terjadi setelah 27 jam inkubasi (Hedger, 1972).

5. Isolasi

Isolasi virus PMK merupakan suatu pekerjaan yang tidak mudah dan memerlukan kecermatan dalam mempersiapkan bahan penularan. Bahan penularan yang digunakan biasanya berasal dari jaringan tempat gemar virus, misal epitel lepuh lidah, epitel lepuh telapak kaki. Dapat pula dari darah, epitel lepuh ambing dan puting, ekstrak lymphoglandulae, epitel lepuh oesophagus dan pharynx dalam 50% glycerol-phosphat-buffer (Henderson, 1949 ; Lennette dan Schimdt, 1969 ; Seller et al. 1981).

Penggunaan hewan percobaan yang sesuai misal marmut, anak sapi, anak tikus putih yang masih menyusui (umur 4 hari - 10 hari), kelinci disamping biakan jaringan adalah yang terbaik (Lennette dan Schimdt, 1969 ; Edwards, 1971).

Dengan menggunakan suspensi virus 4 %, 10 %, 20 % dari epitel lepuh lidah dan lymphoglandulae mandibula dalam 25 % larutan phosphat buffer dalam Hartley's digest broth kemudian digerus dan dipusingkan (2000 rpm) selama 30 menit supernatant disaring (membran filter 0,6 mikron) siap disuntikkan pada hewan percobaan atau perbenihan jaringan (Henderson, 1949 dan Anonimous, 1980)

Penggunaan media biakan jaringan untuk isolasi maupun perbanyakan virus, terlebih dahulu dipersiapkan menurut cara Paul (1975). Untuk media mono layer, dibiakkan ulang dengan cara membuang media lama sel yang konfluen.

Kemudian dicuci dengan Phosphat Buffer Saline^{Ca + Mg Free} (PBS⁻) 25 % sebanyak 20 ml - 30 ml atau larutan Hanks' Balanced Saline Solution (Hanks' BSS) 15 ml. Dilanjutkan dengan trypsinasi sel menggunakan Versen Trypsin 0,2 % sehingga sel memisah satu dengan lainnya. Kemudian ditambah media baru yang terdiri, foetal bovine serum 2 ml, Eagle's Medium (EM) 94,5 ml, 8,8 % NaHCO₃ 2,5 ml dan Penicillin, Streptomycin, Neomycin, Bacitracin 1 ml. Penanaman dilakukan bila jumlah sel lebih dari 14×10^5 sel / ml.

Isolasi virus PMK O Java 83 dikerjakan dengan kombinasi hewan percobaan dan media biakkan. Virus berasal dari epitel lidah sapi dari Kotamadya Brebes yang diadaptasi kan pada hewan percobaan maupun pada sel BHK₂₁.

6. Identifikasi

Cara identifikasi yang digunakan untuk mengidentifikasi virus PMK O Java 83 adalah sebagai berikut :

6.1. Complement Fixation Test (CFT)

Menurut Brooksby (1952), penggunaan uji CFT untuk identifikasi virus alam (field virus) dapat menetapkan hingga subtype. Anderson et al. (1974), berhasil menentukan subtype beberapa virus PMK dengan memakai cara Cross-fixation seperti yang diuraikan Darbyshire et al. (1972) dengan menggunakan spektrofotometer sebagai alat pembaca.

Uji ini berprinsip, adanya ikatan antara anti se

serum spesifik yang digunakan dari 7 Type dengan anti gen yang akan diuji dengan menggunakan indikator sel darah merah domba yang telah disensitisisasi dengan haemolysin. Serum hyperimmun yang digunakan berasal dari marmut setelah diinokulasi 2 - 3 kali dengan interval 4 minggu oleh suspensi virus 20 %, yang diinaktifkan dengan Formalin serta digabung dengan Saponin sebagai Adjuvansia.

Haemolytik indikator, terdiri dari 0,7 % sel darah merah domba yang dipekokkan dengan Rabbit anti sheep red blood cell dengan penipisan 1 : 800. Komplemen yang digunakan, berasal dari serum marmut tanpa dipanaskan (normal unheat serum). Pembacaan didasarkan atas 50 % haemolysis end point. Penentuan subtype didasarkan atas penghitungan harga R (relationship) = $100 \sqrt{r_a \cdot r_b}$;

$$r_a = \frac{\text{Heterologous serum titer}}{\text{Homologous serum titer}} \quad 0,10 \left\{ r_a \left\{ 1,0 \right. \right.$$

$$r_b = \frac{\text{Heterologous serum titer}}{\text{Homologous serum titer}} \quad 0,10 \left\{ r_b \left\{ 1,0 \right. \right.$$

Kriteria harga R dalam satuan persen adalah ;

- (i) Berbeda subtype bila kurang dari 40
- (ii) Sedikit berbeda subtype bila antara 40-60
- (iii) Tak berbeda subtype bila diatas 60.

6.2. Uji Netralisasi

Pinto dan Hedger (1978), telah mencoba mende-

teksi antigen dan anti body virus PMK dengan cara mikro netralisasi. Uji ini berprinsip adanya ikatan netral antara antigen dan antiserum yang homolog sehingga tak bersifat infeksius bila ditularkan pada perbenihan jaringan. Serum hyperimmune yang digunakan berasal dari serum kerbau jantan yang ditulari dengan virus inaktif, sedang serum normal berasal dari serum anak kerbau umur 3 bulan. Uji ini berindikasi terbentuknya CPE pada perbenihan jaringan bila ikatannya heterolog.

6.3. Isoelectrofocusing Radio Labelled Protein (IEF)

Para peneliti bidang Virology telah berhasil mengembangkan cara identifikasi dengan menggunakan kombinasi Biophysic terhadap virus PMK dengan berbagai strain.

Menurut Crowther (1978), Haris et al. (1981) dan McCahon et al. (1982), cara ini dapat digunakan untuk mengamati kecepatan replikasi berbagai type maupun strain virus PMK.

Uji ini berprinsip mereaksikan ekstrak asam inti virus normal dengan substrat asam inti sintetis yang telah dilebel (^{35}S -Radioaktif Methionin), sedang hasil ikatan dilakukan pemotretan dengan menggunakan sinar-X.

Untuk pembuatan ekstrak asam inti tersebut, digunakan cara dari Polatnick dan Arlinghaus (1967).

tu dengan memusingkan secara bertahap suspensi virus hingga diperoleh sedimen suspensi sel yang jernih. Kemudian dicuci berulang ulang dengan larutan enzim proteolitik yang terdiri dari Tris-Natrium-Edta Buffer+Sodium Dodecyl sulfat (SDS) 0,1 % dan dipusingkan kembali (500 rpm) selama 10 menit. Sedimen ekstraksi yang terbentuk, dengan penambahan 0,3 M Na-Acetat (pH 5) siap ditanamkan pada sel monolayer yang telah tumbuh konfluen didasar botol Roux.

Penanaman dilakukan setelah membuang media lama sel monolayer tersebut . Kemudian ditambah larutan ^{35}S -Radioaktif Methionin dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 90 menit. Selanjutnya larutan Radioaktif tersebut dihisap dengan penambahan 10 % SDS-Polyacrylamide Gel dan dikeringkan dengan cara membuat suasana hampa didalam botol Roux dan siap dipotret.

Gambaran hasil pemotretan akan memperlihatkan masing masing tingkat kecepatan replikasi.

7. Penggunaan Formalin sebagai inaktifan

Formalin sebagai inaktifan virus PMK, mulai dipopulerkan pertama kali di Negara Perancis pada tahun 1925, dimana sudah digunakan untuk memperoleh antigen inaktif.

Pada tahun 1938, berhasil diteliti daya inaktifasi Formalin terhadap virus PMK type SAT₁. Dimana disebutkan bahwa dengan konsentrasi 0,15 % dapat menginaktifkan virus dalam waktu 2 hari - 3 hari, sedang dengan konsentrasi 0,05%

dalam waktu 3 hari - 4 hari, dengan suhu inkubasi 22°C sampai 25°C . Pada tahun 1950, dijelaskan pula bahwa dengan penambahan 0,09 % Formalin pada suspensi virus PMK dengan suhu inkubasi 4°C , pada umumnya akan kehilangan keganasan setiap hari 90 % (Simms, 1971).

Penelitian yang dilakukan Brown dan Crick (1958) menyatakan , penambahan 0,02 % Formalin terhadap virus PMK Type O Strain V_1 dalam suhu inkubasi 37°C dan pH suspensi virus 7,5 akan menginaktifkan virus dalam waktu 96 jam, di mana digunakan Agar gel diffusion untuk pengamatannya....

Sedang penelitian yang dilakukan Graves (1963 dikutip Simms, 1971) merupakan penelitian pertama kali menggunakan media biakan jaringan (Bovine Kidney Cell) untuk mengetahui daya inaktifasi 0,05 % Formalin dengan cara titrasi suspensi virus setelah inkubasi 37°C . Sebelum titrasi kerja Formalin dinetralsir dengan menambahkan 3-4 % Sodium Thiosulfat. Ternyata disimpulkan bahwa kerja inaktifan Formalin terhadap virus PMK cukup lama berkisar antara 36 jam hingga 40 jam.

8. Penggunaan AEI sebagai inaktifan

AEI digunakan untuk inaktifasi virus PMK pertama kali oleh Brown dan Crick (1958). Mereka membandingkan kecepatan inaktifasi antara AEI dan Formalin dengan menggunakan Agar gel diffusion sebagai pengamatnya. Jenis virus yang digunakan adalah O Strain V_1 yang diadaptasikan pada marmut. Hasil penelitian disimpulkan, bahwa virus terse-

but (pH 7,6) lebih cepat di inaktifkan oleh AEI dibanding dengan Formalin dengan suhu inkubasi 37° C.

Kesimpulan ini diperkuat dengan penelitian ulang dari Brown et al. (1963 dikutip Simms, 1971), dimana digunakan virus PMK hasil adaptasi dari sapi dan media biakan jaringan (Pig Kidney Cell) dengan marmut dan tikus putih sebagai indikator titrasi.

Fellowes (1965), berhasil mengamati penurunan LD_{50} dari suspensi virus PMK type A Strain 119 akibat penambahan 0,05 % AEI. Pengamatan dilakukan setiap interval 4 jam dengan jalan melakukan titrasi pada anak tikus (umur 4 hari - 14 hari). Dosis titrasi yang digunakan 0,05 ml dan disuntikkan secara intra peritoneal. Ternyata dari hasil penelitian tersebut disimpulkan, AEI dapat menginaktifkan dalam waktu 26 jam - 28 jam dalam suhu inkubasi 23° C.

Pada tahun 1968, disebutkan kembali bahwa inaktifan AEI 0,05 % sangat baik untuk inaktifasi virus dalam pelayan komersial karena daya kerjanya cepat dan tidak akan merusak kapsid tetapi hanya berpengaruh pada substrat inti dari virus tersebut (Simms, 1971).

BAB III

B A H A N D A N C A R A

1. Bahan penelitian1.1. Virus

Digunakan suspensi virus PMK O Java 83 hasil adaptasi sel BHK₂₁ clone 13. Contoh virus diperoleh dari Laboratorium Penyakit Mulut Kuku Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya.

Contoh virus ini telah diisolasi dan diidentifikasi oleh pihak PUSVETMA Surabaya.

1.2. Media

1.2.1. Serum Free Medium (SFM)	25 l
Terdiri dari :	
Air suling	10 l
Asam amino kosentrat	5 l
Dry salt pack	115 gram
Larutan Triptose Phosphat Broth (TPB)	
6,6 %	0,75 ml
Larutan Ferric Nitrat. 9H ₂ O 0,1 %	10 ml
Larutan vitamin kosentrat	80 ml
Larutan phenol red 0,1 %	200 ml

17

Penicillin, Neomycin, Polymicin, Kanamycin, Gentamycin, Fungizone, Streptomycin

60,5 gram

NaCl

10,6 gram

NaHCO₃

8,25 gram

Air suling hingga mencapai

25 l

1.2.2. Standard Suspension Medium (. SSM) 25 l

Terdiri dari :

Serum Free Medium + 10 % Serum Sapi.

1.2.3. Eagle Medium (E.M)

1 l

Terdiri dari

NaCl

6,4 gram

KCL

400 mgram

MgSO₄. 7H₂O

200 mgram

Glukose

4,5 gram

Ferric Nitrat. 9H₂O (0,1 %)

1 ml

Air suling

750 ml

NaH₂PO₄. 2H₂O

140 mgram

Glutamine

292 mgram

CaCl₂

200 mgram

NaHCO₃

2,75 gram

Phenol red

11 ml

Stock Aminos

50 ml

Penicillin, Neomycin, Fungizone

10 gram

Air suling

183 ml

1.2.4. Nutrient agar plate

1.2.5. Nutrient broth

1.3. Bahan kimia yang digunakan inaktifasi

1.3.1. Formalin 100 %

1.3.2. AEI 100 %

1.4. Bahan kimia untuk perbenihan jaringan

1.4.1. Poly-ethylene-glycol (PEG) + Serum sapi 3 %

1.4.2. Phospat Buffer Saline 25 %

1.4.3. Versen-Trypsin 0,25 %

1.4.4. Sodium thiosulfat 2 %

1.4.5. Hibitane 10 %

1.4.6. Asam cytrat

1.4.7. Trypan blue 0,25 %

1.5. Alat alat yang digunakan

1.5.1. Botol 10 l, 1 l, Roux, Kimex

1.5.2. Disposable falcon tissue culture

1.5.3. Bijou isi 5 ml

1.5.4. Water bath, glass beaker, gelas ukur 300 ml

1.5.5. Filler , Haemocytometer

1.5.6. Disposable pipet 0,1 ml - 1 ml

1.5.7. Automatic pipet 0,1 ml - 1 ml

1.5.8. Pipet 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml.

1.5.9. Microtiter plates F-B shape with cover, Linbro Flow Laboratories, Inc. Mclean, Virgin, U.S.A. Cat No : 76-003-05

- 1.5.10. Aluminium foil
- 1.5.11. Cover seal
- 1.5.12. Mikroskope sinar halogen
- 1.5.13. Unit steril Laminar Flow Cabinet

1.6. Alat alat yang digunakan untuk pemotretan

- 1.6.1. Foto kamera
- 1.6.1. Film negatif

2. Cara penelitian

2.1. Perbanyakkan virus pada suspensi sel BHK₂₁

Suspensi sel mengandung lebih dari 14×10^5 sel / ml suspensi dalam media SSM dengan pH 7,2 sebanyak 2 buah botol masing masing berisi 8 l. Setelah diendapkan 24 jam dalam ruang dingin (4°C), media lama dibuang dan diganti dengan SFM masing masing botol 8 l. Suspensi sel siap ditanami suspensi virus 1 % - 2 % dari total volume, dengan cara menghubungkan botol botol tersebut melalui selang silicon steril yang dilengkapi dengan membrana filter disertai kran penutup pada pipa penghisap didalam Lamina Flow Cabinet. Setelah ditanami, botol botol tersebut diisi dengan batang magnet steril. Kemudian diinkubasikan pada ruang panas (37°C) dan diAerasikan. Kedua botol contoh virus tersebut masing masing diberi kode V/A/BHK₂₁/tanggal pengerjaan dan V/B/BHK₂₁/tanggal pengerjaan.

2.2. Memanen virus dan membagi suspensi virus

Suspensi virus sebanyak 2 x 8 l, masing masing dibagi menjadi 1 l (dalam botol 1 l), sehingga diperoleh 16 botol. Kemudian diberi kode dengan V/A/BHK₂₁/1/tanggal pengerjaan, hingga V/A/BHK₂₁/8/tanggal pengerjaan, dan V/B/BHK₂₁/9/tanggal pengerjaan, hingga V/B/BHK₂₁/16/tanggal pengerjaan.

Ke 16 botol tersebut, diambil contoh masing masing 5 ml dan dimasukkan dalam bijou, untuk digunakan titrasi (48 jam inkubasi).

2.3. Inaktifasi

Botol yang berkode V/A/BHK₂₁/1/tanggal pengerjaan, hingga yang berkode V/A/BHK₂₁/4/tanggal pengerjaan, dan botol yang berkode V/B/BHK₂₁/9/tanggal pengerjaan, hingga yang berkode V/B/BHK₂₁/12/tanggal pengerjaan, masing masing ditambah dengan AEI 0,5 ml. Sedangkan botol yang berkode V/A/BHK₂₁/5/tanggal pengerjaan hingga yang berkode V/A/BHK₂₁/8/tanggal pengerjaan, maupun yang berkode V/B/BHK₂₁/13/tanggal pengerjaan, hingga V/B/BHK₂₁/16/tanggal pengerjaan, masing masing ditambah dengan 0,5 ml Formalin.

Kemudian ke 16 botol tersebut masing masing diambil 5 ml dan ditambah dengan 0,25 ml Sodium Thiosulfat dimasukkan dalam bijou, untuk digunakan titrasi (9 jam setelah inaktifasi). Ke 16 botol tersebut dimasu

ki batang magnet steril dan diinkubasikan lagi pada ruang panas (37°C), selama 48 jam.

2.4. Pengambilan contoh setiap interval 12 jam

Setiap interval 12 jam, ke 16 botol tersebut diambil sebanyak 5 ml. Kemudian dinetralisir dengan penambahan 0,25 ml Sodium Thiosulfat dan dimasukkan dalam bijou, untuk digunakan titrasi.

2.5. Pembuatan stok sel, perbanyakkan sel monolayer.

Stok sel berasal dari sel monolayer yang konfluen setelah 48 jam inkubasi, dibiakkan **ulang dengan cara**, membuang media lama dan mencuci dengan PBS 30 ml - 40 ml. Kemudian diberi Versen-Trypsin 0,25 % sebanyak 3 ml - 5 ml, dan diinkubasikan selama 1 menit - 2 menit (37°C).

Setelah sel memisah satu sama lain, ditambah dengan EM yang telah ditambah dengan Serum + PEG 3 %, sebanyak 100 ml, kemudian dimasukkan dalam botol kimex. Sebelum digunakan untuk titrasi, dilakukan penghitungan jumlah kandungan sel / ml dengan menggunakan Haemocytometer, dimana terlebih dahulu suspensi sel dalam botol kimex diencerkan hingga 10^5 dengan Trypan blue 0,25 %.

Perbanyakkan sel mono layer, dimaksud agar terdapat persediaan sel yang akan dibuat stok sel.

Cara memperbanyak sel adalah sebagai berikut. Dari sel monolayer yang telah konfluen, media lama dibuang dan dicuci dengan PBS 30 ml - 40 ml. Kemudian ditambahkan Versen-Trypsin 0,25 % sebanyak 3 ml - 5 ml, diinkubasikan selama 1 menit - 2 menit ($37^{\circ}C$), botol dikocok hingga sel mengelupas dari dinding botol.

Selanjutnya, sel yang telah mengelupas ditambah media baru E.M yang mengandung Serum + PEG 3 % sebanyak 300 ml. Suspensi sel tersebut dibagi 3 (masing-masing 100 ml), dan dimasukkan dalam botol Roux, siap diinkubasikan ($37^{\circ}C$) selama 48 jam.

2.6. Titration virus

Mula mula suspensi virus, diencerkan hingga 10^9 dengan cara mencampur 0,3 ml suspensi virus ditambah dengan 2,7 ml E.M. Kemudian 0,3 ml campuran tersebut diambil dan dimasukkan dalam bijou ditambah 2,7 ml E.M demikian seterusnya hingga bijou ke 9.

Titration dilakukan, dengan cara mengambil 0,1 ml suspensi virus dari tingkat pengenceran tertinggi hingga terendah. Ditambah dengan 0,1 ml suspensi sel (dari stok sel) dan dimasukkan pada lubang (Well) mikro titer plates (setiap pengenceran, diwakili 4 lubang, sedang untuk sel kontrol diwakili 5 lubang). Untuk sel kontrol, terdiri dari 0,1 ml suspensi sel ditambah 0,1 ml E.M yang mengandung Serum + PEG 3 %.

Setelah semua tingkat pengenceran terwakili, per

mukaan mikro titer plates ditutup dengan Cover seal, dan diberi kode. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu 37° C.

2.7. Pengamatan hasil titrasi

Setelah 48 jam inkubasi, masing masing mikro titer plates hasil titrasi, diperiksa dengan mikroskop, dengan pembesaran 40 x. Pengamatan pertama kali diarahkan pada kontrol sel, yang diwakili 5 lubang. Bila pada kontrol sel tidak didapatkan bentukan CPE, maka pengamatan untuk setiap lubang dilanjutkan.

2.8. Pengumpulan data dan penghitungan titer

Data penelitian diperoleh dengan cara, menandai bentukan CPE (lubang yang mewakili setiap pengenceran) pada tabel data dengan tanda positif (+) atau tanda negatif (-).

Untuk menghitung titer digunakan dengan cara dari Reed dan Meunch dengan menggunakan dosis titrasi 0,1 ml (Lampiran 7).

2.9. Analisa data

Data yang diperoleh, dilakukan analisa dengan memakai cara statistik. Analisa data berupa, menghitung Rata Simpang (R.S), dilanjutkan dengan uji hipotesa menggunakan uji perbedaan dua rata rata, dan analisa

korelasi regresi untuk mengetahui pengaruh penurunan ti
ter terhadap lamanya waktu inaktivasi. (Sudjana, 1982):

BAB IV

H A S I L

Setelah dilakukan penghitungan, hasil titrasi dari suspensi virus dengan masa tanam 48 jam, diperoleh harga titer ke 16 contoh tersebut rata-rata $10^{6,05}$ TCID₅₀/ml, dengan pH rata-rata 8,16.

Harga titer 0 jam setelah inaktivasi rata-rata $10^{6,05}$ TCID₅₀/ml dengan pH rata-rata 8,16.

Setiap interval 12 jam harga titer rata-rata $10^{3,212}$ TCID₅₀/ml, dengan pH rata-rata 8,41 ; $10^{0,9}$ TCID₅₀/ml, dengan pH rata-rata 8,14 ; $10^{0,9}$ TCID₅₀/ml, dengan pH rata-rata 8,56 ; 10^0 TCID₅₀/ml dengan pH rata-rata 8,66 (Tabel 1).

1. Pengamatan pencapaian harga titer 0 TCID₅₀/ml

Hasil pengamatan terhadap kelompok contoh (Tabel 2), didapatkan harga titer 0 TCID₅₀/ml akan dicapai lebih dahulu pada kelompok contoh yang diberi AEI, sedang kelompok contoh yang diberi Formalin menyusul kemudian dengan waktu berkisar antara 24 jam hingga 36 jam (Grafik 1).

Dengan uji hipotesa menggunakan uji perbedaan dua rata-rata, uji satu pihak terhadap dua data masing-masing dari kelompok contoh Formalin dan AEI pada pengamatan 24 jam. Ternyata harga titer 0 TCID₅₀/ml lebih cepat dicapai pada kelompok contoh yang diberi AEI (Lampiran 1).

2. Analisa data dan analisa korelasi

Dari analisa data diperoleh hasil rata-rata penurunan titer akibat pemberian Formalin $10^{2,10}$ TCID₅₀/ml. Sedangkan rata-rata penurunan titer akibat pemberian AEI adalah $10^{2,16}$ TCID₅₀/ml (Lampiran 2).

Pada analisa korelasi, antara penurunan harga titer TCID₅₀/ml dengan lamanya waktu inaktivasi didapatkan harga $r = - 0,99$. Dari perhitungan tersebut diartikan bertambahnya waktu inaktivasi akan mengakibatkan penurunan titer TCID₅₀/ml (Lampiran 3).

Dengan penghitungan koefisien regresi, didapatkan persamaan garis lengkung geometrik, yang menunjukkan berkurangnya harga titer log virus TCID₅₀ akan diikuti secara bersamaan dengan bertambah lamanya waktu inaktivasi (Lampiran 4 dan lampiran 5).

Pada diagram pancar, tampak titik-titik koordinat yang makin lama makin menurun (Lampiran 6).

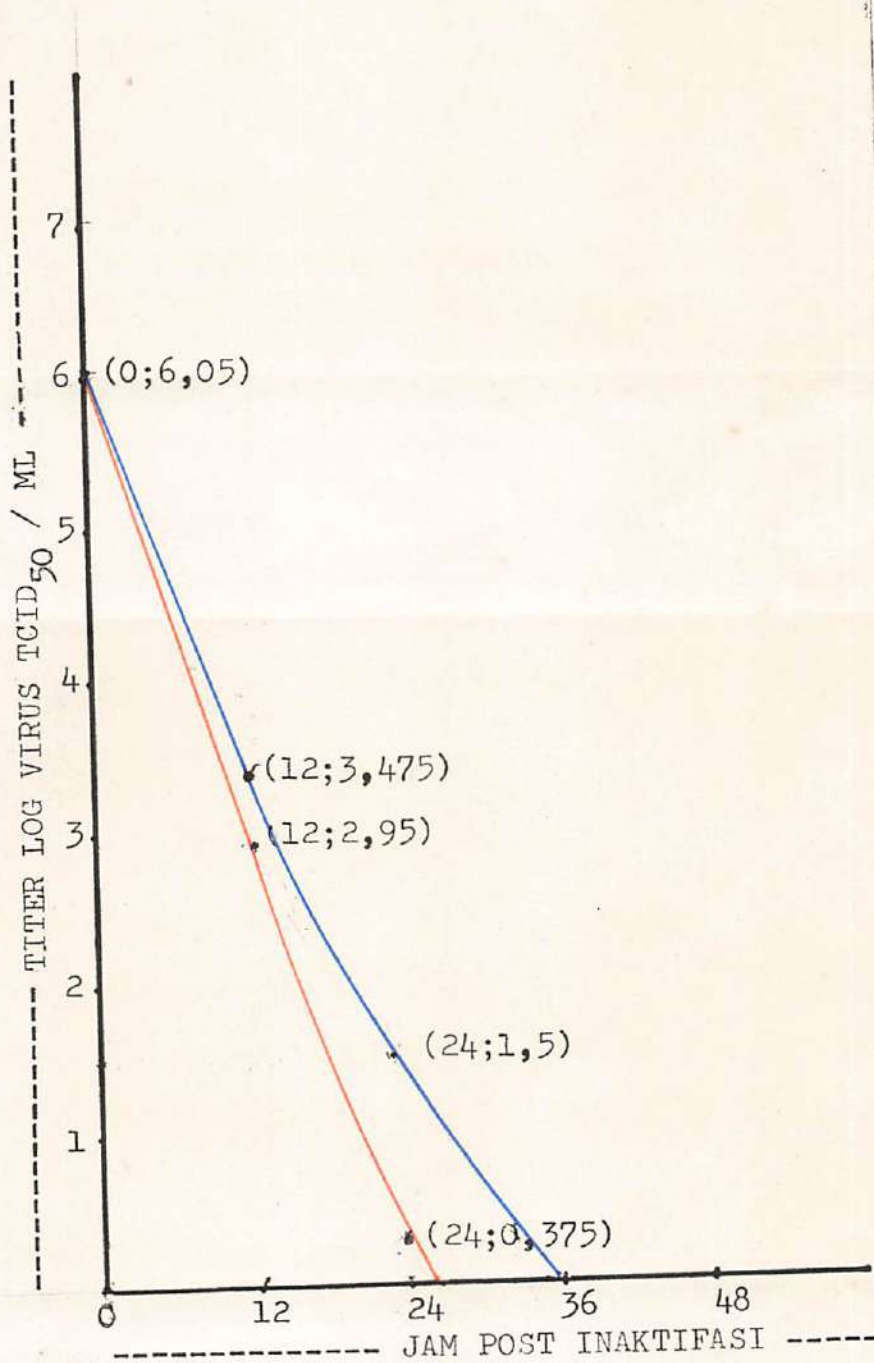
Adanya keadaan inaktif virus, diperiksa dengan tak terbentuknya CPE, sedang aktifnya virus akan ditemui ben-tukan CPE (Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4, Gambar 5, Gambar 6).

CONTOH	Titer/ML	PH	Titer/ML	PH	Titer/ML	PH	Titer/ML	PH	Titer/ML	PH	Titer/ML	PH
V/A/BHK/1	5.8	8.15	5.8	8.18	4.2	8.37	0	8.49	0	8.54	0	8.64
V/A/BHK/2	5.8	8.16	5.8	8.17	3.7	8.37	0	8.49	0	8.54	0	8.64
V/A/BHK/3	5.8	8.16	5.8	8.18	2.5	8.37	0	8.49	0	8.54	0	8.64
V/A/BHK/4	5.8	8.16	5.8	8.18	3.2	8.37	0	8.50	0	8.54	0	8.64
V/A/BHK/5	5.8	8.15	5.8	8.17	3.5	8.39	1.5	8.50	0	8.54	0	8.65
V/A/BHK/6	5.8	8.16	5.8	8.17	4.5	8.38	1.5	8.50	0	8.56	0	8.65
V/A/BHK/7	5.8	8.16	5.8	8.18	3.5	8.37	1.5	8.49	0	8.56	0	8.65
V/A/BHK/8	5.8	8.16	5.8	8.18	3.5	8.39	1.5	8.50	0	8.56	0	8.65
V/B/BHK/9	6.3	8.17	6.3	8.19	2.5	8.42	0	8.52	0	8.58	0	8.66
V/B/BHK/10	6.3	8.17	6.3	8.19	2.5	8.43	0	8.52	0	8.58	0	8.66
V/B/BHK/11	6.3	8.17	6.3	8.19	2.5	8.43	1.5	8.52	0	8.58	0	8.66
V/B/BHK/12	6.3	8.16	6.3	8.19	2.5	8.47	1.5	8.52	0	8.59	0	8.68
V/B/BHK/13	6.3	8.16	6.3	8.18	3.5	8.47	1.5	8.52	0	8.59	0	8.68
V/B/BHK/14	6.3	8.16	6.3	8.18	2.5	8.47	1.5	8.53	0	8.59	0	8.68
V/B/BHK/15	6.3	8.16	6.3	8.18	3.3	8.47	1.5	8.53	0	8.59	0	8.68
V/B/BHK/16	6.3	8.17	6.3	8.19	3.5	8.48	1.5	8.53	0	8.59	0	8.68
RATA - RATA	6.05	8.16	6.105	8.18	3.212	8.41	0.9	8.51	0	8.56	0	8.66

Contoh + AEI	V/A/BHK/1	V/A/BHK/2	V/A/BHK/3	V/A/BHK/4	V/B/BHK/9	V/B/BHK/10	V/B/BHK/11	V/B/BHK/12	RATA - RATA
Pengamatan	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H
10Jam Post In	5.8 8.18 5.8	18.17 5.8 8.18 5.8	18.18 6.3 18.19 6.3	18.19 6.3 18.19 6.3	18.19 6.3 18.19 6.3	18.19 6.3 18.19 6.3	18.19 6.3 18.19 6.3	18.19 6.3 18.19 6.3	6.05 18.18
12Jam Post In	4.2 8.37 3.7	18.37 2.5 18.37 3.2	18.37 2.5 18.42 2.5	18.42 2.5 18.43 2.5	18.42 2.5 18.43 2.5	18.43 2.5 18.43 2.5	18.43 2.5 18.43 2.5	18.47 2.95 18.40	2.95 18.40
16Jam Post In	0 8.49 0	18.49 0 18.50 0	18.52 0 18.52 0	18.52 0 18.52 0	18.52 0 18.52 0	18.52 0 18.52 0	18.52 0 18.52 0	18.52 0 18.52 0	0.375 18.50
16Jam Post In	0 8.54 0	18.54 0 18.54 0	18.54 0 18.54 0	18.54 0 18.54 0	18.54 0 18.54 0	18.54 0 18.54 0	18.54 0 18.54 0	18.54 0 18.54 0	0 18.56
16Jam Post In	0 8.64 0	18.64 0 18.64 0	18.64 0 18.64 0	18.64 0 18.64 0	18.64 0 18.64 0	18.64 0 18.64 0	18.64 0 18.64 0	18.64 0 18.64 0	0 18.65
Contoh+Form	V/A/BHK/5	V/A/BHK/6	V/A/BHK/7	V/A/BHK/8	V/B/BHK/13	V/B/BHK/14	V/B/BHK/15	V/B/BHK/16	RATA - RATA
Pengamatan	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H	Titer/ML P.H
10 Jam Post In	5.8 18.17 5.8	18.17 5.8 18.18 5.8	18.18 6.3 18.18 6.3	18.18 6.3 18.18 6.3	18.18 6.3 18.18 6.3	18.18 6.3 18.18 6.3	18.18 6.3 18.18 6.3	18.19 6.05 18.17	6.05 18.17
12Jam Post In	3.5 18.39 4.5	18.38 3.5 18.37 3.5	18.37 3.5 18.47 3.5	18.47 2.5 18.47 3.5	18.47 2.5 18.47 3.5	18.47 3.5 18.47 3.5	18.47 3.5 18.47 3.5	18.48 3.475 18.43	3.475 18.43
12Jam Post In	1.5 18.50 1.5	18.50 1.5 18.49 1.5	18.49 1.5 18.52 1.5	18.50 1.5 18.53 1.5	18.52 1.5 18.53 1.5	18.53 1.5 18.53 1.5	18.53 1.5 18.53 1.5	18.53 1.5 18.51	1.5 18.51
16Jam Post In	0 18.54 0	18.56 0 18.56 0	18.56 0 18.56 0	18.56 0 18.56 0	18.56 0 18.56 0	18.56 0 18.56 0	18.56 0 18.56 0	18.56 0 18.56 0	0 18.57
16Jam Post In	0 18.65 0	18.65 0 18.65 0	18.65 0 18.65 0	18.65 0 18.65 0	18.65 0 18.65 0	18.65 0 18.65 0	18.65 0 18.65 0	18.65 0 18.65 0	0 18.67

Grafik 1

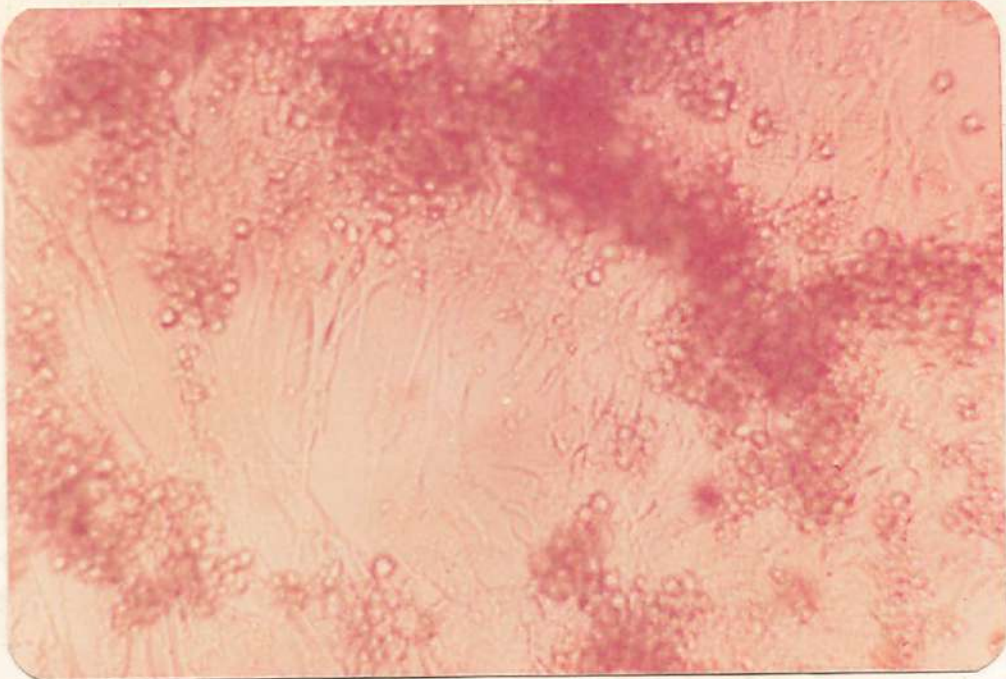
PERBANDINGAN KECEPATAN PENCAPAIAN HARGA TITER
 0 TCID₅₀/ML ANTARA FORMALIN DAN AEI
 DENGAN INTERVAL 12 JAM



KETERANGAN

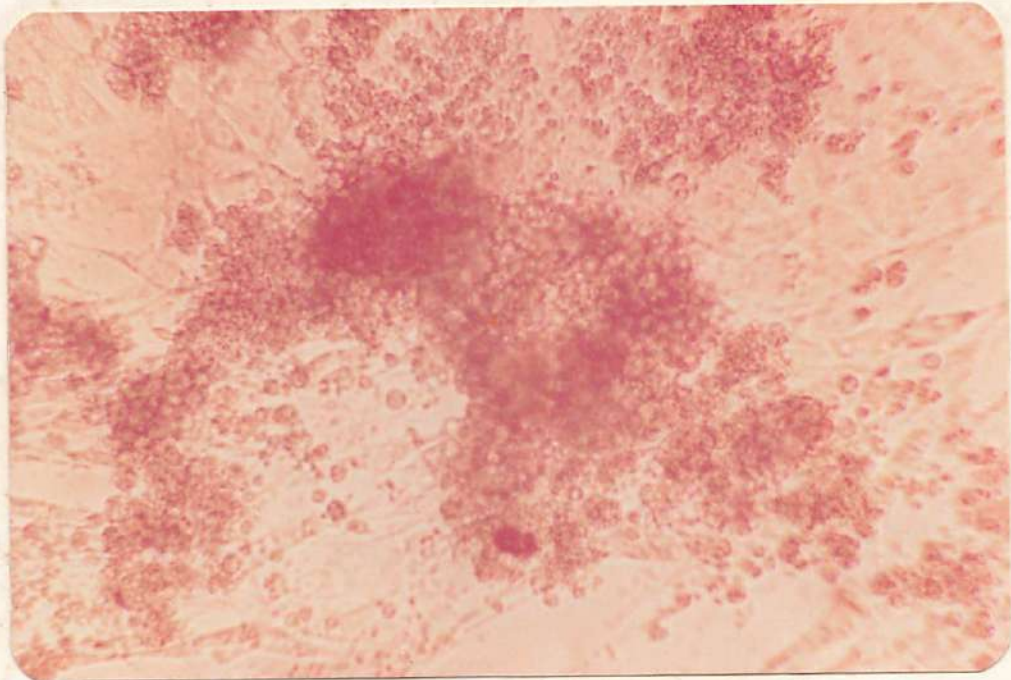
FORMALIN : —————
 AEI : —————
 PH : 8,18-8,67
 SUHU : 37° C.

Gambar 2



Pengamatan 12 jam setelah inaktivasi
dengan pemberian Formalin

Gambar 3

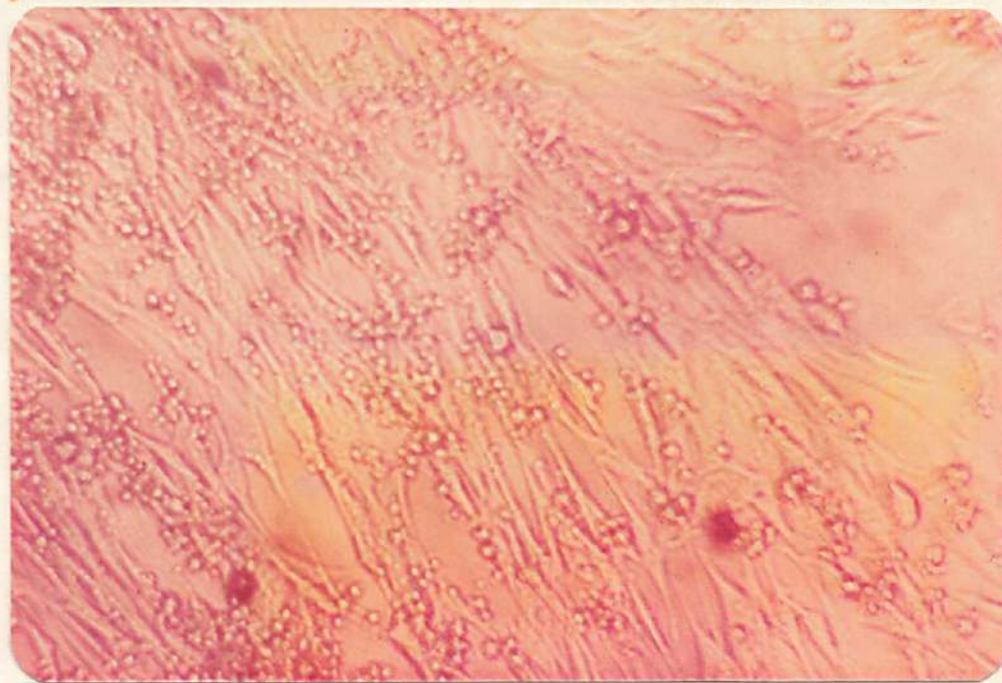


Pengamatan 12 jam setelah inaktivasi
dengan pemberian AEI



Gambar 4

Pengamatan 24 jam setelah inaktivasi dengan pemberian Formalin



Gambar 5

Pengamatan 24 jam setelah inaktivasi dengan pemberian AET



Gambar 6

Sel kontrol

BAB V
P E M B A H A S A N

Dari analisa hasil penelitian, maka diperoleh kenyataan bahwa daya inaktivasi AEI jauh lebih kuat dibanding dengan Formalin . Hasil analisa ini sesuai dengan hasil penelitian dari peneliti peneliti lainnya . (Simms , 1971). Menurut Durand et al. (1968 dikutip Simms 1971) AEI sebagai senyawa alkali kuat, lebih cepat merusak susunan protein asam inti dari pada protein kapsidnya. Tetapi Formalin sebagai senyawa asam kuat, lebih cepat merusak protein kapsidnya dari pada susunan protein asam inti virus. Hal ini yang menyebabkan virus masih dapat bereplikasi ulang, sehingga dikatakan daya inaktivasi Formalin berkurang dibanding AEI.

Dari hasil analisa maka didapat harga $0 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ akan dicapai dengan waktu yang berkisar, hal ini akibat interval waktu pengamatan yang lama. Pada umumnya masalah ini juga ditemui pada uraian peneliti peneliti lain (Brown dan Crick, 1958 dan Fellowes, 1965). Ini semua berkaitan dengan kemampuan si peneliti, disebabkan tidak mudahnya pembacaan hasil titrasi baik invitro maupun invivo (Arrowsmith, 1976).

Penentuan kosentrasi dan suhu inkubasi berpengaruh pada protein kapsid maupun sustrat asam inti, makin besar harga kosentrasi dan suhu inkubasi makin cepat menga-

kibatkan denaturalisasi susunan protein virus (Dimmock , 1967). Hal ini menjadi alasan utama dimana, dalam pengerjaan yang berhubungan dengan virus jarang menggunakan api bunsen (untuk menjaga terjadinya kontaminasi) agar virus tidak mengalami kematian sehingga dapat mengurangi nilai penelitian karena kemungkinan virus inaktif bukan disebabkan pemberian inaktifan.

Hal yang terpenting bagi virus yang inaktif, adalah tidak rusaknya **struktur** antigen baik capsid maupun 140^S asam inti dimana penting sekali untuk merangsang timbulnya kekebalan tubuh, sehingga harga titer $10^{1,5}$ TCID₅₀/ml dianggap sudah tidak virulen atau virulensinya sangat rendah (Fellowes, 1965). Disini penulis menyimpulkan bahwa keadaan inaktif terjadi 24 jam - 36 jam setelah inaktivasi, karena bila antigen tersebut dibuat formula **vaksin** inaktif tidak akan menimbulkan kejadian yang disebut **vaccine born disease** (Anonymous, 1982).

BAB VI

K E S I M P U L A N D A N S A R A N

1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan mulai tanggal 15 mei 1984 hingga 15 Juni 1984 (Lampiran 8), disamping hasil analisa data, ditarik beberapa kesimpulan yang merupakan jawaban dari tujuan penelitian, yaitu :

1. Harga titer 10^0 TCID₅₀ / ml cepat dicapai pada kelompok contoh yang ditambah dengan AEI. Berarti, daya inaktifasi AEI lebih cepat dibanding dengan Formalin pada konsentrasi dan suhu inkubasi yang sama.
2. Makin lama waktu inaktifasi, makin turun harga titer log virus TCID₅₀/ml.

2. Saran

Dilandasi uraian diatas, penulis menarik beberapa saran yang mana berkaitan erat dengan latar belakang masalah maupun bidang Virology pada umumnya.

1. Penggunaan inaktifan AEI sangat efektif bila digunakan untuk menghasilkan antigen inaktif sehubungan dengan produksi vaksin secara komersial.

2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai kandungan 140^S dari virus O Java 83 setelah diinaktifkan.

BAB VII

RINGKASAN

Vaksinasi adalah salah satu cara pencegahan timbulnya wabah Penyakit Mulut Kuku (PMK), dimana hingga saat ini diberberapa propinsi Indonesia masih belum bebas. Bahkan pada bulan Juli 1983, timbul letupan wabah di Pulau Jawa yang dikenal dengan type O strain Java 83. Seperti virus PMK pada umumnya, virus ini tergolong Pico RNA single-stranded.

Dalam kaitannya dengan vaksin, tidak lepas dari masalah inaktifan untuk pembuatan vaksin inaktif. Salah satu cara inaktifasi adalah dengan menambahkan bahan inaktifan pada suspensi virus.

Beberapa bahan kimia yang sering digunakan adalah Beta-propiolactone, Hydroxylamine, Acetyleneimine (AEI), Glycidaldehyde (GDA), Ethyleneimine (EEI) dan yang tergolong paling lama adalah Formalin.

Formalin (CH_2O), sebagai inaktifan jarang digunakan lagi, hal ini karena daya inaktifasinya lambat.

AEI ($\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}$), sebagai inaktifan merupakan alternatif pengganti Formalin. Pemakaian pertama kali sebagai inaktifan pada tahun 1959.

Penggunaan media biak jaringan yang sesuai untuk virus ini, adalah sel thyroid anak sapi, sel ginjal babi, sel ginjal anak sapi, dan ginjal anak hamster. Untuk penana-

man dalam jumlah besar digunakan suspensi sel, sedang untuk penanaman dalam jumlah kecil digunakan monolayer sel. Penggunaan biakan jaringan dengan continuous cell line lebih baik dibanding primary cell, karena primary cell mempunyai phase adaptasi menjadi sel matang sewaktu dibiakkan ulang sehingga bila phase adaptasi gagal, sel akan mati.

Dalam pelaksanaan penelitian ini digunakan media biakan jaringan (BHK₂₁) cell line clone 13, baik suspensi maupun monolayer. Indikasi pertumbuhan virus dengan adanya bentukan Cyto Pathogenic Effect (CPE), setelah penanaman 48 jam.

Sebagai obyek penelitian, adalah Formalin dan AEI dengan konsentrasi yang sama dan suhu inkubasi 37° C, pH suspensi virus berkisar antara 8,16 hingga 8,66.

Virus yang digunakan adalah virus PMK 0 Java 83 yang diperoleh dari kotamadya Brebes sewaktu terjadi letupan wabah sekitar bulan Juli 1983 di Pulau Jawa.

Dari hasil penelitian, ternyata AEI lebih cepat menginaktifkan virus dibanding Formalin. Terbukti dengan cepatnya pencapaian harga 0 TCID₅₀/ml pada kelompok contoh akibat pemberian AEI. Disamping itu diperoleh hasil, dengan makin lamanya waktu inaktifasi makin menurun titer virus hingga didapatkan harga titer 0 TCID₅₀/ml.

Pada penelitian ini diperoleh waktu inaktifasi yang berkisar antara 24-36 jam, hal ini disebabkan waktu pengamatan relatif lama yaitu 12 jam.

D A F T A R K E P U S T A K A A N

- Andrewes, S.C. 1964. Viruses of Vertebrates. Fourth edition. 31 - 44.
- Anderson, E.C., J. Anderson and W.J. Doughty. 1974. The Foot and Mouth Disease Virus Subtype in Kenya. J. Hyg. Camb. . 73 : 237 - 243.
- Anonimous. 1980. Veterinary Microbiologi - 3 , Virologi Laboratory Manual. Departement of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science University Pertanian Malaysia, Serdang. 4 - 6 .
- Anonimous. 1982. Wellcome Foot and Mouth Disease Vaccines . The Wellcome Foot and Mouth Disease Vaccine Laboratory, Pirbright, U.K. 24 - 25 .
- Anonimous. 1984. FMD Diagnostic Procedur : From Emergency Studies to Sophisticated Studies With The Example of O Java 1983 Virus. Département Vétérinaire de l ' Institut Mérieux, Lyon, France. 1 - 12 .
- Arrowsmith, A.E.M. 1976. A Survey of FMD Type ' O ' Strains From The Far East. Develop. biol. Standard. 35 : 221 - 230 .
- Brooksby, J.B. 1952. The Technique of Complement Fixation in Foot Mouth Disease Research. Agric . Res. Council Rep., Her Majesty's Stationery Office, London. 12 : 5 - 35 .
- Brown, F and J. Crick. 1958. Application of Agar Gel Diffusion Analysis to A Study of The Antigenic Structure of In Aktivated Vaccines Prepared from The Virus of Foot and Mouth Disease. J. Immunol. 82 : 444 - 447.
- Brown, F. 1962. The Structure and Multiplication of Foot and Mouth Disease Virus : A review . Foot and Mouth Disease. Tenth Conference. International Office Epizootic, Paris. 167 : 1 - 6 .
- Brown, F and J.F.E. Newman. 1963. Invitro Measurement of Potency of Inactivated Foot and Mouth Disease Virus Vaccines. J. Hyg. Camb. 61 : 345 - 350 .
- Crowther, J.R. 1978. Subtyping of FMD Virus : New Approach. Bull. Off. Int. Epiz. 59 : 831 - 850.

- Darbyshire, J.H., R.S. Hedger and A.E.M. Arrowsmith. 1972. Comparative Complement Fixation Studies With Subtype Strain of Foot and Mouth Disease Virus. J. Hyg. Camb. 70 : 21 - 32.
- Dimmock, N.J. 1967. Differences Between The Thermal Inactivation of Picorna Virus at ' High ' and 'Low' Temperatures. Virology. 31 : 338 - 353.
- Doel, T.R. and P.J. Baccarini. 1981. Thermal Stability of Foot and Mouth Disease Virus. Arch. of Virology. 70 : 21 - 32.
- Edwards, M.C. 1971. The Susceptibility of Small Mammals to Foot and Mouth Disease Virus. Vet. Bull. 4 : 815 - 823 .
- Fellowes, O.N. 1965. Comparisson of The Inactivation and Antigenicity of Foot and Mouth Disease Virus by Acetyleneimine by Combinated Effect of Ultra Violet Light and Beta-propiolactone. J. Immunol. 95 : 1100 - 1105 .
- Garland, A.J.M., G.N. Mowat and B. Fletton. 1976. An Evaluation of Some Methods of Assay of Foot and Mouth Disease Antigen for Vaccines. Develop. biol. Stand. 35 : 323 - 332 .
- Gloster, J., R.F. Sellers and A.I. Donaldson. 1982. Long Distance Transport of Foot and Mouth Disease Virus Over The Sea. Vet. Rec. 110 : 47 - 52 .
- Harris, T.J.R., F. Brown and D.V. Sangar. 1981. Differential Precipitation of Foot and Mouth Disease Virus Protein Made In Vivo and Vitro by Hyperimmune and Virus Particel in Quinea Pig Antisera . Virology. 112 : 91 - 98 .
- Hedger, R.S. 1968 The Isolation and Characterization of Foot and Mouth Disease Virus from Clinically normal Herds of Cattle in Botswana. J. Hyg. Camb. 66 : 27 - 36 .
- Hedger, R.S. 1972. Foot and Mouth Disease and The African Buffalo (Syncerus caffer). J. Comp. Path. 82 : 19 - 28 .
- Henderson, W.M. 1949. The Quantitative Study of Foot and Mouth Disease Virus. Agric. Res. Council Rep., Her Majesty's Stationery Office. London. 8 : 4-46 .
- Lennette, H.E and N.J. Schimdt. 1969. Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections. Fourth Edition. 10 - 169 .

- McCahon, D. 1981. The Genetic of Aphthous Virus. Arch. of Virology. 69 : 1 - 23.
- McCahon, D., A.M.Q. King and J.W.I. Newman. 1982. Rapid Identification of FMD Virus Isolates by Electro focusing of Their Induced Protein. Foot and Mouth Disease . Sixteenth Conference . International Office Epizootic, Paris. 1 : 245 - 251.
- Merchant, I.A and R.A. Packer . 1961. Veterinary Bacteriology. Sixth Edition. 755 - 758.
- Mowat, G.N., A.J. Garland and R.E. Spier. 1978 . The Development of Foot and Mouth Disease Vaccines . Vet. Rec. 102 : 190 - 193.
- Partadiredja, M . 1974 . Foot and Mouth Disease Situation and Its Eradication Programme in Indonesia . Bull . Off . Int . Epiz. 81 : 705 - 709.
- Paul, J. 1975. Cell and Tissue Culture . Fifth Edition . 331 - 437 .
- Pinto, A.A. and R.S. Hedger. 1978. The Detection of Antibody to Virus Infection Associated (VIA) Antigen in Various Species of African Wildlife Following Natural and Experimental Infection with Foot and Mouth Disease Virus. Arch. of Virology. 57 : 307 - 314 .
- Polatnick, J and R.B. Arlinghaus. 1967. Foot and Mouth Disease Virus Induced Ribonucleic Acid Polymerase in Baby Hamster Kidney Cells. virology. 31 : 601. - 608.
- Sellers, R.F., A.J.M. Garland., A.I. Donaldson and J. Gloster. 1981. The 1975 Foot and Mouth Disease Epidemic in Malta IV : Analysis of The Epidemic. Br. Vet. J. 137 : 608 - 620.
- Simms, M.J. 1971. The Inactivation of Foot and Mouth Disease Bulletin . Veterinary Biologicals , The Wellcome Research Laboratories , Beckenham , Kent, U.K . 6 : 2 - 10 .
- Sudjana. 1982. Metode Statistik. Edisi Kedua . 297-376.
- Sukobagyo. 1976. Penyakit Aphthae Epizootical (AE) di Indonesia. Direktorat Kesehatan Hewan. Direktorat Jendral Peternakan. Departemen Pertanian . 1 - 3 .

L A M P I R A N

Lampiran 1

UJI PERBEDAAN DUA RATA RATA, UJI SATU PIHAK
TITER LOG VIRUS TCID₅₀/ML

N	Titer 24 jam post in aktifa-si. AEI	Titer 24 jam post in aktifa-si. FORM	$(X_{i1} - \bar{X}_1)^2$	$(X_{i2} - \bar{X}_2)^2$
1	0	1,5	0	0,14
2	0	1,5	0	0,14
3	0	1,5	0	0,14
4	0	1,5	0	0,14
5	0	1,5	0	0,14
6	0	1,5	0	0,14
7	1,5	1,5	0	1,25
8	1,5	1,5	0	1,25
	$\Sigma 3$	$\Sigma 12$	$\Sigma 0$	$\Sigma 3,06$

$\bar{X}_1 = 0,38$
 $\bar{X}_2 = 1,5$
 $S_1 = 0,66$
 $S_2 = 0$
 $S = 0,42$
 $T_{hit} = 5,33$

Berarti
 Harga titer 0 TCID₅₀/ml cepat dicapai pada kelom-

H_0 : Titer 0 TCID₅₀/ml cepat ..
 dicapai pada kelompok Form
 A : Tidak betul titer 0 TC
 ID₅₀/ml cepat dicapai pada
 kelompok Form.

Hipotesa diterima bila ;

$T_{hit} < T_1 - \alpha$
 $\alpha = 0,05$
 $Dk = N_1 + N_2 - 2$
 $S^2 = \frac{(N_1 - 1)S_1^2 + (N_2 - 1)S_2^2}{N_1 + N_2 - 2}$
 $T_{hit} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$
 $S = \sqrt{\frac{\Sigma(X_1 - \bar{X})^2}{N - 1}}$

Hipotesa diterima bila :

$T_{hit} < 1,75$

Jadi hipotesa ditolak.

Kesimpulan :

Tidak betul harga titer 0 TC
 ID₅₀/ml cepat dicapai pada ke-
 lompok Form.

Lampiran 2RATA SIMPANG TITER LOG VIRUS TCID₅₀/ML FORMALIN DAN AEIFORMALIN

X	$X_i - \bar{X}$	$ X_i - \bar{X} $
6,05	2,375	2,375
3,475	-0,2	0,2
1,5	-2,175	2,175
0	-3,675	3,675

RATA SIMPANG (RS)

$$RS = \frac{\sum |X_i - \bar{X}|}{N}$$

$$\bar{X} = 3,675$$

$$\sum |X - \bar{X}| = 8,425$$

$$R.S = \underline{\underline{2,10}}$$

AEI

X	$X_i - \bar{X}$	$ X_i - \bar{X} $
6,05	3,707	3,707
2,95	0,607	0,607
0,375	-1,968	1,968
0	-2,343	2,343

$$\bar{X} = 2,343$$

$$\sum |X_i - \bar{X}| = 8,643$$

$$R.S = \underline{\underline{2,16}}$$

Lampiran 3ANALISA KORELASI

Pada analisa ini bertujuan untuk mengetahui, apakah terdapat hubungan antara penurunan titer log virus TCID₅₀ setiap ml. :

Kriteria (Sudjana, 1982) : $-1 \leq r \leq +1$

Bila $r = -1$, menyatakan adanya hubungan sempurna antara X dan Y ,

Artinya : Titik titik yang ditentukan oleh (X_1 ; Y_1), seluruhnya terletak pada garis regresi. Harga X yang besar menyebabkan atau berpasangan dengan harga Y yang kecil sedang harga X yang kecil berpasangan dengan harga Y yang besar

Bila $r = +1$, menyatakan adanya hubungan sempurna antara X dan Y .

Artinya : Titik titik yang ditentukan oleh (X_1 ; Y_1), seluruhnya terletak pada garis regresi. Harga X yang besar menyebabkan atau berpasangan dengan Y yang besar sedang harga X yang kecil menyebabkan harga Y yang kecil.

Hitungan : (Lampiran 5).

$$\begin{aligned} \sum X_i &= 72 & \sum Y_i^2 &= 47,729 \\ \sum Y_i &= 10,162 & \sum (X_i)^2 &= 5184 \\ \sum X_i Y_i &= 60,144 & \sum (Y_i)^2 &= 103,266 \\ \sum X_i^2 &= 2016 & & \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} r &= \frac{N \sum X_i Y_i - (\sum X_i)(\sum Y_i)}{\sqrt{\{N \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2\} \{N \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2\}}} = \\ r &= \frac{4 (60,144) - (72) (10,162)}{\sqrt{4 (2016) - (5184) \quad 4 (47,729) - (103,266)}} \\ r &= \frac{240,576 - 731,664}{\sqrt{(8064 - 5184) (190,916 - 103,266)}} \\ r &= - 0,99. \end{aligned}$$

Kesimpulan : harga r mendekati harga -1, ada korelasi antara dua variabel.

Berarti : Bertambah lamanya waktu inkubasi diikuti dengan berkurangnya harga titer log virus TC ID₅₀/ml.

Lampiran 4KOEFISIEN REGRESI

Dalam penghitungan koefisien regresi ini, bertujuan untuk menguatkan bahwa, antara berkurangnya titer saakan diikuti secara bersama sama dengan bertambah lamanya waktu inaktivasi.

Kriteria (Sudjana, 1982) :

Pada grafik menunjukkan garis lengkung geometrik , yang dikuatkan dengan diagram pancar (Lampiran 6)

Hitungan : (Lampiran 5).

Persamaan koefisien regresi $\hat{Y} = aX^{-b}$; $\hat{Y} = \frac{a}{X^b}$

$$\text{Log } a = \frac{\sum \log Y_i}{N} - b \frac{\sum \log X_i}{N} = 284,4461$$

$$b = \frac{N(\sum \log X_i \log Y_i) - (\sum \log X_i)(\sum \log Y_i)}{N(\sum \log^2 X_i) - (\sum \log X_i)^2}$$

$$\begin{aligned} \text{Log } a &= \frac{1,2428}{4} - (-2,135) \frac{4,0156}{4} \\ &= 0,3107 - (-2,1433) = 2,4540 \end{aligned}$$

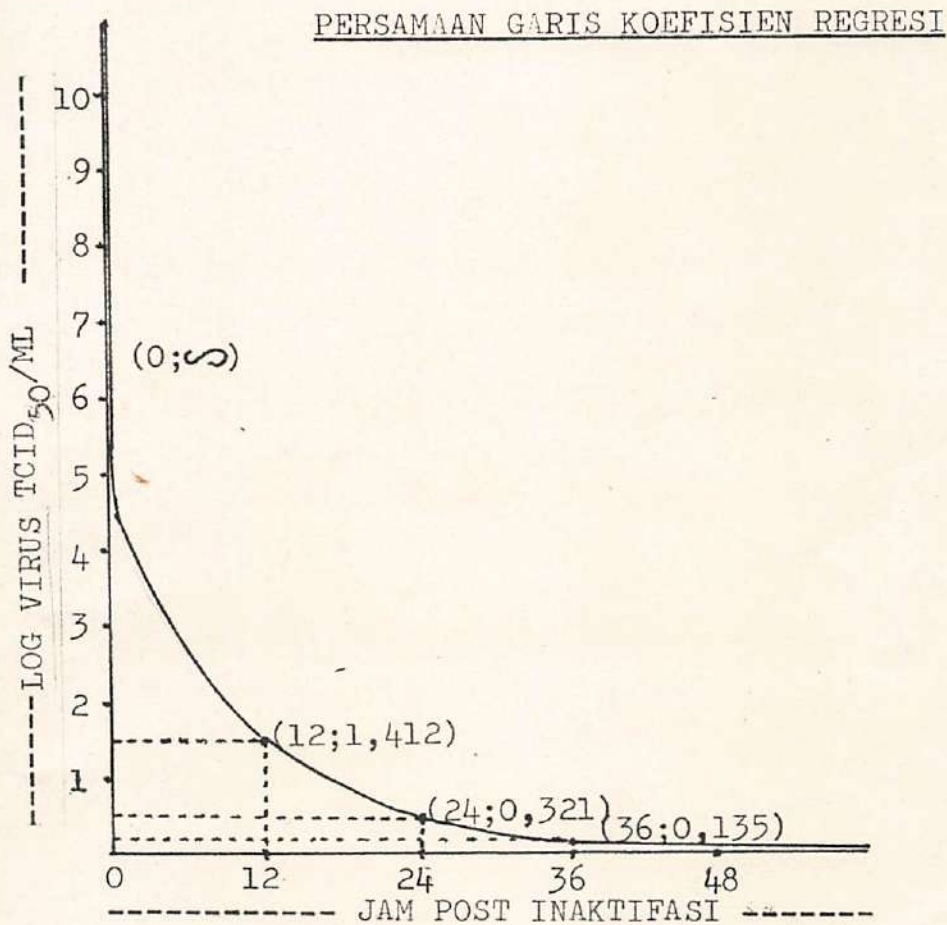
$$b = \frac{4(2,8218) - (4,0156)(1,2428)}{3(3,2441) - 16,125}$$

$$b = \frac{11,2872 - 4,9906}{13,1764 - 16,125} = -2,135$$

$$\text{Persamaan garis } \hat{Y} = \frac{284,44}{X^{2,135}}$$

Setelah dilakukan penghitungan persamaan garis koefisien regresi, dilanjutkan pembuatan grafik $\hat{Y} = \frac{284,44}{X^{2,135}}$.

Grafik 2



Kesimpulan : Grafik menunjukkan suatu garis lengkung geometrik.

Berarti : Berkurangnya titer akan diikuti secara bersama sama dengan bertambah lamanya waktu inaktivasi.

ANALISA DATA ANTARA PENURUNAN TITER DENGAN LAMANYA INAKTIFASI

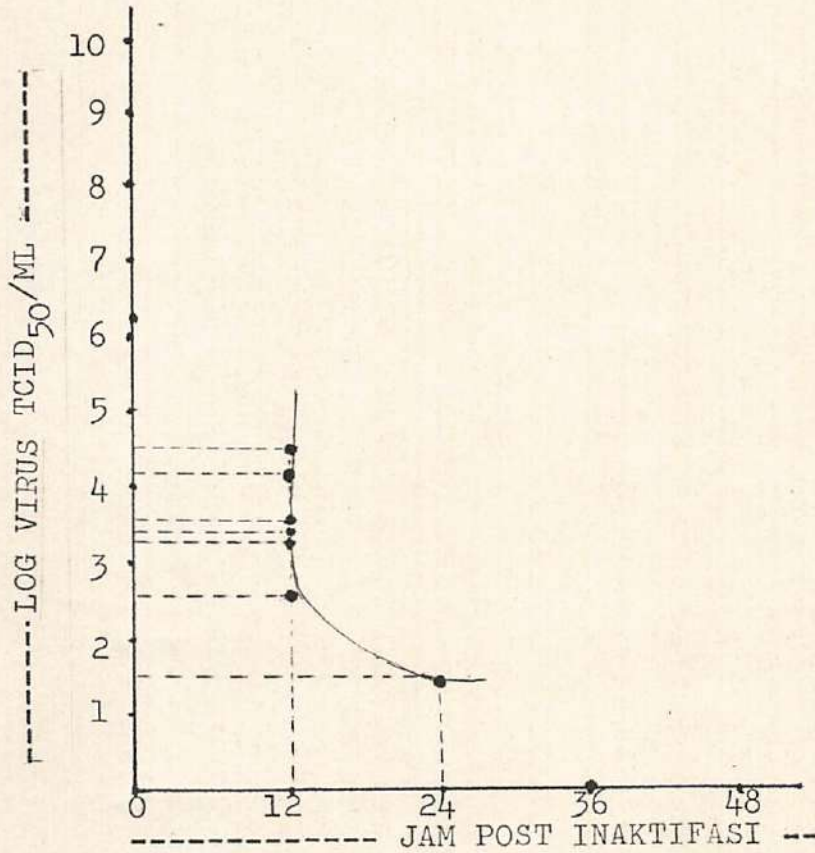
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

X_i	y_i	X_i^2	y_i^2	$X_i \cdot Y_i$	$\log X_i$	$\log Y_i$	$\log X_i \cdot Y_i$	$\log^2 X_i$
0	6,05	0	36,602	0	0,000	0,7818	0	0
12	3,212	144	10,317	38,544	1,0791	0,5068	0,5469	1,1645
24	0,9	576	0,81	21,6	1,3802	-0,0458	-0,0632	1,0632
36	0	1296	0	0	1,5563	0	0	2,4221
$\Sigma 72$	$\Sigma 10,162$	$\Sigma 2016$	$\Sigma 47,729$	$\Sigma 60,144$	$\Sigma 4,0156$	$\Sigma 1,2428$	$\Sigma 2,8218$	$\Sigma 5,4915$

Lampiran 6

DIAGRAM PANCAR

Grafik 3



Dalam pembuatan diagram pancar terlihat titik titik koordinat yang dapat didekati dengan garis lengkung menurun.

Lampiran 7

HASIL TITRASI

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Perhitungan

Pengenceran suspensi virus O Java '83	Mortality	Mati	Hidup	Nilai akumulasi			
				Mati	Hidup	Mortality	
						Ratio	Persen

Hasil : Dosis titrasi 0,1 ml

$$PD_{50} = \frac{M > 50\% - 50\%}{M < 50\% - M > 50\%}$$

Negatif log end point = neg log yang mendekati 50 % kematian + (PD₅₀ x dilution factor)

$$Titer = \frac{\text{Neg log end point}}{\text{Dosis titrasi}} = TCID_{50}/ml.$$

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

984	Perbanyakkan virus pada suspensi sel 16 l.	22 - 5 - 1984	Menumbuhkan sel pada botol Roux.
984	Memanen virus dan membagi dalam botol 1 l. Mengambil sampel 5 ml setiap botol (48 jam in) Menginaktivasi .	23 - 5 - 1984	Menumbuhkan sel pada botol Roux. Pengambilan gambar.
	Mengambil sampel 5 ml setiap botol (0 jam post inaktivasi) .	24 - 5 - 1984	Menumbuhkan sel pada botol Roux. Pengambilan gambar.
	Titrasi sampel 48 jam inkubasi .	25 - 5 - 1984	Menumbuhkan sel pada botol Roux. Pengambilan gambar.
	Titrasi sampel 0 jam post inaktivasi .	26 - 5 - 1984	Titrasi ulang.
	Mengambil sampel 5 ml setiap botol (12 jam post inaktivasi) .	27 - 5 - 1984	Titrasi ulang.
	Mengambil sampel 5 ml setiap botol (24 jam post inaktivasi) .	28 - 5 - 1984	Titrasi ulang.
984	Titrasi sampel 12 jam post inaktivasi.		Pembacaan hasil titrasi tanggal 26 - 5 - 1984. Pengambilan gambar.
	Titrasi sampel 24 jam post inaktivasi.	29 - 5 - 1984	Titrasi ulang.
	Menumbuhkan sel pada Roux.		Pembacaan hasil titrasi tanggal 27 - 5 - 1984. Pengambilan gambar.
	Mengambil sampel 5 ml setiap botol (36 jam post inaktivasi) .	30 - 5 - 1984	Titrasi ulang.
984	Titrasi sampel 36 jam post inaktivasi.		Pembacaan hasil titrasi tanggal 28 - 5 - 1984. Pengambilan gambar.
	Pembacaan hasil titrasi tanggal 17 - 5 - 1984.	31 - 5 - 1984	Titrasi ulang.
984	Pembacaan hasil titrasi tanggal 18 - 5 - 1984.		Pembacaan hasil titrasi tanggal 29 - 5 - 1984.
984	Pembacaan hasil titrasi tanggal 19 - 5 - 1984.	1 - 6 - 1984	Menumbuhkan sel pada botol Roux.
	Pembacaan hasil titrasi tanggal 20 - 5 - 1984.		Penipisan ulang.

TANGGAL	KEGIATAN
2 - 6 - 1984	Menumbuhkan sel pada botol Roux. Menipiskan ulang.
3 - 6 - 1984	Menumbuhkan sel pada botol Roux. Menipiskan ulang.
4 - 6 - 1984	Menumbuhkan sel pada botol Roux. Menipiskan ulang.
5 - 6 - 1984	Menumbuhkan sel pada botol Roux. Menipiskan ulang.
6 - 6 - 1984	Titrasi ulang.
7 - 6 - 1984	Titrasi ulang.
8 - 6 - 1984	Titrasi ulang. Pembacaan hasil titrasi tanggal 6 - 6 - 1984.
9 - 6 - 1984	Titrasi ulang. Pembacaan hasil titrasi tanggal 7 - 6 - 1984.
10 - 6 - 1984	Titrasi ulang. Pembacaan hasil titrasi tanggal 8 - 6 - 1984.
11 - 6 - 1984	Titrasi ulang. Pembacaan hasil titrasi tanggal 9 - 6 - 1984. Pengambilan gambar.
12 - 6 - 1984	Pembacaan hasil titrasi tanggal 10 - 6 - 1984. Pengambilan gambar.
13 - 6 - 1984	PERBANDINGAN EFEKTIVITAS FORMALIN ... 6 - 1984 Pengambilan gambar.