



FARMAKOPE OBAT HEWAN INDONESIA

**JILID 1
(SEDIAAN BIOLOGIK)**

EDISI 5

**DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
KEMENTERIAN PERTANIAN REPUBLIK INDONESIA
2018**



FARMAKOPE OBAT HEWAN INDONESIA

JILID 1
(SEDIAAN BIOLOGIK)

EDISI 5

DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
KEMENTERIAN PERTANIAN REPUBLIK INDONESIA
2018

Farmakope Obat Hewan Indonesia

(Sediaan Biologik) Edisi 5

Penulis :

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH)

ISBN : 978-623-91394-1-4

Katalog Dalam Terbitan (KDT). Kementerian Pertanian RI

615.371
IND
f

Indonesia Kementerian Pertanian RI

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH).
Farmakope Obat Hewan Indonesia Sediaan Biologik, Jilid 1, Edisi 5/
Tim Penyusun: BBPMSOH.
Bogor : BBPMSOH, 2018
ix, 209 hlm.; ill.; 30 cm

ISBN : 978-623-91394-1-4 (jil.1)

ISBN : 978-623-91394-0-7 (no.jil.lengkap)

I. VACCINE-ANIMAL DISEASES

1. Judul

Penerbit:

BBPMSOH

Redaksi:

Jln. Raya Pembangunan, Gunungsindur,
Kecamatan Gunungsindur, Kabupaten Bogor 16340

Tel +621 7560489

Fax +621 7560466

Email: bbpmsoh@pertanian.go.id

Cetakan pertama, Desember 2018

Hak cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memeprobanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun tanpa ijin
tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kepada Allah SWT, karena atas rahmatNya buku Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 4 Tahun 2013 serta Suplemen Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 4 Tahun 2015 telah selesai direvisi dan diterbitkan menjadi Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 Tahun 2018.

Perkembangan teknologi obat hewan meningkat sangat pesat. Hal ini dapat dilihat dari semakin meningkatnya jenis dan jumlah produk obat hewan yang didaftarkan di Indonesia. Untuk mengimbangi perkembangan tersebut maka perlu perlu untuk melakukan perbaikan Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid 1 (Sediaan Biologik). Farmakope ini sangat penting dalam memenuhi kebutuhan adanya suatu standar atau pedoman yang sifatnya mengikat terutama yang berkaitan dengan spesifikasi bahan baku, metode pembuatan dan pengujian sampai pada persyaratan dan spesifikasi obat jadi sediaan biologik yang dibuat dan diedarkan di Indonesia.

Dalam sejarahnya Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid 1 (Sediaan Biologik) Edisi 1 diterbitkan pertama kali pada tahun 1997, Edisi 2 pada tahun 2004, Edisi 3 pada tahun 2007, Edisi 4 pada tahun 2013, Suplemen Edisi 4 tahun 2015 dan perbaikan kembali pada Edisi 5 tahun 2018. Dalam melakukan revisi, selalu digunakan referensi-referensi seperti *OIE Terrestrial Manual: Requirements for Vaccines and Diagnostic Biological*, *British Pharmacopoeia*, metode uji yang sudah divalidasi dan lain-lain.

Atas perkembangan tersebut Kementerian Pertanian membentuk suatu Tim Penyiapan Naskah Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 Tahun 2018 dengan Surat Keputusan Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Nomor 11443/KPTS/OT.050/F/11/2018 tanggal 06 November 2018. Dengan adanya perbaikan farmakope diharapkan semua produk obat hewan sediaan biologik yang beredar di Indonesia menjadi semakin terjamin mutu dan keamanannya.

Untuk itu, kami mengucapkan terima kasih pada seluruh Tim Penyusun Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 Tahun 2018 dan kepada semua pihak yang telah membantu sehingga dapat diterbitkannya Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 ini.

Akhir kata, semoga Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 Tahun 2018 ini dapat dimanfaatkan sebaik-baiknya sebagai acuan metode pengujian dan standar mutu obat hewan sediaan biologik.

Jakarta, 20 Desember 2018

DIREKTUR JENDERAL PETERNAKAN

DAN KESEHATAN HEWAN


drh. I Ketut Dharma, MP
NIP. 19621231 198903 1 006



KEMENTERIAN PERTANIAN

DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN

KEPUTUSAN

DIREKTUR JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN

Nomor : 11443/Kpts/OT.050/F/11/2018

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PENYIAPAN NASKAH

FARMAKOPE OBAT HEWAN INDONESIA

JILID I (SEDIAAN BIOLOGIK) EDISI 5 TAHUN 2018

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA,

DIREKTUR JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN

- Menimbang : a. bahwa dalam rangka memberikan petunjuk teknis dalam pembuatan, penyediaan, peredaran, dan pengujian obat hewan telah disusun buku Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 4 Tahun 2013 dan Suplemen Pertama (I) Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 4 Tahun 2015;
- b. bahwa dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang obat hewan, diperlukan penyempurnaan dan perbaikan metode standar pengujian mutu obat hewan;
- c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan huruf b, perlu pembentukan Tim Penyusunan Naskah Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 Tahun 2018 oleh Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan.
- Mengingat : 1. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 41 Tahun 2014 Tentang Perubahan Atas Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2009 Tentang Peternakan Dan Kesehatan Hewan;
2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 18 tahun 2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan (Lembaran Negara RI Tahun 2009 Nomor 84, Tambahan Lembaran Negara Nomor 47);
3. Peraturan Pemerintah Nomor 15 Tahun 1977 tentang Penolakan, Pencegahan, Pemberantasan dan Pengobatan Penyakit Hewan (Lembaran Negara Tahun 1977 Nomor 20, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3509);
4. Peraturan Pemerintah Nomor 78 Tahun 1992 tentang Obat Hewan (Lembaran Negara Tahun 1992 Nomor 129, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3509);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 102 Tahun 2000 tentang Standar Nasional Indonesia (Lembaran Negara Tahun 2000 Nomor 199, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4020);
6. Peraturan Pemerintah Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara;

7. Peraturan Pemerintah Nomor 24 Tahun 2010 tentang Kedudukan, Tugas dan Fungsi Kementerian Negara serta Susunan Organisasi, Tugas dan Fungsi Eselon I Kementerian Negara;
8. Peraturan Menteri Keuangan Nomor 134/PMK.06/2005 tentang Pedoman Pembayaran dalam Pelaksanaan APBN;
9. Keputusan Menteri Pertanian No. 453/Kpts/TN.260/9/2000 tentang Obat Alami Untuk Hewan;
10. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 11/Permentan/OT.140/1/2007 tentang Susunan Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Pertanian;
11. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 12/Permentan/OT.140/1/2007 tentang Kelengkapan Susunan Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Pertanian.

MEMUTUSKAN:

Menetapkan :

KESATU : Membentuk Tim Penyiapan Naskah Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 Tahun 2018, yang selanjutnya dalam keputusan ini disebut Tim, dengan susunan keanggotaan sebagai berikut:

Pengarah:

1. Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan
2. Direktur Kesehatan Hewan

Penanggung Jawab:

1. Kepala Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
2. Kepala Sub Direktorat Pengawasan Obat Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan

Pelaksana:

- a. Ketua : drh. Emilia, M.Si
- b. Wakil Ketua : 1. drh. Hany Mucharini
2. drh. Cynthia Devy Irawati, MM
- c. Sekretaris : 1. drh. Lilis Sri Astuti
2. Muhammad Zahid, S.Si, Apt, M.Sc
- d. Tim Ahli : 1. Prof. Dr. drh. Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni, M.Si (FKH UGM)

2. Dr. drh. Agustin Indrawati, M.Biomed (FKH IPB)

3. drh. Ida Lestari Soedijar, M.Sc (Medik Veteriner Utama, Ditjen PKH)
4. drh. Surachmi Setyaningsih, Ph.D (FKH IPB)
5. drh. Nining Hartaningsih, MVSc, Ph.D

- e. Anggota : 1. drh. Istiyaningsih
2. Dr. drh. Abdul Rahman
3. Dr. drh. Ketut Karuni N. Natih, M.Si
4. drh. Nur Khusni Hidayanto, M.Sc
5. drh. Ramlah
6. drh. Dina Kartini
7. drh. Meutia Hayati

KEDUA : Tim Penyiapan Naskah Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 Tahun 2018 sebagaimana tersebut pada AMAR PERTAMA mempunyai tugas :

- a. Menyiapkan bahan yang diperlukan dalam rangka penyusunan naskah suplemen farmakope;
- b. Melakukan pengkajian dan rapat pembahasan naskah suplemen farmakope;
- c. Merumuskan hasil pengkajian dan hasil rapat pembahasan untuk disusun dalam naskah suplemen farmakope;
- d. Menyusun laporan hasil pelaksanaan tugasnya.

KETIGA : Segala biaya yang diperlukan berkenaan dengan tugas Tim Penyiapan Naskah Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 Tahun 2018 dibebankan pada anggaran DIPA Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan;

KEEMPAT : Apabila dipandang perlu untuk membantu kelancaran tugas Tim, Penanggungjawab dapat menunjuk Pembantu Tim sesuai dengan kebutuhan;

KELIMA : Keputusan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di : J a k a r t a

Pada Tanggal : 6 November 2018

DIREKTUR JENDERAL PETERNAKAN

DIV. KESEHATAN HEWAN



drh. I Ketut Dharma, MP

NIP. 19621231 198903 1 006

Salinan keputusan ini disampaikan kepada Yth.:

1. Kepala Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan;
2. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan - IPB;
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan - UGM;
4. Yang bersangkutan.



KEPUTUSAN DIREKTUR JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN

NOMOR : 5851/Kpts/PK.350/F/05/2019

TENTANG

PENETAPAN PEMBERLAKUAN

FARMAKOPE OBAT HEWAN INDONESIA

JILID I (SEDIAAN BIOLOGIK) EDISI 5 TAHUN 2018

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

DIREKTUR JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN,

- Menimbang : a. bahwa dengan Keputusan Direktur Jenderal Nomor 1245/Kpts/Lb.450/P/11/2013 telah ditetapkan Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 4 Tahun 2013;
- b. bahwa dalam rangka penyempurnaan standar atau pedoman terhadap metode atau cara pengujian mutu serta persyaratan spesifikasi bahan baku dan sediaan biologik obat hewan sesuai perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang obat hewan, telah diterbitkan Farmakope Obat Hewan Indonesia Edisi 5 Tahun 2018 sebagai revisi Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 4 Tahun 2013;
- c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan huruf b, perlu menetapkan pemberlakuan Farmakope Obat Hewan Indonesia Edisi 5 Tahun 2018.

- Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 84, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5015) sebagaimana telah diubah dengan Undang-Undang Nomor 41 Tahun 2014 tentang Perubahan atas Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2009 tentang

- Peternakan dan Kesehatan Hewan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 338, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5619);
2. Peraturan Pemerintah Nomor 78 Tahun 1992 tentang Obat Hewan (Lembaran Negara Tahun 1992 Nomor 129, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3509);
 3. Peraturan Pemerintah Nomor 47 Tahun 2014 Tentang Pengendalian Dan Penanggulangan Penyakit Hewan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 130, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5543);
 4. Peraturan Pemerintah Nomor 3 Tahun 2017 Tentang Otoritas Veteriner Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2017 Nomor 20, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 6019);
 5. Peraturan Presiden Nomor 7 Tahun 2015 tentang Organisasi Kementerian Negara (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2015 Nomor 8);;
 6. Peraturan Presiden Nomor 45 Tahun 2015 tentang Kementerian Pertanian (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2015 Nomor 85);
 7. Keputusan Presiden Nomor 100/TPA Tahun 2016 Tentang Pengangkatan dalam Jabatan Pimpinan Tinggi Madya di Lingkungan Kementerian Pertanian;
 8. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 43/Permentan/OT.110/8/2015 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Pertanian (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2015 Nomor 1243);

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : KEPUTUSAN DIREKTUR JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN TENTANG PENETAPAN PEMBERLAKUAN FARMAKOPE OBAT HEWAN INDONESIA EDISI 5 TAHUN 2018.

KESATU : Menetapkan pemberlakuan Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5 Tahun 2018 sebagai buku standar atau pedoman terhadap metode maupun cara pengujian mutu serta persyaratan spesifikasi bahan baku maupun produk jadi obat hewan;

KETIGA : Keputusan ini berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di: J a k a r t a

Pada Tanggal : 22 Mei 2019

DIREKTUR JENDERAL PETERNAKAN
DAN KESEHATAN HEWAN



KETUT DIARMITA

NIP. 19621231 198903 1 006

Salinan keputusan ini disampaikan kepada Yth.:

1. Menteri Pertanian;
2. Menteri Kesehatan;
3. Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan;
4. Ketua Umum Asosiasi Obat Hewan Indonesia;

DAFTAR ISI

Kata Pengantar.....	i
Surat Keputusan	ii
Daftar Isi	1
Daftar Lampiran.....	4
Penjelasan Umum	5
Monografi Umum	11
Daftar Singkatan.....	19
Daftar Perubahan	22
Monografi Individu	23
 I. Vaksin Bakteri	
A. Vaksin Bakteri Inaktif	
1. Vaksin Avibacterium paragalarinarum inaktif	27
2. Vaksin Bordetella bronchiseptica babi inaktif.....	29
3. Vaksin Brucella abortus (strain 45/20) inaktif.....	31
4. Vaksin Clostridium botulinum inaktif	33
5. Vaksin Clostridium novyi tipe B inaktif	35
6. Vaksin Clostridium perfringens inaktif.....	36
7. Vaksin Clostridium septicum inaktif.....	39
8. Vaksin Clostridium tetani inaktif	41
9. Vaksin Erysipelas babi inaktif.....	43
10. Vaksin Fowl cholera inaktif.....	45
11. Vaksin Haemorrhagic septicaemia inaktif	46
12. Vaksin Leptospira sp. inaktif	49
13. Vaksin Mycoplasma gallisepticum inaktif	51
14. Vaksin Mycoplasma hyopneumoniae inaktif	53
15. Vaksin Salmonella enteritidis inaktif.....	55
16. Vaksin Bordetella bronchiseptica anjing inaktif	57
B. Vaksin Bakteri Aktif	
1. Vaksin Anthrax aktif.....	59
2. Vaksin Brucella abortus (strain 19) aktif.....	61
3. Vaksin Brucella abortus (strain RB 51) aktif.....	63
4. Vaksin Contagious bovine pleuropneumonia aktif	65
5. Vaksin Bordetella bronchiseptica anjing aktif.....	66
6. Vaksin Mycoplasma gallisepticum aktif.....	67
7. Vaksin Mycoplasma synoviae aktif	69
 II. Vaksin Parasit	
Vaksin Coccidiosis unggas aktif.....	72

III. Vaksin Virus

A. Vaksin Virus Inaktif

1. Vaksin Aujeszky's inaktif.....	77
2. Vaksin Avian encephalomyelitis inaktif.....	79
3. Vaksin Avian influenza inaktif.....	80
4. Vaksin Bovine viral diarrhoea inaktif.....	82
5. Vaksin Canine infectious hepatitis virus inaktif.....	84
6. Vaksin Canine parvovirus inaktif.....	86
7. Vaksin Egg drop syndrome '76 inaktif.....	88
8. Vaksin Infectious bovine rhinotracheitis inaktif.....	89
9. Vaksin Infectious bronchitis inaktif.....	91
10. Vaksin Infectious bursal disease inaktif.....	93
11. Vaksin Newcastle disease inaktif.....	95
12. Vaksin Rabies inaktif.....	97
13. Vaksin Swollen head syndrome inaktif.....	99
14. Vaksin Viral arthritis inaktif.....	100

B. Vaksin Virus Aktif

1. Vaksin Aujeszky's aktif.....	102
2. Vaksin Avian encephalomyelitis aktif.....	104
3. Vaksin Bovine viral diarrhoea aktif.....	106
4. Vaksin Canine infectious hepatitis virus aktif.....	108
5. Vaksin Canine distemper aktif.....	110
6. Vaksin Canine parainfluenza aktif.....	112
7. Vaksin Canine parvovirus aktif.....	114
8. Vaksin Chicken anemia virus aktif.....	116
9. Vaksin Contagious pustular dermatitis aktif.....	117
10. Vaksin Feline calicivirus aktif.....	119
11. Vaksin Feline panleukopenia virus aktif.....	121
12. Vaksin Feline viral rhinotracheitis aktif.....	123
13. Vaksin Fowl pox aktif.....	125
14. Vaksin Hog cholera aktif.....	127
15. Vaksin Infectious bovine rhinotracheitis aktif.....	129
16. Vaksin Infectious bronchitis aktif.....	131
17. Vaksin Infectious bursal disease aktif.....	133
18. Vaksin Infectious laryngotracheitis aktif.....	136
19. Vaksin Marek's disease aktif.....	138
20. Vaksin Newcastle disease aktif.....	140
21. Vaksin Swollen head syndrome aktif.....	142
22. Vaksin Viral arthritis aktif.....	143

IV. Bahan Diagnostika	
1. Antigen Brucella abortus RBT	145
2. Antigen Brucella abortus SAT	147
3. Antigen Mycoplasma gallisepticum.....	149
4. Antigen Salmonella pullorum	151
Lampiran	153

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran I.	Pengujian Umum Sediaan Biologik.....	153
Lampiran II.	Uji Sterilitas Sediaan Biologik	154
Lampiran III.	Uji Kontaminasi <i>Mycoplasma</i> , <i>Salmonella</i> , <i>E.Coli</i> , <i>Fungi</i> , dan Jasad Renik Hidup Lain pada Vaksin Virus Aktif untuk Unggas.....	155
Lampiran IV.	Uji Kontaminasi <i>Mycoplasma</i> pada Vaksin Virus Aktif Non Unggas	157
Lampiran V.	Uji Biologis Antitoksin <i>Clostridium septicum</i>	158
Lampiran VI.	Penetapan Potensi Antitoksin	160
Lampiran VII.	Sterilisasi.....	161
Lampiran VIII.	Pemeriksaan Wadah.....	170
Lampiran IX.	Spektrofotometri, Kolorimetri, Turbidimetri, dan Nefelometri	183
Lampiran X.	Uji Kelembaban Sediaan Biologik.....	187
Lampiran XI.	Ayam <i>Specific Pathogen Free</i> (SPF)	188
Lampiran XII.	<i>Extraneous Pathogen Free</i> pada <i>Seed Lot</i> Virus Vaksin Unggas	192
Lampiran XIII.	<i>Extraneous Pathogen Free</i> pada <i>Batch</i> Produk Jadi Vaksin Virus Aktif Unggas.....	196
Lampiran XIV.	Uji Kualitas Media	203
Lampiran XV.	Uji Penentuan Angka Lempeng Total Bakteri.....	204
Lampiran XVI.	Pengembangan Produk Vaksin Hewan dengan Bioteknologi.....	207

PENJELASAN UMUM

Penjelasan umum memuat azas, batasan dan penjelasan yang dapat dijadikan petunjuk dasar untuk menafsirkan persyaratan prosedur pembakuan, cara pengujian dan persyaratan lain yang sering dijumpai dalam paparan, terutama paparan monografi yang berlaku untuk Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 5. Penjelasan umum dihimpun dengan maksud agar tidak perlu berulang kali menyebutkan lagi uraian tersebut dalam paparan monografi dan lampiran. Kadang-kadang dikehendaki penjelasan dalam paparan yang uraiannya agak berbeda dengan yang disebutkan dalam penjelasan umum.

1. Air

Air adalah air suling (akuades), kecuali dinyatakan dengan penjelasan lain.

2. Bagian

Bagian adalah bagian berat atau volume, kecuali dinyatakan lain.

3. Berat Atom dan Berat Molekul

Berat atom adalah berat atom yang tertera dalam daftar Berat Atom Internasional yang telah disahkan oleh *The International Union of Pure and Applied Chemistry* 2001. Berat molekul ditetapkan dengan pembulatan 2 angka di belakang koma.

4. Bobot tetap

Bobot tetap adalah zat yang telah dikeringkan, maksudnya bahwa perhitungan didasarkan pada zat yang telah dikeringkan menurut cara penetapan susut pengeringan yang tertera pada monografi yang bersangkutan.

5. Cemarkan Jasad Renik

Sediaan vaksin, antigen dan antisera tidak boleh mengandung jasad renik lain, selain yang dipergunakan untuk produksi.

6. Dosis

Dosis yang tertera dalam FOHI adalah dosis yang diberikan untuk hewan sesuai jenisnya yang tidak boleh dilampaui, kecuali dinyatakan lain dalam Monografi Individu dan dosis tersebut merupakan petunjuk yang mengikat.

7. Indikator

Indikator adalah jumlah larutan percobaan (LP) yang digunakan sebanyak 0,2 mL atau 3 tetes, kecuali dinyatakan dengan lain.

8. Kering Beku dan Vakum

“Kering beku dan vakum” adalah pengeringan yang didahului dengan pembekuan dan dilanjutkan dengan penghisapan udara sehingga produk jadi biologik dalam keadaan kering beku dan vakum, kecuali dinyatakan lain.

9. Kadaluwarsa

Kadaluwarsa dimaksud adalah batas waktu yang ditentukan sampai dengan tanggal yang dimaksud mutu dan kemurnian obat dijamin masih tetap memenuhi persyaratan minimum mutu, tanggal kadaluwarsa dinyatakan dalam tanggal, bulan, dan tahun.

10 Metode Sterilisasi

Metode sterilisasi digunakan untuk sediaan steril dilakukan seperti pada Lampiran VII. Metode/cara sterilisasi sediaan larutan air diutamakan dengan otoklaf. Metode sterilisasi yang lain disesuaikan dengan jenis sediaan sehingga menjamin sterilitas dan kualitas sediaan seperti persyaratan yang ditentukan.

11. Obat Hewan Baru

Obat hewan baru adalah obat hewan yang mengandung zat berkhasiat baru atau zat berkhasiat lama tetapi indikasinya baru atau mengandung kombinasi baru dari suatu zat berkhasiat lama atau formulasinya baru termasuk zat tambahannya atau zat berkhasiat lama dengan aplikasi baru.

12. Penafsiran Angka

Penafsiran angka yang tertera dalam FOHI, tergantung dari tingkat ketelitian yang dikehendaki.

Bilangan yang tidak merupakan batasan mempunyai ketelitian 0,05 ke bawah dan ke atas nilai satuan angka terakhir bilangan yang bersangkutan misalnya bilangan 10,0 mempunyai nilai antara 9,95 sampai 10,05.

Bilangan yang merupakan batasan mempunyai ketelitian sampai persepuluhan satuan angka terakhir bilangan yang bersangkutan misalnya pernyataan tidak kurang dari 99,5% dan tidak lebih dari 100,5% berarti tidak kurang dari 99,50% dan tidak lebih dari 100,50%.

13. Penandaan

Penandaan adalah pernyataan tertulis dari suatu sediaan biologik (vaksin, antigen, antisera) mengenai diskripsi, komposisi, indikasi, aplikasi, dosis, hewan target, waktu kadaluwarsa, nomor bets (*batch*), produsen, alamat produsen dan importir untuk sediaan impor.

14. Penangas Air

Penangas air adalah wadah untuk memanaskan air.

15. Penetes/Dropper

Penetes atau *dropper* adalah suatu alat yang digunakan sebagai penetes untuk suatu bahan cair yang volumenya telah distandarisasi.

16 Pengujian Mutu

Metode pengujian mutu yang terdapat dalam FOHI Jilid 1 (Sediaan Biologik) adalah metode resmi yang dapat memberikan hasil yang sesuai dengan persyaratan minimum yang ditetapkan bagi setiap *Master Seed Production*, bahan baku atau produk jadi sediaan biologik.

Metode pengujian mutu dengan cara lain dapat dilakukan dengan disertai bukti data yang dapat dijamin setidaknya tidaknya sama dengan metode resmi (FOHI) baik dalam ketelitian, ketepatan maupun selektifitasnya (divalidasi).

17. Penimbangan dan Pengukuran

- a. Pengertian “lebih kurang” adalah jumlah bahan yang diperlukan untuk produksi, pemeriksaan dan pengujian mutu. Dengan demikian jumlah yang harus ditimbang atau diukur tidak boleh kurang dari 90% dan tidak boleh lebih dari 110% dari jumlah yang tertera;
- b. Hasil produksi, pemeriksaan atau pengujian mutu didasarkan pada penimbangan atau pengukuran secara seksama, dengan pengertian bahwa penimbangan tidak lebih dari 0,1% dari jumlah yang ditimbang. Misalnya dengan pernyataan timbangan seksama 100 mg berarti bahwa batas kesalahan penimbangan tidak lebih dari 0,1 mg penimbangan seksama dapat juga dinyatakan dengan menambah angka 0 di belakang koma angka terakhir bilangan bersangkutan. Misalnya dengan pernyataan timbang 10,0 mg dimaksudkan bahwa penimbangan harus dilakukan dengan seksama;
- c. Pernyataan “ukur seksama” dimaksudkan bahwa pengukuran dilakukan dengan memakai pipet atau buret yang memenuhi syarat yang tertera pada bobot dan ukuran. Pengukuran seksama dapat juga dinyatakan dengan perkataan pipet atau dengan menambahkan angka 0 di belakang koma angka terakhir bilangan yang bersangkutan misalnya dengan pernyataan pipet 10 mL atau ukur 10,0 mL dimaksudkan bahwa pengukuran harus dilakukan dengan seksama.

18. Penyimpanan

- a. Semua *Master seed production*, zat bahan baku dan sediaan jadi biologik, harus disimpan sedemikian rupa sehingga perubahan karena cahaya atau kelembaban atau suhu sejauh mungkin dihindarkan;
- b. Bahan baku yang mudah menguap atau terurai dan bahan yang mengandung bagian yang mudah menguap atau terurai harus disimpan dalam wadah tertutup rapat, bahan baku yang mudah menyerap air harus disimpan dalam wadah tertutup kedap yang berisi kapur tohor, bahan baku yang dapat menyerap gas karbondioksida harus disimpan dengan pertolongan kapur tohor;
- c. Terlindung dari cahaya berarti bahan disimpan menurut ketentuan, misalnya disimpan dalam wadah yang buram atau botol yang dibuat dari kaca hitam, merah, coklat tua atau dibungkus dengan kertas hitam atau kertas lain yang tidak tembus cahaya;

- d. *Master Seed* bakteri dan virus harus disimpan dalam *deep freezer* -80°C, sedangkan produk jadi sediaan biologik dan bahan biologik lain seperti serum harus disimpan pada *refrigerator* 2°–8°C, kecuali dinyatakan lain;
- e. Disimpan pada suhu kamar, jika tidak disertai penjelasan lain, disimpan pada suhu antara 23°–27°C;
- f. Disimpan di tempat dingin, jika tidak disertai penjelasan lain, disimpan pada suhu antara 2°–8°C;
- g. Sediaan dalam bentuk cair tidak boleh disimpan dalam *freezer*, kecuali dinyatakan lain.

19. Pereaksi

Pengujian akan memberikan hasil yang memuaskan seperti ditetapkan monografi, jika pengujian dilakukan menggunakan pereaksi, pereaksi ini tidak dapat dijadikan persyaratan minimum.

20. Persen (%)

Persen (%) dinyatakan dengan salah satu dari empat cara berikut:

- a. % b/b (persen berat per berat) menyatakan jumlah g zat dalam 100 g bahan atau hasil akhir;
- b. % b/v (persen berat per volume) menyatakan jumlah g zat dalam 100 mL bahan atau hasil akhir;
- c. % v/v (persen volume per volume) menyatakan jumlah mL zat dalam 100 mL bahan atau hasil akhir;
- d. % v/b (persen volume per bobot) menyatakan jumlah mL zat dalam 100 g bahan atau hasil akhir.

21. Persyaratan Minimum dan Berlakunya Persyaratan Minimum

Semua paparan yang tertera dalam Monografi Umum ini kecuali yang akan disebutkan dalam Monografi Individu merupakan persyaratan minimum untuk komponen/zat aktif, bahan baku atau sediaan jadi yang bersangkutan. Komponen/zat aktif, bahan baku atau sediaan jadi tidak dapat dinyatakan bermutu sesuai FOHI jika tidak memenuhi syarat minimum tersebut. Persyaratan minimum yang tertera dalam FOHI berlaku untuk sediaan jadi dan bahan yang akan digunakan untuk keperluan produksi, tetapi tidak berlaku bagi bahan yang digunakan untuk keperluan lain yang dijual dengan nama sama.

22. Produk Bioteknologi Bidang Kesehatan Hewan

Produk bioteknologi bidang kesehatan hewan meliputi bahan biologik, farmasetik dan premiks yang dihasilkan melalui proses bioteknologi molekuler. Penjelasan produk bioteknologi terdapat dalam Lampiran XVI.

23. Produk Rekayasa Genetika

Produk rekayasa genetika merupakan bagian dari produk bioteknologi, adalah produk yang dihasilkan melalui proses manipulasi gen dari suatu mikroorganisme, yang dapat berupa *recombinant* dan *reverse genetic*.

24. Rumus Kimia

Rumus kimia suatu zat resmi adalah susunan kimia yang telah diketahui atau telah diterima secara umum. Rumus molekul dan berat molekulnya harus dicantumkan pada awal monografi. Rumus bangun zat kimia organik yang dicantumkan adalah rumus bangun yang telah diketahui atau telah diterima secara umum juga dicantumkan.

25. Suhu

Suhu dinyatakan dalam derajat Celcius (°C)

26. Tata Nama

Monografi ditulis berturut-turut nama latin dan nama Indonesia. Bagi *Master Seed Production* bakteri dan virus yang telah mempunyai nama latin disertai nama latinnya. Jika yang dimaksud komponen/zat aktif, maka namanya ditulis dengan permulaan huruf besar dan untuk nama yang terdiri dari dua kata atau lebih, setiap huruf permulaan kata ditulis dengan huruf besar, kecuali apabila kata yang kedua atau berikutnya hanya menyatakan sifat keterangan.

Nama komponen aktif atau *Master Seed Production* bakteri dan virus untuk produksi vaksin atau antigen atau antisera harus menyebutkan nama spesies, serotipe, dan strainnya.

Bentuk sediaan berupa larutan dalam air, vakum kering beku, *frozeen*, *oil adjuvant* harus dituliskan pada penandaan.

27. Timbangan

- a. Timbangan ada 3 jenis yaitu timbangan gram kasar, timbangan gram halus, dan timbangan milligram.
 1. Timbangan kasar daya beban antara 250 g – 1.000 g, dengan kepekaan 200 mg.
 2. Timbangan halus, daya beban antara 100 g – 250 g, dengan kepekaan 50 mg.
 3. Timbangan milligram daya beban antara 10 g – 50 g, dengan kepekaan 5 mg.
- b. Daya beban adalah berat maksimum yang boleh ditimbang dengan suatu timbangan tertentu, sedang yang dimaksud kepekaan adalah tambahan berat maksimum yang diperbolehkan pada salah satu piringan timbangan, setelah keduanya diisi dengan muatan maksimum.

28. Volume dosis

Volume dosis merupakan ukuran yang disesuaikan dengan kebutuhan dosis berdasarkan jenis hewan.

29. Wadah

- a. Wadah adalah tempat yang terbuat dari bahan yang tidak mempengaruhi isi yang disimpan di dalamnya baik secara kimia maupun secara fisika sehingga dapat mengakibatkan perubahan potensi mutu atau kemurniannya;
- b. Wadah tertutup rapat harus melindungi isinya terhadap masuknya bahan padat atau cair atau udara dari luar dan mencegah keluarnya produk pada waktu penanganan baik dalam waktu pembuatan, penyediaan dan peredaran;
- c. Wadah tertutup kedap harus melindungi isinya terhadap bahan padat atau cair atau udara dari luar dan mencegah kehilangan volume, pencairan dan penguapan pada waktu penanganan baik dalam waktu pembuatan, penyediaan dan peredaran. Keterangan lebih lanjut mengenai wadah dapat ditemukan dalam Lampiran VIII.

30. Zat/Komponen pada Sediaan Biologik

Komponen pada sediaan biologik adalah bahan aktif/ utama dan tambahan yang terkandung dalam sediaan biologik

31. Zat/Komponen Aktif

Zat/komponen aktif dalam sediaan biologik adalah *Master Seed Production* (MSP) dari bakteri atau virus yang digunakan dalam produksi sediaan biologik.

32. Zat Pewarna

Zat pewarna adalah suatu zat pewarna spesifik/khusus yang digunakan untuk menformulasikan sediaan, kecuali dinyatakan lain.

33. Zat Tambahan pada Sediaan Biologik

Zat tambahan adalah zat yang dimaksudkan untuk mempertinggi kegunaan, kemantapan, keawetan dan sebagai zat warna dapat ditambahkan baik pada produk jadi maupun produk antara, kecuali dalam monografi dinyatakan lain. Jumlah zat tambahan yang digunakan tidak boleh membahayakan dan harus aman, tidak boleh mengganggu dan atau mengurangi khasiat obat dan tidak boleh mengganggu pemeriksaan dan pengujian mutu.

MONOGRAFI UMUM

Vaksin hewan adalah vaksin yang digunakan untuk hewan dan menjadi pokok bahasan dan monografi pada FOHI Jilid I (Sediaan Biologik) ini. Persyaratan umum dirangkum pada uraian berikut: apabila suatu monografi dihubungkan pada flock ayam *Specific Pathogen Free* (SPF) maka flock tersebut harus sesuai dengan persyaratan flock ayam SPF untuk produksi dan kontrol kualitas dari vaksin-vaksin yang dijelaskan pada bagian akhir monografi ini.

1. Vaksin hewan

Vaksin hewan adalah sediaan yang mengandung bahan antigen dan digunakan untuk memicu kekebalan aktif dan spesifik melawan penyakit yang disebabkan oleh bakteri, toksin, virus, jamur atau parasit. Vaksin, baik aktif maupun inaktif menurunkan imunitas aktif yang mungkin diturunkan secara pasif melalui antibodi maternal melawan agen penyakit yang ada di dalam tubuh makhluk hidup dan kadang-kadang juga melawan antigen.

Vaksin bersifat aktif atau inaktif mengandung bakteri, virus, fungi, parasit, fraksi, antigen atau bahan-bahan yang diproduksi olehnya dan tidak mengakibatkan penyakit sewaktu mengeluarkan sebagian atau seluruh sifat antigeniknya. Vaksin dapat mengandung kombinasi dari komponen ini. Antigen dapat diproduksi oleh teknologi DNA rekombinan. Adjuvan yang sesuai dapat ditambahkan untuk meningkatkan sifat penguatan dari vaksin.

2. Vaksin Bakteri

Vaksin bakteri dibuat dari biakan yang ditumbuhkan pada media padat atau cair, atau dengan cara lain yang sesuai. Vaksin ini mengandung bakteri inaktif atau bakteri aktif atau komponen antigeniknya. Identitas, potensi antigenik dan kemurnian dari masing-masing biakan yang digunakan harus diuji dengan seksama.

Komponen vaksin aktif atau inaktif kekeruhannya dinyatakan dengan satuan internasional dan kekeruhan atau apabila memungkinkan ditentukan dengan cara jumlah bakteri atau jumlah kandungan sel dengan metode lain yang sesuai. Untuk vaksin mengandung adjuvan, perhitungan tersebut dilakukan pada saat pembuatan ditambah adjuvan.

3. Vaksin Bakteri Inaktif

Vaksin bakteri inaktif mengandung bakteri atau komponen imunogenik yang telah diinaktifkan atau berupa toksoid dimana toksisitas bakterinya sudah dikurangi sampai pada tingkat yang aman atau dihilangkan secara fisik atau secara kimia tanpa merusak sifat antigeniknya. Vaksin tersebut di atas diperoleh dari galur bakteri spesifik yang dibiakkan pada media yang sesuai. Vaksin dapat berupa cairan yang dapat diendapkan dengan aluminium fosfat, aluminium hidroksida, kalsium fosfat, *adsorbant* lainnya tertera pada monografi.

4. Vaksin Bakteri Aktif

Vaksin bakteri aktif dapat dibuat dari bakteri galur ganas, yang keganasan dikurangi atau dari galur alami yang patogenitasnya rendah tetapi mampu menstimulasi kekebalan terhadap galur patogen atau galur patogen dari bakteri yang sama atau spesies bakteri yang mempunyai hubungan antigenik.

5. Vaksin Virus

Vaksin virus dibuat dari virus atau komponen antigeniknya yang dibuat dengan cara ditumbuhkan pada biakan jaringan, mikroorganisme, TAB, atau hewan hidup lainnya atau dengan cara lain yang sesuai. Bentuk sediaan dapat berupa cairan atau kering beku yang terdiri dari 1 atau lebih virus atau sub unit viral atau peptidanya. Vaksin virus dapat bersifat aktif atau inaktif.

6. Vaksin Virus Inaktif

Vaksin virus inaktif mengandung virus yang telah diinaktifkan sedemikian rupa atau komponen antigenik sehingga imunogenisitasnya tetap dipertahankan.

7. Vaksin Virus Aktif

Vaksin virus aktif dibuat dari galur virus yang spesifik yang keganasannya dilemahkan atau dari virus alami yang patogenitasnya rendah tetapi dapat menimbulkan rangsangan kekebalan terhadap galur patogen dari virus yang sama atau spesies virus yang mempunyai hubungan antigenik.

8. Vaksin Kombinasi

Vaksin kombinasi adalah vaksin yang mengandung dua atau lebih mikroorganisme. Bila ada monografi untuk vaksin kombinasi maka disesuaikan dengan persyaratan FOHI untuk komponen vaksin tunggal.

9. Vaksin Vektor

Vaksin vektor adalah vaksin yang terdiri dari satu atau lebih tipe mikroorganisme (bakteria atau virus) yang bersifat non patogenik atau patogenitasnya rendah yang telah dimasuki oleh satu atau lebih gen penyandi antigen yang mampu menstimulasi respon kekebalan. Bentuk sediaan vaksin vektor bisa cair atau kering beku.

10. Antigen

Antigen adalah substansi yang dapat menimbulkan respon imun spesifik dan dapat bereaksi dengan produk yang meresponnya, contoh dengan antibodi spesifik atau T limfosit spesifik yang telah disensitisasi atau keduanya. Antigen disingkat dengan Ag.

11. Seed-lot System

Seed-lot system merupakan suatu sistem produksi dimana *batch* yang diproduksi berasal dari *master seed lot* yang sama. Untuk produksi rutin, *working seed lot* disiapkan dari *master seed lot*. Asal dan sejarah pasase *master seed lot* dan *working seed lot* harus terdokumentasi.

12. Master Seed Lot

Biakan mikroorganisme didistribusikan dari satu ruahan (*single bulk*) ke dalam wadah dan diproses dalam satu pengerjaan untuk memastikan keseragaman, stabilitas dan mencegah kontaminasi. *Master seed lot* dalam bentuk cair umumnya disimpan dibawah atau pada -80°C . *Master seed lot* kering beku disimpan pada suhu yang sesuai untuk mempertahankan kestabilannya.

13. Working Seed Lot

Biakan mikroorganisme berasal *master seed lot* yang telah dipasase dan diperuntukkan untuk produksi. *Working seed lot* disimpan dalam wadah pada suhu penyimpanan sesuai dengan suhu penyimpanan *master seed lot*.

14. Cell-bank system (Cell-seed system)

Suatu sistem produksi dimana *batch* yang diproduksi dengan cara dibiakkan pada biakan sel yang berasal dari *master cell bank (master cell seed)* yang sama. Beberapa wadah *master cell bank (master cell seed)* digunakan untuk menyiapkan *working cell bank (working cell seed)*. *Cell-bank system (cell-seed system)* divalidasi dengan menggunakan tingkat pasase tertinggi pada saat produksi rutin.

15. Master cell bank (Master cell seed)

Biakan sel yang disimpan dalam beberapa wadah, diproses dalam satu pengerjaan untuk memastikan keseragaman, stabilitas, dan mencegah kontaminasi. *Master cell bank (master cell seed)* umumnya disimpan pada -80°C atau lebih.

16 Working cell bank (Working cell seed)

Biakan sel yang berasal dari *master cell bank (master cell seed)* yang diperuntukkan untuk persiapan produksi biakan sel. *Working cell bank (working cell seed)* disimpan dalam wadah, diproses dan disimpan sebagaimana *master cell bank (master cell seed)*.

17. Biakan Jaringan (Tissue Culture)

Biakan jaringan merupakan proses yang kompleks dimana sel atau jaringan ditumbuhkan pada kondisi yang terkontrol. Pada prakteknya istilah “biakan jaringan” lebih mengarah pada biakan jaringan yang berasal dari *multi-cellular eukaryotes*, khususnya sel hewan.

18. Biakan Sel Primer (Primary Cell Cultures)

Biakan sel yang dihasilkan dari proses *trypsination* jaringan atau organ. Identifikasi asal jaringan harus diketahui dan pasase *in vitro* dari jaringan awal tidak boleh lebih dari 5 kali pasase.

19. Sel Lestari (*Cell lines*)

Sel lestari adalah sel yang mempunyai kemampuan tinggi untuk mutipikasi secara *in vitro*, bersifat diploid, dan harus memiliki karakteristik yang sama dengan jaringan asal.

20. Produksi Biakan Sel

Biakan sel yang digunakan untuk produksi atau pengujian, dapat berasal dari satu atau lebih wadah *working cell bank (working cell seed)* atau berasal dari biakan sel primer.

21. Peringatan

- a. Pembuatan dan pengujian produk biologik berkaitan dengan mikroorganisme yang patogen terhadap manusia diperlukan cara yang tepat untuk memperkecil resiko infeksi atau intoksikasi pada pekerja dan pencemaran terhadap lingkungan;
- b. Pernyataan peringatan dicantumkan dalam Monografi Individu tertentu dimana pada pembuatan atau pengujian produk tersebut dapat menimbulkan bahaya tertentu;
- c. Untuk vaksin inaktif bentuk emulsi minyak jika terjadi kecelakaan penyuntikan dapat menyebabkan reaksi lokal yang serius terhadap manusia (pekerja). Kecelakaan tersebut harus diinformasikan kepada dokter yang berwenang dan diberitahukan bahwa vaksin berbentuk emulsi minyak.

22. *Phenol* (Fenol)

Untuk vaksin yang mengandung fenol sebagai bahan pengawet dengan jumlah tidak lebih dari 0,5% b/v yang ditentukan dengan metode sebagai berikut:

- a. Sediaan yang akan diperiksa dicampur sampai homogen larutkan sejumlah vaksin dengan air untuk mendapatkan larutan fenol 0,0015 % b/v yang mengandung 5 mL dari larutan yang diperoleh;
- b. Lima mL *borate buffer* pH 9,0, 5 mL larutan aminopenozon dan 5 mL larutan *potassium hexacyanoferrate* (III) ditambahkan, didiamkan 10 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang 546 nm (Lampiran IX);
- c. Kandungan fenol dari adsorbansi yang diperoleh dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi yang dibuat dengan mengulang penggunaan 5 mL dari masing-masing serial dari larutan baku (referensi) yang mengandung fenol 0,005; 0,0010; 0,0020 dan 0,0030% b/v secara berurutan.

23. *Formaldehyde* (formaldehid)

Untuk toksoid bakteri yang mengandung formaldehid tidak lebih dari 0,05% b/v formaldehid bebas digunakan uji A walaupun tidak tertera pada monografi. Gunakan uji B pada vaksin-vaksin yang menggunakan sodium metadisulfit untuk menetralkan formaldehid yang berlebihan.

- a. Ke dalam 1 mL pengenceran 25 kali bahan yang diperiksa dimasukkan 4 mL dan 5 mL reagen asetilaseton. Tabung diletakkan dalam *waterbath* pada suhu 40°C selama 40 menit. Larutan warnanya tidak lebih tua dibanding dengan larutan baku (referensi) yang dibuat pada saat bersamaan dan dengan cara yang sama dengan menggunakan 1 mL larutan yang mengandung 0,0020% formaldehid. Formaldehid di dalam larutan yang diperiksa dibuat perbandingan dengan memeriksa tabung yang diletakkan secara vertikal;
- b. Pada 0,5 mL pengenceran 100 kali dari larutan yang diperiksa ditambahkan 5 mL 0,05% b/v larutan 3 *methylbenzothiazoline 2-1 hydrazone hydrochlorida* dan 0,05 mL *polysorbate* 80, tabung ditutup, dikocok dan didiamkan 60 menit. Satu mL larutan asam *iron (III) chloridesulphanic* ditambahkan dan didiamkan selama 15 menit (larutan A). Larutan B dibuat dengan cara yang sama seperti pada larutan A tetapi dengan menggunakan 0,5 mL air pada tempat dimana bahan akan diperiksa. Serapan larutan A diukur pada 628 nm (Lampiran IX) menggunakan larutan B pada sel baku referensi, serapan tidak melebihi larutan referensi / baku yang dibuat pada waktu dan cara yang sama dengan menggunakan 0,5 mL larutan yang mengandung 0,0005% b/v formaldehid;
- c. Jika sediaan yang akan diuji bentuk emulsi maka dipisahkan fase airnya dengan metode sebagai berikut:

Isoprophyl myristate ditambahkan dengan volume sama ke dalam vaksin dan dicampur, pada 3 volume campuran ditambahkan 2 volume 1 M HCl, 3 volume kloroform dan 4 volume 0,9% b/v larutan NaCl dan dicampur sampai merata. Campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 15.000 G selama 60 menit, kemudian fase air dipisahkan dan ukur volumenya dengan menggunakan 0,5 mL enceran 100 kali dari fase air dan lakukan dengan prosedur tersebut di atas. Konsentrasi formaldehid dari larutan pembanding diatur untuk pengenceran vaksin selama fase pemisahan. Jika prosedur yang di jelaskan tersebut di atas gagal untuk memisahkan fase air, maka ditambahkan 10% b/v *polysorbate* 20 ke dalam larutan *sodium chloride* dan prosedur di atas diulangi tetapi disentrifus pada 22.500 G.

24. Pengujian Umum

Semua vaksin harus dilakukan pengujian umum yang terdiri dari uji fisik, kemurnian, kevakuman, kelembaban, sterilitas dan uji kontaminasi (*Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain), kecuali jika disebutkan lain dalam Monografi Individu vaksin.

25. Uji Fisik, Kemurnian dan Kevakuman

Semua vaksin harus dilakukan uji fisik, kemurnian, kevakuman dan kelembaban dengan metode persyaratan seperti pada Lampiran I, kecuali jika disebutkan lain dalam Monografi Individu vaksin

26. Uji Kelembaban Sediaan Biologik

Semua vaksin bentuk kering beku dilakukan uji kelembaban dengan metode seperti Lampiran X, kecuali dinyatakan lain dalam Monografi Individu vaksin.

27. Uji Sterilitas dan Kontaminasi

Kecuali jika tidak disebutkan dalam Monografi Individu vaksin, selain vaksin bakteri hidup harus dilakukan uji sterilitas seperti pada Lampiran II, jika memungkinkan dilakukan sentrifugasi terlebih dahulu terutama apabila volume di dalam wadah lebih dari 1.000 mL dengan modifikasi sebagai berikut:

Kecuali jika tidak dijelaskan di dalam monografi, media diinkubasikan selama tidak kurang dari 14 hari pada 30°-37°C pada uji yang dimaksudkan untuk mendeteksi bakteri, sedangkan pada 20°-25°C pada uji yang dimaksud untuk mendeteksi *fungi*, jumlah sesuai yang digunakan untuk uji sediaan injeksi kecuali jumlah dari tiap wadah berupa cairan 20 mL atau lebih, jumlah minimum yang digunakan untuk masing-masing medium adalah 10% dari isinya atau 5 mL apabila tidak cukup.

Kecuali apabila tidak disebut pada monografi maka vaksin bakteri harus diuji sterilitas (Lampiran II) dengan modifikasi tambahan sebagai berikut. Media padat dan media cair untuk menunjukkan atau menghitung *extraneous* bakteri atau *fungi* yang terkandung dalam produk. Media yang dipilih akan tergantung pada sifat produk yang diuji, isi wadah yang disegel dan sediaan yang akan diuji, bagian-bagian dari larutannya sebaiknya diinokulasi pada permukaan media. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika tidak ada mikroorganisme yang tumbuh, kecuali jika dinyatakan lain pada Monografi Individu.

Kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain untuk vaksin virus aktif unggas kecuali jika tidak disebutkan di dalam monografi maka vaksin virus aktif untuk unggas dilakukan uji bebas dari kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain dengan metode seperti pada Lampiran III.

28. *Mycoplasma*

Vaksin virus aktif non unggas dilakukan uji bebas kontaminasi *Mycoplasma* dengan metode seperti pada Lampiran IV, kecuali jika dinyatakan lain dalam Monografi Individu.

29. *Extraneous Pathogen Free*

- a. Pengujian-pengujian perlu dilakukan untuk memastikan bahwa pada produk akhir vaksin tidak mengandung agen *extraneous pathogen*. Pengujian ini dilakukan pada:
 - saat produksi *seed-lot system* dan *cell-seed system*, jika memungkinkan;
 - *seed lots* dan *cell seed*. Uji *extraneous pathogen free* pada *seed lot* untuk vaksin unggas terdapat dalam Lampiran XII;
 - persyaratan flock SPF untuk bahan-bahan produksi vaksin;
 - bahan-bahan yang berasal dari hewan.

b. *Extraneous Pathogen Free* Vaksin Aktif Non Unggas

Pengujian *extraneous pathogen free* pada vaksin virus aktif vaksin non unggas dilakukan uji sebagai berikut:

Vaksin dinetralisasi dengan anti serum spesifik tidak menimbulkan efek sitopatik pada biakan jaringan yang diketahui sensitif terhadap patogen bagi spesies dimana vaksin tersebut digunakan, kecuali dinyatakan lain dalam Monografi Individu.

c. *Extraneous Pathogen Free* Vaksin Aktif untuk Unggas

Pengujian *extraneous pathogen free* pada vaksin aktif untuk unggas terdapat dalam Lampiran XIII.

30. Uji Keamanan

a. Pada umumnya uji keamanan untuk vaksin inaktif disuntikkan 2 dosis dan vaksin aktif disuntikkan 10 dosis pada hewan target sesuai dengan rute yang direkomendasikan, kecuali dinyatakan lain dalam monografi individu. Amati selama tidak kurang dari 7 hari. Tidak boleh ada reaksi abnormal yang timbul.

b. Uji keamanan yang tidak menggunakan hewan target disebut juga uji toksisitas abnormal. Uji dapat dilakukan sebagai berikut 5 ekor mencit berat 17–24 g masing-masing disuntik 0,5 dosis vaksin tidak lebih dari 0,5 mL cara IP atau 2 ekor marmot berat 300-500 g disuntik 1 dosis vaksin tidak lebih dari 5,0 mL 2 mL secara IP atau SC, kecuali dinyatakan lain dalam monografi individu. Pengamatan dilakukan selama 7 hari. Jika terdapat lebih dari 1 hewan yang mati atau menunjukkan gejala sakit maka vaksin tidak lulus uji. Jika terdapat satu ekor hewan mati atau memperlihatkan gejala sakit dalam periode pengamatan maka uji harus diulang.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat bila semua marmot tetap hidup dari ke-2 kelompok atau tidak menunjukkan gejala sakit dalam waktu 7 hari.

31. Pengujian Partikel Asing

Pada setiap monografi tidak mungkin diberikan cara pengujian untuk menunjukkan adanya partikel asing, oleh karena itu dapat dipahami bahwa adanya partikel asing yang tidak berasal dari komposisi resmi akan mengakibatkan suatu penyimpangan dari persyaratan minimum.

Pembuktian penyimpangan ini dapat dilakukan dengan suatu metode ilmiah yang diakui, baik metode yang tertera dalam FOHI maupun referensi lain.

32. Potensi

Potensi vaksin ditentukan dengan menggunakan metode yang tertera pada masing-masing Monografi Individu. Vaksin menyesuaikan dengan level *immune respon specific* pada monografi individu atau untuk vaksin campuran harus sesuai dengan level spesifik dari masing-masing individu komponen dalam monografi.

33. Penyimpanan

Vaksin harus terlindung dari cahaya dan disimpan pada suhu antara 2°-8°C, kecuali dinyatakan lain misalnya vaksin Marek's bentuk *frozen* disimpan dalam nitrogen cair atau vaksin *Contagious Bovine Pleuropneumonia* aktif sediaan kering beku disimpan pada -20°C. Sediaan berupa larutan tidak boleh disimpan dalam *freezer*, kecuali dinyatakan lain.

34. Penandaan/etiket

Pada penandaan/etiket agar dicantumkan:

- a. Dosis dan aplikasi yang direkomendasikan untuk masing-masing spesies hewan target
- b. Vaksin bentuk larutan dicantumkan volume larutan, sedangkan untuk vaksin kering beku dicantumkan jumlah dosis dalam kemasan
- c. Pelarut vaksin kering beku harus steril dan vaksin harus segera digunakan setelah dilarutkan
- d. Waktu kadaluwarsa
- e. Nomor lot/bets (*batch*)
- f. Nomor Registrasi Kementerian Pertanian
- g. Suhu penyimpanan
- h. Komposisi zat aktif spesies, tipe/serotipe, *strain*/galur bakteri atau virus yang dipergunakan untuk produksi vaksin
- i. Nama dan jumlah bahan preservatif atau zat tambahan lainnya
- j. Nama bahan yang dapat menyebabkan reaksi efek samping
- k. Indikasi
- l. Kontra indikasi
- m. Bentuk sediaan

35. Ayam *Specific Pathogen Free* (SPF)

Ayam SPF adalah ayam yang bebas dari beberapa penyakit tertentu seperti yang diuraikan dalam Lampiran XI dan dipelihara dalam kondisi/ syarat tertentu.

DAFTAR SINGKATAN

ABSL	<i>Animal Biosafety Level</i>
AGPT	<i>Agar Gel Precipitation Test</i>
ALT	Angka Lempeng Total
AMPT	<i>Active Mouse Protection Test</i>
BSC	<i>Biosafety Cabinet</i>
BSL	<i>Biosafety Level</i>
CAM	<i>Chorio Allantoic Membrane</i>
CCU	<i>Colour Changing Unit</i>
CEF	<i>Chicken Embryo Fibroblast</i>
CFT	<i>Complement Fixation Test</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CPE	<i>Cytopathic Effect</i>
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
EID ₅₀	<i>Egg infective dose</i> (dosis mikroorganisme yang menyebabkan infeksi pada 50% telur berembrio yang diinokulasi)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAAS	<i>Flame Atomic Absorbtion Spectrophotometry</i>
FAT	<i>Fluorescent Antibody Test</i>
GMT	<i>Geometric Mean Titre</i>
g	Gram
HA	<i>Haemagglutination</i>
HAU	<i>Haemagglutination Unit</i>
HI	<i>Haemagglutination Inhibition</i> atau Hambatan Aglutinasi
IC	<i>Intracerebral</i>
ID ₅₀	<i>Infective dose 50</i> (dosis mikroorganisme yang menyebabkan infeksi pada 50% hewan yang diinokulasi). Misalnya: EID ₅₀ (<i>Egg infective dose 50</i>) CID ₅₀ (<i>Chicken infective dose 50</i>) MID ₅₀ (<i>Mice infective dose 50</i>)
IFAT	<i>Indirect Fluorescent Antibody Technique</i>
IM	<i>Intramuscular</i>
IP	<i>Intraperitoneal</i>

Daftar Singkatan

IU	<i>International Unit</i>
IV	<i>Intravena</i>
LD ₅₀	<i>Lethal dose 50</i> (dosis dari sediaan atau organism yang menyebabkan kematian pada 50% hewan yang diinokulasi). Misalnya: ELD ₅₀ (<i>Egg Lethal dose 50</i>) CLD ₅₀ (<i>Chicken Lethal Dose 50</i>) MLD ₅₀ (<i>Mice Lethal Dose 50</i>)
MID	<i>Minimum Infective Dose</i>
mL	Milliliter
MLD	<i>Minimum Lethal Dose</i>
mm	Millimeter
O-PS	O-polisakarida
nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD50	<i>Protective dose 50</i> (Dosis vaksin, yang dalam kondisi uji, diharapkan untuk memberikan kekebalan terhadap 50% hewan yang digunakan terhadap dosisantang mikroorganisme dalam kondisi aktif)
PFU	<i>Pock-forming units</i> atau <i>plaque-forming units</i>
PMPT	<i>Passive Mouse Protection Test</i>
PO	<i>Per Oral</i>
PRG	Produk Rekayasa Genetik
RBT	<i>Rose Bengal Test</i>
rRT-PCR	<i>realtime Reverse Transcriptase – PCR</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase – PCR</i>
SAN	<i>Specific Antibody Negative</i>
SAT	<i>Serum Agglutination Test</i>
SC	<i>Subcutan</i>
SN	<i>Serum Neutralization</i>

SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
TCID ₅₀	<i>Tissue culture infective dose</i> (dosis mikroorganisme yang menyebabkan infeksi pada 50% kultur sel atau jaringan yang diinokulasi)
VLP	<i>Virus Like Particle</i>
VN	<i>Virus Neutralization</i>

DAFTAR PERUBAHAN

KETENTUAN UMUM

DIHAPUS (FOHI Jilid 1 Edisi 4)	TAMBAHAN BARU (FOHI Jilid 1 Edisi 5)
Tidak ada	Tidak ada

MONOGRAFI UMUM

DIHAPUS (FOHI Jilid 1 Edisi 4)	TAMBAHAN BARU (FOHI Jilid 1 Edisi 5)
Produksi (Nomor 20)	Tidak ada

MONOGRAFI INDIVIDU

DIHAPUS (FOHI Jilid 1 Edisi 4)	TAMBAHAN BARU (FOHI Jilid 1 Edisi 5)
- Subbagian tentang produksi di setiap metode pengujian Vaksin - Vaksin Jembrana disease inaktif	- Vaksin <i>Bordetella Bronchiseptica</i> Anjing Inaktif. - Vaksin <i>Bordetella Bronchiseptica</i> Anjing Aktif. - Uji Vaksin <i>Mycoplasma Synoviae</i> Aktif.

SEBELUMNYA (FOHI Jilid 1 Edisi 4)	PERUBAHAN (FOHI Jilid 1 Edisi 5)
Tidak ada	Tidak ada

LAMPIRAN

DIHAPUS (FOHI Jilid 1 Edisi 4)	TAMBAHAN BARU (FOHI Jilid 1 Edisi 5)
Tidak ada	Tidak ada

MONOGRAFI INDIVIDU

Persyaratan Monografi Individu ini ditetapkan untuk sediaan berikut ini:

I. Vaksin Bakteri

A. Vaksin Bakteri Inaktif

1. Vaksin *Avibacterium paragallinarum* inaktif
2. Vaksin *Bordetella bronchiseptica* babi inaktif
3. Vaksin *Brucella abortus* (strain 45/20) inaktif
4. Vaksin *Clostridium botulinum* inaktif
5. Vaksin *Clostridium novyi* tipe B inaktif
6. Vaksin *Clostridium perfringens* inaktif
7. Vaksin *Clostridium septicum* inaktif
8. Vaksin *Clostridium tetani* inaktif
9. Vaksin *Erysipelas* babi inaktif
10. Vaksin Fowl cholera inaktif
11. Vaksin Haemorrhagic septicaemia inaktif
12. Vaksin *Leptospira* sp. inaktif
13. Vaksin *Mycoplasma gallisepticum* inaktif
14. Vaksin *Mycoplasma hyopneumoniae* inaktif
15. Vaksin *Salmonella enteritidis* inaktif
16. Vaksin *Bordetella bronchiseptica* anjing inaktif

B. Vaksin Bakteri Aktif

1. Vaksin Anthrax aktif
2. Vaksin *Brucella abortus* (strain 19) aktif
3. Vaksin *Brucella abortus* (strain RB 51) aktif
4. Vaksin Contagious bovine pleuropneumonia aktif
5. Vaksin *Bordetella bronchiseptica* anjing aktif
6. Vaksin *Mycoplasma synoviae* aktif

II. Vaksin Parasit

1. Vaksin Coccidiosis unggas aktif

III. Vaksin Virus

A. Vaksin Virus Inaktif

1. Vaksin Aujeszky's inaktif
2. Vaksin Avian encephalomyelitis inaktif
3. Vaksin Avian influenza inaktif
4. Vaksin Bovine viral diarrhoea inaktif
5. Vaksin Canine infectious hepatitis virus inaktif
6. Vaksin Canine parvovirus inaktif
7. Vaksin Egg drop syndrome '76 inaktif
8. Vaksin Infectious bovine rhinotracheitis inaktif
9. Vaksin Infectious bronchitis inaktif
10. Vaksin Infectious bursal disease inaktif
11. Vaksin Newcastle disease inaktif
12. Vaksin Rabies inaktif
13. Vaksin Swollen head syndrome inaktif
14. Vaksin Viral arthritis inaktif

B. Vaksin Virus Aktif

1. Vaksin Aujeszky's aktif
2. Vaksin Avian encephalomyelitis aktif
3. Vaksin Bovine viral diarrhoea aktif
4. Vaksin Canine infectious hepatitis virus aktif
5. Vaksin Canine distemper aktif
6. Vaksin Canine parainfluenza aktif
7. Vaksin Canine parvovirus aktif
8. Vaksin Chicken anemia virus aktif
9. Vaksin Contagious pustular dermatitis aktif
10. Vaksin Feline calicivirus aktif
11. Vaksin Feline panleukopenia virus aktif
12. Vaksin Feline viral rhinotracheitis aktif
13. Vaksin Fowl pox aktif
14. Vaksin Hog cholera aktif

15. Vaksin Infectious bovine rhinotracheitis aktif
16. Vaksin Infectious bronchitis aktif
17. Vaksin Infectious bursal disease aktif
18. Vaksin Infectious laryngotracheitis aktif
19. Vaksin Marek's disease aktif
20. Vaksin Newcastle disease aktif
21. Vaksin Swollen head syndrome aktif
22. Vaksin Viral arthritis aktif

IV. Bahan Diagnostika

1. Antigen Brucella abortus RBT
2. Antigen Brucella abortus SAT
3. Antigen Mycoplasma gallisepticum
4. Antigen Salmonella pullorum



I. VAKSIN BAKTERI

A. VAKSIN BAKTERI INAKTIF

I.A.1 VAKSIN AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM INAKTIF (VAKSIN INFECTIOUS CORYZA INAKTIF)

Definisi

Vaksin infectious coryza inaktif adalah vaksin yang dibuat dari suspensi biakan *Avibacterium paragallinarum* yang diinaktivasi dengan formaldehid atau yang sepadan dan ditambah adjuvan sehingga aktifitas imunogeniknya masih dipertahankan.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Inaktivasi

Produk ruahan dan produk akhir dilakukan uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif yang mempunyai karakteristik morfologik dan serologik *Avibacterium paragallinarum*.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 30- 35 hari, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan selama 21 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam vaksinasi dan ayam kontrol tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor ayam SPF, umur 30-35 hari, divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Dua minggu setelah vaksinasi pertama dilakukan *booster*. Dua minggu pasca vaksinasi terakhir, semua ayam kelompok vaksinasi dan ayam kelompok kontrol, ditantang dengan 0,2 mL biakan *Avibacterium paragallinarum* serotipe homolog umur 12-18 jam, dengan konsentrasi tidak kurang dari $10^{8,0}$ CFU secara *intra nasal*. Pengamatan dilakukan selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 70% ayam kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala klinis *coryza*, sedangkan kelompok ayam kontrol tidak kurang dari 70% harus menunjukkan gejala klinis *coryza*.

2. Sepuluh ekor ayam SPF, umur 30-35 hari, divaksin dengan dosis dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. *Booster* dilakukan pada 2 minggu pasca vaksinasi pertama. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Darah ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol diambil dua minggu pasca vaksinasi terakhir, dan dipisahkan serumnya. Serum dititer antibodinya dengan uji HI dengan menggunakan 4 HA unit antigen *A. paragallinarum* serotipe homolog.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 70% ayam kelompok vaksinasi mempunyai titer HI tidak kurang dari 10, dan tidak kurang 70% ayam kelompok kontrol mempunyai titer tidak lebih dari 5, atau perbedaan GMT antibodi antara kelompok vaksinasi dan kontrol tidak kurang dari 2 log₂.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.2 VAKSIN BORDETELLA BRONCHISEPTICA BABI INAKTIF (VAKSIN ATROPIC RHINITIS BABI INAKTIF)

Definisi

Vaksin bordetella bronchiseptica babi inaktif adalah sediaan suspensi biakan *Bordetella bronchiseptica* yang telah diinaktivasi sedemikian rupa sehingga aktifitas imunogeniknya masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Inaktivasi

Produk ruahan dan produk akhir dilakukan uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif yang mempunyai karakteristik morfologik dan/atau serologik *Bordetella bronchiseptica*.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Tidak kurang dari 10 ekor mencit, berat 18-22 g, divaksinasi dengan 0,5 mL vaksin secara IP atau SC. Pengamatan dilakukan selama 14 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan adanya gejala abnormal

2. Tidak kurang dari 2 ekor marmot, berat 350-400 g, divaksinasi 2 mL vaksin secara SC atau IM. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot tidak menunjukkan adanya gejala abnormal

3. Dua ekor babi SAN *B. bronchiseptica*, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 14 hari. Ukur suhu tubuh babi sehari sebelum, 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 2 hari berturut-turut pasca vaksinasi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan semua babi tidak menunjukkan gejala abnormal atau mati dan peningkatan suhu tubuh tidak lebih dari 2°C.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Dua puluh ekor mencit, berat 18-22 g, divaksinasi 1/6 dosis babi dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. *Booster* dilakukan 14 hari pascavaksinasi pertama dengan dosis dan aplikasi yang sama. Sepuluh ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Enam hari setelah vaksinasi terakhir, semua mencit kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan biakan virulen *Bordetella bronchiseptica*. Pengamatan dilakukan selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 70% mencit vaksinasi tidak timbul gejala klinis dan tidak kurang dari 70% mencit kontrol timbul gejala klinis.

2. Uji proteksi aktif:

Seratus ekor mencit, berat 18-22 g, dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok 1 divaksinasi 0,2 mL vaksin dan kelompok 2 sebagai kelompok kontrol. Masing-masing kelompok dibagi menjadi 10 sub kelompok, setiap sub kelompok terdiri dari 5 mencit. Tiga minggu pasca vaksinasi setiap subkelompok ditantang dengan 0,1 mL pengenceran kelipatan 10 yang berbeda (sampai pengenceran 10^{10}) dari biakan *Bordetella bronchiseptica*, secara IP. Pengamatan dilakukan selama 7 hari. Kemudian dilakukan penghitungan LD_{50} .

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila LD_{50} kelompok vaksinasi lebih besar 10^2 atau lebih dari kelompok kontrol.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum

I.A.3. VAKSIN BRUCELLA ABORTUS (STRAIN 45/20) INAKTIF (VAKSIN CONTAGIOUS ABORTION (STRAIN 45/20) INAKTIF)

Definisi

Vaksin brucella abortus (strain 45/20) inaktif adalah sediaan emulsi air dalam minyak biakan *Brucella abortus* strain 45/20 (Mc. Ewen) yang telah diinaktivasi sedemikian rupa sehingga aktifitas immunogeniknya masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif yang mempunyai karakteristik morfologi dan/atau serologik *Brucella abortus* (strain 45/20)

Inaktivasi

Uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Dua ekor sapi SAN *Brucella abortus*, sekurang-kurangnya berumur 6 bulan, divaksinasi 2 dosis secara SC. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat bila semua sapi tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dilakukan dengan ujiantang yang dilaksanakan di laboratorium BSL 3. Tidak kurang dari 12 ekor marmot sehat dan peka, divaksinasi dengan 1/10 dosis sesuai yang direkomendasikan secara IM. Enam ekor marmot yang lain digunakan sebagai marmot kontrol. Enam minggu pascavaksinasi semua marmot kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol, ditantang dengan 1 mL suspensi yang mengandung 5.000 CFU *Brucella abortus* strain ganas 544, secara IM. Enam minggu pascatantang, semua marmot dieutanasia, limpa ditimbang, kemudian disuspensikan dengan larutan yang sesuai, sehingga konsentrasi akhir 10% (b/v). Suspensi limpa setara dengan 0,05 g, diinokulasikan pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada 37°C selama 4 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila:

1. Tidak lebih dari 25% limpa marmot kelompok vaksinasi ditemukan bakteri tantang *Brucella abortus*, dan 100% limpa marmot kontrol ditemukan bakteri tantang *Brucella abortus*.

2. Perbandingan rata-rata berat limpa dengan berat badan marmot kelompok vaksinasi tidak kurang dari 0,3% dan rata-rata titer antibodi tidak kurang dari 600 unit.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.4. VAKSIN CLOSTRIDIUM BOTULINUM INAKTIF

Definisi

Vaksin clostridium botulinum inaktif adalah sediaan suspensi strain *Clostridium botulinum* tipe C atau D atau campuran kedua tipe tersebut dalam medium cair atau filtrat yang telah diinaktivasi sedemikian rupa sehingga aktifitas imunogeniknya masih dipertahankan.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram positif yang mempunyai karakteristik morfologi dan sifat biakan yang sama dengan *Clostridium botulinum*

Inaktivasi

Uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor mencit, berat 18-20 g, divaksinasi 0,5 mL vaksin secara SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila pada semua mencit tidak menunjukkan adanya gejala abnormal atau mati.

2. Tidak kurang dari 2 ekor hewan target sehat dan peka, divaksinasi dengan 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan tidak kurang dari 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua hewan tidak menunjukkan adanya gejala abnormal atau mati.

Potensi

Dua puluh ekor mencit, berat 18-20 gram, divaksinasi dengan 0,2 mL vaksin yang telah diencerkan 8 menggunakan larutan dapar faali (NaCl fisiologis) dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Dua puluh satu hari setelah vaksinasi semua mencit ditantang dengan toksin *Clostridium botulinum* tipe yang sama dengan dosis 25 *paralytic dose* 50 secara IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala *botulism*, dan 100% kelompok kontrol menunjukkan gejala *botulism*.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.5.VAKSIN CLOSTRIDIUM NOVYI TIPE B INAKTIF (VAKSIN CLOSTRIDIUM TIPE B; BLACK DISEASE INAKTIF)

Definisi

Vaksin *Clostridium novyi* tipe B inaktif adalah sediaan suspensi biakan di dalam medium cair, atau filtrat biakan, atau bahan-bahan yang diperoleh dari *Clostridium novyi* tipe B yang telah diinaktivasi dengan suatu cara sehingga toksisitasnya hilang dan aktifitas imunogeniknya dipertahankan. Vaksin dapat mengandung adjuvan yang sesuai.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram positif yang mempunyai karakteristik morfologi dan sifat biakan yang sama dengan *Clostridium novyi*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor mencit, berat 17-22 g, divaksinasi 0,5 mL secara SC. Lima ekor mencit lainnya digunakan sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal atau mati.

2. Tidak kurang dari 2 ekor hewan target, yang belum pernah divaksinasi terhadap *Clostridium novyi* tipe B, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan tidak kurang dari 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua hewan tidak menunjukkan gejala abnormal atau mati.

Potensi

Tidak kurang dari 10 ekor kelinci yang sehat, umur 3-6 bulan, divaksinasi dengan dosis yang tidak lebih besar dari dosis minimum yang direkomendasikan, sebagai dosis primer. *Booster* dilakukan pada 21-28 hari pascavaksinasi pertama, dengan dosis yang tidak lebih besar dari dosis minimum yang disebutkan pada etiket sebagai dosis sekunder. Darah dari tiap kelinci diambil pada 10-14 hari pascavaksinasi terakhir untuk dibuat *pooled sera*. Antitoksin *pooled sera* diuji untuk menetapkan potensinya dengan uji seperti pada Lampiran VI.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap mL serum mengandung tidak kurang dari 3,5 unit alpha toksin *Clostridium novyi*.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.6.VAKSIN CLOSTRIDIUM PERFRINGENS INAKTIF

Definisi

Vaksin clostridium perfringens inaktif adalah sediaan suspensi biakan di dalam suatu medium cair, atau filtrat dari biakan, atau bahan-bahan yang berasal dari *Clostridium perfringens*, tipe B, tipe C atau tipe D atau kombinasi dari tipe-tipe ini, yang diinaktivasi dengan suatu cara dimana toksisitasnya dihilangkan dan aktifitas imunogeniknya dipertahankan. Vaksin dapat mengandung suatu adjuvan yang sesuai.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Uji identifikasi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

- Tipe B : Bila diinokulasikan pada hewan target sehat dan peka dapat menimbulkan pembentukan antitoksin beta dan epsilon dari *Clostridium perfringens*.
- Tipe C : Bila diinokulasikan pada hewan target sehat dan peka dapat menimbulkan pembentukan antitoksin beta dari *Clostridium perfringens*.
- Tipe D : Bila diinokulasikan pada hewan target sehat dan peka dapat menimbulkan pembentukan antitoksin epsilon dari *Clostridium perfringens*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor mencit, berat 17-22 g, divaksinasi 0,5 mL secara SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.
Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal atau mati.
2. Tidak kurang dari 2 ekor hewan target, yang belum pernah divaksinasi dengan *Cl. perfringens*, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan tidak kurang dari 2 minggu.
Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua hewan tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

a. Vaksin *Clostridium perfringens* Tipe B

(Vaksin Disentri anak domba)

Tidak kurang dari 10 ekor kelinci sehat, umur 3-6 bulan, divaksinasi dengan dosis yang tidak lebih dari dosis minimum sesuai yang direkomendasikan, sebagai dosis primer. *Booster* dilakukan pada 21-28 hari pascavaksinasi pertama dengan dosis yang tidak lebih besar dari dosis minimum sesuai yang direkomendasikan, sebagai dosis sekunder. Darah kelinci diambil pada 10-14 hari pascavaksinasi terakhir untuk dibuat *pooled sera*. Antitoksin *pooled sera* diuji untuk menetapkan potensinya dengan metode seperti pada Lampiran VI.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap mL serum mengandung tidak kurang dari 10 unit antitoksin beta dan tidak kurang dari 5 unit antitoksin epsilon.

b. Vaksin *Clostridium perfringens* Tipe C

(Vaksin *Struck*)

Uji potensi dilakukan seperti pada uji tipe B.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap mL serum mengandung tidak kurang dari 10 unit antitoksin beta.

c. Vaksin *Clostridium perfringens* Tipe D

(Vaksin Enterotoksemia, Vaksin *Pulpy Kidney*)

Uji potensi dilakukan seperti pada uji tipe B.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap mL serum mengandung tidak kurang dari 5 unit antitoksin epsilon.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.7. VAKSIN CLOSTRIDIUM SEPTICUM INAKTIF (VAKSIN BRAXY INAKTIF; VAKSIN MALIGNANT OEDEMA INAKTIF)

Definisi

Vaksin *Clostridium septicum* inaktif adalah sediaan suspensi biakan di dalam medium cairan, atau filtrat dari biakan, atau bahan-bahan yang berasal dari suatu strain yang sesuai atau strain *Clostridium septicum*, yang diinaktivasi dengan suatu cara dimana toksisitasnya dihilangkan dan aktifitas immunogeniknya dipertahankan. Vaksin biakan mengandung suatu adjuvan yang sesuai.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram positif yang mempunyai karakteristik morfologi dan sifat biakan yang sama dengan *Clostridium septicum*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor mencit, berat 17-22 g, divaksinasi 0,5 mL secara SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal atau mati.

2. Tidak kurang dari 2 ekor hewan target, yang belum pernah divaksinasi terhadap *Clostridium septicum*, divaksinasi dengan 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan tidak kurang dari 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat semua hewan tidak menunjukkan gejala abnormal atau mati.

Potensi

Sepuluh ekor kelinci sehat, umur 3-6 bulan, divaksinasi dengan dosis yang tidak lebih dari dosis minimum sesuai yang direkomendasikan, sebagai dosis primer. *Booster* dilakukan pada 21-28 hari pascavaksinasi pertama dengan dosis yang tidak lebih besar dari dosis minimum sesuai yang direkomendasikan, sebagai dosis sekunder.

Darah diambil pada 10-14 hari pascavaksinasi terakhir untuk dibuat *pooled sera*. Antitoksin *pooled sera* diuji dengan uji biologis alfa toksin *Clostridium septicum* seperti pada Lampiran V.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap mL serum mengandung tidak kurang dari 10 unit antitoksin beta dan tidak kurang dari 2,5 unit antitoksin *Clostridium septicum*.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.8. VAKSIN CLOSTRIDIUM TETANI INAKTIF

Definisi

Vaksin clostridium tetani inaktif adalah filtrat dari biakan *Clostridium tetani* pada media cair yang diinaktivasi dengan suatu cara dimana toksisitasnya dihilangkan dan aktifitas imunogeniknya masih dipertahankan. Vaksin ini digunakan untuk memacu timbulnya kekebalan aktif dan pasif.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Uji identifikasi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Vaksin diinokulasikan pada hewan target sehat dengan dosis dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila dapat menstimulasi pembentukan antineurotoksin *Clostridium tetani* atau melindungi terhadap efek kelumpuhan akibat toksin.

2. Toksoid dipisahkan dari adjuvan. Untuk vaksin yang dicampur dengan aluminium hidroksida, dengan cara sebagai berikut:

Vaksin dilarutkan dalam sodium sitrat sehingga diperoleh larutan 10%, dan disimpan pada 37°C selama $\pm$ 16 jam, kemudian disentrifugasi sampai memperoleh supernatan yang jernih.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila larutan yang mengandung toksoid direaksikan dengan tetanus antitoksin, terlihat adanya presipitat.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Lima ekor marmot, berat 300-500 g, divaksinasi 5 mL secara SC di dua tempat dengan dosis masing-masing tempat 2,5 mL.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila dalam 21 hari tidak ada marmot yang menunjukkan gejala abnormal ataupun mati karena tetanus.

Potensi

Lima ekor marmot, berat 300-500 g, divaksinasi dengan dosis minimal yang direkomendasikan sebagai dosis awal secara SC. *Booster* dilakukan pada 28 hari pascavaksinasi pertama dengan dosis minimal sesuai yang direkomendasikan secara SC.

Darah diambil pada 14 hari pascavaksinasi terakhir untuk dibuat *pooled sera*. Antitoksin *pooled sera* diuji secara biologis *Clostridium tetani*.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap mL serum mengandung minimum 7,5 unit atau jika vaksin ditujukan untuk kuda harus mengandung minimum 30 unit.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

Catatan

Bagi penguji dianjurkan untuk diimunisasi. Jika terjadi infeksi karena *Clostridium tetani* pada orang yang tidak diimunisasi dengan *Tetanus Toxin*, maka harus segera diberikan antitoksin *gamma-globulin*.

I.A.9. VAKSIN ERYSIPELAS BABI INAKTIF (VAKSIN ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPHATIAE INAKTIF)

Definisi

Vaksin erysipelas babi inaktif adalah vaksin yang dibuat dari satu atau lebih tipe yang sesuai dari *Erysipelothrix rhusiopathiae* yang telah diinaktivasi sedemikian rupa sehingga sifat immunogeniknya masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari bakteri gram negatif, bentuk batang kecil, mempunyai karakteristik morfologik, sifat biakan dan serologik *E. rhusiopathiae*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Dua ekor babi SAN *E. rhusiopathiae* atau jika tidak memungkinkan, dapat menggunakan babi yang belum pernah divaksinasi terhadap *E. rhusiopathiae*, umur 3-4 bulan, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua babi tidak menunjukkan gejala abnormal.

2. Sepuluh ekor mencit, berat 16-20 g, divaksinasi 0,2 mL secara SC. Sepuluh ekor mencit lainnya sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima belas ekor babi SAN *E. rhusiopathiae*, umur 12 minggu, berat badan tidak kurang dari 20 kg dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok vaksinasi terdiri dari 10 ekor babi divaksinasi sesuai dengan dosis dan rute aplikasi yang direkomendasikan. Kelompok kontrol terdiri dari 5 ekor.

Tiga minggu pascavaksinasi, semua babi ditantang dengan 0,1 mL bakteri *E. rhusiopathiae* strain 1 dan 2 strain virulen yang disuntikkan secara intradermal. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika tidak kurang 90% babi kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala klinis penyakit ini misalnya adanya *diamond skin lesion* ditempat injeksi dan lebih dari 80% babi kelompok kontrol menunjukkan gejala klinis penyakit ini.

2. Dua puluh ekor mencit sehat dan peka, berat 17-20 g, divaksinasi 0,2 mL secara SC dan 10 ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Sepuluh hari pascavaksinasi semua mencit ditantang dengan 100 *Mice Lethal Dose 50* (MLD₅₀) *E. rhusiopathiae* strain ganas. Pengamatan dilakukan selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% mencit kelompok vaksinasi tetap hidup dan 100% mencit kelompok kontrol mati.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.10. VAKSIN FOWL CHOLERA INAKTIF (VAKSIN PASTEURELLA MULTOCIDA INAKTIF)

Definisi

Vaksin *Pasteurella multocida* inaktif adalah sediaan suspensi strain *Pasteurella multocida* yang telah diinaktivasi sehingga aktifitas imunogenik masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari bakteri gram negatif, bentuk batang kecil, mempunyai karakteristik morfologi, sifat biakan dan serologik *Pasteurella multocida* pada unggas.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Lima belas ekor ayam SPF umur sesuai rekomendasi, sepuluh ekor divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan dan lima ekor sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama masa pengamatan tidak ada gejala klinis lokal atau sistemik yang dicurigai sebagai infeksi *Pasteurella multocida* dan gejala abnormal yang disebabkan pemberian vaksin.

Potensi

Tiga puluh ekor ayam SPF umur sesuai rekomendasi, dua puluh ekor divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi yang direkomendasikan, sepuluh ekor sebagai kelompok kontrol. Dua minggu pascavaksinasi terakhir dilakukan ujiantang dengan biakan *Pasteurella multocida* homolog, dosis tidak kurang dari 250 CFU per 0,5 mL secara IM atau IV. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 70% kelompok ayam vaksinasi tetap hidup dan tidak menunjukkan gejala klinis *fowl cholera*, sedangkan tidak kurang dari 80% kelompok ayam kontrol mati atau menunjukkan gejala klinis.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.11. VAKSIN HAEMORRHAGIC SEPTICEMIA INAKTIF
(Vaksin Septicemia Epizootica Inaktif, Vaksin Penyakit Ngorok Inaktif,
Vaksin *Pasteurella Multocida* Inaktif)

Definisi

Vaksin haemorrhagic septicemia atau septicemia epizootica (SE) inaktif adalah vaksin yang diproduksi dari biakan *Pasteurella multocida* tipe B2 (strain Katha), yang telah diinaktivasi sehingga sifat imunogeniknya masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari bakteri gram negatif, bentuk batang kecil, dan dapat diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologik *Pasteurella multocida* tipe B2 (strain Katha) atau secara biomolekuler.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Pada hewan percobaan

a. Vaksin dalam pelarut air

Sepuluh ekor mencit, berat 18-22 g, divaksinasi 0,5 mL secara IM/IP/SC. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tersebut tidak menunjukkan gejala abnormal yang disebabkan pemberian vaksin.

b. Vaksin dalam pelarut minyak

Enam ekor kelinci sehat dan peka, umur rata-rata 6 bulan, divaksinasi dengan dua kali setengah dosis vaksin yang direkomendasikan perusahaan secara IM. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua kelinci tersebut tidak menunjukkan gejala abnormal yang disebabkan pemberian vaksin.

2. Pada hewan target

Dua ekor sapi sehat dan peka, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan sapi tersebut tidak menunjukkan gejala klinis SE dan gejala abnormal yang disebabkan pemberian vaksin.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. *Passive Mouse Protection Test (PMPT)*

- a. Tiga ekor kelinci sehat dan peka, berat 1800-2200 g, divaksinasi dengan 1/2 dosis vaksin yang direkomendasikan perusahaan secara IM sebagai kelompok vaksinasi. Setelah 28 hari, masing-masing kelinci kelompok vaksinasi diambil darahnya, serum dipisahkan dan dibuat *pooled sera* dengan perbandingan volume yang sama. Tiga puluh ekor mencit berat 18-22 g, dua puluh ekor mencit disuntik dengan 0,5 mL *pooled sera* secara SC dan sepuluh ekor mencit sebagai kelompok kontrol. Dua puluh empat jam kemudian semua mencit ditantang dengan 0,1 mL biakan *Pasteurella multocida* B:2 strain lapang ganas, umur 6 jam, dengan konsentrasi 10 *mice lethal dose* 50 (10 MLD₅₀) secara SC. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% mencit kelompok vaksinasi tetap hidup, sedangkan 100% kelompok kontrol mati.

- b. Lima ekor sapi divaksinasi dengan 1 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan. Sapi diambil darahnya pada 28 hari pascavaksinasi dan dipisahkan serumnya. Tiga puluh lima ekor mencit, berat 18-22 g, dibagi menjadi 7 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Lima kelompok disuntik dengan 0,5 mL serum dari 5 sapi secara SC, 1 kelompok mencit sebagai kontrol serum dan 1 kelompok mencit lain sebagai kontrolantang. Dua puluh empat jam kemudian semua mencit ditantang dengan 0,1 mL biakan *Pasteurella multocida* B:2 strain lapang ganas, umur 6 jam, dengan konsentrasi 10 *mice lethal dose* 50 (10 MLD₅₀) secara SC. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% mencit kelompok vaksinasi tetap hidup sedangkan 100% kelompok kontrol mati.

2. *Active Mouse Protection Test (AMPT)*

Pengujian dilakukan dengan menggunakan 100 ekor mencit, berat badan 18-22 g, yang dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok pertama sebanyak 50 ekor mencit divaksinasi 0,2 mL secara IP dan *dibooster* 14 hari kemudian. Kelompok kedua sebanyak 50 ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Masing-masing kelompok dibagi menjadi 10 sub kelompok, setiap sub kelompok terdiri dari 5 mencit. Dua puluh satu hari pascavaksinasi terakhir setiap subkelompok ditantang dengan 0,1 mL pengenceran kelipatan 10 yang berbeda (sampai pengenceran 10⁻¹⁰) dari biakan *Pasteurella multocida* B:2 strain lapang ganas umur 6 jam, secara IP. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 1 minggu dan kemudian dilakukan penghitungan LD₅₀. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila perbedaan nilai LD₅₀ antara mencit kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak kurang dari 10^{4,0}.

3. Uji Proteksi Hewan Target

Lima ekor sapi SAN SE, empat ekor sapi divaksinasi dengan dosis dan aplikasi rute yang direkomendasikan dan satu ekor sapi sebagai kontrol. Dua puluh delapan hari pascavaksinasi, semua sapi ditantang dengan dosis $10^{6.0}$ CFU *Pasteurella multocida* B:2 strain lapang ganas. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila 100% sapi kelompok vaksinasi hidup dan tidak menunjukkan gejala klinis SE, sedangkan sapi kontrol mati dan atau timbul gejala klinis SE.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.12. VAKSIN LEPTOSPIRA Sp. INAKTIF

Definisi

Vaksin leptospira inaktif adalah sediaan suspensi biakan *Leptospira sp.* strain patogen satu atau lebih serovar yang telah diinaktivasi sedemikian rupa sehingga aktifitas imunogeniknya masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif yang mempunyai karakteristik morfologik dan serologik *Leptospira sp.*

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Tiga ekor anjing SAN umur sesuai yang direkomendasikan. Dua ekor divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan dan satu ekor sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika semua anjing tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dengan metode tentang harus dilakukan pada laboratorium ABSL 3

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor hamster sehat dan peka, umur tidak lebih dari 3 bulan, divaksin dengan 1/40 dosis anjing secara SC. Lima ekor hamster lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Pada 15-20 hari pascavaksinasi kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan biakan *Leptospira sp.* serovar homolog yang ganas dengan jumlah yang cukup secara IP. Pengamatan pascatantang dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% hamster kelompok vaksinasi hidup dan tidak menunjukkan gejala klinis sedangkan tidak kurang dari 80% kelompok kontrol mati.

2. Uji Serologis

Tiga ekor anjing SAN, umur sesuai yang direkomendasikan, divaksinasi 1 dosis dengan rute sesuai rekomendasi dan 1 ekor anjing sebagai kontrol. Minimal 2 minggu pascavaksinasi diambil darah untuk dilakukan pengukuran titer antibodi dengan metode ELISA.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat bila terbentuk titer antibodi lebih tinggi pada kelompok vaksinasi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.13. VAKSIN MYCOPLASMA GALLISEPTICUM INAKTIF

Definisi

Vaksin mycoplasma gallisepticum inaktif adalah sediaan suspensi biakan bakteri *Mycoplasma gallisepticum* yang telah diinaktivasi sehingga aktifitas imunogeniknya masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif yang mempunyai karakteristik serologik *Mycoplasma gallisepticum*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Sepuluh ayam SPF, umur sesuai rekomendasi, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam tidak menunjukkan gejala klinis dan gejala abnormal secara lokal atau sistemik dari pemberian vaksin.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Dua puluh ekor ayam SPF umur sesuai rekomendasi, sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan dan sepuluh ekor ayam SPF lainnya sebagai kelompok kontrol. Tidak kurang dari 14 hari pascavaksinasi, semua ayam diuji dengan metode uji *Haemagglutination Inhibition* (HI).

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila ayam kelompok kontrol negatif titer antibodi terhadap *M. gallisepticum* dan ayam vaksinasi harus memiliki titer rata-rata minimal 1/99.

2. Penilaian Lesi Kantung Udara

Empat puluh ekor ayam SPF umur minimum sesuai rekomendasi, dua puluh ekor divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan, dan dua puluh ekor sebagai kelompok kontrol. Jika *booster* dianjurkan, maka dilakukan dengan interval yang direkomendasikan.

Empat belas sampai dua puluh delapan hari pascavaksinasi terakhir dilakukan ujiantang dengan dosis 0,1 mL (10^8 CFU/mL) biakan *Mycoplasma gallisepticum* virulen, dengan meneteskan pada sinus infra orbitalis atau injeksi pada kantung udara posterior (*posterior thoracic air sac*). Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu selanjutnya ayam dieutanasi dan dinekropsi untuk segera dihitung lesi kantung udara.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika skor lesi kantung udara kelompok vaksinasi signifikan lebih rendah dari pada kelompok kontrol dan selisihnya tidak kurang dari 30%.

Cara penghitungan skor lesi dilakukan sebagai berikut:

- 0 : tidak ada lesi pada kantung udara
- 1 : pada daerah terbatas 1-2 kantung udara terdapat kekeruhan, penebalan membran kantung udara atau adanya eksudat berwarna kekuningan
- 2 : pada 1-2 bagian kantung udara berwarna abu-abu atau kuning, terkadang disertai eksudat berbusa serta ada penebalan membran kantung udara
- 3 : pada 3 kantung udara terdapat eksudat berlebih dengan penebalan yang jelas pada kantung udara
- 4 : radang kantung udara parah yang ditandai dengan eksudat dan penebalan pada hampir semua kantung udara

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.14. VAKSIN MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE INAKTIF

Definisi

Vaksin mycoplasma hyopneumoniae inaktif adalah sediaan suspensi biakan bakteri *Mycoplasma hyopneumoniae* yang telah diinaktivasi sedemikian rupa sehingga aktifitas imunogeniknya masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif yang mempunyai karakteristik serologik *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Uji keamanan menggunakan 4 (empat) ekor babi SAN dengan umur dan rute aplikasi sesuai dengan yang direkomendasikan. Tiga ekor divaksinasi 2 (dua) dosis sebagai kelompok vaksinasi dan 1 (satu) ekor sebagai kontrol. Suhu tubuh babi diukur: sehari sebelum, pada saat, empat jam setelah vaksinasi, dan setiap hari selama 2 hari pascavaksinasi. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua babi tidak menunjukkan gejala abnormal atau mati dan peningkatan suhu pascavaksinasi tidak lebih dari 2°C.

Potensi

Uji Potensi dapat dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lima ekor mencit sehat dan peka, berat 18-20 g, divaksinasi 1/6 dosis babi secara SC. Lima ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Apabila dianjurkan untuk *booster*, maka dilakukan dengan interval yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu. Pada hari terakhir pengamatan diambil darah untuk dilakukan pengukuran titer antibodi terhadap *Mycoplasma hyopneumoniae* dengan menggunakan metode ELISA.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mencit kelompok vaksinasi memiliki antibodi spesifik dan memiliki rata-rata titer antibodi sesuai yang direkomendasikan, sedangkan semua kelompok mencit kontrol negatif.

2. Empat ekor babi SAN dengan umur dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Tiga ekor divaksinasi 1 dosis sebagai kelompok vaksinasi dan 1 ekor sebagai kontrol.

Apabila dianjurkan untuk *booster*, maka dilakukan dengan interval yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu. Pada hari terakhir pengamatan diambil darah untuk dilakukan pengukuran titer antibodi terhadap *Mycoplasma hyopneumoniae* dengan menggunakan metode ELISA.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila babi kelompok vaksinasi memiliki antibodi spesifik dan memiliki rata-rata titer antibodi sesuai yang direkomendasikan, sedangkan semua kelompok babi kontrol negatif.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.15. VAKSIN SALMONELLA ENTERITIDIS INAKTIF

Definisi

Vaksin salmonella enteritidis inaktif adalah sediaan suspensi biakan *Salmonella Enteritidis* yang telah diinaktivasi sedemikian rupa sehingga aktifitas imunogeniknya masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif yang mempunyai karakteristik morfologik dan serologik *Salmonella Enteritidis*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi 2 dosis melalui rute aplikasi yang direkomendasikan. Umur ayam SPF yang digunakan tidak boleh melebihi umur minimal vaksinasi yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam tidak menunjukkan gejala klinis *salmonellosis*.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Enam puluh ekor ayam SPF, umur tidak melebihi umur minimal vaksinasi yang direkomendasikan. Tiga puluh ekor ayam divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi yang direkomendasikan. Tiga puluh ekor ayam lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Empat minggu pascavaksinasi, kedua kelompok ditantang dengan *Salmonella Enteritidis* secara PO. Sehari sebelum tantang, semua darah ayam diambil. Pengamatan dilakukan selama 4 minggu. Satu hari setelah tantang dan setiap 2 kali seminggu sampai 2 minggu pascatantang, tiap ayam diambil sampel fecesnya untuk melihat ada tidaknya *Salmonella Enteritidis* dengan cara *direct plating*. Pada akhir pengamatan, semua ayam dieutanasia, hati dan limpa diambil untuk diuji adanya *Salmonella Enteritidis* dengan metode yang valid atau sesuai. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika:
 - a. Jumlah *Salmonella Enteritidis* pada feces kelompok ayam vaksinasi signifikan lebih rendah dari kelompok kontrol.

- b. Jumlah hati dan limpa kelompok ayam vaksinasi yang positif *Salmonella* Enteritidis signifikan lebih rendah dari kelompok kontrol.
2. Dua puluh ayam SPF, umur 12 minggu, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ayam SPF lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Apabila direkomendasikan *booster*, maka dilakukan sesuai jadwal. Pengambilan darah dilakukan 5 kali yaitu 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu, 4 minggu dan 5 minggu pascavaksinasi. Lakukan uji serologis dengan menggunakan metode yang valid untuk mengukur titer antibodi terhadap *Salmonella* Enteritidis.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila pada minggu ketiga pascavaksinasi sudah terbentuk antibodi.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.A.16. VAKSIN BORDETELLA BRONCHISEPTICA ANJING INAKTIF (VAKSIN KENNEL COUGH INAKTIF)

Definisi

Vaksin bordetella bronchiseptica anjing inaktif adalah sediaan suspensi biakan *Bordetella bronchiseptica* yang telah diinaktivasi sedemikian rupa sehingga aktivitas imunogeniknya masih tetap ada.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) dan uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif yang mempunyai karakteristik morfologik dan/atau serologik *Bordetella bronchiseptica*. (carikan sumber referensi)

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media yang sama atau sepadan dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan organisme.

Keamanan

Uji keamanan menggunakan 4 (empat) ekor anjing SAN dengan umur dan rute aplikasi sesuai dengan yang direkomendasikan. Tiga ekor divaksinasi 2 dosis sebagai kelompok vaksinasi dan 1 (satu) ekor tidak sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika tidak terjadi reaksi abnormal secara lokal dan sistemik pada semua anjing.

Potensi

Uji potensi menggunakan dua puluh ekor mencit, berat 18-22 g, divaksinasi 1/6 dosis anjing dengan rute aplikasi sesuai dengan yang direkomendasikan. *Booster* dilakukan 14 hari pascavaksinasi pertama dengan dosis dan aplikasi yang sama. Sebanyak 10 ekor mencit lainnya sebagai kelompok kontrol. Enam hari setelah *booster*, semua mencit kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan biakan virulen *Bordetella bronchiseptica* dosis 80 x LD₅₀. Pengamatan dilakukan selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak timbul gejala klinis pada tidak kurang dari 70% mencit yang divaksin dan timbul gejala klinis pada tidak kurang dari 70% mencit kontrol.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum:-



I. VAKSIN BAKTERI
B. VAKSIN BAKTERI AKTIF

I. B.1. VAKSIN ANTHRAX AKTIF

Definisi

Vaksin anthrax aktif adalah sediaan suspensi spora hidup *Bacillus anthracis* nonpatogen (tidak berkapsul) dan mempunyai sifat immunogenitas yang tinggi.

Catatan

Proses produksi dan pengujian vaksin harus dilakukan dengan hati-hati karena mengandung spora *Bacillus anthracis* yang hidup.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram positif yang mempunyai karakteristik morfologik *Bacillus anthracis*

Kandungan spora

Uji kandungan spora dilakukan dengan cara mengencerkan vaksin dengan menggunakan larutan dapar faali atau medium *heart infusion broth* (HIB) atau media lain sampai didapatkan 3 konsentrasi pengenceran yang sesuai. Masing-masing pengenceran diinokulasi ke dalam 2 cawan petri yang telah dilapisi dengan medium *heart infusion agar* (HIA) atau media lain yang sesuai, sebanyak 1 mL. Inkubasi dilakukan pada 37°C selama 20-24 jam.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila vaksin mengandung spora $\geq 2 \times 10^6$ *culturable spores* per dosis untuk sapi.

Keamanan

Dua ekor domba atau kambing sehat dan peka, divaksinasi dengan 2 dosis dengan rute sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak ditemukan adanya reaksi sistemik dan tidak terjadi oedema pada semua domba uji.

Potensi

Uji potensi dengan metodeantang harus dilakukan pada laboratorium ABSL 3. Sepuluh ekor marmot sehat dan peka, berat 300-500 g, divaksinasi dengan 0,5 dosis sapi atau 1 dosis domba secara SC. Tiga ekor marmot lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 3 minggu. Tidak kurang dari 80% marmot vaksinasi tetap hidup. Marmot kelompok vaksinasi yang hidup dan marmot kontrol ditantang dengan 200 MLD *B. anthracis* strain ganas (17JB) secara SC. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot kelompok vaksinasi tetap hidup dan semua marmot kontrol mati dengan menunjukkan gejala spesifik anthraks.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.B.2. VAKSIN BRUCELLA ABORTUS (STRAIN 19) AKTIF (VAKSIN CONTAGIOUS ABORTION (STRAIN 19) AKTIF)

Definisi

Vaksin brucella abortus (strain 19) aktif, adalah sediaan suspensi biakan *Brucella abortus* strain 19 yang virulensinya rendah. Vaksin diproduksi dalam bentuk sediaan larutan atau vakum kering beku, yang dipergunakan dengan segera setelah dilarutkan dengan pelarut yang sesuai.

Catatan

Vaksin dapat menginfeksi manusia, khususnya jika terjadi kesalahan inokulasi. Proses pengujian harus dilakukan dengan hati-hati, jangan sampai terjadi kontaminasi melalui udara. Semua pekerjaan harus dilakukan tanpa ditunda.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I), uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif, bentuk batang kecil, mempunyai karakteristik morfologik, sifat biakan dan serologik *Brucella abortus strain 19*.

Disosiasi

Koloni yang tumbuh pada medium agar berbentuk halus, jika ada koloni berbentuk kasar tidak lebih dari 5%.

1. Dengan stereomikroskop
Koloni yang tumbuh pada medium agar terlihat kecil serta bulat. Warna koloni kebiru-biruan sampai kehijau-hijauan.
2. Dengan akriflavin
Koloni yang tumbuh pada medium *Brucella selective medium* diambil dan diletakkan pada gelas objek kemudian ditetesi dengan larutan akriflavin (10 mg akriflavin dalam 10 mL air suling) dan diaduk. Larutan tidak boleh menggumpal dan tetap berbentuk sediaan suspensi.
3. Dengan larutan gentian violet.
Koloni yang tumbuh pada media *Brucella selective medium* diberi larutan gentian violet selama 10-15 menit, kemudian larutan gentian violet diambil dengan pipet. Koloni harus tidak menyerap zat warna gentian violet.

Kandungan bakteri

Uji kandungan bakteri dilakukan dengan cara mengencerkan vaksin dengan larutan dapar faali (NaCl fisiologis) sampai didapatkan 3 konsentrasi pengenceran yang sesuai.

Masing-masing pengenceran diinokulasi ke dalam 2 cawan petri yang telah dilapisi dengan medium *Brucella selective medium* atau media padat yang sesuai lainnya untuk pertumbuhan bakteri *Brucella abortus*, sebanyak 1 mL. Inkubasi dilakukan pada 37°C 5% CO₂ selama 4 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung bakteri antara 40-120 x 10⁹CFU per dosis.

Keamanan

Sepuluh ekor marmot sehat dan peka, berat 350-400 g, divaksinasi seperlima belas (1/15) dosis sapi sesuai yang direkomendasikan secara IM. Lima ekor marmot lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 10 hari.

Darah marmot diambil pada hari ke-11 untuk diuji titer antibodinya. Pada waktu yang sama limpa tiap marmot diambil untuk penghitungan kandungan *Brucella abortus* pada limpa.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot vaksinasi tidak menunjukkan adanya gejala abnormal dan titer antibodi tiap marmot tidak lebih dari 1.000 unit/mL serta kandungan bakteri pada limpa tidak lebih dari 500.000 CFU/g limpa.

Potensi

Uji potensi dengan metodeantang harus dilakukan pada laboratorium ABSL-3.

Dua puluh ekor marmot sehat dan peka, berat badan 350-400 g, divaksinasi dengan seperlima belas (1/15) dosis sapi dalam 1 mL secara IM. Enam ekor marmot lainnya digunakan sebagai kontrol. Delapan minggu pascavaksinasi, kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan 5.000 CFU *Brucella abortus* strain ganas 544. Enam minggu pascatantang, semua marmot dieutanasia, limpa ditimbang, kemudian disuspensikan dengan larutan yang sesuai sehingga konsentrasi akhir 10% (b/v). Suspensi limpa setara dengan 0,05 g, diinokulasikan pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada 37°C 5% CO₂ selama 4 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila pada tidak lebih dari 25% marmot vaksinasi ditemukan kumanantang *Brucella abortus* strainantang pada limpanya, sedangkan lebih dari 80% marmot kontrol ditemukan *Brucella abortus* strainantang pada limpanya.

Catatan: Virulensi dan infektivitas strainantang harus mempunyai LD₅₀ kurang dari 100 CFU dan 5 minggu pascatantang, minimal, 10 marmot mengandung 5.000 CFU/g limpa. Rata-rata perbandingan antara berat limpa dan berat badan tidak lebih dan 0,03% serta titer antibodi rata-rata dalam serum tidak boleh lebih dari pada 1.000 unit dengan SAT atau 600 unit dengan CFT.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.B.3. VAKSIN BRUCELLA ABORTUS (STRAIN RB 51) AKTIF (VAKSIN CONTAGIOUS ABORTION (STRAIN RB 51) AKTIF)

Definisi

Vaksin brucella abortus (strain RB51) aktif, adalah sediaan suspensi biakan *Brucella abortus* strain RB51 yang telah diatenuasi (tidak mempunyai antigen O-polisakarida). Vaksin diproduksi dalam bentuk sediaan larutan atau vakum kering beku, yang dipergunakan dengan segera setelah dilarutkan dengan pelarut yang sesuai.

Catatan

Vaksin dapat menginfeksi manusia, khususnya jika terjadi kesalahan inokulasi. Proses pengujian harus dilakukan dengan hati-hati, jangan sampai terjadi kontaminasi melalui udara. Semua pekerjaan harus dilakukan tanpa ditunda.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kelembaban, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi bakteri gram negatif, bentuk batang kecil, mempunyai karakteristik morfologik, sifat biakan dan serologik *Brucella abortus strain* RB51.

Disosiasi

Koloni yang tumbuh pada medium agar 100% berbentuk kasar (*rough phase*).

1. Dengan stereomikroskop
Koloni yang tumbuh pada medium agar terlihat kering, granular dan berwarna putih kekuning-kuningan.
2. Dengan uji aglutinasi akriflavin
Koloni yang tumbuh pada medium *Brucella selective medium* diambil dan diletakkan pada gelas objek kemudian ditetesi dengan larutan akriflavin (10 mg akriflavin dalam 10 mL air suling) dan diaduk. Larutan menggumpal dengan cepat.
3. Dengan larutan *crystal violet*.
Koloni yang tumbuh pada media *Brucella selective medium* diberi larutan *crystal violet* selama 10-15 menit, kemudian larutan *crystal violet* diambil dengan pipet. Koloni harus menyerap zat warna *crystal violet*, antara merah sampai dengan ungu.

Kandungan Bakteri

Uji kandungan bakteri dilakukan dengan cara mengencerkan vaksin dengan larutan dapar faali (NaCl fisiologis) sampai didapatkan 3 konsentrasi pengenceran yang sesuai.

Masing-masing pengenceran diinokulasi ke dalam 2 cawan petri yang telah dilapisi dengan medium *Brucella selective medium* atau media padat yang sesuai lainnya untuk pertumbuhan bakteri *Brucella abortus*, sebanyak 1 mL. Inkubasi dilakukan pada 37°C 5% CO₂ selama 4 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung bakteri antara 1-3,4 x 10¹⁰CFU per dosis dan 100% koloni berbentuk kasar (*rough phase*).

Keamanan

Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, dengan umur 8-10 minggu, divaksinasi secara IP sebanyak 1x 10⁸ CFU. Lima ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 6 minggu. Mencit dieutanasi dan diambil limpa pada minggu ke-6 untuk diuji titer antibodinya dan dikultur pada media yang sesuai.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit vaksinasi dan kontrol tidak menunjukkan adanya gejala abnormal dan tidak mengandung antibodi terhadap O-polisakarida (anti-OPS), serta tidak ada kandungan bakteri pada limpa.

Potensi

Uji potensi dengan metodeantang harus dilakukan pada laboratorium ABSL 3.

Mencit sehat dan peka sebanyak 10 ekor, dengan usia 5-6 minggu, divaksinasi dengan 0,1 mL secara SC sebanyak 1,0x10⁵ CFU/ekor. Enam ekor mencit lainnya digunakan sebagai kontrol. Empat minggu pascavaksinasi, kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan 2 x 10⁵ CFU/0,1 mL *Brucella abortus* strain ganas (2308 atau 544). Dua minggu pascatantang, semua marmot dieutanasi, limpa ditimbang, kemudian disuspensikan dengan larutan yang sesuai sehingga konsentrasi akhir 10% (b/v) diinokulasikan pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada 37°C 5%CO₂ selama 4 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila pada mencit vaksinasi ditemukan kumanantang *Brucella abortus* strainantang pada limpanya lebih rendah secara signifikan secara statistik dibandingkan dengan mencit kontrol.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.B.4. VAKSIN CONTAGIOUS BOVINE PLEUROPNEUMONIA AKTIF

Definisi

Vaksin contagious bovine pleuropneumonia aktif adalah suatu biakan yang diperoleh dengan menginokulasikan kaldu yang diperkaya serum dengan suatu modifikasi strain yang sesuai dari *Mycoplasma mycoides sub species mycoides*, seperti *T1* atau *KH3J*. Vaksin ini dapat berbentuk sediaan cair atau vakum kering beku.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kelembaban, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Organisme dalam vaksin menghasilkan suatu pertumbuhan karakteristik pada kaldu yang diperkaya serum dan pertumbuhan pada media padat dapat dihambat oleh antiserum spesifik.

Kandungan Bakteri

Vaksin yang dibuat dari strain selain *KH3J* mengandung tidak kurang dari $10^{7.0}$ CFU *Mycoplasma* per dosis . Vaksin yang dibuat dari strain *KH3J* mengandung tidak kurang dari $10^{8.0}$ CFU *Mycoplasma* per dosis.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Setelah diencerkan, vaksin diinokulasikan secara SC pada 2 ekor mencit jantan, secara IP pada 2 ekor mencit jantan, dan secara IP pada 2 marmot jantan. Pengamatan dilakukan selama 4 minggu. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat bila tidak ada hewan yang mati dan pada marmot tidak menunjukkan gejala klinis *orchitis*.
2. Minimal dua ekor sapi divaksinasi 10 dosis. Pengamatan dilakukan selama 4 minggu. Vaksin memenuhi syarat apabila semua sapi tidak menunjukkan gejala abnormal.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.B.5. VAKSIN BORDETELLA BRONCHISEPTICA ANJING AKTIF (VAKSIN KENNEL COUGH AKTIF)

Definisi

Vaksin bordetella bronchiseptica anjing aktif adalah biakan bakteri *Bordetella bronchiseptica* aktif yang diproduksi dalam bentuk sediaan larutan atau kering beku.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman, kelembaban dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Vaksin berupa suspensi yang mengandung bakteri gram negatif dengan karakteristik morfologik dan/atau serologik *Bordetella bronchiseptica*.

Kandungan Bakteri

Pada uji potensi vaksin *Bordetella bronchiseptica* aktif dilakukan dengan menghitung jumlah kandungan bakteri (CFU/mL).

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika jumlah kandungan bakteri minimal sesuai yang direkomendasikan.

Keamanan

Empat ekor anjing SAN umur dan rute aplikasi sesuai dengan yang direkomendasikan. Tiga ekor divaksinasi 10 dosis sebagai kelompok vaksinasi dan 1 ekor sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika tidak terjadi reaksi abnormal secara lokal dan sistemik pada semua anjing

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.B.6. VAKSIN MYCOPLASMA GALLISEPTICUM AKTIF

Definisi

Vaksin *Mycoplasma gallisepticum* aktif adalah sediaan biakan bakteri *M. gallisepticum* virulensi rendah dan bersifat imunogenik. Vaksin diproduksi dalam bentuk sediaan kering beku dan cair yang digunakan untuk menimbulkan kekebalan aktif pada unggas.

Umum

Vaksin harus dilakukan uji umum yang meliputi uji fisik, kevakuman, kelembaban dan kemurnian seperti pada Lampiran I, uji sterilitas seperti pada Lampiran II.

Identifikasi

Keberadaan *Mycoplasma gallisepticum* di dalam vaksin diidentifikasi berdasarkan morfologik atau biomolekuler.

Keamanan

Empat puluh ekor ayam SPF minimal umur 2 minggu, dua puluh ekor divaksin dengan dosis dan rute aplikasi yang direkomendasikan dan dua puluh ekor ayam SPF lainnya sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 14 - 21 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama masa pengamatan tidak ada gejala klinis lokal atau sistemik yang dicurigai sebagai infeksi *Mycoplasma* dan gejala abnormal yang disebabkan pemberian vaksin.

Uji Kandungan Bakteri

Uji *Color Changing Unit* (CCU)

Dua vial vaksin yang diuji diencerkan dengan 10 mL DW steril dan divortex hingga homogen. Masing-masing vial vaksin diinokulasikan sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL PPLO *broth*, dibuat serial pengenceran 10 kali hingga pengenceran 10^{-10} . Pengenceran dilakukan duplo. Dibuat kontrol negatif yaitu media PPLO *broth* yang diinokulasikan 1 mL DW steril. Inkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika hasil Uji *Color Changing Unit* (CCU) minimal sama atau lebih dari persyaratan yang direkomendasikan perusahaan pembuat vaksin.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Dua puluh ekor ayam SPF umur sesuai rekomendasi, sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan dan sepuluh ekor ayam SPF lainnya sebagai kontrol. Tidak kurang dari empat belas hari pasca vaksinasi, semua ayam diuji dengan metode uji *Haemagglutination Inhibition* (HI).

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila ayam kelompok kontrol negatif titer antibodi terhadap *M. gallisepticum* dan ayam vaksinasi harus memiliki titer rata-rata minimal 1/99.

2. Penilaian Lesi Kantung Udara

Empat puluh ekor ayam SPF umur minimum sesuai rekomendasi, dua puluh ekor divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan, dan dua puluh ekor sebagai kontrol. Jika *booster* dianjurkan, maka dilakukan dengan interval yang direkomendasikan. Empat belas sampai dua puluh delapan hari pasca vaksinasi terakhir dilakukan uji tantang dengan dosis 0,1 mL (10^8 CFU/mL) biakan *Mycoplasma gallisepticum* virulen, dengan meneteskan pada sinus infraorbitalis atau injeksi pada kantung udara posterior (*posterior thoracic air sac*). Pengamatan dilakukan setiap hari selama 7 - 10 hari selanjutnya ayam dieutanasi dan dinekropsi untuk segera dihitung lesi kantung udara.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika skor lesi kantung udara kelompok vaksinasi signifikan lebih rendah daripada kelompok kontrol dan selisihnya tidak kurang dari 30%.

Cara penghitungan skor lesi dilakukan sebagai berikut:

- 0 : tidak ada lesi pada kantung udara
- 1 : pada daerah terbatas 1-2 kantung udara terdapat kekeruhan, penebalan membran kantung udara atau adanya eksudat berwarna kekuningan
- 2 : pada 1-2 bagian kantung udara berwarna abu-abu atau kuning, terkadang disertai eksudat berbusa serta ada penebalan membran kantung udara
- 3 : pada 3 kantung udara terdapat eksudat berlebih dengan penebalan yang jelas pada kantung udara
- 4 : radang kantung udara parah yang ditandai dengan eksudat dan penebalan pada hampir semua kantung udara

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

I.B.7. VAKSIN MYCOPLASMA SYNOVIAE AKTIF

Definisi

Vaksin mycoplasma synoviae aktif adalah sediaan biakan bakteri *Mycoplasma synoviae* aktif yang diproduksi dalam bentuk sediaan larutan atau kering beku.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kelembaban, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Vaksin berupa suspensi yang mengandung bakteri gram negatif dengan karakteristik morfologik, serologik dan/atau biomolekuler *Mycoplasma synoviae*.

Kandungan Bakteri

Dalam pengujian dibutuhkan 2 (dua) vial vaksin yang masing-masing dilakukan pengenceran sesuai dengan konsentrasi yang direkomendasikan. Pengenceran dilakukan kelipatan 10 kali dengan menggunakan media PPLO *broth*, secara duplo dan diinkubasi pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 5 (lima) hari. Kandungan bakteri ditentukan dengan pengenceran terakhir yang menunjukkan terjadinya perubahan warna pada media sesuai yang direkomendasikan. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika hasil Uji *Color Changing Unit (CCU)* minimal sama atau lebih dari persyaratan yang direkomendasikan.

Keamanan

Dua puluh ekor ayam SPF umur minimal 2 minggu, 10 ekor divaksinasi 10 kali dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan, 10 ekor ayam SPF lainnya sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama masa pengamatan tidak ada reaksi lokal, atau sistemik dan gejala klinis akibat infeksi *Mycoplasma synoviae*.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih salah satu metode berikut:

1. Uji potensi menggunakan 20 ekor ayam SPF umur sesuai dengan rekomendasi, 10 ekor divaksin dengan 1 (satu) dosis, dengan rute aplikasi yang direkomendasikan, 10 ekor lainnya sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu, semua ayam diambil serumnya untuk diuji dengan metode uji *Haemagglutination Inhibition (HI)*.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila ayam kelompok kontrol negatif titer antibodi terhadap *Mycoplasma synoviae* dan ayam kelompok vaksinasi harus memiliki titer rata-rata minimal 1/99.

2. Penilaian Lesi Kantung Udara

Uji potensi menggunakan 40 ekor ayam SPF umursesuai dengan rekomendasi, 20 ekor divaksin dengan 1 (satu) dosis, dengan rute aplikasi yang direkomendasikan, 20 ekor lainnya sebagai kontrol. Apabila dianjurkan untuk *booster*, maka dilakukan dengan interval yang direkomendasikan. Hari ke-14 sampai 28 hari pascavaksinasi terakhir dilakukan ujiantang dengan dosis setara dengan 4.8×10^5 CFU/0,1 mL biakan *Mycoplasma synoviae* strain ganas. Aplikasi dilakukan dengan meneteskan pada *sinus infraorbitalis* atau injeksi pada kantung udara posterior (*posterior thoracic air sac*). Pengamatan dilakukan setiap hari selama 1 - 2 minggu, selanjutnya ayam dieutanasi dan dinekropsi untuk segera dihitung lesi kantung udara.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika kelompok yang divaksin $\geq 70\%$ tidak menunjukkan gejala klinis dan kelompok kontrol tidak kurang dari 70% menunjukkan gejala klinis, dan/atau vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika skor lesi kantung udara kelompok vaksinasi signifikan lebih rendah daripada kelompok kontrol dan selisihnya tidak kurang dari 30%.

Cara penghitungan lesi dilakukan sebagai berikut:

- 0 Tidak ada lesi pada kantung udara
- 1 Pada daerah terbatas 1-2 kantung udara terdapat kekeruhan, penebalan membran kantung udara atau adanya eksudat berwarna kekuningan
- 2 Pada 1-2 bagian kantung udara berwarna abu-abu atau kuning, terkadang disertai eksudat berbusa serta ada penebalan membran kantung udara
- 3 Pada 3 kantung udara terdapat eksudat berlebih dengan penebalan yang jelas pada kantung udara
- 4 Radang kantung udara parah yang ditandai dengan eksudat dan penebalan pada hampir semua kantung udara

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.



II. VAKSIN PARASIT

II.1. VAKSIN COCCIDIOSIS UNGGAS AKTIF (VAKSIN KOKSIDIOSIS UNGGAS AKTIF)

Definisi

Vaksin coccidiosis unggas aktif adalah suspensi biakan ookista bersporulasi dari spesies koksidia (*Eimeria spp*). Vaksin diproduksi dalam bentuk sediaan cair yang digunakan untuk menimbulkan kekebalan aktif pada unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Terdiri dari suspensi *Eimeria spp* yang mempunyai karakteristik morfologik *Eimeria spp*.

Kandungan Ookista

Kandungan ookista bersporulasi per dosis ditentukan dengan menghitung ookista bersporulasi dalam kamar hitung yang sesuai dengan menggunakan mikroskop.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila kandungan ookista bersporulasi tidak kurang dari jumlah minimum dan tidak lebih dari jumlah maksimum yang direkomendasikan.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, tidak pernah diberi koksidostat, divaksinasi 10 dosis pada umur dan rute aplikasi yang direkomendasikan. Jika volume 10 dosis terlalu besar maka digunakan volume terbesar yang memungkinkan untuk diberikan. Pascavaksinasi ayam dipelihara dengan kondisi kandang berlantai padat untuk mencegah reinfeksi ookista. Pengamatan dilakukan selama 21 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam tidak menunjukkan gejala klinis atau mati yang berkenaan dengan vaksin.

Potensi

Dua puluh ekor ayam SPF, tidak pernah diberi koksidostat, divaksinasi dengan dosis dan aplikasi rute yang direkomendasikan. Dua puluh ekor ayam lainnya digunakan sebagai kontrol. Umur ayam yang digunakan tidak boleh lebih dari umur minimal yang direkomendasikan. Antara 14-21 hari pasca vaksinasi, semua ayam ditimbang kemudian ditantang secara PO dengan sejumlah koksidia ganas. Jumlah koksidiaantang harus mampu memacu infeksi pada kelompok kontrol yang ditandai dengan adanya gejala klinis khas *Eimeria* yang digunakan sebagaiantang. Ayam dipelihara dengan kondisi kandang berlantai padat untuk mencegah reinfeksi ookista dan memudahkan untuk melakukan koleksi feses.

Pengamatan dilakukan setiap hari, jumlah ayam yang masih hidup dicatat dan diamati gejala klinisnya. Feses dikumpulkan kemudian produksi ookista dihitung dari hari ke-3

pasca tantang sampai selesai uji. Pada hari ke 4-8 pasca tantang, tergantung dari panjang periode pre-paten masing-masing spesies tantang, semua ayam ditimbang.

Sepuluh ekor ayam dari tiap kelompok dieutanasi untuk diperiksa adanya lesi pada *tractus intestinum*. Setiap lesi spesifik yang mengindikasikan spesies koksidia tantang dicatat.

Skor lesi dari skala 0 – 4 dihitung dengan menggunakan sistem penilaian sebagai berikut:

Eimeria acervulina

- 0 Tidak ada lesi.
- 1 Terdapat lesi plak putih dan menyebar sepanjang dinding *duodenum*. Lesi ini terlihat memanjang menyerupai anak tangga pada daerah permukaan serosa dan mukosa usus. Sebanyak maksimum 5 lesi persentimeter persegi.
- 2 Lesi lebih rapat tetapi tidak menyatu, lesi dapat meluas sepanjang 20 cm *posterior duodenum* pada umur ayam 3 minggu. Dinding usus tidak ada penebalan. Kandungan dari saluran pencernaan normal.
- 3 Lesi sangat banyak sampai bergabung dengan pengurangan ukuran lesi dan tampak berlapis. Dinding usus menebal dan berisi air. Lesi bisa memanjang sampai daerah posterior sampai daerah *diverticulum* kuning telur.
- 4 Dinding mukosa tampak keabu-abuan dengan koloni lesi yang menyatu. Kongesti dapat menimbulkan *ptechiae* kecil atau pada infeksi berat seluruh mukosa terlihat berwarna merah. Lesi individual sedikit tampak pada usus bagian atas. Lesi seperti anak tangga terlihat pada bagian tengah usus. Dinding usus sangat tebal dan berisi eksudat berwarna krem yang mengandung sejumlah besar oosit. Ayam sekarat karena koksidiosis.

Eimeria brunetti

- 0 Tidak ada lesi.
- 1 Tidak ada lesi. Lesi tidak terlihat jelas. Parasit tidak terlihat kecuali jika kerokan usus dilihat di mikroskop mungkin akan ditemukan oosit.
- 2 Dinding usus berwarna abu-abu. Bagian bawah usus menebal dan terdapat plak berwarna merah muda.
- 3 Dinding usus terlihat menebal dan terdapat eksudat kataral sedikit bercak darah. pada rectum bagian bawah terdapat guratan yang melintang dan lesi juga terlihat pada *caecal tonsil* dan terlihat adanya sumbatan mukus.
- 4 Ada nekrosis koagulan yang melebar pada permukaan mukosa usus bagian bawah. Pada beberapa ayam, pada ususnya terdapat membran nekrosis kering seperti garis dan pada *caecal tonsil* ditemukan perkejuan dan masuk menyumbat pada bagian *caecal*. Lesi dapat meluas sampai bagian tengah atau atas usus. Ayam sekarat karena koksidiosis.

Eimeria maxima

- 0 Tidak ada lesi.
- 1 Ada perdarahan *ptechiae* terlihat pada bagian serosa usus bagian tengah. Usus tidak menggelembung atau menebal hanya terdapat segumpal mukus berwarna oranye.
- 2 Permukaan serosa terdapat bercak merah. usus berisi mukus oranye dan terdapat sedikit penebalan dinding usus tanpa menggelembung.
- 3 Dinding usus menggelembung dan menebal. Permukaan mukosa terlihat kasar. Usus berisi mukus dan gumpalan darah.
- 4 Dinding usus menggelembung, memanjang dan berisi banyak gumpalan darah sel darah merah yang rusak dan memberikan karakteristik warna dan bau yang khas. Dinding usus sangat tebal dan ayam tampak sekarat karena koksidiosis.

Eimeria necatrix

- 0 Tidak ada lesi.
- 1 Pada permukaan serosa ditemukan sedikit *ptechiae* yang terpisah dan berpencah dan lesi tersebut menyebabkan kerusakan pada mukosa.
- 2 *Petechia* yang sedang tampak pada permukaan serosa, pada usus bagian tengah terdapat penggelembungan.
- 3 Terdapat perdarahan yang melebar didalam usus. Permukaan serosa terdapat *ptechiae* dengan plak putih, menebal dan kasar ditemukan banyak bercak darah. usus yang normal sudah tidak terlihat lagi karena terjadi penggelembungan yang meluas hampir disemua usus bagian bawah.
- 4 Terdapat perdarahan yang meluas dan usus tampak hitam. Usus berisi mukus berwarna merah kecoklatan. Terjadi penggelembungan hampir pada semua usus. Unggas sekarat karena koksidiosis.

Eimeria tenella

- 0 Tidak ada lesi.
- 1 Terdapat *ptechia* yang terpisah dan tidak ada penebalan pada dinding sekum. Sekum tampak normal.
- 2 Lesi lebih banyak ditemukan pada sekum dan dinding sekum menebal. Sekum tampak normal.
- 3 Banyak ditemukan gumpalan darah pada sekum dan dinding sekum tampak menebal. Hanya terdapat sedikit feses normal pada sekum.
- 4 Dinding sekum terdapat penggejutan yang banyak dan berdarah dan bercampur dengan sedikit sisa-sisa feses. Ayam sekarat karena koksidiosis.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat uji apabila:

1. Untuk semua jenis spesiesantang *Eimeria*, produksi ookista secara signifikan menurun pada ayam vaksinasi dibandingkan dengan ayam kontrol;
2. Untuk semua jenis spesiesantang *Eimeria*, ayam tidak divaksinasi mati karena infeksi dari *seed* tantang;
3. Untuk tantang dengan *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima*, atau *E. brunetti*, tidak kurang dari 80% ayam kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala klinis ringan penyakit dibandingkan dengan ayam kelompok kontrol;
4. Untuk tantang dengan *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima*, atau *E. brunetti*, tidak kurang dari 80% ayam kelompok vaksinasi tidak memiliki atau minimal lesi pada usus (misalnya nilai lesi tidak lebih besar dari 1) dan tidak ada ayam memiliki skor lesi 4;
5. Untuk tantang dengan *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. mitis*, atau *E. praecox*, tingkat pertumbuhan ayam kelompok vaksinasi secara signifikan lebih besar daripada ayam kelompok kontrol.

Uji dinyatakan tidak valid jika:

1. Selama periode antara vaksinasi dan tantang, lebih dari 10% ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol menunjukkan gejala klinis abnormal atau mati karena penyebab yang tidak disebabkan oleh vaksin;
2. Untuk tantang dengan *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima* atau *E. Brunetti*, kurang dari 80% dari ayam kelompok kontrol pada pemeriksaan *post-mortem* antara hari 4 dan 8 terdapat lesi karakteristik infeksi koksidia di usus (misalnya skor lesi tidak kurang dari 2);
3. Untuk tantang dengan *E. mitis* atau *E. praecox*, kurang dari 80% dari ayam kelompok kontrol terinfeksi pada pemeriksaan antara 4 dan 8 hari.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.



III. VAKSIN VIRUS

A. VAKSIN VIRUS INAKTIF

III.A.1. VAKSIN AUJESZKY'S DISEASE INAKTIF

Definisi

Vaksin aujeszky's disease inaktif adalah sediaan suspensi biakan jaringan vaksin mengandung virus *Pseudorabies* yang telah diinaktivasi serta masih bersifat imunogenik untuk babi.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Vaksin akan menggertak terbentuknya antibodi spesifik terhadap virus *pseudorabies* pada babi SAN *pseudorabies*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor mencit yang sehat dan peka, divaksinasi 0,5 mL secara IP atau SC, jika diberikan secara IC dosis yang diberikan adalah 0,03 mL vaksin. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan adanya gejala abnormal atau mati.

2. Tiga ekor kelinci sehat dan peka, divaksinasi dosis 2 mL vaksin secara IM atau SC. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua kelinci tidak menunjukkan gejala abnormal atau mati.

3. Vaksin diinokulasi pada biakan jaringan yang sesuai kemudian diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Pasase dilakukan minimal 2 kali pada biakan jaringan yang sama dengan interval waktu 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila biakan jaringan yang digunakan tidak menunjukkan CPE.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor mencit sehat dan peka, berat badan 18-22 g, divaksinasi 0,5 mL secara IP atau SC. Lima ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan reaksi abnormal.

2. Lima ekor mencit sehat dan peka, berat badan 18-22 g, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Lima ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan reaksi abnormal.

3. Dua ekor marmot sehat dan peka, berat badan 300-500 g, divaksinasi 2 mL secara IP, IM atau SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot tidak menunjukkan reaksi abnormal.

4. Dua ekor babi SAN *Aujeszky's disease*, divaksin 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan

5. Dua ekor babi SAN *Aujeszky's disease*, divaksin 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua babi tidak menunjukkan reaksi abnormal.

Potensi

Lima ekor babi SAN *Aujeszky's disease*, berat badan 15-35 kg, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Lima ekor babi digunakan sebagai kontrol. Tiga minggu pascavaksinasi semua babi ditantang dengan strain ganas virus *pseudorabies* secara intranasal. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu. Semua babi ditimbang berat badannya pada hari ke-7 pascatantang atau pada saat mati.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua babi kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala klinis *pseudorabies* dan perbedaan rata-rata peningkatan tiap hari berat badan kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak kurang dari 1,1 kg.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.2. VAKSIN AVIAN ENCEPHALOMYELITIS INAKTIF

Definisi

Vaksin avian encephalomyelitis inaktif adalah sediaan cair yang mengandung virus *Avian Encephalomyelitis* (AE) yang telah diinaktivasi serta mempertahankan imunogetiknya.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Inaktivasi

Uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan vaksin sebanyak 0,2 mL/telur intra *yolk*sac pada 10 TAB umur 6 hari. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan virus AE pada telur yang diinokulasi sampai pasase kedua.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 30 hari, divaksinasi 2 dosis secara IM. Lima ekor ayam lainnya tidak divaksin sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan semua ayam tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor ayam SPF, umur 30 hari, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Dua puluh satu hari pascavaksinasi semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan virus AE virulen secara IC atau IM. Pengamatan dilakukan selama selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% ayam kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala klinis AE dan tidak kurang dari 80% ayam kontrol mati atau menunjukkan gejala klinis AE.

2. Sepuluh ekor ayam SPF, umur 7-14 hari, divaksinasi dengan dosis yang direkomendasikan secara IM. Lima ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Empat minggu pascavaksinasi semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol diambil darahnya untuk diuji dengan AGPT.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% ayam kelompok vaksinasi positif uji AGPT dan 100% ayam kelompok kontrol negatif uji AGPT

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.3. VAKSIN AVIAN INFLUENZA INAKTIF

Definisi

Vaksin avian influenza inaktif adalah sediaan cair yang mengandung strain virus *Avian influenza* (AI) yang telah diinaktivasi serta masih bersifat imunogenik untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) dan uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Uji identifikasi dapat dilaksanakan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Serologi

- a. Vaksin yang diinjeksikan pada hewan target SPF/SAN menggertak terbentuknya antibodi spesifik yang dapat menghambat kemampuan Haemagglutinasi virus AI yang sesuai dengan strain virus vaksin tersebut.
- b. Vaksin diekstraksi dengan menggunakan n-Heksanol, disentrifugasi kemudian supernatan diambil untuk uji identifikasi secara serologis menggunakan standar antisera spesifik. Vaksin memenuhi syarat apabila strain virus vaksin homolog secara sempurna (100%) terhadap standar antisera spesifik.

2. Molekuler

Vaksin dipisahkan dari adjuvannya kemudian diekstraksi RNAny dan diuji dengan RT-PCR. Jika diperlukan dilanjutkan dengan analisis sekuen asam nukleat (*sequencing*). Vaksin memenuhi syarat apabila identik dengan strain virus vaksin tersebut.

Inaktivasi

Uji inaktivasi menggunakan minimal 10 butir TAB SPF umur 9-11 hari. Setiap butir telur diinokulasi dengan 0,2 mL vaksin ke cairan alantois. Telur diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Pada hari ke-7 cairan alantois dari setiap butir telur diambil dan diuji HA. Selanjutnya dilakukan 2 kali pasase dengan cara yang sama.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua telur yang diinokulasi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan virus AI yang dapat dilihat melalui perubahan embrio maupun uji HA.

Keamanan

Uji keamanan menggunakan 20 ekor ayam SPF umur 21 - 28 hari. Sepuluh ekor ayam dilakukan vaksinasi masing-masing 2 dosis secara IM atau sesuai rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak dilakukan vaksinasi sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam kelompok vaksinasi maupun kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi**1. Vaksin HPAI**

Uji potensi menggunakan metodeantang dan harus dilaksanakan di dalam laboratorium ABSL-3. Sepuluh ekor ayam SPF umur 21 - 28 hari divaksinasi masing-masing 1 dosis secara IM atau sesuai rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Tiga minggu pascavaksinasi, semua ayam ditantang dengan virus AI strain ganas sesuai yang direkomendasikan oleh pemerintah masing-masing 0,1 mL $10^{6,0}$ EID₅₀ secara IM. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila:

- a. Tidak kurang dari 90% ayam kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala klinis penyakit AI, dan tidak kurang 90% ayam kelompok kontrol mati dengan menunjukkan gejala klinis penyakit AI.
- b. Tidak terjadi *shedding* virus setelah hari ke-7 pascatantang virus AI.

Uji *shedding* virus dilakukan sebagai berikut:

Hari ke-8 pasca tantang, ayam kelompok vaksinasi diambil usap trakea dan kloaka untuk analisis *shedding* virus. Suspensi dari tiap usapan diinokulasikan pada TAB SPF, tiap sampel menggunakan 3 butir TAB SPF umur 9-10 hari. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu. Pada hari ke-7 semua cairan allantois telur diambil, lalu diulangi prosedur diatas sampai pasase ketiga. Cairan allantois kemudian diuji dengan uji HA.

2. Vaksin LPAI

Dua puluh ekor ayam SPF umur 21-28 hari dibagi menjadi 2 kelompok. Sepuluh ekor ayam divaksinasi 1 dosis secara IM atau sesuai rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol dan tidak divaksinasi. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila 100% serum ayam vaksinasi mempunyai titer antibodi HI tidak kurang dari 128, sedangkan 100% serum ayam kontrol mempunyai titer kurang dari 4.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.4. VAKSIN BOVINE VIRAL DIARRHEA INAKTIF (VAKSIN DIARE GANAS INAKTIF)

Definisi

Vaksin bovine viral diarrhea inaktif adalah suspensi yang mengandung virus *Bovine Viral Diarrhea* (BVD) yang telah dimurnikan, diinaktivasi serta bersifat imunogenik untuk sapi.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan vaksin pada biakan jaringan yang sesuai atau spesifik.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan virus BVD pada biakan jaringan yang diinokulasi ditandai dengan tidak adanya CPE.

Keamanan

Lima ekor sapi SAN BVD atau titer SN kurang dari 2, umur 6 bulan, berat badan lebih kurang 150 kg, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Tiga ekor sapi lainnya digunakan sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua sapi tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Uji Tantang

Lima ekor sapi SAN BVD atau titer SN kurang dari 2, umur 6 bulan, berat badan lebih kurang 150 kg, divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi sesuai dengan rekomendasi. Tiga ekor sapi digunakan sebagai kontrol.

Empat belas hari pascavaksinasi semua sapi kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan menggunakan virus BVD strain ganas. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 4 ekor sapi kelompok vaksinasi tidak menunjukkan adanya gejala klinis BVD atau tidak terjadi peningkatan suhu badan hingga 40°C dan gangguan respirasi. Sedangkan 2 dari 3 ekor sapi kontrol menunjukkan adanya gejala klinis BVD atau terjadi peningkatan suhu badan hingga 40°C.

2. Uji Serologi

Lima ekor sapi SAN BVD, umur 6 bulan, berat badan lebih kurang 150 kg, divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Tiga ekor sapi digunakan sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Empat belas hari setelah vaksinasi, semua sapi diambil darahnya untuk dilakukan uji titer antibodi serum dengan uji SN terhadap virus BVD strain ganas 50-300 TCID₅₀.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang 80% sapi kelompok vaksinasi mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 8, sedangkan 100% sapi kelompok kontrol mempunyai titer antibodi maksimum dari 2.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.5. VAKSIN CANINE INFECTIOUS HEPATITIS VIRUS INAKTIF

Definisi

Vaksin canine infectious hepatitis virus inaktif adalah sediaan cair yang mengandung strain *Canine Infectious Hepatitis Virus (CIHV)*, yang telah dilemahkan melalui pasase pada biakan jaringan yang peka atau TAB SPF.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Vaksin akan menggertak produksi antibodi spesifik terhadap *CIHV* pada hewan target SAN *CIHV*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan vaksin pada biakan jaringan yang sesuai.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak ada pertumbuhan virus *CIHV* pada biakan jaringan.

Extraneous Pathogen Free

Lima ekor anak mencit yang masih menyusu (*suckling mice*) sehat dan peka, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tetap sehat tanpa timbul gejala *CIHV*.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor marmot sehat dan peka, berat badan 300-500 g, divaksinasi 5 mL secara IP. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, umur 15 minggu, divaksinasi 0,5 mL secara IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot dan mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

2. Dua ekor anjing SAN *CIHV* atau belum pernah divaksinasi dengan vaksin *CIHV*, umur 8-14 minggu, divaksinasi dengan 2 dosis secara SC atau sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anjing tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Dua ekor anjing SAN *CIHV*, umur 8-14 minggu, divaksinasi dengan dosis dan aplikasi sesuai yang direkomendasikan. *Booster* dilakukan pada 14 hari pascavaksinasi pertama. darah anjing diambil pada 14-21 hari pascavaksinasi terakhir untuk diuji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anjing mempunyai titer SN tidak kurang dari 80.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.6. VAKSIN CANINE PARVOVIRUS INAKTIF

Definisi

Vaksin canine parvovirus inaktif adalah suspensi yang mengandung *Parvovirus* Anjing yang diinaktivasi serta bersifat imunogenik untuk anjing.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Vaksin akan menggertak terbentuknya antibodi spesifik *parvovirus* pada anjing SAN *canine parvovirus*.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan vaksin pada biakan jaringan yang sesuai dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan *Canine Parvovirus* pada biakan jaringan yang diinokulasi.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, berat badan 18-22 g, divaksinasi 0,5 mL secara IP atau SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

2. Dua ekor marmot sehat dan peka, berat badan 300-500 g, divaksinasi 2 mL secara IM atau SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

3. Dua ekor anjing SAN *canine parvovirus* atau tidak pernah divaksin dengan *canine hepatitis* vaksin, divaksinasi 1 dosis pada umur minimum dan rute pemberian sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anjing tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor marmot sehat dan peka, berat badan 300-500 g, divaksinasi 0,5 dosis secara SC dan 14 hari pascavaksinasi dilakukan *booster*. Darah diambil 14 hari pascabooster dan serum dipisahkan. Serum diinaktivasi pada 56°C selama 30 menit.

Satu bagian serum ditambah satu bagian kaolin 25%, kemudian didiamkan pada 4°C selama 1 jam lalu disentrifugasi. Uji HI dilakukan pada supernatan dengan antigen 8 unit.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila rata-rata titer antibodi marmot tidak kurang dari 80.

2. Lima ekor mencit sehat dan peka, divaksinasi 0,5 dosis secara SC. Darah diambil 14 hari pascavaksinasi dan serum dipisahkan. Serum diinaktivasi pada 56°C selama 30 menit. Satu bagian serum ditambahkan satu bagian kaolin 25%, kemudian didiamkan pada 4°C selama 1 jam lalu disentrifugasi. Uji HI dilakukan pada supernatan dengan antigen 8 unit.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila rata-rata titer antibodi mencit tidak kurang dari 32.

3. Dua ekor anjing SAN *canine parvovirus* atau memiliki titer antibodi kurang dari 4 ND₅₀ per 0,1 mL serum, umur 8-12 minggu divaksinasi 1 dosis secara SC. Darah diambil pada 14 hari pascavaksinasi dan serum dipisahkan. Serum diinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit, kemudian dilakukan uji SN. Uji yang tidak menghasilkan reaksi antibodi diulang dengan menggunakan dua ekor anjing tambahan dan titer rata-rata diambil dari tiga ekor anjing yang memberikan respon pada uji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila rata-rata titer antibodi tidak kurang dari 32 per 0,1 mL serum.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.7. VAKSIN EGG DROP SYNDROME'76 INAKTIF

Definisi

Vaksin egg drop syndrome'76 inaktif adalah sediaan cair yang mengandung virus *Egg Drop Syndrome'76* (EDS'76) yang telah diinaktivasi serta masih bersifat imunogenik untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Vaksin akan menggetak terbentuknya antibodi spesifik terhadap virus EDS'76 pada ayam SPF.

Inaktivasi

Uji inaktivasi menggunakan minimal 10 butir telur bebek berembrio SPF. Setiap butir telur diinokulasi dengan 0.2 mL, vaksin ke cairan alantois. Telur diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Pada hari ke-7 cairan alantois dari setiap butir telur diambil dan diuji HA. Selanjutnya dilakukan 2 kali pasase dengan cara yang sama.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan tidak terjadi pertumbuhan virus EDS'76 pada telur yang diinokulasi.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 49 hari, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan semua tidak terjadi pertumbuhan virus EDS'76 pada telur yang diinokulasi.

Potensi

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 49 hari, divaksinasi 1 dosis secara IM. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan kelompok kontrol tidak divaksinasi. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu. Pada hari terakhir pengamatan, semua darah ayam kelompok vaksinasi dan ayam kelompok kontrol diambil dan serumnya dipisahkan. Serum ditambah dengan larutan kaolin 25% sebanyak 3 kali volume serum (1:3) dan vortex/mix dalam suhu kamar selama 20 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm per menit selama 10 menit. Uji HI dilakukan terhadap supernatan dengan menggunakan antigen EDS'76 4 HA Unit (HAU).

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila rata-rata hasil uji HI serum ayam vaksinasi mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 16, sedangkan 100% serum ayam kontrol mempunyai titer kurang dari 4.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.8. VAKSIN INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS INAKTIF

Definisi

Vaksin infectious bovine rhinotracheitis inaktif adalah suspensi biakan jaringan yang mengandung virus *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) yang dibiakkan pada biakan jaringan yang sesuai. Virus telah diinaktivasi dengan formalin dan tetap mempertahankan aktifitas imunogeniknya.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Vaksin akan menggertak terbentuknya antibodi spesifik terhadap virus IBR pada hewan target sehat dan peka.

Inaktivasi

Vaksin diinokulasikan pada biakan jaringan yang sesuai dengan yang digunakan pada saat produksi.

Vaksin dinyatakan lulus apabila tidak terjadi pertumbuhan virus.

Keamanan

Dua pedet SAN IBR, umur 3 bulan, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua pedet tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode sebagai berikut:

1. Lima ekor pedet SAN IBR, umur 2-3 bulan, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Dua ekor pedet yang lain digunakan sebagai kontrol. Setelah 21 hari pascavaksinasi, semua pedet ditantang dengan virus IBR strain ganas secara intranasal. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila pedet kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala klinis berat (reaksi ringan dapat terjadi), sedangkan kelompok kontrol menunjukkan gejala spesifik IBR.

2. Lima ekor pedet SAN IBR, umur 2-3 bulan, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Dua ekor pedet digunakan sebagai kontrol. Serum diambil 21 hari pascavaksinasi dari semua pedet dan diuji dengan menggunakan uji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika kelompok pedet vaksinasi memiliki titer tidak kurang dari 8, sedangkan semua pedet kelompok kontrol mempunyai titer antibodi tidak lebih dari 2.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.9. VAKSIN INFECTIOUS BRONCHITIS INAKTIF

Definisi

Vaksin infectious bronchitis inaktif adalah sediaan cair yang mengandung virus *Infectious Bronchitis* (IB) yang telah diinaktivasi serta masih bersifat imunogenik untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Vaksin akan menggertak terbentuknya antibodi spesifik terhadap virus IB pada ayam SPF.

Inaktivasi

Uji inaktivasi menggunakan minimal 10 butir TAB SPF umur 9-11 hari. Setiap butir telur diinokulasi dengan 0.2 mL vaksin ke cairan alantois. Telor diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Selanjutnya dilakukan 2 kali pasase dengan cara yang sama.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan virus IB pada telur yang diinokulasi.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 14-28 hari, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksin digunakan kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak memperlihatkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor ayam SPF, umur 28 hari, divaksinasi dengan dosis sesuai yang direkomendasikan secara IM atau SC. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksin digunakan kelompok kontrol. *Booster* dilakukan pada 2 minggu pascavaksinasi pertama dengan dosis yang sama. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu. Darah semua ayam ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol diambil pada akhir masa pengamatan, dipisahkan serumnya. Serum dari tiap kelompok dikumpulkan menjadi satu, kemudian diinaktivasi dalam penangas air pada 56°C selama 30 menit.

Serum yang telah diinaktivasi dicampur dengan virus IB homolog yang telah diencerkan kelipatan 10 menggunakan larutan PBS bebas kalsium dan magnesium. Campuran ini disimpan dalam penangas air 37°C selama 60 menit atau dalam lemari pendingin 4°C selama 18-24 jam. Setiap campuran ini diinokulasikan pada 5 butir TAB SPF umur 9-11 hari, masing-masing 0,1 mL ke dalam cairan alantois, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 7 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila nilai Indeks Netralisasi (IN) tidak kurang dari 2,0.

2. Dua puluh ekor ayam SPF, divaksinasi 1 dosis pada umur minimal dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Dua puluh ekor ayam lainnya tidak divaksin digunakan sebagai kelompok kontrol. Dua minggu pascavaksinasi, ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol diuji secara serologis.

Vaksin memenuhi syarat apabila nilai GMT dari uji HI ayam kelompok vaksinasi tidak kurang dari 20 dan semua ayam kelompok kontrol negatif.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.10. VAKSIN INFECTIOUS BURSAL DISEASE INAKTIF

Definisi

Vaksin infectious bursal disease inaktif adalah sediaan cair yang mengandung virus *Infectious Bursal Disease* (IBD) yang telah diinaktivasi serta masih bersifat imunogenik untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Vaksin akan menggertak terbentuknya antibodi spesifik terhadap virus IBD pada ayam SPF.

Inaktivasi

Uji inaktivasi menggunakan minimal 10 butir TAB SPF umur 9-11 hari. Setiap butir telur diinokulasi dengan 0.2 mL vaksin ke CAM, *yolk sac* atau cairan alantois. Telur diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Selanjutnya dilakukan 2 kali pasase dengan cara yang sama.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan virus IBD pada telur yang diinokulasi.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, divaksinasi 2 dosis pada umur minimal dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksin digunakan kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor ayam SPF umur 28 hari, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksin digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 21-28 hari. Darah semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol diambil pada akhir masa pengamatan, dipisahkan serumnya. Serum diinaktivasi dalam penangas air pada 56°C selama 30 menit. Uji serologi dengan uji SN. Serum ayam vaksinasi dan kontrol diencerkan kelipatan 2 dari 8 kali sampai 1024 kali dengan media pemeliharaan (*maintenance medium*). Serum dicampur dengan virus IBD 100 TCID₅₀ dengan volume yang sama kemudian diinkubasikan pada 37°C 5% CO₂ selama 60 menit, kemudian ditambahkan 100 µL sel CEF. Campuran diinkubasi pada 37°C 5% CO₂ selama 3–5 hari dan diamati tiap hari terhadap adanya CPE.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% serum ayam kelompok vaksinasi mempunyai nilai tidak kurang dari 512.

2. Dua puluh ekor ayam SPF umur 14-28 hari, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan, sedangkan 5 ekor ayam lainnya sebagai kelompok kontrol. Darah ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol diambil pada 3-4 minggu pascavaksinasi, untuk dititer antibodinya menggunakan metode AGPT.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila rata-rata titer AGPT ayam kelompok vaksinasi tidak kurang dari 32 dan kelompok kontrol kurang dari 2.

3. Dua puluh ekor ayam SPF umur 14-28 hari, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Lima ayam SPF lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Tiga sampai 4 minggu pascavaksinasi, semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan virus IBD virulen. Semua ayam dieutanasia dan dinekropsi pada 3-5 hari pascatantang.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% ayam kelompok vaksinasi tidak memperlihatkan lesi IBD dan tidak kurang dari 80% ayam kelompok kontrol memperlihatkan lesi IBD.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.11. VAKSIN NEWCASTLE DISEASE INAKTIF

Definisi

Vaksin newcastle disease inaktif adalah sediaan cair yang mengandung strain virus *Newcastle Disease* (ND) yang telah diinaktivasi serta masih bersifat imunogenik untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Identifikasi

Uji identifikasi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Serologi

Vaksin yang diinjeksikan pada hewan target SPF menggetak terbentuknya antibodi spesifik terhadap virus ND yang dapat dideteksi dengan uji HI.

2. Molekuler

Vaksin dipisahkan dengan adjuvannya kemudian diekstraksi RNAnya dan diuji dengan RT-PCR. Jika diperlukan dilanjutkan dengan analisis sekuen asam nukleat (*sequencing*).

Vaksin memenuhi syarat apabila identik dengan strain virus vaksin tersebut.

Inaktivasi

Uji inaktivasi dilakukan menggunakan minimal 10 butir TAB SPF umur 9-11 hari. Setiap butir telur diinokulasi dengan 0,2 mL vaksin ke cairan alantois. Telur diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Pada hari ke-7 cairan alantois dari setiap butir telur diambil dan diuji HA. Selanjutnya dilakukan 2 kali pasase dengan cara yang sama. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua telur yang diinokulasi tidak menunjukkan pertumbuhan virus ND yang dapat dilihat melalui perubahan embrio maupun uji HA.

Keamanan

Dua puluh ekor ayam SPF, umur 21-28 hari. sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi dengan 2 dosis secara IM atau sesuai rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2-3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan semua ayam kelompok vaksinasi dan ayam kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala klinis serta tidak menunjukkan efek yang tidak diinginkan akibat pemberian vaksin.

Potensi

Digunakan 20 ekor ayam SPF, umur 21 - 28 hari. sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi dengan 1 dosis secara IM atau sesuai rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol.

Empat belas hari pascavaksinasi, semua ayam ditantang dengan virus ND strain velogenik $10^{4.0}$ CLD₅₀ secara IM. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 90% ayam kelompok vaksinasi tidak memperlihatkan gejala klinis penyakit ND, sedangkan tidak kurang dari 90% ayam kelompok kontrol mati atau memperlihatkan gejala klinis ND.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.12. VAKSIN RABIES INAKTIF

Definisi

Vaksin rabies inaktif adalah sediaan cair yang mengandung virus rabies yang telah diadaptasi dan diinaktivasi serta masih bersifat imunogenik untuk mamalia.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II). Jika vaksin berupa sediaan kering beku, maka harus dilakukan uji kelembaban (Lampiran I) dan uji kevakuman (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin akan menggertak terbentuknya antibodi spesifik virus rabies pada anjing SAN rabies.

Inaktivasi

Uji inaktivasi harus dilakukan di laboratorium ABSL-3. Sepuluh ekor anak mencit sehat dan peka umur 1–3 hari, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Sepuluh ekor anak mencit lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit kelompok vaksinasi dan kontrol tidak menunjukkan adanya gejala klinis terhadap penyakit rabies.

Keamanan

Uji keamanan harus dilakukan di laboratorium ABSL-3 dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, umur 3–4 minggu, divaksinasi 0,5 dosis secara IP. Sepuluh ekor mencit lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

2. Dua ekor hewan target SAN rabies, divaksinasi dengan 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua hewan uji tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi harus dilakukan di laboratorium ABSL-3 dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Metode Habel

Vaksin diencerkan 10 kali dengan larutan garam faali steril. Lima puluh ekor mencit sehat dan peka, berat badan minimal 15 g, umur 4–6 minggu, dibagi menjadi 5 kelompok, divaksinasi 0,25 mL vaksin yang telah diencerkan secara IP.

Penyuntikan dilakukan 6 kali dengan interval 2 hari. Empat puluh ekor mencit lainnya tidak divaksinasi, dibagi menjadi 4 kelompok dan digunakan sebagai kelompok kontrol. Empat belas hari pascavaksinasi, setiap kelompok vaksinasi ditantang secara IC dengan 0,03 mL dari pengenceran virus rabies strain ganas (CVS) 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} per ekor. Sedangkan 4 kelompok mencit kontrol ditantang dengan 0,03 mL dari pengenceran virus rabies strain ganas (CVS) 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8} per ekor. Pengamatan dan pencatatan mencit yang mati atau menunjukkan gejala rabies dalam jangka waktu 5 – 14 hari setelah tantang dilakukan selama 14 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila nilai indeks proteksi antara kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak kurang dari 3,0.

2. Metode NIH (*National Institute of Health*)

Vaksin yang akan diuji dan vaksin referensi (misalnya di NIBSC, *National Institute for Biological Standard and Control*) diencerkan dengan 3 seri pengenceran yang sesuai. Pengenceran terendah diharapkan masih mampu melindungi lebih dari 50%, dan pengenceran tertinggi diharapkan melindungi kurang dari 50%. Vaksin yang sudah diencerkan kemudian diberikan kepada 6 kelompok mencit (tiap kelompok terdiri dari 10 ekor mencit) secara IP dengan dosis 0,5 mL. Setelah 7 hari, dilakukan *booster* dengan dosis dan pengenceran yang sama seperti diatas. Tujuh hari setelah *booster*, dilakukan uji tantang secara IC dengan dosis 0,03 mL yang mengandung virus tantang sebanyak 12–50 LD₅₀. Pengamatan dan pencatatan mencit yang mati atau menunjukkan gejala rabies dalam jangka waktu 5–14 hari setelah tantang dilakukan selama 14 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila nilai potensi tidak kurang dari 1 IU.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.13. VAKSIN SWOLLEN HEAD SYNDROME INAKTIF

Definisi

Vaksin swollen head syndrome inaktif adalah sediaan cair yang mengandung virus *Swollen Head Syndrome* (SHS) yang telah diinaktivasi serta masih bersifat imunogenik untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Inaktivasi

Uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan vaksin pada TAB SPF yang sesuai dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan virus SHS pada telur yang diinokulasi.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 14-28 hari, divaksinasi 2 dosis secara IM. Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksin digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 14-28 hari, divaksinasi 1 dosis secara IM. Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu. Darah ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol pada 3-4 minggu pascavaksinasi diambil dan dipisahkan serumnya. Titer antibodi dapat diuji dengan satu metode berikut: ELISA, metode IFAT, atau uji SN.

Vaksin memenuhi syarat apabila dengan metode IFAT tidak kurang dari 80% ayam kelompok vaksinasi mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 40, dengan metode SN apabila *Geometric Mean Titer* (GMT) dari ayam yang divaksinasi memiliki titer antibodi tidak kurang dari 16. Sedangkan semua ayam kelompok kontrol mempunyai titer antibodi tidak lebih dari 4.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.A.14. VAKSIN VIRAL ARTHRITIS INAKTIF

Definisi

Vaksin viral arthritis inaktif adalah sediaan yang mengandung virus Reo yang telah diinaktivasi serta masih bersifat imunogenik untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji sterilitas (Lampiran II).

Inaktivasi

Uji inaktivasi dengan cara menginokulasikan pada TAB SPF atau biakan jaringan yang sesuai dengan yang digunakan untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi pertumbuhan virus *Viral Arthritis* (VA) pada telur atau biakan jaringan yang digunakan.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, minimal umur 21 hari, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak memperlihatkan gejala abnormal.

Potensi

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 21 hari, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Darah ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol pada minggu ke-3 dan minggu ke-4 pascavaksinasi diambil, dan dipisahkan serumnya. Titer antibodi serum diuji menggunakan uji SN pada sel CEF atau sel vero atau pada sel CEL.

Vaksin memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% ayam kelompok vaksinasi mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 256, sedangkan semua ayam kelompok kontrol mempunyai titer tidak lebih dari 4.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.



III. VAKSIN VIRUS

B. VAKSIN VIRUS AKTIF

III.B.1. VAKSIN AUJESZKY'S DISEASE AKTIF

Definisi

Vaksin aujeszky's disease aktif adalah suspensi biakan jaringan yang mengandung virus *Aujeszký's Disease* (AD) atau *Pseudorabies* hidup yang diatenuasi yang digunakan untuk babi.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin akan menggeratkan terbentuknya antibodi spesifik virus *pseudorabies* pada babi SAN *pseudorabies*.

Extraneous Pathogen Free

1. Vaksin dinetralkan dengan menggunakan antisera monospesifik terhadap virus *pseudorabies* dan diinokulasi pada biakan jaringan yang peka. Biakan jaringan diinkubasikan pada 37°C selama 7 hari. Biakan virus diinokulasi kembali (subpasase) pada biakan jaringan yang sama sekurang-kurangnya satu kali pasase dengan interval waktu 7 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila pada biakan jaringan tidak timbul CPE dan *hemadsorpsi* baik pada jaringan atau suspensi jaringan.

2. Vaksin disuntikkan pada babi SAN *pseudorabies*

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila babi yang divaksinasi timbul antibodi spesifik terhadap *pseudorabies*.

Kandungan virus

Kandungan titer virus dilakukan pada biakan jaringan yang peka atau *chorio-allantoic cavity* TAB SPF.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila vaksin mengandung titer virus tidak kurang dari $10^{2.5}$ TCID₅₀ per dosis.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor mencit sehat dan peka, berat badan 18-22 g, divaksinasi 0,5 mL secara IP atau SC. Lima ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

2. Lima ekor mencit sehat dan peka, berat badan 18-22 g, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Lima ekor mencit lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

3. Dua ekor marmot sehat dan peka, berat badan 300 – 500 g, divaksinasi 2 mL secara IP atau IM atau SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

4. Sekurang-kurangnya 3 ekor anak babi SAN *pseudorabies*, umur 3-4 minggu, divaksinasi 10 kali dosis. Anak babi dengan jumlah dan asal yang sama digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anak babi kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tetap sehat tanpa timbul gejala klinis dan tidak ada perbedaan yang signifikan dalam pertambahan berat badan antara kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor babi SAN *pseudorabies*, divaksinasi sesuai dengan dosis yang direkomendasikan. Lima ekor babi lain tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Empat belas hari setelah vaksinasi, tiap babi dari kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol diuji secara serologis dengan menggunakan uji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang 80% babi kelompok vaksinasi memiliki titer minimal 8 dan semua babi kelompok kontrol memiliki titer 2.

2. Lima ekor babi SAN *pseudorabies*, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Dua ekor babi lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Tiga minggu sampai 4 minggu pascavaksinasi semua babi kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan virus Aujeszky's strain ganas. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua babi kelompok vaksinasi tetap hidup dan tidak menunjukkan gejala klinis AD, sedangkan tidak kurang dari 80% babi kelompok kontrol mati atau menunjukkan gejala klinis AD.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.2. VAKSIN AVIAN ENCEPHALOMYELITIS AKTIF

Definisi

Vaksin avian encephalomyelitis aktif adalah sediaan yang mengandung virus *Avian Encephalomyelitis* (AE) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin disuntikkan ke dalam *yolk-sac* TAB SPF umur 5-6 hari. Pengamatan dilakukan sampai 10 hari setelah menetas. Anak ayam harus memperlihatkan gejala syaraf yang khas dan AE.

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Lampiran XIII.

Kandungan Virus

Vaksin diencerkan secara seri (kelipatan 10) menggunakan larutan PBS bebas kalsium dan magnesium. Setiap pengenceran diinokulasikan pada kelompok telur yang berbeda. Lima butir TAB SPF umur 6 hari dari kelompok yang sama, diinokulasi 0,1 mL enceran vaksin ke dalam *yolk-sac*. Pada hari ke-21 telur ayam kelompok vaksinasi dan kelompok telur ayam kontrol diamati adanya kematian dan kelainan gejala AE. Apabila diperlukan konfirmasi maka dilakukan pemeriksaan histopatologi dari sampel otak anak ayam yang menetas.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila vaksin mengandung titer virus tidak kurang dari $10^{2,5}$ EID₅₀ per dosis.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, divaksinasi 10 dosis secara PO, pada umur tidak boleh melebihi umur minimum yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksin digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor ayam SPF, divaksinasi dengan 1 dosis secara PO, pada umur tidak boleh melebihi dari umur minimal yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol.

Darah ayam kelompok vaksinasi dan kelompok diambil 4 minggu pascavaksinasi dan dipisahkan serumnya. Serum diuji titer antibodinya dengan uji AGPT

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang 80% serum dari ayam vaksinasi positif dengan AGPT, sedangkan 100% kelompok ayam kontrol negatif.

2. Tidak kurang dari 10 ekor ayam SPF, divaksinasi 1 dosis dengan umur tidak boleh melebihi umur minimal vaksinasi dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Dua puluh satu hari pascavaksinasi semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan virus AE strain virulen secara IC atau IM. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% ayam kelompok vaksinasi tidak timbul gejala klinis AE dan tidak kurang dari 80% ayam kontrol mati atau timbul gejala klinis AE.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.3. VAKSIN BOVINE VIRAL DIARRHEA AKTIF

Definisi

Vaksin bovine virus diarrhea (BVD) aktif adalah suspensi yang mengandung virus BVD hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk sapi.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Monografi Umum sediaan biologik.

Kandungan virus

Kandungan titer virus dalam vaksin pada produk akhir dilakukan menggunakan biakan jaringan yang sesuai.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila vaksin mengandung tidak kurang dari $10^{3,0}$ TCID₅₀ per dosis.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, berat badan 18-22 g, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan adanya reaksi abnormal.

2. Sepuluh ekor marmot sehat dan peka, berat badan 300-500 g, divaksinasi 0,5 mL secara IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot tidak menunjukkan adanya reaksi abnormal.

3. Dua ekor sapi SAN BVD, divaksinasi 10 dosis. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua sapi tidak menunjukkan adanya gejala klinis.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Uji Serologi

Lima ekor sapi SAN BVD atau titer kurang dari 1:2 dengan uji SN terhadap 50-300 TCID₅₀ virus BVD, umur 6 bulan, berat badan lebih kurang 150 kg, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan.

Tiga ekor sapi lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Darah sapi kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol pada 2–4 minggu pascavaksinasi diambil, untuk dilakukan uji serologi dengan uji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang 4 ekor dari 5 ekor sapi vaksinasi mempunyai titer SN tidak kurang dari 8.

2. Uji Tantang

Apabila uji SN tidak memenuhi syarat dilakukan uji tantang sebagai berikut: 3 hari sebelum melakukan uji tantang semua sapi diambil darahnya untuk penghitungan leukosit. Uji tantang dilakukan dengan virus BVD strain ganas. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu. Penghitungan leukosit dilakukan pada setiap sapi dimulai hari ke-2 sampai ke-8.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila pada tidak kurang dari 80% sapi kelompok vaksinasi tidak menunjukkan kenaikan suhu badan sampai 40°C selama lebih dari 2 hari atau tidak menunjukkan gejala klinis BVD, sedangkan 2 dari 3 sapi kontrol mengalami leukopenia dan terjadi kenaikan suhu badan sampai 40°C atau memperlihatkan gejala BVD.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.4. VAKSIN CANINE INFECTIOUS HEPATITIS VIRUS AKTIF

Definisi

Vaksin canine infectious hepatitis virus aktif adalah suspensi yang mengandung *Canine Infectious Hepatitis Virus* (CIHV) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk anjing.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin dinetralisasi dengan antisera monospesifik, dipasase pada biakan jaringan atau TAB SPF dalam waktu tertentu dan tidak menimbulkan kerusakan biakan jaringan atau CPE.

Vaksin akan menggertak terbentuknya antibodi spesifik CIHV pada hewan target sehat dan peka.

Extraneous Pathogen Free

Lima ekor anak tikus sehat dan peka, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anak tikus tidak menunjukkan gejala klinis.

Kandungan Virus

Titrasi kandungan virus vaksin pada biakan jaringan ginjal anjing.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung tidak kurang dari $10^{2.5}$ TCID₅₀ per dosis.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, umur 15 minggu, divaksinasi 0,5 mL secara IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

2. Lima ekor marmot sehat dan peka, berat badan 300-500 g, divaksinasi 5 mL secara IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot tidak menunjukkan gejala abnormal

3. Dua ekor anjing SAN CIHV, umur 14-20 minggu, divaksinasi 2 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anjing sehat dan tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Dua ekor anjing SAN CIHV, umur 14-20 minggu, divaksinasi 1 dosis secara IM. Dua ekor anjing tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Dua puluh satu hari pascavaksinasi, semua anjing kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan virus hepatitis strain ganas $1.000LD_{50}$ secara IM atau IV. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anjing kelompok vaksinasi tetap sehat dan semua anjing kontrol mati akibat *hepatitis* atau menunjukkan gejala klinis *hepatitis*.

2. Empat ekor anjing SAN CIHV, divaksinasi dengan dosis, rute aplikasi, dan usia minimal sesuai yang direkomendasikan. Satu ekor anjing lainnya digunakan sebagai kontrol. Empat belas hari pascavaksinasi, kelompok vaksinasi dan kontrol diuji serologis dengan uji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila 75% anjing kelompok vaksinasi memiliki titer minimal 10, dan kontrol memiliki titer 2.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.5. VAKSIN CANINE DISTEMPER AKTIF

Definisi

Vaksin canine distemper aktif adalah sediaan yang mengandung virus *Canine Distemper* virus (CDV) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk anjing.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin dinetralkan dengan antisera monospesifik CDV, dipasase pada biakan jaringan atau TAB SPF dalam waktu tertentu dan tidak menimbulkan CPE atau kerusakan biakan jaringan atau lesi CAM.

Extraneous Pathogen Free

Lima ekor anak tikus sehat dan peka, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin memenuhi syarat apabila semua tikus tidak timbul gejala klinis abnormal *Canine Distemper*.

Kandungan virus

Titrasi vaksin pada biakan jaringan ginjal anjing atau TAB SPF.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung tidak kurang dari 10^3 CCID₅₀ atau 10^3 EID₅₀.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan salah satu cara seperti tersebut di bawah ini:

1. Dua ekor anjing SAN *Canine Distemper*, umur 6-14 minggu, divaksinasi 10 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anjing tidak menunjukkan gejala abnormal.

2. Lima ekor marmot sehat dan peka, berat badan 300-500 g, divaksinasi 5 mL secara IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot tidak menunjukkan gejala abnormal.

3. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, umur 3-4 minggu, divaksinasi 0,5 mL secara IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak ada menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor anjing SAN *Canine Distemper*, umur 8-14 minggu, divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Dua ekor anjing lainnya digunakan sebagai kontrol. Setelah 21 hari pascavaksinasi semua anjing ditantang dengan virus *Canine Distemper* 10^3LD_{50} secara *suboccipital* atau *intracranial* atau IV. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila 100% anjing kelompok vaksinasi tetap sehat dan 100% anjing kelompok kontrol mati atau menunjukkan gejala klinis *Canine Distemper*.

2. Empat ekor anjing SAN *Canine Distemper*, umur 8-14 minggu, divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Satu ekor anjing lainnya digunakan sebagai kontrol. Empat belas hari setelah vaksinasi, kelompok vaksinasi dan kontrol diuji serologis dengan uji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 75% anjing kelompok kontrol memiliki titer minimal 50 dan anjing kontrol memiliki titer 2.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.6. VAKSIN CANINE PARAINFLUENZA AKTIF

Definisi

Vaksin canine parainfluenza aktif adalah suspensi biakan jaringan yang mengandung virus *Canine Parainfluenza* hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk anjing.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin akan menggertak terbentuknya antibodi spesifik virus *canine parainfluenza* pada hewan target sehat dan peka.

Extraneous Pathogen Free

Enam ekor mencit sehat dan peka, berat badan 12-16 g, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 12 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tetap sehat tanpa timbul gejala klinis.

Kandungan Virus

Kandungan virus dititrasi pada biakan jaringan asal anjing atau biakan jaringan yang peka.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila vaksin mengandung titer virus tidak kurang dari $10^{2,5} \text{TCID}_{50}$ per dosis atau minimal seperti yang direkomendasikan/ tertulis pada etiket.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, divaksinasi 0,5 mL secara IP atau SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak ada reaksi abnormal yang timbul pada semua mencit uji.

2. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

3. Dua ekor anjing SAN *canine parainfluenza*, divaksinasi 10 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anjing tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Sepuluh ekor anjing SAN *canine parainfluenza*, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Lima ekor anjing lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Dua puluh satu hari pascavaksinasi, semua anjing ditantang menggunakan virus *parainfluenza* strain ganas. Sebelum ditantang serum semua anjing diambil dan dilakukan uji SN. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu. *Nasal swab* semua anjing diambil pada 14 hari pascatantang untuk diisolasi virusnya.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anjing kelompok vaksinasi tetap sehat dan tidak menunjukkan gejala klinis serta mempunyai titer SN tidak kurang dari 4, sedangkan kelompok kontrol menunjukkan gejala klinis.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.7. VAKSIN CANINE PARVOVIRUS AKTIF

Definisi

Vaksin canine parvovirus aktif adalah sediaan yang mengandung virus *Canine Parvovirus* hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk anjing.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Monografi Umum sediaan biologik.

Kandungan Virus

Sel *Crandel Feline Kidney* (CRFK) dibuat pada mikroplat. Sel CRFK diinokulasi dengan vaksin virus dengan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-8} sebanyak 25 μL setiap pengenceran per lubang, tiap kelompok pengenceran minimum 5 lubang. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu. Amati pembentukan CPE, apabila diperlukan dapat dikonfirmasi dengan uji HA dengan menggunakan eritrosit darah babi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung titer virus $10^{5,0}$ TCID₅₀ per dosis.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Dua ekor anjing SAN *canine parvovirus*, divaksinasi 10 dosis vaksin dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua anjing tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

2. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, umur 3-4 minggu, divaksinasi 0,5 mL secara IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal

Potensi

Empat ekor anjing SAN *canine parvovirus* divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Satu ekor anjing lainnya tidak divaksin sebagai hewan kontrol. Darah anjing kelompok vaksinasi dan kontrol diambil 4 minggu pascavaksinasi dan dipisahkan serumnya. Antibodi dititer dengan uji SN menggunakan 50-300 TCID₅₀ *Canine Parvovirus*.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila 3 dari 4 ekor anjing kelompok vaksinasi mempunyai titer tidak kurang dari 16 dan satu ekor anjing lainnya mempunyai titer tidak kurang dari 8. Sedangkan anjing kontrol mempunyai titer antibodi tidak lebih dari 2.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum

III.B.8. VAKSIN CHICKEN ANEMIA VIRUS AKTIF

Definisi

Vaksin chicken anemia virus aktif adalah sediaan yang mengandung *Chicken Anemia Virus* (CAV) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I), uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) serta uji kelembaban (Lampiran X).

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Lampiran XIII.

Kandungan Virus atau Potensi

Vaksin diencerkan secara seri (kelipatan 10) dengan menggunakan *minimum eagle medium* atau yang sesuai. Setiap pengenceran diinokulasikan 0,1 mL ke dalam biakan sel MDCC (*Marek's Disease Chicken Cell line*) atau biakan sel yang sesuai. Sel diinkubasikan ke dalam inkubator CO₂ selama 5 hari. Pengamatan terhadap adanya CPE dilakukan setiap hari selama 5 hari. Penghitungan kandungan virus dilakukan dengan menggunakan metode *Reed and Muench*.

Vaksin memenuhi syarat apabila kandungan virus tidak kurang dari 10^{4,0}TCID₅₀ per dosis.

Keamanan

Sedikitnya 10 ekor ayam SPF divaksinasi 10 dosis secara *wing web* (tusuk sayap) pada umur minimum yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam kelompok vaksinasi dan ayam kontrol tidak memperlihatkan adanya gejala abnormal.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.9. VAKSIN CONTAGIOUS PUSTULAR DERMATITIS AKTIF

Definisi

Vaksin contagious pustular dermatitis aktif adalah suspensi yang mengandung virus *orf* hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk domba dan kambing.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin jika diaplikasikan pada parutan jaringan kulit domba akan membentuk lesi spesifik *contagious pustular dermatitis*.

Vaksin akan menggeratkan terbentuknya antibodi spesifik virus *contagious pustular dermatitis* pada domba SAN *orf*.

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Monografi Umum sediaan biologik.

Kandungan virus

Vaksin dititrasi pada media yang sama (setara) dengan yang dipakai pada produksi vaksin.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung tidak kurang dari 100 TCID₅₀ tiap dosis atau sesuai dengan yang direkomendasikan.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Dua ekor marmot sehat dan peka, berat badan 300-500 g, divaksinasi 2 mL secara IM atau SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot tidak menunjukkan gejala abnormal.

2. Dua ekor domba SAN *orf*, umur 6-12 bulan, divaksinasi 10 dosis pada kulit yang dilukai (*scarification*). Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua domba tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Dua ekor domba SAN *orf*, umur 6-12 bulan, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Satu ekor domba lain digunakan sebagai kontrol.

Setiap lesi karakteristik penyakit *orf* yang terlihat pada hari ke-4 sampai ke-8 pascavaksinasi harus dicatat.

Dua minggu pascavaksinasi semua hewan vaksinasi dan hewan kontrol ditantang dengan virus *orf*.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua domba kelompok vaksinasi tidak menunjukkan adanya gejala klinis, sedangkan domba kontrol menunjukkan gejala klinis penyakit *orf*.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.10. VAKSIN FELINE CALICIVIRUS AKTIF

Definisi

Vaksin feline calicivirus aktif adalah suspensi biakan jaringan yang mengandung *Feline Calicivirus Virus* (FCV) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk kucing.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Jika diinokulasikan pada biakan jaringan asal kucing menimbulkan CPE, dapat dihambat dengan pemakaian antisera spesifik.

Extraneous Pathogen Free

Enam ekor mencit sehat dan peka, berat badan 12-16 g, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama tidak kurang dari 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan abnormal.

Kandungan virus

Kandungan virus dititrasi pada biakan jaringan yang sesuai dengan biakan jaringan yang dipakai untuk produksi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung tidak kurang dari $10^{3,0}$ TCID₅₀ per dosis atau sama seperti yang direkomendasikan.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, umur 3-4 minggu, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

2. Dua ekor kucing SAN FCV, umur tidak lebih dari 12 minggu, divaksinasi 10 kali dosis dengan rute aplikasi seperti yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua kucing tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Dua ekor kucing SAN FCV, umur tidak lebih dari 12 minggu, divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi sesuai seperti yang direkomendasikan. Dua ekor kucing lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol.

Dua puluh satu hari pascavaksinasi, semua kucing kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan FCV strain ganas secara *intranasal*. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua kucing vaksinasi tetap sehat dan semua kucing kontrol menunjukkan gejala klinis saluran pernafasan bagian atas yang disebabkan FCV.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.11. VAKSIN FELINE PANLEUKOPENIA VIRUS AKTIF

Definisi

Vaksin feline panleukopenia virus aktif adalah suspensi biakan jaringan yang mengandung virus *feline panleukopenia* (FPV) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk kucing.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Jika diinokulasi pada biakan jaringan asal kucing menimbulkan CPE, dapat dihambat dengan pemakaian antisera spesifik.

Extraneous Pathogen Free

Enam ekor mencit sehat dan peka, berat badan 12-16 g, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama tidak kurang dari 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

Kandungan Virus

Kandungan virus dititrasikan pada biakan jaringan asal kucing atau biakan jaringan yang peka.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung tidak kurang dari $10^{3,0}$ TCID₅₀ per dosis atau minimal sama seperti yang direkomendasikan.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, umur 3-4 minggu, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

2. Dua ekor kucing SAN FPV, umur tidak lebih dari 12 minggu, divaksinasi 10 kali dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua kucing tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Dua ekor kucing SAN FPV, umur tidak kurang dari 12 minggu, divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Dua ekor kucing lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol.

Dua puluh satu hari pascavaksinasi semua kucing ditantang dengan strain ganas FPV. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua kucing vaksinasi tetap sehat tanpa timbul gejala klinis FPV. Sedangkan semua kucing kontrol menunjukkan gejala klinis FPV.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.12. VAKSIN FELINE VIRAL RHINOTRACHEITIS AKTIF

Definisi

Vaksin feline viral rhinotracheitis aktif adalah suspensi biakan jaringan yang mengandung virus *Feline Viral Rhinotracheitis* (FVR) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk kucing.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Jika diinokulasikan pada biakan jaringan asal kucing menimbulkan CPE, dapat dihambat dengan pemakaian antisera spesifik.

Extraneous Pathogen Free

Enam ekor mencit sehat dan peka, berat badan 12-16 g, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama tidak kurang dari 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

Kandungan Virus

Kandungan virus dititrasi pada biakan jaringan asal kucing atau biakan jaringan yang peka.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung tidak kurang dari $10^{3,0}$ TCID₅₀ per dosis atau minimal sama seperti yang direkomendasikan.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, umur 3-4 minggu, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

2. Dua ekor kucing SAN FVR, umur tidak lebih dari 12 minggu, divaksinasi 10 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua kucing tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Dua ekor kucing SAN FVR, umur tidak kurang dari 12 minggu, divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Dua ekor kucing lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol.

Dua puluh satu hari pascavaksinasi semua kucing ditantang dengan strain ganas FVR secara intranasal. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua kucing kelompok vaksinasi tetap sehat tanpa menunjukkan gejala klinis FVR atau tidak menunjukkan kenaikan suhu badan. Sedangkan semua kucing kelompok kontrol menunjukkan gejala klinis FVR dan atau disertai peningkatan suhu badan yang diikuti sekresi *mucopurulent* dari mata dan hidung.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.13. VAKSIN FOWL POX AKTIF

Definisi

Vaksin fowl pox aktif adalah sediaan yang mengandung virus aktif *Fowl Pox* (FP) atau virus *Pigeon Pox* hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas.

Umum

Untuk harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I), uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) serta uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin yang diinokulasikan pada TAB SPF menimbulkan *pox* dan jika vaksin direaksikan dengan antiserum monospesifik virus *fowl pox* akan terjadi netralisasi.

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Lampiran XIII.

Kandungan Virus

Vaksin diencerkan secara seri (kelipatan 10) menggunakan larutan PBS bebas kalsium dan magnesium. Setiap pengenceran diinokulasikan masing-masing 0,1 mL ke dalam CAM 5 butir TAB SPF umur 10-12 hari. Telur yang telah diinokulasi diinkubasikan pada 37°C selama 5-7 hari. Embrio yang mati dalam waktu 24 jam setelah inokulasi dibuang. Embrio yang terinfeksi adalah embrio yang ditandai dengan adanya plak (*Pox*) pada CAM.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung tidak kurang dari $10^{3,0}$ EID₅₀ per dosis.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 4 hari atau 4 minggu, divaksinasi 10 dosis secara tusuk sayap. Lima ekor ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu. Bercak cacar pada sayap akan berkurang secara berangsur-angsur dan sudah hilang pada hari ke-21 setelah divaksinasi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam kelompok vaksinasi dan semua kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 4 hari atau 4 minggu, divaksinasi 1 dosis secara tusuk sayap. Lima ekor ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Dua minggu pascavaksinasi ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan virus FP strain ganas yang dapat menimbulkan *scarification*. Pengamatan dilakukan selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 90% ayam kelompok vaksinasi tidak menunjukkan adanya lesi FP dan tidak kurang dari 90% ayam kelompok kontrol menunjukkan lesi FP.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.14. VAKSIN HOG CHOLERA AKTIF

Definisi

Vaksin hog cholera aktif diproduksi dari virus *Hog Cholera* (HC) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk babi.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin diinokulasikan pada biakan jaringan ginjal babi atau biakan jaringan yang peka menyebabkan pengaruh CPE yang dapat dihambat dengan antisera spesifik *Hog Cholera*.

Extraneous Pathogen Free

Netralisasi vaksin dengan antisera spesifik HC pada biakan jaringan asal babi atau biakan jaringan yang peka terhadap virus HC strain ganas dari babi atau terhadap residu virus ganas yang lain dalam vaksin.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak menyebabkan timbulnya CPE pada biakan jaringan yang digunakan dan tidak menyebabkan timbulnya hemadsorpsi pada biakan jaringan serta bebas dari agen-agen yang dapat menyebabkan hemaglutinasi.

Kandungan Virus

Kandungan virus dititrasikan pada biakan jaringan asal babi atau biakan jaringan yang peka.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung titer virus tidak kurang dari $10^{2,3}$ TCID₅₀ per dosis atau tidak kurang dari titer minimal yang direkomendasikan.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor mencit sehat dan peka, divaksinasi 0,5 mL secara SC atau IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

2. Dua ekor marmot sehat dan peka, divaksinasi 2 mL secara IP. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua marmot tidak menunjukkan gejala abnormal.

-
3. Dua ekor babi SAN HC, divaksin 10 dosis pada umur minimal dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua babi tidak terjadi reaksi abnormal.

Potensi

Empat ekor babi SAN HC, divaksinasi 1/100 dosis pada umur minimal dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. produsen. Dua ekor babi lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Dua minggu pascavaksinasi, semua babi kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan virus virulen HC. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua babi kelompok vaksinasi sehat tanpa timbul gejala klinik HC, sedangkan semua babi kelompok kontrol mati atau menunjukkan gejala klinis HC.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.15. VAKSIN INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS AKTIF

Definisi

Vaksin infectious bovine rhinotracheitis aktif adalah suspensi biakan jaringan yang mengandung virus *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk sapi.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin diinokulasikan pada biakan jaringan asal sapi atau biakan jaringan yang peka menyebabkan timbulnya CPE yang dapat dihambat dengan antisera spesifik IBR.

Extraneous Pathogen Free

Netralisasi vaksin dengan antisera spesifik IBR pada biakan jaringan asal sapi atau biakan jaringan yang peka terhadap virus IBR strain ganas dari sapi atau terhadap residu virus ganas yang lain dalam vaksin.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak menyebabkan timbulnya CPE pada biakan jaringan yang digunakan dan tidak menyebabkan timbulnya hemadsorpsi pada biakan jaringan serta bebas dari agen-agen yang dapat menyebabkan hemaglutinasi.

Kandungan Virus

Kandungan virus dititrasi pada biakan jaringan asal sapi atau biakan jaringan yang peka.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung tidak kurang dari titer minimal yang direkomendasikan.

Keamanan

Uji keamanan dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Dua ekor pedet SAN IBR, umur 3-6 bulan, divaksinasi 10 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua pedet tidak menunjukkan adanya gejala abnormal.

2. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, divaksinasi 0,5 mL secara IP atau SC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

3. Sepuluh ekor mencit sehat dan peka, divaksinasi 0,03 mL secara IC. Pengamatan dilakukan selama 1 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua mencit tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Lima ekor sapi SAN IBR, umur minimal 3 bulan, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Dua ekor sapi digunakan sebagai kelompok kontrol. Semua sapi kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan virus IBR strain ganas pada 14-21 hari pascavaksinasi secara intranasal. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua sapi kelompok vaksinasi tidak menunjukkan gejala klinis IBR yang berat (reaksi ringan dapat terjadi), sedangkan kelompok kontrol menunjukkan gejala klinis IBR.

2. Lima ekor sapi SAN IBR, umur minimal 3 bulan, divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Dua ekor sapi lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol. Darah semua sapi kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol diambil pada 21 hari pascavaksinasi untuk diuji secara serologis dengan menggunakan uji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua sapi kelompok vaksinasi memiliki titer minimal 8, sedangkan sapi kelompok kontrol memiliki titer maksimum 2.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.16. VAKSIN INFECTIOUS BRONCHITIS (IB) AKTIF

Definisi

Vaksin infectious bronchitis aktif adalah sediaan yang mengandung virus *Infectious Bronchitis* (IB) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) dan uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Vaksin direaksikan dengan anti serum monospesifik virus IB strain yang sama dengan vaksin, kemudian diinokulasi pada TAB SPF umur 9-11 hari atau biakan jaringan yang sesuai.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila vaksin tidak dapat menginfeksi TAB SPF atau biakan jaringan.

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Lampiran XIII.

Kandungan Virus

Vaksin diencerkan secara seri (kelipatan 10) dengan menggunakan larutan PBS bebas kalsium dan magnesium. Setiap pengenceran diinokulasi 0,1 mL per butir ke dalam ruang alantois 5 butir TAB SPF umur 9-11 hari. Telur yang telah diinokulasi diinkubasi pada 37°C selama 7 hari. Embrio yang terinfeksi adalah embrio yang mati atau yang memperlihatkan gejala hambatan pertumbuhan misalnya hipoplasia dan *dwarfing/ curling*.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung titer virus tidak kurang dari $10^{2,5}$ EID₅₀ per dosis.

Keamanan

Sepuluh ekor anak ayam SPF umur 4 hari, divaksinasi 10 dosis secara tetes mata. Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Sepuluh ekor anak ayam SPF umur 4 hari, divaksinasi 1 dosis secara tetes mata. Sepuluh ekor anak ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Pada akhir masa pengamatan ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol diambil darahnya dan dipisahkan serumnya. Serum ayam dari kelompok yang sama dijadikan satu, kemudian diinaktivasi dalam penangas air pada 56°C selama 30 menit. Virus IB homolog dengan strain vaksin yang diuji diencerkan kelipatan 10 menggunakan larutan PBS bebas kalsium dan magnesium. Serum yang telah diinaktivasi dicampur dengan virus yang telah diencerkan kelipatan 10 dengan volume yang sama. Campuran ini disimpan dalam penangas air 37°C selama 60 menit atau dalam lemari pendingin 4°C selama 18-24 jam. Setiap campuran diinokulasikan 0,1 mL per butir ke dalam cairan alantois 5 butir TAB SPF umur 9-11 hari. Telur yang telah diinokulasi diinkubasikan pada 37°C selama 7 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila Indeks Netralisasi tidak kurang dari 2,0.

2. Dua puluh ekor ayam SPF, umur 21-28 hari, divaksinasi 1 dosis secara *intraocular* atau intranasal. Pada 21-28 hari pascavaksinasi, semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang 10^3 – $10^{3,5}$ EID₅₀ virus IB homolog secara *intraocular* atau intranasal.

Pada 4-7 hari pascatantang, dilakukan *tracheal swab*, kemudian 0,2 mL swab trakea diinokulasikan ke cairan alantois TAB SPF umur 9-11 hari. Tiap *swab* diinokulasikan pada 5 butir TAB SPF. Inkubasi telur selama 6-8 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila virusantang tidak dapat diisolasi paling sedikit 90% dari *swab* trakea ayam kelompok vaksinasi. Sedangkan virusantang dapat diisolasi paling sedikit 90% dari *swab* trakea ayam kelompok kontrol.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.17. VAKSIN INFECTIOUS BURSAL DISEASE AKTIF

Definisi

Vaksin infectious bursal disease aktif adalah sediaan yang mengandung virus *Infectious Bursal Disease* (IBD) strain *mild*, *intermediate* atau *intermediate plus (hot)* hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I), uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) serta uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Uji identifikasi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

Apabila direaksikan dengan antiserum monospesifik, virus IBD tidak mampu menginfeksi biakan jaringan yang peka maupun TAB SPF umur 9 - 11 hari.

PCR atau uji lainnya, sesuai dengan referensi internasional.

Kandungan Virus

Vaksin diencerkan secara seri (kelipatan 10) dengan menggunakan larutan PBS steril hingga konsentrasi akhir 10^{-4} . Setiap pengenceran diinokulasikan pada 5 butir TAB SPF masing-masing 0,1 mL ke dalam ruang alantois. Telur yang telah diinokulasi diinkubasikan pada 37°C selama 7 hari dan pengamatan dilakukan setiap hari. Embrio yang terinfeksi adalah embrio yang mati pada hari kedua sampai akhir pengamatan atau yang memperlihatkan gejala spesifik IBD.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila titer virus dalam vaksin tidak kurang dari $10^{3,0} \text{EID}_{50}$ per dosis untuk strain *mild* dan tidak kurang dari $10^{2,0} \text{EID}_{50}$ untuk strain *intermediate* dan *intermediate plus*. Pengujian dapat dilanjutkan pada biakan jaringan yang sesuai, apabila gejala klinis pada telur embrio tidak terlihat jelas.

Keamanan

1. Vaksin IBD strain *Mild*

Dua puluh ekor ayam SPF, umur tidak lebih dari 14 hari. Sepuluh ekor ayam SPF masing-masing divaksinasi 10 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 3 minggu.

Vaksin memenuhi syarat apabila pada akhir pengamatan semua ayam tidak menunjukkan gejala klinis IBD seperti diare berair keputihan, anoreksia, depresi, bulu kusam, tremor dan lemah, serta tidak memperlihatkan perubahan patologi anatomi seperti *ptechiae*, atrofi dan *yellowish* pada bursa fabrisius.

2. Vaksin IBD *strain Intermediate*

Digunakan dua puluh ekor ayam SPF, umur tidak lebih dari 14 hari. Sepuluh ekor ayam SPF masing-masing divaksinasi 10 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 35 hari. Pada akhir pengamatan, berat badan ayam dan bursa ditimbang, kemudian dihitung *Index Bursal Body Weight Ratio* (IBBWR).

Vaksin memenuhi syarat apabila pada akhir pengamatan semua ayam tidak menunjukkan gejala klinis IBD, tidak ada kematian karena IBD, dan nilai IBBWR vaksin *strain intermediate* $\geq 0,5$.

3. Vaksin IBD *strain Intermediate Plus*

Digunakan dua puluh ekor ayam SPF, umur tidak lebih dari 14 hari. Sepuluh ekor ayam SPF masing-masing divaksinasi 10 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 35 hari. Pada akhir pengamatan, berat badan ayam dan bursa ditimbang, kemudian dihitung *Index Bursal Body Weight Ratio* (IBBWR).

Vaksin memenuhi syarat apabila pada akhir pengamatan semua ayam tidak menunjukkan gejala klinis IBD, tidak ada kematian karena IBD, dan nilai IBBWR vaksin *strain intermediate plus* $\geq 0,3$.

Potensi

Uji potensi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Uji Tantang

Tiga puluh ekor ayam SPF, umur 14-28 hari. Dua puluh ekor ayam SPF divaksinasi dengan dosis dan rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya digunakan sebagai kontrol. Empat belas hari pascavaksinasi, semua ayam ditantang dengan virus IBD strain ganas secara tetes mata. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 2 minggu. Pada akhir masa pengamatan semua ayam dieutanasia dan dinekropsi untuk melihat lesi bursa fabrisiusnya. Penilaian skala kerusakan bursa dapat dilakukan sebagai berikut:

Skala	Keterangan
0	tidak ada lesi, bursa normal
1	1-25% folikel bursa menunjukkan deplesi limfoid yang disertai adanya heterofil dalam lesi (contohnya kurang dari 50% deplesi dalam satu folikel terinfeksi).
2	26-50% folikel menunjukkan deplesi limfoid yang hampir lengkap, folikel yang terinfeksi menunjukkan nekrosis dan ditemukan heterofil yang cukup banyak (lebih dari 75% deplesi dalam satu folikel terinfeksi).
3	51-75% folikel menunjukkan deplesi limfoid lengkap, folikel yang terinfeksi menunjukkan nekrosis dan ditemukan heterofil yang cukup banyak.

4	76-100% folikel menunjukkan deplesi yang hampir lengkap dan terjadi <i>hyperplasia</i> dan struktur <i>cyst</i> , folikel-folikel yang terinfeksi menunjukkan nekrosis dan ditemukan heterofil yang cukup banyak.
5	100% folikel menunjukkan deplesi total yang ditandai dengan struktur folikel, adanya penebalan dari epitel <i>cyst</i> dan adanya fibrosis di jaringan ikat.

Perhitungan skor bursa dilakukan dengan menghitung rata-rata skala bursa kelompok ayam vaksinasi.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 90% ayam vaksinasi hidup, tidak menunjukkan gejala klinis IBD dan skor lesi bursa fabrisius kurang dari 3.

2. Uji Serologi

Dua puluh ekor ayam SPF, umur maksimal 2 minggu. Sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi 1 dosis dengan rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya sebagai kontrol. Dua puluh satu hari pascavaksinasi, semua ayam diambil darahnya dan dipisahkan serumnya. Titer antibodi dalam serum diuji secara serologi dengan uji SN. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila dengan uji SN serum ayam kelompok vaksinasi mempunyai titer tidak kurang dari 512, sedangkan ayam kelompok kontrol mempunyai titer kurang dari 2.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.18. VAKSIN INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS AKTIF

Definisi

Vaksin infectious laryngotracheitis aktif adalah sediaan yang mengandung virus aktif *Infectious Laryngo Tracheitis* (ILT) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I), uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) serta uji kelembaban (Lampiran X)

Identifikasi

Vaksin yang diinokulasikan pada TAB yang peka akan menimbulkan bercak-bercak (*pock*) pada CAM dan jika vaksin direaksikan dengan antiserum monospesifik ILT akan terjadi netralisasi.

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Lampiran XIII.

Kandungan Virus

Vaksin diencerkan secara seri (kelipatan 10) dengan menggunakan larutan PBS bebas kalsium dan magnesium. Setiap pengenceran diinokulasikan 0,1 mL per butir ke dalam CAM 5 butir TAB SPF umur 10-12 hari. Telur diinkubasi pada 37°C selama 5-7 hari. Embrio yang terinfeksi adalah embrio yang ditandai adanya plak pada CAM.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung titer virus tidak kurang dari $10^{2,5}$ EID₅₀.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi 10 dosis secara tetes mata pada umur sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksinasi sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam vaksinasi dan semua ayam kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi 1 dosis secara tetes mata. Umur ayam tidak boleh melebihi umur minimal yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Empat belas hari pascavaksinasi semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan virusantang ILT strain ganas dosis $10^{3,0}$ EID₅₀ secara intra trakea. Pengamatan dilakukan selama 10-21 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 90% ayam yang divaksin tetap hidup tanpa memperlihatkan gejala khas penyakit ILT sedangkan 80% dari ayam-ayam kelompok kontrol memperlihatkan gejala-gejala khas ILT.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.19. VAKSIN MAREK'S DISEASE AKTIF

Definisi

Vaksin marek's disease aktif adalah sediaan yang mengandung virus *Marek's Disease* hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas.

Umum

Vaksin dalam bentuk kering beku harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I), uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) serta uji kelembaban (Lampiran X). Sedangkan vaksin beku (*frozen*) hanya memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian (Lampiran I) serta uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III).

Identifikasi

Saat direaksikan dengan antiserum monospesifik Virus Herpes Kalkun (HVT/Marek's) tidak menimbulkan CPE dalam biakan jaringan yang peka.

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Lampiran XIII.

Kandungan Virus

Uji kandungan virus dilakukan tergantung dari bentuk sediaan vaksin.

- Vaksin sediaan beku (*frozen*) diencerkan menjadi 1/20 dosis dan 1/40 dosis (vaksin beku/*frozen*) per 0,2 mL.
- Vaksin kering beku (*freeze dried*) diencerkan menjadi 1/20 dosis dan 1/80 dosis per 0,2 mL.

Vaksin yang sudah diencerkan diinokulasikan pada 4 cawan petri biakan CEF dan diinkubasi 37°C 5% CO₂ selama 60 menit, kemudian dituangkan media pemeliharaan (MM) sebanyak 4 mL percawan dan diinkubasi lagi selama 5-7 hari. Setelah diinkubasi, biakan difiksasi dengan methanol dingin selama 30 menit, fokus yang terbentuk dihitung.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila:

- Vaksin bentuk beku titer virus dalam vaksin tidak kurang dari 1.000 PFU
- Vaksin bentuk kering beku titer virus tidak kurang dari 1.500 PFU.

Keamanan

Sepuluh ekor ayam SPF umur 4 hari, divaksin 100 dosis secara SC. Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 7 minggu.

Pada akhir masa pengamatan semua ayam dieutanasia dan dinekropsi untuk diperiksa secara makroskopis dan histopatologis organ-organ: kulit, otot, syaraf, jantung, ginjal, limpa, hati, paru-paru, pankreas, *gonade* (indung telur), *bursa fabrisius*, *proventrikulus*, *duodenum* dan seka-tonsil.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam kelompok vaksinasi dan ayam kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Sepuluh ekor anak ayam SPF, umur 1 hari, divaksinasi 1 dosis secara SC. Sepuluh ekor anak ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengambilan darah ayam pascavaksinasi untuk uji serologis tergantung strain vaksin yang digunakan, sebagai berikut:

- a. Strain HVT 3 minggu
- b. Strain SBI 5 minggu
- c. Strain CVI 7 minggu.

Serum diencerkan 40 kali dengan menggunakan larutan PBS bebas kalsium. Serum yang telah diencerkan diinokulasikan pada biakan CEF yang telah diinfeksi virus Marek's strain homolog. Campuran biakan ini diinkubasi pada 37°C dalam kotak lembab selama 45 menit, kemudian dicuci 3 kali dalam larutan PBS bebas kalsium dan magnesium. Teteskan *anti-chicken IgG fluorescen labelled antibody* 4 unit kemudian diinkubasi pada 37°C dalam kotak lembab selama 45 menit. Setelah dicuci lagi dengan larutan PBS dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop fluoresen.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila dengan uji IFAT tidak kurang dari 80% serum ayam yang divaksinasi hasilnya positif.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.20. VAKSIN NEWCASTLE DISEASE AKTIF

Definisi

Vaksin newcastle disease aktif adalah sediaan kering beku yang mengandung strain virus *Newcastle Disease* (ND) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas-

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I), uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *Fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) serta uji kelembaban (Lampiran X).

Identifikasi

Uji identifikasi dapat dilakukan dengan memilih satu dari metode berikut:

1. Serologi

Vaksin yang diinjeksikan pada hewan target SPF menggertak terbentuknya antibodi spesifik terhadap virus ND yang dapat dideteksi dengan uji HI.

2. Molekuler

Vaksin dilarutkan kemudian diekstraksi RNAny dan diuji dengan RT-PCR. Jika dipandang perlu dapat dilanjutkan dengan analisis sekuen asam nukleat (*sequencing*).

Vaksin memenuhi syarat apabila mempunyai kemiripan yang tinggi dengan strain virus vaksin tersebut.

Kandungan virus

Vaksin diencerkan secara seri (kelipatan 10) dengan menggunakan larutan PBS steril hingga pengenceran 10^{-7} . Setiap pengenceran diinokulasikan pada 5 butir TAB SPF masing-masing 0,1 mL ke dalam ruang alantois. Telur yang telah diinokulasi diinkubasikan pada 37°C selama 7 hari dan pengamatan dilakukan setiap hari. Embrio yang terinfeksi adalah embrio yang mati pada hari kedua sampai akhir pengamatan dan cairan alantois dapat mengaglutinasi sel darah merah ayam.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila mengandung titer virus tidak kurang dari $10^{6,5}$ EID₅₀ untuk strain lentogenik dan tidak kurang dari $10^{5,0}$ EID₅₀ untuk strain mesogenik

Keamanan

Dua puluh ekor ayam SPF, umur 1-4 hari. Sepuluh ekor ayam SPF masing-masing divaksinasi 10 dosis secara tetes mata atau rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam lainnya sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila :

- a. Strain lentogenik, 100% ayam kelompok vaksinasi dan ayam kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala klinis serta tidak menunjukkan efek yang tidak diinginkan akibat pemberian vaksin.
- b. Strain mesogenik, tidak kurang dari 90% ayam kelompok vaksinasi dan 100% ayam kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala klinis serta tidak menunjukkan efek yang tidak diinginkan akibat pemberian vaksin.

Potensi

Dua puluh ekor ayam SPF, umur 21 -28 hari. Sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi dengan 1 dosis secara tetes mata atau rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Empat belas hari pascavaksinasi, semua ayam ditantang dengan virus ND strain velogenik $10^{4.0}$ CLD₅₀ secara IM. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 90% ayam kelompok vaksinasi tidak memperlihatkan gejala klinis penyakit ND, sedangkan tidak kurang dari 90% ayam kelompok kontrol mati atau memperlihatkan gejala klinis ND.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.21. VAKSIN SWOLLEN HEAD SYNDROME AKTIF

Definisi

Vaksin swollen head syndrome aktif adalah sediaan yang mengandung virus aktif *swollen head syndrome* (SHS) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I), uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) serta uji kelembaban (Lampiran X).

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous patogen free* seperti pada Lampiran XIII.

Kandungan virus

Vaksin diencerkan secara seri (kelipatan 10) dengan menggunakan larutan PBS bebas kalsium dan magnesium. Setiap pengenceran diinokulasikan 0,1 mL ke dalam biakan jaringan yang sesuai kemudian diinkubasikan ke dalam inkubator CO₂. Pengamatan dilakukan terhadap timbulnya CPE selama 3-5 hari. Penghitungan kandungan virus dilakukan dengan menggunakan metode *Reed and Muench*.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila titer virus tidak kurang dari 10^{4,0} TCID₅₀ per dosis

Keamanan

Sedikitnya 10 ekor ayam SPF, umur 4 minggu, divaksinasi 10 dosis per ekor dengan rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal.

Potensi

Sepuluh ekor ayam SPF umur 4 minggu, divaksinasi 1 dosis rute aplikasi sesuai dengan rekomendasi. Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Tiga minggu pascavaksinasi, semua ayam kelompok vaksinasi maupun kontrol diambil darahnya dan dipisahkan serumnya. Serum diuji titer antibodinya dengan menggunakan uji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila ayam kelompok vaksinasi tetap hidup dan tidak menunjukkan gejala klinis SHS, serta *Geometrical Mean Titer* (GMT) ayam yang divaksinasi menghasilkan titer SN tidak kurang dari 16 dan GMT ayam kontrol tidak lebih dari 4.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.

III.B.22. VAKSIN VIRAL ARTHRITIS AKTIF

Definisi

Vaksin viral arthritis aktif adalah sediaan yang mengandung virus reo atau *Viral Arthritis* (VA) hidup yang diatenuasi dan digunakan untuk unggas.

Umum

Vaksin harus memenuhi persyaratan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kevakuman dan kemurnian (Lampiran I), uji kontaminasi *Mycoplasma*, *Salmonella*, *fungi* dan jasad renik hidup lain (Lampiran III) serta uji kelembaban (Lampiran X).

Extraneous Pathogen Free

Vaksin dilakukan uji *extraneous pathogen free* seperti pada Lampiran XIII.

Kandungan virus

Vaksin diencerkan secara seri (kelipatan 10) dengan menggunakan larutan PBS bebas kalsium dan magnesium. Setiap pengenceran diinokulasikan 0,1 mL ke dalam biakan jaringan yang sesuai kemudian diinkubasikan ke dalam inkubator CO₂. Pengamatan dilakukan terhadap adanya CPE selama 3-5 hari. Penghitungan kandungan virus dilakukan dengan menggunakan metode *Reed and Muench*.

Vaksin memenuhi syarat apabila memiliki kandungan virus tidak kurang 10^{2,0} TCID₅₀ per dosis.

Keamanan

Dua puluh ekor ayam SPF umur 1-4 hari dibagi menjadi 2 kelompok. Sepuluh ekor ayam divaksinasi masing-masing 10 dosis secara tetes mata atau sesuai rute aplikasi yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 3 minggu. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam vaksinasi dan ayam kontrol tidak memperlihatkan gejala klinis dari penyakit VA.

Potensi

Uji potensi dilakukan dengan metode tantang menggunakan 20 ekor ayam SPF umur 14-42 hari. Sepuluh ekor ayam divaksinasi masing-masing 1 dosis rute aplikasi sesuai yang direkomendasikan. Sepuluh ekor ayam SPF lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Empat minggu pascavaksinasi, semua ayam kelompok vaksinasi maupun kelompok kontrol diambil darahnya dan dipisahkan serumnya. Serum diuji titer antibodinya dengan menggunakan uji SN.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila ayam kelompok vaksinasi mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 40 dan semua kelompok kontrol mempunyai titer antibodi tidak lebih dari 4.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum.



IV. BAHAN DIAGNOSTIKA

IV. 1. ANTIGEN BRUCELLA ABORTUS RBT

Definisi

Antigen Brucella RBT adalah antigen *Brucella* untuk uji Rose yang merupakan suspensi bakteri *Brucella abortus* yang telah dimatikan dan ditambah zat warna, digunakan untuk uji aglutinasi cepat.

Umum

Antigen harus dilakukan uji umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian seperti pada Lampiran I

Variasi

Sediaan diencerkan dengan larutan dapar faali yang mengandung fenol 0,5% sehingga konsentrasinya menjadi 10 kali dari derajat kekeruhan tabung *Mac Farland* No.1; antigen yang telah diencerkan digunakan untuk uji sebagai berikut :

a. Variasi terhadap panas

Sediaan dipanaskan pada suhu 100°C selama 30 menit.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi aglutinasi.

b. Variasi terhadap asam.

Pada tiga buah tabung yang masing-masing berisi 0,5 mL larutan *Clark* dan *Lubs* dengan pH 2,4; 4,6; dan 6,8 ditambah 0,5 mL antigen. Kemudian campuran ini disimpan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi aglutinasi.

c. Variasi terhadap akriflavin.

Pada 0,5 mL sediaan ditambahkan 0,5 mL larutan akriflavin 0,2% kemudian disimpan pada 37°C selama 18 - 24 jam.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi aglutinasi.

Identifikasi

Antigen yang diuji diencerkan 10 kali dengan larutan dapar faali yang mengandung fenol 0,5%. Dibuat 3 set yang masing-masing terdiri dari serum positif yang telah diketahui titernya dan 3 set yang masing-masing terdiri dari serum negatif. Dibuat suatu seri pengenceran dengan kelipatan 2 dari pengenceran serum tersebut di atas. Tiap 0,5 mL serum yang telah diencerkan tersebut ditambahkan 0,5 mL antigen yang telah diencerkan 10 kali. Kemudian campuran tadi disimpan pada 37°C selama 18-24 jam.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila pada serum positif menunjukkan aglutinasi sesuai dengan titer positif yang digunakan, sedangkan dengan serum negatif harus tidak menunjukkan aglutinasi.

Potensi

Dipakai serum positif 30 IU/mL dan 20 IU/mL. Satu tetes dan masing-masing serum positif dicampur dengan 2 tetes antigen yang diuji. Setelah diaduk dengan sempurna, diamati terjadinya aglutinasi.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila menunjukkan aglutinasi pada serum positif 30 IU/mL dalam waktu 2-5 menit, sedangkan pada serum positif 20 IU/mL harus tidak menunjukkan aglutinasi sampai 5 menit.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum FOHI Jilid I (Sediaan Biologik).

IV. 2. ANTIGEN BRUCELLA ABORTUS SAT

Definisi

Antigen *Brucella abortus* SAT adalah antigen *brucella* yang digunakan untuk uji aglutinasi tabung yang merupakan suspensi bakteri *Brucella abortus* yang telah dimatikan dan di dalamnya ditambahkan bahan pengawet.

Umum

Antigen harus dilakukan uji umum yang meliputi uji flsik dan kemurnian seperti pada Lampiran I serta uji sterilitas seperti pada lampiran II.

Variasi

Antigen diencerkan dengan fenol 0,5% dalam larutan dapar faali sehingga konsentrasinya menjadi 10 kali dari derajat kekeruhan tabung *Mc Farland* No.1. Antigen yang telah diencerkan ini kemudian digunakan untuk uji sebagai berikut:

- a. Variasi terhadap panas
Sediaan antigen yang diuji dipanaskan pada 100°C selama 30 menit. Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi aglutinasi
- b. Variasi terhadap asam
Pada masing-masing tabung yang berisi 0,5 mL larutan *Clark* dan *Lubs* dengan pH 2,4; 4,6; dan 6,8 ditambahkan 0,5 mL sediaan antigen yang diuji. Kemudian campuran disimpan pada 37°C selama 18-24 jam.
Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi aglutinasi.
- c. Variasi terhadap akriflavin
Pada 0,5 mL antigen ditambahkan 0,5 mL larutan akriflavin 0,2% kemudian disimpan pada 37°C selama 18-24 jam.
Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak terjadi aglutinasi.

Konsentrasi bakteri

Antigen diencerkan dengan larutan dapar faali, konsentrasi ditentukan dengan spektrofotometer. Metode selengkapnya seperti pada Lampiran IX.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila konsentrasi antigen yang diuji antara 150 -250% dari kekeruhan tabung *Mc Farland* No.1.

Identifikasi

Antigen yang diuji diencerkan 10 kali dengan larutan dapar faali yang mengandung fenol 0,5% dibuat 3 set yang masing-masing terdiri dari serum positif yang telah diketahui titernya dari 3 set yang masing-masing terdiri dari serum negatif. Dibuat suatu seri pengenceran dengan kelipatan dua dari semua pengencer serum tersebut di atas.

Tiap 0,5 mL serum yang telah diencerkan tersebut ditambahkan dengan 0,5 mL antigen yang telah diencerkan 10 kali. Kemudian campuran tadi disimpan pada 37°C selama 18 - 24 jam.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila pada serum positif menunjukkan aglutinasi sesuai dengan titer positif yang digunakan, sedangkan serum negatif tidak menunjukkan adanya aglutinasi.

Potensi

Standar serum positif 1.000 IU/mL diencerkan dengan 0,5% fenol salin menjadi 1:100; 1:150; 1:200; 1:250; 1:300; 1:350; 1:400. Tiap 0,5 mL pengenceran serum ditambahkan 0,5 mL antigen yang telah diencerkan 10 kali kemudian disimpan pada 37°C selama 18-24 jam, kemudian derajat aglutinasinya dibandingkan dengan tabung-tabung standar tersebut.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila pada pengenceran akhir 1:400 terjadi aglutinasi 50%.

Pembuatan larutan standar untuk penilai uji adalah sebagai berikut:

No.	Derajat	Larutan Standar	Keterangan
1	0%	antigen	0,5 mL larutan ditambah 0,5 mL 0,5% fenol salin
2	25%	tiga bagian antigen dan satu bagian 0,5% fenol-salin	0,5 mL larutan ditambah 0,5 mL 0,5% fenol salin
3	50%	dua bagian antigen dan dua bagian 0,5% fenol salin	0,5 mL larutan ditambah 0,5 mL 0,5% fenol salin
4	75%	satu bagian antigen dan tiga bagian 0,5% fenol salin	0,5 mL larutan ditambah 0,5 mL 0,5% fenol salin

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum FOHI Jilid I (Sediaan Biologik).

IV. 3. ANTIGEN MYCOPLASMA GALLISEPTICUM

Definisi

Antigen *Mycoplasma gallisepticum* adalah suatu suspensi bakteri *Mycoplasma gallisepticum* yang telah dimatikan dan ditambah zat warna. Digunakan untuk uji aglutinasi cepat untuk mengetahui adanya penyakit yang disebabkan oleh *Mycoplasma gallisepticum*.

Umum

Antigen harus dilakukan uji umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian seperti pada Lampiran I serta uji sterilitas seperti pada Lampiran II.

Identifikasi

Dilaksanakan dengan cara aglutinasi cepat dengan menggunakan 3 standar serum positif, 3 standar serum negatif dan 3 sampel darah ayam negatif *Mycoplasma gallisepticum*. Dua tetes antigen ($\pm 0,06$ mL), baik yang diuji maupun antigen pembanding masing-masing ditetaskan pada lempeng kaca secara berdampingan, kemudian ditetaskan 1 tetes ($\pm 0,03$ mL) standar serum pada masing-masing antigen tersebut dan campur dengan baik. Hal ini dilakukan untuk semua serum standar dan sampel darah ayam negatif. Diamati waktu terjadinya aglutinasi dengan menggunakan pencatat waktu. Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila terhadap serum positif menunjukkan adanya aglutinasi dan terhadap serum negatif serta darah ayam yang negatif tidak menunjukkan adanya aglutinasi.

Potensi

1. Aglutinasi cepat

Antigen pembanding yang digunakan adalah antigen yang telah memenuhi syarat pada uji sebelumnya. Pada uji ini dipakai 8 ekor ayam positif *Mycoplasma gallisepticum* dan 4 ekor ayam yang negatif *Mycoplasma gallisepticum*. Dua tetes ($\pm 0,06$ mL) antigen baik yang diuji maupun antigen pembanding masing-masing ditetaskan terpisah pada lempeng kaca, kemudian ditetaskan 1 tetes ($\pm 0,03$ mL) darah ayam pada masing-masing antigen tersebut dan masing-masing dicampur sampai homogen. Uji ini dilakukan pada 25° - 30° C. Waktu terjadinya aglutinasi diamati dengan menggunakan *timer*. Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila waktu terjadinya aglutinasi antigen yang diuji harus tidak jauh berbeda dengan waktu terjadinya aglutinasi antigen pembanding.

2. Aglutinasi Tabung

Antigen yang diuji dan antigen pembanding (antigen yang telah lulus uji sebelumnya) masing-masing diencerkan 1:12,5 dengan menggunakan larutan dapar faali. Serum darah ayam positif dan negatif *Mycoplasma* yang dipakai dalam uji ini dititrasi kandungan antibodinya dengan menggunakan kedua antigen (antigen yang diuji dan antigen pembanding).

Masing-masing 0,5 mL serum positif maupun serum negatif yang telah diencerkan ditambahkan 0,5 mL antigen dan dieramkan dalam penangas air pada 37°C selama 2 jam, kemudian didiamkan pada 4°C selama satu malam. Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila titer yang diperoleh dari antigen yang diuji dan antigen pembanding hampir sama.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum FOHI Jilid I (Sediaan Biologik).

IV.4. ANTIGEN SALMONELLA PULLORUM

Definisi

Antigen *Salmonella pullorum* adalah suatu suspensi bakteri *Salmonella pullorum* yang telah dimatikan dan ditambah zat warna digunakan untuk uji aglutinasi cepat, guna mengetahui adanya penyakit pullorum.

Umum

Antigen harus dilakukan uji umum yang meliputi uji fisik dan kemurnian seperti pada Lampiran I serta uji sterilitas seperti pada Lampiran II.

Identifikasi

Dilakukan dengan cara aglutinasi cepat menggunakan 3 standar serum positif, 3 standar serum negatif dan 3 sampel darah ayam negatif antibodi *Salmonella pullorum*. Dua tetes ($\pm 0,06$ mL) antigen, baik yang diuji maupun perbandingan, masing-masing ditetaskan pada lempeng kaca secara berdampingan, kemudian ditetaskan 1 tetes ($\pm 0,03$ mL) standar serum pada masing-masing antigen tersebut dan dicampur sampai homogen. Diamati waktu terjadinya aglutinasi dengan menggunakan *timer*.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila terhadap serum positif menunjukkan adanya aglutinasi dan terhadap serum negatif dari darah ayam negatif harus tidak menunjukkan adanya aglutinasi.

Potensi

Digunakan 8 ekor ayam positif *Salmonella pullorum* dan 4 ekor ayam negatif *Salmonella pullorum*. Antigen perbandingan dalam uji ini adalah antigen yang telah lulus pada uji terdahulu. Dua tetes antigen ($\pm 0,06$ mL) baik yang diuji maupun perbandingan masing-masing ditetaskan pada lempeng kaca, kemudian ditetaskan 1 tetes ($\pm 0,03$ mL) darah masing-masing antigen dan dicampur sampai homogen. Uji dilakukan pada suhu 25°- 30°C. Diamati dan dicatat waktu terjadinya aglutinasi. Pengamatan dilakukan sampai 2 menit.

Antigen dinyatakan memenuhi syarat apabila kedua antigen menunjukkan aglutinasi terhadap darah ayam positif *Salmonella pullorum* dan tidak menunjukkan aglutinasi terhadap darah ayam negatif *Salmonella pullorum*. Waktu terjadinya aglutinasi antigen yang diuji dan antigen perbandingan hampir bersamaan.

Penandaan

Penandaan disesuaikan dengan ketentuan penandaan untuk vaksin hewan, seperti tertera pada Monografi Umum FOHI Jilid I (Sediaan Biologik).



LAMPIRAN

LAMPIRAN I

PENGUJIAN UMUM SEDIAAN BIOLOGIK

Sediaan biologik untuk obat hewan adalah vaksin, antigen dan antisera yang dihasilkan dari jasad renik (virus, bakteri, parasit dan protozoa) yang digunakan untuk pengobatan, pencegahan atau diagnosa. Untuk menilai kualitas suatu sediaan biologik obat hewan perlu juga dilakukan pengujian umum yang meliputi uji fisik, kemurnian, sterilitas, kontaminasi (*Mycoplasma*, *Salmonella*, *Fungi* dan jasad renik hidup lain). Disamping itu untuk sediaan tertentu perlu uji kevakuman dan kelembaban.

Metode Uji

1. Uji fisik

Paling sedikit 4 wadah sediaan dipakai dalam uji ini. Pada uji ini harus diperhatikan: warna, homogenitas, volume, dan kemungkinan adanya partikel asing dalam setiap wadah.

Sediaan dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap sediaan mempunyai volume, warna, dan tidak mengandung partikel asing dan harus homogen.

2. Uji Kemurnian

Paling sedikit 4 wadah sediaan dipakai dalam uji ini. Pada uji ini masing-masing isi wadah dicampur menjadi satu hingga homogen. Campuran ini dibuat preparat apus (*smear*) di atas gelas obyek dan kemudian diwarnai dengan larutan pewarna *Giemsa* (1:20) selama 10 menit. Selanjutnya preparat ini diperiksa di bawah mikroskop pembesaran 40x, tidak kurang dari 30 lapang pandang. Pada sediaan yang mengandung *adjuvan* minyak sediaan disentrifugasi terlebih dahulu.

Sediaan dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap sediaan hanya menunjukkan adanya jasad renik yang sama dengan jasad renik yang dipakai dalam produksi.

3. Uji Kevakuman

Uji ini hanya dipakai untuk sediaan bentuk vakum kering beku kecuali dipersyaratkan lain. Paling sedikit 4 wadah sediaan harus dipakai dalam uji ini dan dilakukan di ruang gelap. Semua sediaan yang dipakai dalam uji ini diletakkan di atas tempat dengan latar belakang yang gelap, kemudian disinari dengan menggunakan *tesla coil set* pada jarak lebih dari 5 mm.

Sediaan dinyatakan memenuhi syarat apabila sinar ultra violet dari *tesla coil set* dapat menembus ampul atau vial dari sediaan yang diuji.

Uji sterilitas dilakukan untuk memastikan bebas kontaminasi bakteri lain dan *fungi* pada vaksin bakteri aktif, vaksin bakteri inaktif, vaksin virus inaktif dan vaksin virus aktif kecuali vaksin virus aktif untuk unggas yang hidup dalam sediaan yang diuji. Uji sterilitas harus dilaksanakan di dalam laboratorium dengan level *biosafety* dan menggunakan *laminar flow cabinet* atau *biosafety cabinet* (BSC) sesuai dengan yang dipersyaratkan, dikontrol udara dan permukaannya.

Media

Media untuk pengujian ini harus dapat menumbuhkan bakteri dan *fungi*.

LAMPIRAN II

UJI STERILITAS SEDIAAN BIOLOGIK

Inkubasi

Inkubasi uji sterilitas untuk mendeteksi bakteri pada 30°-37°C dan untuk mendeteksi *fungi* pada 20°-25°C.

Uji sterilitas untuk sediaan biologik

1. Gambaran Umum

- a. Inokulasi harus dilakukan secara aseptik.
- b. Ruang steril harus dijaga bersih sempurna sebelum dipakai, ruangan dan lampu ultraviolet dalam *laminar flow* harus selalu menyala atau BSC sesuai dengan yang dipersyaratkan dan meja kerja *laminar flow* disemprot dengan larutan alkohol 70%.
- c. Petugas yang melakukan uji di dalam ruangan steril ini harus menggunakan pakaian laboratorium, topi, masker dan sarung tangan yang telah disucihamakan.

2. Media

Sediaan tertentu harus menggunakan media cair *thioglycolate* (TGC), *Soybean Casein Digest* (SCD), dan *heart infusion agar* (HIA). Media yang akan dipakai harus diperiksa terlebih dahulu kualitasnya, hanya medium yang kualitasnya baik dapat dipergunakan.

Cara uji kualitas media yang digunakan untuk uji sterilitas terdapat dalam Lampiran XIV.

3. Inokulasi

- a. Sediaan dengan volume kemasan 2 mL, diinokulasikan 0,5 mL masing-masing pada 4 tabung yang berisi @ 20 mL media TGC dan @ 20 mL media SCD.
- b. Sediaan dengan volume kemasan 5 mL atau lebih diinokulasikan 1 mL masing-masing pada 4 tabung yang berisi @ 20 mL media TGC dan @ 20 mL media SCD.
- c. Untuk vaksin bakteri aktif, selain diinokulasikan pada media TGC dan @ 20 mL media SCD, juga diinokulasikan 1 mL masing-masing pada 3 tabung media HIA.

4. Inkubasi

- a. Dua tabung TGC dan dua tabung SCD yang telah diinokulasi, diinkubasikan pada 22°C selama 14 hari. Dua tabung media TGC dan dua tabung SCD lainnya diinkubasikan pada 37°C selama 14 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke-3, ke-7, dan ke-14.
- b. Media HIA yang telah diinokulasi, semua diinkubasikan pada 37°C selama 7 hari

Sediaan biologik dinyatakan memenuhi persyaratan apabila tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan *fungi* (kapang dan khamir) dalam media yang digunakan, sedangkan pada vaksin bakteri aktif hanya tumbuh bakteri seperti yang dipakai dalam produksi.

LAMPIRAN III

UJI KONTAMINASI MYCOPLASMA, SALMONELLA, E. COLI, FUNGI DAN JASAD RENIK HIDUP LAIN PADA VAKSIN VIRUS AKTIF UNTUK UNGGAS

1. Uji Kontaminasi *Mycoplasma*

Media yang diperlukan dalam uji ini adalah media *Pleuro pneumoniae like organisme* (PPLO) cair dan media PPLO agar. Uji ini dipakai 4 kemasan sampel, 2 kemasan yang di uji (sediaan vakum kering beku), dilarutkan ke dalam satu wadah pelarutnya (konsentrasi 2 kali waktu pemakaian vaksin). Vaksin diinokulasikan 1 mL ke dalam 20 mL media PPLO cair. Sedangkan sediaan bentuk cair, volume inokulasi 2 mL per tabung media. Inkubasi dilakukan pada 37°C selama 7 hari. Biakan ini kemudian dipasase (diinokulasikan) kembali 1 mL ke dalam 10 mL media PPLO cair. Pasase dilakukan dengan cara yang sama sebanyak 3 kali dengan interval 7 hari. Turunan biakan pasase terakhir diambil 0,1 mL diinokulasikan pada media PPLO agar dan diinkubasikan pada 37°C 5% CO₂ selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak menunjukkan adanya pertumbuhan *Mycoplasma* pada semua media yang digunakan.

2. Uji Kontaminasi *Salmonella* dan *E.coli*

Media yang digunakan dalam uji ini adalah media *selenite* cair, *soybean casein digest* (SCD) cair, media *deoxycholate lactose* (DHL) agar dan media *bromthymol blue lactose* (BTB *Lactose*) agar. Uji ini dipakai 4 kemasan sampel, 2 kemasan yang di uji, dilarutkan ke dalam satu wadah pelarutnya (konsentrasi 2 kali waktu pemakaian vaksin) dan dicampur hingga homogen. Sebanyak 5 mL sediaan diinokulasikan ke dalam masing-masing 100 mL media *selenite* cair dan 100 mL media SCD cair atau 1 mL sediaan diinokulasikan ke dalam masing-masing 20 mL media *selenite* cair dan 20 mL media SCD cair. Sedangkan untuk sediaan bentuk cair volume inokulasi 10 mL dalam 100 mL botol media atau 2 mL dalam 20 mL botol media. Inkubasikan pada 37°C selama 18-24 jam. Kemudian 0,1 mL biakan dari masing-masing media cair tersebut diinokulasikan kembali pada media DHL agar dan BTB *Lactose* agar, kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 18-24 jam.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Salmonella* dan *E. coli* pada semua jenis media.

3. Uji Kontaminasi *Fungi*

Media yang digunakan dalam uji ini adalah media TGC cair untuk sediaan yang mengandung *thimerosal* dan media SCD cair untuk sediaan yang tidak mengandung *thimerosal*. Uji ini dipakai 4 kemasan sampel, 2 kemasan yang di uji (sediaan vakum kering beku), dilarutkan ke dalam satu wadah pelarutnya (konsentrasi 2 kali waktu pemakaian vaksin) dan dicampur hingga homogen.

Sebanyak 1 mL vaksin diinokulasikan ke dalam masing-masing media. Sedangkan untuk sediaan bentuk cair volume diinokulasikan 2 mL tiap botol media. Pada uji ini digunakan 2 tabung media kemudian diinkubasi pada 22°C selama 14 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke-3, ke-7, dan ke-14, apabila timbul kekeruhan pada hari ke-7, biakan tersebut dipindahkan ke media baru dan diinkubasi dengan cara yang sama. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila vaksin yang diuji tidak menunjukkan adanya pertumbuhan jamur pada semua jenis media.

4. Uji Kontaminasi Jasad Renik Hidup Lain

Media yang digunakan adalah media HIA. Uji ini dipakai 4 kemasan sampel, 2 kemasan yang di uji (sediaan vakum kering beku), dilarutkan ke dalam satu wadah pelarutnya (konsentrasi 2 kali waktu pemakaian vaksin) dan dicampur sampai homogen. Sebanyak 1 mL sediaan diinokulasikan ke dalam cawan media. Pada uji ini digunakan 4 cawan media. Kemudian 2 cawan diinkubasikan pada 37°C selama 2 hari dan 2 cawan sisanya diinkubasikan pada 22°C selama 4 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila sediaan vaksin yang rute aplikasinya lewat suntik tidak boleh menunjukkan adanya pertumbuhan jasad renik pathogen, sedangkan sediaan vaksin yang rute aplikasinya tidak melalui suntik, tidak boleh menunjukkan pertumbuhan jasad renik lebih dari 1 (satu) koloni setiap dosis vaksin.

LAMPIRAN IV

UJI KONTAMINASI MYCOPLASMA PADA VAKSIN VIRUS AKTIF NON UNGGAS

Gunakan media yang mampu untuk menumbuhkan semua spesies *Mycoplasma*, dan telah diketahui mampu untuk menumbuhkan *Mycoplasma hyopneumoniae*. Untuk menguji media, dianjurkan untuk menggunakan galur *Mycoplasma* yang memiliki pasase rendah (*low passase*). Lakukanlah uji pada media cair yang mengandung fenol *red* dan media padat sehingga apabila digunakan bersama akan memberikan kondisi pertumbuhan optimal untuk semua *Mycoplasma* yang bersifat kontaminan.

Jika perlu, semua zat penghambat yang ada di dalam sampel vaksin, dinetralisasi dengan prosedur netralisasi yang efektif.

Prosedur Uji

Uji ini memakai 4 kemasan sampel, 2 kemasan sediaan (sediaan vakum kering beku), dilarutkan dalam satu wadah pelarutnya (konsentrasi 2 kali waktu pemakaian vaksin). Sebanyak 1 mL larutan vaksin diinokulasikan ke dalam 20 mL media PPLO cair, sedangkan sediaan bentuk cair, volume inokulasi 2 mL per tabung media. Inkubasikan pada 37°C selama 7 hari. Biakan ini kemudian diinokulasikan kembali ke dalam 10 mL media PPLO cair sebanyak 1 mL tiap tabung medium melalui pasase dengan interval 7 hari sebanyak 3 kali pasase dan turunan biakan terakhir ini diambil 0,1 mL diinokulasikan pada media PPLO agar dan diinkubasikan pada 37°C 5% CO₂ selama 10 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak menunjukkan adanya pertumbuhan *Mycoplasma* pada semua media yang digunakan.

LAMPIRAN V

UJI BIOLOGIS ANTITOKSIN *CLOSTRIDIUM SEPTICUM*

Potensi antitoksin *Clostridium septicum* ditentukan dengan membandingkan dosis yang diperlukan untuk melindungi mencit atau hewan lainnya yang sesuai, terhadap efek toksin *Clostridium septicum* dengan dosis standar dari antitoksin *Clostridium* yang ditentukan untuk memberikan perlindungan yang sama.

Untuk perbandingan ini dibutuhkan standar preparat dari antitoksin gas gangren (*Clostridium septicum*) dan suatu preparat yang sesuai dari toksin *Clostridium septicum*. Dosis uji dari toksin ditentukan berhubungan dengan standar preparat anti toksin dan potensi dari preparat yang diperiksa kemudian ditentukan dalam hubungannya dengan sediaan standar dengan menggunakan toksin yang diuji.

Sediaan Standar

Suatu sediaan standar adalah standar internasional, yang terbuat dari *horse serum hyper-immune* kering (dalam ampul, mengandung 500 unit), atau preparat lain yang sesuai, dimana potensinya telah ditentukan dalam hubungannya dengan Standar Internasional.

Metode

1. Penyiapan Toksin Uji

Toksin *Clostridium septicum* dipersiapkan dari suatu filtrat steril dari biakan *Clostridium septicum* yang berusia kurang lebih 5 hari dan dikeringkan dengan metode yang sesuai.

2. Seleksi Toksin Uji

Toksin yang diseleksi untuk digunakan sebagai toksin uji dengan menentukan jumlahnya sebagai berikut : L+/5 dosis ini merupakan jumlah yang paling kecil dari vaksin, dimana apabila dicampur dengan 0,2 unit antitoksin dan disuntikkan secara IV atau IP kepada mencit, dapat menyebabkan kematian dalam tempo 72 jam. LD₅₀ adalah jumlah toksin yang apabila diinjeksikan secara IV atau IP kepada mencit yang dapat menyebabkan kematian dalam tempo 72 jam pada separuh mencit yang disuntik. Toksin yang sesuai adalah suatu toksin yang memiliki 1 +15 dosis di dalam 1,0 mg dan mengandung tidak kurang dari 10 LD₅₀ di dalam L+/5 dosis.

3. Penetapan Dosis Uji dari Toksin

Sejumlah toksin kering dilarutkan dalam larutan yang sesuai, sehingga 1,0 mL mengandung sejumlah yang tepat misalnya 4 mg. Preparat Standar dilarutkan dengan larutan yang sesuai untuk mendapatkan larutan yang mengandung 1,0 unit dalam 1 mL. Larutan toksin dan larutan standar dicampur sehingga 5,0 mL dari masing-masing campuran mengandung 2,0 mL larutan Preparat Standar (2 unit) dari suatu seri tingkat volume dari larutan toksin. Masing-masing campuran dilarutkan pada volume akhir yang sama dengan cairan yang sesuai.

Campuran didiamkan pada suhu kamar, dilindungi dari cahaya. selama 60 menit dan kemudian disuntikkan 1 dosis 0,5 mL tiap-tiap campuran secara IV atau IP pada masing-masing tidak kurang dari 2 ekor mencit. Pengamatan dilakukan selama 72 jam.

Jika semua mencit mati, jumlah toksin yang ada di dalam 0,5 mL campuran melebihi dosis uji. Jika tidak satupun mencit mati, jumlah toksin yang ada di dalam 0,5 mL campuran adalah kurang dari dosis uji. Campuran segar dipersiapkan, tiap 5,0 mL dari tiap- tiap campuran mengandung 2,0 mL Larutan Preparat Standar (2 unit) dari satu seri volume bertingkat dari larutan toksin dipisahkan satu sama lain dengan tingkat tidak lebih dari 20% dan mencapai titik akhir (*end point*) yang diharapkan.

Campuran didiamkan pada suhu kamar, dilindungi dari cahaya selama 60 menit. Dua ekor mencit masing-masing disuntikkan 1 dosis 0,5 mL dari masing-masing campuran secara IV atau IP. Pengamatan dilakukan selama 72 jam. Penentuan ini diulangi minimal satu kali dan ditambahkan bersamaan dengan hasil dari uji terpisah yang telah dibuat dengan campuran yang komposisinya sama sehingga didapatkan suatu seri total, setiap seri total memberikan angka mortalitas dari suatu campuran dari komposisi tertentu.

Dosis uji dari toksin adalah jumlah yang ada pada 0,5 mL campuran yang menyebabkan kematian separuh dari jumlah total mencit yang diinjeksikan dengan campuran 0,5 mL dalam waktu 72 jam.

LAMPIRAN VI

PENETAPAN POTENSI ANTITOKSIN

Uji Pendahuluan

Toksin uji dilarutkan dalam larutan yang sesuai sehingga tiap 2,0 mL mengandung 10 dosis uji. Campuran dibuat sehingga tiap 5,0 mL dari masing-masing campuran mengandung 2,0 mL larutan toksin dari satu seri volume bertingkat dari preparat yang akan diuji. Masing-masing campuran dilarutkan dengan volume final yang sama dengan larutan yang sesuai. Campuran didiamkan pada suhu kamar dan dilindungi dari cahaya selama 60 menit. Enam ekor mencit masing-masing disuntikkan 1 dosis 0,5 mL tiap-tiap campuran secara IV atau IP. Pengamatan dilakukan selama 72 jam. Jika tidak ada satu pun mencit yang mati, maka 0,5 mL dari campuran mengandung tidak lebih dari 0,2 unit antitoksin. Jika semua mencit mati, maka 0,5 mL dari campuran mengandung tidak kurang dari 0,2 unit antitoksin.

Uji Akhir

Campuran segar yang sama dibuat, sehingga tiap 5,0 mL dari masing-masing campuran mengandung 2,0 mL dari larutan toksin dari satu seri volume bertingkat dari preparat yang akan diuji, dipisahkan dari masing-masing larutan sedikit demi sedikit tidak lebih dari 2% dan telah mencapai titik akhir (*end point*) yang diharapkan. Campuran selanjutnya disiapkan, tiap 5,0 mL mengandung 2,0 mL larutan toksin dari volume bertingkat dari preparat standar untuk memastikan dosis uji dari toksin. Campuran didiamkan pada suhu kamar dan dilindungi dari cahaya selama 60 menit. Enam ekor mencit masing-masing disuntikkan 1 dosis 0,5 mL dari tiap-tiap campuran secara IV atau IP. Pengamatan dilakukan selama 72 jam.

Campuran antitoksin yang akan diperiksa yang mengandung 0,2 unit dalam 0,5 mL adalah campuran yang menyebabkan kematian dengan jumlah yang sama atau hampir sama dari mencit, sebagaimana yang mengandung 0,2 unit preparat standar di dalam 0,5 mL. Penentuan ini diulangi minimal satu kali dan rata-rata dari semua dugaan (estimasi) yang sah dihitung. Estimasi tidak valid jika preparat standar tidak memberi hasil 20% dari nilai yang diharapkan.

LAMPIRAN VII

STERILISASI

Cara Sterilisasi

Dibawah ini akan dijelaskan beberapa cara sterilisasi, termasuk cara pemisahan mikroba melalui penyaringan dan pedoman untuk proses aseptik. Pilihan cara sterilisasi harus disesuaikan untuk setiap bentuk sediaan atau komponen didalamnya, memerlukan pengetahuan tentang teknik sterilisasi dan informasi yang berkenaan dengan setiap efek dari proses pada bahan yang disterilkan.

1. Sterilisasi Uap

Proses sterilisasi termal ini menggunakan uap jenuh dibawah tekanan yang berlangsung di suatu bejana yang disebut otoklaf. Merupakan proses sterilisasi yang paling banyak dilakukan (suatu siklus otoklaf yang telah ditetapkan dalam farmakope untuk media atau pereaksi adalah selama 15 menit pada suhu 121°C, kecuali dinyatakan lain). Prinsip dasar kerja alat ini adalah udara di dalam bejana sterilisasi diganti dengan uap jenuh, hal ini dicapai dengan menggunakan alat pembuka atau penutup khusus. Untuk mengganti udara secara lebih efektif dari bejana sterilisasi dan dari dalam bahan yang disterilkan, siklus sterilisasi dapat meliputi tahap evakuasi udara dan uap.

Desain atau pemilihan suatu siklus untuk produk atau komponen tertentu tergantung pada beberapa faktor, termasuk ketidakstabilan panas dari bahan, pengetahuan tentang penetrasi panas ke dalam bahan dan faktor lain yang tercantum dalam program validasi. Selain deskripsi tentang parameter siklus sterilisasi dengan menggunakan suhu 121°C, konsep F_0 dapat juga diterapkan. F_0 pada suhu tertentu selain suhu 121°C adalah waktu (dalam menit) yang diperlukan untuk mendapatkan kesetaraan seperti pada suhu 121°C untuk waktu tertentu.

2. Sterilisasi Panas Kering

Proses sterilisasi termal ini menggunakan oven yang dilengkapi dengan sirkulasi udara/peralatan lain yang dirancang khusus untuk tujuan tersebut. Oven modern yang dilengkapi dengan udara yang dipanaskan dan disaring, didistribusikan secara merata ke seluruh bejana dengan cara sirkulasi atau radiasi menggunakan sistem semprotan dengan peralatan sensor, pemantau dan pengendali parameter kritis.

Validasi fasilitas sterilisasi ini dilakukan dengan cara yang sama seperti pada sterilisasi uap. Unit yang digunakan untuk sterilisasi komponen seperti wadah untuk larutan intravena, harus dijaga agar dapat dihindari akumulasi partikel di dalam bejana sterilisasi. Umumnya suhu yang dapat diterima dalam bejana sterilisasi kosong adalah 250°C selama 15 menit.

Proses berkesinambungan sering digunakan untuk sterilisasi dan depirogenisasi alat gelas sebagai suatu bagian dari sistem pengisian dan penutupan kedap secara aseptik yang berkesinambungan dan terpadu. Sistem berkesinambungan biasanya

memerlukan suhu yang lebih tinggi dari suhu pada umumnya karena waktu menetapnya yang lebih singkat. Bagaimanapun suhu total selama melewati produk harus sama dengan yang dicapai sewaktu proses dalam bejana. Pada program kualifikasi dan validasi sehubungan dengan waktu menetap singkat, perlu ditetapkan parameter untuk keseragaman suhu terutama waktu menetap.

3. Sterilisasi Gas

Proses sterilisasi ini digunakan jika bahan yang akan disterilkan tidak tahan terhadap suhu tinggi pada pemanasan uap atau panas kering. Bahan aktif yang digunakan pada sterilisasi gas adalah etilen oksida dengan kualitas mensterilkan yang dapat diterima. Kerugian dari bahan aktif ini antara lain sifatnya yang sangat mudah terbakar walaupun sudah dicampur dengan gas inert yang sesuai; bersifat mutagenik dan kemungkinan adanya residu toksik didalam bahan yang disterilkan, terutama yang mengandung ion klorida.

Proses sterilisasi pada umumnya berlangsung di suatu bejana bertekanan sama seperti pada otoklaf tetapi dengan tambahan bagian khusus yang hanya terdapat pada alat sterilisasi menggunakan gas. Fasilitas yang menggunakan bahan sterilisasi seperti ini harus didesain sedemikian rupa hingga mampu mengeluarkan gas sesudah proses sterilisasi, mampu memantau mikroba yang masih hidup dan mengurangi paparan gas yang sangat berbahaya terhadap petugas yang menanganinya.

Kualifikasi proses sterilisasi menggunakan gas etilen oksida dicapai sesuai dengan uraian sebelumnya. Sterilisasi ini memiliki cakupan lebih luas daripada cara sterilisasi lainnya, karena selain suhu, kelembaban, tekanan positif atau hampa udara juga diperlukan pengendalian ketat terhadap kadar etilen oksida. Suatu ketentuan penting adalah menunjukkan bahwa semua parameter proses kritis dalam bejana sterilisasi harus cukup selama berlangsungnya seluruh siklus. Karena parameter sterilisasi yang digunakan bagi bahan yang akan disterilkan merupakan variabel kritis, sering dianjurkan untuk melakukan prakondisi mutan sampai mencapai kadar kelembaban yang diperlukan, mengurangi waktu yang diperlukan pada suhu yang ditentukan, sebelum muatan dimasukkan ke dalam bejana sterilisasi etilen oksida.

Proses validasi umumnya dilakukan menggunakan produk yang telah diinokulasi dengan indikator biologik yang sesuai, seperti sediaan spora *Bacillus subtilis*. Untuk validasi, spora dapat digunakan dalam bejana sterilisasi yang terisi penuh dengan produk atau produk simulasinya.

Salah satu keterbatasan utama dari proses sterilisasi etilen oksida adalah terbatasnya kemampuan gas tersebut untuk berdifusi sampai ke daerah yang paling dalam dari produk yang akan disterilkan. Desain kemasan dan cara pengisian bejana sterilisasi harus ditetapkan sedemikian rupa hingga terdapat resistensi minimal terhadap difusi gas.

4. Sterilisasi dengan Radiasi Ion

Proses sterilisasi ini digunakan jika bahan yang akan disterilkan tidak tahan terhadap suhu tinggi dan kekhawatiran tentang keamanan penggunaan etilen oksida.

Keunggulan sterilisasi radiasi meliputi reaktivitas kimia rendah, residu rendah yang dapat diukur dan kenyataan yang membuktikan bahwa variabel yang dikendalikan lebih sedikit. Hal yang terpenting dalam sterilisasi ini adalah dosis radiasi yang diserap dan dapat diukur secara tepat. Oleh karena sifat tersebut, banyak prosedur baru yang telah dikembangkan untuk menetapkan dosis sterilisasi. Walaupun begitu, hal ini masih dalam peninjauan dan pertimbangan, terutama mengenai kegunaannya paling tidak untuk pengendalian tambahan dan tindakan keamanan. Iradiasi hanya menimbulkan sedikit kenaikan suhu tetapi dapat mempengaruhi kualitas dan jenis plastik atau kaca tertentu.

Ada dua jenis radiasi ion yang dapat digunakan dalam sterilisasi ini, yaitu disintegrasi radioaktif dari radioisotop (radiasi gamma) dan radiasi berkas elektron. Pada kedua jenis tersebut, dosis radiasi yang dapat menghasilkan derajat jaminan sterilitas yang diperlukan harus ditetapkan sedemikian rupa hingga dalam rentang satuan dosis minimum dan maksimum, sifat bahan yang disterilkan dapat diterima.

Untuk iradiasi gamma, validasi prosedur meliputi penetapan kesesuaian bahan, cara memasukkan produk dan penyelesaian penataan jumlah produk di dalam wadah sterilisasi (termasuk identifikasi zona dosis minimum dan maksimum), penetapan pengaturan waktu dan petunjuk pemberian dosis sterilisasi yang diperlukan.

Untuk iradiasi berkas elektron, sebagai tambahan perlu divalidasi pengendalian voltase, arus listrik, kecepatan dan berjalan dan dimensi pengamat berkas elektron.

Untuk sterilisasi radiasi gamma, harus dipilih dosis sterilisasi yang efektif dan dapat ditoleransi tanpa menimbulkan kerusakan. Berdasarkan pengalaman dipilih dosis 2,5 megarad (Mrad) radiasi yang diserap, tetapi dalam beberapa hal, diinginkan dan dapat diterima penggunaan dosis yang lebih rendah untuk peralatan, bahan obat dan bentuk sediaan akhir. Dalam hal yang lain mungkin diperlukan dosis yang lebih tinggi.

Untuk validasi efikasi, terutama tingkat paparan yang rendah, penting untuk menetapkan besar (jumlah dan atau derajat) resistensi radiasi alami dari populasi mikroba produk. Model pengisian produk yang khusus harus dibuat dan ditetapkan distribusi dosis serapan maksimum dan minimum menggunakan dosimeter kimia (Dosimeter ini umumnya merupakan plastik silinder, pipih atau segi empat berwarna yang menunjukkan intensifikasi warna berdasarkan langsung pada jumlah energi radiasi yang diserap; alat ini harus dikalibrasi dengan seksama).

Penentuan dosis serapan yang diperlukan dilakukan berdasarkan biakan murni mikroba resisten dan menggunakan produk yang telah diinokulasi, misalnya spora *Bacillus pumilus* sebagai indikator biologik. Siklus eksperimen berfraksi memberikan data yang dapat digunakan untuk menetapkan nilai D_{10} indikator biologik. Informasi ini dapat diterapkan untuk ekstrapolasi jumlah radiasi yang diserap untuk menetapkan suatu probabilitas yang sesuai tentang mikroba yang masih bertahan hidup.

Prosedur yang terbaru untuk sterilisasi radiasi gamma berdasarkan pada dosis terhadap resistensi radiasi dari beban mikroba heterogen alami, dalam produk yang akan disterilkan.

Prosedur tersebut sedang dikembangkan, tetapi dapat merupakan penilaian yang lebih mewakili di bidang resistensi radiasi, terutama jika terdapat jumlah mikroba yang signifikan tahan radiasi. Rentang ini, mulai dari inokulasi mikroba resisten baku seperti *Bacillus pumilus* hingga pemaparan dosis sub-lethal contoh produk jadi yang diambil dari proses produksi.

Beberapa hipotesis tertentu adalah umum terhadap semua metode ini. Walaupun jumlah populasi mikroba yang terdapat di dalam suatu bahan umumnya terdiri dari suatu campuran mikroba yang memiliki sensitivitas yang berbeda terhadap radiasi, langkah memperlakukan bahan ini dengan suatu dosis sterilisasi yang lebih rendah dari jumlah dosis sterilisasi lethal akan menghilangkan fraksi mikroba yang kurang resisten. Ini akan menghasilkan populasi residu yang relatif homogen sehubungan dengan resistensi radiasi dan menghasilkan suatu hasil penetapan yang konsisten dan mempunyai keberulangan dari penetapan populasi yang tersisa. Jumlah pengujian laboratorium yang diperlukan tergantung pada prosedur tertentu yang digunakan.

Satu dari cara tersebut memerlukan perhitungan populasi mikroba dari contoh yang mewakili betas bahan yang diproduksi secara terpisah. Resistensi populasi mikroba tidak ditetapkan dan penentuan dosis didasarkan pada pada arbitrari resistensi radiasi baku yang ditetapkan untuk populasi mikroba dan dari data yang diterima dari produsen atau pustaka. Perkiraan kemudian dibuat bahwa distribusi pilihan resistensi menunjukkan suatu tantangan yang lebih hebat daripada populasi mikroba alami didalam produk yang akan disterilkan. Perkiraan ini, bagaimanapun juga harus diverifikasi dengan percobaan. Setelah diverifikasi, dosis sterilisasi radiasi yang sesuai dapat dilihat dalam suatu tabel produsen atau pustaka.

Metode lain, yang dibuat lebih rinci tidak memerlukan penghitungan populasi mikroba, tetapi menggunakan satu seri paparan dosis bertingkat untuk mendapatkan suatu dosis yang akan ditetapkan sedemikian rupa sehingga kurang lebih 1 dari 100 contoh yang diiradiasi pada dosis tersebut tidak steril. Ini bukanlah dosis sterilisasi tertinggi tetapi sebagai dasar untuk menetapkan dosis sterilisasi dengan ekstrapolasi dari dosis yang menghasilkan 1 dari 100 contoh yang tidak steril dengan menggunakan faktor resistensi yang sesuai dan mencerminkan populasi mikroba resisten tersisa. Pengawasan secara berkala dilakukan untuk memeriksa bahwa temuan dapat terus dilanjutkan.

Prosedur yang lebih rinci memerlukan lebih banyak percobaan dan meliputi isolasi biakan mikroba, termasuk satu percobaan setelah penetapan dosis substerilisasi (yang menghasilkan 1 dari 100 contoh yang tidak steril), resistensi mikroba yang bertahan hidup digunakan untuk menetapkan dosis sterilisasi. Cara lain dibuat berdasarkan pada penetapan yang berbeda, dimulai dengan peningkatan dosis substerilisasi yang menghasilkan tidak lebih dari 50% contoh yang tidak steril. Setelah iradiasi jumlah secukupnya pada contoh ini, diperoleh beberapa isolat mikroba resistensi radiasi dari setiap prosedur ditetapkan. Dosis sterilisasi kemudian dihitung menggunakan penetapan resistensi dan dosis sterilisasi 50% yang semula telah ditetapkan. Penetapan pengawasan diperlukan untuk metode ini seperti untuk metode lain.

Jika dosis radiasi minimum yang diperlukan telah ditetapkan dan pemberian dosis tersebut telah dipastikan (dengan dosimeter kimia dan fisika), pelepasan bahan yang telah disterilkan dapat diperkuat dengan validasi menyeluruh jaminan sterilitas yang meliputi antara lain 0,22 μm kepastian dosis yang digunakan, penggunaan indikator biologik dan lainnya.

5. Sterilisasi dengan Penyaringan

Sterilisasi larutan yang labil terhadap panas sering dilakukan dengan penyaringan menggunakan bahan yang dapat menahan mikroba, sehingga mikroba yang terkandung dapat dipisahkan secara fisika. Perangkat penyaring umumnya terdiri dari suatu matriks berpori tertutup kedap atau dirangkaikan pada wadah yang tidak permeabel. Efektifitas suatu penyaring media atau penyaring substrat tergantung pada ukuran pori bahan dan dapat tergantung pada daya adsorpsi bakteri pada atau di dalam matriks penyaring atau tergantung dari mekanisme pengayakan. Ada beberapa bukti yang menyatakan bahwa pengayakan merupakan komponen yang lebih penting dari mekanisme. Penyaringan yang melepas serat, terutama yang mengandung asbes harus dihindarkan penggunaannya kecuali tidak ada cara penyaringan alternatif lain yang mungkin digunakan. Jika penyaring yang melepas serat memang diperlukan, merupakan keharusan bahwa proses penyaringan meliputi adanya penyaring yang tidak melepas serat diletakkan pada arah hilir atau sesudah langkah penyaringan awal.

Ukuran penyaring. Pengukuran porositas membran penyaring dilakukan dengan pengukuran nominal yang menggambarkan kemampuan membran penyaring untuk menahan mikroba dari galur tertentu dengan ukuran yang sesuai, bukan dengan penetapan suatu ukuran rata-rata pori dan pernyataan tentang distribusi ukuran.

Membran penyaring untuk sterilisasi adalah membran yang mampu menahan 100% biakan dari 10^7 mikroba galur *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19146) tiap cm^2 permukaan membran pada tekanan tidak kurang dari 30 psi (2,0 bar). Membran penyaring semacam ini berukuran 0,22 μm atau 0,2 μm tergantung pada cara pembuatan produsen.

Pengukuran membran penyaring dapat juga ditentukan untuk pereaksi atau media yang harus disterilkan dengan cara penyaringan. Membran penyaring bakteri (juga dikenal sebagai membran penyaring analitik) yang hanya mampu menahan mikroba dengan ukuran lebih besar, diberi etiket dengan ukuran nominal 0,45 μm . Tidak ada satupun cara pengukuran penyaring 0,45 μm yang ditetapkan oleh badan yang berwenang, dan pengukuran tergantung pada cara konvensional dari produsen. Penyaring 0,45 μm mampu menahan biakan tertentu seperti *Serratia marcescens* (ATCC 14756) atau *Pseudomonas diminuta*. Tekanan uji yang digunakan beragam mulai dari yang terendah (5psi; 0,33 bar untuk *Serratia marcescens* atau 0,5 psi; 0,34 bar untuk *Pseudomonas diminuta*) hingga yang tertinggi (50 psi; 3,4 bar). Membran ini digunakan untuk uji sterilitas yang tidak memerlukan retensi mikroba yang sempurna. Kecil kemungkinan untuk melakukan pengujian contoh yang tercemar hanya oleh mikroba berukuran kecil.

Membran penyaring berukuran nominal yang sangat kecil dapat diuji dengan biakan *Acholeplasma laidlawii* atau galur lain *Mycoplasma* pada tekanan 7 psi (0,7 bar) dan akan berukuran nominal 0,1 μm .

Pengukuran nominal yang didasarkan pada sifat retensi mikroba berbeda jika pengukuran dilakukan dengan cara lain umpamanya dengan pengukuran retensi lingkaran lateks dengan berbagai diameter. Merupakan tanggungjawab pengguna untuk memilih suatu penyaring dengan ukuran yang tepat untuk tujuan tertentu, tergantung pada sifat produk yang akan disaring.

Pemakai harus menetapkan parameter penyaring yang digunakan dalam pembuatan yang mempengaruhi efisiensi retensi mikroba secara bermakna. Beberapa hal penting lain yang perlu diperhatikan pada proses penyaringan meliputi kemampuan kompatibilitas produk, penyerapan obat, pengawet dan zat tambahan lainnya dan pengeluaran awal kandungan endotoksin.

Karena efektifitas proses penyaringan juga dipengaruhi oleh beban mikroba larutan yang akan disaring, penetapan kualitas mikrobiologi larutan sebelum penyaringan merupakan aspek penting dari validasi proses penyaringan sebagai tambahan pada penetapan parameter lainnya, seperti tekanan, laju aliran dan karakteristik unit penyaring.

Cara lain untuk menguraikan kemampuan menahan penyaring adalah menggunakan log nilai reduksi (LNR), umpamanya suatu penyaring berukuran 0,2 μm yang dapat menahan 10^7 mikroba galur tertentu akan memiliki LNR tidak kurang dari 7 pada kondisi yang ditetapkan.

Proses sterilisasi larutan dengan cara penyaringan pada akhir-akhir ini telah menghasilkan tingkat kepuasan yang baru, sebagian besar merupakan hasil perkembangan dan kemajuan penyaring membran. Kelompok media penyaring ini menjurus ke arah pengendalian pembakuan dan mutu yang lebih efektif dan juga memberi kesempatan yang lebih luas pada pengguna untuk memastikan karakteristik atau sifat rakitan penyaring sebelum dan sesudah penggunaan. Kenyataan bahwa penyaring membran adalah lapisan tipis polimer memberikan banyak keuntungan tetapi juga memberikan beberapa kerugian jika dibandingkan dengan penyaring tebal seperti penyaring dari bahan porselen atau bahan masir. Karena banyak dari permukaan membran adalah suatu ruangan yang cukup kosong atau ruang terbuka, maka penyaring yang cukup baik dirakit dan disterilisasi akan memberikan suatu keuntungan berupa laju aliran tinggi. Kerugian karena membran umumnya rapuh sehingga penting untuk menetapkan bahwa rakitan sudah cukup baik dan membran tidak akan rusak atau pecah selama perakitan, sterilisasi atau selama penggunaan. Rakitan wadah dan penyaring yang digunakan pertama-tama harus divalidasi terhadap kompatibilitas dan integrasi oleh pengguna. Jika terbuka kemungkinan untuk mencampur rakitan dan membran penyaring yang diproduksi berbagai produsen, maka kompatibilitas dari rakitan gabungan tersebut harus lebih dahulu divalidasi.

Penyaringan untuk tujuan sterilisasi umumnya dilaksanakan menggunakan rakitan yang memiliki membran dengan porositas nominal 0,2 μm atau kurang. Berdasarkan pada pembandingan yang telah divalidasi tidak kurang dari 10^7 suspensi *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19146) tiap cm^2 dari luas permukaan penyaring. Media membran penyaring yang tersedia saat ini yaitu selulosa asetat, selulosa nitrat, fluoro karbonat, polimer akrilik, polikarbonat, poliester, polivinil klorida, vinil, nilon, politef dan juga membran logam, dan ini dapat diperkuat atau ditunjang oleh bahan berserat internal. Rakitan penyaring membran harus diuji untuk integritas awal sebelum digunakan dengan ketentuan bahwa uji tersebut tidak mengurangi validitas sistem uji dan harus diuji sesudah proses penyaringan selesai untuk menunjukkan bahwa rakitan penyaring mempertahankan integritas sepanjang prosedur penyaringan berlangsung.

6. Proses Aseptik

Pendapat umum mengatakan bahwa sterilisasi wadah akhir terisi sebagai suatu bentuk sediaan atau alat terkemas akhir adalah proses yang dipilih untuk menjamin resiko terkecil kontaminasi mikroba dalam berts, terdapat suatu kelompok besar produksi yang tidak disterilasi akhir, tetapi disiapkan melalui seri tahapan septik. Proses ini didesain untuk mencegah masuknya mikroba hidup kedalam komponen steril atau komponen yang melewati proses antara yang mengakibatkan produk setengah jadi atau produk ruahan atau komponennya bebas dari mikroba hidup.

Suatu produk yang dianggap diproses secara aseptik dapat saja terdiri dari komponen yang sebelumnya telah disterilkan dengan salah satu proses yang telah diuraikan. Misalnya produk setengah jadi jika berupa cairan yang dapat disaring, dapat disterilisasi dengan cara penyaringan atau komponen wadah akhir kosong dapat disterilkan dengan pemanasan. Daerah kritis yang perlu diperhatikan adalah lingkungan bermikroba tempat komponen yang sebelumnya telah disterilkan terkontaminasi selama perakitan untuk memproduksi sediaan jadi dan selama pengisian secara aseptik.

Pesyaratan untuk fasilitas pengisian atau proses aseptik lainnya yang didesain, divalidasi dan dipelihara dengan benar, terutama ditujukan pada :

- a. Lingkungan udara yang bebas dari mikroba viabel yang dirancang dengan benar untuk memungkinkan pemeliharaan yang efektif dari unit alat pemasok udara.
- b. Tersedianya tenaga pekerja terlatih yang dilengkapi dan mengenakan pakaian kerja yang memadai.

Lingkungan yang diinginkan dapat dicapai melalui teknologi penyaringan udara tingkat tinggi yang berperan memasok udara berkualitas yang diperlukan. Fasilitas meliputi sistem sawar primer (di dekat tempat bahan terpapar) dan sekunder (tempat proses aseptik berlangsung). Untuk fasilitas proses aseptik atau lingkungan tempat pengisian secara aseptik yang di desain dengan baik, berikan perhatian untuk bagian yang penting, seperti permukaan yang tidak berpori dan licin termasuk dinding dan langit-langit sehingga dapat secara berkala disanitasi; tempat ganti pakaian kerja dengan ruangan yang cukup memadai untuk pekerja dan untuk menyimpan pakaian yang

steril; pemisahan yang memadai antara ruang persiapan bagi pekerja dan proses aseptik akhir, jika perlu tersedia perlengkapan tertentu seperti ruang tertutup kedap udara dan atau penyemprotan udara; perbedaan tekanan yang sesuai antar ruangan, tekanan yang paling positif adalah diruangan atau lingkungan proses aseptik; penggunaan ruang bersih (satu arah) ditempat yang paling dekat dengan produk atau komponen yang terpapar dan aliran udara tersaring ketempat tersebut dengan frekuensi pergantian udara yang cukup; kelembaban yang sesuai dan pengendalian lingkungan; dan suatu program sanitasi yang terdokumentasi.

Pelatihan yang sesuai bagi pekerja dalam teknik higiene dan cara berpakaian harus ditekankan sedemikian rupa hingga pakaian kerja, sarung tangan dan penutup tubuh lainnya terutama dapat menutupi secara sempurna permukaan kulit yang terpapar.

Sertifikasi dan validasi proses aseptik dan fasilitas dapat dicapai dengan penentuan efisiensi sistem penyaringan dengan menggunakan prosedur pemantauan lingkungan secara mikrobiologi dan membuat biakan steril sebagai bentuk produk simulasi.

Pemantauan fasilitas aseptik harus meliputi pemeriksaan penyaringan udara lingkungan secara berkala sebagaimana juga pemantauan berkala terhadap partikulat dan mikroba lingkungan dan dapat meliputi proses pembuatan media biakan steril secara berkala.

7. Indikator Biologik

Indikator biologik dengan menggunakan mikroorganisme tertentu digunakan untuk menilai efektifitas prosedur sterilisasi. Biasanya terdiri dari spora bakteri yang diinokulasikan pada pelarut yang sesuai. Suspensi spora ini bisa disiapkan dalam bentuk ampul tertutup. Indikator biologik ini dapat disimpan dalam kondisi tertentu dan ditentukan batas kadaluarsanya.

Spesies yang sama dengan bakteri yang digunakan sebagai indikator biologik, dapat di inokulasikan pada produk cair yang akan disterilkan. Dalam hal ini harus dipastikan bahwa produk cair tersebut tidak memiliki efek menghambat pertumbuhan spora bakteri tersebut.

Indikator biologik diberi tanda /kode berupa nama spesies bakteri yang digunakan sebagai acuan mikroorganisme, nomor arsip koleksi asli (nomor ATCC), jumlah spora yang terkandung dalam pelarut dan nilai D. Nilai D adalah nilai parameter sterilisasi (durasi atau dosis serap) yang diperlukan untuk mengurangi jumlah organisme yang layak untuk 10% dari jumlah aslinya. Hal ini penting hanya dalam kondisi eksperimental tepat. Hanya menyatakan mikro-organisme yang hadir. Indikator biologik yang terdiri dari lebih dari satu jenis bakteri pada pelarut/media yang sama dapat digunakan. Diberikan informasi tentang media kultur dan kondisi inkubasi.

Indikator biologik untuk sterilisasi uap dianjurkan untuk memvalidasi siklus sterilisasi. Digunakan spora *Geobacillus stearothermophilus* (misalnya, ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157 atau CIP 52,81) atau mikroorganisme lainnya yang sejenis.

Jumlah spora yang dipakai minimal 5×10^5 per pelarut. Nilai D pada 121°C tidak kurang dari 1,5 menit. Hal ini memverifikasi bahwa tidak ada pertumbuhan dari mikroorganisme setelah indikator biologik tersebut terkena uap pada suhu 121°C selama 15 menit. Indikator biologik untuk sterilisasi panas kering direkomendasikan untuk menggunakan spora *Bacillus atrophaeus* (misalnya, ATCC 9372, NCIMB 8058 atau CIP 77,18) atau mikroorganisme lainnya yang sejenis. Jumlah spora yang dipakai minimal 1×10^6 per pelarut. Nilai D pada 160°C tidak kurang dari 2,5 menit. Sterilisasi dengan menggunakan suhu lebih tinggi dari 220°C sering digunakan untuk sterilisasi dan depirogenasi. Dalam hal ini mengurangi 3 log dari endotoksin bakteri tahan panas dapat digunakan sebagai pengganti indikator biologik.

Indikator biologik pada sterilisasi dengan radiasi ion dapat digunakan untuk memantau proses secara rutin sebagai kemungkinan tambahan untuk menilai efektivitas mengatur dosis radiasi energi terutama dalam kasus percepatan elektron. Indikator yang digunakan adalah Spora *Bacillus pumilus* (misalnya, ATCC 27142, 10327 NCTC, NCIMB 10.692 atau 77,25 CIP) atau mikroorganisme lainnya yang sejenis. Jumlah spora yang dipakai minimal 1×10^7 per pelarut. Nilai D tidak kurang dari 1,9 kGy. Hal ini membuktikan bahwa tidak ada pertumbuhan dari mikroorganisme dalam indikator biologik setelah terpapar 25kGy (dosis serap minimal).

Indikator biologik pada sterilisasi menggunakan gas diperlukan untuk memvalidasi siklus dan proses sterilisasi. Indikator yang digunakan adalah *Bacillus atrophaeus* (misalnya, ATCC 9372, NCIMB 8058 atau CIP 77,18) atau mikroorganisme lainnya yang sejenis yang direkomendasikan untuk etilen oksida. Jumlah spora yang dipakai minimal 1×10^6 per pelarut. Parameter resistensi adalah nilai D tidak kurang dari 2,5 menit untuk siklus yang melibatkan 600 mg / etilen oksida, pada 54°C dan pada 60% rh. Hal ini untuk membuktikan bahwa tidak ada pertumbuhan mikroorganisme dalam indikator biologik setelah terpapar siklus sterilisasi selama 25 menit dan bahwa mengekspos indikator untuk siklus penurunan temperatur (600 mg / L, 30°C dan 60% Rh) selama 50 menit meninggalkan spora.

LAMPIRAN VIII

PEMERIKSAAN WADAH

Wadah Kaca

Wadah kaca untuk Penggunaan Farmasi adalah kaca dimaksudkan bersentuhan langsung dengan sediaan farmasi.

Kaca tidak berwarna adalah yang sangat transparan atau tembus pandang dalam spektrum tampak.

Kaca berwarna diperoleh dengan penambahan sejumlah kecil logam oksida, dipilih berdasarkan absorban spektra yang diinginkan.

Kaca netral adalah kaca borosilikat yang mengandung dalam jumlah besar borat oksida, alkali aluminium oksida dan/atau alkali oksida bumi. Karena komposisinya kaca netral memiliki ketahanan hidrolitik tinggi, dan dari hantaman panas tinggi.

Kaca *soda-lime-silica* adalah kaca silika yang mengandung alkali logam silika, terutama natrium oksida dan alkali oksida bumi, terutama kalsium oksida. Karena komposisinya *soda-lime-silica* hanya memiliki ketahanan hidrolitik sedang.

Stabilitas hidrolitik dari wadah kaca untuk penggunaan farmasi dinyatakan sebagai ketahanan untuk bahan mineral terlarut dalam air dibawah kondisi kontak yang ditetapkan antara permukaan dalam dari wadah atau biji kaca dan air. Ketahanan hidrolitik dievaluasi dengan titrasi melepaskan alkali.

Berdasarkan ketahanan hidrolitik, wadah kaca diklasifikasikan sebagai berikut:

- Wadah kaca Tipe I: kaca netral, dengan ketahanan hidrolitik tinggi karena komposisi kimia dari kaca tersebut;
- Wadah kaca Tipe II: biasanya kaca *soda-lime-silica* dengan ketahanan hidrolitik tinggi yang dihasilkan dari penanganan permukaan yang baik;
- Wadah kaca Tipe III: biasanya kaca *soda-lime-silica* dengan ketahanan hidrolitik sedang.

Wadah kaca tipe I sesuai untuk kebanyakan sediaan baik parenteral maupun non parenteral.

Wadah kaca tipe II sesuai untuk sediaan asam dan netral, sediaan yang mengandung air baik untuk penggunaan parenteral maupun non parenteral.

Wadah kaca tipe III umumnya sesuai untuk sediaan yang tidak mengandung air untuk penggunaan parenteral, serbuk untuk penggunaan parenteral (kecuali untuk sediaan kering beku) dan sediaan non parenteral.

Sediaan untuk penggunaan parenteral umumnya digunakan kaca tidak berwarna, akan tetapi kaca berwarna dapat digunakan untuk bahan-bahan yang peka terhadap cahaya. Kaca berwarna atau tidak berwarna digunakan untuk sediaan farmasi lain. Dianjurkan semua wadah kaca untuk sediaan cair dan untuk serbuk untuk penggunaan parenteral dilakukan pengamatan visual terhadap isinya.

Wadah kaca untuk penggunaan farmasi harus memenuhi persyaratan uji yang terkait atau uji ketahanan hidrolitik. Jika wadah kaca memiliki komponen non kaca, uji diperuntukan hanya pada bagian kaca dari wadah.

Untuk menyatakan kualitas dari wadah kaca berdasarkan tujuan penggunaannya diperlukan satu atau lebih pengujian. Pengujian untuk ketahanan hidrolitik dilakukan untuk menyatakan tipe kaca (I, II, III) dan untuk mengendalikan ketahanan hidrolitik. Disamping itu, wadah untuk sediaan parenteral yang mengandung air diuji untuk pelepasan arsen dan wadah kaca berwarna untuk transmisi spektra.

Ketahanan Hidrolitik

Tabel 8.1. Tipe Kaca

Tipe Wadah	Jenis Pengujian
Wadah kaca Tipe I dan II (untuk membedakan dari wadah kaca tipe III)	Uji A (uji permukaan)
Wadah kaca Tipe I (untuk membedakan dari wadah kaca tipe II dan tipe III)	Uji B (uji biji gelas) atau uji C (uji <i>etching</i>)
Wadah kaca Tipe I dan II, dimana diperlukan untuk menentukan apakah ketahanan hidrolitik tinggi disebabkan oleh komposisi kimia atau penanganan permukaan	Uji A dan B, atau uji A dan C

Uji dilakukan dengan titrasi dari larutan ekstrak yang diperoleh di bawah kondisi seperti yang dijelaskan untuk uji A, B, dan C.

Peralatan

- Sebuah otoklaf yang mampu mempertahankan suhu $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, dilengkapi dengan sebuah thermometer atau sebuah pencatat *thermocouple* yang terkalibrasi, pengukur tekanan, ventilasi dan nampan, kapasitas yang cukup untuk menampung air yang dibutuhkan pada level yang dipersyaratkan untuk melakukan pengujian; bersihkan bejana otoklaf dan semua peralatan sebelumnya dengan menggunakan air suling;
- Buret dengan kapasitas yang cukup;
- Labu takar, dengan kapasitas 1000 mL;
- Pipet dan gelas kimia;
- Gelas piala dengan kapasitas 100 dan 250 mL;
- Penangas air;
- *Metal foil* (seperti: aluminium, *stainless steel*)

Labu atau gelas kimia harus sudah tersedia digunakan untuk pengujian dan diisi dengan air suling dan disimpan di dalam otoklaf pada 121°C paling tidak 1 jam sebelum digunakan.

Penentuan pengisian volume

Pengisian volume adalah volume air yang diisi ke dalam wadah untuk tujuan pengujian.

Untuk vial dan botol, pengisian volume adalah 90% dari kapasitas total. Untuk ampul, volume diisi hingga setinggi bahu ampul.

Pemilihan vial dan botol

Ambil secara acak, 6 (enam) wadah dari lot sampel, atau 3 jika kapasitas melebihi 100 mL, dan bersihkan dari debu atau kotoran. Timbang wadah kosong secara seksama 0,1 g. Letakkan wadah di atas permukaan horizontal dan isi dengan air suling hingga ujung lingkaran, jangan sampai tumpah dan hindari terbentuknya gelembung. Atur batas cairan hingga garis total. Timbang wadah yang telah diisi untuk memperoleh bobot air yang dinyatakan dengan 2 angka desimal untuk wadah yang memiliki volume nominal kurang atau setara dengan 30 mL, dan dinyatakan 1 angka desimal untuk wadah yang memiliki volume nominal lebih besar dari 30 mL. Hitung rata-rata nilai dari kapasitas total dalam mL dan kalikan dengan 0,9 volume ini, dinyatakan 1 angka desimal, dan volume pengisian untuk lot wadah tertentu.

Ampul

Letakkan paling tidak 6 ampul di atas permukaan datar, horizontal, dan isi dengan air suling dari buret, hingga mencapai poin A (lihat Gambar 8.1). Baca kapasitas (dinyatakan dalam 2 angka desimal) dan hitung rata-rata nilai. Volume ini, dinyatakan dalam 1 angka desimal, adalah volume pengisian untuk lot ampul tertentu. Volume pengisian juga dapat ditentukan dengan berat.



Gambar 8.1 Volume pengisian ampul (sampai poin A)

Uji A. Ketahanan Hidrolitik, Permukaan Dalam dan Wadah Gelas (Uji Permukaan)

Penentuan dilakukan pada wadah yang tidak digunakan. Volume dari cairan uji untuk penentuan akhir ditampilkan dalam Tabel 8.2

Tabel 8.2 Volume Cairan Uji dan Jumlah Titrasi

Volume Pengisian (mL)	Volume dari cairan uji untuk satu kali titrasi (mL)	Jumlah titrasi
Sampai dengan 3	25,0	1
Diatas 3 dan sampai dengan 30	50,0	2
Diatas 30 dan sampai dengan 100	100,0	2
Diatas 100	100,0	3

Pembersihan

Bersihkan kotoran atau debu. Sebelum pengujian, bilas setiap wadah secara hati-hati paling tidak dua kali dengan air suling dan diamkan beberapa saat. Segera sebelum pengujian kosongkan wadah, bilas sekali dengan air suling kemudian dengan aquabidestilata dan buang airnya. Lengkapi prosedur pembersihan dari pembilasan pertama dalam waktu tidak kurang dari 20 menit dan tidak lebih dari 25 menit.

Panaskan ampul tertutup di atas penangas air atau di dalam oven pada suhu sekitar 50°C selama kira-kira 2 menit sebelum dibuka; jangan bilas sebelum pengujian.

Pengisian dan pemanasan

Wadah-wadah diisi dengan air aquabidestilata hingga volume pengisian. Wadah dalam bentuk *cartridge* atau *prefilled syringe* ditutup dengan menggunakan bahan yang sesuai yang tidak mempengaruhi pengujian. Tiap wadah termasuk ampul sebaiknya jangan ditutup terlalu rapat dengan bahan yang inert seperti kaca netral atau aluminium foil yang sebelumnya telah dibilas dengan air suling. Letakkan wadah di atas nampan otoklaf. Tempatkan nampan di dalam otoklaf yang berisi sejumlah air suling sehingga nampan tetap berisi air yang jernih.

Tutup otoklaf dan lakukan cara sebagai berikut:

- Panaskan otoklaf hingga 100°C dan biarkan uap keluar dari ventilasi selama 10 menit;
- Tutup ventilasi dan naikan suhu dari 100°C ke 121°C pada kisaran 1°C per menit;
- Jaga suhu pada 121°C±1°C selama 60±1 menit;
- Turunkan suhu dari 121°C ke 100°C pada kisaran 0,5°C per menit, buka ventilasi untuk menghindari vakum;
- Jangan buka otoklaf sebelum suhu mencapai 95°C;
- Keluarkan wadah dari otoklaf dengan hati-hati, letakkan di dalam penangas air pada suhu 80°C, dan alirkan air keran dingin, jaga supaya air tidak bersentuhan dengan tutup foil untuk menghindari kontaminasi dari larutan ekstraksi.
- Waktu pendinginan tidak lebih dari 30 menit.

Larutan ekstraksi dianalisis dengan titrasi berdasarkan metode yang dijabarkan di bawah ini.

Metode

Lakukan titrasi dalam waktu 1 jam dan wadah yang telah dikeluarkan dari otoklaf. Gabung cairan yang diperoleh dari wadah-wadah dan campur. Masukkan air suling ke dalam gelas piala dengan volume yang tertera pada Tabel 8.2. Tempatkan sejumlah volume yang sama air suling ke dalam gelas piala kedua sebagai blanko. Tambahkan ke tiap gelas piala 0,05 mL larutan metal merah pada tiap 25 mL cairan. Titrasi blanko dengan asam klorida 0,01 M. Titrasi larutan uji dengan asam yang sama hingga warna dari larutan sama dengan yang diperoleh untuk blanko. Kurangi nilai yang diperoleh untuk titrasi blanko dari yang diperoleh untuk larutan uji dan nyatakan hasil dalam mL dari asam klorida 0,01 M per 100 mL. Nyatakan nilai titrasi kurang dari 1,0 mL hingga 2 angka desimal dan nilai titrasi lebih dari atau sama dengan 1,0 mL hingga 1 angka desimal.

Batasan

Hasil atau rata dari hasil jika lebih dari satu titrasi dilakukan, adalah tidak lebih dari nilai yang tertera di dalam Tabel 8.3.

Tabel 8.3 Nilai Batas Dalam Pengujian Ketahanan Hidrolitik Permukaan

Volume maksimum Asam Klorida (HCl) 0,01 M per mL dari cairan uji		
Wadah Gelas		
Volume pengisian (mL)	Tipe I dan II	Tipe III
Sampai dengan 1	2,0	20,0
Diatas 1 dan sampai dengan 2	1,8	17,6
Diatas 2 dan sampai dengan 5	1,3	13,2
Diatas 5 dan sampai dengan 10	1,0	10,2
Diatas 10 dan sampai dengan 20	0,80	8,1
Diatas 20 dan sampai dengan 50	0,60	6,1
Diatas 50 dan sampai dengan 100	0,50	4,8
Diatas 100 dan sampai dengan 200	0,40	3,8
Diatas 200 dan sampai dengan 500	0,30	2,9
Diatas 500	0,20	2,2

Uji B. Ketahanan Hidrolitik dari Biji Kaca

Uji dapat dilakukan di kaleng yang digunakan untuk memproduksi wadah gelas tabung atau di wadah-wadah.

Peralatan

- Mortar, alu dan palu, besi magnet
- Seperangkat 3 ayakan berbentuk persegi empat dari bahan *stainless steel*, yang terdiri dari:
 - (A) Ayakan no. 710;
 - (B) Ayakan no. 425;
 - (C) Ayakan no. 300;
- Magnet permanen;
- Foil logam (seperti: aluminium, *stainless steel*);
- Oven, mampu menjaga suhu $140 \pm 5^{\circ}\text{C}$;
- Timbangan, mampu menimbang hingga 500 dengan akurasi 0,005 g;
- Desikator;
- Penangas ultrasonik

Metode

Bilas wadah yang akan diuji dengan air suling dan keringkan dalam oven. Bersihkan sedikitnya 3 kaca dengan kertas pembersih and hancurkan untuk menghasilkan 2 sampel dari sekitar 100 g tiap-tiap potongan yang tidak lebih dari 30 mm. letakkan 30-40 g dari potongan antara 10-30 mm yang diambil dari 1 sampel di dalam mortar, masukan alu dan tumbuk sekali dengan keras menggunakan palu. Pindahkan isi dari mortar ke bagian ke ayakan yang paling kasar. Ulangi cara tadi sampai semua fragmen telah dipindahkan ke ayakan. Ayak dengan tangan dalam waktu singkat dan buang kaca yang masih tersisa diayakan (a) dan (b). Gunakan sampel dengan jumlah yang sama untuk proses lebih lanjut, ulangi cara tersebut di atas sampai sekitar 10 g kaca yang tersisa di atas ayakan (a). Buang jumlah ini dan jumlah yang melewati ayakan (c). kumpulkan kembali seperangkat ayakan dan ayak selama 5 menit. Pindahkan ke botol timbang yang mana biji kaca melewati ayakan (b) dan yang tersisa diayakan (c). Ulangi penumbukan dan prosedur pengayakan dengan sampel kaca lain dan 2 sampel dari biji kaca, masing yang diperoleh harus lebih dari 10 g. Sebar tiap sampel diatas secarik kertas mengkilat dan buang partikel besi dengan melewati magnet terhadapnya. Pindahkan tiap sampel ke dalam gelas kimia untuk dibersihkan. Tambahkan biji kaca ke dalam tiap gelas kimia 30 mL yang berisi aseton and gosok biji kaca dengan cara yang sesuai, seperti menggunakan karet atau tangkai kaca berlapis plastik. Setelah biji kaca digosok and tambahkan aseton kembali.

Isi bak penangas ultrasonik dengan air pada suhu kamar, dan letakkan gelas kimia ke dalam rak dan rendam hingga batas aseton sama dengan batas air, gunakan ultrasound selama 1 menit. Goyang gelas kimia, biarkan sebentar dan tuang aseton sebanyak mungkin dan kemudian ulangi cara pembersihan ultrasonic. Jika turbiditas masih ada, ulangi pembersihan ultrasonic dan cuci aseton hingga larutan jernih. Goyang dan tuang aseton, kemudian keringkan biji kaca, pertama dengan menempatkan gelas kimia di atas sebuah lempengan

(plate) hangat untuk untuk menghilangkan sisa aseton dan kemudian dipanaskan pada suhu 140°C selama 20 menit dalam oven pengering. Pindahkan biji kaca yang telah dikeringkan dari tiap gelas kimia ke dalam botol timbang yang terpisah, tutup dan dinginkan di dalam desikator. Timbang 10 g biji kaca kering dan bersih ke dalam gelas Erlenmeyer terpisah. Tambahkan 50 mL aquabidestilata ke dalam gelas kimia ketiga sebagai blanko. Taburkan biji kaca secara merata di atas dasar rata pada gelas Erlenmeyer dan goyang perlahan. Tutup Erlenmeyer dengan piring gelas netral atau aluminium foil yang dibilas dengan air suling. Letakkan 3 gelas kimia di atas rak di dalam otoklaf yang berisi air pada suhu lingkungan, dan pastikan letaknya di atas batas air dari bejana otoklaf. Lakukan prosedur otoklaf dalam cara yang sama dijelaskan pada uji A, namun jaga suhu $121^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 30 ± 1 menit. Jangan buka otoklaf sampai suhunya turun hingga 95°C. Ambil sampel dari otoklaf dan dinginkan gelas kimia dengan air ledeng yang mengalir sesegera mungkin. Ke dalam masing 3 gelas kimia, tambahkan larutan metal merah. Titrasi larutan blanko dengan asam klorida 0,02 M kemudian titrasi larutan uji hingga warnanya sama dengan warna yang diperoleh oleh larutan blanko. Kurangi volume titrasi larutan blanko dengan larutan uji.

Catatan: jika diperlukan untuk memperoleh titik akhir yang jelas, larutan jernih dituang ke dalam gelas kimia 250 mL yang terpisah. Bilas biji kaca dengan 15 mL aquabidestilata sebanyak 3 kali, dan kocok, kemudian masukan ke dalam larutan utama. Tambahkan 0,05 mL larutan metal merah. Titrasi dan hitung seperti yang tertera di bawah ini. Dapat juga ditambahkan 45 mL air suling dan 0,05 mL larutan metal merah ke dalam larutan blanko.

Hitung rata-rata hasil dalam mL dari asam klorida 0,02 M per gram sampel dan jika dibutuhkan kesetaraannya dalam alkali yang diekstraksi, dihitung sebagai mikrogram dari natrium oksida per gram biji kaca.

1 mL dari asam klorida 0,02 M setara dengan 620 ug natrium oksida

Ulangi uji jika nilai tertinggi dan terendah yang diamati berbeda lebih dari 20%.

Batasan

Wadah kaca Tipe I memerlukan tidak lebih dari 0,1 mL asam klorida 0,02 M per gram gelas, wadah kaca tipe II dan tipe III memerlukan tidak lebih dari 0,85 mL asam klorida per gram kaca.

Uji C. Menentukan Apakah Permukaan Wadah Telah Ditreatment (Uji Etching)

Jika diperlukan untuk menentukan sebuah wadah telah ditreatment permukaannya, dan/ atau membedakan antara wadah kaca tipe I dan tipe II, uji C digunakan sebagai tambahan uji A. Sebagai gantinya, uji A dan B dapat digunakan. Uji C bisa dilaksanakan baik pada sampel yang tidak digunakan atau sampel yang sebelumnya diuji untuk Uji A.

Vial dan botol

Volume dan larutan uji yang dibutuhkan seperti terlihat di dalam Tabel 8.2

Bilas wadah dua kali dengan air suling dan isi hingga penuh dengan campuran 1 volume asam hidrofluorik dan 9 volume asam klorida dan diamkan selama 10 menit.

Kosongkan wadah dan bilas secara hati-hati lima kali dengan air suling. Sebelum pengujian, bilas sekali lagi dengan air suling. Gunakan wadah yang sebelumnya telah disiapkan untuk prosedur otoklaf dan penentuan yang sama seperti yang dijelaskan di dalam uji A untuk ketahanan hidrolitik permukaan. Jika hasil lebih tinggi dari yang diperoleh dari permukaan aslinya (dengan faktor dari 5 ke 10), sampel yang telah ditreatment permukaannya.

Ampul

Catatan: ampul dibuat dari tabung kaca umumnya ditujukan untuk treatment permukaan internal karena ketahanan kimia tinggi tergantung pada komposisi kimia dari kaca tersebut sebagai bahan dasarnya.

Gunakan metode seperti yang tertera pada vial dan botol di atas. Jika ampul tidak ditreatment permukaan, nilai baru sedikit lebih rendah dari yang diperoleh uji sebelumnya.

Perbedaan Wadah Kaca Tipe I dan Tipe II

Hasil yang diperoleh di dalam uji C dibandingkan dengan yang diperoleh di dalam uji A. interpretasi dari hasil ditunjukkan di dalam Tabel 8.4

Tabel 8.4 Perbedaan antara wadah kaca Tipe I dan Tipe II

Tipe I	Tipe II
Nilainya hampir sama dengan yang diperoleh pada uji untuk ketahanan hidrolitik permukaan untuk wadah kaca Tipe I	Nilainya melebihi dengan yang diperoleh pada uji ketahanan hidrolitik permukaan dan sama akan tetapi tidak lebih besar dari yang diperoleh untuk wadah kaca Tipe III

Arsenik

Uji berlaku untuk wadah kaca pada sediaan parenteral mengandung air.

Spektrometri serapan atom generasi hidrida.

Larutan uji. Gunakan larutan ekstrak yang diperoleh dari wadah tipe II dan II, setelah diotoklaf pada suhu 121°C selama 1 jam seperti tertera pada uji A untuk ketahanan hidrolitik permukaan. Pindahkan 10,0 mL ke dalam labu ukur 100 mL. tambahkan 10 mL asam klorida dan 5 mL 200 g/L larutan kalium iodide. Panaskan di atas penangan air pada suhu 80°C selama 20 menit, biarkan dingin dan encerkan hingga 100 mL dengan air suling.

Larutan standar. Siapkan larutan standar menggunakan standar arsenik (1 ppm As). Tambahkan 10 mL asam klorida dan 5 mL 200 g/L larutan kalium iodida. Panaskan di atas penangas air pada suhu 80°C selama 20 menit, biarkan dingin dan encerkan hingga 100 mL dengan air suling. Kisaran konsentrasi dari larutan standar biasanya adalah 0,005 ppm sampai 0,015 ppm As.

Penampung asam. Asam klorida

Penampung pereduksi. Larutan pereduksi natrium tetrahidroborat

Gunakan perangkat generasi hidrida spektrometer serapan atom untuk mengisi larutan uji ke dalam kuvet. Gunakan dan standardisasi kondisi penggunaan peralatan seperti yang tercantum di dalam manual, optimasi kecepatan tabung pompa peristaltik, kemudian sambungkan tabung ke penampung asam, penampung pereduksi, dan larutan uji.

Sumber. Lampu *Hollow-cathode*

Panjang gelombang. Maksimum 0.1 ppm As

Perangkat atomisasi. Nyala *air-acetylene*

Batasan. Maksimum 0.1 ppm As

Transmisi Spektra Untuk Wadah Kaca Berwarna

Peralatan. Spektrofotometer UV-VIS, yang dilengkapi dengan detektor *photodiode* atau tabung *photomultiplier* yang digabung dengan *sphere* terpadu.

Persiapan spesimen. Pecahkan wadah kaca atau potong dengan gergaji bulat yang dibasahkan. Pilih bagian yang mewakili dari ketebalan dinding dan pangkas dengan bentuk yang sesuai ganjalan di dalam spektrofotometer. Jika spesimen terlalu kecil untuk menutup wadah spesimen, tutup bagian yang terbuka dengan kertas *opaque* atau tape, perhatikan bahwa panjang dari spesimen harus lebih besar dari slit. Sebelum menempatkan di dalam wadah, cuci, keringkan dan lap spesimen dengan tisu lensa. Buat gundukan spesimen dengan bantuan lilin, atau dengan cara yang sesuai, lakukan dengan hati-hati untuk menghindari bekas tanda jari tangan atau noda lain.

Metode. Letakan spesimen di dalam spektrofotometer dengan sumbu silindrik searah dengan I sehingga cahaya tegak lurus ke permukaan dari bagian dan pemantulan cahaya dapat dihindari sekecil mungkin. Ukur transmisi dari specimen dengan referensi terhadap udara di dalam daerah spektra 290-450 nm, secara berkelanjutan atau interval 20 nm.

Batasan. Transmisi spektra diamati untuk wadah kaca berwarna untuk sediaan non parenteral tidak melebihi 10% pada panjang gelombang 290-450 nm, tanpa tergantung dengan tipe dan kapasitas dari wadah kaca. Transmisi spektra yang diamati di dalam wadah kaca berwarna untuk sediaan parenteral tidak melebihi batas yang diberikan pada Tabel 8.5

Tabel 8.5 Batas Transmisi spektrum Wadah Kaca Berwarna Sediaan Parenteral

Prosentase maksimum dari transmisi spektra pada panjang gelombang antara 290 nm dan 450 nm		
Volume nominal (mL)	Wadah <i>flame-sealed</i>	Wadah dengan penutup
Sampai dengan 1	50	25
Diatas 1 dan sampai dengan 2	45	20
Diatas 2 dan sampai dengan 5	40	15
Diatas 5 dan sampai dengan 10	35	13
Diatas 10 dan sampai dengan 20	30	12
Diatas 20	25	10

Lampiran – uji untuk ketahanan hidrolitik permukaan – penentuan dengan menggunakan spektrometri serapan atom nyala – *flame atomic absorption spectrometry (FAAS)*

Ketahanan hidrolitik permukaan dari gelas tipe I dan II ditentukan dengan analisis larutan dengan spektrometri serapan atom nyala. Sejumlah elemen tersebut, ketika muncul sebagai oksida dalam kaca, akan menyebabkan larutan menjadi alkali, ditentukan dan digunakan untuk menyatakan kesetaraan alkali.

Metode spektrometri memiliki keuntungan yaitu jumlah sampel dari ekstrak yang digunakan sedikit sekali sehingga dapat digunakan terhadap wadah tunggal yang kecil. Ini memberikan evaluasi terhadap keseragaman dari wadah dalam betas yang digunakan dimana ini sangat kritis. Hasil dari pengukuran ini tidak setara dengan yang dihasilkan dari titrasi, sehingga kedua metode tersebut tidak dapat saling menggantikan. Hubungan antara 2 tergantung dari tipe kaca, ukuran, dan bentuk dari wadah. Metode titrimetri adalah metode standar untuk farmakope; metode spektrometri dapat digunakan sebagai justifikasi dan otorisasi.

Metode yang sesuai untuk tipe analisis ini ditunjukkan di dalam Tabel di bawah.

Penentuan yang dilakukan untuk wadah yang tidak digunakan. Jumlah wadah yang diuji ditetapkan di dalam Tabel 8.6.

Tabel 8.6 Jumlah Wadah Uji Spektrometri

Volume pengisian (mL)	Jumlah wadah yang dinilai secara terpisah	Wadah tambahan untuk pengukuran awal
Sampai dengan 2	20	2
Diatas 2 sampai dengan 5	15	2
Diatas 5 sampai dengan 30	10	2
Diatas 30 sampai dengan 100	5	1
Diatas 100	3	1

Cara kerja untuk penentuan volume pengisian, pembersihan dari wadah, pengisian dan pemanasan dibawah ketahanan hidrolitik dan uji A. ketahanan hidrolitik dari permukaan bagian dalam dari wadah kaca.

Larutan-larutan

Larutan dapar spektrokimia. Larutkan 80 g dari caesium klorida dalam sekitar 300 mL aquabidestilata, tambahkan 10 mL asam klorida 6 M dan pindahkan ke dalam labu ukur 1000 mL. Encerkan hingga batas dengan aquabidestilata dan campur.

Larutan stok

- Natrium oksida (Na_2O) = 1 mg/mL;
- Kalium oksida (K_2O) = 1 mg/mL;
- Kalsium oksida (CaO) = 1 mg/mL.

Larutan stok yang tersedia secara komersial dapat juga digunakan.

Larutan standar

Siapkan larutan standar dengan melarutkan larutan stok dengan aquabidestilata untuk memperoleh konsentrasi yang sesuai untuk membuat larutan referensi dengan cara yang cocok, sebagai contoh masing-masing dengan konsentrasi 20 ug/mL dari natrium oksida, kalium oksida, dan kalsium oksida. Larutan standar yang tersedia secara komersial dapat juga digunakan.

Larutan referensi

Siapkan larutan referensi untuk membuat kurva kalibrasi dengan mengencerkan larutan standar berkonsentrasi yang sesuai dengan aquabidestilata, sehingga kisaran kerja normal dari elemen yang spesifik terpenuhi, perhatian instrument yang digunakan untuk pengukuran.

Tipikal konsentrasi yang larutan referensi adalah:

- Untuk penentuan dengan spektrometri emisi atom dari natrium oksida dan kalium oksida: sampai dengan 10 ug/mL;

-
- Untuk penentuan dengan spektrometri serapan atom dari natrium oksida dan kalium oksida: sampai dengan 3 ug/mL;
 - Untuk penentuan dengan spektrometri emisi atom dari kalsium oksida: sampai dengan 7 ug/mL;
 - Gunakan larutan referensi yang mengandung 5 %v/v dari larutan dapar spektrokimia.

Metode

Lakukan pengukuran awal dari konsentrasi kalium oksida dan kalsium oksida dari satu dari larutan ekstrak. Jika, untuk satu tipe wadah, konsentrasi dari kalium oksida adalah kurang dari 0,2 ug/mL dan jika konsentrasi dari kalsium oksida kurang dari 0,1 ug/mL, larutan ekstraksi yang tersisa dari tipe wadah ini tidak perlu dianalisis untuk ion-ion ini. Uapkan larutan ekstraksi dari tiap sampel secara langsung ke nyala api dari instrument serapan atom atau emisi atom dan tentukan konsentrasi perkiraan dari natrium oksida (dan kalium oksida dan kalsium oksida, jika ada) dengan referensi untuk kurva kalibrasi yang dihasilkan dari larutan referensi dari konsentrasi yang sesuai.

Penentuan akhir

Jika pengenceran tidak perlu ditambahkan ke tiap wadah, volume dari larutan dapar spektrokimia setara dengan 5% dari volume pengisian, aduk rata dan tentukan natrium oksida, kalsium oksida, dan kalium oksida, jika ada, dengan referensi untuk kurva kalibrasi. Untuk penentuan dari konsentrasi kalsium oksida dengan spektrometri atom nyala, nyala nitrous oksida/*acetylene* harus digunakan.

Jika pengenceran diperlukan, tentukan natrium oksida, kalsium oksida, dan kalium oksida, jika ada, ikuti prosedur yang dijelaskan diatas. Pengukuran larutan harus mengandung 5% v/v dari larutan dapar spektrokimia. Nilai konsentrasi kurang dari 1,0 ug/mL dinyatakan dengan dua angka desimal, nilai lebih besar atau sama dengan 1,0 ug/mL untuk satu angka desimal. Perbaiki hasil untuk tambahan dapar dan pengenceran, jika diperlukan.

Perhitungan

Hitung rata-rata nilai dari masing-masing konsentrasi oksida yang diperoleh dalam tiap sampel yang diuji, dalam mikrogram dari oksida per milliliter dari larutan ekstraksi dan hitung jumlah dari masing-masing oksida, dinyatakan sebagai mikrogram natrium oksida per milliliter dari larutan ekstraksi menggunakan faktor konversi masa berikut ini:

- 1 ug kalium oksida sesuai dengan 0,658 ug natrium oksida;
- 1 ug kalsium oksida sesuai dengan 1,105 ug natrium oksida.

Batas. Untuk tiap wadah yang diuji, hasil tidak lebih dari nilai yang diberikan di dalam Tabel 8.7.

Tabel 8.7 Batas Nilai Dalam Uji Ketahanan Hidrolitik Permukaan Dengan Spektrometri Serapan Atom Nyala

Nilai maksimum untuk konsentrasi dari oksida dinyatakan sebagai natrium oksida (ug/mL)	
Volume pengisian (mL)	Wadah kaca Tipe I dan II
Sampai dengan 1	5,00
Diatas 1 dan sampai dengan 2	4,50
Diatas 2 dan sampai dengan 5	3,20
Diatas 5 dan sampai dengan 10	2,50
Diatas 10 dan sampai dengan 20	2,00
Diatas 20 dan sampai dengan 50	1,50
Diatas 50 dan sampai dengan 100	1,20
Diatas 100 dan sampai dengan 200	1,00
Diatas 200 dan sampai dengan 500	0,75
Diatas 500	0,50

Wadah selain kaca (*polyethelene*)

Cara ini didasarkan atas daya tahan wadah selain kaca terhadap kikisan air. Derajat kikisan ditetapkan berdasarkan jumlah kikisan yang dibebaskan dalam keadaan tertentu. Percobaan dilakukan dalam ruangan yang praktis, bebas asap dan bebas debu. Wadah yang telah memenuhi persyaratan pemeriksaan pada penyimpanan dapat mengalami kemunduran.

Air suling khusus

Air suling yang disuling kembali dengan alat penyulingan yang seluruhnya terbuat dari kaca tahan zat kimia dibebaskan dari gas yang terlarut dengan mendidihkan hingga sisa 75% bagian volume semula bebas dan logam terutama tembaga.

Otoklaf

Harus dapat mempertahankan suhu antara $121^{\circ} \pm 15^{\circ}\text{C}$ dilengkapi dengan alat pengatur suhu termometer dan katup keamanan, dan sebuah rak di atas permukaan air yang dapat memuat tidak kurang dari 12 wadah yang di periksa dalam keadaan berdiri tegak.

LAMPIRAN IX

SPEKTOFOTOMETRI, KOLORIMETRI, TURBIDIMETRI, DAN NEFELOMETRI

Definisi

Spektrofotometri serapan adalah pengukuran serapan radiasi elektromagnetik suatu zat pada panjang gelombang terbatas yang hampir monokromatik.

Kolorimetri adalah pengukuran serapan cahaya. Pada umumnya pada daerah spektrum yang tampak, tidak monokromatik, tetapi dalam daerah gelombang terbatas yang diperoleh dengan menggunakan filter optik.

Turbidimetri adalah pengukuran derajat pengurangan berkas cahaya yang terhalang oleh butir yang tersuspensi, yang didasarkan atas pengukuran berkas cahaya yang diteruskan.

Nefelometri adalah pengukuran cahaya yang dihamburkan oleh butir yang tersuspensi. Pada umumnya pengukuran dilakukan tegak lurus terhadap berkas cahaya masuk.

Daerah panjang gelombang yang dapat digunakan untuk mengukur, berkisar dan daerah ultraviolet gelombang pendek, sampai daerah inframerah. Daerah spektrum dibagi menjadi daerah ultraviolet (185-380 nm), daerah cahaya tampak (380-780 nm), daerah inframerah dekat (780-3.000 nm), dan daerah inframerah (3-40 μ m).

Penggunaan Daerah Spektrum

Untuk kebanyakan zat farmasi, pengukuran dapat dilakukan dalam daerah ultraviolet (UV) dan dalam daerah cahaya tampak (Vis) dengan ketepatan dan kepekaan yang lebih besar dan pada dalam daerah inframerah dekat dan dalam daerah inframerah. Larutan yang mengandung 1 mg zat tiap 100 mL dalam sel 1 cm sering mempunyai serapan 0,2 - 0,8. Untuk pengukuran dalam daerah inframerah dekat dan dalam daerah inframerah, dipergunakan larutan yang mengandung 1-10 mg zat tiap mL, kadang-kadang sampai 100 mg tiap mL dan menggunakan sel 0,01-3 mm untuk memperoleh serapan yang sama.

Spektrum serapan UV dan spektrum serapan Vis suatu zat pada umumnya tidak menunjukkan selektifitas seperti yang ditunjukkan oleh spektrum inframerah. Akan tetapi untuk beberapa zat spektrum tersebut dapat digunakan untuk identifikasi dan untuk penetapan kadar.

Daerah inframerah dekat cocok untuk menunjukkan gugusan OH dan NH, misalnya air dalam alkohol, gugusan -OH disamping amina, alkohol dalam hidrokarbon dan amina primer dan sekunder disamping amina tersier. Masing-masing senyawa kimia mempunyai spektrum inframerah khas yang berbeda-beda kecuali zat isomer optis aktif, mempunyai spektrum yang sama polimorfi senyawa kimia padat kadang-kadang menyebabkan perbedaan spektrum inframerah. Karena spektrum penyerapan inframerah mempunyai banyak maksimum maka sering banyak dapat dilakukan penetapan kuantitatif beberapa senyawa dalam campuran yang telah diketahui susunan kuantitatif, tanpa melakukan pemisahan terlebih dahulu.

Teori dan Istilah

Kekuatan berkas sinar menurun sebanding dengan jarak medium penyerap yang ditempuh dan konsentrasi molekul atau ion yang terserap dalam medium.

Kedua faktor ini menentukan perbandingan antara tenaga sinar yang masuk terhadap tenaga sinar yang keluar. Penurunan kekuatan sinar radiasi monokromatik yang masuk melalui media penyerap yang homogen, secara kuantitatif memenuhi Hukum Beer:

$$\text{Log}_{10}(1/T) = A = abc$$

Istilah dan simbol di bawah ini digunakan untuk keperluan farmakope.

1. Serapan (A) adalah logaritma dasar 10 harga kebalikan transmittan (T)
2. Daya serap (a) adalah serapan dibagi dengan hasil kali kadar larutan (g) dalam tiap 1.000 mL dan tebal larutan dalam cm (b).
3. Daya serap molar (c) adalah serapan dibagi dengan hasil kali kadar larutan dalam gram tiap 1.000 mL dan tebal larutan dalam cm (atau hasil kali daya serap dengan berat molekul zat).
4. Serapan jenis [A(1%, 1cm)] adalah serapan dari 1% zat terlarut yang diukur dengan menggunakan larutan setebal 1 cm.
5. Spektrum serapan adalah grafik hubungan antara serapan atau salah satu fungsinya terhadap panjang gelombang atau fungsi dan panjang gelombang.
6. Transmittans (T) adalah hasil bagi intensitas sinar keluar dengan intensitas sinar masuk.
7. Turbidansi (S) adalah efek penghamburan cahaya oleh utir yang tersuspensi. Jumlah zat yang tersuspensi dapat diukur dengan melakukan pengamatan terhadap cahaya yang diteruskan (Turbidimetri), maupun cahaya yang dihamburkan (Nefelometri).

Turbidansi (s), dinyatakan dengan rumus pendekatan berikut:

$$S = \frac{\log P_0/N \text{ kbsd } 3}{d^4 + a^4}$$

P₀ adalah intensitas sinar masuk, **P** adalah intensitas sinar keluar, **b** adalah tebal suspensi yang dilalui sinar, **c** adalah kadar zat yang tersuspensi dihitung dalam **g** tiap liter, **d** adalah garis tengah rata-rata butir yang tersuspensi, adalah panjang gelombang, **k** adalah tetapan perimbangan yang besarnya tergantung dan sifat suspensi dan cara pengukuran, **a** adalah tetapan yang besarnya tergantung dan cara yang digunakan.

Persamaan tersebut berlaku untuk suspensi encer. Intensitas sinar masuk (P) dapat dianggap sama dengan jumlah intensitas sinar keluar (P) dan intensitas sinar yang dihamburkan (Ps).

$$P_s = P_0 - P = (1 - 10^{-S})$$

Suspensi yang diukur sinar monokromatik memakai alat tertentu mempunyai harga a, b, k, d dan a yang tetap, sehingga S sebanding dengan kadar (c):

$$S = Kc \text{ dan } P_s = P_0 (1 - 10^{-Kc})$$

K adalah suatu tetapan pembanding yang baru.

Untuk kebanyakan cara yang digunakan dalam spektrofotometri serapan, daya serap suatu zat merupakan suatu tetapan yang tidak tergantung pada intensitas sinar masuk, tebal larutan dan kadar, hingga kadar dapat ditentukan secara fotometri.

Hukum Beer tidak menyatakan pengaruh suhu, panjang gelombang atau jenis pelarut. Untuk kebanyakan analisa, pengaruh perubahan suhu biasa dapat diabaikan.

Penyimpangan Hukum Beer mungkin disebabkan oleh perubahan-perubahan kimia atau alat. Hukum Beer mungkin tidak cocok disebabkan oleh adanya perubahan kadar zat yang dilarutkan, karena adanya asosiasi antara molekul zat atau antara molekul zat dan molekul pelarut. atau disosiasi atau ionisasi. Penyimpangan lain mungkin disebabkan oleh sinar polikromatik, lebar celah atau sinar menyimpang.

Meskipun diukur pada suhu dan pelarut tertentu, harga daya serap tidak dapat benar benar tetap. Untuk analisa kuantitatif larutan yang hanya mengandung suatu zat yang menyerap cahaya, sistem serapan tersebut tidak perlu memenuhi Hukum Beer. Kadar zat dapat ditetapkan berdasarkan kurva baku yang menyatakan hubungan antara kadar dan serapan zat pembanding.

Penggunaan Zat Pembanding

Dalam percobaan dan penetapan kadar secara spektrofotometri pada umumnya perlu dibandingkan terhadap larutan baku yang mengandung zat pembanding kimia (PK). Maksud pembanding ini adalah untuk memastikan bahwa pengukuran zat yang diperiksa maupun zat pembanding dilakukan ada kondisi yang sama.

Kondisi yang dimaksud antara lain adalah panjang gelombang, pengatur lebar celah, penempatan dan koreksi set dan harga trasmitan. Sel-sel yang pada suhu panjang gelombang memberikan suatu transmittan yang sama, dapat memberikan transmittan yang berbeda pada panjang gelombang yang lain. Untuk memperoleh ketelitian yang tinggi pada pengukuran, harus dilakukan koreksi terhadap sel penyerap. Pada umumnya larutan baku dilakukan koreksi terhadap sel penyerap. Pada umumnya larutan baku dibuat sehingga mempunyai kadar lebih kurang sama dengan kadar zat yang diperiksa.

Penggunaan Blangko

Pada pengukuran serapan suatu larutan, selalu diperlukan suatu larutan blangko. Maksud dan larutan blangko ini adalah untuk mengatur spektrofotometer hingga pada panjang gelombang yang digunakan mempunyai serapan nol. Larutan blangko ini dapat berupa pelarut murni atau pereaksi yang digunakan untuk membuat larutan yang akan diukur serapannya.

Spektrofotometri

Untuk membandingkan zat yang diperiksa terhadap zat pembanding, pengukuran yang baik dilakukan pada puncak spektrum serapan. Pada penetapan kadar secara spektrofotometri yang tertera pada monografi, pada umumnya telah dicantumkan panjang gelombang serapan maksimum yang bersangkutan. Panjang gelombang serapan maksimum dapat berbeda tergantung dari alat yang digunakan, maka pengukuran dilakukan pada panjang

gelombang serapan maksimum yang diperoleh pada percobaan, asalkan tidak berbeda dari 1 nm dan panjang gelombang yang ditentukan. Jika perbedaan lebih dari 1 nm, alat harus ditera kembali.

Larutan Percobaan

Untuk penetapan spektrofotometri UV-Vis, pada umumnya zat yang diperiksa diukur dalam bentuk larutan. Sebagai pelarut dapat digunakan air, alkohol, kloroform, hidrokarbon rendah, eter, amonia encer, larutan natrium hidroksida encer atau asam klorida encer. Pengotoran yang dapat bersinar dalam daerah spektrum yang digunakan harus dihindarkan. Tidak ada pelarut yang pada ketebalan yang biasa digunakan transparan sempurna terhadap sinar dalam daerah inframerah.

Karbontetraklorida sampai setebal 5 mm praktis transparan untuk panjang gelombang sampai 6 μm . Karbondisulfida setebal 1 mm, dapat digunakan sebagai pelarut sampai panjang gelombang 40 μm , kecuali pada panjang gelombang antara 4,2 μm dan antara 5,5 μm , karena pada daerah tersebut terjadi penyerapan yang kuat. Pelarut lain mempunyai daerah transparan yang sempit. Jika tidak ada pelarut yang cocok, pemeriksaan dapat dilakukan dengan membuat suspensi zat yang diperiksa dalam parafin cair atau zat yang diperiksa dicampur dengan kalium bromida P kering, kemudian dicetak menjadi tablet yang transparan.

Kolorimetri

Penetapan kadar secara kolorimetri pada umumnya dilakukan dengan membandingkan pada waktu yang bersamaan serapan larutan zat yang diperiksa terhadap serapan baku dengan kadar yang lebih kurang sama. Penetapan kadar secara kolorimetri dapat juga dilakukan dengan menggunakan kurva baku yang dibuat dengan menggunakan zat pembanding. Cara ini dapat dilakukan jika zat yang diperiksa memenuhi Hukum Beer dalam batas antara 75% dan 125% dan kadar larutan zat yang diperiksa. Kadar larutan yang diperiksa dapat ditetapkan dengan interpolasi pada kurva baku. Kurva baku harus sering diteliti kembali dan selalu dibuat baru jika digunakan kolorimetri lain atau pereaksi dengan lot baru. Meskipun pada monografi tertera bahwa penetapan kadar secara kolorimetri dapat dilakukan menggunakan kurva pembanding, sebaiknya penetapan dilakukan dengan membandingkan langsung terhadap larutan baku.

Turbidimetri dan Nefelometri

Kekeruhan dapat diukur dengan fotometri listrik filter atau spektrofotometri, sebaiknya menggunakan sinar biru. Untuk turbidimetri, pengukuran dilakukan langsung terhadap sinar yang diteruskan. Untuk nefelometri, fotosel terletak sedemikian rupa sehingga dapat menangkap cahaya yang dihamburkan, tetapi tidak menangkap cahaya yang diteruskan.

Penetapan dilakukan dengan membandingkan terhadap suspensi zat pembanding. Sejauh mungkin pengendapan butiran zat dalam suspensi harus dihindari pada umumnya dengan menambahkan koloida pelindung.

LAMPIRAN X

UJI KELEMBABAN SEDIAAN BIOLOGIK

Uji ini dilakukan pada sediaan vaksin virus atau bakteri bentuk kering beku, setiap sediaan menggunakan 3 botol timbang, sebelum botol timbang digunakan, harus dipanaskan terlebih dahulu selama 30 menit, ruang untuk penimbangan harus berada dalam kelembaban udara 45-50% pada suhu $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Metode Uji

- a. Sebelum ditimbang sediaan diaduk sehingga menjadi serbuk homogen terlebih dahulu.
- b. Sediaan ditimbang seberat 0,1 g atau 0,2 g $\pm$ 10% dan sediaan dimasukkan dalam botol timbang.
- c. Botol timbang tersebut dimasukkan ke dalam lemari pengering (*vacuum drying oven*), tutup botol timbang dalam posisi setengah terbuka.
- d. Lemari pengering diatur sehingga suhunya 60°C , tekanan lebih kecil 5 mmHg selama 3 jam atau pada suhu 105°C tekanan lebih kecil 5 mmHg selama 1-2 jam.
- e. Setelah proses pengeringan dalam lemari pengering selesai, lemari pengering dibuka tutupnya dan botol timbang dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit
- f. Botol timbang tersebut kembali ditimbang.
- g. Perhitungan kelembaban (susut pengeringan) dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kelembaban (\%)} = \frac{\frac{\text{Berat sediaan sebelum dikeringkan} - \text{Berat sediaan sesudah dikeringkan}}{\text{Berat sediaan sebelum dikeringkan}}}{\frac{\text{Berat botol kosong + Sediaan sebelum dikeringkan} - \text{Berat botol timbang kosong}}{\text{Berat botol kosong + Sediaan sebelum dikeringkan}}}$$

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila nilai kelembaban tidak lebih dari 3%

LAMPIRAN XI

AYAM SPECIFIC PATHOGEN FREE (SPF)

Seperti yang tertera di dalam monografi umum dan individu, yang dimaksud dengan ayam, TAB atau biakan jaringan yang digunakan untuk pembuatan atau pengujian mutu vaksin adalah berasal dari telur yang diproduksi dari flock ayam *Specific Pathogen Free* (SPF). Ayam SPF adalah ayam yang bebas dari beberapa penyakit tertentu seperti pada Tabel.9. Adapun data tersebut merupakan data penyakit terbaru dan akan ditambah bila diperlukan.

Flock SPF ialah sekelompok ayam yang berasal dari lingkungan khusus dan mempunyai petugas tersendiri yang tidak boleh kontak dengan flock ayam bukan SPF. Sebuah flock artinya tidak ada satu ekor ayam yang bukan SPF yang ditambahkan ke dalamnya. Flock ayam tersebut dikandangkan untuk meminimalisasikan terjadinya kontaminasi. Kandang ayam SPF tidak boleh berdekatan dengan ayam bukan SPF dan ditempatkan dalam isolator atau dalam gedung dengan filter udara yang bertekanan positif. Konstruksi gedung dibuat sedemikian rupa agar terhindar dari masuknya binatang rodensia, burung-burung liar, serangga dan orang luar yang bukan petugas kandang yang bersangkutan.

Petugas kandang ayam SPF, sebelum memasuki gedung tidak boleh kontak dengan ayam lain atau dengan agen penyakit yang dapat menulari flock. Petugas kandang harus mandi dan berganti pakaian steril sebelum memasuki ruangan-ruangan di dalam gedung. Semua barang yang dibawa masuk ke dalam ruangan flock harus dalam keadaan steril. Pakan ayam sebaiknya disterilkan dengan gas (fumigasi) untuk menghindari adanya mikroorganisme yang patogen, sedangkan air minum dialirkan melalui pipa otomatis yang telah difiltrasi, dan disinari dengan UV. Obat-obatan maupun vaksin tidak boleh diberikan pada flock ayam SPF karena akan menimbulkan kerancuan dalam mendeteksi suatu penyakit.

Petugas kandang harus memonitoring dan membuat laporan rutin tentang kesehatan umum flock ayam dan adanya gejala abnormal. Beberapa faktor yang harus dimonitor adalah morbiditas, mortalitas, kondisi umum fisik, konsumsi pakan, produksi telur, dan mutu telur (fertilitas dan daya tetas).

Ayam dari flock awal harus terbebas dari agen penyakit yang dapat menular secara vertikal. Secara berkala setiap ekor ayam dari flock yang sama diuji secara berulang terhadap adanya penyakit leukosis sehingga flock terbebas dari virus leukosis dan antibodinya. Untuk mempertahankan ayam SPF, pengujian terhadap penyakit tersebut di atas dilakukan paling tidak 4 bulan sekali. Setelah 6 minggu masa pengujian dan pada akhir masa pengujian tiap ekor ayam SPF di dalam flock harus terbebas dari infeksi penyakit seperti pada Tabel.9. Untuk setiap generasi baru pada flock ayam SPF, semua ayam dalam flock yang sama harus diuji pada umur kurang dari 20 minggu, menggunakan metode uji seperti pada Tabel.9. Selain itu uji bulanan dilakukan pada 5% ayam dari populasi flock ayam SPF (tidak kurang dari 10 dan tidak lebih dari 200 ekor ayam) dengan menggunakan metode uji pada Tabel.9. dan uji terakhir dilakukan setelah 4 minggu telur dikumpulkan.

Sampel darah yang diuji diambil dari beberapa ekor ayam pada waktu tertentu. Sampel serum diuji titer antibodinya terhadap agen penyakit tertentu. Uji SN dilakukan pada 5 sampel serum untuk setiap jenis penyakit, dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

Bahan standar (antigen, antisera) yang berasal dari standar Internasional. Pada penyakit avian leucosis, untuk uji tambahan selain titer antibodi pada sampel serum, juga dilakukan uji isolasi virus leukosis.

Tabel.9. Jenis Penyakit yang Harus Bebas Pada Flok Ayam SPF dan Jenis Uji untuk Pemeriksaan Pada Tahap Awal dan Tahap Lanjutan

Mikroorganisme	Jenis Uji	Transmisi Vertikal	Kecepatan Penyebaran
<i>Avian adenovirus</i>	ELISA, AGPT	Ya	Lambat
<i>Avian encephalomyelitis virus</i>	ELISA, AGPT	Ya	Cepat
<i>Avian infectious bronchitis virus</i>	ELISA, HI	Tidak	Cepat
<i>Avian infectious laryngo-tracheitis virus</i>	VN, ELISA	Tidak	Lambat
<i>Avian leucosis virus</i>	ELISA untuk virus dan antibodi, VN untuk antibodi	Ya	Lambat
<i>Avian nephritis virus</i>	<i>Immunostaining (IS)</i>	Tidak	Lambat
<i>Avian orthoreovirus</i>	IS, ELISA	Ya	Lambat
<i>Avian reticuloendotheliosis virus</i>	AGPT, IS, ELISA	Ya	Lambat
<i>Egg drop syndrome 76 adenovirus</i>	HI, ELISA	Ya	Lambat
<i>Infectious bursal disease virus</i>	Serotipe 1 : AGPT, ELISA, VN Serotipe 2 : VN	Tidak	Cepat
<i>Influenza A Virus</i>	AGP, ELISA, HI	Tidak	Cepat
<i>Marek's disease virus</i>	AGP	Tidak	Cepat
<i>Newcastle disease virus</i>	HI, ELISA	Tidak	Cepat
<i>Turkey rhinotracheitis virus</i>	ELISA	Tidak	Lambat
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Aglutinası dan HI untuk konfirmasi tes positif, ELISA, HI	Ya	Lambat

<i>Mycoplasma synoviae</i>	Aglutinası dan HI untuk konfirmasi tes positif, ELISA, HI	Ya	Cepat
<i>Salmonella pullorum</i>	Aglutinası	Ya	Lambat
<i>Chicken Anemia Virus</i>	IS, ELISA, VN	Ya	Lambat

Selain uji serologi, gejala klinik terhadap adanya penyakit *Pox* dan penyakit lain dilakukan 1 minggu sekali. Bedah bangkai dilakukan untuk konfirmasi diagnosa jika diperlukan, pengujian histopatologi dilakukan pada ayam mati yang tidak memperlihatkan gejala klinis yang spesifik.

Negatif *Salmonella* ditentukan dengan pengujian serologi dan pembiakan dari sampel feses, sedikitnya sekali tiap 4 minggu dan minimal 10 sampel digunakan untuk uji.

Jika didapatkan hasil positif dari ayam yang diuji untuk penentuan status SPF dari suatu flock, maka flock tersebut tidak dapat dikatakan sebagai flock ayam SPF. Jika didapatkan hasil positif dari ayam yang diuji pada flock ayam SPF, maka flock tersebut kehilangan status SPFnya. Ayam, embrio atau jaringan sel yang berasal dari flock tersebut tidak dapat digunakan untuk produksi dan pengujian vaksin. Ayam, telur, atau jaringan sel yang berasal dari flock yang kehilangan status SPFnya harus dibuang dan pengujian mutu yang dilakukan dengan memakai ayam, telur, atau biakan jaringan tersebut dikatakan tidak memenuhi syarat dan harus diulang.

LAMPIRAN XII

EXTRANEIOUS PATHOGEN FREE PADA SEED LOT VIRUS VAKSIN UNGGAS

Umum

1. Dalam uji-uji di bawah ini, ayam ataupun bahan-bahan yang berasal dari ayam seperti telur dan biakan jaringan/ sel harus berasal dari ayam SPF.
2. Untuk sediaan kering-beku, sediaan dilarutkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Jika dinyatakan lain, dalam 0,1 mL inokulum sediaan yang diuji harus mengandung virus yang setara dengan 10 dosis vaksin.
3. Jika virus dalam *seed lot* bisa mempengaruhi pelaksanaan dan sensitivitas dari pengujian, maka virus dinetralisasi dengan menggunakan antiserum monospesifik.

Uji-Uji

1. Uji Pada TAB

Vaksin dinetralisasi dengan antiserum monospesifik yang homolog, sehingga didapat suatu campuran yang mengandung setara 10 dosis per 0,2 mL. Untuk mengontrol infeksi bakteri *extraneous* dapat menambahkan antibiotik yang sesuai.

Tiga kelompok TAB SPF terdiri dari 10 butir, diinokulasi sebagai berikut:

Kelompok 1: 10 butir TAB SPF umur 9–11 hari diinokulasi @ 0,2 mL vaksin yang telah dinetralisasi ke dalam *allantoic cavity*.

Kelompok 2: 10 butir TAB SPF umur 9–11 hari diinokulasi @ 0,2 mL pada CAM.

Kelompok 3: 10 butir TAB SPF umur 5–6 hari diinokulasi @ 0,2 mL ke dalam *yolk sac*.

Telur kelompok 1 dan 2 diteropong setiap hari selama 7 hari, sedangkan kelompok 3 diteropong selama 12 hari. Setiap embrio yang mati pada 24 jam pasca inokulasi dibuang, uji ini dinyatakan valid jika minimal 6 TAB SPF dari masing-masing kelompok tetap hidup dalam 24 jam pasca inokulasi. Embrio yang mati setelah 24 jam pasca inokulasi atau yang bertahan hingga periode observasi diperiksa ada tidaknya abnormalitas secara makroskopis. Pemeriksaan juga dilakukan pada setiap abnormalitas pada CAM dan *allantoic fluid* untuk mengetahui ada tidaknya agen *haemagglutination*. Kemudian dilakukan pasase ulang seperti diatas.

Seed lot vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak ada embrio yang secara makroskopis menunjukkan abnormalitas atau mati karena hal-hal yang berkenaan dengan *seed lot* dan jika pemeriksaan CAM serta *allantoic fluid* tidak menunjukkan adanya keberadaan *agen extraneous*.

2. Uji Dalam Biakan *Chicken Kidney Cells* (CKC)

Virus dalam *seed lot* dinetralisasi dengan antiserum yang homolog. Uji ini menggunakan 7 biakan *monolayer* CKC 25 cm². Dua biakan sel *monolayer* digunakan sebagai kontrol negatif. Lima biakan sel *monolayer* lainnya digunakan sebagai biakan uji. Biakan sel *monolayer* uji diinokulasi @ 0,1 mL sediaan yang diuji (setara 10 dosis) dan didiamkan 1 jam hingga terserap kemudian ditambahkan media biakan. Biakan diinkubasi dan dilakukan pasase 3-4 kali dengan interval 4-7 hari.

Selama periode inkubasi semua biakan sel diperiksa dengan menggunakan mikroskop untuk mengetahui adanya CPE atau agen kontaminan dari vaksin yang diuji. Pada akhir periode pasase dapat dilakukan satu dari pengujian sebagai berikut:

- a. Sel pada pasase terakhir (10 cm²) difiksasi dan diwarnai dengan Giemsa atau *haematoxylin* dan eosin kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop untuk melihat ada tidaknya CPE, *inclusion bodies*, *syncytial formation*, atau setiap gejala yang menunjukkan adanya kontaminasi yang berasal dari sediaan yang diuji.
- b. Sel dari pasase terakhir (25 cm²) dicuci dan dikeringkan, kemudian ditambahkan suspensi sel darah ayam 5% (1 mL suspensi untuk tiap 5 cm²). Selanjutnya, diinkubasi pada 4°C selama 20 menit dan kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4. Sel diperiksa dengan menggunakan mikroskop untuk mengetahui ada tidaknya agen *haemadsorbing* dari sel yang diuji.
- c. Masing-masing cairan yang dihasilkan dari biakan CKC diuji dengan menggunakan sel darah merah ayam untuk uji *haemagglutination* untuk mengetahui adanya agen *haemagglutination* dari vaksin yang diuji.

Uji dinyatakan valid jika tidak ditemukan tanda atau gejala adanya agen *extraneous* pada biakan kontrol negatif dan lebih dari 80% biakan sel *monolayer* tidak rusak setelah dipasase.

Seed lot vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika tidak ditemukan adanya *extraneous* agen.

3. Uji untuk Virus *Avian Leucosis*

Dalam cawan petri ukuran diameter 60 mm², lima biakan CEF yang diketahui dapat menumbuhkan virus *avian leucosis* sub grup A, B, dan J, masing-masing diinokulasi 0,1 mL (10 dosis vaksin yang telah dinetralisasi) sediaan yang diuji. Sebagai kontrol positif, 2 biakan CEF lainnya diinokulasi dengan menggunakan virus *avian leucosis* sub grup A (tidak lebih dari 10 CCID₅₀ dalam 0,1 mL), dua biakan yang lain diinokulasi dengan virus *avian leucosis* sub grup B (tidak lebih dari 10 CCID₅₀ dalam 0,1 mL), dan 2 biakan diinokulasi dengan virus *avian leucosis* sub grup J (tidak lebih dari 10 CCID₅₀ dalam 0,1 mL). Dua biakan CEF lainnya digunakan sebagai kontrol negatif.

Biakan diinkubasi pada 37°C dan dipasase 2 kali dengan interval 3-4 hari. Pada akhir periode pasase, dilakukan panen sel untuk kemudian disuspensikan kembali pada konsentrasi 10⁷ sel per mL dan dibuat ekstrak. Uji dinyatakan valid jika virus *avian leucosis* dideteksi pada tidak kurang dari 5 biakan kontrol positif atau jika tidak terdeteksi pada kontrol negatif.

Seed lot dinyatakan memenuhi syarat jika tidak ditemukan adanya virus *avian leucosis*.

4. Uji untuk *Avian Retikuloendotheliosis Virus*

Uji ini menggunakan 11 biakan *monolayer* CEF primer atau sekunder (25 cm²), yang berasal dari jaringan embrio ayam umur 13-14 hari. Lima biakan sel *monolayer* masing-

masing diinokulasi 0,1 mL *seed lot* yang diuji (setara dengan 10 dosis yang telah dinetralisasi) kemudian didiamkan selama 1 jam hingga terserap, dan ditambahkan media biakan. Empat biakan sel *monolayer* masing-masing diinokulasi dengan virus *avian reticuloendotheliosis* (tidak lebih dari 10 CCID₅₀ dalam 0,1 mL) sebagai kontrol positif. Dua biakan sel *monolayer* lainnya digunakan sebagai kontrol negatif. Biakan diinkubasi dan dilakukan 2 kali pasase dengan interval tiap 3-4 hari. Uji dinyatakan valid jika lebih dari 75% kontrol positif atau lebih dari 80% biakan sel *monolayer* uji atau 100% kontrol negatif tidak rusak setelah pasase.

Untuk pasase yang terakhir, fibroblas yang dipanen ditumbuhkan pada media atau substrat yang sesuai sehingga menghasilkan *confluents fibroblast* dengan luas area 10 cm². Pengujian dilanjutkan dengan *immunostaining* pada masing-masing *confluents fibroblast* untuk melihat ada/tidaknya virus *avian reticuloendotheliosis*. Uji dinyatakan valid jika virus bisa dideteksi pada lebih dari 75% biakan sel *monolayer* kontrol positif atau jika tidak ditemukan di kontrol negatif.

Seed lot vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak ada gejala yang menunjukkan virus *avian reticuloendotheliosis*.

5. Uji untuk *Chicken Anemia Virus*

Uji ini menggunakan 11 suspensi *MDCC-MSDI cell line* @ 20 mL atau *cell line* lain yang sesuai dalam *flask* 25 cm² dengan konsentrasi *cell line* 5x10⁵ sel/mL. Lima *flask* masing-masing diinokulasi 0,1 mL *seed lot* (setara dengan 10 dosis). Empat *flask* diinokulasi dengan 10 CCID₅₀ virus *chicken anemia* sebagai kontrol positif. Dua *flask* tidak diinokulasi sebagai kontrol negatif.

Biakan diinkubasi dan dipasase 8 kali dengan interval 3-4 hari. Pada saat pasase, keberadaan virus *chicken anemia* ditandai dengan adanya perubahan metabolik di media yang terinfeksi. Untuk melihat ada/tidaknya CPE dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis. Pada akhir periode inkubasi, tiap biakan sel disentrifus dengan kecepatan rendah. Resuspensi dilakukan sehingga mengandung 10⁶ sel/mL. Kemudian sebanyak 25 µl dimasukkan ke masing-masing 10 *wells multi-well slide*. Pemeriksaan sel menggunakan *immunostaining*. Pengujian dinyatakan valid, jika virus *chicken anemia* dideteksi pada lebih dari 75% kontrol positif atau jika tidak ditemukan di kontrol negatif. *Seed lot* vaksin dinyatakan memenuhi syarat, jika tidak ditemukan adanya *Chicken anemia virus*.

6. Uji Pada Ayam

a. Uji Standar

Tidak kurang dari 10 ekor ayam SPF umur 2 minggu, divaksinasi secara IM dengan 100 dosis vaksin atau bila melalui tetes mata dengan 10 dosis. Dua minggu kemudian dilakukan vaksinasi ulang dan diamati selama 3 minggu.

Uji dinyatakan valid jika sampai akhir masa pengamatan lebih dari 80% ayam yang digunakan bertahan hidup. Semua serum unggas sebelum dan setelah masa akhir pengamatan, tidak mengandung antibodi terhadap organisme patogen

seperti yang terdapat pada daftar Tabel 12.1. Tetapi jika ditemukan *extraneous* patogen selain virus yang dipakai dalam produksi maka uji tidak memenuhi syarat dan harus diulang.

Seed lot dinyatakan memenuhi syarat bila gejala penyakit tidak ditemukan pada unggas selama periode pengamatan.

secara mikroskopis. Pada akhir periode inkubasi, tiap biakan sel disentrifus dengan kecepatan rendah. Resuspensi dilakukan sehingga mengandung 10^6 sel/mL. Kemudian sebanyak 25 μ L dimasukkan ke masing-masing 10 *wells multi-well slide*. Pemeriksaan sel menggunakan *immunostaining*. Pengujian dinyatakan valid, jika virus *chicken anemia* dideteksi pada lebih dari 75% kontrol positif atau jika tidak ditemukan di kontrol negatif.

Seed lot vaksin dinyatakan memenuhi syarat, jika tidak ditemukan adanya *Chicken anemia virus*.

Tabel 12.1 *Extraneous Pathogens Free* dan Jenis Uji

No. Jenis Patogen	Jenis Uji
1. <i>Avian infectious bronchitis virus</i>	AGPT atau HI
2. <i>Infectious bursal (Gumboro)</i>	AGPT
3. <i>Marek's disease virus</i>	AGPT
4. <i>Newcastle disease virus</i>	HI
5. <i>Salmonella pullorum</i>	Agg
6. <i>Adenovirus</i>	AGPT, EIA, SN
7. <i>Avian encephalomyelitis virus</i>	AGPT atau EIA
8. <i>Avian reovirus</i>	IS, EIA
9. <i>Avian reticuloendotheliosis virus</i>	AGP, IS, EIA
10. <i>Influenza A Virus</i>	AGPT
11. <i>Avian infectious laryngo tracheitis virus</i>	SN
12. <i>Avian leucosis virus</i>	SN, EIA
13. <i>Avian nephritis virus</i>	IS
14. <i>Chicken anemia virus</i>	IS, EIA, SN
<i>Egg drop syndrome virus</i>	HI, EIA
<i>Turkey rhinotracheitis virus</i>	EIA

Keterangan: Agg : Agglutination, EIA : IS : Immunostaining

b. Uji tambahan Agen *Extraneous* Pada Kalkun

Jika *seed* virus yang digunakan berasal dari kalkun atau dipropagasi dalam substrat kalkun, maka uji antibodi terhadap agen-agen patogen berikut juga harus dilakukan sebagaimana Tabel 12.2

Uji untuk mengetahui ada tidaknya *turkey lympho-proliferative disease virus* dilakukan dengan melakukan inokulasi secara IP pada 20 ekor kalkun umur 4 minggu. Pengamatan dilakukan selama 40 hari. Uji dinyatakan valid jika jumlah kalkun yang mati karena hal-hal yang tidak spesifik, kurang dari 20%.

Seed lot dinyatakan memenuhi syarat jika 2 minggu pasca inokulasi, limpa dan timus dari 10 ekor kalkun tidak menunjukkan lesi makroskopis ataupun mikroskopis dan tidak ada kalkun yang mati disebabkan oleh agen patogen tersebut.

Tabel 12.2 Jenis Patogen dan Jenis Uji Tambahan Pada Kalkun

No. Jenis Patogen	Jenis Uji
1. <i>Chlamydia spp.</i>	EIA
2. <i>Avian infectious haemorrhagic enteritis virus</i>	AGPT
3. <i>Avian paramyxovirus 3</i>	HI
4. <i>Avian infectious bursal disease virus type 2</i>	SN

c. Uji Tambahan Agen *Extraneous* Pada Bebek

Jika *seed* virus berasal dari bebek atau dipropagasi dalam substrat bebek, maka uji antibodi terhadap agen-agen patogen berikut juga harus dilakukan sebagaimana Tabel 12.3.

Tabel 12.3 Jenis Patogen dan Jenis Uji Tambahan Pada Bebek

No. Jenis Patogen	Jenis Uji
1. <i>Chlamydia spp.</i>	EIA
2. <i>Duck and goose parvovirus</i>	SN, EIA
3. <i>Duck enteritis virus</i>	SN
4. <i>Duck hepatitis virus type 1</i>	SN

Seed lot dinyatakan memenuhi syarat jika tidak ditemukan agen-agen patogen

7. Uji terhadap *Mycoplasma* Unggas

Disesuaikan dengan uji bebas *Mycoplasma* unggas pada *seed lot* virus hidup untuk unggas seperti pada Lampiran III.

LAMPIRAN XIII

EXTRANEIOUS PATHOGEN FREE PADA BATCH PRODUK JADI VAKSIN VIRUS AKTIF UNGGAS

Umum

1. Vaksin virus aktif unggas harus memenuhi uji ***Extraneous Pathogen Free***, kecuali dinyatakan lain dalam monografi individu.
2. Dalam uji-uji di bawah ini, ayam ataupun bahan-bahan yang berasal dari ayam seperti telur dan biakan jaringan harus berasal dari ayam SPF.
3. Untuk sediaan kering-beku, sediaan dilarutkan dengan pelarut sesuai yang direkomendasikan. Kecuali dinyatakan lain, dalam 0,1 mL inokulum vaksin yang diuji harus mengandung setara dengan 10 dosis vaksin.
4. Jika virus dalam vaksin bisa mempengaruhi pelaksanaan dan sensitivitas dari pengujian, maka virus dinetralisasi dengan menggunakan antiserum monospesifik

Uji-Uji

1. Uji Pada TAB

Vaksin dinetralisasi dengan antiserum monospesifik yang homolog, sehingga didapat suatu campuran yang mengandung setara 10 dosis per 0,1 mL. Untuk mengontrol infeksi bakteri *extraneous* ditambahkan antibiotik yang sesuai.

Tiga kelompok TAB terdiri dari 10 butir diinokulasi sebagai berikut:

Kelompok 1: 10 butir TAB SPF umur 9–11 hari diinokulasi @ 0,2 mL vaksin yang telah dinetralisasi ke dalam *allantoic cavity*.

- a. Kelompok 2: 10 butir TAB SPF umur 9–11 hari diinokulasi @ 0,2 mL pada CAM.
- b. Kelompok 3: 10 butir TAB SPF umur 5–6 hari diinokulasi @ 0,2 mL ke dalam *yolk sac*.

Telur kelompok 1 dan 2 diteropong setiap hari selama 7 hari, sedangkan kelompok 3 diteropong selama 12 hari. Setiap embrio yang mati dalam 24 jam pasca inokulasi dibuang. Uji ini dinyatakan valid jika minimal 6 TAB SPF dari tiap kelompok tetap hidup pada 24 jam pasca inokulasi. Embrio yang mati setelah 24 jam pasca inokulasi atau yang hidup hingga akhir periode pengamatan diperiksa ada tidaknya abnormalitas secara makroskopis. Pemeriksaan juga dilakukan pada setiap abnormalitas pada CAM dan *allantoic fluid* diuji untuk mengetahui ada tidaknya agen *haemagglutination*. Kemudian dilakukan pasase seperti diatas.

Batch vaksin dinyatakan lulus apabila:

- a. Secara makroskopis tidak ada embrio yang menunjukkan abnormalitas atau mati karena hal-hal yang berkenaan dengan vaksin.
- b. CAM dan *allantoic fluid* tidak menunjukkan adanya keberadaan agen *extraneous*.

2. Uji Dalam Biakan CEF

Virus vaksin dinetralisasikan dengan antiserum homolog sehingga mendapatkan campuran yang mengandung 10 dosis per 0,1 mL. Uji ini menggunakan 7 *monolayer*

biakan *chicken kidney cells* (CKC) 25 cm². Dua biakan sel *monolayer* digunakan sebagai kontrol negatif. Lima biakan sel *monolayer* digunakan sebagai biakan uji. Tiap biakan uji diinokulasi dengan 0,1 mL sediaan yang diuji (setara 10 dosis) dan didiamkan 1 jam hingga terserap kemudian ditambahkan media biakan.

Biakan sel *monolayer* diinkubasi dan dilakukan pasase 4-5 kali dengan interval 4-5 hari. Pasase dilaksanakan setelah dilakukan *freeze-thaw cycle*. Uji dinyatakan valid jika lebih dari 80% biakan sel *monolayer* tidak rusak setelah pasase.

Selama periode inkubasi, semua biakan sel diperiksa dengan menggunakan mikroskop untuk mengetahui adanya CPE atau ada tidaknya agen kontaminan dari vaksin yang diuji.

Pada akhir periode pasase dilakukan satu dari pengujian sebagai berikut:

- a. Sel pasase terakhir (10 cm²) difiksasi dan diwarnai dengan Giemsa atau *haematoxylin* dan eosin. Biakan sel *monolayer* diperiksa dengan menggunakan mikroskop untuk melihat ada tidaknya CPE, *inclusion bodies*, *syncytial formation*, atau setiap gejala yang menunjukkan adanya kontaminasi yang berasal dari sediaan yang diuji.
- b. Sel pasase terakhir (25 cm²) dicuci dan dikeringkan, kemudian ditambahkan suspensi sel darah ayam 5% (1 mL suspensi untuk tiap 5 cm²). Selanjutnya, diinkubasi pada 4°C selama 20 menit dan dicuci dengan PBS pH 7,4. Sel diperiksa dengan menggunakan mikroskop untuk mengetahui ada tidaknya agen *haemadsorbing*.
- c. Masing-masing cairan yang dihasilkan dari biakan CKC diuji dengan menggunakan sel darah merah ayam untuk uji *haemagglutination* untuk mengetahui adanya agen *haemagglutination* dari vaksin yang diuji.

Uji dinyatakan valid jika tidak ditemukan tanda atau gejala adanya agen *extraneous* pada biakan kontrol negatif.

Batch vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika tidak ditemukan adanya *extraneous* agen.

3. Uji untuk *Egg Drop Syndrome Virus* (EDS)

Uji ini menggunakan 11 *monolayer* biakan *Chicken embryo liver cells* 25 cm² umur 14-16 hari. Lima biakan sel *monolayer* diinokulasi @ 0,1 mL vaksin yang diuji (setara dengan 10 dosis yang telah dinetralisasi) kemudian didiamkan selama 1 jam hingga terserap dan ditambahkan media biakan. Empat biakan sel *monolayer* @ 0,1 mL dengan strain virus EDS yang sesuai (tidak lebih dari 10 CCID₅₀ dalam 0,1 mL) sebagai kontrol positif. Dua biakan sel *monolayer* lainnya digunakan sebagai kontrol negatif.

Biakan diinkubasi dan dipasase 4-5 kali dengan interval 4-5 hari. Pengujian dinyatakan valid jika lebih dari 80% biakan sel *monolayer* uji atau, lebih dari 75% biakan sel *monolayer* kontrol positif atau 100% biakan sel *monolayer* kontrol negatif tidak rusak setelah pasase.

Selama masa inkubasi semua biakan diamati untuk mengetahui adanya CPE atau agen kontaminasi dari agen yang diuji. Pada akhir masa inkubasi, dilakukan pengujian sebagai berikut: cairan biakan sel *monolayer* uji, kontrol positif dan kontrol negatif diuji secara terpisah. Tiap biakan sel ditambahkan sel darah merah ayam untuk mengetahui adanya agen *haemagglutination* dari vaksin yang diuji.

Uji dinyatakan valid jika:

- a. Virus EDS tidak terdeteksi pada semua kontrol negatif
- b. Virus EDS terdeteksi pada lebih dari 75% biakan sel *monolayer* kontrol positif
- c. Hasil dari kedua biakan sel *monolayer* kontrol negatif tidak menunjukkan *inconclusive*.

Batch vaksin dinyatakan memenuhi syarat, jika tidak menunjukkan adanya *EDS virus* dan *extraneous* agen.

4. Uji untuk *Marek's Disease Virus*

Uji ini menggunakan 11 *monolayer* biakan *Chicken embryo liver cells* 25 cm² umur 14-16 hari. Lima biakan sel *monolayer* diinokulasi @ 0,1 mL vaksin yang diuji (setara dengan 10 dosis yang telah dinetralisasi) kemudian didiamkan selama 1 jam hingga terserap, dan ditambahkan media biakan. Empat biakan sel *monolayer* diinokulasi masing-masing dengan strain virus *Marek's* yang sesuai (tidak lebih dari 10 CCID₅₀ dalam 0,1 mL) sebagai kontrol positif. Dua biakan sel *monolayer* lainnya digunakan sebagai kontrol negatif.

Biakan sel *monolayer* diinkubasi dan dipasase 4-5 kali dengan interval 4-5 hari sebagaimana prosedur diatas. Pengujian dinyatakan valid jika lebih dari 80% biakan sel *monolayer* uji atau, lebih dari 75% biakan sel *monolayer* kontrol positif atau 100% biakan sel *monolayer* kontrol negatif tidak rusak setelah pasase.

Selama masa inkubasi semua biakan diamati untuk mengetahui adanya CPE atau agen kontaminasi dari agen yang diuji. Untuk pasase yang terakhir, biakan sel ditumbuhkan pada media/substrat yang sesuai untuk menghasilkan *confluents cells* 10 cm². Pengujian dilanjutkan dengan *immunostaining* pada masing-masing *confluents cells* untuk melihat ada tidaknya virus *Marek's disease*. Uji dinyatakan valid jika virus bisa dideteksi pada lebih dari 75% biakan sel *monolayer* kontrol positif atau jika tidak ditemukan di kontrol negatif.

Batch vaksin dinyatakan memenuhi syarat, jika tidak ada gejala yang menunjukkan virus *Marek's disease* dan agen patogen *extraneous* yang lain.

5. Uji untuk *Turkey Rhinotracheitis Virus*

- a. Biakan CEF

Catatan: Uji ini dapat dikombinasikan dengan Uji No. 2 dengan menggunakan biakan sel *monolayer* uji dan kontrol negatif yang sama.

Uji menggunakan 11 biakan *monolayer chicken embryo liver cells* 25 cm² umur 14-16 hari. Lima biakan sel *monolayer* diinokulasi @ 0,1 mL vaksin yang diuji (setara dengan 10 dosis yang telah dinetralisasi), kemudian didiamkan selama 1 jam hingga terserap, dan ditambahkan media biakan.

Empat biakan sel *monolayer* diinokulasi masing-masing dengan strain virus *turkey rhinotracheitis* yang sesuai (tidak lebih dari 10 CCID₅₀ dalam 0,1 mL) sebagai kontrol positif. Dua biakan sel *monolayer* lainnya digunakan sebagai kontrol negatif.

Biakan sel *monolayer* diinkubasi dan dipasase 4-5 kali dengan interval 4-5 hari sesuai dengan prosedur diatas. Pengujian dinyatakan valid jika lebih dari 80% biakan sel *monolayer* uji atau, lebih dari 75% *monolayer* kontrol positif atau 100% *monolayer* kontrol negatif tidak rusak setelah pasase.

Selama masa inkubasi semua biakan diamati untuk mengetahui adanya CPE atau agen kontaminasi dari agen yang diuji. Untuk pasase yang terakhir, biakan sel ditumbuhkan pada media/substrat yang sesuai untuk menghasilkan *confluents cells* 10 cm². Pengujian dilanjutkan dengan *immunostaining* pada masing-masing *confluents cells* untuk melihat ada tidaknya virus *turkey rhinotracheitis*. Uji dinyatakan valid jika virus bisa dideteksi pada lebih dari 75% biakan sel *monolayer* kontrol positif atau jika tidak ditemukan di kontrol negatif.

Batch vaksin dinyatakan memenuhi syarat, jika tidak ada gejala yang menunjukkan virus *turkey rhinotracheitis* dan agen patogen *extraneous* yang lain

b. Sel Vero

Uji ini menggunakan 11 biakan *monolayer* sel vero 25 cm². Lima biakan sel *monolayer* diinokulasi @ 0,1 mL vaksin uji (setara 10 dosis yang telah dinetralisasi), kemudian didiamkan hingga terabsorpsi selama 1 jam, dan ditambahkan media biakan. Empat biakan sel *monolayer* diinokulasi 0,1 mL masing-masing dengan virus *turkey rhinotracheitis* (tidak lebih dari 10 CCID₅₀ dalam 0,1 mL) sebagai kontrol positif. Dua biakan sel *monolayer* sebagai kontrol negatif.

Biakan sel diinkubasi dan dipasase 4-5 kali dengan interval 4-5 hari. Prosedur pasase dilakukan sebagaimana prosedur diatas. Pengujian dinyatakan valid jika lebih dari 80% biakan sel *monolayer* uji atau, lebih dari 75% biakan sel *monolayer* kontrol positif atau 100% biakan sel *monolayer* kontrol negatif bertahan setelah pasase.

Selama masa inkubasi semua biakan diamati untuk mengetahui adanya CPE atau agen kontaminasi dari agen yang diuji. Untuk pasase yang terakhir, ditumbuhkan dalam media/substrat yang sesuai untuk menghasilkan *confluents cells* 10 cm². Pengujian dilanjutkan dengan *immunostaining* pada masing-masing *confluents cells* untuk melihat ada tidaknya virus *turkey rhinotracheitis*. Uji dinyatakan valid jika virus bisa dideteksi pada lebih dari 75% biakan sel *monolayer* kontrol positif atau jika tidak ditemukan di kontrol negatif.

Batch vaksin dinyatakan memenuhi syarat, jika tidak ada gejala yang menunjukkan virus *turkey rhinotracheitis* dan agen patogen *extraneous* yang lain.

6. Uji untuk *Chicken Anemia Virus*

Uji ini menggunakan 11 suspensi *MDCC – MSDI cell line* @ 20 mL atau *cell line* lain yang sesuai dalam *flask* 25 cm² dengan konsentrasi *cell line* 5 x 10⁵ sel/mL. Lima *flask* diinokulasi @ 0,1 mL vaksin uji (setara 10 dosis yang telah dinetralisasi). Empat *flask* diinokulasi dengan 10 CCID₅₀ virus *chicken anemia* sebagai kontrol positif. Dua *flask* tidak diinokulasi sebagai kontrol negatif.

Biakan diinkubasi dan dipasase 8 kali dengan interval 3-4 hari. Pada saat pasase, keberadaan virus *chicken anemia* ditandai dengan adanya perubahan metabolik di media yang terinfeksi. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop untuk melihat ada/tidaknya CPE. Pada akhir periode inkubasi, biakan sel disentrifus dengan kecepatan rendah dan diresuspensi sehingga mengandung 10⁶ sel/mL. Selanjutnya sebanyak 25 µl suspensi dimasukkan ke masing-masing 10 *wells multi-well slide*. Sel diperiksa dengan menggunakan *immunostaining*. Pengujian dinyatakan valid, jika virus *chicken anemia* dideteksi pada lebih dari 75% kontrol positif atau jika tidak ditemukan di kontrol negatif.

Batch vaksin dinyatakan memenuhi syarat, jika tidak ditemukan adanya *chicken anemia virus*.

7. Uji Pada Ayam

a. Uji Standar

Tidak kurang dari 10 ekor ayam SPF umur 2 minggu, diinokulasi 100 dosis secara IM atau 10 dosis secara tetes mata. Dua minggu kemudian dilakukan inokulasi ulang dan diamati selama 3 minggu. Uji dinyatakan valid jika sampai akhir masa pengamatan lebih dari 80% ayam yang digunakan bertahan hidup.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat bila gejala penyakit tidak ditemukan pada unggas selama periode pengamatan.

Selain pengujian tersebut diatas, dengan menggunakan metode yang tepat, semua serum unggas sebelum dan setelah masa akhir pengamatan, tidak mengandung antibodi terhadap organisme patogen seperti yang terdapat pada daftar Tabel 13.1. Tetapi jika ditemukan *extraneous* patogen selain virus yang dipakai dalam produksi maka uji tidak memenuhi syarat dan harus diulang.

Tabel 13.1 *Extraneous Pathogens Free* dan Jenis Uji

No. Jenis Patogen	Jenis Uji ¹⁾
1. <i>Avian infectious bronchitis virus</i> ²⁾	AGPT atau HI
2. <i>Infectious bursal (Gumboro)</i>	AGPT
3. <i>Marek's disease virus</i>	AGPT
4. <i>Newcastle disease virus</i>	HI
5. <i>Salmonella pullorum</i>	Agg
6. <i>Adenovirus</i> ³⁾	AGPT, EIA, SN
7. <i>Avian encephalomyelitis virus</i>	AGPT atau EIA
8. <i>Avian reovirus</i> ³⁾	IS, EIA
9. <i>Avian reticuloendotheliosis virus</i>	AGPT, IS, EIA
10. <i>Influenza A virus</i> ³⁾	AGPT
11. <i>Avian infectious laryngo tracheitis virus</i>	SN
12. <i>Avian leucosis virus</i> ³⁾	SN, EIA
13. <i>Avian nephritis virus</i>	IS
14. <i>Chicken anemia virus</i>	IS, EIA, SN
<i>Egg drop syndrome virus</i>	HI, EIA
<i>Turkey rhinotracheitis virus</i>	EIA

Keterangan: Agg: *Agglutination*, IS: *Immunostaining*.

- 1) Jenis uji disesuaikan dengan kesepakatan dan peraturan kontrol yang berlaku, jenis uji yang lain dapat digunakan bilamana uji yang tersebut dalam Tabel *Extraneous Pathogens Free* kurang sensitif dan spesifik.
- 2) Uji terhadap IBV disesuaikan dengan kesepakatan dan peraturan pengawasan yang berlaku. Uji ini boleh tidak dilakukan oleh suatu perusahaan sebagai uji rutin dari masing-masing batch. Jika uji item a) telah dilakukan pada tiap-tiap *batch*.
- 3) Uji terhadap adenovirus, reovirus, leukosis virus dan influenza A virus. Disesuaikan dengan kesepakatan dan peraturan pengawasan yang berlaku, untuk virus ini tidak harus dilakukan oleh perusahaan sebagai uji rutin. Pada tiap-tiap *batch* kecuali bila dinyatakan pada monografi.

b. Uji Tambahan Agen *Extraneous* Pada Kalkun

Jika *seed* virus berasal dari kalkun atau dipropagasi dalam substrat kalkun, maka uji antibodi terhadap agen-agen patogen berikut juga harus dilakukan sebagaimana Tabel 13.2.

Tabel 13.2 Jenis Patogen dan Jenis Uji Tambahan Pada Kalkun

No. Jenis Patogen	Jenis Uji
1. <i>Chlamydia spp.</i>	EIA
2. <i>Avian infectious haemorrhagic enteritis virus</i>	AGP
3. <i>Avian paramyxovirus 3</i>	HI
4. <i>Avian infectious bursal disease virus type 2</i>	SN

Uji untuk mengetahui ada tidaknya *turkey lympho-proliferative disease virus* dilakukan dengan melakukan inokulasi secara IP pada 20 ekor kalkun umur 4 minggu. Pengamatan dilakukan selama 40 hari. Uji dinyatakan valid jika jumlah kalkun yang mati karena hal-hal yang tidak spesifik, kurang dari 20%.

Batch vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika 2 minggu pasca inokulasi, limpa dan timus dari 10 ekor kalkun tidak menunjukkan lesi makroskopis ataupun mikroskopis dan tidak ada kalkun yang mati disebabkan oleh agen patogen tersebut.

c. Uji Tambahan Agen *Extraneous* Pada Bebek

Jika *seed* virus berasal dari bebek atau dipropagasi dalam substrat bebek, maka uji antibodi terhadap agen-agen patogen berikut juga harus dilakukan sebagaimana Tabel 13.3.

Tabel 13.3. Jenis Patogen dan Jenis Uji Tambahan Pada Bebek

No. Jenis Patogen	Jenis Uji
1. <i>Chlamydia spp.</i>	EIA
2. <i>Duck and goose parvovirus</i>	SN, EIA
3. <i>Duck enteritis virus</i>	SN
4. <i>Duck hepatitis virus type 1</i>	SN

Batch vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika tidak ditemukan *extraneous* pathogen.

8. Uji *Mycoplasma* Unggas

Disesuaikan dengan uji bebas *Mycoplasma* unggas pada vaksin virus hidup untuk unggas seperti pada Lampiran III.

LAMPIRAN XIV

UJI KUALITAS MEDIA

Uji ini bertujuan untuk menguji kualitas media-media yang akan digunakan dalam uji sterilitas.

Uji kualitas media Tioglikolat (TGC)

- a. Beberapa tabung media, diisi dengan 20 mL TGC setiap tabung kemudian disterilkan.
- b. Dua tabung yang berisi TGC diinokulasi dengan *Bacillus subtilis*, diinkubasi pada 30°-37°C, kondisi *aerob*, selama tidak lebih dari 3 hari. Media dinyatakan memenuhi syarat apabila *Bacillus subtilis* dapat tumbuh dengan subur.
- c. Dua tabung yang berisi TGC diinokulasi dengan *Candida albicans*, diinkubasi pada 20-25°C, kondisi *aerob*, dan tidak lebih dari 5 hari. Media dinyatakan memenuhi syarat apabila dalam *Candida albicans* dapat tumbuh dengan subur.
- d. Dua tabung yang berisi TGC diinokulasi dengan *Clostridium sporogenes*, diinkubasi pada 30°-37°C, kondisi *anaerob*, dan selama tidak lebih dari 3 hari. Media dinyatakan memenuhi syarat apabila *Clostridium sporogenes* dapat tumbuh dengan subur.
- e. Dua tabung yang berisi TGC diinokulasi dengan *Streptococcus haemolyticus* dan dua tabung lain yang di dalamnya dipasang tabung *Durham* diinokulasi dengan *Escherichia coli*. Semua media yang telah diinokulasi dan media yang tidak diinokulasi sebagai kontrol diinkubasi pada 30°-37°C, kondisi *aerob*, selama 18-24 jam. Dari biakan tersebut di atas, biakan *E. coli* dipindahkan ke media *triple sugar iron* (TSI) agar miring dan biakan *Streptococcus haemolyticus* dipindahkan ke media agar darah. Semua media TSI agar miring dan media agar darah yang telah diinokulasi tersebut diinkubasikan pada 37°C selama 18-24 jam. Media dinyatakan berkualitas apabila bakteri *E.coli* dan *Streptococcus haemolyticus* dapat tumbuh dengan subur.

Uji kualitas media *Sabouraud Casein Digest* (SCD)

- a. Dua tabung media SCD, diinokulasi 0,1 mL suspensi biakan *Candida albicans* (1000 sel/mL), kemudian diinkubasikan pada 20°-25°C, kondisi *aerob*, selama tidak lebih dari 5 hari. Medium dinyatakan memenuhi syarat apabila *Candida albicans* dapat tumbuh.
- b. Dua tabung media SCD, diinokulasi 0,1 mL suspensi biakan *Bacillus subtilis* (1000 sel/mL), kemudian diinkubasi pada 30-37°C, kondisi *aerob*, selama tidak lebih dari 3 hari. Medium dinyatakan memenuhi syarat apabila *Bacillus subtilis* dapat tumbuh

LAMPIRAN XV

UJI PENENTUAN ANGKA LEMPENG TOTAL BAKTERI

Definisi

Metode penentuan angka lempeng total (ALT) digunakan untuk menentukan jumlah mikroba yang terdapat dalam suatu produk dengan cara menghitung koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media agar.

Umum

Pertumbuhan mikroorganisme setelah sampel diinkubasikan dalam media agar pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam, mikroorganisme ditumbuhkan pada suatu media agar, maka mikroorganisme tersebut tumbuh dan berkembang biak dengan membentuk koloni yang dapat langsung dihitung.

Metode

Penentuan ALT Bakteri dapat dilakukan dengan dua cara. Pertama, metode cawan agar tuang (*pour plate*) yaitu dengan menanamkan contoh ke dalam cawan petri terlebih dahulu kemudian ditambahkan media agar. Kedua, metode cawan agar sebar (*spread plate*) yaitu dengan menuangkan terlebih dahulu media agar ke dalam cawan petri kemudian contoh diratakan pada permukaan agar dengan menggunakan batang gelas bengkok.

1. Bahan

- a. *Plate Count Agar (PCA)*
- b. Larutan *Buffered Pepton Water 0,1% (BPW 0,1%)*

2. Peralatan

- a. Timbangan dengan ketelitian 0,0001 g
- b. *Autoclave*
- c. Inkubator $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- d. Cawan Petri 15 mm x 90 mm
- e. Tabung reaksi
- f. Alat Penghitung Koloni (*Colony Counter*)
- g. Stirer
- h. Vorteks
- i. Batang gelas bengkok
- j. Pipet gelas atau pipetor : 0,1 mL, 1 mL, 5 mL dan 10 mL

3. Prosedur

Preparasi Sampel

- a. Dengan menerapkan teknik aseptis, contoh diambil sebanyak 25g/mL kemudian ditambahkan 225 mL larutan BPW 0,1%.
- b. Contoh dihomogenkan dengan menggunakan stirer selama 2 menit. Homogenat ini merupakan larutan pengenceran 10^{-1} .

- c. Dengan menggunakan pipet steril, diambil 1 mL homogenat dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 9 mL larutan BPW 0,1% untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} .
- d. Pengenceran selanjutnya (10^{-3}) dibuat dengan mengambil 1 mL pengenceran 10^{-2} dan dimasukkan ke dalam 9 mL BPW 0,1%. Selanjutnya hal yang sama dilakukan untuk mendapatkan pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} dan seterusnya sesuai kondisi contoh.

Metode cawan agar tuang/*pour plate method*

- a. Setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan seterusnya dipipet 1 mL, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril, dan dilakukan secara duplo.
- b. Tiap cawan yang sudah berisi contoh ditambahkan 12-15 mL PCA yang sudah didinginkan dalam penangas air hingga mencapai $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Supaya contoh dan media PCA tercampur sempurna dilakukan pemutaran cawan ke depan ke belakang dan ke kiri-ke kanan.
- c. Setelah agar menjadi padat, untuk penentuan mikroorganisme aerob, cawan-cawan tersebut diinkubasi pada $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Mesofilik) dalam posisi terbalik selama 24-48 jam.
- d. Kontrol negatif dibuat dengan mencampur larutan pengencer dengan media PCA.
- e. Penghitungan koloni dilakukan dengan cara membuat ratahan dari kedua cawan petri yang digunakan.

Metode cawan agar sebar (*spread plate method*)

- a. Tiap cawan petri diisi dengan 12-15 mL PCA yang sudah didinginkan dalam penangas air hingga mencapai $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- b. Setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan seterusnya dipipet 0,1 mL untuk kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang sudah berisi media PCA, diratakan dengan menggunakan batang gelas bengkok, dan dilakukan secara duplo.
- c. Untuk penentuan mikroorganisme aerob, cawan-cawan tersebut diinkubasi pada $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dalam posisi terbalik selama 24-48 jam.
- d. Penghitungan koloni dilakukan dengan cara membuat ratahan dari kedua cawan petri yang digunakan.

4. Interpretasi hasil

A. Cawan yang mengandung jumlah 30-300 koloni dan bebas *spreader*

Perhitungan ALT sebagai berikut:

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

Dengan:

N adalah jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per mL atau koloni per gram.

ΣC adalah jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung

n_1 adalah jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

n_2 adalah jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung

d adalah pengenceran pertama yang dihitung

B. Cawan dengan jumlah koloni lebih besar dari 300

Bila jumlah koloni per cawan lebih besar dari 300 pada seluruh pengenceran maka laporkan hasil sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), tetapi jika salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni mendekati 300, maka dilaporkan sebagai perkiraan ALT.

C. Spreader

Koloni *spreader* dibedakan menjadi 3 tipe:

- a. Rantai koloni, antara koloni saling menyambung yang disebabkan karena bakteri yang saling mengelompok
- b. *Spreader* dari lapisan air antara agar dan dasar cawan
- c. *Spreader* berasal dari lapisan air pada sisi/pinggir cawan atau pada permukaan agar.

Jika cawan ditumbuhi *spreader* lebih besar dari 25% maka dilaporkan sebagai *spreader*:

- *Spreader* tipe 1, jika hanya ada 1 rantai maka nyatakan sebagai 1 koloni.
- Jika 1 atau lebih rantai terlihat berasal dari sumber yang berbeda maka dilaporkan masing-masing sumber sebagai 1 koloni
- *Spreader* tipe 2 dan 3 umumnya berasal dari koloni yang berbeda dan dilaporkan masing-masing sebagai 1 koloni

Spreader dan koloni dijumlahkan untuk menghitung "Angka Lempeng Total".

D. Jumlah koloni semua cawan kurang dari 30 koloni atau cawan tanpa koloni

Bila pada kedua pengenceran yang digunakan diperoleh koloni kurang dari 30, koloni yang ada dicatat, tetapi perhitungan dinyatakan sebagai kurang dari 30 dan dikalikan dengan $1/d$, dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan ALT.

LAMPIRAN XVI

PENGEMBANGAN PRODUK VAKSIN HEWAN DENGAN BIOTEKNOLOGI

Vaksin hewan yang dikembangkan dengan metode bioteknologi diperoleh dari hasil teknologi untuk mengubah target patogen dengan cara menghilangkan, menyisipkan, atau modifikasi genetik lain, atau bisa digunakan untuk modifikasi gen, atau sekuen gen dari patogen untuk menghasilkan imunogen spesifik yang memiliki kekebalan protektif.

Metode bioteknologi umumnya dilakukan dengan rekayasa genetik suatu organisme. Hasil rekayasa tersebut berupa modifikasi organisme hidup, bagian-bagiannya, dan/atau hasil olahannya sehingga mempunyai susunan genetik baru dari hasil penerapan bioteknologi modern. Melalui rekayasa genetik dihasilkan produk rekayasa genetik (PRG) untuk produk biologik yang memiliki sifat baru seperti penurunan keganasan dan peningkatan imunitas. Vaksin yang berasal dari PRG dapat berupa jasad renik hidup, jasad renik mati, dan bahan asal jasad renik PRG. Vaksin PRG sudah banyak diproduksi dan dipasarkan di berbagai negara. Untuk dapat memberi manfaat yang efektif dan sesuai dengan tujuan yang diinginkan maka pemanfaatan vaksin PRG harus sesuai dengan prinsip maupun aturan yang berlaku.

Teknik bioteknologi untuk pengembangan vaksin hewan

Teknik bioteknologi untuk pengembangan vaksin hewan dilakukan dengan cara:

- *reverse genetic*
- *vektor rekombinan*
- *gene-deleted vaccines*
- *chimeric viruses*
- *subunit vaccines*
- *virus-like particles*
- *DNA vaccines*
- *vaccine delivery*

1. **Reverse Genetic**

Pengembangan dari sistem *reverse genetic* untuk berbagai virus RNA dan DNA yang berbeda, telah berkembang pesat di bidang virologi yang memungkinkan untuk dilakukannya mutasi, penyisipan, dan penghilangan genome dari virus hidup. *Reverse genetic* ini telah banyak digunakan untuk berbagai macam aplikasi untuk menghasilkan virus yang: dilemahkan sifat virulensinya, dimodifikasi spesifisitas inangnya, dan/atau dilemahkan kemampuan replikasinya. Metode ini telah digunakan untuk strategi pengembangan vaksin baru.

2. **Vektor Rekombinan**

a. Vektor Bakteri

Secara umum, menggunakan bakteri yang telah dilemahkan sebagai vektor ekspresi gen penyandi antigen penyakit tertentu. Pelemahan bakteri dapat menggunakan delesi gen yang dibutuhkan untuk proses metabolisme atau gen yang ada hubungannya dengan virulensi.

b. Vektor viral

Vektor viral dikembangkan dengan menggunakan virus yang tidak virulen atau telah dilemahkan sifat virulesinya untuk mengekspresikan gen penyandi antigen penyakit tertentu. Pelemahan virus dapat menggunakan delesi atau mutasi gen yang diperlukan untuk virulensi.

3. *Gen Deleted Vaccine*

Teknologi pengembang vaksin bakterial maupun viral dengan jalan melakukan delesi gen yang berperan dalam patogenisitas/virulensi dari organisme tanpa mempengaruhi imunogenitasnya.

4. *Chimeric Viruses*

Chimeric Viruses adalah virus rekombinan yang mengandung bagian dari dua genom virus berkerabat. Prinsipnya *chimeric viruses* memperlihatkan karakteristik biologi dari tetuanya. Keuntungan pemberian *chimeric virus* secara dosis tunggal dapat menimbulkan respon imun protektif terhadap lebih dari satu virus patogen atau pada virus yang sama tetapi mempunyai serotipe yang berbeda.

5. *Vaksin Subunit*

Vaksin subunit mengandung protein murni yang dihasilkan dari teknologi DNA rekombinan. Vaksin subunit mudah dimodifikasi dan dapat dikombinasikan dengan protein subunit yang lain.

6. *Virus-Like Particles*

Virus-Like Particles (VLPs) merupakan struktur supra molekuler menyerupai partikel virus yang bisa tersusun dari satu atau lebih protein rekombinan. Struktur partikuler tersebut dapat meningkatkan imunogenisitas antigen sehingga bisa digunakan sebagai vaksin yang aman.

7. *DNA Vaccines*

Vaksin DNA adalah sediaan vaksin berupa plasmid rekombinan yang menyandi antigen agen infeksi tertentu dibawah kendali regulasi gen eukariot. Apabila diberikan kepada hewan target protein antigen akan diekspresikan secara endogenus sehingga akan memicu pembentukan tanggap kebal seluler maupun humoral.

Vaksin DNA mempunyai stabilitas yang baik tanpa memerlukan rantai dingin.

8. *Vaccine Delivery*

Vaccine delivery merupakan suatu teknik penyediaan antigen yang khusus ditujukan untuk vaksinasi masal ketika terjadi wabah dengan cara antara lain menebarkan vaksin secara aman bagi lingkungan.

Pengujian sediaan biologik PRG dapat dilakukan **setelah mendapatkan Sertifikat Aman Pakan dan/atau Aman Lingkungan dari Komisi Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetik (KKH PRG) Republik Indonesia. Proses selanjutnya akan dilaksanakan di Kementerian Pertanian sesuai prosedur yang berlaku.**

Metode pengujian sediaan biologik PRG mengacu pada Monografi Individu dalam FOHI dan dilaksanakan di dalam fasilitas BSL sesuai tingkat bahaya dari jasad renik PRG.

ISBN 978-623-91394-1-4 (J11-1)



786239

139414