

**PENGUJIAN POTENSI VAKSIN *Pasteurella multocida* ISOLAT
LOKAL YANG DIBUAT DENGAN EKSTRAKSI POTASIMUM
TIOSIANAT (KSCN) PADA BABI**

**THE EVALUATION OF POTASIMUM THIOCYANATE EXTRACTED
Pasteurella multocida VACCINE ON PIG**

E.S. PRIBADI, C.S.U PRAMONO, M. PARTADIREDJA, M.B.M. MALOLE¹

ABSTRAK

Isolat *P. multocida* diperoleh dari babi-babi di peternakan di daerah Kapuk yang diduga menderita pasteurellosis. Dari isolat yang sama dibuat vaksin dengan mengekstraksinya dalam larutan potasium tiosianat dan potensi vaksin diuji pada kelompok babi percobaan. Sebanyak 17 ekor babi yang berumur tiga sampai empat bulan dibagi menjadi empat kelompok, yaitu (i) kelompok kontrol, (ii) kelompok yang diberi vaksin, (iii) kelompok yang diberi vaksin dan uji tantang dan (iv) kelompok yang hanya menerima uji tantang saja. Percobaan berlangsung selama 30 hari dan seluruh hewan percobaan mendapatkan makan dan minum ad libitum.

Titer antibodi untuk seluruh kelompok percobaan tidak berbeda nyata hingga pemeriksaan hari ke-21. Sejak hari ke-23 barulah ada perbedaan titer antibodi antara hewan percobaan yang divaksinasi dan hewan percobaan yang tidak divaksinasi, yaitu kelompok percobaan yang divaksinasi mempunyai titer antibodi yang lebih tinggi dibandingkan kelompok percobaan yang tidak divaksinasi.

Pada kelompok hewan yang menerima uji tantang, tanda klinis yang terlihat adalah menurunnya nafsu makan, melakukan pernafasan perut dengan cepat dan beberapa ekor mengeluarkan lendir dari lubang hidungnya. Perubahan patologis anatomis yang teramati adalah dermatitis lokal superfisialis, limfadenitis, udem di daerah ventral leher, trakeitis, laringitis, pleuropneumoni, emfisema pulmonum, pleuritis, perkarditis, epikarditis, hipertrofi ventrikel kanan, dilatasi ventrikel kiri, splenitis, enteritis kataralis, teflitis, kolitis, sistitis, miositis nekrotikans, gastritis kataralis dan gangrenosa, degenerasi parenkhimatososa, hidronefrosis, sinusitis kataralis, pneumoni lobuler dan epiglositis. Perubahan histopatologis yang dapat didiagnosa adalah adanya kerusakan alveoli dari organ paru dan pembentukan pusat-pusat germinal pada organ limpa dan limfoglandula yang terlihat lebih parah pada

¹ Staf Pengajar Jurusan Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151. Indonesia

kelompok yang hanya menerima uji **tantang saja** dibandingkan ketiga kelompok **lainnya**. Dari hasil pemeriksaan bakteriologis dapat diisolasi bakteri *P. multocida* dari organ-organ yang mengalami kelainan **asal** kelompok yang menerima perlakuan.

Sedangkan dari kelompok **hewan** yang menerima vaksinasi, gejala klinis yang terlihat **lebih ringan**. **Perubahan** patologis **anatomis** yang diperoleh dari kelompok ini sama dengan kelompok yang hanya menerima uji **tantang** hanya pada kelompok yang menerima vaksinasi tidak ditemukan udem di daerah ventral leher. **Pengamatan** hasil histopatologis dari kelompok **hewan** yang hanya menerima uji **tantang** dan kelompok yang menerima vaksinasi memberikan hasil yang sama, hanya **perubahan** histopatologis **pada** kelompok **hewan** yang **divaksinasi bersifat** kronis. Hasil pemeriksaan bakteriologis **terhadap** organ dari kelompok **hewan** yang menerima vaksinasi tidak **ditemukan** *P. multocida*.

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa (i) vaksin yang dibuat **dinyatakan murni** dan tidak bersifat toksik dan (ii) vaksin yang dibuat dapat memberikan **perlindungan** 100 % **pada hewan** percobaan babi selama 30 hari penelitian.

ABSTRACT

Pasteurella multocida has been isolated from pigs at **Kapuk** Farm West Jakarta that had been diagnosed pasteurellosis. These isolates were extracted with potassium **thiocyanate** (KSCN) and has been evaluated as vaccine for pig. Seventeenth 3-4 years-old pigs were used for experiment and they were divided to four groups. i.e (i) control, (ii) vaccination, (iii) vaccination and challenge and (iv) challenge groups. All pigs were fed and receive water **ad libitum**. The experiment was carried out for 30 days.

All experiment groups showed no difference statistically for antibody titer until **days**-21. At days-23, vaccination groups showed antibody titer higher than non vaccination groups.

Challenge groups showed clinical sign **i.e.** anorexia, abdominal respiration, rhinitis and **demonstrated** pathological changes **i.e.** local dermatitis superficialis, limphadenitis, **oedem** cervicalis ventral, trcheitis, laryngitis, pleuropneumoni, emphysema pulmonum, pleuritis, pericarditis, epicarditis, hipertrophy ventricle dextra, dilatation ventricle sinistra, splenitis, anteritis catarhalis, tephritis, colitis, cystitis,, myositis necroticans, gastritis catarhalis and gangrenosa, degeneration parenchymatosa. hidronephrosis, sinusitis catarhalis, **pneumoni** lobuler and epiglositis. Histopathological changes showed alveoli damaged, germinal **centers** formation in spleen and **limphoglandulae** which was more severe in the challenge groups. *P. multocida* was isolated from visceral organs that showed pathology and histopathology changes.

Mild clinical signs was observed in the vaccination groups. This groups showed **similar** pathological changes as other groups **but there were** no **oedema** at cervicalis region. This group showed chronic histopathological changes. No *P. multocida* was isolated from visceral organs.

It can be concluded that all vaccinated pigs was protected by vaccine during the 30 days experiment.

PENDAHULUAN

Salah satu kendala yang sering ditemukan dalam peternakan babi adalah berjangkitnya **penyakit** menular, **diantaranya** adalah **penyakit** menular *pasteurellosis* yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Pasteurella multocida*. **Penyakit** ini juga dikenal dengan **nama** *haetnorrhagic septichaemia*, *atrophic rhinitis*, *pneumonic pasteurellosis*, dan *shipping fever pneumonia*. Pada peternakan babi, **penyakit** ini dapat mendatangkan kerugian yang cukup **tinggi** yaitu meliputi kerugian akibat **gangguan pertumbuhan**, angka **konversi makanan** yang **linggi**, juga timbulnya **ancaman** penyebaran **penyakit** di dalam kelompok **ternak baik** di dalam maupun di **luar** suatu peternakan. Menurut Buddle (1985). bila **penyakit** ini menyerang peternakan babi, angka **kematian** dapat mencapai lima **prosen** dari angka **kesakitan** yang 40 %. Infeksi oleh *P. multocida* yang terjadi pada babi dapat **secara kontak**, aerogen atau **peroral** (Carter, Claus dan Rikihisa, 1986). Pada umumnya pasteurellosis yang terjadi pada babi ini diikuti oleh infeksi *Mycoplasma hyopneumoniae*, sehingga menimbulkan **gejala** pneumoni yang kompleks. **Penyakit** ini **dikenal** dengan **sebutan** *swine pneumoni complex* (Buddle. 1985).

Ternak yang terserang atau **hewan** penderita **merupakan sumber** infeksi utama **untuk** ternak di sekitarnya. **Selain** itu, pasteurellosis dapat berjangkit dari infeksi **laten** pada ternak-ternak yang **mengalami** stres. Faktor stres **selain karena adanya perubahan** cuaca dan kesalahan manajemen, juga sering berkaitan erat dengan **stres** akibat **perjalanan jarak jauh** dari daerah **asal** ternak ke **rumah potong hewan**. **Tindakan** pengendalian terhadap **penyakit** *pasteurellosis* dan **semacamnya** yang dapat diandalkan adalah tindak **pengecahan** dengan **cara** vaksinasi. Berbagai vaksin yang **pernah digunakan** pada babi adalah **bakterin**, vaksin **alum-precipitated**, vaksin oil adjuvant, vaksin **hidup**, vaksin kombinasi, vaksin **crude cytotoxin**, vaksin ribosomal, vaksin **ribosom-lipopolisakarida**, *P. multocida* DNT-toksoid.

Agresin yang dibuat dari **biakan** *P. multocida* memberikan **perlindungan pada** sapi yang **menerima** uji **tantang** dengan menggunakan **galur** virulen dari *B. bronchoseptica* yang **diinokulasikan** lewat mulut. Sapi yang tidak diberi agresin **mati** semua **ketika ditantang** dengan mikroorganisme yang **sama** (Gochmour, 1924 *dalam* Mosier *et al.*, 1989). **Dalam** penelitian dengan menggunakan vaksin **hidup** terhadap septikemik hemoragik, **seluruh** sapi yang divaksinasi **mengalami sakit** walaupun tidak sampai **mati** (Buckley dan Gachenour, 1924 *dalam* Mosier *et al.*, 1989). Vaksinasi dengan menggunakan vaksin **hidup** dari **bakteri** *I'. multocida* ternyata **meningkatkan** juga respon **tanggap kebal** yang cukup **tinggi** terhadap antigen **somatik** dan ini dapat **meningkatkan ketahanan** terhadap infeksi **tantang** yang **dibricikan**. Pemberian vaksin dilakukan dengan **cara** aerosol, subkutanus dan **intradermal** (Pancicra *et al.*, 1984 *dalam* Mosier *et al.*, 1989). Akan tetapi **menurut** percobaan yang dilakukan oleh Ringler *et al.*, (1985) dengan menggunakan **hewan** percobaan kelinci **diproleh** data **bahwa** vaksin ini tidak memberikan perlindungan yang menyeluruh karena masih ditemukan **beberapa lesi** paru **pada** kclinci yang divaksinasi dengan vaksin ini. Vaksin hidup yang pernah dicoba **pada** sapi yang memberikan hasil **bahwa** vaksin ini tidak memberikan **perbedaan** yang nyata **pada** penampilan, tingkat morbiditas dan mortalitas sapi yang divaksinasi dua minggu sebelum **pengapalan** dibandingkan dengan kontrol. **Modifikasi** terhadap vaksin hidup pernah **juga** dibuat untuk **meningkatkan** daya tahan ternak yang menerima vaksin ini. Percobaan **pun pernah** dilakukan dengan menggunakan vaksin *I'. multocida* yang **dibiakkan pada** media yang **mengandung** akriflavin hidroklorida dan menggunakan mutan *I'. multocida* yang membutuhkan streptomisin (*streptomycin-dependent*

mutant). Ternyata vaksin modifikasi ini lebih baik daya perlingkungannya dibandingkan dengan bakteri *P. multocida*.

Dengan menggunakan antiserum septikemik hemoragik yang diberikan sebelum pengapalan ternyata dapat **mengurangi** jumlah sapi yang **sakit** bila dibandingkan dengan sapi yang tidak menerima antiserum tersebut. **Walaupun** antiserum ini memberikan efek yang kurang memuaskan juga, namun pada **saat** itu tetap dianggap lebih **efektif** (Schipper *et al.*, 1962 *dalam* Mosier *et al.*, 1989).

Rice *et al.* (1955 *dalam* Mosier *et al.*, 1989) **pernah** menggunakan bakterin *P. multocida* untuk memvaksin sapi sebelum pengapalan. Ternyata tingkat kematian pada sapi yang divaksinasi ini lebih **rendah dibandingkan** dengan sapi yang tidak divaksinasi.

Vaksin **kombinasi virus-hnktteri pernah** juga dibuat untuk mencegah pasteurellosis. Vaksinasi **dua dosis PI₃** inaktif dengan bakteri *P. multocida* menyebabkan **peningkatan** titer terhadap PI₃ dan **berkurangnya** lesi pada **paru** bila dibandingkan dengan **kelompok** kontrol **setelah diadakan** infeksi **tantang** dengan **memberikan** stres dan *P. multocida* dan **PI₃** (Matsuoka *et al.*, 1966 *dalam* Mosier *et al.*, 1989).

Vaksin terhadap pasteurellosis juga dibuat dari komponen-komponen bakteri. Antigen **permukaan** mempunyai kemampuan mencegah pneumoni oleh pasteurellosis (Kodama, Matsumoto, dan Snow, 1981). Ekstrak *P. multocida* dengan potasium tiosianat (KSCN) yang diberikan **secara** subkutan, aerosol dan **intramuskular** dapat **meningkatkan tingkat pembersihan** bakteri **pulmonar dan** respon aglutinasi, **hemaglutinasi**, bakterisidal dan **antibodi** homositotipik (Yates *et al.*, 1983a *dalam* Mosier *et al.*, 1989). Vaksin **ini dapat menurunkan kematian, kesakitan** dan lesi pulmonar. **Ringler et al.** (1985) dan **Ryu dan Kaberle** (1985) membuktikan bahwa vaksin yang dibuat dari *P. multocida* dengan **cara mengekstraksinya** dalam KSCN juga telah memberikan kekebalan yang baik pada mencit dan kelinci.

Kapsul *P. multocida* merupakan suatu glikoprotein yang dapat diekstraksi oleh ion **chaotropic** (Mukkur, 1979). Ion **potasium** yang terdapat di dalam **larutan** potasium tiosianat akan **niendnaturasi** protein yang menyebabkan adanya **perubahan struktur** molekul namun tidak **memutuskan ikatan** peptida yang terdapat pada protein **tersebut** (Cheftel, Cuq dan Lorient, 1985). Terjadinya denaturasi ini **akan menurunkan** derajat kelarutan dari protein **sehingga setelah** dilakukan **sentrifugasi** protein **tersebut** dapat dipisahkan dari komponen selaput luar **bakteri** lainnya (Harper *et al.*, 1979). Komponen **lain** di selaput luar yang bersifat antigenik dapat **diambil** untuk disiapkan menjadi vaksin.

Penelitian ini dilakukan dengan **tujuan** untuk melihat potensi dan tingkat keamanan vaksin yang dibuat dari ekstrak kuman *Pasteurella multocida* **dalam** KSCN. Vaksin **ini** diharapkan dapat menjadi salah satu vaksin yang **digunakan** dalam **usaha** pencegahan pasteurellosis pada babi.

Dalam penelitian ini dikemukakan hipotesis bahwa ekstrak bakteri *P. multocida* dalam KSCN dapat **memberikan** daya **perlindungan** terhadap **infeksi tantang** dengan bakteri *P. multocida*, **tanpa reaksi sampingan** yang merugikan.

METODE PENELITIAN

1. Persiapan

1.1. Identifikasi dan Karakterisasi *P. multocida*

Isolat *P. multocida* yang diperoleh dari peternakan babi di Kapuk Jakarta Barat dan Gunungsindur Kabupaten Bogor dibiakkan kembali pada agar darah domba 5 % yang kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada koloni kuman yang muncul dilakukan pemeriksaan baku untuk identifikasi dan karakterisasi (Holt, 1984).

1.2. Mempersiapkan Organisme Penantang

Kuman ditumbuhkan pada media tryptose soy agar dengan 5 % darah sapi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan tersebut kemudian dipanen dalam larutan garam fisiologis, disentrifugasi dan diencerkan secara desimal.

Setiap pengenceran disuntikkan ke lima ekor mencit dengan dosis 0,1 ml suspensi bakteri secara intraperitoneal dan diamati selama satu minggu. Kemudian dilakukan pencatatan gejala klinis yang timbul pada mencit untuk mendapatkan MID.

Dosis yang akan digunakan dalam ujiantang adalah 1000 MID₅₀ (Bain et al., 1982).

1.3. Hewan Percobaan

Sebagai hewan percobaan dipakai babi umur antara tiga sampai empat bulan yang didatangkan dari peternakan babi di Desa Kemang Parung. Babi yang digunakan untuk hewan percobaan adalah babi yang bebas infeksi *P. multocida*. Pernyataan bebas *P. multocida* ini diadakan setelah pemeriksaan bakteriologik terhadap usapan mukosa dan pemeriksaan serologik, keduanya dinyatakan negatif.

2. Pembuatan Vaksin

2.1. Propagasi

Dari sediaan *P. multocida* diambil satu koloni yang kemudian ditanamkan pada 5 ml media BHIA (Difco) dengan 0,5 % ekstrak khamir (Difco) dan 5 % serum sapi steril (BHISY) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama empat jam. Kemudian biakan tersebut ditambahkan 95 ml BHISY dan waktu inkubasi ditambah empat jam lagi (Ringler et al., 1985 dan Ryu dan Kaeberle, 1988).

2.2. Pembuatan Vaksin

Hasil inkubasi terakhir pada tahap propagasi *P. multocida* ditambahkan enam mililiter NaCl 0.08 M dan enam mililiter KSCN 0,5 M. Suspensi tersebut diinkubasi dalam shaking waterbath pada suhu 37 °C selama lima jam. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 17.300 x g selama 30 menit. Supernatan diambil dan disaring dengan menggunakan filter yang berukuran 0,45 mm. Filtrat didialisis dengan cara menambahkan enam mililiter NaCl 0.32 M buffer tris HCl (pH 8.0) pada suhu empat derajat Celcius selama lima hari. Buffer diganti dua kali sehari.

Untuk mengetahui bahwa KSCN telah hilang dari kantong dialisa, larutan hasil dialisa diperiksa dengan cara mereaksikannya dengan FeSO₄. Ion Fe⁺⁺ akan bereaksi dengan ion SCN⁻ yang akan membentuk warna merah bata. Bila tidak terbentuk warna merah bata berarti di dalam larutan yang diperiksa tidak terdapat senyawa KSCN.

Konsentrasi protein dan karbohidrat dihitung dengan metode yang telah dilakukan oleh Ringler et al., (1985) dan Ryu dan Kacberle (1986) untuk menentukan dosis vaksin yang akan disuntikkan.

3. Pengamatan Hasil Vaksinasi pada Babi

3.1. Rancangan Percobaan

Hewan percobaan dibagi dalam empat kelompok percobaan. Kelompok pertama terdiri dari dua ekor babi. Kelompok ini tidak menerima perlakuan vaksinasi dan uji tantang sehingga kelompok ini dipakai sebagai kelompok kontrol. Seluruh babi dalam kelompok ini dibunuh dan dilakukan bedah bangkai dalam jangka waktu yang sama seperti pada kelompok ketiga.

Kelompok kedua terdiri dari tiga babi. Kelompok ini tidak menerima uji tantang dengan kuman *P. multocida* tetapi menerima vaksinasi dengan ekstrak KSCN. Seluruh babi dalam kelompok ini dibunuh dan dilakukan bedah bangkai dalam jangka waktu yang sama dengan kelompok ketiga.

Kelompok ketiga terdiri dari enam ekor babi. Pada kelompok ini dilakukan vaksinasi dengan ekstrak KSCN secara intramuskular dengan dosis satu miligram per mililiter. Dua minggu setelah vaksinasi, babi dari kelompok ini ditantang dengan kuman *P. multocida*. Dua minggu kemudian babi dalam kelompok ini dibunuh dan dilakukan bedah bangkai.

Kelompok keempat terdiri dari enam ekor babi. Kelompok ini merupakan kelompok yang menerima uji tantang saja, yaitu diinfeksi dengan *P. multocida*. Babi yang mati segera dilakukan bedah bangkai untuk diperiksa adanya perubahan patologis anatomis dan histopatologis dan yang tahan segera dibunuh dalam waktu dua minggu setelah ditantang untuk selanjutnya dilakukan bedah bangkai.

3.2. Uji Toksisitas

Tiga ekor babi masing-masing disuntik ekstrak KSCN dengan dosis 625 mg protein, satu miligram protein dan satu mililiter larutan garam fisiologis. Babi diamati dalam jangka waktu 40 hari.

3.3. Pengumpulan Sampel Serum

Pengambilan darah dilakukan pada hari ke-0 (pada saat diberikan perlakuan), hari ke-5, hari ke-9, hari ke-14, hari ke-19, hari ke-21, hari ke-23 dan hari ke-29. Darah diambil dari vena jugularis kemudian dimasukkan ke dalam botol sampel dan dibiarkan membeku untuk diambil serumnya. Serum ini dipakai untuk mengukur titer antibodi.

3.4. Pengukuran Titer Antihodi

Pengukuran titer antibodi dilakukan terhadap sampel serum darah. Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan menggunakan teknik ELISA yang dikembangkan oleh Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Departemen Pertanian.

3.5. Analisis Statistika

Analisis statistik dilakukan terhadap data yang diperoleh. Penyebaran kelompok yang dicoba diuji terhadap perbedaan nyata dengan menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* yang tidak membutuhkan asumsi kenormalan dan keragaman yang sama (Steel dan Torric, 1980).

3.6. Pemeriksaan Patologi

Terhadap babi yang mati dilakukan bedah bangkai dan dilihat perubahan patologi yang ada. Selain dilakukan pemeriksaan patologis anatomis juga dilakukan pemeriksaan histopatologis.

Organ yang diperiksa antara lain organ paru dan pleura, hati, jantung, limpa, saluran pencernaan, laring, trakhea dan rongga hidung.

3.7. Isolasi Bakteri

Untuk memastikan bahwa perubahan patologis anatomis yang timbul disebabkan oleh bakteri *P. multocida* maka dari bahan nekropsis dilakukan pengisolasian bakteri dari darah jantung, paru, nasofaring dan limfoglandula di daerah sekitar saluran pernafasan. Koloni bakteri diidentifikasi dengan metode yang baku dan dilakukan inventarisasi bakteri (Ringler et al., 1985).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Bibit Vaksin

Hasil identifikasi dan karakterisasi dari isolat yang berasal dari daerah Kapuk Jakarta Barat menunjukkan sifat-sifat sebagai berikut : tumbuh pada agar darah, membentuk koloni yang relatif kecil, bulat dan tepinya rata, permukaan cembung, warna putih keabu-abuan, tidak membentuk zona hemolisis dan berbau khas seperti bau sperma. Secara mikroskopis dengan menggunakan pewarnaan Gram, bakteri isolat menunjukkan sifat Gram negatif, berbentuk batang ovoid dan bipolar. Dari uji biokimiawi, bakteri tersebut menunjukkan sifat-sifat sebagai berikut: indol positif; menghasilkan katalase, oksidase, urease; mereduksi nitrat; menggunakan pepton; mencairkan gelatin; memfermentasi arabinosa, laktosa, maltosa, manitol, rafinosa, salisin sorbitol, sukrosa, trehalosa, xylosa dan aeskulin (Holt, 1984).

Secara serologis, isolat *P. multocida* ini tergolong serotipe D. Uji biologis yang dilakukan dengan cara inokulasi sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri isolat pada hewan percobaan mencit mengakibatkan kematian 24 jam setelah inokulasi. Tanda-tanda pasca mati menunjukkan adanya pembesaran limfoglandula dan pembengkakan hati. Serotipe D merupakan bakteri *P. multocida* yang dominan berada di saluran pernafasan babi dan bakteri yang menyerang babi menghasilkan toksin dermonekrotik yang pada babi secara klinis menyebabkan kemerahan pada kulit. Oleh sebab itu, pasteurellosis pada babi di beberapa daerah disebut dengan nama *penyakit merah*.

2 Evaluasi Vaksin

Sebelum digunakan, produk vaksin tersebut perlu diuji kemurnian, keamanan serta potensinya baik dalam skala laboratorium maupun dalam skala lapangan. Dalam penelitian ini pengujian potensi vaksin hanya dilakukan dalam skala laboratorium.

Pada uji kemurnian vaksin yang dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi produk vaksin pada agar darah dan dieramkan pada suhu 37 °C selama 24 jam, ternyata tidak ditemukan pertumbuhan koloni bakteri maupun mikroba lainnya pada agar darah. Dengan demikian produk vaksin yang diperiksa dapat dinyatakan murni karena hanya berisi hasil

ekstraksi dan tidak disertai pertumbuhan bakteri baik bakteri *P. multocida* maupun bakteri lainnya.

Uji keamanan dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi produk vaksin pada dua ekor hewan percobaan babi dengan dosis masing-masing 625 mg dan satu miligram protein. Babi ketiga disuntik dengan NaCl fisiologis. Dari hasil uji keamanan ini tidak didapatkan satu ekor babi pun yang menunjukkan gejala menyimpang. Yang dimaksud dengan gejala menyimpang dalam hal ini adalah timbulnya shock yang bisa disebabkan oleh endotoksin dan timbulnya warna merah pada kulit yang disebabkan oleh toksin dermonekrotik, yang keduanya dapat dihasilkan oleh *P. multocida* serotipe D. Dari hasil penelitian ini produk vaksin yang dihasilkan berarti sudah aman.

Untuk uji potensi, vaksin dari hasil penelitian ini semula disiapkan untuk 20 ekor babi. Sebelum diadakan uji potensi, tiga ekor babi mati. Dari hasil pemeriksaan patologis anatomis, histopatologis dan bakteriologis dari ketiga ekor babi yang mati tersebut tak seekor pun kematiannya yang disebabkan oleh pasteurellosis. Dari pengamatan tersebut diasumsikan bahwa babi-babi lainnya bebas pasteurellosis dan siap dipakai untuk percobaan uji potensi.

Tujuh belas ekor hewan percobaan babi dibagi dalam empat kelompok perlakuan. Kelompok pertama tidak diberi vaksin maupun uji tantang (dua ekor), kelompok kedua hanya diberi vaksinasi saja (tiga ekor), kelompok ketiga diberi vaksinasi dan uji tantang (enam ekor) dan kelompok keempat hanya diberi uji tantang saja (enam ekor). Hasil kompilasi setelah pengamatan selama 42 hari dapat dibaca pada Tabel 3.

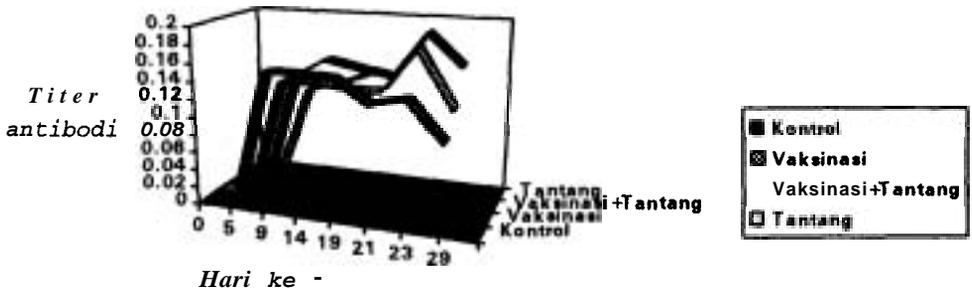
Tabel 1. Hasil Pengamatan Kematian Hewan Setelah 42 Hari pada Kelompok Hewan Penerima Perlakuan

No	Kelompok	Jumlah (ekor)	Hidup (ekor)	Mati (ekor)
1	Tanpa vaksinasi dan uji tantang	2	2	0
2	Divaksin	3	3	0
3	Divaksinasi dan ditantang	6	6	0
4	Ditantang	6	0	6

Dari Tabel 1 dapat dibaca bahwa kelompok kontrol (kelompok pertama) dan kelompok yang divaksinasi baik yang tidak diberi uji tantang (kelompok kedua) maupun yang diberi uji tantang (kelompok ketiga) dapat bertahan hidup, sedangkan kelompok babi yang tidak diberi vaksinasi tetapi tidak diberi uji tantang (kelompok keempat) mati semua. Kematian kelompok keempat ini terjadi secara bertahap, yaitu dua ekor pada hari kedua setelah pemberian dosis tantang dan empat ekor mati pada hari ketiga setelah pemberian dosis tantang

Babi yang digunakan dalam penelitian **disyaratkan** tidak mempunyai titer antibodi terhadap *P. multocida*. Karena dalam penelitian diharapkan keempat kelompok penelitian yang berbeda **memperlihatkan** kadar titer antibodi yang berbeda pula. Hari ke-0 (pada **saat dilakukan** vaksinasi) dan hari ke-5 tidak terdeteksi adanya titer antibodi pada semua kelompok percobaan. Diduga belum ada **reaksi** dari **hasil** vaksinasi karena biasanya reaksi vaksinasi muncul kurang lebih pada hari ke-10 sampai hari ke-14 (Tizard, 1982). Pada hari ke-9 **barulah** terlihat adanya antibodi yaitu **kelompok** kontrol terdeteksi mempunyai titer antibodi yang paling tinggi. Hasil ini merupakan **hasil** yang tidak diharapkan. Babi pada **kelompok** kontrol ini **kemungkinan terinfeksi dan sekaligus** mendapatkan vaksinasi secara aerosol. Hal ini **mungkin** terjadi karena **selama pemeliharaan** jarak **antar** kelompok tidak terlalu jauh. Dugaan ini muncul karena **berdasarkan** penelitian yang dilakukan **oleh** Thompson, Chanter dan Wathes (1992), **bahwa** *P. multocida* dapat **diisolasi** kembali **dalam waktu** yang singkat **setelah** diinokulasi. Hingga pada hari ke-14, titer antibodi semua kelompok **tetap** dan pada hari ke-14 ini dilakukan uji **tantang** untuk kelompok ketiga dan keempat. **Pengukuran** titer antibodi tidak dilanjutkan **lagi** untuk kelompok keempat karena pada hari ke-19 **seluruh** babi dari kelompok ini telah **mati** semua. Sampai hari ke-21, **belum** terlihat adanya **kenaikan** titer antibodi **sebagai** reaksi terhadap uji **tantang**. Barulah pada hari ke-23, terlihat adanya kenaikan titer antibodi dari ketiga kelompok tersebut.

Titer antibodi **menurun** kembali **ketika** dilakukan pengukuran pada hari ke-29 dan titer antibodi pada kelompok kontrol (kelompok kesatu) merupakan yang terendah. **Fluktuasi** titer antibodi seluruh kelompok perlakuan **selama** penelitian terparap pada Gambar 1.



Gambar 1. Titer Antibodi dari Seluruh Kelompok Perlakuan

Berdasarkan uji statistik **dengan menggunakan Uji** Nonparametrik Kruskal-Wallis, titer antibodi kelompok **perlakuan** ini tidak **berbeda** nyata **hingga** hari ke-21. Barulah pada hari ke-23 dan ke-29 didapatkan **perbedaan** titer antibodi yang **nyata** antara kelompok kontrol, **kelompok** vaksinasi dan kelompok vaksinasi yang **menerima uji**antang.

5. Tanda Penyakit

Di akhir penelitian, seluruh babi yang masih hidup dieuthanasia dengan menggunakan chloral hydrat 30 % sebagai penenang dan dilanjutkan dengan penyembelihan. Seluruh babi yang mati dan dimatikan dilakukan pemeriksaan bedah bangkai di Laboratorium Patologi FKH - IPB untuk memperoleh diagnosa anatomi dan histologi. Tanda-tanda penyakit yang muncul, baik dalam bentuk klinis, patologis anatomis dan histopatologis, pada kelompok yang menerima perlakuan disarikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Tanda Penyakit yang Diamati pada Hewan Percobaan

Tanda Penyakit	Kelompok			
	Pertama	Kedua	Ketiga	Keempat
Klinis			+	+
Patologis anatomis	+		+	+
Histopatologis	+		+	+

5.1. Klinis

Pada hari ke-15, beberapa ekor babi dan kelompok vaksinasi dan uji tantang dan yang menerima uji tantang saja memperlihatkan gejala sakit berupa menurunnya nafsu makan, melakukan pernafasan perut dengan cepat dan beberapa ekor pada kelompok yang menerima uji tantang saja mengeluarkan lendir dari hidung. Lendir yang keluar tersebut diambil dengan menggunakan kapas steril bergagang untuk selanjutnya diperiksa secara mikrobiologis terhadap kemungkinan adanya ekskresi bakteri *P. multocida* dari hidung. Ternyata, tidak ditemukan bakteri *P. multocida* dan bakteri yang tumbuh setelah diidentifikasi adalah bakteri *Streptococcus* sp. dan *Proteus* sp.. Tanda-tanda klinis ini mengarah kepada penyakit rinitis atropik. Gejala klinis lebih jelas lagi terlihat pada kelompok yang menerima uji tantang saja.

Kelompok penerima vaksinasi dan uji tantang juga memperlihatkan gejala sakit, namun tidak ada yang mati dan dapat bertahan hidup sampai akhir waktu penelitian. Hal yang sama juga terjadi pada kelompok kontrol dan kelompok yang menerima vaksinasi saja. Satu ekor babi dari kelompok yang menerima vaksinasi ditemukan mati pada hari ke-19.

5.2. Patologis anatomis

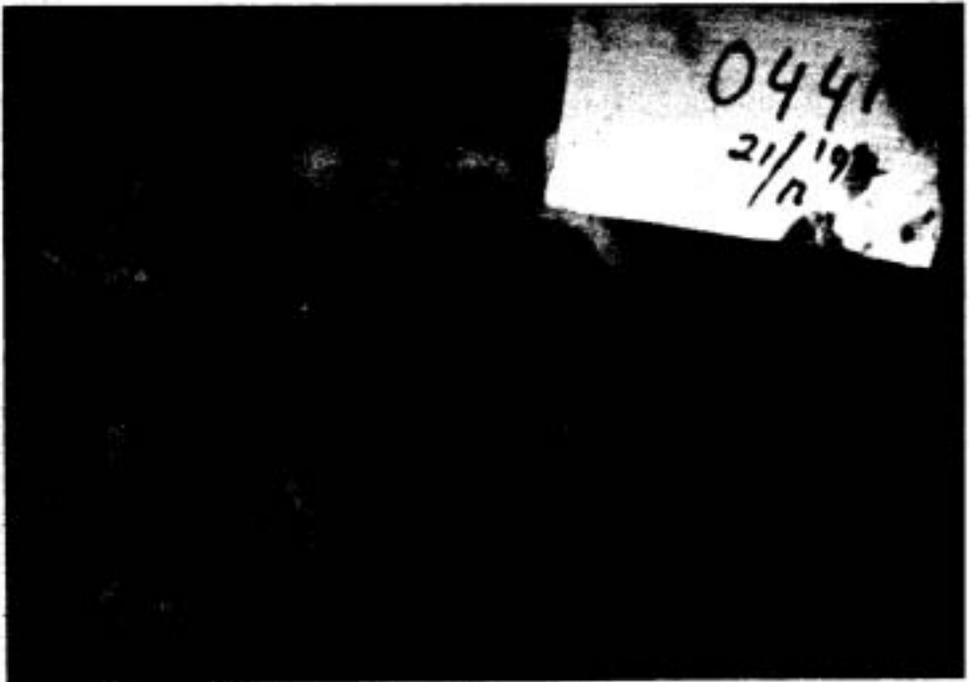
Seluruh babi dari kelompok yang menerima uji tantang saja memperlihatkan perubahan patologis anatomis yang sama berupa dermatitis lokal superfisialis, limfadenitis, udem di daerah ventral leher, trakheitis, laringitis, pleuropneumoni, emfisema pulmonum, pleuritis, perikarditis, epikarditis, hipertrofi ventrikel kanan, dilatasi ventrikel kiri, splenitis, enteritis katarhalis, tiflitis, kolitis, sistitis, miositis nekrotikan, gastritis katarhalis dan gangrenosa, degenerasi perengkimatosa hati, hidronefrosis, sinusitis katarhalis, pneumoni lobuler dan epiglositis.



Gambar 2. Gejala Klinis Berupa Dermatitis Lokal Superfisialis di Daerah Ventral Leher



Gambar 3. Gejala Klinis Berupa Udem di Daerah Ventral Leher



Gambar 4. Perubahan Patologis Anatomis Berupa Atrofi Os Nasal

Atropik tulang hidung memang terjadi baik pada penyakit yang bersifat akut maupun kronis. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Kosbich dan Pennings (1989) menerangkan bahwa 89 % penderita pasteurellosis akan mengalami atrofi pada os nasal, 83 % menderita pneumoni dan 11 % menderita perikarditis. Hasil yang sama juga diperoleh oleh Elling dan Pederson (1985), Rutter dan Rojas (1982); Rutter (1983); Ryu dan MacKenzie (1984) dan Dominick dan Rimler (1986).



Gambar 5. Perubahan Patologis Anatomis Berupa Laringotrakheitis



Gambar 6. Perubahan Patologis Anatomis Berupa Degenerasi Parenkhimatos Hati



Gambar 7. Perubahan **Patologis Anatomis Berupa** Kolitis

Hampir semua **babi** dari kelompok yang **hanya** menerima uji **tantang** (kelompok keempat) ini menderita **kolitis** dan gastritis **hemorrhagika**. Hasil pemeriksaan **mikrobiologi** terhadap **usus** yang mengalami kolitis berupa **ditemukannya** bakteri *E. coli*. Namun **tidak dilakukan** pemeriksaan terhadap sifat patogenisitasnya **dari** bakteri *E. coli*. **Kedua** perubahan patologi **anatomis** ini kemungkinan juga **disebabkan** oleh **infeksi** *Pasteurella* sp. **seperti** yang **pernah diungkapkan** oleh McLaughin *et al.* (1991).

Sedangkan babi dari kelompok lain yang dieuthanasia, **memperlihatkan** perubahan patologi **anatomis** yang **semuanya** sama berupa rhinitis **ringan**, pneumoni fokal dengan terdapat **beberapa** stadium **resolusi**, limfoglandula **peribronkial membengkak**, pleuritis adhesiva, kolitis **difterika** fokal, teflitis **difterika dan selulitis ringan**. Perubahan patologi **anatomis** pada saluran **pernafasan** juga **terjadi** pada **tiga** kelompok yang diperiksa terakhir dengan perubahan yang sama **seperti** pada kelompok yang **menerima uji tantang** yang **mati** (kelompok keempat). Namun **secara** kualitatif perubahan patologi **anatomis** yang **diperoleh** pada kelompok **pertama, kedua dan ketiga lebih ringan** dibandingkan dengan **kelompok keempat (Hernomoadi dan Bahagia, komunikasi pribadi)**.

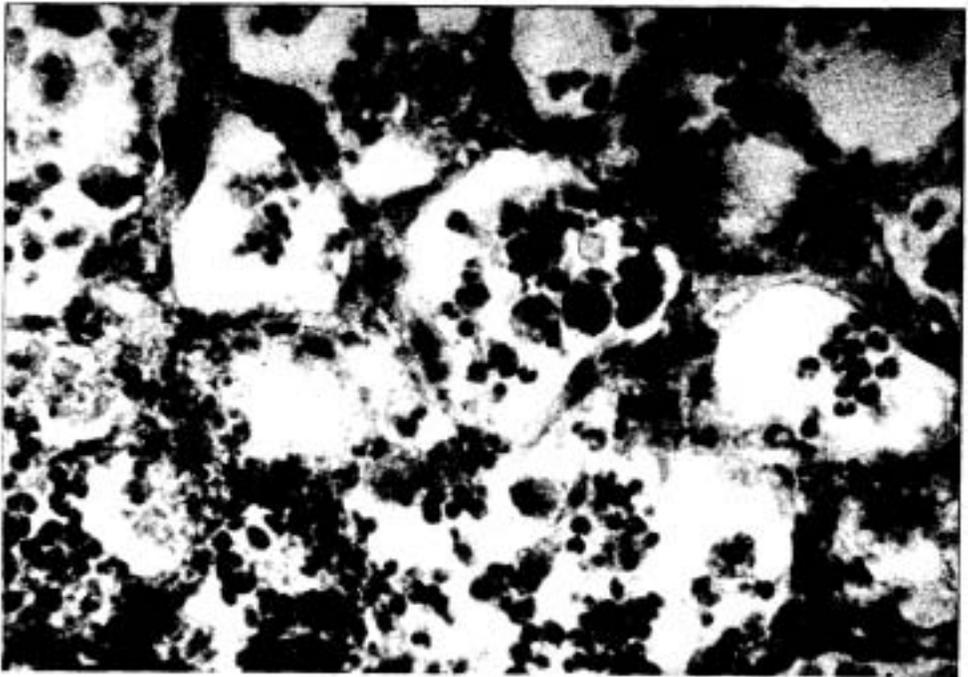
3.3. **Histologis**

Semua organ dan jaringan yang **mengalami** perubahan patologi **anatomis** ditruskan **pemeriksaannya ke arah pemeriksaan** histopatologis.

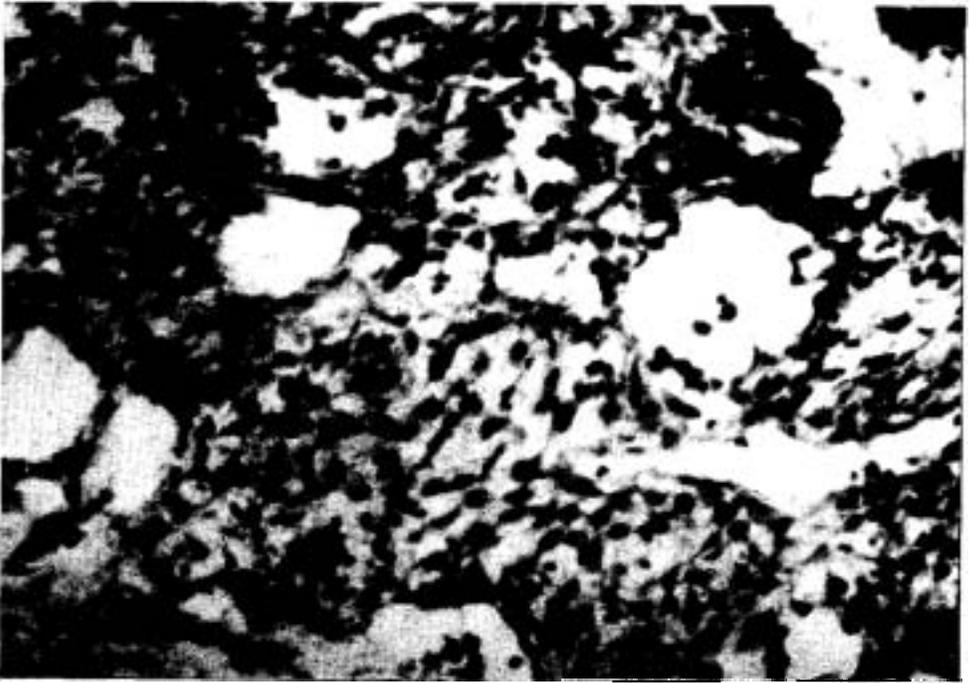
Dari **pengamatan** secara **histopatologis, kelompok** yang **hanya menerima uji tantang** saja (kelompok keempat) **memperlihatkan** alveoli, **paru-paru** yang sudah **tidak utuh lagi**; walaupun ada juga yang terlihat masih utuh. Namun di **dalam** alveoli yang masih utuh sudah terisi oleh sel-sel **radang**, baik berupa sel-sel **polimorf** maupun makrofag. **Dalam**

keadaan normal alveoli-alveoli ini dalam keadaan **kosong**. Interstitium terlihat **sangat menebal**. Bila **dilakukan pengamatan** lebih **cermat** lagi dengan **pembesaran** yang **lebih tinggi**, **ditemukan** bahwa jumlah **sel-sel** radang yang terdiri **dari** sel **polimorf** dan makrofag yang **sangat banyak**. Dengan demikian **maka paru-paru** yang **mengalami perubahan histopatologis seperti ini** didiagnosa pneumoni akut (Gambar 8).

Pada **kelompok** yang **menerima** perlakuan **vaksinasi** dan diuji **tantang**, pada umumnya mereka terserang pneumoni yang bersifat kronis. Bentuk pneumoni ini ditandai **dengan ditemukannya** alveoli yang **telah** digantikan dengan **tenunan ikat** (Gambar 9).

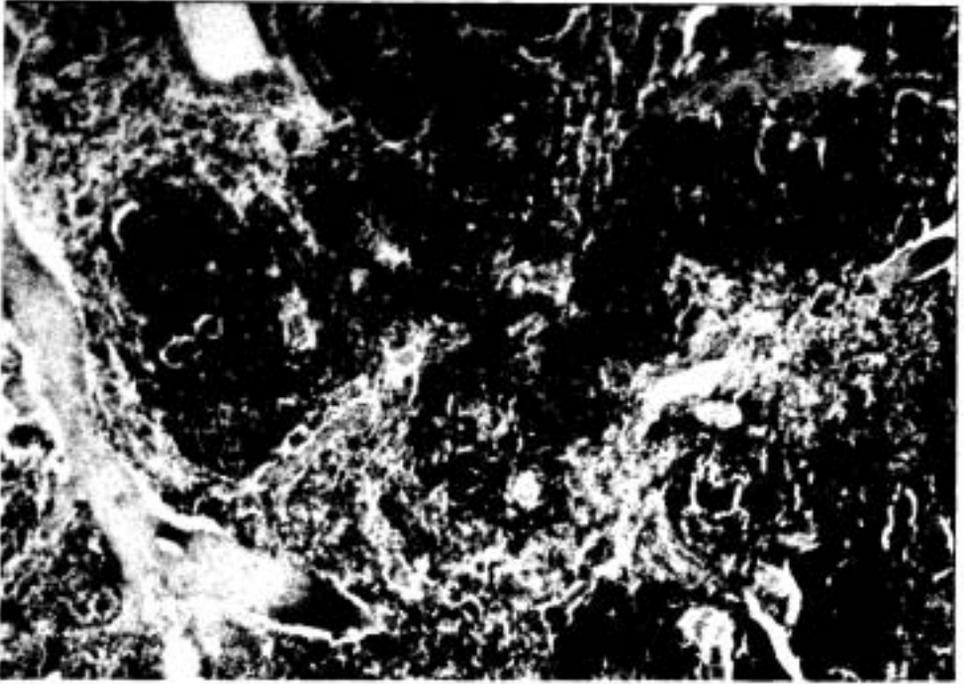


Gambar 8. Pneumoni Akut dengan Alveoli-alveoli yang Telah Diisi **oleh Sel** Radang Makrofag (a) dan Sel **Polimorf** (b). Interstitium juga Terlihat Menebal (c). Pembesaran 400 x



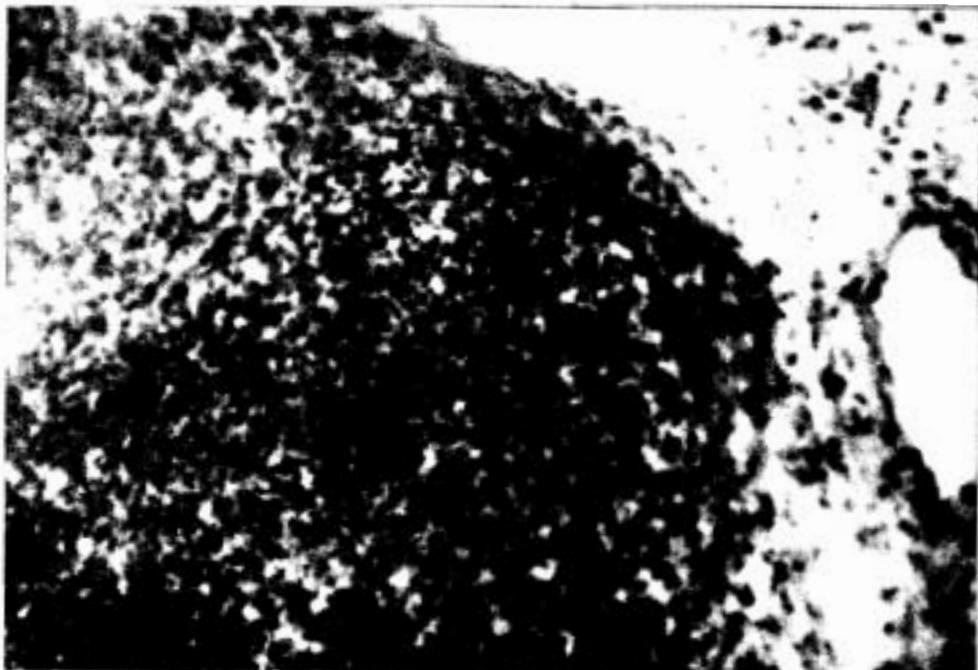
Gambar 9. Paru-paru Yang Mengalami Pneumoni Kronis dengan Alveoli yang Telah Digantikan dengan Tenunan Ikat (a). Pembesaran 200 x

Sayatan limpa memperlihatkan adanya beberapa folikel limfoid (*lymphoid follicle*) dan pusat germinal (*germinal center*). Pada kelompok yang mendapatkan uji **tantang** dan kelompok yang mendapatkan vaksinasi dan uji **tantang**, **sayatan limpanya memperlihatkan** folikel limfoid dan **pusat germinal** yang lebih **banyak** (Gambar 10). Sedangkan **pada kelompok** yang menerima vaksinasi **walaupun** ditemukan juga tetapi jumlahnya tidaklah **banyak**.



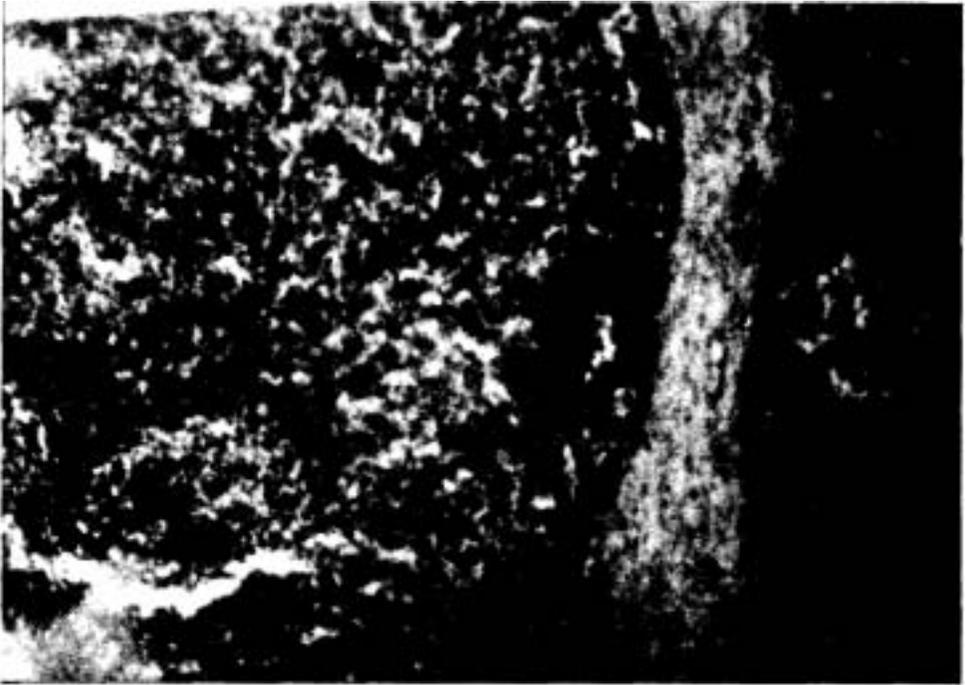
Gambar 10. Sayatan Limpa dengan Folikel Limfoid dan Beberapa Pusat Germinal (a). Pembesaran 200 x

Sama halnya dengan limpa, limfoglandula yang diperiksa secara histopatologis ini terdapat juga folikel limfoid. Daerah sinusoid diisi oleh sel-sel **neutrofil**, **monosit** dan **makrofag** dalam jumlah yang **cukup banyak** (Gambar 11 dan Gambar 12).



Gambar 11. Sayatan Limfoglandula yang Memperlihatkan Daerah Sinusoid yang Berisi Banyak Sel-sel Neutrofil, Monosit dan Makrofag (a) serta Folikel Limfoid (b). Pembesaran 400 x

Pada kedua organ tersebut didapatkan sejumlah pusat-pusat germinal (*germinal center*) yang merupakan respon tubuh berupa reaksi organ yang bersangkutan terhadap antigen yang berhasil ditangkap oleh organ ini



Gambar 12. Beberapa Folikel Limfoid (a) pada Limfoglandula. Pembesaran 200 x

Selain dilakukan pemeriksaan histopatologis, organ dan jaringan yang mengalami perubahan diperiksa di Laboratorium Bakteriologi FKH-IPB untuk mengetahui keterlibatan bakteri apa saja di organ dan jaringan tersebut. Pada kelompok yang hanya menerima uji tantang, rata-rata diperoleh bakteri *P. multocida* di organ paru, darah, limfoglandula mediastinalis dan leher. Sedangkan pada kelompok lainnya tidak ditemukan bakteri ini. Pada os nasal dan trakhea tidak ditemukan *P. multocida* dan yang dapat diisolasi hanyalah bakteri *Proteus* sp. Hasil isolasi bakteri dari organ yang mengalami perubahan pada seluruh kelompok perlakuan tercantum dalam Tabel 3.

Tabel 7. Temuan Bakteri dari Organ yang Mengalami Perubahan secara Patologis

Kelompok Perlakuan Spesimen	Kontrol	Vaksinasi	Vaksinasi dan Tantang	Tantang
Darah	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacillus sp.</i>	<i>Ps. diminuta</i> <i>Staph. epidermidis</i> <i>Serratia sp.</i> <i>Ps. putida</i>	<i>Ps. putida</i> <i>Staph. epidermidis</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Ps. diminuta</i>	<i>Pasteurella multocida</i> <i>Staph. epidermidis</i>
Paru	<i>Ps. diminuta</i> <i>Ps. putida</i> <i>Staph. epidermidis</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>P. multocida</i>	<i>Ps. diminuta</i> <i>Staph. epidermidis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Ps. diminuta</i>	<i>Ps. diminuta</i> <i>Staph. epidermidis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Ps. putida</i>	<i>P. multocida</i> <i>Ps. diminuta</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staph. epidermidis</i>
Lgl. Mediastinalis				<i>P. multocida</i> <i>Ps. diminuta</i> <i>E. coli</i>
Lgl. daerah leher				<i>P. multocida</i> <i>Ps. diminuta</i>
Trakhea (usap)	<i>Ps. diminuta</i> <i>Staph. epidermidis</i>	<i>Ps. diminuta</i> <i>Staph. epidermidis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Ps. putida</i>	<i>Ps. diminuta</i> <i>Staph. epidermidis</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Ps. putida</i> <i>Streptococcus sp.</i>	<i>Proteus sp.</i>
Os Nasal (usap)	<i>Ps. diminuta</i> <i>Staph. epidermidis</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Ps. putida</i>	<i>Ps. diminuta</i> <i>Staph. epidermidis</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Ps. putida</i>	<i>Staph. epidermidis</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Ps. diminuta</i> <i>Ps. putida</i> <i>Bacillus sp.</i>	<i>Proteus sp.</i>

Hasil yang sama juga didapat oleh Pijoan *et al.* (1984) dan Iwamatsu dan Sawada (1988). Pada kelompok hewan lainnya tidak berhasil diisolasi bakteri *P. multocida*, tetapi ditemukan beberapa bakteri gram negatif seperti *E. coli* dan *Ps. diminuta*. Iwamatsu dan Sawada (1988) menambahkan bahwa selain dapat mengisolasi kembali bakteri *P. multocida* mereka juga dapat mengisolasi *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella bronchoseptica* dan *Streptococcus* sp..

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan, bahwa vaksin yang dihasilkan mampu memberikan perlindungan 100 % terhadap uji **tantang selama** 30 hari penelitian.

Untuk melengkapi dan menyempurnakan hasil penelitian yang telah dilakukan, disarankan (i) menambah waktu penelitian untuk mempelajari **pola keberadaan** antibodi sehingga dapat **ditentukan waktu** yang tepat untuk melakukan vaksinasi **ulang**, (ii) mempelajari sifat dari hasil ekstraksi guna **mendapatkan cara lain** yang lebih **sederhana** dalam **mengaplikasikan** vaksin yang dihasilkan, (iii) melakukan **analisis** ekonomi terhadap vaksin yang dihasilkan guna memberikan gambaran **berupa kelebihan dan kekurangan** vaksin yang dihasilkan

DAFTAR PUSTAKA

- Bain. R.V.S., M.C.L. de Alwis, G.R. Carter, B.K. Gupta. 1982. **Haemorrhagic Septicaemia**. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Roma. 54 p
- Buddle, J.R. 1985. Animal Health in Australia. Bacterial and Fungal Disease of Pigs. Vol. 6. Australia **Government** Publishing Service, **Canberra**. 247 p.
- Carter. G.R., G.W. Claus and Y. Rikihisa. 1986. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Third Edition. Lea & Febiger. Philadelphia. 261 p.
- Cheftel, J.C., J.L. Cuq and D. Lorient. 1985. Amino Acids, **Peptides** and Proteins. In O.R. Fennema. Ed. 1985. Food Chemistry. Second edition. Marcel Dekker, Inc. **N.Y.** 1991 p.
- Dominick, M.A.** and R.B. **Rimler**. 1986. Turbinate Atrophy in Gnotobiotic Pigs **Intranasally** Inoculated with Protein Toxin from Type D *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* **47**:1532-1536.
- Elling, F.** and K.B. Pederson. 1985. The Pathogenesis of Persistent Turbinate Atrophy Induced by **Toxicogenic Pasteurella multocida** in Pigs. *Vet. Patohol.* **22**:469-474.
- Ernest, J. 1985. Review of **Medical** Microbiology. Lange **Medical** Publications. California.

- Harper, H.A., V.W. **Rodwell** and P.A. Mayers. 1979. Biochemistry. Review of Physiological Biochemistry. (**Alih Bahasa: Martin** Muliawan). 17th **ed. Lange** Medical Publications. California. 743 p.
- Holt, J.G.** 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. **Williams & Wilkins**. Baltimore. London.
- Iwamatsu, S.** and T. Sawada. 1988. Relationship between **Serotype, Dermonecrotic** Toxins Production of *Pasteurella multocida* Isolates and Pneumonic Lesions of Porcine Lung. *Jpn. J. Vet. Sc.* 50:1200-1206.
- Kosbich, M. and A. **Pennings**. 1989. **An** Evaluation in Pigs of **NobiVac AR** and **An** Experimental **Atrophic Rhinitis** Vaccine Containing *P. multocida* DNT-Toxoid and *B. bronchoseptica*. *Vet. Rec.* 124:57-58.
- Kodama, H.** M. Matsumoto and L.M. Snow. 1981. Immunogenicity of Capsular Antigens of *Pasteurella multocida* in Turkeys. *Am. J. Vet. Res.* 42:1838-1841.
- McLaughlin, B.C., S.C. Greer, M.M. Chengapa, S. Singh R.L. Maddux, W.L. Kadel and P.S. McLaughlin.** 1991. Association of *Pasteurella haemolytica*-Like Organism With Enteritis in Swine. *Vet. Bull.* 62(7):Abst. 3891.
- Mosier, D.A., A.W. Confer and R.J. Panciera. 1989. The Evolution of Vaccines for Bovine Pneumonie Pasteurellosis. *Res. Let. Sci.* 47:1-10.
- Mukkur, T.K.S.** 1979. Immunogenicity of A Chaotropically Extratct Protective **Antigen(s)** of *Pasteurella multocida* Type A (Bovine **Origin**) Against Experimental Pasteurellosis in Mice. *J. Gen. Microbiol.* 113:37-43.
- Pijoan, C., A. Lastra, C. Ramirez and A.D. Leman.** 1984. Isolation of Toxigenic Strain of *Pasteurella multocida* from Lungs of Pneumonic Swine. *JAVMA* 185:522-523.
- Ringler, D.H., G.K. Peter, C.E. Chrisp and D.F. Keren.** 1985. Protection of Rabbits against Experimental Pasteurellosis by Vaccination with Potassium **Thiocyanate Extratc** of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 49:498-504.
- Rutter, M.** 1989. Atrophic **Rhinitis**. *In Practice*. March 1989:74-80.
- Ruteer J.M. and X. Rojas. 1982. Atrophic **Rhinitis** in Gnotobiotic Pigs: Differences in The Pathogenicity of *Pasteurella multocida* in Combined Infections with *Bordetella bronchoseptica*. *Vet. Rec.* 110:531-535.
- Ryu, H. and M.L. **Kaberle.** 1986. Immunogenicity of Potassium Thiocyanate Extract of Type a *Pasteurella multiocida*. *Vet. Microbiol.* 11:373-385.
- _____**A. MacKenzie.** 1984. Pathogenesis of **Atrophic Rhinitis** in Pigs: A New Perspective. *Vet. Rec.* 114:89-90.
- Steel, R.G.D. and J.H. Toririe. 1981. Principles and Procedures of Statistics. A **Biometrical** Approach. 2th. Ed. **McGraw-Hill** International Book Company. London. 633 p.
- Thompson, C.M.A., N. Chanter and C.M. Wathes. 1992. **Survivak** of **Toxigenic Pasteurella multocida** in Aerosols ad **Aquesous** Liquids. *Vet. Bull.* 58(3): **Abstr.** 5371.
- Tizard, I. 1982. An Introduction to Veterinary Immunology. 2th. Ed. W.B. Saunders Company. Taiwan. 363 p.