



# BULETIN VETERINER FARMA

MEDIA INFORMASI KEGIATAN  
BALAI BESAR VETERINER FARMA PUSVETMA

Pembuatan Antigen Rabies untuk Kit ELISA Rabies Tahun 2020 - 2022 

Pengembangan Metode Inaktivasi Antigen Rabies Dengan  
Cara Pemanasan untuk Optimasi Kit ELISA Rabies Pusvetma 

Pengembangan Produksi Vaksin Avian Influenza Bivalen  
HPAI H5N1 dan LPAI H9N2 

Pengkajian Pembuatan Vaksin Afluvet Kombinasi Highly Pathogenic Avian  
Influenza (HPAI) H5N1 Strain Tanggamus dan ND Lasota 

Validasi Pengujian Kit Diagnostik Sebagai Tugas  
BBVF Pusvetma Sebagai Laboratorium  
Rujukan Penyakit Mulut dan Kuku Di Indonesia 



Suscribe Now!  
[pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id](http://pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id)

**BULETIN VETERINER FARMA**  
**Media Informasi Kegiatan**  
**Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma**

**Pelindung :**

drh. Edy Budi Susila, M.Si.  
KEPALA BALAI BESAR VETERINER FARMA PUSVETMA

**Pemimpin Redaksi Penganggungjawab**

drh. Sapto Rini Budi Prasetyowati, M.Imun.

**Dewan Redaksi & Pelaksana**

drh. Wriningati, M.Kes.  
drh. Ida Arlita Wulandari, M.Biotech.  
Dr.drh. Dewi Noor H, M.Kes.  
drh. Evy Indah Setyorinie, M.Sc.  
drh. Faizal Zakariya, M.Sc.  
drh. Dina Ristiana, M.Sc.  
drh. Febri Hartanti, M.Sc.  
drh. Dwi Kurnia Lestari, M.Si.

**Sekretariat**

Haris Firmansyah, S.Farm., Apt.  
Ari Wijayanto, S.Pd.

**Diterbitkan oleh**

Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

Jl. A. Yani 68 - 70 Surabaya 60231

Telp. (031) 8291124 - 25 Fax: (031) 8291183

Telp. Pengaduan : (031) 8291477

E-mail: [pusvetma@pertanian.go.id](mailto:pusvetma@pertanian.go.id), [pusvetma.kementan@yahoo.com](mailto:pusvetma.kementan@yahoo.com)

Website : [pusvetma.ditjennak.pertanian.go.id](http://pusvetma.ditjennak.pertanian.go.id)

## Surat Redaksi

Buletin Veteriner Farma merupakan media informasi kegiatan, kajian dan penelitian pada Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma Surabaya. Pada penerbitan kali ini memuat tentang Pembuatan antigen rabies untuk Kit ELISA Rabies tahun 2020-2022, Pengembangan metode inaktivasi antigen rabies dengan cara pemanasan untuk optimasi Kit ELISA Rabies BBVF Pusvetma, Pengembangan produksi vaksin avian influenza bivalen HPAI H5N1 dan LPAI H9N2, Pengkajian pembuatan vaksin afluvent kombinasi *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H5N1 strain Tanggamus dan ND LaSota, Validasi pengujian kit diagnostik sebagai tugas BBVF Pusvetma sebagai laboratorium rujukan penyakit mulut dan kuku di Indonesia.

Semoga artikel-artikel yang dimuat dapat menambah wawasan dan manfaat bagi pembaca. Redaksi mengucapkan terimakasih kepada penulis dan mengundang partisipasi peneliti dan pembaca untuk mengirimkan hasil penelitian dalam bentuk artikel ilmiah serta saran dan kritik membangun untuk menyempurnakan penerbitan buletin selanjutnya.

Salam dari redaksi, Selamat membaca

## DAFTAR ISI

Pembuatan Antigen Rabies untuk Kit ELISA Rabies Tahun 2020 - 2022 .....	4
Pengembangan Metode Inaktivasi Antigen Rabies Dengan Cara Pemanasan untuk Optimasi Kit ELISA Rabies Pusvetma .....	12
Pengembangan Produksi Vaksin Avian Influenza Bivalen HPAI H5N1 dan LPAI H9N2 .....	22
Pengkajian Pembuatan Vaksin Afluvet Kombinasi <i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i> (HPAI) H5N1 Strain Tanggamus dan <i>ND Lasota</i> .....	38
Validasi Pengujian Kit Diagnostik Sebagai Tugas BBVF Pusvetma Sebagai Laboratorium Rujukan Penyakit Mulut dan Kuku Di Indonesia .....	58

Redaksi menerima tulisan/makalah dari pembaca, para ilmuwan dalam bidang pengendalian, pencegahan dan pemberantasan penyakit hewan sesuai dengan misi yang diemban Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma Surabaya.

Makalah yang telah ditelaah oleh tim Editor dan telah direvisi oleh penulis segera dikembalikan ke alamat redaksi Buletin Veteriner Farma.

Jl. A. Yani 68 - 70 Surabaya  
Telp. : (031) 8291125  
Fax. : (031) 8291183  
Email : [pusvetma@pertanian.go.id](mailto:pusvetma@pertanian.go.id)  
[pusvetma.kementan@yahoo.com](mailto:pusvetma.kementan@yahoo.com)

\*Redaksi tidak bertanggung jawab atas isi naskah/makalah

## PEMBUATAN ANTIGEN RABIES UNTUK KIT ELISA RABIES TAHUN 2020 - 2022

Kiki Dwi Restika<sup>1</sup>, Evy Indah Setyorinie<sup>1</sup>, Ismail Budi Wahyuri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

### ABSTRAK

Tingkat antibodi rabies paska vaksinasi dapat diukur dengan menggunakan kit elisa rabies. Mikroplat kit elisa rabies telah *dicoated* dengan antigen rabies yang sesuai, oleh karena itu antigen rabies merupakan bahan utama pembuatan kit elisa rabies. Pada tulisan ini diuraikan cara pembuatan antigen rabies yang akan dicoatingkan pada kit elisa rabies. Seed virus rabies strain pasteur diinokulasi pada kultur sel BHK-21 konfluen dengan dosis inokulasi 3 ml per botol roux menggunakan perhitungan *multiple of infection* (moi) 0.5. Sel diinkubasi pada suhu 35 °C selama 60 menit kemudian ditambahkan 100 ml media pertumbuhan virus dan diinkubasi kembali pada suhu 35 °C selama 96 jam. Suspensi virus diinaktivasi dengan betapropiolakton 10% kemudian diuji inaktivasi dan titrasi virus menggunakan mencit. Suspensi virus 200 ml dikoleksi. Hasil uji inaktivasi didapatkan inaktif dan hasil titrasi didapatkan titer  $10^{7.0}$  -  $10^{7.9}$ LD<sub>50</sub>/ml. Virus dimurnikan dengan filtrasi. Virus rabies inaktif dapat dicoatingkan pada mikroplate sebagai antigen rabies.

Kata kunci: rabies, kit elisa rabies, antigen rabies

## PENDAHULUAN

Virus rabies berasal dari genus *Lyssavirus* dan keluarga *Rhabdoviridae* (Wunnera, 2020). Rabies adalah penyakit neurologis akut fatal yang menyerang manusia dan mamalia yang ditularkan melalui air liur hewan pembawa rabies lewat gigitan atau cakaran. Penyakit ini berjalan di sepanjang neuron dari tempat infeksi ke sistem syaraf pusat dimana pada replikasi virus menyebabkan gejala klinis dan penyebaran sistemik. Kejadian pada manusia 99% disebabkan oleh anjing dan penyakit ini menyebabkan kematian pada 59.000 orang setiap tahun. Metode yang efektif untuk mengurangi kejadian rabies adalah dengan vaksinasi. (Brunker, 2018).

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) telah menetapkan target untuk eliminasi rabies dengan program *Global Framework for the Elimination of Human-Mediated Dog Rabies 2030*. Seiring dengan hal tersebut Indonesia juga mencanangkan program pembebasan Rabies secara bertahap melalui implementasi Prestasi Indonesia 2030 atau Pembebasan Rabies Bertahap Seluruh Indonesia 2030". Strategi utama pengendalian dan pemberantasan rabies adalah dengan cara vaksinasi dimana Kementerian Pertanian telah menyiapkan lebih dari 1 juta dosis vaksin dengan pembiayaan lebih dari 32,74 Milyar rupiah untuk membantu pemerintah daerah dalam penyediaan dan operasional kegiatan vaksinasi (Ditjen PKH, 2021).

Strategi pembebasan melalui program vaksinasi diperlukan monitoring antibodi rabies dengan mengukur tingkat antibodi yang dihasilkan untuk mengetahui keefektifan vaksin. *Enzym Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dapat digunakan sebagai uji untuk mendeteksi titer antibodi spesifik rabies setelah vaksinasi massal pada anjing (OIE, 2018). Prinsip dasar reaksi Elisa adalah mereaksikan antigen dengan antibodi yang berlabel enzim yang kemudian ditambah dengan substrat sehingga akan dihidrolisis menjadi presipitat warna yang dapat dideteksi menggunakan *Elisa reader* (Santosa, 2020). Uji Elisa memiliki beberapa kelebihan yaitu, uji dapat dilakukan secara cepat dalam 4 jam, tidak menggunakan virus hidup, dan tidak memerlukan laboratorium dengan fasilitas biosekuriti tinggi (Bili, 2014).

Tingkat antibodi rabies dalam serum darah anjing paska vaksinasi bisa diukur dengan menggunakan Kit Elisa rabies. Kit Elisa rabies adalah seperangkat alat uji elisa yang terdiri dari beberapa komponen seperti mikroplat, pengencer sampel, kontrol, standard atau kalibrator, konjugat, substrat, stop solution, dan wash buffer. Mikroplat kit elisa rabies telah *dicoated* dengan antigen rabies yang sesuai, oleh karena itu antigen rabies merupakan salah satu bahan utama pembuatan Kit Elisa Rabies. Pada penelitian ini akan diuraikan cara pembuatan antigen Rabies yang akan dicoatingkan pada Kit Elisa Rabies.

## MATERI DAN METODE

### Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan antara lain clean room, inkubator 37 °C dan 35 °C, botol roux 225 cm<sup>2</sup>, botol laboratorium, botol sampel, pipet, bulb, spuit, alat filtrasi, alat pelindung diri, spidol, karet, peralatan kandang, dan kain kassa.

Bahan yang digunakan terdiri dari eagle media, versen trypsin, phosphate buffer saline, bovine serum, betapropiolactone, thimerosale, alkohol 70%, hewan coba mencit, dan pakan mencit.

### Kultur Sel BHK-21

Sel BHK-21 ditumbuhkan pada botol roux kaca dengan Eagle Media mengandung 10% bovine serum dan 1% antibiotik penstrep. Botol roux kemudian diinkubasi dalam suhu 37 °C selama 48 jam sampai konfluent, untuk kemudian diinokulasi virus rabies.

### Inokulasi Virus

Sel BHK-21 yang telah konfluen diinokulasi seed virus rabies strain Pasteur dengan dosis inokulasi 3 ml per botol roux menggunakan perhitungan *multiple of infection* (moi) 0.5. Sel diinkubasi pada suhu 35 °C selama 60 menit kemudian ditambahkan media pertumbuhan virus dan diinkubasi kembali pada suhu 35 °C selama 96 jam. Pengamatan sel secara mikroskopis dilakukan setiap hari.

### Koleksi dan Inaktivasi Virus

Suspensi virus dikoleksi dari setiap kultur botol roux, dilakukan pengambilan sampel aktif, kemudian suspensi diinaktivasi menggunakan betapropiolactone (BPL) dengan konsentrasi 10%. Suspensi virus diputar pada suhu 3-5 °C selama 48 jam. Setelah suspensi virus inaktiv, ditambahkan bahan pengawet thimerosal 10% dan diputar kembali pada suhu 3-5 °C selama 24 jam.

### Uji Inaktivasi Virus

Hewan coba anak mencit sehat umur 1-3 hari diinjeksi 0.03 ml secara intracerebral (IC) dengan sampel suspensi virus yang telah diinaktivasi. Pengamatan dilakukan selama 14

hari. Suspensi dinyatakan inaktif apabila semua hewan coba tidak menunjukkan adanya gejala klinis terhadap penyakit rabies.

### **Penghitungan Titer Virus**

Sampel virus aktif dititrasi dengan pengenceran bertingkat dari tingkat pengenceran  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-6}$ . Setiap pengenceran diinjeksikan pada 10 ekor mencit remaja umur 2-3 minggu dengan berat badan 18-20 gram, dosis injeksi 0.03 ml/ekor secara intracerebral (IC). Pengamatan dilakukan selama 14 hari, seluruh kondisi mencit dicatat dari kondisi normal hingga yang menunjukkan gejala klinis rabies yaitu bulu berdiri, inkoordinasi, paralisa, dan kematian.

Penghitungan titer virus *lethal dose 50* ( $LD_{50}$ ) dilakukan dengan menghitung jumlah hewan positif menggunakan tabel metode Spearman Karber dengan tahapan sebagai berikut: 1) menentukan pengenceran terendah virus dimana semua hewan positif (contoh  $10^{-3}$  yaitu  $\log_{10} 10^{-3} = 3$ ); 2) menentukan jumlah total hewan positif pada seluruh pengenceran; 3) baca pada tabel untuk faktor pengenceran yang sesuai; 4) Nilai dari tahap 1 dan 3 dijumlahkan. Jumlah ini mewakili  $\log_{10}$  dari  $LD_{50}$ .

### **Purifikasi Virus**

Suspensi virus yang telah inaktiv dimurnikan dengan filtrasi menggunakan membran  $0.2 \mu\text{m}$  untuk menghilangkan sel-sel debris.

## **HASIL**

Suspensi virus rabies yang dihasilkan adalah 200 cc. Suspensi virus ini kemudian diinaktivasi menggunakan BPL 10%. Hasil uji inaktivasi menunjukkan bahwa semua hewan uji hidup tanpa menunjukkan gejala rabies, yang berarti virus telah inaktif dan dapat digunakan sebagai antigen.

Tabel 1 Suspensi virus rabies

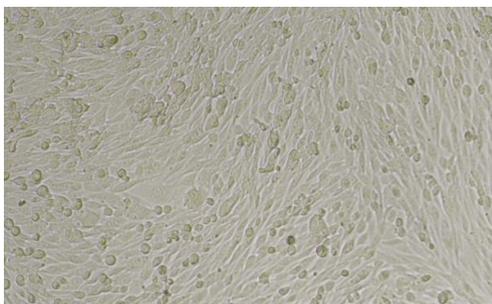
Tahun	Kode Antigen	Volume (ml)	Status Inaktivasi
2020	E 203.2603.05	200	Inaktif
	F 205.7145.06	200	Inaktif
2021-2022	F 213.1703.07	200	Inaktif

Penghitungan titer virus Rabies diperoleh hasil antara  $10^{7.0} - 10^{7.9}$  LD<sub>50</sub>/ml. Hasil pengamatan titer virus pada hewan coba adalah sebagai berikut:

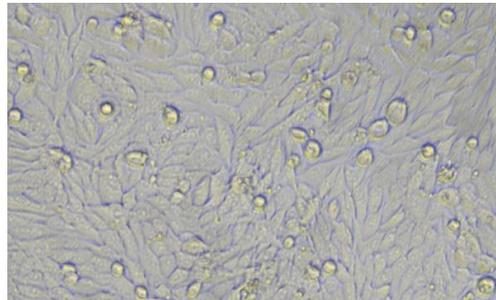
Tabel 2 Penghitungan titer virus rabies

Pengenceran virus (faktor pengenceran 10)	E 2003.2603.05		F 2005.7145.06		F 2103.1703.07	
	Hewan coba positif	Hewan coba negatif	Hewan coba positif	Hewan coba negatif	Hewan coba positif	Hewan coba negatif
10 <sup>-3</sup>	10	0	10	0	10	0
10 <sup>-4</sup>	9	1	9	1	10	0
10 <sup>-5</sup>	10	0	10	0	6	4
10 <sup>-6</sup>	10	0	7	3	4	6
Penghitungan						
Tahap:						
1.	1. 3		1. 3		1. 4	
	2. 39		2. 36		2. 20	
2.	3. 3.4		3. 3.1		3. 1.5	
	4. 6.4		4. 6.1		4. 5.5	
3.	10 <sup>-6.4</sup>		10 <sup>-6.1</sup>		10 <sup>-5.5</sup>	
4.	10 <sup>6.4</sup> LD <sub>50</sub>		10 <sup>6.1</sup> LD <sub>50</sub>		10 <sup>5.5</sup> LD <sub>50</sub>	
<i>End-point dilution</i>	10 <sup>7.9</sup> LD <sub>50</sub> /ml		10 <sup>7.6</sup> LD <sub>50</sub> /ml		10 <sup>7.0</sup> LD <sub>50</sub> /ml	
Titer virus						
Titer virus (LD <sub>50</sub> /ml)						

1. Pengenceran terendah seluruh hewan positif
2. Jumlah total hewan positif pada seluruh pengenceran
3. Nilai merujuk pada tabel metode Spearman Karber
4. Nilai dari tahap 1 dan 3 dijumlahkan

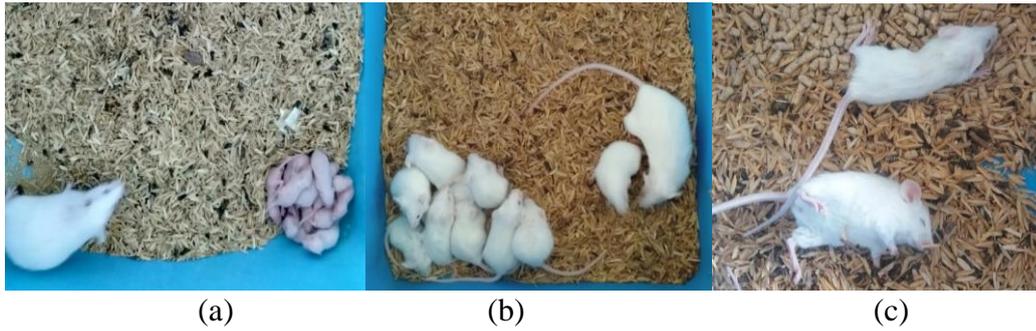


(a)



(b)

Gambar 1 Sel BHK-21 konfluen sebelum diinokulasi virus rabies dengan perbesaran 100x (a); Sel BHK-21 96 jam post inokulasi virus rabies dengan perbesaran 100x, tidak ada efek sitopatik (b)



Gambar 2 Uji inaktivasi virus rabies pada hewan coba anak mencit umur 3 hari (a) dan setelah 14 hari pengamatan anak mencit tetap hidup (b); titrasi virus rabies pada hewan coba mencit menunjukkan gejala positif rabies inkoordinasi, paralisa, kematian (c)

## PEMBAHASAN

Tehnik kultur jaringan pada penelitian tentang Rabies dikenalkan mulai tahun 1913 oleh Noguchi dan Levaditi. Propagasi pertama virus rabies berhasil dilakukan pada ganglia tulang belakang yang dipertahankan dalam media yang mengandung plasma monyet yang terkoagulasi. Sistem kultur jaringan yang bisa digunakan untuk virus rabies meliputi *Primary Culture*, *Diploid Cell Lines*, *Heteroploid Cell Lines* dan *Lymphocyt*. Penggunaan kultur sel untuk isolasi ataupun pertumbuhan berbagai macam strain virus Rabies dilakukan oleh Crick dan King dengan mengisolasi virus Rabies pada sel *baby Hamster Kidney* (BHK-21). Penelitian tentang isolasi virus Rabies lapangan yang dilakukan pada sel BHK-21 dan *Chick Embryo-Relates* (CER) dan sel neuroblastoma dengan immunofluoresen menunjukkan bahwa infeksi rabies pada sel terlihat mulai 4-5 jam sampai 5 hari sesudah infeksi. Sel BHK mempunyai kepekaan terhadap infeksi rabies lebih tinggi jika dibandingkan dengan mencit. Kepekaan infeksi pada sel tergantung pada asal sel syaraf yang digunakan serta strain virus infeksi (Meslin, 1996).

Metode paling umum yang digunakan untuk perbanyak virus Rabies adalah menggunakan kultur jaringan, baik itu menggunakan sel monolayer dalam flask yang *stationary* ataupun menggunakan botol roller yang bergerak atau dengan sel suspensi. Media yang digunakan adalah Eagle Media, sedangkan penambahan serum lebih berfungsi untuk melindungi virus dari inaktivasi akibat suhu daripada untuk replikasi virus (Meslin, 1996). Pertumbuhan optimal pada suhu inkubasi 32°C dan media dipertahankan pada pH 7.4 – 7.6 dengan penambahan sodium bikarbonas. Sel diinokulasi virus ketika sudah konfluent untuk mendapatkan hasil yang maksimal.

Efek sitopathologik infeksi virus Rabies pada sel BHK-21 monolayer tidak terlihat. Pada sel BHK-21 terinfeksi virus rabies yang terlihat adalah sel tampak tua dan mudah lepas dari permukaan flask dibandingkan dengan sel yang tidak terinfeksi. Efek sitopathologik terlihat pada sel neuroblastoma membentuk formasi sinsithia (Meslin, 1996).

Virus rabies harus diinaktivasi sebelum digunakan untuk antigen Kit Elisa Rabies. Inaktivan yang bisa digunakan untuk inaktivasi adalah betapropiolakton (BPL), acetyleneimine atau radiasi ultraviolet. Penyiapan antigen Rabies pada pembuatan antigen ini menggunakan inaktivan BPL dikarenakan BPL mempunyai sifat bisa membunuh bakteri dan virus tanpa berakibat pada antigenitas virus Rabies (Meslin, 1996).

Tingkat penyiapan antigen yang diperlukan untuk ELISA ditentukan oleh asal antigen, spesifisitas reagen dan tujuan dirancangnya ELISA, apakah untuk mengukur jumlah antigen spesifik atau sebagai kualitatif berspektrum lebar. Penyiapan antigen virus cukup digunakan cairan biakan sel terinfeksi kasar atau sel terinfeksi dirusak dengan deterjen atau bahan kimia lain kemudian diikuti sentrifugasi untuk menghilangkan serpihan sel (Burgess, 1995) atau di filter melewati membran filter 8  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , dan 1.2  $\mu\text{m}$  (Meslin, 1996). Preparat antigen kasar dalam elisa bermanfaat serodiagnosis pada sampel yang hanya sedikit diketahui mengenai sifat dan jumlah antigennya. Pemurnian antigen lebih lanjut diperlukan untuk menghindari reaksi silang dengan antigen lain yang mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat.

Penghitungan titer virus metode Spearman-Karber merupakan salah satu metode sederhana yang paling dikenal. Metode ini menggunakan faktor pengencer yang konstan dan kisaran pengenceran cukup lebar yang dapat mencakup pengenceran di bawah dan di atas 100% hewan biasanya akan positif dan pengenceran di bawah dan di atas 100% hewan biasanya negatif. Hewan positif dapat berupa hewan yang mati atau yang bertahan hidup tergantung pada jenis tes (Meslin, 1996). Pada pembuatan antigen rabies, dilakukan titrasi virus hidup sehingga hewan yang mati dihitung positif.

## **SIMPULAN DAN SARAN**

Antigen yang didapatkan dalam penelitian ini dapat digunakan sebagai coating antigen untuk kit elisa rabies. Antigen tersebut diperoleh melalui suspensi kultur virus rabies yang diinokulasikan pada sel BHK-21, telah diinaktivasi, dan dimurnikan dengan filtrasi. Penelitian lebih lanjut terkait proses pemurnian antigen Rabies, perlu dilakukan untuk meningkatkan spesifisitas kit yang dihasilkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bili, F.A.L. 2014. Serosurveilens pascavaksinasi rabies tahun 2014 di wilayah kerja upt veteriner Nusa Tenggara Timur. *Jurnal Kajian Veteriner*. Vol. 2 No. 2 : 119-126.
- Brunker, K., Mollentze, N., Rabies Virus. *Trends in Microbiology*. 2018. Month Year, Vol. xx, No. Yy. Elsevier Ltd.
- Ditjen PKH. 2021. <https://ditjenpkh.pertanian.go.id/berita/885-melalui-prestasi-indonesia-2030-kementan-dorong-target-bebas-rabies-indonesia-2030>
- Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H., *et al.* (1996). *Laboratory techniques in rabies* 4<sup>th</sup>ed. WHO.
- OIE terrestrial manual. Ch 3.1.1.8. Rabies (infection with rabies virus And other lyssaviruses). 2018.
- Santosa B. 2020. Teknik Elisa Metode Elisa untuk Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit. Semarang: Unimuss Press.
- Wunnera, W.H., Conzelmann, K., Rabies virus. 2020. 4th ed. *Scientific Basis of the Disease and its Management*. Pages 43-81. Elsevier.

## **PENGEMBANGAN METODE INAKTIVASI ANTIGEN RABIES DENGAN CARA PEMANASAN UNTUK OPTIMASI KIT ELISA RABIES PUSVETMA**

Petri Nandatina Saputri<sup>1</sup>, Nur Sjolichah<sup>1</sup>, Diah Pancawidyana<sup>1</sup>, Ekky Valinia DM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

### **ABSTRAK**

Objek penelitian ini adalah pengembangan metode inaktivasi antigen rabies dengan perlakuan pemanasan 56°C selama 1 jam, 3 jam, 5 jam dengan substrat TMB untuk optimasi kit elisa rabies. Hasil penelitian memperlihatkan perbedaan tidak signifikan diantara ketiga perlakuan tersebut diatas. Kesimpulan penelitian adalah metode inaktivasi pemanasan 56°C selama 1 jam dengan pengenceran 1000x sudah memenuhi syarat uji Kit ELISA Rabies Pusvetma. Substrat TMB digunakan pada penelitian ini karena stabil dan non mutagenik, namun diperlukan pengembangan lebih lanjut mengenai stabilitas dan masa ekspirasi substrat TMB ini.

Kata Kunci: *ELISA, Inaktivasi, Pemanasan*

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Rabies disebabkan oleh virus neurotropik genus *Lyssavirus* family Rhabdoviridae dan dapat ditularkan dari hewan ke hewan dan dari hewan ke manusia melalui gigitan. Karena bersifat zoonosis, maka semua material yang dicurigai terinfeksi harus ditangani dengan memperhatikan aspek keamanan sesuai spesifikasi WHO (WHO, 1996). Vaksinasi merupakan tindakan pencegahan yang efektif dalam mengurangi kejadian rabies. Hasil vaksinasi rabies harus memenuhi standar kebutuhan minimal sesuai dengan acuan OIE, yaitu sama atau lebih besar dari 0,5 Equivalent Unit (EU). (Hooper et al, 1998, WHO Expert Committee in Biological standard, 1985). Antibodi netralisasi diyakini merupakan komponen utama dari respon imun melawan virus rabies. Pemeriksaan zat kebal (Antibodi) pada serum dapat dilakukan dengan cara Mouse Neutralization (MN), Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) dan Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA).

*Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* merupakan alat pertama kali diperkenalkan pada awal tahun 1970 (D.Catty,1989) dan salah satu uji untuk mendeteksi antibodi yang sangat berguna terkait dengan survey epidemiologi dalam populasi besar (Xu et al, 2007) dengan teknik pengujian atau pemeriksaan berdasarkan atas ikatan antigen – antibodi yang mana salah satu antigen atau antibodi dilabel dengan Enzyme tertentu dan reaktan lainnya berikatan bersifat resisten yang tidak berikatan akan lepas dengan pencucian. Apabila dalam ikatan Antigen – antibodi yang berlabel berinteraksi dengan substrat maka akan terjadi perubahan warna yang spesifik. Intensitas warna yang mencerminkan intensitas antigen – antibodi yang diperiksa dan dapat diukur absorbansinya secara kuantitatif dengan *optical density*.

Kit ELISA Rabies Pusvetma telah mendapat perhatian secara nasional dan internasional dalam perjalanan produksinya, dengan memperhatikan saran mengenai masa kedaluarsa kit dan stabilitas kit ELISA Pusvetma ini maka dilakukan pengembangan metode. Dalam rangka meningkatkan mutu dan kualitas kit ini dilakukan penelitian pengembangan metode inaktivasi antigen rabies dengan perlakuan pemanasan untuk optimasi kit elisa rabies Pusvetma, sehingga diharapkan meningkatkan kualitas Kit Elisa Rabies Pusvetma. Perlakuan inaktivasi dengan pemanasan ini dipilih karena lebih sederhana dan murah bila dibandingkan dengan penggunaan bahan kimia.

## 1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah antigen yang dihasilkan dari proses inaktivasi menggunakan pemanasan dapat menghasilkan kit elisa rabies yang memenuhi standar mutu.

Tujuan kedua adalah dalam rangka mengembangkan metode inaktivasi kit ELISA Rabies Pusvetma yang memenuhi syarat uji

## 1.3 Tinjauan Pustaka

Menurut Madigan M.T., et al (2009) rabies adalah penyakit infeksi tingkat akut pada susunan syaraf pusat yang disebabkan oleh virus rabies. Penyakit ini bersifat zoonotik, yaitu dapat ditularkan dari hewan ke manusia. Virus rabies ditularkan ke manusia melalui gigitan hewan misalnya oleh anjing, kucing, kera, rakun dan kelalawar. Meskipun semua mamalia peka terhadap rabies, hanya spesies dari jenis canid, viverrid (skunks and raccoons) and chiropteran (kelalawar) adalah vektor yang paling efisien untuk rabies (Mrak R.E and Young L, 1994). Jackson, A.C. (2000) menyatakan anjing adalah vektor utama pada infeksi ke manusia. Rabies disebut juga penyakit anjing gila (Smith J.S., 1990). Sedangkan Steele J.H. and Fernandes P.J. (1991) berpendapat rabies penyakit encephalitis bersifat akut, progresif dan belum ada obatnya yang disebabkan oleh virus rabies yang sudah sangat lama dikenal manusia sebagai penyakit yang bisa menular dari hewan ke manusia. Berdasarkan laporan OIE dinyatakan bahwa penyakit Rabies di negara berkembang merupakan urutan nomor 2 (dua) yang paling ditakuti wisatawan mancanegara setelah penyakit malaria. Pemerintah Indonesia melalui Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian telah menetapkan rabies sebagai penyakit hewan menular prioritas utama yang harus ditangani.

Rabies disebabkan oleh virus rabies yang masuk ke keluarga Rhabdoviridae dan genus Lysavirus. Karakteristik utama virus keluarga Rhabdoviridae adalah hanya memiliki satu utas negatif RNA yang tidak bersegmen. Virus ini hidup pada beberapa jenis hewan yang berperan sebagai perantara penularan. Hewan perantara menginfeksi inang yang bisa berupa hewan lain atau manusia melalui gigitan. Infeksi juga dapat terjadi melalui jilatan hewan perantara pada kulit yang terluka. Setelah infeksi, virus akan masuk melalui saraf-saraf menuju ke sumsum tulang belakang, otak dan bereplikasi di sana. Selanjutnya virus akan berpindah lagi melalui saraf ke jaringan non saraf, misalnya kelenjar liur dan masuk ke dalam air liur. Virus tersebar luas dalam tubuh hewan yang

terinfeksi terutama susunan syaraf pusat, air liur, urine, getah bening, susu dan darah (Rabies Bulletin-Europa, 2011).

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*) adalah alat diagnostik klinis yang banyak digunakan untuk mendeteksi reaksi antigen-antibodi spesifik yang dapat digunakan untuk mendeteksi penyakit serta antibodi yang terbentuk setelah dilakukan vaksinasi. ELISA merupakan metode diagnostik yang tepat, sensitif, serbaguna, dan dapat di kuantifikasi. Salah satu aplikasi dari uji ELISA adalah deteksi antibodi terhadap virus rabies untuk investigasi kasus kejadian rabies dalam skala besar. Uji ELISA tidak memerlukan virus rabies dalam keadaan hidup, namun cukup dengan menggunakan serum dari darah hewan atau manusia penderita rabies dalam jumlah kecil. Selain itu, prosedur uji ELISA lebih sederhana dan lebih aman jika dibandingkan dengan uji FAVN (*Fluorescent Antibodi Virus Neutralization*).

## II. MATERI DAN METODE

### II.1 Materi

Bahan – bahan yang digunakan meliputi antigen rabies, carbonat bicarbonat buffer, bovine serum albumin, sucrose, phosphat buffer saline, tween 20, thiomersal, sampel serum lapangan, serum kontrol positif, serum kontrol negatif, serum standart, phosphat buffer saline tween, substrat, konjugat Protein A, stopper. Peralatan yang digunakan meliputi mikroplate urai, *multi channel pipet*, *single channel pipet*, finntipe, baker glass, tabung reaksi, petri disk, elisa reader dan elisa *washer*

### II.2 Metode

Antigen rabies yang digunakan pada pengembangan metode ini diinaktivasi dengan cara pemanasan suhu 56°C selama 1 jam , 3 jam, 5 jam. Antigen yang telah inaktif dilapiskan pada mikroplate urai dengan menggunakan bicarbonat buffer pH 9,6 seratus µl setiap sumuran dan ditutup dengan plastic absorban lalu simpan semalam pada suhu 4°C. *Blocking* mikroplate dengan membuka plastik absorben dan membuang larutan pelapis lalu diisi dengan larutan *blocking buffer* bicarbonat buffer pH 9,6 bovine serum albumin, dan succrose, di isi seratus µl setiap sumuran dan di tutup dengan plastik absorben lalu di simpan pada inkubator pada suhu 37 °C selama 1 jam. Cuci mikroplate dengan cara membuka plastik absorben yang sudah di

simpan pada inkubator lalu di buang cairan blocking dan di cuci dengan phospat buffer saline selama 4 kali, diisi 250 µl setiap sumuran.

### **Pengujian ELISA**

Uji Elisa dilakukan dengan pengenceran serum sampel, serum kontrol negatif, serum kontrol positif, serum standart dengan PBS *tween*, masukkan ke dalam setiap sumuran masing – masing seratus µl dan tutup plastik absorbent dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam setelah itu buka plastik absorbent dan cuci dengan PBS Tween pengenceran 1x ,masukan pengenceran konjugat dengan PBS Tween sebanyak seratus mikroliter setiap sumuran lalu tutup kembali dengan plastik absorbent dan inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 1 jam, lalu cuci kembali dengan PBS Tween, tambahkan substrat TMB sebanyak seratus µl tempatkan pada ruang gelap selama 10 menit dan hentikan reaksi dengan larutan *stopper* lalu baca pada elisa *reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

### **III. HASIL DAN PEMBAHASAN**

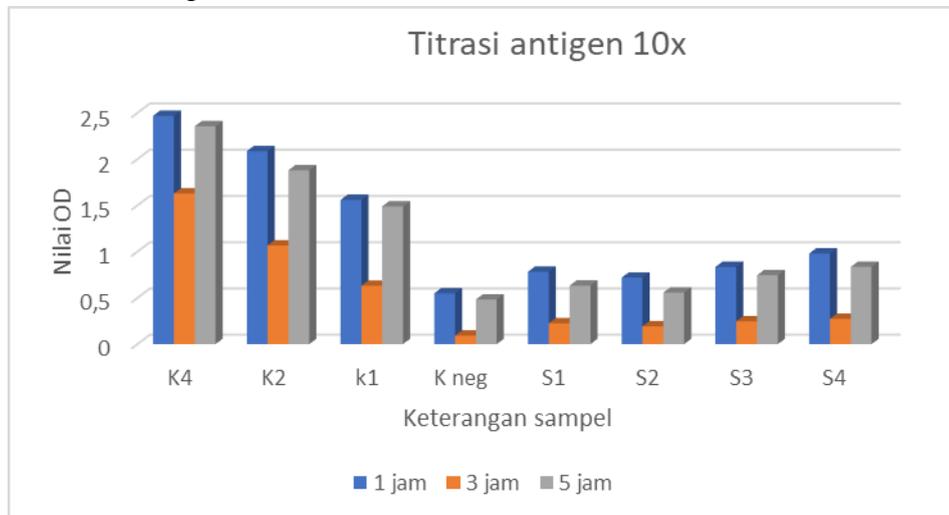
Metode inaktivasi virus rabies Pasteur pada penelitian ini adalah dengan pemanasan menggunakan indikator waktu yaitu 1 jam , 3 jam, 5 jam suhu 56°C. Konjugat Horseradish Peroxidase (HRP) Protein A dipergunakan pada penelitian sebagai label dalam enzim immunoassays, karena mengkatalisis oksidasi indikator redoks oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Indikator redoks yang umum dipergunakan adalah 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB), chromogen yang mudah diidentifikasi dengan spektrofotometri. Sebelum dibaca pada fotometri, reaksi TMB-HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diakhiri dengan menurunkan pH campuran dengan asam kuat seperti H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> untuk meningkatkan absorbansi dan dibaca pada Panjang gelombang 450 nm (Bally, 1989).

Kontrol positif yang digunakan adalah hiperimun serum yang mempunyai titer 4,50 dengan uji RFFIT. Kontrol negatif yang digunakan adalah serum anjing yang telah diuji RFFIT yaitu < 0,07 IU/ml. Serum sampel sebelumnya telah diuji dengan kit ELISA Rabies Pusvetma.

Michalski, 1976 menyatakan bahwa, metode pemanasan di suhu 37°C selama 2,4 jam dalam PBS dapat digunakan untuk inaktivasi virus rabies. Penelitian ini menggunakan antigen rabies yang berasal strain Pasteur yang telah diinaktif dengan

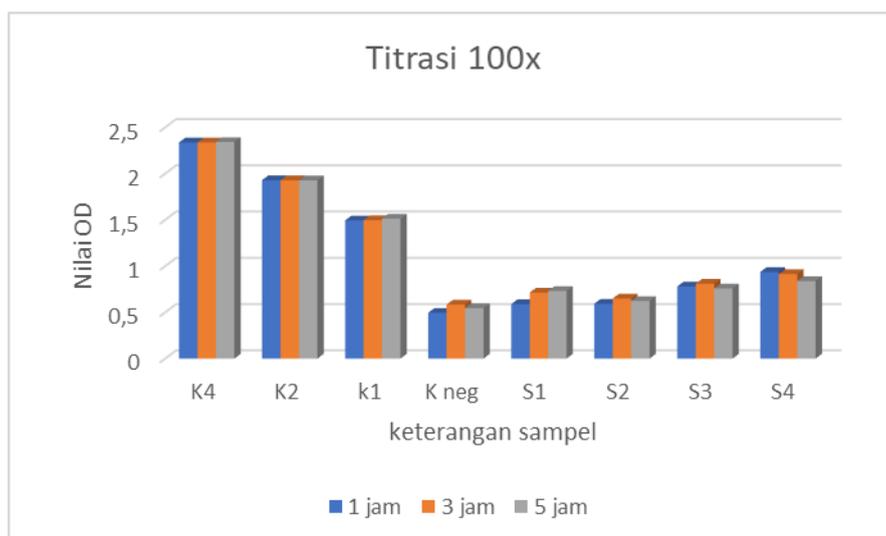
pemanasan 56°C dengan beberapa perlakuan waktu yaitu, 1 jam, 3 jam dan 5 jam. Hasil penelitian tertera pada tabel grafik berikut

Grafik 1. Titrasi antigen rabies 10x



Grafik 1 menggambarkan hasil titrasi antigen dalam larutan Carbonat Buffer pH 9,6 dengan pengenceran 10x antara perlakuan waktu 1 jam dan 5 jam tidak terdapat perubahan significant. Namun perlakuan waktu 3 jam menunjukkan anomali hasil uji titrasi antigen 10x sehingga tidak dapat digunakan.

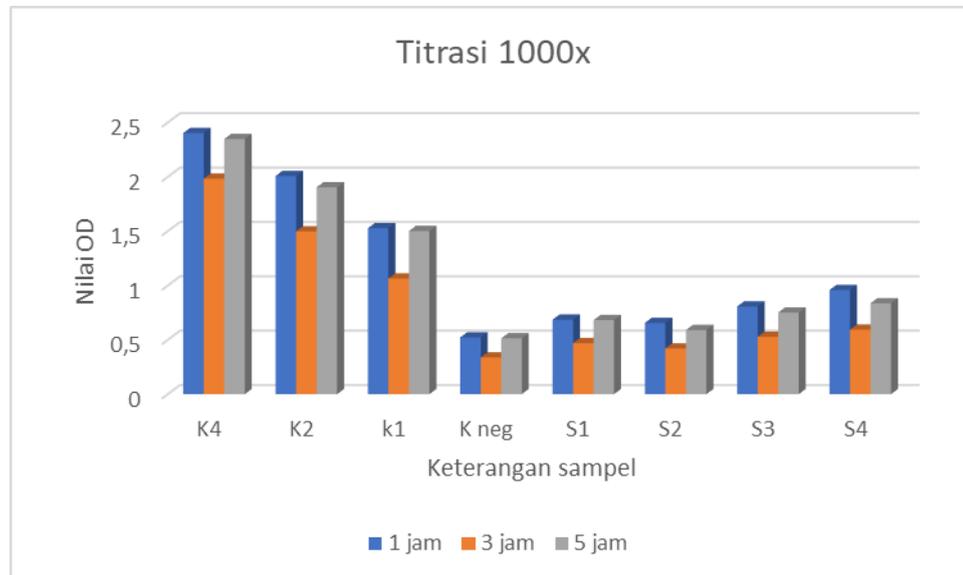
Grafik 2. Titrasi Antigen Rabies 100x



Grafik 2 menggambarkan hasil titrasi antigen dalam larutan Carbonat Buffer pH 9,6 dengan pengenceran 100x antara perlakuan waktu 1 jam, 3 jam dan 5 jam tidak menunjukkan perbedaan nilai OD pada kontrol positif 4, kontrol positif 2, kontrol positif

1. Pada kontrol negatif dan serum sampel menunjukkan sedikit perbedaan OD dengan kesimpulan akhir sama.

Grafik 3. Titrasi Antigen Rabies 1000x



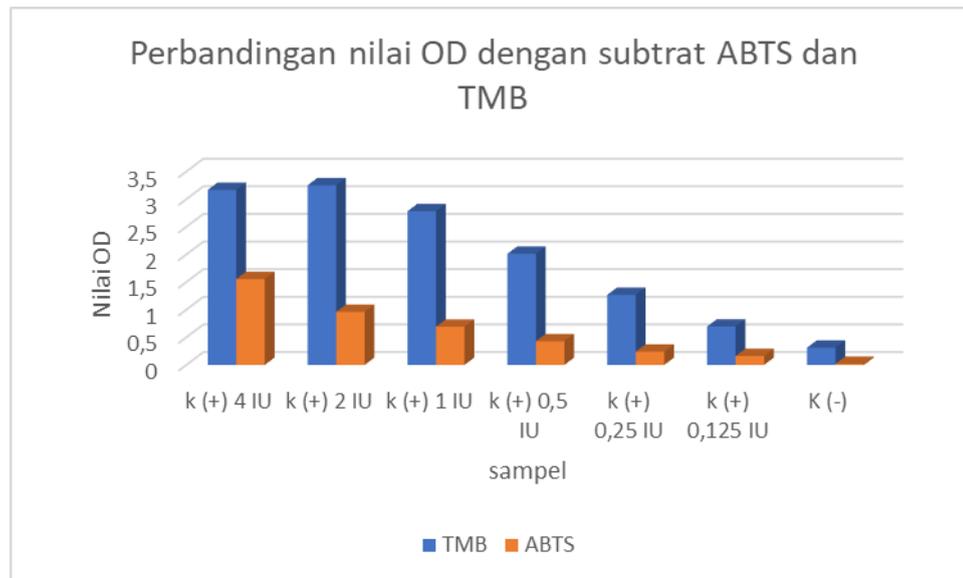
Grafik 3 menggambarkan hasil hasil titrasi antigen dalam larutan Carbonat Buffer pH 9,6 dengan pengenceran 1000x antara perlakuan waktu 1 jam menunjukkan variasi nilai OD yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan waktu 3 jam dan 5 jam, pada kontrol positif 4, kontrol positif 2, kontrol positif 1, kontrol negatif dan serum sampel. Perlakuan waktu 3 jam memperlihatkan nilai OD paling rendah pada pengenceran ini.

Dari grafik 1,2, 3 dapat disimpulkan sampai dengan titrasi 1000x, antigen rabies masih dapat berikatan dengan konjugat HRP Protein A, dan substrat TMB akan mendapatkan nilai OD seperti yang diharapkan. Perlakuan waktu inaktivasi selama 1 jam sudah dapat menginaktivasi antigen rabies dan memberikan hasil yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan inaktivasi 3 jam dan 5 jam. Sesuai dengan pernyataan Michalski,1976 bahwa temperature 56°C selama 50 menit atau 37°C selama 2,4 jam dapat menginaktivasi virus rabies

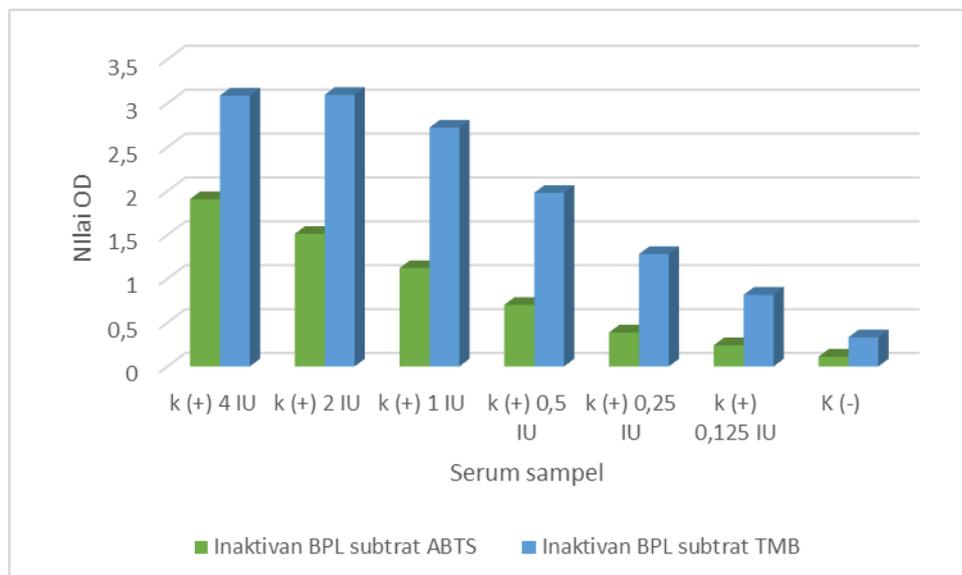
TMB merupakan chromogen untuk horseradish peroxidase menghasilkan produk reaksi dengan koefisien penyerapan tinggi dan tidak memiliki karsinogenisitas (A Frey, 2000) sehingga dapat dipergunakan untuk menggantikan komponen karsinogenik seperti benzidine and o-phenylenediamine.( J Ashby,1982). Menurut Lee 2014, Dorin 2020,

substrat TMB lebih sensitif dan lebih stabil serta menghasilkan pembacaan yang lebih tinggi dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan ABTS.

Grafik 4. Perbandingan nilai OD substrat ABTS dan substrat TMB dengan inaktivasi pemanasan, inkubasi 10 menit



Grafik 5. Perbandingan nilai OD dengan substrat ABTS dan substrat TMB dengan inaktivasi BPL, inkubasi 10 menit



Pengujian kit Elisa Rabies dengan inaktivasi BPL juga dilakukan pada penelitian ini dengan hasil pada grafik 5, dimana substrat ABTS memberikan nilai OD lebih rendah daripada substrat TMB. Nilai OD substrat TMB dengan inaktivasi BPL maupun dengan

inaktivasi pemanasan tidak memberikan perbedaan yang nyata. Nilai OD substrat TMB kontrol positif yang tinggi dapat terjadi karena waktu inkubasi (10 menit) yang menyesuaikan dengan substrat ABTS.

#### IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Inaktivasi antigen rabies strain Pasteur dengan metode pemanasan 56°C selama 1 jam dapat dipergunakan sebagai alternatif metode inaktivasi dengan biaya rendah, karena mengurangi pembelian bahan inaktivasi kimia namun tetap memenuhi syarat pengujian Kit Elisa Rabies. Diperlukan kajian lanjutan untuk mengetahui stabilitas dan Duration Of Immunity Kit ELISA Rabies dengan inaktivasi pemanasan.

TMB merupakan substrat kromogenik yang stabil, dengan koefisien penyerapan tinggi dan tidak karsinogenik, namun perlu dilakukan kajian lanjutan untuk mengetahui stabilitas dan *Duration Of Immunity* TMB.

#### V. DAFTAR PUSTAKA

[A Frey, B Meckelein, D Externest, M A Schmidt](#), 2000, A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays, *J. Immunol Methods* 2000 Jan 13;233(1-2):47-56. DOI (diakses di <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii> 15 September 2022)

Anonim, 2022, Comparison of ABTS, TMB, and OPD Peroxidase Substrate Systems, (diakses di: <https://www.seracare.com/globalassets/seracare-resources/tg-comparison-of-abts-tmb-and-opd-peroxidase-substrate-systems.pdf> pada tanggal 15 September 2022)

Bally R.W, 1989, 'Some Aspects of the Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as Hydrogen Donor in a Horseradish Peroxidase Assay' By R. W. Bally and T. C. J. Gribnau Scientific Development Group Organon Int. U.V. Oss, The Netherlands (Received October 28, 1988/June 21, 1989)'

D. Catty, 1989, *A Practical Approach*, Vol II

Dorin H, Evgeni E, Timothy S. E., Robert S.M and Alfred I.Y, 2020, Enhanced Colorimetric Signal for Accurate Signal Detection in Paper-Based Biosensors, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167932/pdf/diagnostic-s-10-00028.pdf>

Hooper D.C., Morimoto K., Bette M., Weihe E., Koprowski H. & Dietzschold B. (1998). Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J. Virol.*, 72, 3711-3719.

Jackson, A.C (2000). Rabies Canadian journal of neurological sciences 27.

[J Ashby, D Paton, P A Lefevre, J A Styles, F L Rose](#), 1982, Valuation of two suggested methods of deactivating organic carcinogens by molecular modification, (diakses di <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6758975/> 15 September 2022)

Lee H.Y, Atlasevich, N, Granzotto C, Schultz J, Loike J and Julie Arslanoglu J, (2014), Development and application of an ELISA method for the analysis of protein-based binding media of artworks, Royal Society of Chemistry

Madigan MT, Matinko JM, DuMLap PV, Clark PP (2009). Brock Biology of Microorganisms, Twelfth Edition.

Michalski F, Parks, N.F, Sokol F, Clarks F, 1976, Thermal Inactivation of Rabies and Other Rhabdoviruses: Stabilization by the Chelating Agent Ethylenediaminetetraacetic Acid at Physiological Temperatures, The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, Pennsylvania 19104 Received for publication 21 January 1976

Mrak RE, Young L (1994), Rabies encephalitis in humans : pathology ,pathogenesis and pathophysiology, *J Neurophathol Exp Neurol*.

Smith JS (1996). New Aspects of Rabies with Emphasis on Epidemiology, Diagnosis, and Prevention of the Disease in the United States. *Di Bali positip rabClin Microbiol Rev* 9 (2).

Steele, J. H. and Fernandez, P. J. (1991). History of rabies and global aspects. In: Baer, G. M. [ed.] *The natural history of rabies*, 2nd ed. pp. 415-425. CRC, Boca Raton Florida. USA.

The Protein Man's Blog | A Discussion of Protein Research, 2016, ELISA Substrates: A Selection Guide, <https://info.gbiosciences.com/blog/elisa-substrates-a-selection-guide>

Rabies-Bulletin-Europa (2011). Diagnosis of rabies in Animals, Jan 27, 2017 from [who-rabies-buletin.org](http://who-rabies-buletin.org): Diagnosis of Rabies in animals

World Health Organization (1996). *Laboratory techniques in Rabies Fourth Edition*, Meslin F-X, Kaplan M.M & Koprowski H., eds. WHO, Geneva, Switzerland.

World Health Organization Expert Committee On Biological Standards. Thirty-Fifth Report (1985). *World Health Organisation Technical Report Series No. 725*. WHO, Geneva, Switzerland.

Xu G., Weber P., Hu Q., Xue H., Audry L., Li C., Wu J & Bourhy H. (2007). A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies *BioLogicals*, 35, 297-302.

## **PENGEMBANGAN PRODUKSI VAKSIN AVIAN INFLUENZA BIVALEN HPAI H5N1 DAN LPAI H9N2**

Yanita Anjar P<sup>1</sup>, Petri Nandatina S<sup>1</sup>, Murtining Dyah K<sup>1</sup>, Bambang Erwan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

### **ABSTRAK**

Objek penelitian ini adalah pengembangan pembuatan vaksin *High Pathogenic Avian Influenza* H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> strain Tanggamus dan *Low Pathogenic Avian Influenza* H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> Strain South Sulawesi untuk menjawab tantangan perkembangan penyakit unggas di Indonesia. Uji keamanan dan uji potensi menggunakan 40 ekor ayam SAN (*Specific Antibody Negatif*) umur 21-28 hari. Uji keamanan menggunakan 20 ekor ayam, 10 ekor ayam dilakukan vaksinasi masing-masing 2 dosis secara intra muskular (IM). Pengamatan dilakukan selama 14 hari. Sepuluh ekor ayam yang lainnya tidak dilakukan vaksinasi sebagai kelompok kontrol. Uji potensi menggunakan 10 ekor ayam divaksinasi masing-masing 1 dosis secara intra muskular (IM), 10 ekor ayam lainnya yang tidak divaksinasi merupakan kelompok kontrol. Pengambilan darah dilakukan pada minggu ke-3 dan ke-4 pasca vaksinasi. Hasil uji keamanan menunjukkan 100% hewan tidak menunjukkan gejala AI spesifik. Hasil uji potensi dilihat dari uji HI serum ayam yang diambil 3 minggu paska vaksinasi, diperoleh hasil 100% titer antibodi terhadap H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> lebih besar sama dengan 128 (2<sup>7</sup>) dan titer antibodi terhadap H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 4 minggu paska vaksinasi 100% lebih besar sama dengan 16 (2<sup>4</sup>). Hasil penelitian ini menunjukkan pemeriksaan respon imun pada ayam SAN yang divaksin dengan vaksin HiLow AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> isolat Tanggamus-AI H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> isolat South Sulawesi dapat memberikan respon imun terhadap AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> isolat tanggamus dan juga terhadap AI H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> isolat South Sulawesi

Kata Kunci : *Avian Influenza, HPAI, H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>, LPAI, Vaksin bivalen*

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Pemerintah menetapkan Keputusan Menteri Pertanian Nomor 393/Kpts/PD.620/7/2007 tanggal 10 Juli 2007 yang menyatakan bahwa *Avian Influenza* telah mewabah di 31 provinsi. *Avian Influenza* merupakan salah satu Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) dan Hama Penyakit Hewan Karantina (HPHK). Virus AI yang tidak menyebabkan penyakit pada reservoir alaminya disebut sebagai *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Virus LPAI hanya mengakibatkan penurunan produksi telur yang bersifat ringan dan sementara, atau menurunkan bobot badan pada unggas pedaging (Capua & Mutinelli 2001). Virus LPAI dapat ditularkan keunggas yang rentan seperti ayam, mentok dan itik. Kasus *Avian Influenza* ini menimbulkan kerugian yang sangat besar bagi peternak karena angka morbiditas dan mortalitas tinggi, depopulasi unggas secara masal, peningkatan biaya untuk sanitasi dan desinfeksi area kandang, air dan peralatan peternakan.

Upaya pengendalian penyebaran penyakit yang disebabkan virus *Avian Influenza* pada unggas antara lain pemusnahan unggas terinfeksi, penerapan konsep biosekuriti secara tepat sasaran dan vaksinasi tepat dosis, tepat sasaran. Vaksinasi AI pada unggas tidak hanya mampu mencegah gejala klinis dan penyakit, namun dapat mencegah dan mengurangi jumlah *shedding* virus secara signifikan, yang dapat menjadi sumber infeksi bagi unggas lain.

Pusat Veteriner Farma sebagai produsen vaksin pemerintah terus melakukan penelitian dan pengembangan vaksin untuk ikut andil dalam pengendalian penyakit hewan di Indonesia. Inovasi tersebut diantaranya menghasilkan vaksin *Avian Influenza* HiLow yang berisi *High Pathogenic Avian Influenza* H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> isolat Tanggamus dan *Low Pathogenic Avian Influenza* H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> isolat South Sulawesi. Pengembangan virus HPAI dan LPAI dalam satu vaksin, diharapkan dapat memenuhi syarat mutu sesuai standar Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan dan mencegah penyakit *avian influenza* pada unggas di Indonesia.

### B. Rumusan Masalah / Hipotesa

Berdasarkan uraian diatas, maka timbul permasalahan yaitu apakah vaksin HiLow virus HPAI dan LPAI dapat memenuhi persyaratan berdasarkan Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI).

### C. Tujuan

Mengembangkan vaksin AI Bivalen virus HPAI dan LPAI yang memenuhi syarat sesuai standar mutu FOHI.

### D. Manfaat

Pengembangan vaksin AI Bivalen virus HPAI dan LPAI dalam satu formula vaksin, diharapkan dapat memenuhi syarat mutu sesuai standar FOHI sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan dan mencegah penyakit *avian influenza* pada unggas di Indonesia.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

*Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> pertama kali dilaporkan pada tahun 1996 di Provinsi Guangkong, Tiongkok. Agen etiologi HPAI termasuk keluarga *Orthomyxoviridae* (OIE, 2018). Menurut Nunez et al. (2008), beberapa strain HPAI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> telah mengakibatkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi pada itik domestik dan liar sejak tahun 2002. Virus HPAI yang menginfeksi ayam dapat menimbulkan gejala klinis yang parah, sedangkan pada itik akan menimbulkan gejala dari subklinis hingga parah (Laura et al., 2002). Bentuk akut (HPAI) ditandai oleh adanya proses penyakit yang cepat disertai mortalitas yang tinggi. Gejala klinis pada ayam domestik, kalkun, dan unggas lainnya ditandai dengan adanya kerusakan beberapa organ visceral, kardiovaskular dan sistem saraf.

H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> termasuk golongan LPAI yang menunjukkan gejala klinis yang tidak terlalu spesifik seperti pada kasus infeksi HPAI. Gejala klinis pada ayam yang terserang LPAI berupa gangguan pernafasan, batuk, konjungtivitis dan *airsacculitis* serta kadang diikuti oleh infeksi sekunder (Ladman et al., 2008). Unggas domestik yang terinfeksi virus LPAI akan menunjukkan gejala klinis depresi, bulu kusam, penurunan aktivitas, lesu, penurunan konsumsi makanan, gangguan pencernaan/diare, dan gangguan reproduksi (Capua and Marangon, 2000; Lee et al., 2015). Gejala klinis yang paling sering terlihat adalah infeksi saluran pernapasan yang dapat dilihat dari tanda-tanda gangguan pernapasan ringan sampai berat seperti batuk, bersin, rales, nafas cepat, dan

lakrimasi yang berlebihan. Infeksi pada ayam petelur dan pembibitan dapat mengakibatkan penurunan produksi dan kualitas telur (Swayne dan Halvorson, 2013).

### III. MATERI DAN METODE

#### A. Materi

Bahan :

##### a. Bahan untuk produksi :

Virus AI H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> South Sulawesi dan virus AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> clade 2.3.2 Tanggamus, TAB umur 9 – 11 hari ; kapas, alkohol 70%, PBS<sup>-</sup>, bahan inaktivan, adjuvant.

##### b. Bahan untuk pengujian :

TAB umur 9 – 11 hari, ayam SAN umur 21 - 28 hari, media untuk sterilitas : *Heart Infusion Agar* (HIA), *Thioglycolate broth* (TGC), *Soybean Casein Digest* (SCD), dan PBS<sup>-</sup>, RBC, antigen AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> clade 2.3.2 Semarang, antigen H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> South Sulawesi.

Alat :

##### a. Alat untuk produksi :

Inkubator telur, *sprit disposable* ukuran 1 ml dan 3 ml, *mikroplate*, *multichanel* pipet, vintip, *vortex mixer*, erlenmeyer, gelas beker, botol laboratorium, tabung gelas ukuran 10 ml, 20 ml dan 50 ml, rak tabung, timbangan, sentrifus, inkubator, *Bio Safety Cabinet* (BSC), botol vaksin, *magnetic stirrer*, *magnetic bar*, ultraturak.

##### b. Alat untuk pengujian :

Tabung gelas ukuran 10 ml, rak tabung, timbangan, sentrifus, inkubator, *Bio Safety Cabinet* (BSC), *sprit disposable* ukuran 1 ml dan 3 ml, PBS<sup>-</sup>, *mikroplate*, multipipet, fintip, *vortex mixer*.

#### B. Metode

1. Titrasi virus untuk mengetahui nilai EID<sub>50</sub> dari virus yang dipakai dan pembuatan *working seed*.
2. Propagasi dan panen virus.
3. Inaktivasi virus.

4. Formulasi vaksin dan *bottling*.
5. Pengujian mutu vaksin

1. Titrasi virus dan pembuatan *working seed*

Suspensi virus AI ditipiskan 10 kali sampai dengan  $10^{-9}$ , kemudian suspensi pada penipisan  $10^{-5}$  s/d  $10^{-9}$  diinokulasikan pada TAB umur 9-11 hari. Setelah inokulasi, TAB diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , untuk virus AI H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> diinkubasi selama 4 hari, untuk virus AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> selama 2 hari. Selama masa inkubasi, TAB yang sudah diinokulasi diobservasi (*candling*) dua kali sehari untuk memisahkan embrio yang mati dan yang masih hidup. TAB yang embrionya mati kurang dari 20 jam paska inokulasi, dipisahkan untuk di *chilling*, didekontaminasi dan dibuang. Pada akhir masa inkubasi, TAB yang embrionya mati setelah 20 jam paska inokulasi dan yang embrionya masih hidup di *chilling* pada suhu  $2-8^{\circ}\text{C}$  untuk dipanen dan dilakukan uji HA cairan alantois untuk diketahui nilai EID<sub>50</sub>. Pasase virus diulang sampai mendapatkan nilai EID<sub>50</sub> yang tinggi. Hasil pengukuran titer EID<sub>50</sub> yang diperoleh adalah  $10^{8.5}\text{EID}_{50}/0,1\text{ ml}$  untuk HPAI dan  $10^{8.5}\text{EID}_{50}/0,1\text{ ml}$  untuk LPAI. Kandeil *et.al* (2017) menyatakan bahwa vaksin AI yang dihasilkan dari virus dengan titer  $10^{7.5}\text{EID}_{50}/0,1\text{ ml}$  mampu menimbulkan titer antibodi protektif dalam satu kali vaksinasi.) Setelah mendapatkan nilai EID<sub>50</sub> yang sesuai, suspensi alantois dapat dipanen untuk dijadikan *working seed*.

2. Propagasi dan panen virus

*Working Seed virus* ditipiskan 10 kali sampai dengan  $10^{-4}$ , kemudian suspensi pada penipisan  $10^{-4}$  diinokulasikan pada TAB umur 9-11 hari. TAB yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , untuk virus AI H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> diinkubasi selama 4 hari, untuk virus AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> selama 2 hari. Selama masa inkubasi, TAB yang sudah diinokulasi diobservasi (*candling*) dua kali sehari untuk memisahkan embrio yang mati dan yang masih hidup. TAB yang embrionya mati kurang dari 20 jam paska inokulasi, dipisahkan untuk di *chilling*, didekontaminasi dan dibuang. Pada akhir masa inkubasi, TAB yang embrionya mati setelah 20 jam paska inokulasi dan yang embrionya masih hidup di *chilling* pada suhu  $2-8^{\circ}\text{C}$  untuk

dipanen dan dilakukan uji HA cairan alantois untuk diketahui nilai EID<sub>50</sub>. Cairan allantois yang telah dipanen ini untuk selanjutnya disebut produk antara.

### 3. Inaktivasi virus

Masukkan larutan formalin ke dalam tank inaktivasi yang telah berisi produk antara. Formalin diteteskan sedikit demi sedikit hingga konsentrasi akhirnya mencapai 0.1 – 0,2% sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*, dihomogenisasi pada suhu ruang selama 25 jam.

Uji inaktivasi menggunakan 10 butir TAB umur 9-11 hari. Setiap butir TAB diinokulasi dengan 0,02 ml cairan alantois yang sudah diinaktivasi. TAB diinkubasi pada 37<sup>0</sup>C selama 7 hari. Pada hari ke-7 cairan alantois dari setiap butir TAB diambil dan diuji HA. Selanjutnya dilakukan 2 kali pasase dengan cara yang sama. Cairan alantois yang telah diinaktif dapat dilanjutkan ke proses formulasi vaksin apabila semua TAB yang diinokulasi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan virus AI yang dapat dilihat melalui perubahan embrio maupun uji HA (FOHI, 2018).

### 4. Formulasi vaksin dan *bottling*

Setelah lulus uji inaktivasi maka dapat dilanjutkan dengan proses formulasi. Bahan yang perlu disiapkan yaitu produk antara yang sudah lulus uji inaktivasi dan adjuvan. *Mixing* produk antara dan adjuvan sesuai rasio yang telah ditentukan. Homogenisasi dilakukan pada suhu 4°C selama 30-60 menit sampai produk antara tercampur sempurna dan siap untuk dilakukan pembotolan.

Bahan dan alat steril yang akan dipergunakan disiapkan dalam *biosafety cabinet*, kemudian isikan pada masing-masing botol produk ruahan sesuai keperluan uji dan tutup dengan prop karet, selanjutnya tutup dengan prop alluminium menggunakan mesin *capping* dan beri label dan lakukan pengujian mutu vaksin.

### 5. Pengujian mutu vaksin

#### a. Uji fisik

Metode uji yang dilakukan yaitu melihat warna, homogenitas, volume, dan keberadaan partikel asing. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap

sediaan mempunyai volum dan warna yang sama, homogen dan tidak mengandung partikel asing (FOHI, 2018).

b. Uji sterilitas

Uji sterilitas dilakukan di dalam laboratorium dengan menggunakan *Bio Safety Cabinet* (BSC). Vaksin diinokulasikan 1 ml masing-masing pada 4 tabung yang berisi 20 ml media TGC, 4 tabung yang berisi 20 ml media SCD dan 4 *plate* media HIA (FOHI, 2018).

Dua tabung TGC dan dua tabung SCD yang telah diinokulasi vaksin, diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 14 hari. Dua tabung media TGC dan dua tabung media SCD lainnya diinkubasikan pada suhu 22<sup>0</sup>C selama 14 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke 3, 7 dan 14. Media HIA yang telah diinokulasi, diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 7 hari (FOHI, 2018).

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan fungi (kapang dan khamir) pada media yang digunakan (FOHI, 2018).

c. Uji stabilitas emulsi

Dua botol vaksin ditempatkan ke dalam inkubator suhu 37<sup>0</sup>C selama 14 hari tanpa digoyang-goyang. Vaksin dikatakan stabil/tidak rusak apabila pada akhir pengamatan, emulsi vaksin tidak mengalami *cracking*/pecah, apabila dikocok vaksin akan kembali homogen (Bain *et al.*, 1982).

d. Uji Inaktivasi

Uji inaktivasi menggunakan 10 butir TAB umur 9-11 hari. Setiap butir TAB diinokulasi dengan 0,02 ml vaksin ke cairan alantois. TAB diinkubasi pada 37<sup>0</sup>C selama 7 hari. Pada hari ke-7 cairan alantois dari setiap butir TAB diambil dan diuji HA. Selanjutnya dilakukan 2 kali pasase dengan cara yang sama.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua TAB yang diinokulasi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan virus AI yang dapat dilihat melalui perubahan embrio maupun uji HA (FOHI, 2018).

e. Uji Keamanan

Uji keamanan menggunakan 20 ekor ayam umur 21-28 hari. Sepuluh ekor ayam dilakukan vaksinasi masing-masing 2 dosis secara intra muskular (IM). Sepuluh ekor ayam lainnya tidak dilakukan vaksinasi sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal (FOHI, 2018)

f. Uji Potensi (secara serologis)

Pada uji ini digunakan 20 ekor ayam umur 21-28 hari dengan metode serologis. Sepuluh ekor ayam divaksinasi masing-masing 1 dosis secara intra muskular (IM). Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Titer antibodi yang timbul diketahui dengan uji HI.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat terhadap H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> apabila 3 minggu setelah vaksinasi, 100% serum ayam vaksinasi mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 128 (2<sup>7</sup>), sedangkan 100% serum ayam kontrol mempunyai titer kurang dari 4 (2<sup>2</sup>) (FOHI, 2018).

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat terhadap H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> apabila 4 minggu setelah vaksinasi tidak kurang dari 90% ayam vaksinasi mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 16 (2<sup>4</sup>) dan semua ayam kontrol mempunyai titer antibodi tidak lebih dari 4 (2<sup>2</sup>) (FOHI, 2007).

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Vaksin Afluvet HiLow merupakan vaksin kombinasi HPAI dan LPAI inaktif, berbentuk emulsi air dalam minyak. Proses produksi vaksin ini meliputi propagasi *seed* dan *working seed*, inaktivasi, formulasi, dan pengujian mutu vaksin. Propagasi *seed* dan *working seed* dilakukan dengan cara membiakkan virus HPAI dan virus LPAI ke dalam TAB. *Working seed* yang akan dibiakkan dalam TAB harus diketahui titer EID<sub>50</sub> yang bertujuan untuk mengetahui jumlah virus yang hidup. Hasil pengukuran titer

EID<sub>50</sub> yang diperoleh adalah 10<sup>8,5</sup>EID<sub>50</sub>/0,1 ml untuk HPAI dan 10<sup>8,5</sup>EID<sub>50</sub>/0,1 ml untuk LPAI. Kandeil *et.al* (2017) menyatakan bahwa vaksin AI yang dihasilkan dari virus dengan titer 10<sup>7,5</sup>EID<sub>50</sub>/0,1 ml mampu menimbulkan titer antibodi protektif dalam satu kali vaksinasi. Dalam penelitiannya juga dinyatakan bahwa ayam yang divaksinasi mampu bertahan setelah ditantang dengan virus ganas dengan titer 10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>/ml tanpa menunjukkan gejala abnormal dan tidak terjadi *shedding* virus baik pada swab kloaka maupun swab oral.

Setelah dilakukan perbanyakan virus dalam TAB, kemudian dilakukan pengujian titer virus dengan metode HA dan diperoleh titer virus HPAI dan LPAI masing-masing sebesar 512 (2<sup>9</sup>). Tahap inaktivasi menggunakan formalin dan pengujian HA virus setelah inaktivasi. Hasil pengujian HA virus setelah inaktivasi yaitu 256 (2<sup>8</sup>) untuk HPAI dan 256 (2<sup>8</sup>) untuk LPAI. Berdasarkan hasil uji ini, terdapat penurunan titer virus HPAI dan LPAI sebanyak 1 (satu) log sesudah penambahan inaktifan. Penambahan formalin sebanyak 0,04% atau 0,1% akan menyebabkan penurunan nilai HA sebanyak 1(satu) log karena formalin dapat merusak protein permukaan virus sehingga aktifitas HA akan menurun.

#### Virus AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> clade 2.3.2 Tanggamus

EID <sub>50</sub>	: 8,5
Titer HA sebelum inaktivasi	: 2 <sup>9</sup>
Titer HA sesudah inaktivasi	: 2 <sup>8</sup>

#### Virus AI H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> South Sulawesi

EID <sub>50</sub>	: 8,5
Titer HA sebelum inaktivasi	: 2 <sup>9</sup>
Titer HA sesudah inaktivasi	: 2 <sup>8</sup>

#### Formulasi

AI H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> clade 2.3.2 Tanggamus	: 15%
AI H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> South Sulawesi	: 25%
Adjuvan	: 60%

Vaksin Afluvet HiLow harus memenuhi standar baku mutu sebelum dapat diedarkan secara legal. Standar baku mutu yang digunakan sebagai acuan adalah Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI). Vaksin harus memenuhi standar uji fisik, uji sterilitas, uji stabilitas emulsi, uji inaktivasi, uji keamanan dan uji potensi secara serologis.

Warna vaksin, homogenitas, volum dan keberadaan partikel asing merupakan unsur yang harus diamati pada uji fisik. Vaksin Afluvet HiLow telah memenuhi persyaratan mutu uji fisik yang ditetapkan dalam Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) antara lain berwarna putih, homogen, mempunyai volum sama pada tiap botol yang diuji, dan tidak mengandung partikel asing dalam vaksin seperti yang tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Uji fisik vaksin Afluvet HiLow

Hasil uji sterilitas vaksin Afluvet HiLow pada berbagai media yang diinkubasi pada suhu dan waktu yang berbeda menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri dan fungi. Suhu inkubasi 30°-37°C bertujuan untuk mendeteksi bakteri sedangkan suhu inkubasi 20°-25°C bertujuan untuk mendeteksi fungi.

Tabel 1. Hasil uji sterilitas vaksin Afluvet HiLow , kombinasi AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> clade 2.3.2 Tanggamus dengan AI H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> South Sulawesi

No.	Jenis Media	Suhu Inkubasi	
		37°C	22°C
1	<i>Heart Infusion Agar</i> (HIA)	Steril	-

2	<i>Thioglycolate (TGC)</i>	Steril	Steril
3	<i>Soybean Casein Digest (SCD)</i>	Steril	Steril

Vaksin Afluvet HiLow merupakan vaksin inaktif, sehingga perlu dilakukan uji inaktivasi untuk mengetahui apakah virus dalam vaksin sudah inaktif. Pada uji inaktivasi vaksin Afluvet HiLow tidak menunjukkan adanya pertumbuhan virus AI yang dapat dilihat melalui perubahan embrio maupun uji HA.

Tabel 2. Hasil uji inaktivasi vaksin Afluvet HiLow , kombinasi AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> clade 2.3.2 Tanggamus dengan AI H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> South Sulawesi

	Pasase I		Pasase II		Pasase III	
	HA	Embrio	HA	Embrio	HA	Embrio
TAB	Negatif	Tidak ada perubahan	Negatif	Tidak ada perubahan	Negatif	Tidak ada perubahan

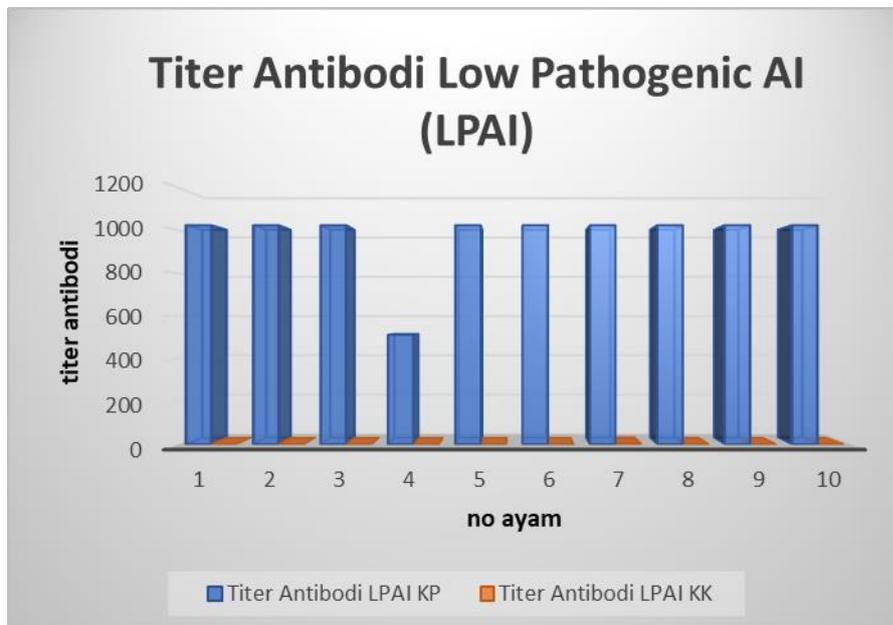
Uji stabilitas emulsi bertujuan untuk mengetahui kestabilan emulsi vaksin pada suhu ekstrim (37°C). Kestabilan emulsi ini berperan untuk menjaga kestabilan ikatan antara antigen dan adjuvan dalam vaksin. Vaksin Afluvet HiLow merupakan vaksin emulsi air dalam minyak (*water in oil*). Emulsi merupakan suatu sistem yang tidak stabil. Dalam emulsi, tegangan antar muka mempengaruhi terjadinya emulsi. Semakin kecil tegangan antar muka, emulsi yang terbentuk akan semakin stabil. Naiknya suhu secara linier akan menurunkan tegangan permukaan. Kerusakan pada sediaan emulsi biasanya ditandai *terbentuknya flokulasi, creaming, koalesen dan demulsifikasi*. Hasil uji stabilitas emulsi vaksin Afluvet HiLow menunjukkan bahwa emulsi vaksin tetap stabil setelah disimpan dalam suhu 37°C selama 14 hari, vaksin kembali homogen/tidak *cracking* setelah dikocok (Bain *et al.*, 1982)

Hasil uji keamanan vaksin menunjukkan bahwa vaksin Afluvet HiLow yang diuji tidak menunjukkan adanya gejala abnormal. Kelompok ayam yang divaksin sebanyak 2 dosis tidak menunjukkan gejala abnormal. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin Afluvet HiLow aman diaplikasikan ke hewan. Uji keamanan ini bertujuan untuk mengetahui

apakah komponen dalam vaksin aman pada hewan, tidak menunjukkan gejala abnormal ketika diaplikasikan ke hewan.

Vaksin Afluvet HiLow merupakan kombinasi dari HPAI dan LPAI sehingga uji potensi dilakukan untuk mengukur titer antibodi terhadap virus HPAI dan LPAI. Uji potensi yang dilakukan adalah secara serologis dan tidak dilakukan ujiantang karena keterbatasan fasilitas. Pelaksanaan ujiantang harus dilaksanakan di dalam laboratorium *Animal Bio Safety Level 3 (ABSL-3)*.

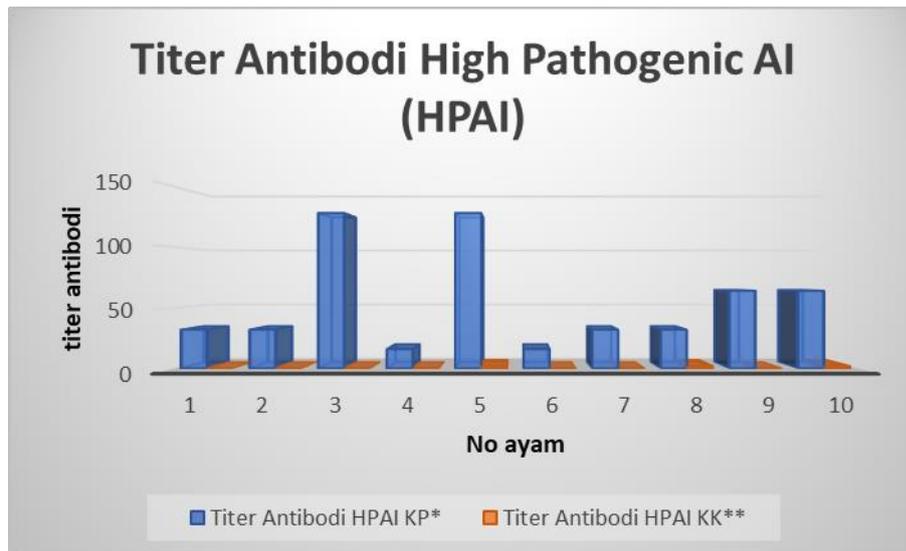
Bagan 1. Hasil Uji Potensi Vaksin Afluvet HiLow (Titer Antibodi AI H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>)



\*KP: Kelompok Perlakuan

\*\*KK: Kelompok Kontrol

Bagan 2. Hasil Uji Potensi Vaksin Afluvet HiLow (Titer Antibodi AI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>)



\*KP: Kelompok Perlakuan

\*\*KK: Kelompok Kontrol

Pada bagan 1 dan 2 dapat dilihat bahwa hasil uji potensi dengan uji HI serum ayam yang diambil tiga minggu paska vaksinasi, diperoleh hasil 100% titer antibodi terhadap H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> lebih besar sama dengan 512 (2<sup>9</sup>) dan titer antibodi terhadap H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> empat minggu paska vaksinasi 100% lebih besar sama dengan 16 (2<sup>4</sup>). Hasil uji serum kelompok kontrol baik pada LP AI maupun HP AI menunjukkan titer antibody (2<sup>0</sup>).

Tabel 3. Hasil Uji Vaksin Afluvet HiLow

Jenis Uji		Acuan Metode	Persyaratan Mutu	Hasil Uji
Uji Fisik	Warna	FOHI JIL I E5 2018	Uniform	Uniform
	Partikel Asing	FOHI JIL I E5 2018	Tidak ada	Tidak ada
	Homogenitas	FOHI JIL I E5 2018	Homogen	Homogen
	Volum	FOHI JIL I E5 2018	Uniform	Uniform
Uji Inaktivasi		FOHI JIL I E5 2018	100% HA negatif	100% HA negatif
Uji Sterilitas		FOHI JIL I E5 2018	Steril	Steril
Uji Stabilitas Emulsi		FOHI JIL I E5 2018	Baik	Baik

Uji <i>Safety</i>		FOHI JIL I E5 2018	100% tidak menunjukkan gejala abnormal	100% tidak menunjukkan gejala abnormal
Uji Potensi	AI Subtipe H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> <sup>ˆ</sup>	FOHI JIL I E3 2007	90% titer antibodi ≥ 16 (2 <sup>4</sup> )	100% titer antibodi ≥ 16 (2 <sup>4</sup> )
	AI Subtipe H <sub>9</sub> N <sub>2</sub>	FOHI JIL I E5 2018	100% titer antibodi ≥ 128 (2 <sup>7</sup> )	100% titer antibodi ≥ 128 (2 <sup>7</sup> )

Berdasarkan hasil uji terhadap vaksin Afluvet HiLow , dinyatakan bahwa vaksin tersebut telah memenuhi persyaratan uji sesuai standar Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI). Vaksin Afluvet HiLow saat ini sudah memperoleh nomor registrasi obat hewan sehingga sudah dapat diedarkan secara legal.

#### IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil pengujian mutu Vaksin Afluvet HiLow baik yang dilakukan di Pusvetma maupun di BBPMSOH memenuhi persyaratan mutu sesuai standar FOHI dan saat ini sudah memperoleh nomor registrasi obat hewan.

Uji lapang vaksin pada ayam perlu dilakukan untuk mengetahui efikasi vaksin pada hewan target, serta perlu dilakukan penelitian uji stabilitas untuk mengetahui masa penyimpanan vaksin yang disarankan.

#### V. DAFTAR PUSTAKA

- BBLitvet. 2017. Isolat lokal low pathogenic avian influenza (LPAI) subtipe H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> dalam vaksin inaktif Kombinasi Avian Influenza Highly Pathogenic dan Low Pathogenic Avian Influenza. *Dokumen*. Balai Besar Penelitian Veteriner.
- BPS. 2020. Produksi Telur Ayam Petelur menurut Provinsi, 2009-2018. <https://bps.go.id/linkTableDinamis/view/id/1079>.
- BPS.2020. Produksi Daging Ayam Ras Pedaging menurut Provinsi, 2009-2019. <https://www.bps.go.id/linkTableDinamis/view/id/1064>

- Capua I, Muttinelli F, 2001, Mortality in Muscovy Duck and Domestic Geese Associated with Natural Infection with A Highly pathogenic avian influenza virus of H7N1 Subtype avian pathology, 30, 179 -183
- Capua, I., and S. Marangon. 2000. "The Avian Influenza Epidemic in Italy, 1999- 2000: A Review." *Avian Pathology* 29 (4): 289–94. <https://doi.org/10.1080/03079450050118403>.
- Damayanti, R. Wiyono, A. Nuradji, H. Cahyono, MI. 2016. The pathogenicity of H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> highly pathogenic Avian Influenza (HPAI) virus clade 2.3.2 in Indonesia indigenous chicken by contact transmission with infected duck. *JITAA* 42.2.72-80. doi:10.14710
- Dharmayanti, IRNLP. 2014. Prototipe Virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 Sebagai Kandidat Vaksin AI Subtipe H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> Clade 2.3.2 pada itik lokal. *BBLitVet Master JITV*
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2007. Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I Edisi 3. Jakarta. Kementerian Pertanian Republik Indonesia
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018. Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid I Edisi 5. Jakarta. Kementerian Pertanian Republik Indonesia
- Kandeil A, Mostafa A, El-Shesheny R, Nageh A, Gomaa M, Galal H, Kayali G dan Ali MA. 2017. *Avia Influenza H5N1 Vaccination Efficacy In Egyptian Backyard Poultry*. Vaccine. 2017 October 27 ; 35 (45) : 6195-6201
- King DJ, 1991. Evaluation of Different Methods of Inactivation of Newcastle Disease Virus and Avian Influenza Virus in Egg Fluids and Serum, *Avian Disease* 35:505-514
- Ladman, B. S., J. Gelb, S. C. Rosenberger, C. R. Pope, and J. K. Rosenberger. 2008. "Virulence of Low Pathogenicity H7N2 Avian Influenza Viruses from the Delmarva Peninsula for Broiler and Leghorn Chickens and Turkeys." *Avian Diseases* 52 (4): 623–31. <https://doi.org/10.1637/8282-031208-reg.1>
- Laura, E, Leigh Perkins, and David E Swayne. 2002. "Pathogenicity of a Hong Kong – Origin H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> Highly Pathogenic Avian Influenza Virus for Emus , Geese , Ducks , and Pigeons Pathogenicity of a Hong Kong – Origin H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> Highly Pathogenic Avian Influenza Virus for Emus , Geese , Ducks , and Pigeons." *BioOne* 46 (1): 53–63
- Lee CW, Suarez DL. 2005. Avian influenza virus prospects for prevention and control by vaccination. *Anim Health Res Rev.* 6:1-15 doi:10.1079/ahr2005101
- OIE. 2018. Avian Influenza (infection with avian influenza viruses). *OIE Terrestrial Manual 2018*. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, 2018, Plotkin's Vaccines, 7th edition, Philadelphia.
- Nunez, Alejandro, Londt Brandon, Banks Jill, Nili Hassan, Johnson Linda K, and Alexander Dennis. 2008. "Pathogenesis of Highly Pathogenic Avian Influenza

- (HPAI) A/Turkey/Turkey/1/2005 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> in Pekin Ducks (*Anas Platyrhincos*) Infected Experimentally.” *Avian Pathology* 37 (06): 619–27.
- R.V.S. Bain, M.C.L. De Alwis, G.R. Carter, B.K. Gupta. 1982. *Haemorrhagic Septicaemia*. Animal Production and Health Paper No 33. Rome. FAO:32
- Swayne, D. E. and Halvorson, D. A., 2013. *Influenza In: Diseases of Poultry*. 13th Ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, pp. 181-218
- Wiyono, A., R. Indriani, N. Dharmayanti, R.Damayanti, L. Parede and T. Syafriati.2004. Isolasi Dan Karakterisasi Virus Highly Pathogenic Avian Influenza Subtipe H5 Dari Ayam Asal Wabah Di Indonesia (Isolation And CharacterizationOf Virus Of Highly Pathogenic AvianInfluenza H5 Subtype Of Chicken FromOutbreaks In Indonesia). *JITV* 9: 2004

**PENGAJIAN PEMBUATAN VAKSIN AFLUVET KOMBINASI *HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA (HPAI) H5N1 STRAIN TANGGAMUS DAN ND LASOTA***

Rinasti RP<sup>1</sup>, Petri Nandatina S<sup>1</sup>, Murtining Dyah K<sup>1</sup>, Jossie Intan C<sup>1</sup>, Misnan<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

**ABSTRAK**

*High Pathogenic Avian Influenza (HPAI)* dan *Newcastle Disease (ND)* adalah penyakit unggas strategis endemic di Indonesia sampai saat ini. Salah satu pengendalian yang dilakukan pemerintah dan peternak adalah program vaksinasi. Penelitian ini merupakan pembuatan vaksin kombinasi HPAI – ND dengan dua formula yang berbeda. Pembuatan vaksin menggunakan virus HPAI clade 2.3.2 Tanggamus dan ND strain *Lasota*. Masing-masing formula vaksin menggunakan sepuluh ekor ayam specific antibody negative (SAN) untuk uji potensi yang dilakukan penyuntikan 2 dosis secara *intra muscular (IM)*, selanjutnya 5 ekor untuk uji keamanan, serta tiga ekor untuk ujiantang terhadap virus ND. Pengambilan darah dilakukan sebelum vaksinasi dan 4 minggu setelah vaksinasi. Hasil Pengujian stabilitas menunjukkan hasil vaksin A dan B kurang stabil ditandai dengan terbentuknya *cracking* pada vaksin yang disimpan pada suhu 37°C. Hasil uji potensi dilihat dari uji HI serum ayam, vaksin A memberikan perlindungan 100% terhadap HPAI clade 2.3.2 Tanggamus, 90% terhadap HPAI clade 2.3.2 Semarang, 90 % terhadap ND-LS, vaksin B memberikan perlindungan diperoleh hasil menunjukkan 86,7% terhadap AI Tanggamus, 50% terhadap AI Semarang, 100 % terhadap ND-LS. Hasil Uji keamanan menunjukkan 100% ayam tidak menunjukkan gejala spesifik AI dan ND. Hasil penelitian menunjukkan vaksin kombinasi AI ND baik A dan B dapat memberikan respon imun terhadap HPAI clade 2.3.2 Tanggamus, HPAI clade 2.3.2 Semarang, namun vaksin formula A menunjukkan hasil uji potensi lebih baik daripada vaksin B dan ND LS, namun hasil uji stabilitas kurang baik.

Kata kunci: *High Pathogenic Avian Influenza (HPAI)*, *ND-Lasota*, *vaksin kombinasi*

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

*Avian Influenza* (AI) adalah penyakit pada unggas yang sangat menular, disebabkan oleh virus influenza tipe A, termasuk dalam famili Orthomyxoviridae (Lamb dan Krug, 2001). *Newcastle Disease* (penyakit ND, tetelo) merupakan penyakit virus yang sangat menular, menyerang unggas liar maupun ayam (Alexander, 2001). Kedua penyakit ini menyebar merata di seluruh dunia termasuk Indonesia. Pengendalian penyebaran penyakit yang disebabkan virus HPAI dan ND pada unggas dilakukan pemusnahan unggas terinfeksi, penerapan konsep biosekuriti dan dilanjutkan dengan vaksinasi yang tepat. *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) adalah virus flu burung yang ganas, menular dan mematikan bagi dunia peternakan Indonesia sampai saat ini, Penyakit ini mempunyai diagnosa banding dengan penyakit ND bahkan seringkali menyerang bersamaan sehingga menimbulkan kerugian yang sangat besar bagi peternak karena angka morbiditas dan mortalitas tinggi, depopulasi unggas secara masal, peningkatan biaya untuk sanitasi dan desinfeksi area kandang, air dan peralatan peternakan (Swayne & Suarez, 2000). Vaksinasi AI H5N1 pada unggas tidak hanya mampu mencegah gejala klinis dan penyakit, namun dapat mencegah dan mengurangi jumlah *shedding* virus secara signifikan, yang dapat menjadi sumber infeksi bagi unggas lain (Lee & Suarez, 2005).

Epidemi virus ND di Indonesia pertama kali terjadi di Jawa pada tahun 1926. Kasus ND merupakan ancaman serius bagi industri perunggasan di Indonesia karena penyakit ini endemik (Saliu *et al*, 2009) (Moomivand *et al*, 2013). Kencana *et al* (2017) dan Wibowo *et al*. (2006) menyatakan bahwa penyakit ND di Indonesia endemik karena ada kasus ND di seluruh tahun di berbagai daerah yang berpotensi menyebabkan wabah yang merugikan. Kasus ND masih dilaporkan di Sumatera, terutama di provinsi-provinsi Lampung, Sumatera Selatan, Bengkulu, dan Bangka Belitung (BeVet, 2019). ND dan AI adalah dua penyakit mematikan pada unggas coba, yang menyebabkan kerugian ekonomi yang besar bagi unggas mencoba industri dan mengganggu ketahanan pangan. Berdasarkan Kementerian Pertanian, Indonesia (Kepmentan, 2013) ND dan penyakit AI merupakan jenis penyakit menular strategis yang dapat mengancam dan menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar kerugian bagi

peternakan unggas. Vaksin yang efektif membutuhkan antigen yang baik. Studi tentang respons dosis vaksinasi sangat ideal untuk mengidentifikasi kandungan antigen vaksin dan tingkat antibodi yang diproduksi untuk memicu perlindungan dan mencegah pelepasan virus dari hewan (Maas *et al.*, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan keamanan dan kemanjuran vaksin kombinasi ND-AI H5N1 dengan dua formula yang berbeda yang selanjutnya akan dievaluasi hasil uji berupa pemeriksaan fisik, respons imun dan perlindungan terhadap uji tantang virus ND.

#### B. Rumusan Masalah / Hipotesa

Apakah vaksin kombinasi virus HPAI dan ND *LaSota* dapat yang dibuat dapat lulus uji serta memiliki potensi untuk dijadikan kandidat vaksin yang memenuhi persyaratan Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI).

#### C. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah menentukan keamanan dan kemanjuran vaksin kombinasi AI ND dengan dua formula yang berbeda yang selanjutnya akan dievaluasi hasil uji berupa pemeriksaan fisik, respons imun dan perlindungan terhadap uji tantang virus ND yang memenuhi syarat sesuai standar mutu FOHI.

#### D. Manfaat

Pengembangan kombinasi virus HPAI dan ND *LaSota* dalam satu formula vaksin, diharapkan dapat memenuhi syarat mutu sesuai standar FOHI sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan dan mencegah penyakit *avian influenza* (AI) dan *Newcastle Disease* (ND) pada unggas di Indonesia.

## TINJAUAN PUSTAKA

### *Avian Influenza H5N1 clade 2.3.2* **Tanggamus**

*Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H5N1 pertama kali dilaporkan pada tahun 1996 di Provinsi Guangkong, Tiongkok. Penyakit ini telah menyebar luas ke seluruh dunia dan menyebabkan dampak yang sangat signifikan di negara-negara yang terkena dampak termasuk Indonesia (Wiyono *et al.*, 2004). Virus HPAI H5N1 sangat menular pada unggas dan menghasilkan mortalitas tinggi hingga 100%. Agen etiologi

HPAI termasuk keluarga *Orthomyxoviridae* (OIE, 2018). Ayam kampung yang diinfeksi HPAI H5N1 dalam waktu 24 jam akan menunjukkan gejala klinis ringan seperti bulu berdiri dan lemah, setelah 48 jam kesembilan ayam mati, sedangkan kedua itik tetap hidup dengan gejala klinis sangat berat. Virus HPAI H5N1 berhasil diisolasi dari preparat usap (*swab*) yang berasal dari ayam dan itik tersebut, menandakan bahwa mereka terinfeksi virus tersebut. Secara mikroskopik, ayam kampung menunjukkan ensefalitis, trakheitis, miokarditis, pneumonia interstitialis, hepatitis, proventrikulitis, enteritis, pankreatitis, nefritis dan bursitis yang kesemuanya bersifat peradangan *non-supuratif*. Lesi dominan lainnya yaitu nekrosis pada limpa dan pankreas. Virus H5N1 HPAI *clade* 2.3.2 dideteksi dengan metode imunohistokimia dan ditemukan pada hampir semua organ visceral yang terserang. Virus H5N1 *clade* 2.3.2 di Indonesia sangat patogen untuk ayam dan itik asli Indonesia. Bebek yang terinfeksi dapat menularkan virus ke ayam asli Indonesia dengan mudah dan menyebabkan kematian tinggi (Damayanti *et al.*, 2016).

*Avian influenza* (AI) merupakan penyakit sistem pernapasan akut pada unggas yang disebabkan oleh virus *single-stranded* RNA sense negatif dengan genom tersegmentasi dari famili *Orthomyxoviridae*, genus *Influenzavirus A*, merupakan virus beramplop dengan diameter 80 – 100 nm. Sifat antigenesitas pada virus *avian influenza* karena keberadaan glikoprotein, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), Virus influenza A diklasifikasikan menjadi 18 subtipe HA (H1-H18) dan sebelas subtipe NA (N1-N11) Virus influenza tipe A dibagi menjadi berbagai subtipe berdasarkan hubungan antigenik antara glikoprotein yang terdapat pada permukaan partikel virus, yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA), pada virus influenza tipe A telah diidentifikasi 18 subtipe HA (H1-H18) dan 11 subtipe NA (N1-N11) (Alexander 2007; Tuscany 2016). Setiap virus influenza A memiliki masing-masing satu jenis antigen permukaan HA dan NA. Kedua protein inilah yang menentukan subtipe virus AI dan merupakan protein terpenting dalam menimbulkan respon imun (Knipe and Howley, 2007; Tong *et al.*, 2013). Tiga virus AI subtipe H5N1 isolat yang menginfeksi unggas air (Trimurjo, Pesawaran, dan Muara Enim) merupakan strain virus yang berbeda dengan virus AI subtipe H5N1 di Indonesia yang telah ditemukan/diisolasi sebelumnya. Tiga isolat HPAI tersebut membentuk *clade* baru

yang dekat dengan clade virus unggas asal Vietnam yaitu clade 2.3.2 (Pfeiffer *et al.*, 2009; Wibawa *et al.*, 2012).

Menurut hasil investigasi wabah BBVET Wates tahun 2012 kasus kematian itik yang cukup tinggi terjadi di daerah Jawa Tengah, DI Jogjakarta dan Jawa Timur ditemukan isolat H5N1 yang termasuk ke dalam clade 2.3.2. (Wibawa *et al.* 2012). Penelitian pembuatan vaksin menggunakan *seed* virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 sebagai benih vaksin pada itik lokal menunjukkan mampu memberikan perlindungan 100% dari kematian dan *shedding* terhadap infeksi virus HPAI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 dan *clade* 2.1.3 sehingga *seed* vaksin ini dapat menjadi pilihan terbaik untuk digunakan pada itik (Dharmayanti, 2014)

### ***Newcastle Disease strain LaSota***

*Newcastle Disease* (penyakit ND, tetelo) merupakan penyakit virus yang sangat menular, menyerang unggas liar maupun ayam (Alexander, 2001). Virus ND diklasifikasikan sebagai *superfamili* dari Mononegavirales dalam *famili* Paramyxoviridae, genus *Avulavirus* (Mayo, 2002 a). Isolat yang dikategorikan sebagai virulen untuk ayam ada tiga patotipe utama tergantung keparahan dari penyakit. Isolat lentogenik adalah isolat yang paling rendah virulensinya, sedangkan virus dengan virulensi *intermediate* adalah mesogenik. Virus dengan virulensi tertinggi menyebabkan mortalitas yang tinggi pada ayam digolongkan ke dalam neurotropik atau viscerotropik. Virus ND *velogenic* adalah virus yang dikategorikan sebagai patogen *List A* dalam pedoman OIE dan kejadiannya harus dilaporkan. OIE mendefinisikan ND sebagai infeksi yang disebabkan oleh virus APMV-1 dengan indeks ICPI 0,7 atau lebih besar bila disuntik pada ayam umur sehari (OIE, 2000). Vaksin ND yang beredar di pasaran Indonesia dan digunakan, umumnya bersifat lentogenik (Lasota atau B1) dan mesogenik (Kumarov) sebagai vaksin hidup (*live*). Strain ND LaSota dapat melindungi dari tantangan heterolog dan merupakan strain yang paling banyak digunakan di dunia terutama di Indonesia (Comax *et al.*, 2012) (Ma *et al.*, 2017)

## MATERI DAN METODE

### A. Materi

#### Bahan :

Telur ayam berembrio (TAB) umur 9 – 11 hari *Specific Antibody Negative* (SAN) 21 - 28 hari, virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 Tanggamus A/Chicken/Tanggamus/03.0872/2016, virus ND LaSota, kapas, alkohol 70%, Phosphat Buffer Saline (PBS), bahan inaktivan formalin, adjuvan minyak Montanide Seppic ISA 70, media untuk sterilitas : *Heart Infusion Agar* (HIA), *Thioglycolate broth* (TGC), *Soybean Casein Digest* (SCD), sel darah merah ayam (DMA), antigen AI H5N1 *clade* 2.3.2 Tanggamus, antigen AI H5N1 *clade* 2.3.2 Semarang, antigen ND.

#### Alat :

Inkubator telur, spuit *disposable* ukuran 1 ml dan 3 ml, mikroplate, *multichannel* pipet, *singlechannel* pipet, mikrotip, *vortex mixer*, erlenmeyer, gelas beker, botol laboratorium, tabung gelas ukuran 10 ml, tabung gelas ukuran 20 ml, gelas ukur ukuran 50 ml, rak tabung, timbangan, mesin sentrifuse, inkubator, *Bio Safety Cabinet* (BSC) level 2, botol vaksin, *magnetic stirrer*, *magnetic bar*, *ulthrathorax*.

### B. Metode

#### 1. Titrasi virus

Titrasi virus bertujuan untuk mengetahui nilai  $EID_{50}$  dari virus yang dipakai dan pembuatan *working seed*. Suspensi virus ditipiskan 10 kali sampai dengan  $10^{-9}$ , kemudian suspensi pada penipisan  $10^{-5}$  s/d  $10^{-9}$  diinokulasikan pada TAB umur 9-11 hari. TAB yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$ , untuk virus ND LS diinkubasi selama 4 hari, untuk virus AI H5N1 selama 36 jam. Selama masa inkubasi, TAB yang sudah diinokulasi di observasi atau di *candling* dua kali sehari untuk memisahkan tab yang mati dan yang hidup. TAB H5N1 yang mati diatas 24 jam paska inokulasi di chilling di suhu  $2-8^{\circ}C$  untuk selanjutnya allantois dipanen dan dilakukan uji HA. TAB ND LS yang mati diatas 72 jam paska inokulasi dan embrio yang masih hidup sampai hari ke 4 masa inkubasi di chilling di suhu  $2-8^{\circ}C$  untuk selanjutnya allantois di chilling dan dipanen serta dilakukan uji HA untuk

menghitung nilai *Embryo Infectious Dose 50* (EID<sub>50</sub>). Pasase virus diulang sampai mendapatkan nilai EID<sub>50</sub> yang tinggi. Setelah mendapatkan nilai EID<sub>50</sub> minimal 10<sup>8</sup>, suspensi allantois dipanen untuk dijadikan *working seed*.

## 2. Propagasi dan panen virus.

*Seed virus* ditipiskan 10 kali sampai dengan 10<sup>-4</sup>, kemudian suspensi pada penipisan 10<sup>-4</sup> diinokulasikan pada TAB umur 9-11 hari untuk ND LS dan TAB umur 11-13 hari untuk H5N1. TAB yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37°C, untuk virus ND LS diinkubasi selama 4 hari, untuk virus AI H5N1 selama 36 jam. Selama masa inkubasi, TAB yang sudah diinokulasi diobservasi atau di *candling* dua kali sehari untuk memisahkan tab yang mati dan yang hidup. TAB H5N1 yang mati diatas 24 jam paska inokulasi di chilling di suhu 2-8°C untuk selanjutnya allantois dipanen dan dilakukan uji HA. TAB ND LS yang mati diatas 72 jam paska inokulasi dan embrio yang masih hidup sampai hari ke 4 masa inkubasi di chilling di suhu 2-8°C untuk selanjutnya allantois di chilling dan dipanen serta dilakukan uji HA. Cairan allantois yang telah dipanen selanjutnya disebut produk antara.

## 3. Inaktivasi virus

Cairan allantois hasil panen ditambah bahan inaktivan formalin sebanyak 0,1% kemudian dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang selama 36 jam. Uji inaktifasi menggunakan 10 butir TAB SAN umur 9-11 hari untuk ND LS dan umur 11-13 hari untuk H5N1. Setiap butir TAB diinokulasi cairan allantois sebanyak 0,02 ml yang telah diinaktifasi. TAB diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. Selama 5 hari TAB diobservasi setiap hari, untuk mengamati hidup dan mati TAB yang diinokulasikan. Pada akhir masa inkubasi cairan allantois dipanen dan dilakukan uji HA cepat, apabila tidak terdapat aglutinasi maka dilanjutkan sampai pasase dua dan tiga dengan cara yang sama. Hasil akhir inaktif apabila cairan allantois yang dipanen tidak terdapat aglutinasi pada uji HA cepat (FOHI, 2018).

## 4. Formulasi vaksin dan pembotolan

Allantois atau produk antara yang telah memenuhi hasil uji sterilitas dan hasil uji inaktivasi selanjutnya diformulasi menggunakan adjuvant. Adjuvant yang digunakan adalah adjuvant minyak komersial yang disimpan pada botol glassware kurang lebih 1 bulan dari tabung drum. Proses mixing adjuvant dan alantoris dilakukan selama 30 menit sampai terbentuk emulsi dan homogen. Produk vaksin yang telah jadi dilakukan beberapa pengujian sesuai ketentuan FOHI. Vaksin diformulasi dengan dua formula yang berbeda. Formula vaksin A menggunakan perbandingan allantois ND LS sebesar 17,5%, allantois AI 232 TG sebesar 22,5% serta adjuvant sebesar 60%. Formula B menggunakan perbandingan allantois ND LS sebesar 15%, allantois AI 232 sebesar 15% serta adjuvant sebesar 70%, adjuvant yang digunakan adalah adjuvant minyak komersial. Adjuvan dihomogenasi menggunakan *ulthrathurax* selama 5 menit dengan kecepatan 5000 rpm, kemudian ditambahkan cairan allantois yang berisi kultur virus inaktif secara bertahap sampai terbentuk emulsi. Homogenisasi dilakukan di suhu 25°C selama selama 30 menit dengan kecepatan 9000 rpm sampai produk tercampur sempurna sampai membentuk emulsi, selanjutnya produk siap untuk dilakukan pembotolan.

#### 5. Pengujian mutu vaksin

Pengujian mutu vaksin dilakukan sesuai standar yang telah ditetapkan dalam FOHI (2018). Uji mutu vaksin meliputi uji fisik, uji sterilitas, uji stabilitas emulsi, uji inaktivasi, uji keamanan dan uji potensi secara serologis.

##### a. Uji Fisik

Uji fisik adalah uji yang dilakukan untuk melihat warna, homogenitas, volume, dan ada tidaknya partikel asing. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap sediaan mempunyai volume dan warna yang sama, homogen dan tidak mengandung partikel asing.

##### b. Uji Sterilitas

Uji sterilitas dilakukan pada media *Thioglycollate* (TGC), *Soybean Casein Digest* (SCD) dan *Heart Infusion Agar* (HIA). Sebanyak 1 ml vaksin dimasukkan ke dalam masing-masing 4 tabung yang berisi 20 ml media. Untuk vaksin yang diuji dalam media TGC dan SCD diinkubasi pada 2 suhu yang berbeda. Dari keempat tabung uji, 2 tabung diinkubasi pada suhu 37°C

selama 14 hari dan 2 tabung yang lain diinkubasi pada suhu 22<sup>0</sup>C selama 14 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke 3, 7 dan 14. Sedangkan vaksin yang diuji pada media HIA inkubasi hanya dilakukan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 7 hari. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan fungi (kapang dan khamir) pada media yang digunakan.

c. Uji Stabilitas Emulsi

Uji stabilitas emulsi bertujuan untuk melihat stabilitas emulsi vaksin pada berbagai suhu. Dua botol vaksin ditempatkan ke dalam inkubator suhu 37<sup>0</sup>C selama 14 hari tanpa digoyang-goyang. Vaksin dikatakan stabil/tidak rusak apabila pada akhir pengamatan, emulsi vaksin tidak mengalami *cracking*/pecah, apabila dikocok vaksin akan kembali homogen.

d. Uji Inaktivasi

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

e. Uji Keamanan

Uji keamanan menggunakan 16 ekor ayam umur 21-28 hari, 5 ekor untuk vaksin A dan 5 ekor untuk vaksin B, masing-masing dilakukan vaksinasi 2 ml. 6 ekor untuk ayam kontrol yang tidak divaksinasi. Ayam diperiksa titer terhadap AI 323 TG dan ND LS untuk memastikan titer antibody terhadap kedua penyakit tersebut 0. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal (FOHI, 2013).

f. Uji Potensi

Pada uji ini digunakan 20 ekor ayam umur 21–28 hari yang dibagi dalam 2 kelompok. Ayam uji diperiksa titer antibodi AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus dan ND LS untuk memastikan titer antibodi terhadap kedua

penyakit tersebut 0. Kelompok perlakuan (KP) terdiri dari 10 ekor ayam yang masing-masing divaksin sebanyak 2 dosis secara IM dan kelompok kontrol (KK) terdiri dari 10 ekor ayam tanpa vaksinasi. Serum diambil pada minggu ke 1, 3, dan 4 setelah vaksinasi dan diuji titer antibodinya menggunakan uji hambatan aglutinasi (HI). Vaksin dinyatakan memenuhi syarat H5N1 apabila 4 minggu setelah vaksinasi tidak kurang dari 90% ayam vaksinasi mempunyai titer antibody tidak kurang dari 16 ( $2^4$ ) dan semua ayam kontrol mempunyai titer antibody tidak lebih dari 4 ( $2^2$ ) (FOHI, 2007). Vaksin dinyatakan memenuhi syarat ND LS apabila tidak kurang dari 90% dari ayam kelompok vaksinasi tetap hidup tanpa menunjukkan gejala klinis ND dan 100% ayam kelompok kontrol mati (FOHI, 2013).

## **HASIL PENELITIAN**

### **Nilai EID50 virus yang digunakan**

Nilai EID50 dari masing masing virus dihitung menggunakan metode Muench (OIE), nilai *Egg Infectious Dose 50* (EID50) yang diperoleh dari titrasi virus sebelum inaktivasi masing masing menunjukkan nilai sebagai berikut ND LS adalah  $10^{9.16}$  EID<sub>50</sub>, virus AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus :  $10^{7.9}$  EID<sub>50</sub>. Hasil uji hemaglutinasi pada virus AI sebelum inaktif adalah 1024 atau  $2^{10}$ , setelah inaktif adalah 512 atau  $2^9$ . Pada virus ND LS sebelum inaktif dan setelah inaktif menunjukkan hasil yang sama yaitu 1024 atau  $2^{10}$ .

### **Konfirmasi Uji Inaktivasi pada Virus**

Vaksin kombinasi AI ND merupakan vaksin inaktif, sehingga perlu dilakukan uji inaktivasi untuk mengetahui apakah virus dalam vaksin sudah inaktif. Uji inaktif dilakukan baik sebelum formulasi dan setelah formulasi. Uji inaktivasi menggunakan TAB yang diinokulasi produk antara dan vaksin. Pengujian dilakukan sampai pasase ke 3, alantois hasil inokulasi dilakukan uji HA cepat untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan virus. hasil uji baik dari produk antara dan vaksin menunjukkan hasil inaktif.

### **Uji Sterilitas dan Safety pada Persiapan Vaksin**

Produk antara selanjutnya diuji sterilitas menggunakan HIA, TGC dan SCD di suhu 37°C dan 22°C. Pengamatan dilakukan sampai hari ke 14, hasil uji steril tidak ada pertumbuhan bakteri dan jamur baik pada produk antara dan vaksin A serta vaksin B. Kedua vaksin kombinasi menunjukkan hasil aman pada ayam yang divaksinasi, dimana tidak ada tanda-tanda klinis penyakit atau lesio setelah vaksinasi dosis ganda yang ditemukan pada ayam SAN yang divaksinasi. Hasil pengujian produk antara AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus dan ND *lasota* dapat dilihat di Tabel 1

Tabel 1 Hasil Pengujian Produk Antara Sebelum Formulasi

		H5N1 TG		ND	
<b>Nilai EID<sub>50</sub></b>		10 <sup>7.9</sup> EID <sub>50</sub>		10 <sup>9.16</sup> EID <sub>50</sub>	
<b>Titer HA</b>	Sebelum inaktif	1024 atau 2 <sup>10</sup>		1024 atau 2 <sup>10</sup>	
	Setelah Inaktif	512 atau 2 <sup>9</sup>		1024 atau 2 <sup>10</sup>	
<b>Pasase</b>	1	Inakif		Inakif	
	2	Inakif		Inakif	
	3	Inakif		Inakif	
<b>Uji sterilitas</b>	Suhu Inkubasi	22°C	37°C	22°C	37°C
	HIA	steril	steril	steril	steril
	TGC	steril	steril	steril	steril
	SCD	steril	steril	steril	steril

### Uji Fisik dan Stabilitas Vaksin

Uji stabilitas emulsi bertujuan untuk mengetahui kestabilan emulsi vaksin pada suhu ekstrim yaitu 37°C. Kestabilan emulsi akan menjaga ikatan antara antigen (allantois) dan adjuvant di dalam vaksin. Hasil uji stabilitas menunjukkan vaksin A dan B kurang stabil, hal ini ditunjukkan dengan adanya *cracking* pada kedua emulsi vaksin.

### Evaluasi Respon Immune Menggunakan Uji HI

#### *Monitoring respon imun terhadap virus ND*

Sampel serum ayam diambil sebelum vaksinasi dan pada minggu ke 4 paska vaksinasi. Hasil respon imun menunjukkan bahwa respon imun terhadap virus ND hasil vaksinasi menggunakan vaksin B melindungi 100% populasi ayam SAN, sedangkan hasil vaksinasi vaksin A melindungi 90% populasi ayam SAN. Hasil ini menunjukkan vaksin B lebih baik dalam memberikan perlindungan terhadap penyakit ND pada ujiantang daripada vaksin A.

### ***Monitoring respon imun terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 Tanggamus dan AI H5N1 clade 2.3.2 Semarang***

Sampel serum ayam diambil sebelum vaksinasi dan pada minggu ke 4 paska vaksinasi. Sampel serum diuji menggunakan dua antigen untuk mengetahui proteksi silang terhadap AI H5N1 clade 2.3.2 strain Semarang. Hasil uji HI menunjukkan bahwa vaksin A menimbulkan respon imun terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 Tanggamus sebesar 100% dan vaksin B menimbulkan respon imun sebesar 86,7%. Respon imun hasil vaksinasi vaksin A terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 Semarang menunjukkan perlindungan sebesar 90%, sedangkan vaksin B menghasilkan respon imun sebesar 50%. Hasil pengujian produk vaksin formula A dan formula B dapat dilihat di Tabel 2.

### **Efektivitas perlindungan dari vaksin yang disiapkan terhadap virus ND yang Virulen**

Uji tantang terhadap virus ND virulen dilakukan untuk mengevaluasi efesiensi perlindungan dari kedua kelompok vaksin, ayam kelompok A dan B ditantang dengan virus ND virulen pada minggu kedua post vaksinasi. Setelah dilakukan uji tantang virus ND virulen kelompok ayam B tidak menunjukkan tanda-tanda klinis penyakit dan tidak ada kematian setelah 14 hari pasca-tantang. Kelompok Ayam A terdapat kelainan dan kematian pada 2 ekor ayam atau 10% ayam dari total formulasi. Titer HI rata-rata untuk kelompok A adalah 4 log<sub>2</sub> setelah minggu ke-2 post tantang, sedangkan di kelompok B, titer masing-masing adalah 6,4 log<sub>2</sub>. Semua ayam kontrol yang tidak divaksinasi menunjukkan gejala yang khas tanda klinis NDV virulen post tantang.

Tabel 2 Hasil Uji Vaksin Kombinasi AI-ND LS

<b>Uji pada Vaksin</b>		<b>Vaksin A</b>	<b>Vaksin B</b>
		ND LS 17,5%, AI 232 TG 22,5%, adjuvant 60%	ND LS 15%, AI 232 15%, adjuvant 70%
<b>Uji Fisik</b>	Warna	Uniform	Uniform
	Partikel Asing	Tidak ada	Tidak ada
	Homogenitas	Homogen	Homogen
	Volum	Uniform	Uniform
<b>Uji Inaktivasi</b>		100% HA negatif	100% HA negatif

<b>Uji Sterilitas</b>		Steril	Steril
<b>Uji Stabilitas Emulsi</b>		Kurang	Kurang
<b>Uji Safety</b>		100% tidak menunjukkan gejala abnormal	100% tidak menunjukkan gejala abnormal
<b>Uji Potensi</b>	AI Subtipe H5N1 Clade 2.3.2 Tanggamus	100% (Terhadap AI clade 232 Tanggamus)	86,7% (Terhadap AI clade 232 Tanggamus)
	AI Subtipe H5N1 Clade 2.3.2 Semarang	90% (Terhadap AI clade 232 Semarang)	50% (Terhadap AI clade 232 Semarang)
	ND-LS	90% titer antibody $\leq 16$ (2 <sup>4</sup> )	100% titer antibody $\leq 16$ (2 <sup>4</sup> )

## PEMBAHASAN

*Newcastle Disease* dan *Avian Influenza* adalah dua penyakit unggas yang mematikan, yang menyebabkan kerugian ekonomi yang besar pada industri unggas. dan mengganggu ketahanan pangan. Berdasarkan data Kementerian Pertanian, Indonesia (Kepmentan, 2013). ND dan AI merupakan jenis penyakit menular strategis yang dapat mengancam dan menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar kerugian bagi peternakan unggas. Penyebaran HPAI H5N1 sudah menyebar ke seluruh dunia, pengendalian difokuskan untuk mencegah penyebaran penyakit dan mengurangi dampak ekonomi, langkah pengendalian difokuskan pada program vaksinasi. Vaksin komersial impor tidak bisa memberikan perlindungan yang maksimal dikarenakan ketidakcocokan virus yang ada dilapangan dengan virus yang ada di dalam vaksin (Kim *et al*, 2010). Vaksin kombinasi ND-AI merupakan vaksin kombinasi HPAI inaktif dan ND Lasota inaktif berbentuk emulsi air dan minyak. Vaksin kombinasi ND-AI menggunakan virus AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus dan virus ND *Lasota*. Virus ND *Lasota* digunakan karena *Lasota* dapat melindungi dari tantangan heterolog dan merupakan strain yang paling banyak digunakan di dunia terutama di Indonesia (Cornax *et al*, 2012; Ma *et al*, 2017). Isolat virus AI yang digunakan adalah Virus AI H5N1 clade 2.3.2 Tanggamus A/Chicken/Tanggamus/03.0872/2016. Virus AI H5N1 clade 2.3.2 Tanggamus merupakan virus avian influenza H5N1 pada unggas di wilayah kerja Balai Veteriner Lampung tahun 2014-2017 (Tyas, 2017).

Perhitungan *egg infectious dose 50* (EID50) yang diperoleh dari titrasi virus sebelum inaktivasi masing masing menunjukkan nilai sebagai berikut ND *lasota* adalah

$10^{9.16}$  EID<sub>50</sub>, virus AI H5N1 Tanggamus :  $10^{7.9}$  EID<sub>50</sub>. Hasil uji hemaglutinasi pada virus AI sebelum inaktif adalah 1024 atau  $2^{10}$ , setelah inaktif adalah 512 atau  $2^9$ . Pada virus ND *lasota* sebelum inaktif dan setelah inaktif menunjukkan hasil yang sama yaitu 1024 atau  $2^{10}$ . Kandeil *et al* (2017) menyatakan bahwa vaksin AI yang dihasilkan dari virus dengan titer  $10^{7.5}$  EID<sub>50</sub>/0,1 ml mampu menimbulkan titer antibody protektif dalam satu kali vaksinasi. Nilai titer virus yang digunakan pada penelitian ini sudah memenuhi syarat untuk digunakan sebagai bahan baku vaksin. Kandungan antigen menjadi faktor utama dalam menentukan efisiensi vaksin dan kemampuan untuk menghasilkan perlindungan terhadap virus, terdapat hubungan antara kandungan antigen vaksin, respons imunogenik, dan pengurangan replikasi virus saat dilakukan ujiantang virus. Kandungan antigen menentukan kemanjuran vaksin H5N1 HPAI inaktif untuk unggas, strain virus serta homologi virus memainkan peran dalam hal antigen yang diperlukan untuk keberhasilan dari proses vaksinasi (Swayne *et al.*, 2000a; Swayne *et al.*, 2000b). Derajat kekebalan dan perlindungan dari vaksin dapat diimplikasikan melalui hasil serologis. Liu *et al.* (2003) menjelaskan kematian pada ayam dapat dihindari ketika nilai titer HI hasil vaksinasi adalah 40 atau lebih dan replikasi virus dapat dicegah ketika titer HI di atas 120 (Swayne *et al.*, 2006). Telah dilaporkan terjadi kasus penularan virus H5N1 HPAI pada tingkat HI di bawah 4 (Swayne *et al.*, 2001).

Vaksinasi kombinasi AI ND menggunakan vaksin inaktif, vaksin inaktif terdiri atas virus yang dimatikan atau protein viral yang spesifik (Stauffer *et al.* 2006). Sifat virus H5N1 HPAI dan ND yang memiliki virulensi yang tinggi maka proses inaktivasi virus menjadi hal yang penting untuk menghasilkan vaksin yang aman namun tetap memiliki potensi yang tinggi. Proses inaktivasi menggunakan formalin dicapai dengan alkilasi amino dan kelompok sulfidrilat protein dan basa purin (De Benedictis *et al.*, 2007). Menurut WHO (2005) pemberian konsentrasi formalin tidak dianjurkan melebihi 0,1%. Formalin merupakan turunan aldehida, mengikat protein virus yang menghambat replikasi virus (Swayne dan Kapczynski, 2008). Senyawa ini merupakan agen cross-linking yang dapat merusak epitop virus dan dapat menyebabkan penurunan imunogenisitas yang dapat memperparah penyakit pada kondisi tertentu. Pada virus avian influenza, inaktivasi terjadi melalui degradasi RNA virus, sehingga antigenisitas dan aktivitas HA serta NA dapat dipelihara (Swayne *et al.* 2013). Möller *et al.* (2015) menyatakan bahwa inaktivasi dengan formaldehid pada suhu rendah (4 °C) sering

menyebabkan inaktivasi tidak sempurna sedangkan inaktivasi yang dilakukan pada suhu lebih tinggi (25 °C) dapat menginaktivasi virus secara menyeluruh dan lebih efisien. Hasil penelitian Möller *et al.* (2015) menunjukkan bahwa inaktivasi suspensi virus dengan menggunakan formaldehid bergantung pada suhu, waktu inkubasi, tipe virus dan faktor lain seperti konsentrasi formaldehid, pH, dan sebagainya. Aktivitas inaktivasi oleh formaldehid dapat dibagi dua, yaitu aktivitas terhadap protein di permukaan partikel virus dan aktivitas terhadap asam nukleat virus.

. Vaksin kombinasi AI ND adalah vaksin emulsi air dan minyak (*water in oil*). Emulsi merupakan suatu system yang tidak stabil dalam emulsi, tegangan antar muka mempengaruhi terjadinya emulsi. Semakin kecil tegangan antar muka, emulsi yang terbentuk akan semakin stabil. Naiknya suhu secara linier akan menurunkan tegangan permukaan. Kerusakan pada sediaan emulsi biasanya ditandai terbentuknya *flokulasi*, *creaming*, *koalesen* dan *demulsifikasi* (Foudazi *et al.*, 2015). Hasil uji stabilitas vaksin kombinasi AI ND menunjukkan emulsi vaksin kurang stabil dengan adanya *cracking*/tidak homogen setelah disimpan pada suhu 37°C selama 14 hari. *Cracking* adalah terjadinya pemisahan fase air dan minyak yang merupakan suatu bentuk kerusakan yang dapat diakibatkan oleh kurangnya surfaktan/minyak yang digunakan, sehingga lapisan pelindung pada permukaan tetesan lemah. Tetesan tersebut akan berfusi (bergabung) membentuk suatu tetesan yang berdiameter lebih besar. Kerusakan ini bersifat *irreversibel*. Stabilitas vaksin adalah salah satu parameter terpenting, karena memiliki arah langsung efek pada keamanan dan kemanjuran (Foudazi *et al.*, 2015). Emulsi *water in oil* (W/O) akan mempertahankan keberadaan antigen di dalam minyak kecuali emulsi pecah. Pada emulsi W/O, antigen masih terperangkap dalam tetesan air dan sifat-sifatnya emulsi dipertahankan. Stabilitas pada 37°C juga memberikan informasi tentang perilaku emulsi setelah injeksi (Aucouturier *et al.*, 2001).. Emulsi dianggap tidak stabil ketika tidak ada penggabungan tetesan pada uji stabilitas di air sesaat setelah selesai dilakukan formulasi vaksin (Lyssant, 1984)

Adjuvant yang digunakan pada penelitian ini adalah Montanide (*Seppic Adjuvant Incomplete*) ISA 70, adalah bahan pembantu minyak non mineral yang terdiri dari minyak tanaman dan pengemulsi halus dari keluarga monooleat manida. Pada penelitian sebelumnya vaksin formulasi dengan Montanide menginduksi kekebalan yang kuat dalam jangka waktu yang lama. Emulsi yang dihasilkan bersifat stabil dan

mudah disuntikkan memiliki kapasitas imunopotensiasi tinggi dan menunjukkan efek samping yang lebih rendah (Aucouturier *et al.*, 2001, 2002; Toledo *et al.*, 2001). Vaksin yang efektif tidak hanya membutuhkan antigen yang baik tetapi juga adjuvant yang lebih disukai untuk ditingkatkan imunogenisitas antigen. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa vaksin inaktif emulsi air-dalam-minyak mampu menginduksi respon imun terhadap melindungi unggas (Kilany *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017). Adjuvan yang digunakan pada penelitian ini sebelumnya disimpan pada botol kaca selama satu bulan. Minyak yang berasal dari tanaman atau *natural oil* dapat rusak karena reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi pada minyak tanaman dimulai dengan adanya pembentukan radikal bebas yang dipercepat oleh cahaya, panas, logam (besi dan tembaga), dan senyawa oksidator pada bahan pangan yang digoreng (seperti klorofil, hemoglobin, dan pewarna sintetik tertentu). Faktor lain yang mempengaruhi laju oksidasi adalah jumlah oksigen, derajat ketidakjenuhan asam lemak dalam minyak, dan adanya antioksidan, reaksi ini akan menurunkan mutu minyak pada adjuvant (Rorong *et al.*, 2008).

Hasil uji potensi terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus menurut ketentuan FOHI memenuhi syarat apabila menghasilkan titer  $> 2^4$  dengan perlindungan 80% terhadap populasi hewan uji. Vaksin a dan vaksin B memenuhi syarat FOHI, namun vaksin A menghasilkan perlindungan lebih baik yaitu 100%. Terdapat proteksi silang dari vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 strain Semarang, hasil uji vaksin A cukup baik karena dapat memberikan perlindungan 90% pada populasi ayam SAN. Nilai antibodi terhadap AI H5N1 clade 2.3.2 strain Semarang ini dapat disebabkan karena adanya reaksi cross protection dari antibodi yang diinduksi vaksin AI dari galur yang heterolog. Keterpaparan ayam terhadap agen infeksi virus AI subtipe H5N1 clade 2.3.2 di peternakan juga dapat terjadi secara alami yang berasal dari lingkungan (Kusumastuti *et al.*, 2015).

Hasil uji tantang terhadap virus ND baik vaksin A dan B menunjukkan hasil yang baik dan lulus menurut ketentuan FOHI yaitu protektifitas  $> 90\%$ . Hasil uji Potensi Alan *et al* (1978) melaporkan 100% kematian karena tantangan dengan virus ND yang ganas ketika titer HI adalah 2 log<sub>2</sub> atau kurang. Sebaliknya tidak ada kematian ketika titer antibodi HI unggas antara 4 log<sub>2</sub> dan 6 log<sub>2</sub> dengan rata-rata titer antibodi HI 5,2 log<sub>2</sub>. Kedua kandidat vaksin bivalen yang telah disiapkan aman untuk vaksinasi

pada ayam dan keduanya mampu menginduksi respon imun terhadap virus ND dan AI H5N1 TG, tetapi vaksin bivalen A yang mengandung formula ND LS 17,5%, AI 232 TG 22,5%, adjuvant 60% Montanide ISA70 memberikan respon imun yang lebih baik dan lebih tinggi dibandingkan dengan vaksin bivalen B. Penelitian Cahyani *et al.*, (2020) menunjukkan vaksin bivalen yang menggunakan Montanide ISA 70 menunjukkan hasil yang baik terutama uji stabilitas fisik bahwa tidak satu pun dari kedua vaksin bivalen yang diuji menunjukkan kerusakan emulsi setelah pengujian.

### KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian pembuatan dan pengujian vaksin bivalen kombinasi AI ND formula A lebih baik daripada vaksin formula B, namun kedua vaksin belum memenuhi standar FOHI karena hasil uji stabilitas belum memenuhi syarat. Proses formulasi dan penyimpanan adjuvant selanjutnya perlu diperbaiki dan diperhatikan agar menghasilkan vaksin yang stabil.

### DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J. 2001. Newcastle disease. *British Poult Sci.* 42: 5 – 22.
- Aucouturier J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V. 2002. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1:111–118
- Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19:2666–2672
- Balai Veteriner. 2019. *Laporan Kejadian Newcastle Disease 5 tahun Terakhir di Sumatra*. Balai Veteriner Lampung, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian, Indonesia.
- Cahyani JI, Widyarini S, Wibowo MH. 2020. Comparative safety and efficacy of two bivalent vaccines containing Newcastle disease LaSota and avian influenza H9N2 Sidrap isolate formulated with different oil adjuvants, *Veterinary World*, 13(11): 2493-2501.
- Comax I , Miller PJ, Afonso, C.L. (2012) Characterization of live LaSota vaccine strain-induced protection in chickens upon early challenge with a virulent Newcastle disease virus of heterologous genotype. *Avian Dis.*, 56(3): 464-470.
- Damayanti, R. Wiyono, A. Nuradji, H. Cahyono, MI. 2016. The pathogenicity of H5N1 highly pathogenic Avian Influenza (HPAI) virus *clade* 2.3.2 in Indonesia indigenous chicken by contact transmission with infected duck. *JITAA* 42.2.72-80.doi:10.14710
- De Benedictis, P., Beato, M.S., Capua, I., 2007. Inactivation of avian influenza viruses by chemical agents and physical conditions: a review. *Zoonoses Public Health*: 54, 51–68.

- Dharmayanti, IRNLP. 2014. Prototipe Virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 Sebagai Kandidat Vaksin AI Subtipe H5N1 *Clade* 2.3.2 pada itik lokal. *BBLitVet Master JITV*
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2007. *Farmakope Obat Hewan Indonesia* Jilid I Edisi 3 [FOHI]. Kementerian Pertanian Republik Indonesia: Jakarta
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018. *Farmakope Obat Hewan Indonesia* Jilid I Edisi 5 [FOHI]. Kementerian Pertanian Republik Indonesia: Jakarta
- Foudazi, S. Qavi, I. Masalova, A.Y. Malkin, Physical chemistry of highly concentrated emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 220 (2015) 78–91.
- Kandeil A, Mostafa A, El-Shesheny R, Nageh A, Gomaa M, Gala H, Kayali G, Ali MA. 2017. Avian Influenza H5N1 Vaccination Efficacy In Egyptian Backyard Poultry. *Vaccine.* 2017: 35 – 45: 6195-6201.
- Kencana, G.A.Y, Suartha, I.N., Paramita, N.M.A. and Handayani, A.N. (2017) Vaksin kombinasi Newcastle disease dengan Avian influenza memicu imunitas protektif pada ayam petelur terhadap penyakit tetelo dan flu burung [Combined Newcastle disease (ND) and Avian influenza (AI) vaccines induce protective immune response in commercial broiler]. *J. Vet.*, 17(2): 257-264.
- Keputusan Menteri Pertanian. 2013. Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) No: 4026/kpts/ OT.140/4/2013. Kementerian Pertanian, Indonesia.
- Keputusan Menteri Pertanian. 2013. *Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS)* No: 4026/kpts/ OT.140/4/2013. Kementerian Pertanian, Indonesia.
- Kilany, W.H., Bazid, A.I., Ali, A., El-deeb, A.H., El-Abideen, M.A.Z., El Sayed, M. and El-kady, M. (2016) Comparative effectiveness of two oil adjuvant inactivated Avian influenza H9N2 vaccines. *Avian Dis.*, 60(1 Suppl): 226-231.
- Kim JK, Kayali G, Walker D, Forrest HL, Ellebedy AH, Griffin YS, Aldridge JR. 2010. Puzzling inefficiency of H5N1 influenza vaccines in Egyptian poultry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 11044-11049.
- Kusumastuti Aprilia 1, Syamsidar1, Agustin Zaharia Paderi1, Arini Nurhandayani1, Gusti Ayu Yuniati Kencana. 2015. Identifikasi Secara Serologi Galur Virus Flu Burung Subtipe H5N1 *Clade* 2.1.3 dan *Clade* 2.3.2 pada Ayam Petelur. *Jurnal Veteriner.* Vol. 16 No. 3 : 371-38
- Lamb RA, Krug RM. 2001. Orthomyxoviridae: The Virus and Their Replication. In: *Fields Virology*, ed. Knipe DM, Howley PM, fourth edition. pp. 1487-1532. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins Publisher
- Lee CW, Suarez DL. 2005. Avian influenza virus prospects for prevention and control by vaccination. *Anim Health Res Rev.* 6:1-15doi:10.1079/ahr2005101.
- Lissant KJL.1984. Emulsions and emulsion technology, part III. Kenneth J Lissant editor. *Surfact. Sci. Series* 6, 206–210 (1984)
- Ma, J., Lee, J., Liu, H., Mena, I., Davis, A.S., Sunwoo, S.Y., Lang, Y., Duff, M., Morozov, I., Li, Y., Yang, J., Garcia- Sastre, A., Richt, J.A. and Ma, W. (2017) Newcastle disease virus-based H5 influenza vaccine protects chickens from lethal challenge with a highly pathogenic H5N2 Avian influenza virus. *NPJ Vaccines*, 2:33.

- Maas R, Tacken M, van Zoelen D, Oei H (2009) Dose response effects of avian influenza (H7N7) vaccination of chickens: serology, clinical protection and reduction of virus excretion. *Vaccine* 27: 3592-3597.
- MAYO, M.A. 2002a. Virus Taxonomy-Houston. *Arch. Virol.* 147: 1071 – 1079.
- Möller L, Schünadel L, Nitsche A, Schwebke I, Hanisch M, Lauel M. 2015. Evaluation of virus inactivation by formaldehyde to enhance biosafety of diagnostic electron microscopy. *Viruses*. 7(2):666–679.
- Moomivand, H., Bassami, M.R., Faramarzi, S., Stabraghil, E., Ghaedi, A., Ghabel, H., Zarghami, A. and Banaei, M. (2013) Serological and clinical survey of Newcastle disease in broiler chickens of East Azarbayjan by HI tests. *Eur. J. Exp. Biol.*, 3(6): 311-314.
- OIE. 2000. Newcastle disease. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th Edition*. World Organization for Animal Health, Paris, France. pp. 221 – 232.
- OIE. 2018. Avian Influenza (infection with avian influenza viruses). *OIE Terrestrial Manual 2018*.
- Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM. 2018. *Plotkin's Vaccines*. 7th edition; Philadelphia.
- Pfeiffer, J., M. Pantin-Jackwood, T.L. To, T. Nguyen, and D.L. Suarez. 2009. Phylogenetic and biological characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses (Vietnam 2005) in chickens and ducks. *Virus Research*. 142:108-120.
- Rorong J, Henry Aritonang1 dan Ferdinan P Ranti. 2008. Sintesis metil ester asam lemak dari minyak kelapa hasil pemanasan. *Chem. Prog.* Vol. 1, No. 1, 2008.
- Saliu, O.J., Sanda, M.E. and Audu, S.I. (2009) Adoption of vaccination against Newcastle disease by rural poultry women farmers in the North Central Zone of Nigeria. *Int. J. Poult. Sci.*, 8(5): 500-503.
- Stauffer F, El-Bacha T, Da Poian AT. 2006. Advances in the development of inactivated virus vaccines. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 1(3):291-296.
- Swayne DE, Beck JR, Perdue ML, Beard CW. 2001. Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza. *Avian Disease* 45: 355-365.
- Swayne DE, Garcia M, Beck JR, Kinney N, Suarez DL. 2000. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine* 18: 1088-1095.
- Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suaarez, Nair V. 2013. *Diseases of Poultry 13th ed.* Iowa (US): Wiley-Blackwell. hlm 106,188.
- Swayne DE, Lee CW, Spackman E. 2006. Inactivated North American and European H5N2 avian influenza virus vaccines protect chickens from Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathology* 35: 141-146.
- Swayne DE, Perdue ML, Beck JR, Garcia M, Suarez DL (2000b) Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years. *Veterinary microbiology* 74: 165-172.
- Swayne DE, Suarez DL, Spackman E, Jadhao S, Dauphin G, Kim- Torchetti M, McGrane J, Weaver J, Daniels P, Wong F, Selleck P, Wiyono A, Indriani R, Yupiana Y, Sawitri Siregar E, Prajitno T, Smith D, Fouchier R (2015) Antibody

- Titer Has Positive Predictive Value for Vaccine Protection against Challenge with Natural Antigenic-Drift Variants of H5N1 High-Pathogenicity Avian Influenza Viruses from Indonesia. *Journal of Virology* 89: 3746–3762.
- Swayne DE, Suarez DL. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *J Rev Sci Tech* .19: 463–482.
- Swayne, D.E., Kapczynski, D.R., 2008. *Vaccines, vaccination, and immunology for avian influenza viruses in poultry*. In: Swayne, D.E. (Ed.), *Avian Influenza*. Black-well Publishing, Oxford; USA, pp. 407–452.
- Toledo H, Baly A, Castro O, Resik S, Laferte J, Rolo F et al. 2001. A phase I clinical trial of a multi-epitope polypeptide TAB 9 combined with Montanide ISA720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers. *Vaccine*. 19:4328–4336
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., et al., 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9, e1003657
- Tuscany N. 2016. Evaluasi keberadaan antibodi asal induk terhadap virus *avian influenza* dan *infectious bursal disease* pada ayam broiler [skripsi]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Tyas ASW, Wuryastuti H, Warsito, R. 2017. Karakterisasi Gen Hemagglutinin Virus Avian Influenza H5n1 Pada Unggas Di Wilayah Kerja Balai Veteriner Lampung Tahun 2014-2017. *Thesis*. Yogyakarta.id
- WHO. 2005. *Avian Influenza : Assessing the pandemic threat*. WHO/CDS/2005.29
- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti NLP I, Irianingsih SH, Miswati Y, A Rohmah, Andesyha E, Romlah, Daulay RSD, Safitria K. 2012. Investigasi wabah penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta dan Jawa Timur: Identifikasi sebuah *clade* baru virus avian influenza subtype H5N1 di Indonesia. *Buletin Laboratorium Veteriner*. 12:2-8.
- Wibowo, M.H., Susetya, H., Untari, T., Putri, K., Tabbu, C.R. and Asmara, W. (2006) Molecular study on the pathogenicity of Avian influenza virus. *Indones. J. Biotechnol.*, 11(2): 901-907.
- Wiyono, A., R. Indriani, N. Dharmayanti, R.Damayanti, L. Parede and T. Syafriati. 2004. Isolasi Dan Karakterisasi Virus Highly Pathogenic Avian Influenza Subtipe H5 Dari Ayam Asal Wabah Di Indonesia (Isolation And Characterization Of Virus Of Highly Pathogenic Avian Influenza H5 Subtype Of Chicken From Outbreaks In Indonesia). *JITV* 9: 2004
- Zhao, J., Yang, H., Xu, H., Ma, Z. and Zhang, G. (2017) Efficacy of an inactivated bivalent vaccine against the prevalent strains of Newcastle disease and H9N2 Avian influenza. *Virol. J.*, 14(1): 56.

**VALIDASI PENGUJIAN KIT DIAGNOSTIK SEBAGAI TUGAS BBVF  
PUSVETMA SEBAGAI LABORATORIUM RUJUKAN PENYAKIT MULUT  
DAN KUKU DI INDONESIA**

Dewi Noor Hidayati<sup>12</sup>

<sup>1</sup>Medik Veteriner Muda; <sup>2</sup>Sub Koordinator Kelompok Pengembangan Produk BBVF  
PUSVETMA

**ABSTRAK**

Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) merupakan salah satu penyakit strategis pada hewan yang paling merugikan karena daya infeksi yang tinggi. Penyakit ini menjadi salah satu fokus pemerintah dalam melakukan program pengendalian dan pencegahan penyakit. Strategi pengendalian dan pencegahan PMK di Indonesia salah satunya adalah deteksi dan diagnose penyakit dengan secara benar, tepat serta cepat. Masuknya kit diagnostik untuk pengujian PMK dari luar negeri membutuhkan validasi pengujian yang dapat dilakukan oleh laboratorium terakreditasi dan memiliki kapasitas yang sesuai standar dari World Organization of Animal Health (WOAH). Validasi pengujian dilakukan untuk melihat karakteristik dan parameter tertentu dari sebuah kit dapat menghasilkan pengukuran yang sesuai dengan standar. BBVF PUSVETMA sebagai laboratorium rujukan nasional untuk PMK telah melakukan validasi pengujian kit diagnostik ini sesuai standar dan panduan dari WOAH Terrestrial Manual Chapter 1.1.6 (2023).

Kata Kunci: *Uji validasi, ELISA, kit pcr, pmk*

## I. PENDAHULUAN

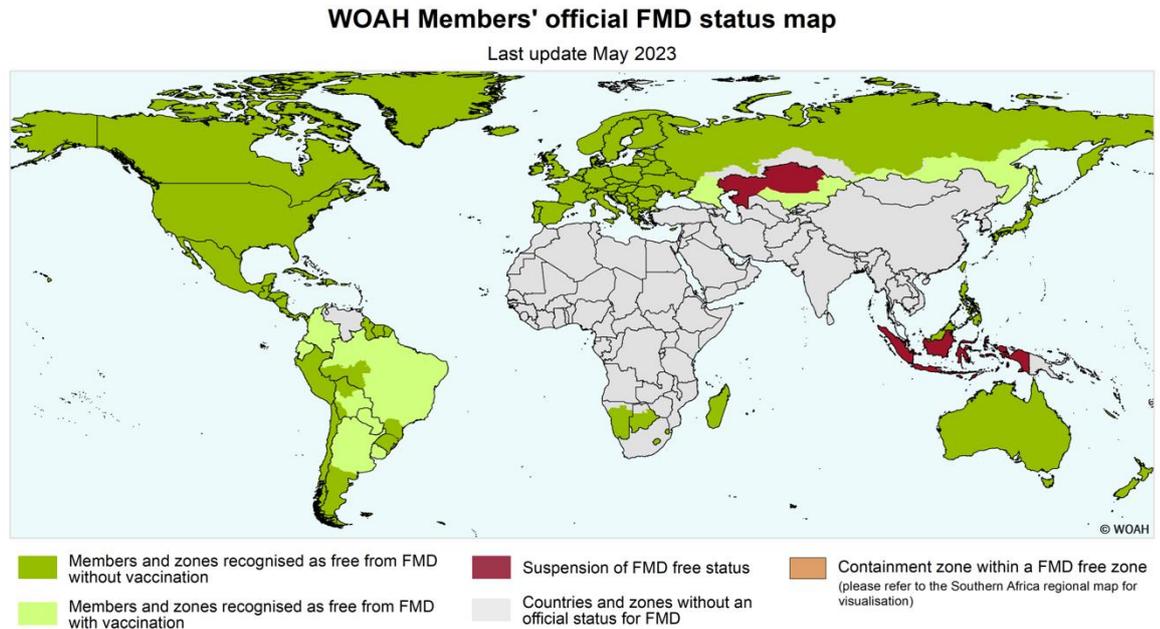
Balai Besar Veteriner Farma PUSVETMA (BBVF PUSVETMA) merupakan laboratorium nasional rujukan untuk Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) di Indonesia yang ditetapkan melalui Peraturan Menteri Pertanian No 12 Tahun 2023. Masuknya PMK ke Indonesia pada pertengahan tahun 2022 selain memberikan dampak negatif pada status kesehatan ternak Indonesia namun juga berdampak positif untuk industri perdagangan yaitu membuka kran importasi untuk masuknya kit-kit diagnostik pengujian PMK, baik untuk uji serologis, uji virologis, dan deteksi asam nukleotida menggunakan uji biomolekuler.

Fungsi Laboratorium rujukan nasional antara lain adalah sebagai *confirmatory assay laboratory*, dan *collaborative laboratory* untuk uji bersama, uji banding dan harmonisasi laboratorium (Donaldson, 1993). Laboratorium rujukan nasional harus memiliki kemampuan dan kapasitas untuk menyediakan standar uji seperti serum referensi untuk uji serologis, virus referensi sebagai virus kontrol untuk pengujian virologi yang dapat digunakan secara nasional. Laboratorium rujukan nasional juga harus memiliki kompetensi dan kapasitas infrastruktur yang terstandarisasi. *World Organization of Animal Health* (WOAH) sebagai organisasi induk untuk organisasi Kesehatan Hewan seluruh dunia mengatur dan menetapkan prinsip dan panduan serta standar yang harus dapat dipenuhi untuk pengujian penyakit PMK menggunakan alat uji atau kit diagnostik. Hal ini bertujuan supaya hasil uji yang didapatkan terpercaya dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) merupakan salah satu penyakit infeksius bagi ternak yang paling ditakuti di seluruh dunia, karena menyebabkan kerugian sangat besar di sektor peternakan. Penyakit ini dapat menyerang ternak seperti sapi, kambing, domba, babi dan ruminansia berkuku belah lainnya. Status Indonesia sebagai negara bebas PMK sejak tahun 1990 hingga di tahun 2021, berubah menjadi “suspension of an FMD free country where vaccination

is not practiced” atau negara yang ditangguhkan status bebasnya sejak pertengahan tahun 2022 (Bulletin WOA, 2022). Peta status PMK negara Indonesia saat ini tersaji pada Gambar 1 dibawah ini.



Gambar. 1 Peta dunia terkini untuk situasi penyakit PMK di dunia. Indonesia berstatus ditangguhkan.

Pengendalian PMK yang baik sangat erat kaitannya dengan proses pengujian yang tepat, akurat dan dapat dipertanggungjawabkan berdasarkan landasan teori uji yang benar. Pengujian PMK dapat meliputi uji serologik yaitu ELISA maupun uji untuk mendeteksi antigen seperti real-time PCR, PCR konvensional, hingga sekuensing. Pengujian PMK dengan alat uji tertentu dapat memiliki beberapa fungsi. Fungsi alat uji ini memiliki spesifikasi parameter tertentu yang harus divalidasi (Tabel.1)

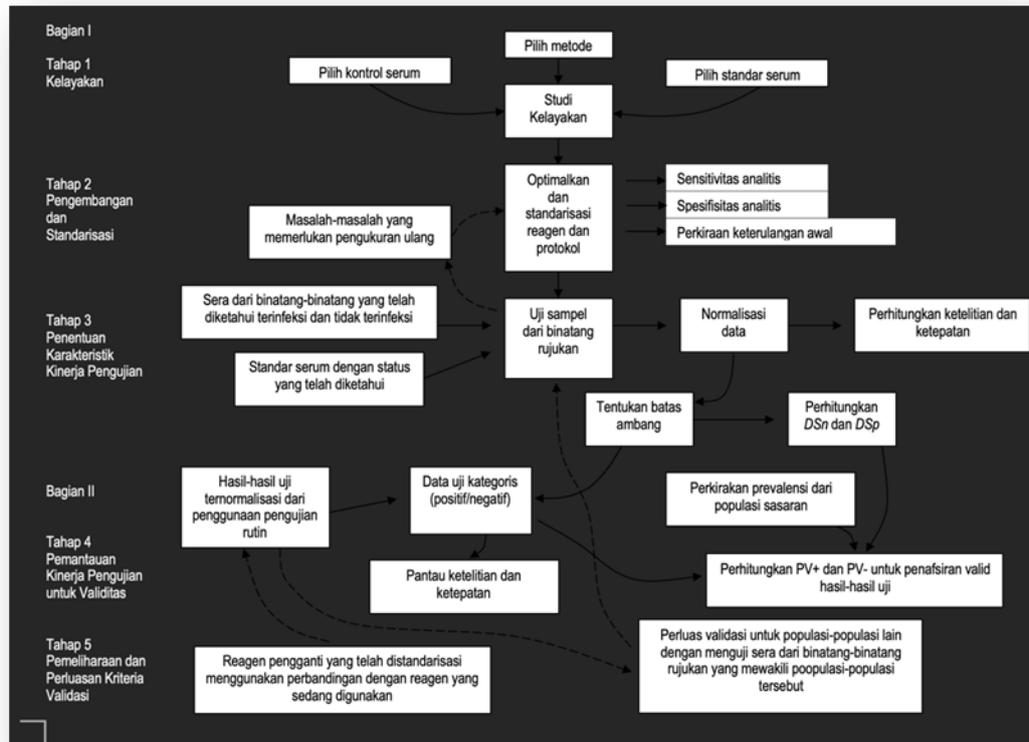
Tabel 1. Macam uji dan pengukuran parameter yang membutuhkan validasi

Tujuan uji	Parameter pengukuran yang dibutuhkan
1a) Untuk pembebasan secara historis (dengan atau tanpa vaksinasi)	Daerah yang bebas secara historis dianggap memiliki prevalensi = 0 atau mendekati 0. Uji untuk kasus ini membutuhkan nilai Diagnostic Specificity (DSp) yang tinggi, nilai (PV+) tinggi, dan (LR+) tinggi sehingga parameter uji yang harus diukur adalah nilai DSp secara berseri.

1b) Pengakuan kembali status bebas setelah <i>outbreak</i>	Selama program pengendalian, dianggap terjadi penurunan prevalensi penyakit secara bertahap, yaitu dari tinggi (pada saat <i>outbreak</i> ) hingga rendah atau bebas ( <i>outbreak</i> berakhir). Pada tahap awal pembuktian bebas, uji membutuhkan nilai DSe tinggi, (PV-) tinggi dan (LR-) tinggi, hal ini ditujukan untuk meminimalkan hasil yang “negatif palsu” dan memberi kepastian individu yang positif. Oleh karena itu parameter yang harus diukur adalah nilai DSe. Sedangkan pada saat tahap akhir program pengendalian (dimana dianggap hewan yang positif tidak ada, dan prevalensi penyakit sangat rendah  ) , pembuktian status bebas membutuhkan parameter nilai DS <sub>p</sub> yang tinggi, (PV+) tinggi dan (LR+) tinggi.
2) Menyatakan status bebas infeksi / bebas agen penyakit pada ternak (individual) atau produk untuk kepentingan perdagangan / lalu lintas	Untuk tujuan lalu lintas dan perdagangan, probabilitas “negatif palsu” harus diperkecil, dan sebaliknya dibutuhkan nilai DSe tinggi, (PV-) tinggi dan (LR-) tinggi, karena kemungkinan bahwa ternak yang dilalulintaskan (secara individu ini) dapat sakit dan menyebarkan penyakit ke populasi hewan sehat. Pengukuran parameter dapat dilakukan dengan menguji nilai DSe tinggi secara paralel.
3) Eradikasi / eliminasi penyakit pada populasi target	Sama dengan parameter untuk 1b, dimana prevalensi yang diharapkan menurun secara bertahap.
4) Konfirmasi diagnosis pada sampel suspek (termasuk konfirmasi hasil positif dari hasil <i>screening test</i> )	Tujuan uji konfirmasi adalah untuk meminimalkan kemungkinan “positif palsu”.  <b>-Untuk konfirmasi kasus klinis:</b>  uji harus memiliki nilai DS <sub>p</sub> tinggi, (PV+) tinggi dan (LR+) tinggi. Karena sudah terlihat manifestasi klinis dan kemungkinan jumlah pathogen yang tinggi, sehingga nilai DSe tidak banyak mempengaruhi.  <b>-Untuk konfirmasi kasus positif (hasil uji screening):</b>  Uji screening biasanya diaplikasikan pada populasi sehat, sehingga biasanya memiliki nilai DSe tinggi, untuk memastikan individu ternak sakit terdeteksi. Oleh karena itu uji konfirmasi dengan nilai DS <sub>p</sub> tinggi diperlukan untuk memastikan bahwa hewan tersebut benar-benar positif. Parameter yang dibutuhkan untuk uji konfirmasi ini adalah nilai DS <sub>p</sub> tinggi, (PV+) tinggi dan nilai LR+ tinggi. Pendekatan ini membutuhkan uji secara seri.
5) Estimasi prevalensi penyakit / infeksi untuk kepentingan analisis resiko	Untuk kepentingan memperkirakan para epidemiolog membutuhkan nilai keakuratan uji untuk dapat menentukan desain sampling untuk tujuan survei, kajian prevalensi, dan pengukuran penyakit. Penggunaan <i>screening test</i> dengan nilai DSe tinggi dan dilanjutkan dengan uji konfirmasi yang memiliki nilai DS <sub>p</sub> tinggi dapat digunakan untuk memperkirakan prevalensi penyakit.
6) Penentuan status imun:  a) pada hewan secara individual pasca vaksinasi  b) memperkirakan sero-prevalensi pasca vaksinasi suatu populasi (misalnya untuk penelitian dan monitoring efikasi vaksin)	Parameter yang dibutuhkan adalah nilai DS <sub>p</sub> tinggi, (PV+) tinggi dan (LR+) tinggi. Uji yang memiliki nilai “positif palsu”, karena dapat menyebabkan konsekuensi fatal, yaitu menyatakan bahwa hewan / ternak tersebut tidak protektif. Keakuratan untuk uji ini harus tinggi sehingga mendapatkan perkiraan yang tepat pada hasil monitoring pasca vaksinasi.  Contoh uji ini adalah uji Fluorescent Antibody Virus Neutralisation (FAVN) untuk menguji status imun pasca vaksinasi. Nilai uji >0.5 IU/ml dapat dianggap protektif.

Ket. DSe : Diagnostic Sensitivity                      PV : predictive value  
      DSp : Diagnostic Specificity                     LR : likelihood ratio

WOAH telah memberikan panduan untuk melakukan validasi baik metode maupun validasi alat uji / kit diagnostik, yaitu tercantum pada Chapter 1.1.6 dalam panduan Manual Terrestrial Code 2023. Menurut panduan tersebut, validasi merupakan serangkaian proses untuk menentukan kesesuaian alat uji kit diagnostik yang telah dikembangkan, dioptimasi dan distandarisasi untuk memberikan hasil uji sesuai dengan kegunaannya / purpose (WOAH, 2023). Validasi tidak hanya dilakukan dan dibatasi pada saat optimalisasi awal faktor intrinsik secara eksperimental, namun validasi pengukuran pada saat pengujian berlangsung pada populasi juga harus dilakukan (Jacobson, 1998). Menurut Jacobson, untuk pengujian serologis, validasi pengujian memiliki dua bagian, bagian pertama adalah penentuan parameter dan karakteristik uji melalui pengembangan pengujian, optimasi dan standarisasi reagen dan protokol. Bagian kedua adalah validasi untuk memastikan validitas konstan hasil-hasil uji dan untuk evaluasi dalam rangka memperbaiki kriteria validasi pengujian. Lebih jelas, bagan pada Gambar 2 menggambarkan hal ini.



Gambar. 2 Bagian-bagian proses validasi pengujian

Validasi merupakan proses terus menerus untuk melihat bahwa hasil uji akurat (accurate), tepat (precise) dan lolos verifikasi (verified) secara statistik (Jacobson, 1998). Ketepatan uji (precision assay) dapat dihitung dari keterulangan (repeatability) dan reproduksibilitas (reproducibility) uji. Ketepatan uji (precises assay) menunjukkan sebaran hasil dari sampel yang dilakukan berulang kali. Semakin kecil sebaran, maka uji tersebut semakin tepat (precise). Sedangkan akurasi (accurate assay) adalah nilai yang menunjukkan kesesuaian pengukuran hasil uji dengan pengukuran nilai standar. Uji yang akurat akan memiliki bias dan random error yang kecil. Sebuah uji bisa jadi tepat (precise) tapi tidak akurat jika hasil uji tidak sesuai dengan nilai standar yang diperkirakan. Sebaliknya uji bisa akurat namun tidak tepat bila variasi / simpangan uji besar.

Dalam hal importasi kit ELISA PMK, BBFV PUSVETMA melakukan fungsi validasi khususnya untuk bagian kedua, yaitu tahap pemantauan ketelitian dan ketepatan hasil uji kit. Kapasitas PUSVETMA yang telah memiliki

kemampuan uji yang terstandarisasi oleh laboratorium rujukan dunia serta ketersediaan koleksi sampel yang mewakili sampel lapang di seluruh wilayah Indonesia membuat PUSVETMA layak dijadikan rujukan untuk melakukan validasi alat / kit diagnostik.

### III. MATERI METODE

#### Penentuan jenis sampel

Sampel uji yang digunakan adalah serum yang diambil dari beberapa spesies hewan yang berbeda-beda baik jenis, ras, status vaksinasi dan lokasinya. Sampel mewakili hewan dengan ambang antibodi tinggi, sedang, lemah, dan negatif. Kontrol serum menggunakan serum positif kuat, positif lemah, dan serum kontrol negatif.

#### Penentuan jumlah sampel

Jumlah sampel untuk melakukan validasi pengukuran alat uji disesuaikan dengan rumus uji :

$$n = \frac{(DSn)(1 - DSn)(c)^2}{e^2}$$

n = jumlah sampel

DSn = asumsi nilai diagnostik sensitifitas / diagnostik spesifisitas

e = persentase kesalahan (ditulis dengan angka desimal)

c = interval kepercayaan

#### Penentuan parameter uji

Parameter uji validasi kit serologis meliputi penentuan nilai Sensitivitas diagnostik (DSe), Spesifisitas diagnostik (DSp), dan keterulangan (Repeatability), dan reproduksibilitas (Reproducibility).

## HASIL

Berdasarkan metode uji validasi dalam panduan WOAHA, nilai DSe dan DS<sub>p</sub> dapat dihitung dengan tabel 2X2 sebagaimana dapat terlihat pada Gambar 3. Nilai DSe dan DS<sub>p</sub> tergantung pada karakterisasi sampel populasi yang dijadikan rujukan. Beberapa kit akan menunjukkan relevansi yang kecil dengan sampel populasi rujukan, karena bisa jadi adanya perbedaan karakterisasi pada populasi. Sehingga nilai DSe dan DS<sub>p</sub> ini tidak menggambarkan baik atau buruknya kit, namun hanya menggambarkan seberapa relevan kit diagnostik tersebut dapat digunakan untuk mengukur sampel pada populasi yang ada.

		Target population		
		Infected	Uninfected	
Test result	Positive	True positive (TP) A	False positive (FP) B	$PV+ = \frac{A}{A+B}$
	Negative	False negative (FN) C	True negative (TN) D	$PV- = \frac{D}{C+D}$
		$DSn = \frac{A}{A+C}$	$DSp = \frac{D}{B+D}$	

Gambar 3. Perhitungan nilai DSe dan DS<sub>p</sub> menggunakan Table 2X2 untuk menghubungkan status infeksi dengan hasil uji.

Beberapa validasi kit diagnostik yang pernah dilakukan oleh BBVF PUSVETMA tersaji pada tabel berikut:

NO	NAMA PRODUK	PRODUSEN	DISTRIBUTOR / AGEN
1	Kit ELISA IDEXX FMD 3 ABC	IDEXX	PT Elokarsa
2	FMDV Antigen Detection ELISA Kits	IZSLER	PT Elokarsa
3	FMD Serotype O Antibody Test	Ring Bio NBGEN	PT Genecraft Labs

4	FMD Serotype A Antibody Test	Ring Bio NBGEN	PT Genecraft Labs
5	FMD Serotype 3 ABC NSP Antibody Test	Ring Bio NBGEN	PT Genecraft Labs
6	VDPro®FMDV Type O ELISA	Median Diagnostic	PT Genecraft Labs
7	VDPro®FMDV Type A ELISA	Median Diagnostic	PT Genecraft Labs
8	VDPro®FMDV NSP AB ELISA	Median Diagnostic	PT Genecraft Labs
9	FMDV Multiplex RT-qPCR Kit	Nusantics	PT Nusantara Butuh Diagnostik

#### IV. PENUTUP

Pusvetma memiliki kemampuan untuk melakukan validasi kit diagnostik serologis seperti ELISA, kit diagnostik biomolekuler yaitu real-time PCR PMK karena Pusvetma memiliki kapasitas laboratorium dalam untuk melakukan pengujian validasi tersebut berdasarkan referensi WOAHA.

#### V. REFERENSI

WOAH (*World Organization Animal Health*), Bulletin 2022-2, *access link*: [bulletin.woah.org](http://bulletin.woah.org).

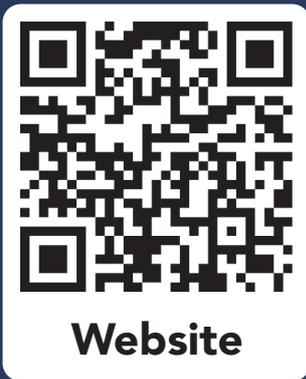
WOAH, Terrestrial Manual Code Chapter 1.1.6. Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assay for Infectious Disease, 2023.

Donaldson, A.I. Role of Reference Laboratory In Diagnosis and Epidemiology of Foot and Mouth Disease in Southeast Asia, Proceeding of an International workshop held in Lampang, Thailand, September 6-9, 1993. P. 100.

Jacobson, R.H., Validation of Serological Assay for diagnosis of Infectious Disease. 1998. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz, 17 (2).

# SCAN ME

## Link Media Sosial Pusvetma



## Link Publikasi Jurnal Pusvetma

