

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

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

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



Suscribe Now!
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 Penanggungjawab

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, pusvetma.kementan@yahoo.com

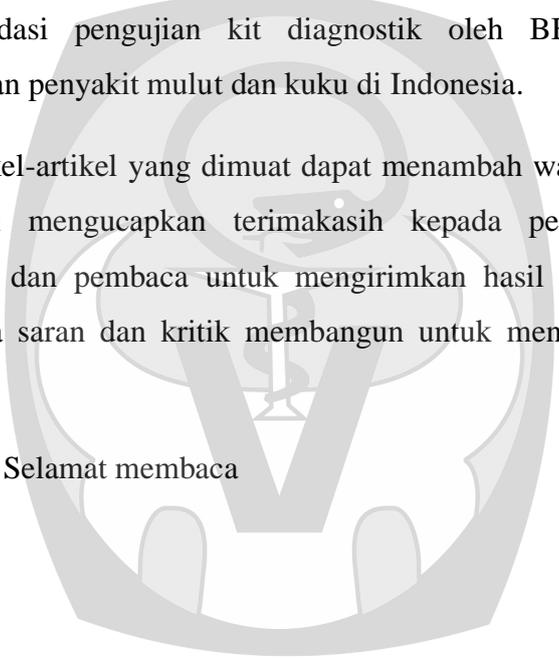
Website : pusvetma.ditjennak.pertanian.go.id

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 afluwet kombinasi *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H₅N₁ strain Tanggamus dan ND Lasota, dan Validasi pengujian kit diagnostik oleh 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



BBVF PUSVETMA

DAFTAR ISI

Pembuatan Antigen Rabies untuk Kit ELISA Rabies Tahun 2020 - 2022.....	1
Pengembangan Metode Inaktifasi Antigen Rabies Dengan Cara Pemanasan untuk Optimasi Kit ELISA Rabies Pusvetma.....	10
Pengembangan Produksi Vaksin Avian Influenza Bivalen HPAI H ₅ N ₁ dan LPAI H ₉ N ₂	20
Pengkajian Pembuatan Vaksin Afluvet Kombinasi <i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i> (HPAI) H ₅ N ₁ Strain Tanggamus dan <i>ND</i> Lasota.....	35
Validasi Pengujian Kit Diagnostik Oleh BBVF Pusvetma Sebagai Laboratorium Rujukan Penyakit Mulut dan Kuku Di Indonesia.....	56

Redaksi menerima tulisan atau 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
pusvetma.kementan@yahoo.com

*Redaksi tidak bertanggung jawab atas isi naskah atau makalah

PEMBUATAN ANTIGEN RABIES UNTUK KIT ELISA RABIES TAHUN 2020 - 2022

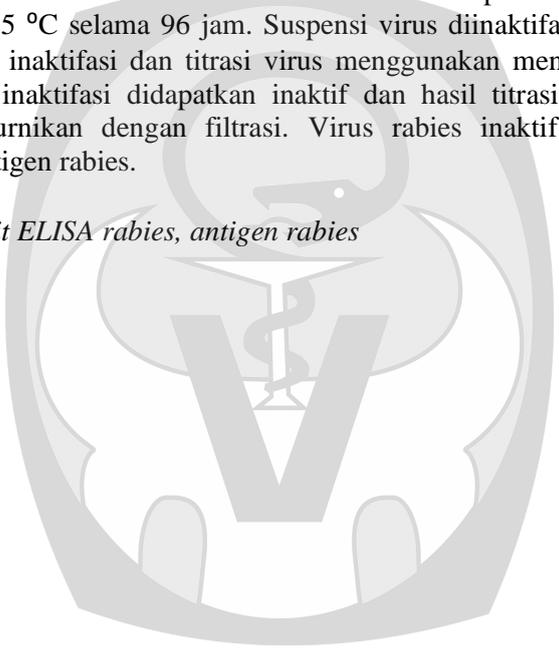
Kiki Dwi Restika¹, Evy Indah Setyorinie¹, Ismail Budi Wahyuri¹

¹Balai 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 *dicoating* 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 $10^{7.0}$ - $10^{7.9}$ LD₅₀/ml. Virus dimurnikan dengan filtrasi. Virus rabies inaktif dapat *dicoating* pada mikroplat sebagai antigen rabies.

Kata kunci: *rabies, kit ELISA rabies, antigen rabies*



BBVF PUSVETMA

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 saraf 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, standar 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 cm², 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 konfluen, 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 Inaktifasi Virus

Suspensi virus dikoleksi dari setiap kultur botol roux, dilakukan pengambilan sampel aktif, kemudian suspensi diinaktifasi menggunakan *betapropiolactone* (BPL)

dengan konsentrasi 10%. Suspensi virus diputar pada suhu 3-5°C selama 48 jam. Setelah suspensi virus inaktif, ditambahkan bahan pengawet thimerosal 10% dan diputar kembali pada suhu 3-5°C selama 24 jam.

Uji Inaktifasi Virus

Hewan coba anak mencit sehat umur 1-3 hari diinjeksi 0,03 ml secara *intracerebral* (IC) dengan sampel suspensi virus yang telah diinaktifasi. 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 inaktif dimurnikan dengan filtrasi menggunakan membran 0,2 μm untuk menghilangkan debris sel.

HASIL

Suspensi virus rabies yang dihasilkan adalah 200 ml. 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

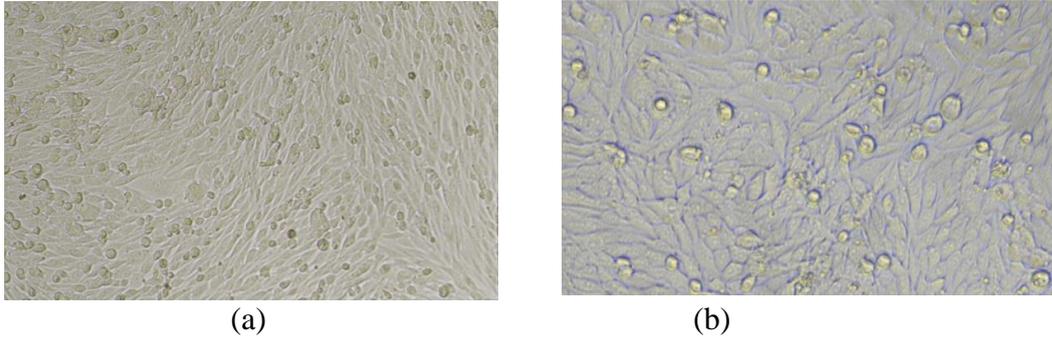
Tahun	Kode Antigen	Volume (ml)	Status Inaktivasi
2020	E 203.2603.05	200	Inaktif
	F 205.7145.06	200	Inaktif
2021-2022	F 213.1703.07	200	Inaktif

Penghitungan titer virus Rabies diperoleh hasil antara $10^{7.0}$ - $10^{7.9}$ LD₅₀/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^{-3}	10	0	10	0	10	0
10^{-4}	9	1	9	1	10	0
10^{-5}	10	0	10	0	6	4
10^{-6}	10	0	7	3	4	6
Penghitungan Tahap:						
1.	1. 3		1. 3		1. 4	
2.	2. 39		2. 36		2. 20	
3.	3. 3.4		3. 3.1		3. 1.5	
4.	4. 6.4		4. 6.1		4. 5.5	
<i>End-point dilution</i>	$10^{-6.4}$		$10^{-6.1}$		$10^{-5.5}$	
Titer virus	$10^{6.4}$ LD ₅₀		$10^{6.1}$ LD ₅₀		$10^{5.5}$ LD ₅₀	
Titer virus (LD ₅₀ /ml)	$10^{7.9}$ LD ₅₀ /ml		$10^{7.6}$ LD ₅₀ /ml		$10^{7.0}$ LD ₅₀ /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



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)

BBVF PUSVETMA

PEMBAHASAN

Teknik 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 saraf 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 konfluen untuk mendapatkan hasil yang maksimal.

Efek sitopatologi 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 sitopatologi terlihat pada sel neuroblastoma membentuk formasi *syncytia* (Meslin, 1996).

Virus rabies harus diinaktivasi sebelum digunakan untuk antigen Kit ELISA Rabies. Inaktifan yang bisa digunakan untuk inaktivasi adalah betapropiolakton (BPL), *acetyleneimine* atau radiasi ultraviolet. Penyiapan antigen Rabies pada pembuatan antigen ini menggunakan inaktifan BPL dikarenakan BPL mempunyai sifat bisa

membunuh bakteri dan virus tanpa berakibat pada antigenisitas 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 difilter melewati membran filter 8 μm , 3 μm , dan 1.2 μm (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* 4thed. 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 INAKTIFASI ANTIGEN RABIES DENGAN CARA PEMANASAN UNTUK OPTIMASI KIT ELISA RABIES PUSVETMA

Petri Nandatina Saputri¹, Nur Sjolichah¹, Diah Pancawidyana¹, Ekky Valinia DM¹

¹Balai 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

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 dan WHO, 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 Assay* (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 survei epidemiologi dalam populasi besar (Xu *et al*, 2007) dengan teknik pengujian atau pemeriksaan berdasarkan ikatan antigen-antibodi yang mana salah satu antigen atau antibodi dilabel dengan enzim tertentu dan reaktan lainnya bersifat resisten yang tidak berikatan 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.

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.

Tinjauan Pustaka

Menurut Madigan M.T., *et al* (2009) rabies adalah penyakit infeksi tingkat akut pada susunan saraf 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* dan *raccoons*) dan *chiropteran* (kelalawar) adalah vektor yang paling efisien untuk rabies (Mrak R.E dan 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. dan Fernandes P.J. (1991) berpendapat rabies adalah 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 saraf pusat, air liur, urin, getah bening, susu dan darah (Rabies Bulletin-Europa, 2011).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 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 dikuantifikasi. 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*).

MATERI DAN METODE

Materi

Bahan – bahan yang digunakan meliputi antigen rabies, *carbonate-bicarbonate buffer*, *bovine serum albumin*, sukrosa, *phosphate buffer saline*, *tween 20*, *thiomersal*, sampel serum lapangan, serum kontrol positif, serum kontrol negatif, serum standar, *phosphate buffer saline tween*, substrat, konjugat protein A, *stopper*. Peralatan yang digunakan meliputi mikrolat urai, *multichannel pipette*, *single channel pipette*, *finntipe*, baker glass, tabung reaksi, *petri disk*, *ELISA reader* dan *ELISA washer*

Metode

Antigen rabies yang digunakan pada pengembangan metode ini diinaktivasi dengan cara pemanasan suhu 56°C selama 1 jam, 3 jam dan 5 jam. Antigen yang telah inaktif dilapiskan pada mikrolat urai dengan menggunakan *bicarbonate buffer* pH 9,6 100 µl setiap sumuran dan ditutup dengan plastik absorban lalu simpan semalam pada suhu 4°C. *Blocking microplate* dengan membuka plastik absorban dan membuang larutan pelapis lalu diisi dengan larutan *blocking bicarbonate buffer* pH 9,6 *bovine*

serum albumin, dan sukrosa, diisi 100 µl setiap sumuran dan di tutup dengan plastik absorben lalu di simpan pada inkubator pada suhu 37°C selama 1 jam. Cuci mikroplat dengan cara membuka plastik absorben yang sudah disimpan pada inkubator lalu dibuang cairan *blocking* dan dicuci dengan *phosphate buffer saline* selama 4 (empat) kali, diisi 250 µl setiap sumuran.

Pengujian ELISA

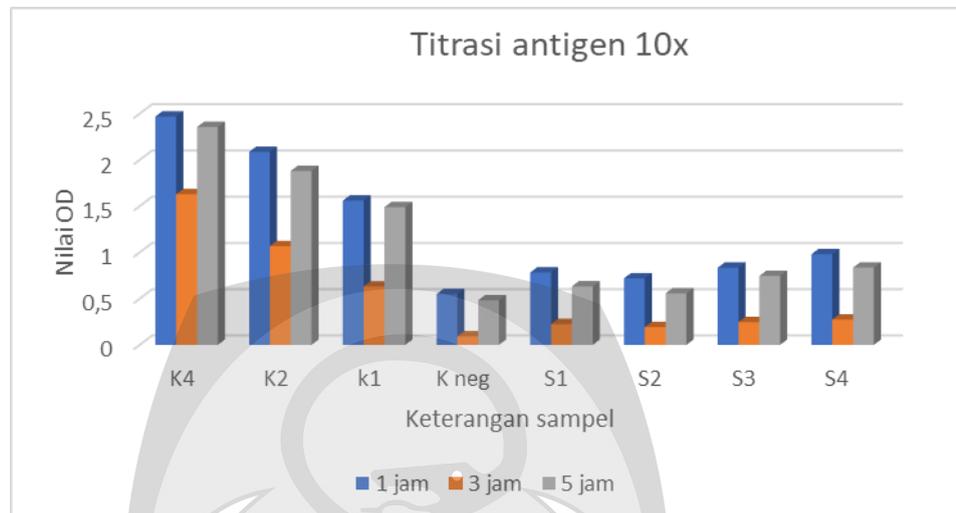
Uji ELISA dilakukan dengan pengenceran serum sampel, serum kontrol negatif, serum kontrol positif, serum standar dengan PBS-*tween*, masukkan ke dalam setiap sumuran masing-masing 100 µl dan tutup plastik absorben dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam setelah itu buka plastik absorben dan cuci dengan PBS-*tween* pengenceran 1x, masukkan pengenceran konjugat dengan PBS-*tween* sebanyak 100 mikroliter setiap sumuran lalu tutup kembali dengan plastik absorben dan inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 1 jam, lalu cuci kembali dengan PBS-*tween*, tambahkan substrat TMB sebanyak 100 µl tempatkan pada ruang gelap selama 10 menit dan hentikan reaksi dengan larutan *stopper* lalu baca pada ELISA *reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

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 *immunoassay*, karena mengatalisis oksidasi indikator redoks oleh H₂O₂. Indikator redoks yang umum dipergunakan adalah 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB), kromogen yang mudah diidentifikasi dengan spektrofotometri. Sebelum dibaca pada fotometri, reaksi TMB-HRP/H₂O₂ diakhiri dengan menurunkan pH campuran dengan asam kuat seperti H₂SO₄ untuk meningkatkan absorbansi dan dibaca pada panjang gelombang 450 nm (Bally, 1989).

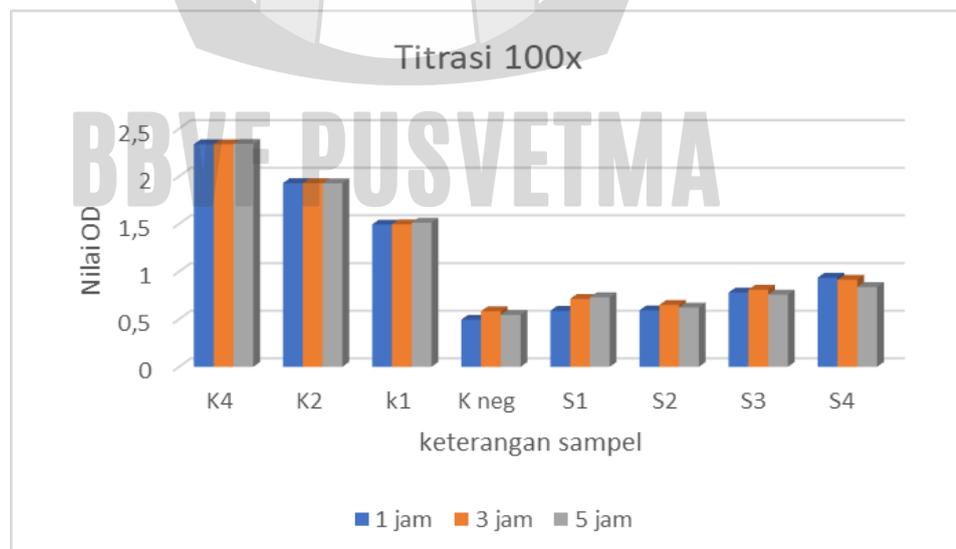
Kontrol positif yang digunakan adalah hiperimun serum yang mempunyai titer 4,50 dengan uji RFFIT. Kontrol negatif yang digunakan adalah serum anjing yang telah diuji RFFIT yaitu < 0,07 IU/ml. Serum sampel sebelumnya telah diuji dengan kit ELISA Rabies Pusvetma.

Michalski (1976) menyatakan bahwa, metode pemanasan di suhu 37°C selama 24 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:



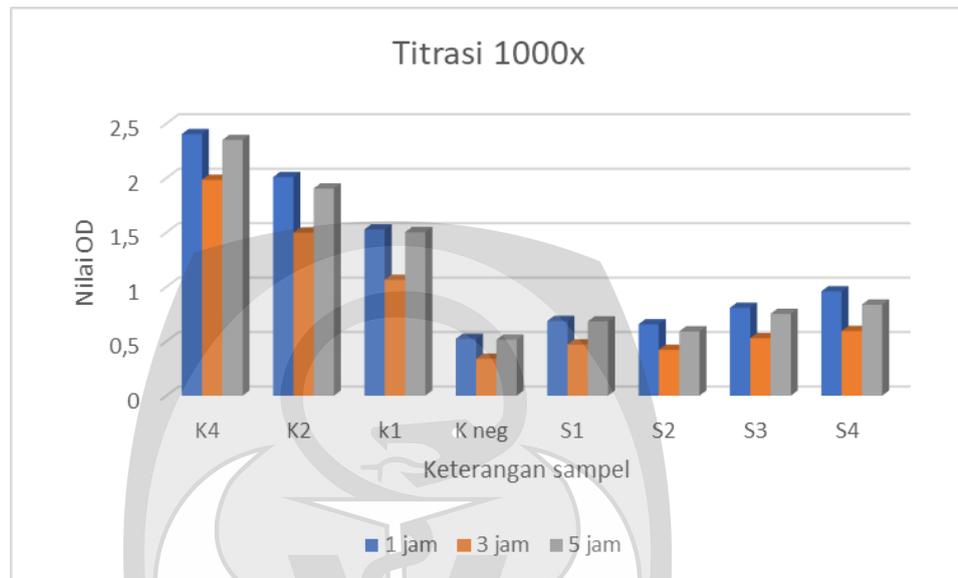
Gambar 1. Grafik Titrasi Antigen Rabies 10x

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



Gambar 2. Grafik Titrasi Antigen Rabies 100x

Gambar 2 menggambarkan hasil titrasi antigen dalam larutan *Carbonate 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.



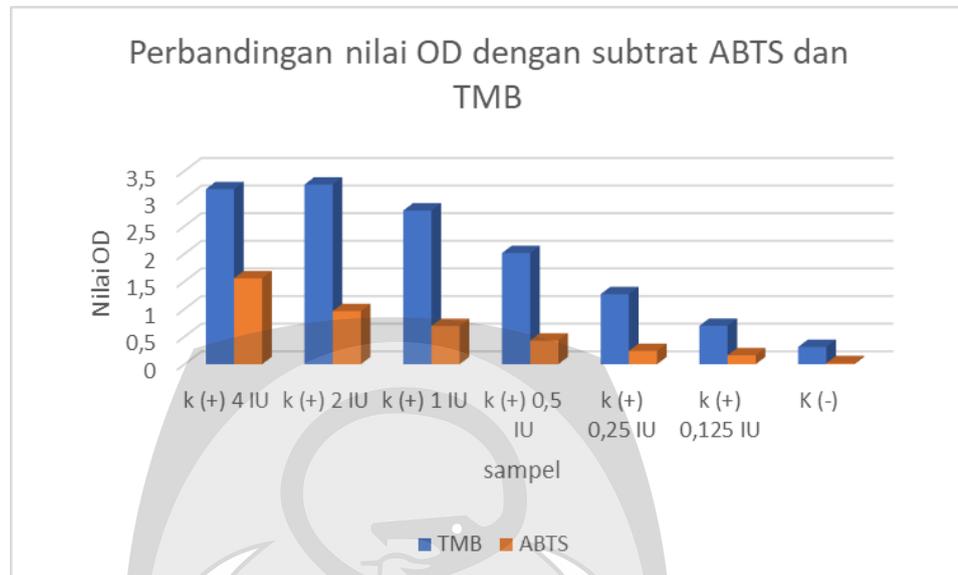
Gambar 3. Grafik Titrasi Antigen Rabies 1000x

Gambar 3 menggambarkan hasil titrasi antigen dalam larutan *Carbonate 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.

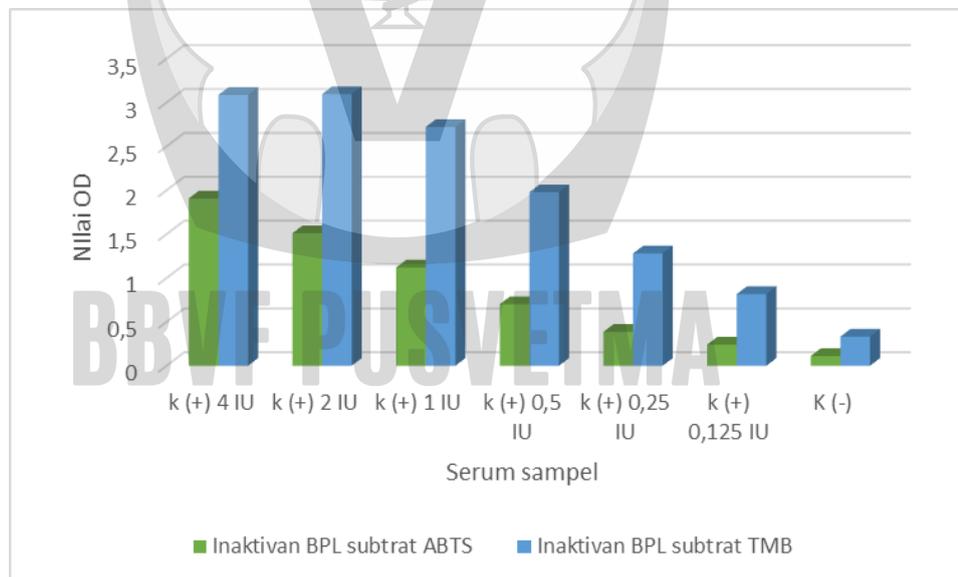
Dari Gambar 1,2 dan 3 dapat disimpulkan sampai dengan titrasi 1000x, antigen rabies masih dapat berikatan dengan konjugat HRP Protein A, dan substrat TMB akan mendapatkan nilai OD seperti yang diharapkan. Perlakuan waktu inaktivasi selama 1 jam sudah dapat menginaktivasi antigen rabies dan memberikan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

TMB merupakan kromogen 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* dan *o-phenylenediamine* (J Ashby,1982). Menurut Lee (2014) dan Dorin (2020), substrat TMB lebih sensitif dan lebih stabil serta menghasilkan pembacaan yang lebih tinggi dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan ABTS.



Gambar 4. Perbandingan nilai OD substrat ABTS dan substrat TMB dengan inaktifan pemanasan, inkubasi 10 menit



Gambar 5. Perbandingan nilai OD dengan subtrat ABTS dan substrat TMB dengan inaktifan BPL, inkubasi 10 menit

Pengujian kit ELISA Rabies dengan inaktifan 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 inaktifan BPL maupun dengan inaktifan 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.

KESIMPULAN DAN SARAN

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

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/diagnostics-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: 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 Biolof=gicals, 35, 297- 302.

PENGEMBANGAN PRODUKSI VAKSIN AVIAN INFLUENZA BIVALEN HPAI H₅N₁ DAN LPAI H₉N₂

Yanita Anjar P¹, Petri Nandatina S¹, Murtining Dyah K¹, Bambang Erwan¹
¹Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

ABSTRAK

Objek penelitian ini adalah pengembangan pembuatan vaksin *High Pathogenic Avian Influenza* H₅N₁ strain Tanggamus dan *Low Pathogenic Avian Influenza* H₉N₂ 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 intramuskular (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 H₉N₂ lebih besar sama dengan 128 (2⁷) dan titer antibodi terhadap H₅N₁ 4 minggu paska vaksinasi 100% lebih besar sama dengan 16 (2⁴). Hasil penelitian ini menunjukkan pemeriksaan respon imun pada ayam SAN yang divaksin dengan vaksin HiLow AI H₅N₁ isolat Tanggamus-AI H₉N₂ isolat *South Sulawesi* dapat memberikan respon imun terhadap AI H₅N₁ isolat tanggamus dan juga terhadap AI H₉N₂ isolat *South Sulawesi*

Kata Kunci : *Avian Influenza, HPAI, H₅N₁, H₉N₂, LPAI, Vaksin bivalen*

BBVF PUSVETMA

PENDAHULUAN

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 ke unggas 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* H₅N₁ isolat Tanggamus dan *Low Pathogenic Avian Influenza* H₉N₂ 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.

Rumusan Masalah

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

Tujuan

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

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.

Tinjauan Pustaka

Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H₅N₁ pertama kali dilaporkan pada tahun 1996 di Provinsi Guangkong, Tiongkok. Virus HPAI termasuk keluarga Orthomyxoviridae (OIE, 2018). Menurut Nunez *et al* (2008), beberapa strain HPAI H₅N₁ 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.

H₉N₂ 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 atau diare, dan gangguan reproduksi (Capua dan Marangon, 2000; Lee *et al*, 2015). Gejala klinis yang paling sering terlihat adalah infeksi saluran pernafasan yang dapat dilihat dari tanda-tanda gangguan pernafasan 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).

MATERI DAN METODE

Materi

Bahan:

a. Bahan untuk produksi:

Virus AI H₉N₂ *South Sulawesi* dan virus AI H₅N₁ *clade 2.3.2* Tanggamus, TAB umur 9 – 11 hari ; kapas, alkohol 70%, PBS⁻, bahan inaktivan, adjuvan.

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⁻, RBC, antigen AI H₅N₁ *clade 2.3.2* Semarang, antigen H₉N₂ *South Sulawesi*.

Alat:

a. Alat untuk produksi:

Inkubator telur, *sprit disposable* ukuran 1 ml dan 3 ml, *microplate*, *multichannel* 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⁻, *mikroplate*, multipipet, fintip, *vortex mixer*.

Metode

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°C, untuk virus AI H₉N₂ diinkubasi

selama 4 hari, untuk virus AI H₅N₁ 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°C untuk dipanen dan dilakukan uji HA cairan alantois untuk diketahui nilai EID₅₀. Pasase virus diulang sampai mendapatkan nilai EID₅₀ yang tinggi. Hasil pengukuran titer EID₅₀ yang diperoleh adalah 10^{8.5}EID₅₀/0,1 ml untuk HPAI dan 10^{8.5}EID₅₀/0,1 ml untuk LPAI. Kandeil *et.al* (2017) menyatakan bahwa vaksin AI yang dihasilkan dari virus dengan titer 10^{7.5}EID₅₀/0,1 ml mampu menimbulkan titer antibodi protektif dalam satu kali vaksinasi.) Setelah mendapatkan nilai EID₅₀ 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°C, untuk virus AI H₉N₂ diinkubasi selama 4 hari, untuk virus AI H₅N₁ 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°C untuk dipanen dan dilakukan uji HA cairan alantois untuk diketahui nilai EID₅₀. Cairan alantois yang telah dipanen ini untuk selanjutnya disebut produk antara.

3. Inaktifasi virus

Masukkan larutan formalin ke dalam *tank* inaktifasi 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°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 volume 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°C selama 14 hari. Dua tabung media TGC dan dua tabung media SCD lainnya diinkubasikan pada suhu 22°C selama 14 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke 3, 7 dan 14. Media HIA yang telah diinokulasi, diinkubasikan pada suhu 37°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°C selama 14 hari tanpa digoyang-goyang. Vaksin dikatakan stabil atau tidak rusak apabila pada akhir pengamatan, emulsi vaksin tidak mengalami *cracking*, 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°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 intramuskular (IM). Sepuluh ekor ayam lainnya tidak divaksinasi digunakan sebagai kelompok kontrol. Titer antibodi yang timbul diketahui dengan uji HI. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat terhadap H₉N₂ apabila 3 (tiga) minggu setelah vaksinasi, 100% serum ayam vaksinasi mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 128 (2⁷), sedangkan 100% serum ayam kontrol mempunyai titer kurang dari 4 (2²) (FOHI, 2018). Vaksin dinyatakan memenuhi syarat terhadap H₅N₁ apabila 4 (empat) minggu setelah vaksinasi tidak kurang dari 90% ayam vaksinasi mempunyai titer antibodi tidak kurang dari 16 (2⁴) dan semua ayam kontrol mempunyai titer antibodi tidak lebih dari 4 (2²) (FOHI, 2007).

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 EID₅₀ yang bertujuan untuk mengetahui jumlah virus yang hidup. Hasil pengukuran titer EID₅₀ yang diperoleh adalah 10^{8.5}EID₅₀/0,1 ml untuk HPAI dan 10^{8.5}EID₅₀/0,1 ml untuk LPAI. Kandeil *et.al* (2017) menyatakan bahwa vaksin AI yang dihasilkan dari virus dengan titer 10^{7.5}EID₅₀/0,1 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 10⁶ EID₅₀/ml tanpa menunjukkan gejala abnormal dan tidak terjadi *shedding* virus baik pada swab kloaka maupun swab oral.

Setelah dilakukan perbanyak virus dalam TAB, kemudian dilakukan pengujian titer virus dengan metode HA dan diperoleh titer virus HPAI dan LPAI masing-masing sebesar 512 (2⁹). Tahap inaktivasi menggunakan formalin dan pengujian

HA virus setelah inaktifasi. Hasil pengujian HA virus setelah inaktifasi yaitu $256 (2^8)$ untuk HPAI dan $256 (2^8)$ 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 H₅N₁ *clade* 2.3.2 Tanggamus

EID₅₀ : 8,5
 Titer HA sebelum inaktifasi : 2⁹
 Titer HA sesudah inaktifasi : 2⁸

Virus AI H₉N₂ South Sulawesi

EID₅₀ : 8,5
 Titer HA sebelum inaktifasi : 2⁹
 Titer HA sesudah inaktifasi : 2⁸

Formulasi

AI H ₅ N ₁ <i>clade</i> 2.3.2 Tanggamus	: 15%
AI H ₉ N ₂ 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 inaktifasi, 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 volume 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 H₅N₁ *clade* 2.3.2 Tanggamus dengan AI H₉N₂ *South Sulawesi*

No.	Jenis Media	Suhu Inkubasi	
		37°C	22°C
1	<i>Heart Infusion Agar</i> (HIA)	Steril	-
2	<i>Thioglycolate</i> (TGC)	Steril	Steril
3	<i>Soybean Casein Digest</i> (SCD)	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.

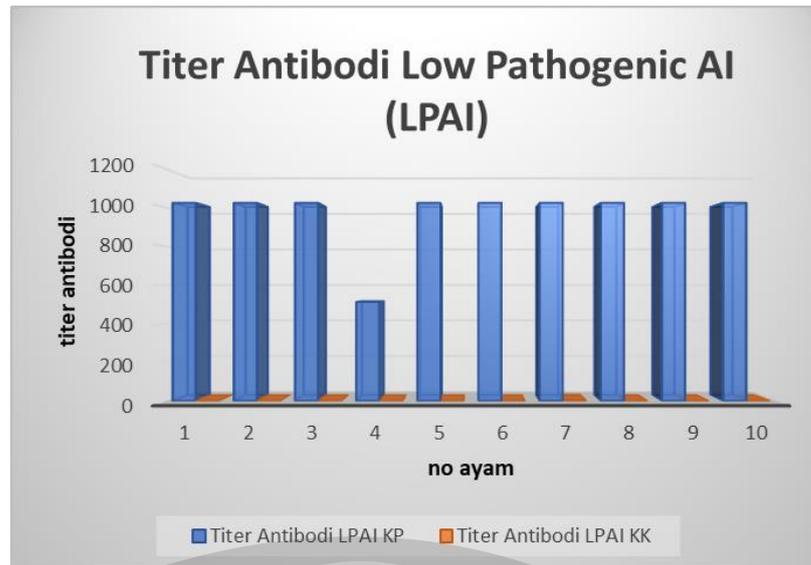
Tabel 2. Hasil Uji Inaktifasi Vaksin Afluvet HiLow, Kombinasi AI H₅N₁ *clade* 2.3.2 Tanggamus dengan AI H₉N₂ *South Sulawesi*

	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 memengaruhi 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 atau 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.

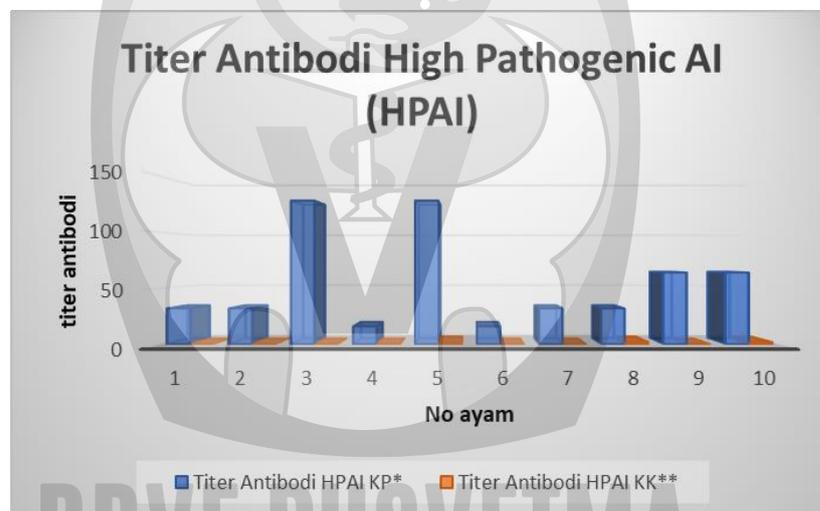
Vaksin Afluvet HiLow merupakan kombinasi dari HPAI dan LPAI sehingga uji potensi dilakukan untuk mengukur titer antibodi terhadap virus HPAI dan LPAI. Uji potensi yang dilakukan adalah secara serologis dan tidak dilakukan ujiantang karena keterbatasan fasilitas. Pelaksanaan ujiantang harus dilaksanakan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



Gambar 1. Hasil Uji Potensi Vaksin Afluvet HiLow (Titer Antibodi AI H₉N₂)

*KP: Kelompok Perlakuan

**KK: Kelompok Kontrol



Gambar 2. Hasil Uji Potensi Vaksin Afluvet HiLow (Titer Antibodi AI H₅N₁)

*KP: Kelompok Perlakuan

**KK: Kelompok Kontrol

Pada Gambar 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 H₉N₂ lebih besar sama dengan 512 (2⁹) dan titer antibodi terhadap H₅N₁ empat minggu paska vaksinasi 100% lebih besar sama dengan 16 (2⁴). Hasil uji serum kelompok kontrol baik pada LPAI maupun HPAI menunjukkan titer antibodi (2⁰).

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
	Volume	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 ₅ N ₁	FOHI JIL I E3 2007	90% titer antibodi \geq 16 (2 ⁴)	100% titer antibodi \geq 16 (2 ⁴)
	AI Subtipe H ₉ N ₂	FOHI JIL I E5 2018	100% titer antibodi \geq 128 (2 ⁷)	100% titer antibodi \geq 128 (2 ⁷)

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.

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.

DAFTAR PUSTAKA

- BBLitvet. 2017. Isolat lokal low pathogenic avian influenza (LPAI) subtipe H₉N₂ 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 Muschovy 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 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
- 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. 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 H₅N₁ Highly Pathogenic Avian Influenza Virus for Emus , Geese , Ducks , and Pigeons Pathogenicity of a Hong Kong – Origin H₅N₁ 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.* 6:1-15doi: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 H₅N₁ 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 Characterization Of Virus Of Highly Pathogenic Avian Influenza H5 Subtype Of Chicken From Outbreaks In Indonesia). *JITV* 9: 2004

BBVF PUSVETMA

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

Rinasti RP¹, Petri Nandatina S¹, Murtining Dyah K¹, Jossie Intan C¹, Misnan¹
¹Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

ABSTRAK

High Pathogenic Avian Influenza (HPAI) dan *Newcastle Disease (ND)* adalah penyakit unggas strategis endemik 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 (ND LS). Masing-masing formula vaksin menggunakan sepuluh ekor ayam *specific antibody negative (SAN)* untuk uji potensi yang dilakukan penyuntikan 2 dosis secara *intramuscular (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*

BBVF PUSVETMA

PENDAHULUAN

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. Seringkali menyerang bersamaan sehingga menimbulkan kerugian bagi peternak dikarenakan angka morbiditas dan mortalitas tinggi, depopulasi unggas secara masal, peningkatan biaya untuk sanitasi dan desinfeksi area kandang, dan peralatan peternakan (Swayne dan 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 dan 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 kasus ND terjadi di berbagai daerah yang berpotensi menyebabkan wabah yang merugikan. Kasus ND masih dilaporkan di Sumatera, terutama di Provinsi Lampung, Sumatera Selatan, Bengkulu, dan Bangka Belitung (BeVet, 2019). Penyakit ND dan AI adalah dua penyakit mematikan pada unggas yang menyebabkan kerugian ekonomi yang besar bagi industri perunggasan dan mengganggu ketahanan pangan. Berdasarkan Kementerian Pertanian, Indonesia (Kepmentan, 2013) penyakit ND dan 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.

Rumusan Masalah

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

Tujuan

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

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%. Virus HPAI termasuk keluarga Orthomyxoviridae (OIE, 2018). Ayam kampung dan itik yang

diinfeksi HPAI H₅N₁ dalam waktu 24 jam akan menunjukkan gejala klinis ringan seperti bulu berdiri dan lemah, setelah 48 jam ayam mati, sedangkan itik tetap hidup dengan gejala klinis sangat berat. Virus HPAI H₅N₁ berhasil diisolasi dari preparat usap (*swab*) yang berasal dari ayam dan itik 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 viseral 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 atau 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 Yogyakarta 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 subtipe 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). Ada tiga patotipe utama isolat virulen pada ayam. Isolat lentogenik adalah isolat yang paling rendah virulensinya, sedangkan virus dengan virulensi *intermediate* adalah mesogenik. Virus dengan virulensi tertinggi termasuk isolat *velogenic*, dan 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

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%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), bahan inaktifan 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, mikroplat, *multichannel pipette*, *singlechannel pipette*, 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 sentrifus, inkubator, *Bio Safety Cabinet* (BSC) level 2, botol vaksin, *magnetic stirrer*, *magnetic bar*, *ultrathurax*.

Metode

1. Titrasi virus

Titrasi virus bertujuan untuk mengetahui nilai EID₅₀ dari virus yang dipakai dan untuk pembuatan *working seed*. Suspensi virus ditipiskan 10 kali sampai dengan 10⁻⁹, kemudian suspensi pada penipisan 10⁻⁵ s/d 10⁻⁹ diinokulasikan pada telur ayam berembrio (TAB) umur 9-11 hari. Telur ayam berembrio yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37°C, inkubasi untuk virus ND Lasota (ND LS) selama 4 (empat) hari, dan 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. Telur ayam berembrio H₅N₁ yang mati di atas 24 jam paska inokulasi di *chilling* di suhu 2-8°C untuk selanjutnya alantois dipanen dan dilakukan uji HA. Telur ayam berembrio 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 alantois di *chilling* dan dipanen serta dilakukan uji HA untuk menghitung nilai *Embryo Infectious Dose 50* (EID₅₀). Pasase virus diulang sampai mendapatkan nilai EID₅₀ yang tinggi. Setelah mendapatkan nilai EID₅₀ minimal 10⁸, suspensi alantois dipanen untuk dijadikan *working seed*.

2. Propagasi dan panen virus.

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

3. Inaktifasi virus

Cairan alantois hasil panen ditambah bahan inaktifan 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 alantois sebanyak 0,02 ml yang telah diinaktifasi. TAB diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. Observasi dilakukan selama 5 hari, untuk mengetahui TAB tersebut hidup atau mati. Pada akhir masa inkubasi cairan alantois 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 alantois yang dipanen tidak terdapat aglutinasi pada uji HA cepat (FOHI, 2018).

4. Formulasi vaksin dan pembotolan

Alantois atau produk antara yang telah memenuhi hasil uji sterilitas dan hasil uji inaktivasi selanjutnya diformulasi menggunakan adjuvan. Adjuvan yang digunakan adalah adjuvan minyak komersial yang disimpan pada botol *glassware* kurang lebih 1 bulan dari tabung drum. Proses *mixing* adjuvan dan alantois 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 alantois ND LS sebesar 17,5%, alantois AI 232 TG sebesar 22,5% serta adjuvan sebesar 60%. Formula B menggunakan perbandingan alantois ND LS sebesar 15%, alantois AI 232 sebesar 15% serta adjuvan sebesar 70%, adjuvan yang digunakan adalah adjuvan minyak komersial. Adjuvan dihomogenasi menggunakan *ultrathurax* selama 5 menit dengan kecepatan 5000 rpm, kemudian ditambahkan cairan alantois 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 *Thioglycolate* (TGC), *Soybean Casein Digest* (SCD) dan *Heart Infusion Agar* (HIA). Sebanyak 1 ml vaksin dimasukkan ke dalam masing-masing 4 (empat) 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 (dua) tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 14 hari dan 2 (dua) tabung yang lain diinkubasi pada suhu 22°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°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°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°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. Enam ekor untuk ayam kontrol yang tidak divaksinasi. Ayam diperiksa titer terhadap AI 323 TG dan ND LS untuk memastikan titer antibodi 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 antibodi tidak kurang dari 16 (2⁴) dan semua ayam kontrol mempunyai titer antibodi tidak lebih dari 4 (2²) (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 inaktifasi masing masing menunjukkan nilai sebagai berikut ND LS adalah 10^{9.16} EID₅₀, virus AI H₅N₁ *clade* 2.3.2 strain Tanggamus : 10^{7.9} EID₅₀. Hasil uji hemaglutinasi pada virus AI sebelum inaktif adalah 1024 atau 2¹⁰, setelah inaktif adalah 512 atau 2⁹. Pada virus ND LS sebelum inaktif dan setelah inaktif menunjukkan hasil yang sama yaitu 1024 atau 2¹⁰.

Konfirmasi Uji Inaktifasi pada Virus

Vaksin kombinasi AI-ND merupakan vaksin inaktif, sehingga perlu dilakukan uji inaktifasi untuk mengetahui apakah virus dalam vaksin sudah inaktif. Uji inaktif dilakukan baik sebelum formulasi dan setelah formulasi. Uji inaktifasi 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 lesi 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

		H ₅ N ₁ TG		ND	
Nilai EID₅₀		10 ^{7.9} EID ₅₀		10 ^{9.16} EID ₅₀	
Titer HA	Sebelum inaktif	1024 atau 2 ¹⁰		1024 atau 2 ¹⁰	
	Setelah Inaktif	512 atau 2 ⁹		1024 atau 2 ¹⁰	
Pasase	1	Inakif		Inakif	
	2	Inakif		Inakif	
	3	Inakif		Inakif	
Uji sterilitas	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 (alantois) dan adjuvan 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 uji tantang 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 (dua) ekor ayam atau 10% ayam dari total populasi. Titer HI rata-rata untuk kelompok A adalah 4 log₂ setelah minggu ke-2 post tantang, sedangkan di kelompok B, titer masing-masing adalah 6,4 log₂. 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

Uji pada Vaksin		Vaksin A	Vaksin B
		ND LS 17,5%, AI 232 TG 22,5%, adjuvan 60%	ND LS 15%, AI 232 15%, adjuvan 70%
Uji Fisik	Warna	Uniform	Uniform
	Partikel Asing	Tidak ada	Tidak ada
	Homogenitas	Homogen	Homogen
	Volum	Uniform	Uniform
Uji Inaktivasi		100% HA negatif	100% HA negative
Uji Sterilitas		Steril	Steril
Uji Stabilitas Emulsi		Kurang	Kurang
Uji Safety		100% tidak menunjukkan gejala abnormal	100% tidak menunjukkan gejala abnormal
Uji Potensi	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 ⁴)	100% titer antibody \leq 16 (2 ⁴)

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). *Newcastle Disease* (ND) dan *Avian Influenza* 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} EID₅₀, virus AI H₅N₁ Tanggamus: 10^{7.9} EID₅₀. Hasil uji hemaglutinasi pada virus AI sebelum inaktif adalah 1024 atau 2¹⁰, setelah inaktif adalah 512 atau 2⁹. Pada virus ND Lasota sebelum inaktif dan setelah inaktif menunjukkan hasil yang sama yaitu 1024 atau 2¹⁰. Kandeil *et al* (2017) menyatakan bahwa vaksin AI yang dihasilkan dari virus dengan titer 10^{7.5} EID₅₀/0,1 ml mampu menimbulkan titer antibodi 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 sulfhidrilat 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. Aktifitas 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 dalam minyak (*water in oil*). Emulsi merupakan suatu sistem yang tidak stabil dalam emulsi, tegangan antar muka memengaruhi terjadinya emulsi. Semakin kecil tegangan antar muka, emulsi yang terbentuk akan semakin stabil. Kenaikan 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* atau 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 atau 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 efek langsung 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).

Adjuvan yang digunakan pada penelitian ini adalah Montanide (*Seppic Adjuvan 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 adjuvan yang lebih baik untuk meningkatkan imunogenisitas antigen. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa vaksin inaktif emulsi air dalam minyak mampu menginduksi respon imun terhadap 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 memengaruhi laju oksidasi adalah jumlah oksigen, derajat ketidakjenuhan asam lemak dalam minyak, dan adanya antioksidan, reaksi ini akan menurunkan mutu minyak pada adjuvan (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 > 2⁴ 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 ujiantang terhadap virus ND baik vaksin A dan B menunjukkan hasil yang baik dan lulus menurut ketentuan FOHI yaitu protektifitas > 90%. Alan *et al* (1978) melaporkan 100% kematian karena tantangan dengan virus ND yang ganas ketika titer HI adalah 2 log₂ atau kurang. Sebaliknya tidak ada kematian ketika titer antibodi HI unggas antara 4 log₂ dan 6 log₂ dengan rata-rata titer antibodi HI 5,2 log₂. 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%, adjuvan 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 adjuvan 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 adjuvans for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1:111–118
- Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. 2001. Adjuvans 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 adjuvans, *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/Bbvw-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 adjuvan 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, Laue 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 Arintonang1 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 adjuvan 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. *Viol. J.*, 14(1): 56.



BBVF PUSVETMA

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

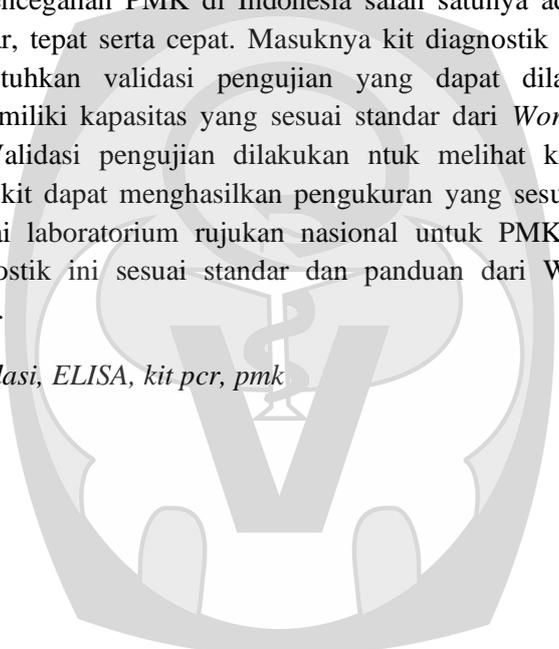
Dewi Noor Hidayati^{1,2}

¹Medik Veteriner Muda; ²Sub 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 diagnosa penyakit 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 WOA *Terrestrial Manual Chapter 1.1.6* (2023).

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



BBVF PUSVETMA

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.

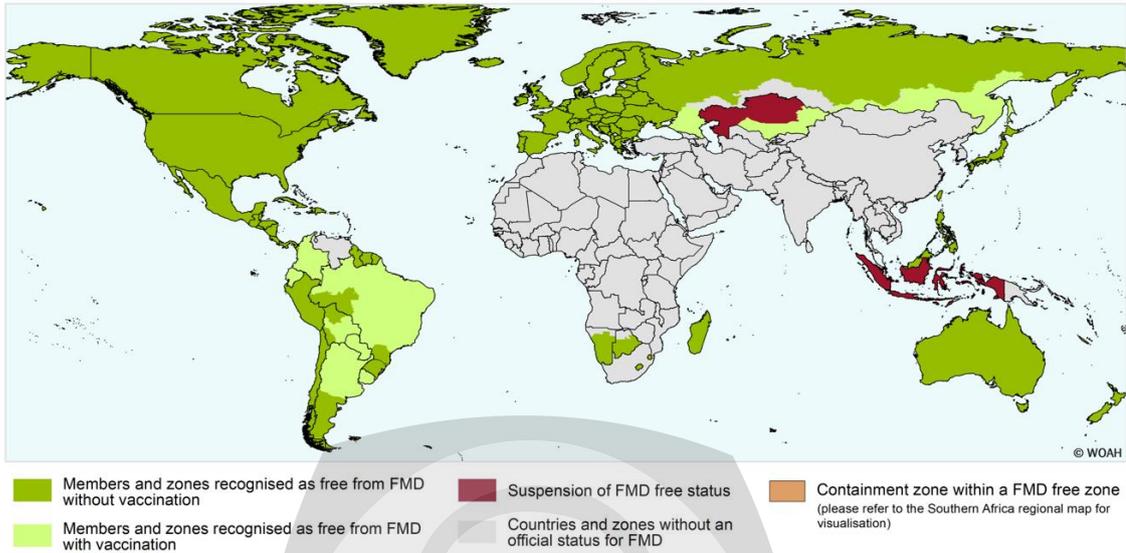
Fungsi Laboratorium rujukan nasional antara lain adalah sebagai *confirmatory assay laboratory*, dan *collaborative laboratory* untuk uji bersama, uji banding dan harmonisasi laboratorium (Donaldson, 1993). Laboratorium rujukan nasional harus memiliki kemampuan dan kapasitas untuk menyediakan standar 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.

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 tahun 2021, dan berubah menjadi “*suspension of an FMD free country where vaccination is not practiced*” atau negara yang ditangguhkan status bebasnya sejak pertengahan tahun 2022 (Buletin WOA, 2022). Peta status PMK negara Indonesia saat ini tersaji pada Gambar 1 dibawah ini.

WOAH Members' official FMD status map

Last update May 2023



Sumber: Buletin WOA, 2022

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)

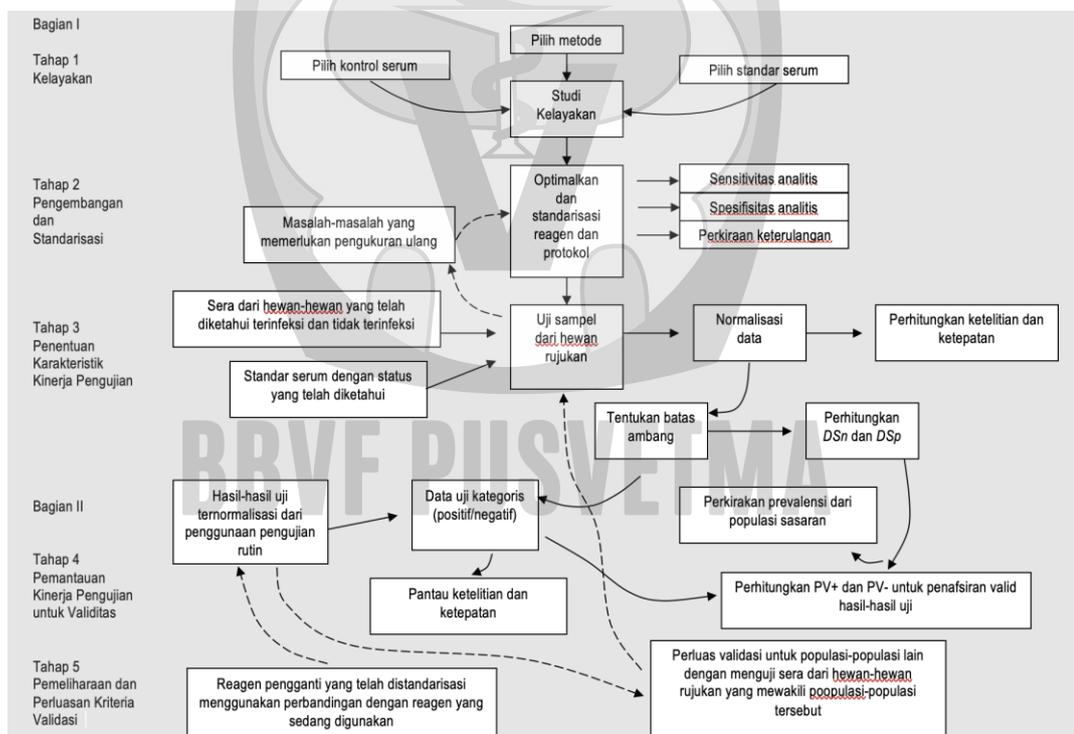
BBVF PUSVETMA

Tabel 1. Macam uji dan pengukuran parameter yang membutuhkan validasi

Tujuan uji	Parameter pengukuran yang dibutuhkan
1a) Untuk pembebasan secara historis (<u>dengan atau tanpa vaksinasi</u>)	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 DSp 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”. -Untuk konfirmasi kasus klinis: uji harus memiliki nilai DSp tinggi, (PV+) tinggi dan (LR+) tinggi. Karena sudah terlihat manifestasi klinis dan kemungkinan jumlah pathogen yang tinggi, sehingga nilai DSe tidak banyak mempengaruhi. -Untuk konfirmasi kasus positif (hasil uji screening): 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 DSp tinggi diperlukan untuk memastikan bahwa hewan tersebut benar-benar positif. Parameter yang dibutuhkan untuk uji konfirmasi ini adalah nilai DSp 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 DSp 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 DSp 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*

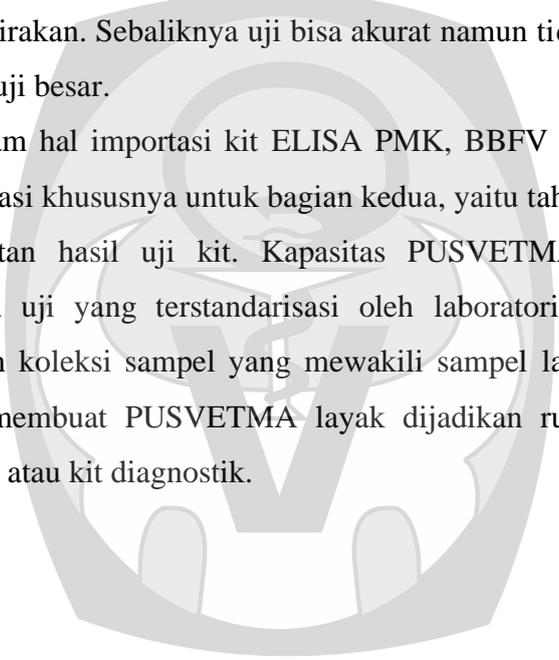
World Organization of Animal Health (WOAH) telah memberikan panduan untuk melakukan validasi baik metode maupun validasi alat uji / kit diagnostik, yaitu tercantum pada *Chapter 1.1.6* dalam panduan *Manual Terrestrial Code 2023*. Menurut panduan tersebut, validasi merupakan serangkaian proses untuk menentukan kesesuaian alat uji kit diagnostik yang telah dikembangkan, dioptimasi dan distandarisasi untuk memberikan hasil uji sesuai dengan kegunaannya atau *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 atau 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 atau kit diagnostik.



BBFV PUSVETMA

MATERI DAN 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)

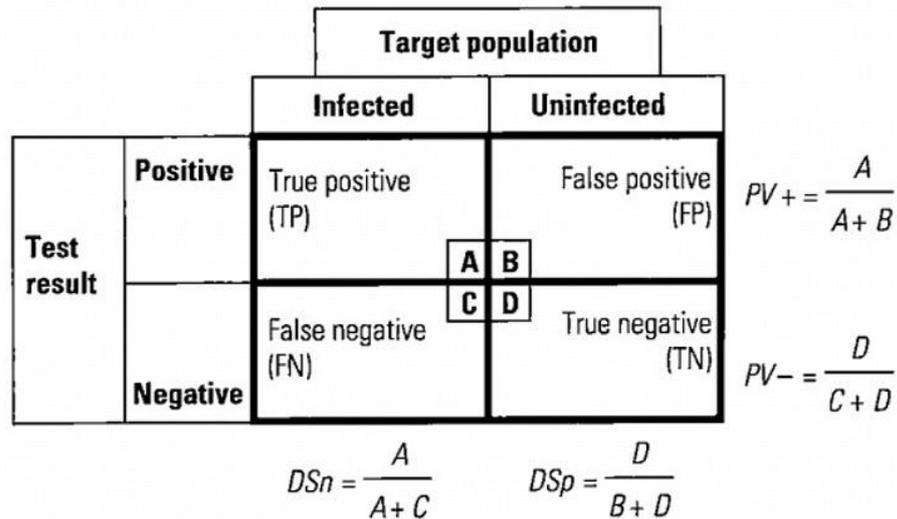
c = interval kepercayaan

Penentuan parameter uji

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

HASIL

Berdasarkan metode uji validasi dalam panduan WOA, nilai DSe dan DSp dapat dihitung dengan tabel 2X2 sebagaimana dapat terlihat pada Gambar 3. Nilai DSe dan DSp 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 DSp ini tidak menggambarkan baik atau buruknya kit, namun hanya menggambarkan seberapa relevan kit diagnostik tersebut dapat digunakan untuk mengukur sampel pada populasi yang ada.



Gambar 3. Perhitungan nilai DSe dan DSp menggunakan Table 2X2 untuk menghubungkan status infeksi dengan hasil uji.

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

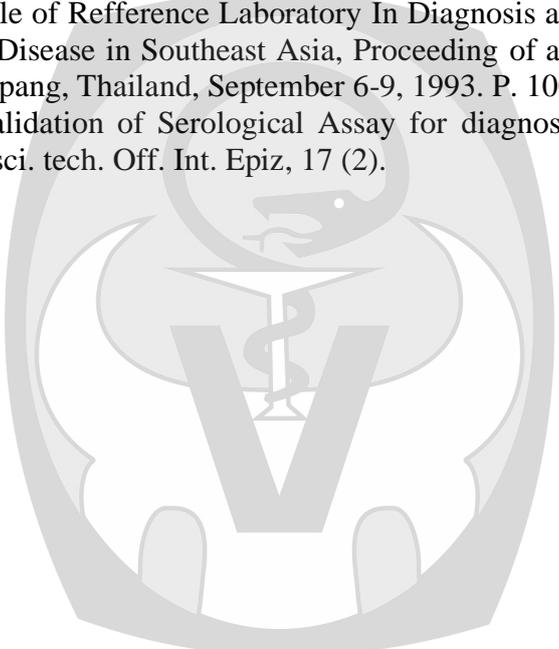
NO	NAMA PRODUK	PRODUSEN	DISTRIBUTOR / AGEN
1	Kit ELISA IDEXX FMD 3 ABC	IDEXX	PT Elokarsa
2	FMDV Antigen Detection ELISA Kits	IZSLER	PT Elokarsa
3	FMD Serotype O Antibody Test	Ring Bio NBGEN	PT Genecraft Labs
4	FMD Serotype A Antibody Test	Ring Bio NBGEN	PT Genecraft Labs
5	FMD Serotype 3 ABC NSP Antibody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

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.

DAFTAR PUSTAKA

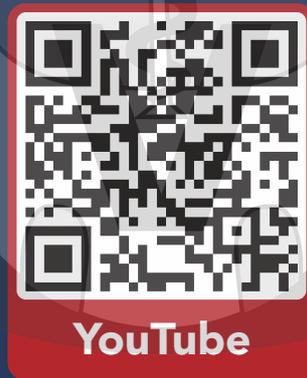
- WOAHA (*World Organization Animal Health*), Bulletin 2022-2, *access link*: bulletin.woaha.org.
- WOAHA, Terrestrial Manual Code Chapter 1.1.6. Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assay for Infectious Disease, 2023.
- Donaldson, A.I. Role of Reference Laboratory In Diagnosis and Epidemiology 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).



BBVF PUSVETMA

SCAN ME

Link Media Sosial Pusvetma



Link Publikasi Jurnal Pusvetma

