



**PUSAT VETERINER FARMA**  
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN  
KEMENTERIAN PERTANIAN

# Buletin **VETERINER FARMA**

BBVF PUS

ISSN | 1410-6280  
VOLUME : XVI NOMOR 1

# 2020

**KAJIAN STABILITAS SERUM  
POSITIF SALMONELLA PULLORUM**  
*Ida Arlita Wulandari, Febri Hartanti, Sri  
Sugiharti, Arina Fadilah*

**PENGARUH WAKTU INKUBASI  
DALAM OPTIMASI ANTIGEN  
ANTHRAX PUSVETMA**  
*Petri Nandatina Saputri, Febri  
Hartanti, Wiwin Sri Utami*

**PENGEMBANGAN VAKSIN  
AFLUVET HILOW, KOMBINASI  
HIGHLY PATHOGENIC AVIAN  
INFLUENZA (HPAI) H5N1 DAN LOW  
PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA  
(LPAI) H9N2**  
*Murtining Dyah K, Yanita Anjar P,  
Rinasti Rida P, Bambang Erwan*

**PENGAJIAN DURATION OF  
IMMUNITY VAKSIN NEO RABIVET  
PUSVETMA**  
*Rosmalina SDD, Dyah Pancawidyana,  
Aulanni'am*

**PENGAJIAN PEMBUATAN KIT  
ELISA JEMBRANA**  
*Febri Hartanti, Nur Sjolichah, Ekky  
Valinia DM, Yanita Anjar P*

**UJI STABILITAS VAKSIN SEPTIVET**  
*Yanita Anjar P, Murtining Dyah K,  
Noring Lestari*

**BULETIN VETERINER FARMA**  
**Media Informasi Kegiatan**  
**Pusat Veteriner Farma**

**Pelindung :**

drh. Agung Suganda, M.Si.  
**KEPALA PUSAT VETERINER FARMA**

**Pemimpin Redaksi Penganggungjawab**

drh. Sapto Rini Budi Prasetyowati, M.Imun.

**Dewan Redaksi & Pelaksana**

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

**BBVF PUSVETMA**  
**Sekretariat**

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

**Diterbitkan oleh**

Pusat Veteriner Farma  
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 Pusat Veteriner Farma Surabaya. Pada penerbitan kali ini memuat tentang Kajian Stabilitas Serum Positif Salmonella pullorum, Pengaruh Waktu Inkubasi dalam Optimasi Antigen Anthrax Pusvetma, Pengembangan Vaksin Afluvet HiLow, Kombinasi Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1 dan Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) H9N2 Tahap I, Pengkajian Duration of Immunity Vaksin Neo Rabivet Pusvetma, Pengkajian Pembuatan Kit ELISA Jembrana dan Uji Stabilitas Vaksin Septivet®.

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

Kajian stabilitas Serum Positif Salmonella pullorum .....	1
Pengaruh waktu inkubasi dalam optimasi Antigen Anthrax Pusvetma .....	7
Pengembangan vaksin Afluvet Hilow, kombinasi <i>highly pathogenic avian influenza</i> (HPAI) H5N1 dan <i>low pathogenic avian influenza</i> (LPAI) H9N2 .....	15
Pengkajian Duration of Immunity Vaksin Neo rabivet Pusvetma .....	25
Pengkajian pembuatan Kit Elisa Jembrana .....	32
Uji stabilitas vaksin Septivet® .....	43
Redaksi menerima tulisan/makalah dari pembaca, para ilmuwan dalam bidang pengendalian, pencegahan dan pemberantasan penyakit hewan sesuai dengan misi yang diemban Pusat Veteriner Farma 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/makalah

## KAJIAN STABILITAS SERUM POSITIF *Salmonella pullorum*

Ida Arlita Wulandari<sup>1</sup>, Febri Hartanti<sup>1</sup>, Sri Sugiharti<sup>1</sup>, Arina Fadilah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Veteriner Farma

### ABSTRAK

Pusat Veteriner Farma (Pusvetma) memproduksi Serum Positif *Salmonella pullorum* produksi Pusvetma dengan masa kedaluwarsa 1 (satu) tahun. Serum ini disimpan pada suhu -20°C dan merupakan sampel per tinggal dari setiap batch produksi, beberapa sampel telah melewati batas masa kedaluwarsa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas serum yang telah melewati batas masa kedaluwarsa.

Penelitian ini menggunakan 4 vial Serum Positif *Salmonella pullorum* yang telah melewati masa kedaluwarsa selama 2, 6, 28, dan 40 bulan serta 1 serum yang belum kedaluwarsa. Serum-serum tersebut dihomogenkan dengan antigen *Salmonella pullorum*® dengan perbandingan 1:1 dan interpretasi hasil positif (+) jika terbentuk reaksi aglutinasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa serum yang telah melewati masa kedaluwarsa selama 6, 28, 40 bulan dan serum yang belum kedaluwarsa menunjukkan adanya aglutinasi. Sedangkan serum yang telah melewati masa kedaluwarsa selama 2 bulan menunjukkan adanya aglutinasi halus. Serum Positif *Salmonella pullorum* yang disimpan pada suhu -20°C masih tetap stabil hingga 40 bulan setelah melewati masa kedaluwarsa.

Kata Kunci : *Salmonella pullorum*, Serum Positif, Kadaluarsa, Stabilitas

### 1. PENDAHULUAN

Pusat Veteriner Farma (Pusvetma) merupakan Unit Pelaksana Teknis (UPT) dibawah Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian. Pusvetma merupakan UPT yang mempunyai tugas pokok dan fungsi sebagai produsen vaksin, antisera, diagnostika dan bahan biologis veteriner. Salah satu produk yang dihasilkan Pusvetma adalah Serum Positif *Salmonella pullorum* yaitu serum kontrol positif untuk uji serologis penentuan diagnosis penyakit medis pullorum pada ayam.

*Salmonella pullorum* merupakan bakteri penyebab penyakit pullorum pada unggas sebagai hospes spesifiknya. Penyakit pullorum ditandai dengan diare (berak) putih dan ditularkan melalui telur, terutama pada ayam dan kalkun. Penyakit pullorum dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang besar karena dapat menurunkan produksi telur, daya tetas rendah, fertilitas rendah, kematian tinggi pada ayam muda.



Ayam dewasa dapat bertindak sebagai karier penyakit ini (Charlton, et.al., 2000).

Diagnosa penyakit pullorum ditentukan berdasar sejarah kelompok, gejala penyakit, perubahan post infeksi mati, isolasi dan identifikasi bakteri serta uji serologis. Salah satu uji serologis untuk mengetahui adanya reaktor adalah uji serum/darah cepat. Pengujian aglutinasi cepat akan memperoleh 3 kriteria penilaian yaitu :

- a. Reaksi negatif (-) yaitu campuran tetap homogen (sama), tidak terjadi gumpalan atau aglutinasi hingga waktu pengujian berlalu.
- b. Reaksi positif (+) yaitu campuran terjadi aglutinasi yang jelas dengan sekelilingnya bening terang, beberapa detik setelah pengadukan.
- c. Reaksi dubius ( $\pm$ ) yaitu reaksi-reaksi yang ada antara negatif dan positif, reaksi aglutinasi yang tidak spesifik dengan cairan sekelilingnya tetap keruh.

Hasil uji dianggap negatif apabila dalam reaksi tersebut tampak titik-titik yang amat lembut (*a very fine granulation*) yang kadang-kadang timbul dan dapat dilihat dengan mata telanjang atau titik-titik reaksi timbul pada tepi-tepi (*a very fine marginal flocculation*) saat sebelum campuran antigen dan antibodi menjadi kering (Anonim, 2008; Direktur Kesehatan Hewan, 2014).

Serum adalah cairan bening yang memisah setelah darah didapat dengan cara membiarkan darah dalam tabung reaksi (tanpa anti koagulan) membeku dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan tinggi untuk mengendapkan semua sel-selnya. Serum tampak sangat jernih dan mengandung zat antibodi. Serum normal tidak terdapat fibrinogen, protrombin, faktor VIII, V, dan XIII, yang ada ialah faktor XII, XI, IX, X, dan VII. Serum hiperimun adalah imunisasi (penyuntikan) dengan sengaja terhadap hewan dengan suatu antigen yang spesifik dalam rangka untuk mendapatkan suplai antibodi. Antibodi ini didapatkan dengan jalan mengumpulkan sampel darah hewan yang diimunisasi, yang kemudian dapat berguna sebagai serum hiperimun (Graham 1995). Serum Positif *Salmonella pullorum* produksi Pusvetma merupakan serum hiperimun.

Serum Positif *Salmonella pullorum* produksi Pusvetma mempunyai masa kedaluwarsa satu tahun. Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas serum yang telah melewati masa kedaluwarsa. Serum yang diuji merupakan sampel per tinggal dalam setiap *batch* produksi dan disimpan pada suhu -20°C. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan untuk menentukan masa kedaluwarsa serum positif *Salmonella pullorum*.

## II. MATERI DAN METODE

Pengujian dilakukan pada tanggal 23 Juni 2020 di laboratorium Pengujian Mutu Pusvetma. Serum yang diuji adalah Serum Positif *Salmonella pullorum* produksi Pusvetma yang disimpan dalam suhu -20°C. Serum yang diuji terdiri dari *batch* 01.16 yang kedaluwarsa pada bulan Maret 2017 (40 bulan setelah masa kedaluwarsa); *batch* 01.17 yang kedaluwarsa pada bulan Maret 2018 (28 bulan setelah masa kedaluwarsa); *batch* 01.18 yang kedaluwarsa pada bulan Desember 2019 (6 bulan setelah masa kedaluwarsa); *batch* 01.19 yang kedaluwarsa pada bulan April 2020 (2 bulan setelah masa kedaluwarsa); dan *batch* 03.19 yang kedaluwarsa pada bulan Agustus 2020 (belum kedaluwarsa). Antigen yang digunakan adalah antigen *Salmonella pullorum* *batch* B201CA03 yang kedaluwarsa pada bulan Juni 2022.

Metode yang digunakan sesuai dengan cara pemakaian Antigen *Salmonella pullorum*® yang dimuat dalam leaflet produk. Sebelum dipakai, antigen dikocok sampai homogen. Sebanyak 1 tetes (50 µl) serum ditetaskan pada obyek glass kemudian ditambahkan antigen dengan perbandingan 1:1. Serum dan antigen dihomogenkan menggunakan ose sambil digoyang selama 2 menit. Interpretasi hasil (+) jika aglutinasi jelas, dengan cairan disekitarnya jernih, (±) aglutinasi halus, dengan cairan disekitarnya sedikit jernih; dan (-) jika tidak terjadi aglutinasi, campuran antigen dan serum tetap homogen.

## III. HASIL

Hasil pengujian Serum Positif *Salmonella pullorum* terdapat dalam Tabel 1 dimana empat dari 5 serum yang diuji telah melewati masa kedaluwarsa yang tertera pada kemasan.

Tabel 1. Rekapitulasi Hasil Uji Serum Positif Salmonella pullorum

No	Batch	Waktu Kadaluarsa	Lama Kadaluarsa *)	Hasil Uji
1	01.16	Maret 2017	40 bulan	+
2	01.17	Maret 2018	28 bulan	+
3	01.18	Desember 2019	6 bulan	+
4	01.19	April 2020	2 bulan	±
5	03.19	Agustus 2020	-	+

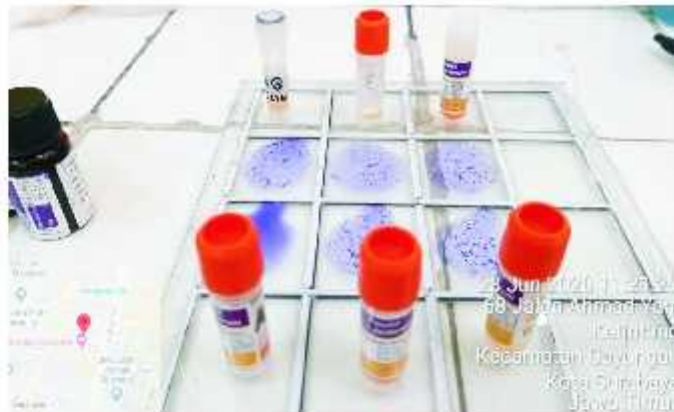
\*) sampai dengan saat diuji pada tanggal 23 Juni 2020

#### IV. PEMBAHASAN

Serum-serum yang diuji, diambil secara acak dari freezer penyimpanan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Serum tersebut merupakan sampel per tinggal dari setiap batch produksi. Antigen yang digunakan untuk menguji serum adalah Antigen Salmonella pullorum® batch B201CA03 yang diproduksi tahun 2020 dengan masa kedaluwarsa hingga bulan Juni 2022. Serum-serum ini diuji pada tanggal 23 Juni 2020. Antigen Salmonella pullorum® ini sudah teregistrasi dengan nomor registrasi D.1802528 VKC.3.

Hasil pengujian Serum Positif Salmonella pullorum menunjukkan bahwa 4 serum yang kedaluwarsa pada bulan Maret 2017, Maret 2018, dan Desember 2019 dan Agustus 2020 menunjukkan adanya aglutinasi jelas dengan cairan jernih di sekitarnya sedangkan 1 serum yang kedaluwarsa pada bulan April 2020 membentuk aglutinasi dubius (±) yaitu Serum Positif Salmonella pullorum batch 01.19. Aglutinasi dubius menandakan aglutinasi lemah dan tidak sempurna. Aglutinasi tidak sempurna disebabkan oleh ketidakseimbangan jumlah antigen dan antibodi. Konsentrasi antigen yang terlalu tinggi justru mengakibatkan reaksi aglutinasi negatif dikenal dengan istilah post-zone effect, demikian pula jika konsentrasi antibodi yang terlalu tinggi juga akan menghambat reaksi aglutinasi atau dikenal sebagai pro-zone effect. Dalam penelitian lebih lanjut, Stavitsky (1998) menemukan bahwa aglutinasi dipengaruhi oleh banyak faktor yaitu kekuatan ikatan ionik, suhu dan viskositas medium.





**Gambar I.** Agglutinasi pada uji Serum Positif *Salmonella pullorum*

Reaksi aglutinasi merupakan reaksi imunologis yang terjadi pada antigen dan antibodi spesifik secara *in vitro*. Aglutinasi terjadi dalam dua tahap yaitu reaksi antigen dan antibodi pada permukaan sel dan terbentuknya agregat partikel (Stavitsky, 1998). Antibodi merupakan salah satu komponen yang terdapat dalam serum. Serum merupakan bagian cairan darah tanpa faktor pembekuan dan sel darah, hal ini yang membedakan antara serum dan plasma, sehingga serum memiliki protein 3-4% lebih sedikit dibanding plasma. Plasma mengandung 22 jenis protein yang merupakan 99% dari total protein yaitu albumin, Ig G, transferrin, fibrinogen, Ig A dan lain sebagainya (Correia, 2010). Makromolekul utama penyusun serum adalah protein yang terdiri dari 60% albumin, 18 % globulin, dan sisanya adalah hormon, dan enzim. Protein globulin berperan dalam membawa zat besi dan melawan infeksi karena dalam globulin terdapat gamma globulin. Gamma globulin merupakan protein dengan muatan negatif lemah yang berfungsi sebagai antibodi. Selain untuk melawan infeksi, antibodi juga berfungsi untuk diagnosis suatu penyakit.

Gislefoss (2009) menyatakan bahwa immunoglobulin G dan E yang disimpan pada suhu  $-25^{\circ}\text{C}$  selama 25 tahun tetap stabil dan tidak mengalami penurunan aktifitas dibandingkan serum yang disimpan selama 2 tahun dan 1 bulan. IgG tidak mengalami proteolisis pada suhu  $-22^{\circ}\text{C}$ , sedangkan pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$  terjadi proteolisis ringan. Proteolisis semakin meningkat dengan cepat seiring dengan pertambahan suhu yaitu pada suhu  $24^{\circ}\text{C}$  dan  $37^{\circ}\text{C}$ .

Suhu penyimpanan yang berubah-ubah akan meningkatkan aktivitas proteolisis (Finlayson and Armstrong, 1972).

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

Serum Positif *Salmonella pullorum* yang disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  masih tetap stabil hingga 40 bulan setelah melewati masa kedaluwarsa. Penggunaan serum secara berulang sebaiknya dilakukan aliquot agar menghindari terjadinya perubahan suhu pada serum.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2001. *The Merck Veterinary Manual 11th Edition*. Merck & Co, Inc. Rahway, New Jersey, USA.
- Charlton, B.R., A.J. Bernudez, M. Boulianne, D.A. Halvorson, J.S. Jeffrey, L.J. Newman, J.F. Sander and P.S. Wakenell. 2000. *Avian Disease Manual 5th Edition*. The American Association of Avian Pathologist Kennet Square, Pennsylvania.
- Correia, I. (2010). *Stability of IgG isotypes in serum*. mAbs, 2(3), 221–232. doi:10.4161/mabs.2.3.11788
- Direktur Kesehatan Hewan. 2014. *Manual Penyakit Unggas*. Direktorat Kesehatan Hewan. Direktorat Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian. Jakarta
- Finlayson, J. S., & Armstrong, B. L. 1972. *Stability of Immunoglobulin G During Storage of Human Serum*. Effects of Prior Heating. Vox Sanguinis, 23(3), 222–227. doi:10.1111/j.1423-0410.1972.tb04009.x
- Gislefoss, R. E., Grimsrud, T. K., & Mørkrid, L. 2009. *Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 47 (5). doi:10.1515/cehm.2009.121
- Graham, W. 1995. *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Greaves, R. I. N. 1968. *Serum-plasma preservation*. Cryobiology, 5(1), 76–86. doi:10.1016/s0011-2240(68)80147-6
- Pegg, D. E. (1976). *Long-term preservation of cells and tissues: a review*. Journal of Clinical Pathology, 29 (4), 271–285. doi:10.1136/jcp.29.4.271
- Stavitsky, A. B. 1998. *Agglutination*. Encyclopedia of Immunology, 56–59. doi:10.1006/rwci.1999.0016 <https://doi.org/10.1006/rwci.1999.0016>

## PENGARUH WAKTU INKUBASI DALAM OPTIMASI ANTIGEN ANTHRAX PUSVETMA

Petri Nandatina Saputri<sup>1</sup>, Febri Hartanti<sup>1</sup>, Wiwin Sri Utami<sup>1</sup>

<sup>1</sup>PUSAT VETERINER FARMA

### ABSTRAK

Kit ELISA anthrax merupakan perangkat uji untuk mengetahui titer antibodi paska vaksinasi. Pusvetma telah melakukan pengembangan kit ELISA anthrax melalui beberapa tahap pengujian. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui waktu inkubasi yang sesuai dalam optimasi pembuatan antigen anthrax dan meningkatkan kualitas Kit ELISA Anthrax Pusvetma. Berdasarkan hasil penelitian, waktu inkubasi terbaik adalah 24 jam. Antigen anthrax pada larutan D (antigen yang diinkubasi selama 24 jam) mempunyai kandungan protein yang paling besar yaitu 2,99 mg/ml sehingga dapat digunakan untuk coating kit, namun memerlukan proses memerlukan purifikasi lebih lanjut untuk meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas kit.

Kata Kunci : anthrax, elisa, antigen, inkubasi, kit.

### I. PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang Masalah

Anthrax adalah salah satu penyakit zoonosis, dapat menyerang hewan dan manusia yang disebabkan oleh kuman *Bacillus anthracis*. Bakteri tersebut menetap di tanah dalam bentuk spora yang tahan dalam cuaca/suhu ekstrim. Spora tahan terhadap kekeringan untuk jangka waktu yang lama, bahkan didalam tanah dapat tahan sampai berpuluh-puluh tahun.

*Bacillus anthracis* termasuk ke dalam famili *Bacillaceae*. *Bacillus anthracis* adalah bakterium Gram-positif aerob berbentuk batang lurus dengan ujung siku, membentuk rantai panjang dalam biakan. Dalam jaringan tubuh tidak pernah terlihat rantai panjang, biasanya tersusun secara tunggal atau dalam rantai pendek dari 2-6 mikroorganisme, berselubung (berkapsul) dan kadang-kadang satu selubung melingkupi beberapa organisme. Bakteri anthrax bersifat aerob, membentuk spora yang letaknya sentral bila cukup oksigen (Anonim, 2012)

*Bacillus anthracis* di luar tubuh inang akan bersporulasi pada suhu 14–42°C dengan suhu optimum 21–37°C. Spora *B. anthracis* berbentuk oval dan dilepaskan setelah bakteri lisis. Sporulasi terjadi dalam waktu 48 jam dan akan terhambat jika pada konsentrasi CO<sub>2</sub> yang tinggi. Spora anthrax akan mengalami germinasi menjadi bentuk vegetatif bila masuk ke dalam lingkungan yang kaya nukleotida, asam amino dan glukosa, seperti yang ditemukan dalam darah dan jaringan binatang atau manusia. Misra (1991) mengatakan isolat *B. anthracis* yang virulen yang tumbuh pada media NA pada suhu 37°C dengan kondisi normal memproduksi *frosted glass* - koloni yang kasar dengan tipe kepala medusa, sementara strain virulen yang tumbuh pada 50%. Media agar serum kuda dan diinkubasi pada 37°C dengan kondisi 30% - 50 % CO<sub>2</sub> memproduksi koloni yang halus dengan bentuk yang terdefinisi. Koloni ini kemudian dipasaskan berulang pada tikus putih dan marmut, namun tidak merubah karakteristiknya dan tidak berubah menjadi virulen. Walaupun tidak ada jejak kapsul yang terbentuk, pemakaian dosis tinggi dapat menyebabkan kematian tikus putih dan marmut. Isolat 34F2 Sterne ini stabil dan tidak dapat membentuk kapsul secara in vitro sehingga aman bagi hewan, dan akan meningkatkan respon imun selama setahun. Sehingga untuk produksi antigen dan vaksin anthrax dapat menggunakan isolat ini.

Faktor virulensi *B. anthracis* berasal dari kapsul dan toksin. Kapsul dari *B. anthracis* terdiri dari *poly D-glutamic acid* yang tidak berbahaya (non toksik) bagi dirinya sendiri dan dihasilkan oleh plasmid pX02. Kapsul ini berfungsi untuk melindungi sel dari fagositosis dan lisis. Toksin *B. anthracis* berasal dari plasmid pX01 yang memiliki AB model (*activating* dan *binding*). Toksin *B. anthracis* terdiri dari tiga jenis, yaitu *protective antigen* (PA) yang berasal dari kapsul *poly D- glutamic acid*, *edema factor* (EF), dan *lethal factor* (LF). Secara individual, ketiga toksin ini tidak bersifat toksik tetapi dapat bersifat toksik bahkan letal (mematikan) jika ada dua atau lebih. Toksin PA dan LF akan mengakibatkan aktivitas yang letal, EF dan PA akan mengakibatkan penyakit edema (nama lain dari penyakit anthrax), toksin EF dan LF akan saling merepresi (inaktif), sedangkan jika ada ketiga toksin tersebut (PA, LF, dan EF), maka akan mengakibatkan edema, nekrosis dan pada akhirnya mengakibatkan kematian (letal) (Dixon et.al., 1999).

Anthrax menyebabkan banyak kematian pada ternak dan menyebabkan kerugian yang sangat besar, sehingga diperlukan penanganan, pengendalian dan pencegahan penyakit yang cepat dan tepat. Keberhasilan strategi vaksinasi dapat diukur melalui titer antibody yang dihasilkan. Pengujian serologis penyakit anthrax hingga saat ini belum tersedia, hal inilah yang mendorong Pusvetma mengembangkan produk kit ELISA Anthrax untuk memenuhi kebutuhan Kit Diagnostik Anthrax.

## **I.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka dapat disusun rumusan permasalahan yaitu apakah perbedaan lama waktu inkubasi dapat mempengaruhi kandungan protein dalam optimasi pembuatan antigen Anthrax?

## **I.3. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui waktu inkubasi yang sesuai dalam optimasi pembuatan antigen anthrax dan meningkatkan kualitas Kit ELISA Anthrax Pusvetma.

## **I.4. Manfaat**

ELISA merupakan salah satu uji diagnosa serologis secara screening yang sangat bermanfaat dalam suatu kelompok populasi hewan. Penyakit anthrax merupakan penyakit zoonosis dengan kerugian ekonomi yang tinggi sehingga diperlukan uji cepat untuk penentuan tindakan dan kebijakan yang harus diambil berikutnya, sehingga Pusvetma mengembangkan Kit ELISA Anthrax ini sebagai jawaban atas kebutuhan konsumen.

# **I. MATERI DAN METODE**

## **II.1. ALAT DAN BAHAN**

Alat yang dipakai dalam uji ini adalah stirrer, vortex, inkubator, *Biosafety Cabinet* (BSC), sentrifus, spuit, multichannel pipet, single channel pipet, fintip, freezer, refrigerator, botol Erlenmeyer, gelas ukur, elisa washer, elisa reader.



Bahan yang dipakai dalam uji ini adalah Isolat *Bacillus anthracis* 34F2, Media RPMI / DMEM, Nutrient Agar, Agar Darah Domba 5 %, Nutrient Broth, BHI Broth, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Ammonium Sulfat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Serum Positif, *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7.4, Serum negatif, Carbonat buffer pH 9,6, dialysis tube, Skim milk, TMB, NaCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Mikroplate, Protein G, Plastik Adsorben, Aquadest.

## III.2. METODE PENELITIAN

### III.2.1 PROSEDUR PEMBUATAN ANTIGEN ANTHRAX

Metode optimasi antigen Anthrax ini dilakukan dengan melakukan inkubasi pada waktu yang berbeda.

- A. Inkubasi selama 12 jam
- B. Inkubasi selama 18 jam
- C. Inkubasi selama 21 jam
- D. Inkubasi selama 24 jam

Prosedur kerja merupakan pengembangan metode oleh Tarigan (2005). Isolat kuman *B. anthracis* diinokulasikan pada medium RPMI / DMEM (10 plate dalam 500 ml), selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C sesuai perlakuan pada tabel di atas. Setelah itu disentrifugasi 4000 rpm 45 menit, supernatan diambil dan pelet dibuang. Supernatan disaring dengan filter 0.22 µm, kemudian dipresipitasi menggunakan ammonium sulfat 35% (atau 70% ammonium sulfat jenuh) sambil distirer selama 30 – 60 menit, dan di diamkan semalam pada suhu 4°C (atau 2 jam pada suhu 4°C). Supernatan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 4000 rpm 45 menit, supernatant dibuang. Pelet dilarutkan dengan Tris-EDTA pH 7.4 dan didialisa dengan menggunakan buffer yang sama. Hasil dialisa selanjutnya diukur konsentrasi toksinnya dan dilakukan titrasi sebelum digunakan untuk elisa.

### III.2.2 PROSEDUR SPEKTROFOTOMETRI

Sampel di ambil 2 mg dari larutan pertama, dan di buat pengenceran per ana sampai dengan 0,25. Kemudian dari masing masing sampel di ambil 0,1 ml dan di masukkan ke dalam tabung,

Dalam masing-masing tabung pengenceran di masukkan 3 ml larutan Bradford selanjutnya di inkubasi selama 15 menit. Langkah berikutnya adalah mengambil sampel antigen sebanyak 100  $\mu$ m dan dimasukkan ke tabung Bradford. Pembacaan tes dengan alat Beckman culture pada panjang gelombang 950.

### III.2.3. PENGUJIAN SECARA ELISA

Langkah pertama adalah melakukan *Coating* (pelapisan) Ag PUSVETMA dengan pengenceran 1 : 3200 (pengencer = carbonat buffer) pada mikroplate sebanyak 50  $\mu$ l setiap sumuran, kemudian mikroplate di tutup dan di inkubasi di suhu 4 °C selama 24 jam. Setelah inkubasi di lakukan Blocking dengan PBST 0,05 % dan susu skim 2% sebanyak 50  $\mu$ l setiap sumuran, inkubasi 1 jam pada suhu ruang dan dihomogenisasi. Setelah Inkubasi dapat di lakukan pencucian dengan PBST volume 200  $\mu$ l setiap sumuran 4-5 kali dan di *tapping*.

Setelah Mikropate terlapisi, di lanjutkan dengan pengenceran serum kontrol negatif, serum sampel 1:200 menggunakan PBST skim 1 %, kemudian di lakukan pengenceran serum kontrol positif dengan PBST skim 1 % dengan 1/200 sebagai positif tinggi, 1/800 sebagai positif medium dan 1/3200 positif rendah menggunakan PBST skim 1 %. Langkah berikutnya adalah memasukkan serum kontrol positif, kontrol negatif dan serum sampel ke dalam sumuran mikroplate sebanyak 50  $\mu$ l (duplo) dan di inkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Setelah inkubasi di lakukan pencucian dengan PBST volume 200  $\mu$ l setiap sumuran 4-5 kali dan *tapping*. Konjugat Protein G Thermo scientific-Invitrogen ditambahkan dengan pengenceran 1 : 8000 pelarut PBST skim 1% sebanyak 50  $\mu$ l setiap sumuran, inkubasi pada suhu ruang selama 60 menit dan dihomogenisasi, setelah itu dilakukan pencucian menggunakan PBST volume 200  $\mu$ l setiap sumuran 4-5 kali dan *tapping*. Proses selanjutnya, penambahan larutan substrat (TMB) 50  $\mu$ l setiap sumuran, dan di inkubasi di suhu ruang selama 30 menit. Penambahan stopper dilakukan bila terjadi perubahan warna, waktu dapat diperpanjang jika reaksi lambat.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kuman anthrax yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *Bacillus anthracis* 34F2. Isolat ini tidak mempunyai kapsul sehingga avirulen dan digunakan sebagai isolat untuk vaksin dan antigen anthrax (Misra,1991). Suspensi anthrax yang digunakan  $10^6 - 10^7$  CFU/ml sesuai syarat OIE, 2012. Media RPMI digunakan sebagai media pengkayaan untuk pertumbuhan kuman. Pengamatan perlakuan dilakukan pada setiap tahap metode kerja di atas. Terdapat perbedaan warna media pada perlakuan A, B, C, D setelah diinokulasi di media RPMI, perlakuan A dan B tidak menunjukkan perubahan warna yang nyata yang dapat diartikan pertumbuhan kuman tidak optimal. Namun pada perlakuan C dan D terlihat perubahan warna. Setelah sentrifus dan filter, setiap perlakuan mengalami tahap yang sama sampai dengan proses Spektrofotometri. Berikut adalah hasil spektrofotometri masing – masing perlakuan

**Tabel I.** Kandungan protein antigen antraks pusvetma

Larutan A	0,25 mg/ml
Larutan B	0,42 mg/ml
Larutan C	0,84 mg/ml
Larutan D	2,99 mg/ml

**Tabel II.** Hasil uji ELISA

PERILAKUAN	OD		RERATA
	A	B	
A	0,610	0,893	0,752
B	0,604	0,616	0,610
C	1,218	1,203	1,211
D	1,498	1,459	1,479

Antigen anthrax pada larutan D mempunyai kandungan protein yang paling besar yaitu 2,99 mg/ml apabila dikonversikan menjadi mega dalton memiliki ukuran  $1,8 \times 10^5$  Mda. Kandungan protein tertinggi baik bila digunakan sebagai bahan antigen, dalam penggunaannya sebagai antigen kit disesuaikan dengan kebutuhan.

Faktor virulensi berasal dari kapsul dan toksin. Kapsul *B. anthracis* dihasilkan oleh plasmid pX02 dan berfungsi untuk melindungi sel dari fagositosis dan lisis. Toksin *B. anthracis* berasal dari plasmid pX01 yang terdiri dari tiga jenis, yaitu protective antigen (PA), edema factor (EF), dan lethal factor (LF) (Dixon.,et.al. 1999). Ukuran plasmid anthrax pX01 adalah 110 Mda dan pX02 60 Mda. pX01 terdiri dari 3 toksin anthrax yaitu, Prokterktif antigen (83 kDa), faktor edema (89 Kda) dan Faktor lethal (90,2 Kda). PX02 merupakan plasmid yang mengkode kapsul sehingga antigen anthrax PUSVETMA tidak memilikinya. Ukuran plasmid pX01 terlalu besar untuk dicoatingkan sehingga harus diekstraksi dan dipurifikasi terlebih dahulu supaya lebih stabil dan lebih sensitif. Untuk meningkatkan jumlah toksin per ml atau per koloni kuman dapat lebih digunakan inkubasi dengan CO<sub>2</sub>.

## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### VI.1. Kesimpulan :

Dari hasil penelitian kandungan protein tertinggi antigen anthrax di hasilkan pada waktu inkubasi 24 jam.

### VI.2. Saran :

Di perlukan beberapa perubahan metode pembuatan antigen anthrax antara lain :

1. Inkubasi antigen dalam inkubator CO<sub>2</sub>,
2. Kecepatan sentrifus lebih ditingkatkan menjadi 10000 rpm
3. Waktu inkubasi di tambah sampai tidak menunjukkan peningkatan jumlah protein yang di dapat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2012, *Manual Penyakit Hewan Mamalia, Anthrax*, Dirjen Peternakan
- Dixon, T.C, Meselson M, Guillemin J and Hanna PC. 1999. *Anthrax*. N Engl J Med. 341(11):815-26
- Merck, 2013, *Anthrax : Introduction, The Merck Veterinary Manual*. [www.merckvetmanual.com/mvm/htm/bc/50400.htm](http://www.merckvetmanual.com/mvm/htm/bc/50400.htm)
- Misra, 1991, *Manual for the production of anthrax and blackleg vaccines*
- OIE, 2012, *OIE Manual Anthrax, Section 2.1, chapter 2.1.1*, [www.oie.int/2.01.01\\_ANTHRAX.pdf](http://www.oie.int/2.01.01_ANTHRAX.pdf)
- Tarigan, et. Al. 2005, *Produksi dan Purifikasi Antigen Protektif Bacillus Anthracis*, Balai Penelitian Veteriner
- WHO/OIE/FAO.2008. *Anthrax in Human and Animals, 4th edition*, [www.who.int/entity/csr/resources/publication/AnthraxGuidelines2008/en](http://www.who.int/entity/csr/resources/publication/AnthraxGuidelines2008/en)



# BBVF PUSVETMA



**PENGEMBANGAN VAKSIN AFLUVET HILOW, KOMBINASI HIGHLY  
PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA (HPAI) H5N1 DAN LOW  
PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA (LPAI) H9N2  
TAHAP I**

Murtining Dyah K<sup>1</sup>, Yanita Anjar P<sup>1</sup>, Rinasti Rida P<sup>1</sup>, Bambang Erwan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Veteriner Farma

**ABSTRAK**

Virus LPAI H9N2 West Java dari BBLITVET dan virus HPAI H5N1 clade 2.3.2 Semarang digunakan sebagai benih vaksin kombinasi LPAI HPAI. Benih virus dengan nilai  $EID_{50}$  minimal  $10^{6.5}$ , digunakan sebagai *working seed*. Virus HPAI diperoleh titer  $EID_{50}/0,1$  sebesar  $10^{7.5}$  dan LPAI sebesar  $10^{6.5}$  lalu allantois diformulasikan dengan 2 formulasi yang berbeda. Pengujian mutu vaksin dilakukan sesuai standar FOHI. Uji fisik dengan melihat warna, volume, homogenitas dan ada tidaknya partikel asing. Uji sterilitas dilakukan pada media TGC, SCD dan HIA lalu diinkubasi pada suhu 37°C dan 22°C selama 14 hari. Uji stabilitas emulsi dilakukan dengan cara melihat stabilitas emulsi vaksin di suhu 37°C selama 14 hari. Uji inaktivasi dilakukan dengan cara TAB diinokulasi vaksin lalu diuji HA dan dilakukan 2 kali pasase apabila tidak ada pertumbuhan virus berarti inaktif. Uji keamanan menggunakan 20 ekor ayam SAN umur 21-28 hari, 10 ekor divaksinasi dan sisanya tidak, apabila ayam tidak menunjukkan gejala abnormal, vaksin telah memenuhi syarat. Pada uji potensi digunakan 20 ekor ayam umur 21-28 hari yang dibagi dalam 2 kelompok. Satu kelompok divaksin dan sisanya tidak divaksin. Serum ayam diambil pada minggu ke 3, dan 4 pasca vaksinasi lalu dilakukan uji HI. Vaksin Afluvet Hilow memenuhi semua standar uji FOHI kecuali uji potensi. Hasil uji vaksin Afluvet formula A dan B menunjukkan hasil titer antibodi untuk LPAI masih belum memenuhi persyaratan mutu sedangkan untuk HPAI sudah memenuhi standar mutu.

Kata kunci : ayam, HPAI, LPAI, vaksin, Virus LPAI H9N2 West Java, H5N1 clade 2.3.2

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Konsumsi daging ayam ras dan telur ayam di Indonesia mengalami kenaikan sepanjang 10 tahun terakhir ini. Produksi ayam pedaging dan telur ayam dari tahun 2009 – 2019 mengalami peningkatan setiap tahunnya (BPS 2020). Dengan pesatnya perkembangan produksi ayam pedaging dan petelur tidak terlepas dari upaya pencegahan dan pemberantasan penyakit unggas. Penyakit unggas yang masih menjadi momok bagi peternak adalah Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) adalah penyakit virus flu burung yang ganas, menular dan mematikan dan Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) adalah penyakit flu burung yang sangat menular dan menyebabkan penurunan produksi telur >50% dan penurunan berat karkas.

Kedua penyakit 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.

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

Virus H9N2 adalah salah satu virus *Avian Influenza* (AI) bersifat zoonosis yang memiliki sifat keganasan rendah pada unggas sehingga digolongkan dengan kelompok *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) (OIE, 2018). Virus ini telah diidentifikasi di beberapa wilayah di dunia seperti di Asia dan Afrika serta menyebabkan kerugian ekonomi yang besar karena menyebabkan gangguan pertumbuhan, infertilitas dan penurunan produksi telur (WHO 2020).

Virus isolat lokal *avian influenza* subtipe H9N2 *West Java* diperoleh dari BBLitvet. Virus isolat lokal *avian influenza* subtipe H9N2 (A/chicken/WestJava/BBLitvet-RI/2017) ini berasal dari Kabupaten Purwakarta di Propinsi Jawa Barat. Sekuen asam amino di *cleavage site* protein HA menunjukkan virus *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) yaitu PSRSSR//GLF (BBLitvet, 2017).

Strategi pengendalian penyakit yang diterapkan untuk negara berkembang seperti Indonesia dan daerah endemis HPAI dan LPAI selain biosekuriti adalah dengan vaksinasi. Vaksinasi AI H5N1 pada unggas mampu mencegah gejala klinis dan penyakit dan mencegah serta mengurangi jumlah *shedding* virus secara signifikan, yang dapat menjadi sumber infeksi bagi unggas lain (Lee & Suarez, 2005).

Pembuatan kombinasi vaksin inaktif HPAI dan LPAI isolat lokal, bertujuan untuk pencegahan kematian dan penurunan produksi pada unggas. Pengembangan kombinasi virus HPAI dan LPAI dalam satu vaksin, diharapkan dapat memenuhi syarat mutu sesuai standar Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOIH) 2018 sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan dan mencegah penyakit *avian influenza* pada ayam di Indonesia.

## II. MATERI DAN METODE

### 2.1 Materi

Bahan untuk produksi adalah virus AI H9N2 *West Java* dari BBLITVET, virus AI H5N1 *clade 2.3.2 Semarang*, Telur Ayam Bertunas (TAB) umur 9 - 11 hari; kapas, alkohol 70%, PBS-, bahan inaktivan, adjuvan, ayam SAN umur 21 - 28 hari, media untuk uji sterilitas: *Heart Infusion Agar* (HIA), *Thioglycolate broth* (TGC), *Soybean Casein Digest* (SCD); RBC, antigen AI H5N1 *clade 2.3.2 Semarang*, antigen H9N2 *West Java*.

Alat untuk produksi adalah inkubator telur, spuit *disposable* ukuran 1 ml dan 3 ml, mikroplate, *multichannel* pipet, mikrotip, *vortexmixer*, erlenmeyer, gelas beker, botol laboratorium, tabung gelas ukuran 10 ml, tabung gelas ukuran 20 ml, gelas ukur ukuran 50 ml, rak tabung, timbangan, centrifuge, inkubator, Bio Safety Cabinet (BSC), botol vaksin, *magneticstirer*, *magneticbar*; tabung gelas ukuran 10 ml, rak tabung, timbangan, sentrifus, inkubator, spuit *disposable*, mikroplate, *multichanel* pipet, vintip, *vortexmixer*.

### 2.2 Metode

#### a. Pembuatan Vaksin

TAB umur 9 - 11 hari diinokulasi dengan virus H5N1 yang memiliki EID  $50 > 10^{5.1}$  lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 36 jam, pembuatan bulk H9N2 dilakukan dengan menginokulasi TAB yang berumur 9-10 hari dengan seed virus H9N2 (A/chicken/WestJava/BBLitvet-RI/2017) yang memiliki EID  $50 > 10^{5.1}$  lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari.

TAB dimasukkan ke chiller setelah masa inkubasi berakhir, kemudian dilakukan uji HA terhadap cairan allantois untuk mengetahui titer HA. Cairan allantois hasil panen ditambah bahan inaktivan formalin, kemudian dihomogenisasi pada suhu ruang selama 48 jam. Cairan allantois yang telah dinaktif dapat dilanjutkan ke proses formulasi vaksin.

Penelitian ini digunakan 2 formula vaksin dengan komposisi yang berbeda. Vaksin dengan formula A (Vaksin A) diproduksi sebanyak 1000 dosis yang terdiri dari 25 ml kultur virus AI H5N1 *clade 2.3.2* inaktif, 25 ml kultur virus AI H9N2 *West Java* inaktif, 350 ml adjuvan, dan 100 ml *Phospat Buffer Saline* (PBS). Vaksin formula B (Vaksin B) diproduksi sebanyak 250 dosis yang terdiri dari 12,5 ml kultur virus AI H5N1 *clade 2.3.2* inaktif, 12,5 ml kultur virus AI H9N2 *West Java* inaktif, 87,5 ml adjuvan, dan 12,5 ml (PBS). Formulasi tersebut dilakukan setelah kultur virus dalam allantois inaktif.

Adjuvan dihomogenkan, kemudian ditambahkan cairan allantois yang berisi kultur virus inaktif dan PBS, sambil dihomogenisasi sampai terbentuk emulsi. Setelah terbentuk emulsi dilakukan pembotolan secara aseptis dalam BSC (*Bio Safety Cabinet*).

#### b. Pengujian mutu vaksin

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

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

Dari keempat tabung uji, 2 tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 14 hari dan 2 tabung yang lain diinkubasi pada suhu 22°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.

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 (Bain *et al.*, 1982).

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.

Uji keamanan menggunakan 20 ekor ayam umur 21-28 hari. Sepuluh ekor ayam dilakukan vaksinasi masing-masing 2 dosis secara 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.

Uji potensi menggunakan 20 ekor ayam umur 21-28 hari yang dibagi dalam 2 kelompok. Kelompok perlakuan (KP) terdiri dari 10 ekor ayam yang masing-masing divaksin sebanyak 1 dosis secara IM dan kelompok kontrol (KK) terdiri dari 10 ekor ayam tanpa vaksinasi. Serum diambil pada minggu ke 3, dan 4 setelah vaksinasi dan diuji titer antibodinya menggunakan uji hambatan aglutinasi (HI).



### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Vaksin Afluvet HiLow diproduksi dengan 2 formula/komposisi yang berbeda. Sebelum virus digunakan untuk produksi vaksin, dilakukan penentuan  $EID_{50}$  dan pengukuran titer. Pengukuran titer virus sebelum dan sesudah penambahan inaktivan dilakukan menggunakan metode uji IIA. Penentuan titer virus ini bertujuan untuk menentukan titer virus yang akan diperbanyak dalam TAB sebagai bahan baku vaksin. Kandeil (2007) melakukan pembuatan vaksin AI dengan titer  $10^{7.5}$   $EID_{50}/0.1$  ml, vaksin ini mampu menimbulkan titer antibodi protektif dalam satu kali vaksinasi. Penelitian tersebut menyatakan bahwa ayam yang divaksinasi mampu bertahan setelah ditantang dengan virus ganas dengan titer  $10^6$   $EID_{50}/ml$  tanpa menunjukkan gejala abnormal dan tidak terjadi *shedding* virus baik pada swab kloaka maupun swab oral. Penelitian ini, diperoleh titer  $EID_{50}/0.1$  ml untuk virus HPAI sebesar  $10^{9.7}$  dan LPAI sebesar  $10^{5.7}$  sehingga diharapkan dapat menimbulkan protektifitas pada ayam yang divaksin.

Vaksin Afluvet HiLow harus memenuhi standar baku mutu sebelum dapat didaftarkan secara legal. Standar baku mutu yang digunakan sebagai acuan adalah FOII. Vaksin harus memenuhi standar uji fisik, uji sterilitas, uji stabilitas emulsi, uji inaktivasi, uji keamanan dan uji potensi secara serologis.

Warna vaksin, homogenitas, volume dan keberadaan partikel asing merupakan unsur-unsur yang harus diamati pada uji fisik. Vaksin Afluvet HiLow formula A dan B berwarna putih, homogen, mempunyai volume sama pada tiap botol yang diuji, dan tidak mengandung partikel asing dalam vaksin seperti yang terdapat pada Gambar I. Hal ini sudah memenuhi persyaratan mutu uji fisik yang ditetapkan dalam FOII 2018.



Gambar I. Uji fisik vaksin Afluvet HiLow

Hasil uji sterilitas vaksin Afluvet HiLow formula A dan B 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.

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

Vaksin Afluvet HiLow merupakan vaksin inaktif, untuk itu perlu dilakukan uji inaktivasi untuk mengetahui apakah virus dalam vaksin sudah inaktif. Uji inaktivasi vaksin Afluvet HiLow formula A dan B, tidak menunjukkan adanya pertumbuhan virus AI yang dapat dilihat melalui perubahan embrio maupun uji IIA.

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 batas aman dosis vaksin yang diaplikasikan pada hewan.

Vaksin Afluvet HiLow harus memenuhi persyaratan uji potensi sesuai standar mutu FOHI 2018. Uji potensi ini bertujuan untuk mengetahui titer antibodi yang terbentuk pada hewan uji setelah vaksinasi.

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 Biosafety Level 3* (ABSL-3).

Hasil uji potensi menunjukkan bahwa vaksin Afluvet HiLow belum memenuhi standar mutu. Hasil uji vaksin Afluvet formula A dan B menunjukkan hasil titer antibodi untuk LPAI masih belum memenuhi persyaratan mutu sedangkan untuk IHPAI sudah memenuhi standar mutu. Titer antibodi terhadap virus AI H9N2 (LPAI) vaksin formula A dan B masing-masing 10%, hanya 1 ekor dari 10 ekor ayam perlakuan yang mempunyai titer antibodi lebih dari  $2^5$ . Persyaratan untuk uji potensi serologis terhadap LPAI adalah 100% ayam perlakuan mempunyai titer antibodi lebih dari  $2^7$ . Sedangkan untuk titer antibodi terhadap virus AI H5N1 (HPAI) vaksin formula A dan B masing-masing adalah 90% dan 100%. Sebanyak 90% ayam kelompok perlakuan yang divaksin dengan vaksin formula A mempunyai titer antibodi lebih besar dari 1:16 ( $2^4$ ) dan 100% ayam kelompok perlakuan yang divaksin dengan vaksin formula B mempunyai titer antibodi lebih besar dari 1:16 ( $2^4$ ).

**Tabel I.** Hasil Uji Potensi Vaksin Afluvet HiLow

No Ayam	Titer Antibodi							
	Vaksin A				Vaksin B			
	IHPAI		LPAI		IHPAI		LPAI	
	KP	KK	KP	KK	KP	KK	KP	KK
1	$2^7$	$2^0$	$2^4$	$2^1$	$2^8$	$2^1$	$2^7$	$2^1$
2	$2^8$	$2^0$	$2^3$	$2^1$	$2^8$	$2^0$	$2^6$	$2^0$
3	$2^8$	$2^2$	$2^3$	$2^0$	$2^8$	$2^0$	$2^6$	2
4	$2^7$	$2^0$	$2^1$	$2^0$	$2^7$	$2^2$	$2^6$	$2^5$
5	$2^{>9}$	$2^0$	$2^6$	$2^1$	$2^8$	$2^2$	$2^8$	$2^2$
6	$2^7$	$2^1$	$2^5$	$2^0$	$2^7$	$2^0$	$2^6$	$2^0$
7	$2^8$	$2^0$	$2^6$	$2^0$	$2^7$	$2^0$	$2^5$	$2^0$
8	$2^9$	$2^0$	$2^4$	$2^2$	$2^7$	$2^0$	$2^5$	$2^0$
9	mati	$2^0$	mati	$2^0$	$2^7$	$2^1$	$2^5$	$2^0$
10	$2^{>9}$	$2^1$	$2^7$	$2^0$	$2^8$	$2^2$	$2^8$	$2^0$

Keterangan :

KK : Kelompok kontrol

KP : Kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil uji terhadap vaksin Afluvet HiLow formula A dan B, dapat dinyatakan bahwa vaksin tersebut belum memenuhi persyaratan uji sesuai standar FOHI karena belum memenuhi persyaratan uji potensi terhadap LPAI. Rekapitulasi hasil uji terdapat pada Tabel 2. Keberhasilan vaksinasi tergantung pada beberapa faktor, menurut Plotkin (2018), respon imun dapat dipengaruhi oleh maternal antibodi, sifat dan dosis antigen, jenis antigen, cara pemberian, jadwal pemberian, adjuvan, pengawet, serta antibiotik yang ada didalam vaksin. Dapat dipengaruhi juga oleh factor penerima vaksin, seperti faktor genetik, jenis kelamin, umur, status gizi dan penyakit penyerta lain yang dapat mempengaruhi system kekebalan. Rendahnya titer antibodi terhadap LPAI pada ayam uji, kemungkinan dipengaruhi sifat dan dosis antigen, karena antibodi terhadap LPAI dapat terbentuk dengan baik. Dosis antigen yang terlalu rendah atau terlalu tinggi dapat mempengaruhi respon imun yang dihasilkan. Ketika dosis terlalu tinggi, maka akan menghambat respon imun yang diharapkan, sedangkan jika dosis terlalu rendah tidak akan merangsang sel-sel imunokompeten.

#### IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil pengujian mutu Vaksin Afluvet HiLow formula A dan B masih belum memenuhi persyaratan uji sesuai standar FOHI. Vaksin Afluvet HiLow formula A dan B belum memenuhi persyaratan lulus uji potensi, hanya 10% ayam uji mempunyai titer antibodi  $2^7$ .

Perlu dilakukan penelitian perbaikan formula vaksin agar memenuhi standar uji mutu vaksin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 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.
- Anonim. 2020. *Human infection with avian Influenza A(H5) viruses*. *Avian Influenza Weekly Update Number 724*. World Health Organization : Western Pacific Region.
- Anonim. 2020. *Produksi Daging Ayam Ras Pedaging menurut Provinsi, 2009-2019*. [https://www.bps.go.id/linkTableDinamis/view/id/1064\\_Toc52539432](https://www.bps.go.id/linkTableDinamis/view/id/1064_Toc52539432)
- Anonim. 2020. *Produksi Telur Ayam Petelur menurut Provinsi, 2009-2018*. <https://bps.go.id/linkTableDinamis/view/id/1079>.
- 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.
- Damayanti, R. Wiyono, A. Nuradji, H. Cahyono, Ml. 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 JIV
- Lee CW, Suarez DL. 2005. *Avian influenza virus prospects for prevention and control by vaccination*. *Anim Health Res Rev.* 6:1-15. doi:10.1079/ahr2005101.
- 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 DURATION OF IMMUNITY VAKSIN NEO RABIVET PUSVETMA

Rosmalina Sari Dewi Daulay<sup>1</sup>, Dyah Pancawidyana<sup>1</sup>, Aulanni'am<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Veteriner Farma, <sup>2</sup>Universitas Brawijaya

### ABSTRAK

Vaksin Neo Rabivet produksi Pusat Veteriner Farma adalah vaksin rabies dengan formula baru. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui masa kekebalan (*duration of immunity*) vaksin Neo Rabivet. Penelitian ini menggunakan 10 ekor anjing berumur 3 bulan yang terbagi dalam 3 kelompok perlakuan. Kelompok I terdiri dari 4 ekor anjing yang divaksin 1 mL; kelompok II terdiri dari 4 ekor anjing yang divaksin 1,5 mL dan kelompok III terdiri dari 2 ekor anjing tidak divaksin dan digunakan sebagai kontrol. Serum diambil pada minggu pertama, kedua, ketiga, dan keempat dilanjutkan setiap bulan hingga mencapai 1 tahun setelah vaksinasi. Antibodi diuji menggunakan kit ELISA Platelia™ Rabies II produksi Bio-Rad. Antibodi protektif jika nilai titer yang diperoleh  $\geq 0,5$  EU/mL. Hasil pengujian antibodi menunjukkan bahwa antibodi protektif mulai terbentuk pada minggu kedua setelah vaksinasi. Kisaran antibodi kelompok I dan II pada minggu kedua setelah vaksinasi adalah 1,18-3,292 EU/mL dan 1,626-2,881 EU/mL. Pada bulan ke-12, 100% anjing pada kelompok I dan II masih mempunyai titer antibodi protektif yaitu 0,539-2,463 EU/mL dan 0,946-1,554 EU/mL. Pada bulan ke-13, titer antibodi protektif pada kelompok I dan II mengalami penurunan. Pada kelompok I, titer antibodi protektif hanya terdapat pada 1 ekor (25%) anjing sedangkan pada kelompok II, titer antibodi protektif hanya terdapat pada 2 ekor (50%) anjing. Berdasarkan hasil pengujian antibodi, vaksin Neo Rabivet mempunyai masa kekebalan (*duration of immunity*) selama 12 bulan.

Kata kunci : vaksin Neo Rabivet, *duration of immunity*, ELISA

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Penyakit rabies (penyakit anjing gila) merupakan penyakit zoonosis yang penting di Indonesia. Penyakit tersebut tersebar luas di beberapa provinsi, dengan jumlah kasus gigitan yang cukup tinggi setiap tahunnya (Adjid *et al.*, 2005). Unsur utama dari strategi pengendalian rabies adalah aplikasi vaksin secara teratur untuk mencapai dan mempertahankan cakupan vaksinasi yang memadai di lapangan untuk menghentikan penularan virus rabies.

Pada anjing yang divaksinasi primer, serokonversi terjadi umumnya antara 4 dan 6 minggu, serokonversi adalah indikator perlindungan terhadap rabies. Faktor yang mempengaruhi tingkat kekebalan adalah faktor eksternal dan faktor internal. Faktor eksternal yaitu mutu vaksin, program vaksinasi, dan penanganan vaksin di lapangan (Utami dan Sumiarto, 2012). Sedangkan faktor internal yaitu kondisi hewan, umur, dan status imun. *Enzym-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dapat menjadi metode pilihan dalam diagnosa rabies, karena sederhana, aman, cepat, dan sensitif (Cliquet *et al.* 2003). Efikasi vaksinasi rabies dapat diukur menggunakan metode ELISA, dilaporkan bahwa titer antibodi ELISA 0,5 IU/mL dapat memberikan perlindungan terhadap anjing selama enam minggu sampai dua tahun. Anjing yang memiliki titer antibodi di bawah 0,5 IU/mL perlu dilakukan pengulangan vaksinasi/booster (Utami dan Sumiarto, 2012).

Melalui berbagai percobaan yang panjang pada tahun 1992, Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA) berhasil memproduksi vaksin rabies dengan nama paten Rabivet Supra'92, menggunakan stabilizer berupa *saccharose* dan *glycine* serta ajuvan berupa *alhydrogel*. Vaksin tersebut mampu memberi masa kekebalan dengan nilai titer antibodi protektif selama 6 bulan. Masa kekebalan dirasakan sangat pendek bagi tenaga kesehatan hewan di lapangan karena secara operasional mereka harus melakukan vaksinasi dua kali dalam setahun. Hal ini tidak mudah dilakukan terutama pada anjing liar. Kebutuhan di lapangan menuntut vaksin Rabies dengan masa kekebalan lebih dari satu tahun, sehingga mereka dapat melakukan vaksinasi minimal 1 satu tahun sekali. Pada tahun 2018, Pusvetma telah mengembangkan vaksin Neo Rabivet untuk menjawab tuntutan lapangan yang membutuhkan vaksin rabies dengan masa kekebalan lebih dari satu tahun sehingga dapat menekan biaya operasional vaksinasi di lapangan. Vaksin Neo Rabivet merupakan vaksin monovalen untuk anjing, kucing dan ker.

### B. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui masa kekebalan (*duration of immunity*) vaksin Neo Rabivet.

## II. MATERI DAN METODE

### A. Materi

Materi yang digunakan adalah vaksin Neo Rabivet produksi Pusat Veteriner Farma. Pengkajian ini menggunakan hewan percobaan yaitu anjing jenis lokal sejumlah 10 ekor berumur 3 bulan yang belum pernah divaksinasi dan dipelihara dalam kurungan individu. Pakan hewan percobaan terdiri dari campuran nasi, makanan anjing bentuk butiran (pellet) dan dicampur dengan kaldu daging yang diberikan pagi dan sore. Pemberian minum dilakukan *ad libitum*. Vaksin yang diberikan selain vaksin Neo Rabivet adalah vaksin Eurican DIIPi2 dan DIIPi2-L. Obat-obatan yang digunakan adalah vitamin, ivomex, dan obat cacing.

### B. Metode

Sebelum dilakukan vaksinasi dengan Neo Rabivet, anjing yang akan dipakai untuk penelitian diberi perlakuan terlebih dahulu agar tetap sehat pada saat digunakan untuk penelitian yaitu dengan cara pemberian vitamin, obat cacing dan vaksin Eurican untuk mencegah terhadap penyakit distemper, hepatitis, parvovirus, parainfluenza tipe 2 dan leptospira pada anjing.

Perlakuan pada anjing dibagi dalam 3 kelompok. Kelompok I adalah anjing yang divaksin menggunakan vaksin Neo Rabivet, dengan dosis 1 mL/ekor secara sub kutan sebanyak 4 ekor, dengan penomoran 1, 2, 3 dan 4. Kelompok II adalah anjing yang divaksin menggunakan vaksin Neo Rabivet, dengan dosis 1,5 mL/ekor secara sub kutan sebanyak 4 ekor dengan penomoran 5, 6, 7 dan 8. Kelompok III adalah anjing yang tidak dilakukan vaksinasi sebanyak 2 ekor, dengan penomoran 9 dan 10.

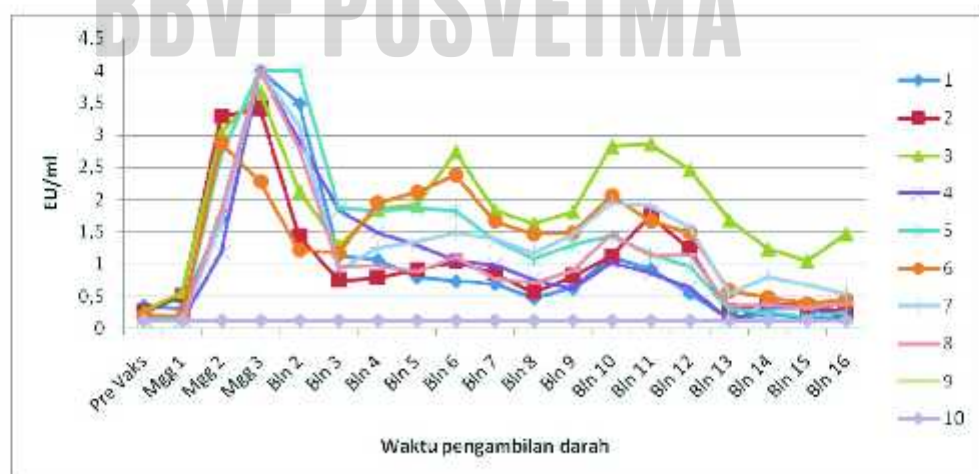
Sebelum penelitian dimulai, semua anjing Kelompok I, II, dan III diambil darahnya untuk pemeriksaan antibodi prevaksinasi. Pengambilan darah juga dilakukan untuk semua kelompok pada minggu pertama, kedua, ketiga, dan keempat pasca vaksinasi dan selanjutnya setiap bulan sampai satu tahun atau lebih hingga terbaca tidak protektif. Pemeriksaan antibodi dilakukan dengan metode ELISA menggunakan Kit ELISA Platelia™ Rabies II produksi Bio-Rad.

### III. HASIL

Hasil pemeriksaan titer antibodi anjing Kelompok I, II, dan III sebelum perlakuan atau pre-vaksinasi (PV) adalah tidak protektif, sehingga dapat dilakukan vaksinasi pada kelompok anjing I dan II.

**Tabel I.** Titer antibodi tiap kelompok anjing.

Minggu/ Bulan	Rerata Titer (TU/ml)									
	Nomor anjing									
	Kelompok I				Kelompok II				Kontrol	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PreVaks	0,349	0,25	0,255	0,126	0,161	0,207	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125
Mgg 1	0,31	0,509	0,567	0,125	0,1655	0,195	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125
Mgg 2	1,708	3,292	3,631	1,16	2,683	2,881	1,626	1,823	<0,125	<0,125
Mgg 3	>4	3,424	3,669	>4	>4	2,279	>4	>4	<0,125	<0,125
Bln 2	3,491	1,437	2,13	2,916	>4	1,22	3,147	2,799	<0,125	<0,125
Bln 3	1,127	0,751	1,273	1,833	1,859	1,169	0,91	0,964	<0,125	<0,125
Bln 4	1,065	0,792	1,85	1,485	1,817	1,946	1,258	0,979	<0,125	<0,125
Bln 5	0,793	0,913	1,911	1,3	1,858	2,122	1,341	0,889	<0,125	<0,125
Bln 6	0,731	1,036	2,74	1,045	1,816	2,381	1,486	1,117	<0,125	<0,125
Bln 7	0,689	0,855	1,833	0,99	1,37	1,659	1,384	0,777	<0,125	<0,125
Bln 8	0,467	0,565	1,625	0,764	1,078	1,461	1,175	0,716	<0,125	<0,125
Bln 9	0,625	0,809	1,808	0,614	1,289	1,484	1,449	0,897	<0,125	<0,125
Bln 10	1,102	1,126	2,826	1,027	1,43	2,057	1,952	1,464	<0,125	<0,125
Bln 11	0,923	1,745	2,865	0,87	1,151	1,666	1,901	1,123	<0,125	<0,125
Bln 12	0,539	1,228	2,463	0,634	0,946	1,482	1,554	1,148	<0,125	<0,125
Bln 13	0,148	0,268	1,68	0,148	0,284	0,581	0,538	0,364	<0,125	<0,125
Bln 14	0,205	0,412	1,231	0,322	0,254	0,483	0,801	0,371	<0,125	<0,125
Bln 15	0,164	0,34	1,646	0,319	0,18	0,389	0,674	0,324	<0,125	<0,125
Bln 16	0,151	0,272	1,466	0,179	0,248	0,447	0,545	0,384	<0,125	<0,125



**Gambar 1.** Grafik titer antibodi tiap kelompok anjing





**Gambar II.** ELISA menggunakan kit ELISA Platelia™

#### **IV. PEMBAHASAN**

Pada tahun 2018 telah dilakukan pengembangan vaksin rabies yang mempunyai masa kebal lebih dari satu tahun. Pada tahun 2019 vaksin yang diberi nama dagang Neo Rabivet mulai diproduksi di Pusvetma dan telah mendapatkan nomor registrasi Kementan RI No. D.19035888 VKC dari Kementerian Pertanian. Vaksin ini diproduksi untuk menjawab tantangan di lapangan yaitu mampu memberi masa kekebalan lebih dari 1 tahun, dan diharapkan dapat menandingi produk impor.

Tabel 1 menunjukkan bahwa Anjing kelompok I dan II belum mempunyai titer antibodi protektif pada minggu pertama setelah vaksinasi. Titer antibodi protektif pada anjing kelompok I dan II mulai terbentuk pada minggu kedua (14 hari) setelah vaksinasi. Pada kelompok I, rentang titer antibodi yang terbentuk adalah 1,626-2,881 EU/mL sedangkan kelompok II, rentang titer antibodi yang terbentuk adalah 1,18-3,292 EU/mL. Titer antibodi tertinggi terbentuk pada 3 minggu setelah vaksinasi, baik pada kelompok I maupun kelompok II. Antibodi protektif yang terbentuk oleh vaksin Neo Rabivet, dapat bertahan selama 12 bulan setelah vaksinasi. Pada bulan ke-13 setelah vaksinasi, titer antibodi mengalami penurunan. Pada kelompok I, titer antibodi protektif hanya terdapat pada 1 ekor dari 4 ekor anjing atau sebesar 25%, sedangkan pada kelompok II, titer antibodi protektif hanya terdapat pada 2 ekor (50%) anjing. Pada bulan ke-16, pola penurunan titer antibodi ini masih tetap sama pada kelompok I yaitu 1 dari 4 ekor anjing masih mempunyai titer antibodi protektif.



Pada kelompok II terjadi penurunan pola titer antibodi dibandingkan bulan ke-13. Pada kelompok II 1 dari 4 ekor anjing masih mempunyai titer antibodi protektif.

Efikasi vaksin dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor yang mempengaruhi kualitas vaksin adalah antigen dan ajuvan. Tiap dosis vaksin Neo Rabivet mengandung virus rabies strain Pasteur inaktif tidak kurang dari  $10^7$  LD<sub>50</sub> dan diformulasi dengan ajuvan *Alluminium hydroxine gel (Alhydrogel)* Al(OH)<sub>3</sub>. Strain Pasteur merupakan strain vaksin yang direkomendasikan oleh *Food and Agriculture Organization (FAO)* dan telah digunakan untuk vaksinasi di Indonesia sejak tahun 1967. Al(OH)<sub>3</sub> merupakan ajuvan yang banyak digunakan dalam vaksin.

Vaksin Neo Rabivet mempunyai beberapa keunggulan diantaranya adalah mempunyai konsentrasi virus dan ajuvan 44 % lebih tinggi dibanding vaksin rabies produksi sebelumnya (Vaksin Rabivet Supra'92). Faktor yang mempengaruhi kualitas vaksin adalah antigen dan ajuvan. Tiap dosis vaksin Neo Rabivet mengandung virus rabies strain Pasteur inaktif tidak kurang dari  $10^7$  LD<sub>50</sub> dan diformulasi dengan ajuvan *Alluminium hydroxine gel (Alhydrogel)* Al(OH)<sub>3</sub>. Strain Pasteur merupakan strain vaksin yang direkomendasikan oleh *Food and Agriculture Organization (FAO)* dan telah digunakan untuk vaksinasi di Indonesia sejak tahun 1967. Ajuvan dalam bahasa latin *adjuvare* yang artinya membantu merupakan komponen dalam vaksin yang berperan untuk membantu menstimulasi respon imun. Ajuvan *Alluminium hydroxine gel (Alhydrogel)* Al(OH)<sub>3</sub> berfungsi menstimulasi respon *T helper 2 (Th2)* untuk mensekresi IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10 untuk meningkatkan respon sel B (Edelman, 2000).

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

Kisaran titer kelompok anjing I dan II mulai menunjukkan antibodi protektif pada minggu kedua dan masih protektif hingga bulan ke-12. Pada bulan ke-13, beberapa ekor anjing menunjukkan penurunan titer antibodi hingga tidak protektif. Berdasarkan hasil uji ini, disarankan agar dilakukan vaksinasi ulang setelah 12 bulan.

Vaksinasi yang dilakukan pada kelompok I tidak berbeda nyata dengan kelompok II, sehingga lebih efisien dilakukan dengan dosis 1 mL/ekor.

Penelitian lanjutan disarankan dilakukan pada populasi yang lebih besar dan pada kondisi lapangan dengan pencatatan yang baik.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adjid RMA, Sarosa A, Syafriati T, Yuningsih. 2015. *Penyakit Rabies di Indonesia dan Pengembangan Teknik Diagnosisnya*. Balai Penelitian Veteriner.
- Cliquet F, Meyer EP. 2004. *Rabies and rabies related viruses: a modern perspective on an ancient disease*. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 23(2): 625-642.
- Edelman R. 2000. *An Overview of Adjuvant Use*. Totowa New Jersey. Humana Press.
- Utami S, Sumiarso B. 2012. *Tingkat dan Faktor Resiko Kekebalan Proiektif Terhadap Rabies pada Anjing di Kota Makasar*. Jurnal Veteriner. 13(1):7-79.



BBVF PUSVETMA

## PENGAJIAN PEMBUATAN KIT ELISA JEMBRANA

Febri Hartanti<sup>1</sup>, Nur Sjolichah, Ekky Valinia D.M<sup>1</sup>, Yanita Anjar P<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Pusat Veteriner Farma

### ABSTRAK

Penyakit jembrana disebabkan oleh virus jembrana. Diagnosa penyakit jembrana dapat dilakukan secara klinis dan imunologis (serologik dan genomik). Salah satu metode diagnosa serologik penyakit Jembrana dengan uji ELISA yang dapat digunakan untuk monitoring pasca vaksinasi. Pusvetma telah mengembangkan Kit ELISA Jembrana. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan protein JGag, pengenceran konjugat dan waktu pemberian stopper pada Kit Elisa Jembrana produksi Pusvetma. Penelitian ini menggunakan mikroplate yang dicoatingkan dengan protein JGag hasil purifikasi/elusi Pusvetma dan protein JGag hasil purifikasi/elusi Balai Besar Veteriner Denpasar. Metode yang dilakukan sesuai dengan protokol kerja Kit Elisa Jembrana produksi Pusvetma dan Balai Besar Veteriner Denpasar. Hasil uji menunjukkan pengenceran 1:40, konjugat dengan pengenceran 1:2.000 dan pemberian stopper setelah inkubasi mikroplate selama 5 menit memberikan hasil yang lebih baik. Kit Elisa Jembrana produksi Pusvetma memberikan kesesuaian yang baik dan sudah dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi Jembrana.

Kata kunci : Kit ELISA Jembrana, protein JGag, antibodi.

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sapi Bali merupakan plasma nutfah dalam penyediaan kebutuhan daging sapi di Indonesia. Sapi Bali memiliki beberapa keunggulan antara lain mempunyai kemampuan adaptasi tinggi terhadap lingkungan, *calving interval* sangat pendek, dan kualitas daging yang cukup bagus, akan tetapi sapi Bali memiliki kelemahan yaitu sangat peka terhadap penyakit jembrana.

Penyakit jembrana atau Jembrana *Disease* (JD) merupakan penyakit viral menular bersifat infeksius yang disebabkan oleh virus jembrana yang termasuk famili *retroviridae*, subfamili *Lentivirinae*. Selain di Bali, penyakit Jembrana juga telah menyebar ke beberapa daerah di Indonesia seperti Lampung (1976), Banyuwangi (1978), Sumatra Barat (1992), Kalimantan Selatan (1993), Bengkulu (1994), Kalimantan Timur (2005), (Hartaningsih, 2005).

Diagnosa penyakit jembrana yang digunakan adalah diagnosis klinis yang didasarkan pada gejala klinis penyakit dan diagnosis imunologis. Diagnosis secara klinis hanya dapat dilakukan terhadap penyakit jembrana akut dan sulit dilakukan karena memiliki kemiripan dengan penyakit lain. Sementara untuk diagnosa imunologis, yang masih sering digunakan adalah secara serologik (ELISA dan antigen presipitasi) maupun secara genomik (RT-PCR).

Keberhasilan kesehatan hewan berbanding lurus dengan keberhasilan dalam penyelenggaraan vaksinasi terhadap hewan itu sendiri. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan vaksinasi adalah pakan, hewan, aplikasi vaksin, dan peninjauan rantai dingin vaksin. Pemantauan efikasi vaksin harus dapat diketahui dan jumlah antibodi yang dihasilkan pasca vaksinasi perlu diketahui kapan jumlah antibodi itu mulai protektif. Monitoring hasil vaksinasi sangat membutuhkan tersedianya alat diagnosa seperti Kit Elisa (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*). ELISA merupakan teknik biokimia yang digunakan dalam imunologi untuk mendeteksi adanya antibodi spesifik penyakit pada serum sampel (Crowther, 2001). Kit Elisa Jembrana menggunakan protein JGag. Laporan penelitian Agustini (2015) menyebutkan bahwa uji banding Kit Elisa Jembrana untuk deteksi antibodi penyakit Jembrana telah dilakukan di Laboratorium PMPP Pusat Veteriner Farma, Surabaya dari tanggal 22 sampai dengan 25 Desember 2015. Hasil uji banding menunjukkan bahwa Kit Elisa Jembrana produksi Pusvetma memberikan kesesuaian yang sangat baik dengan nilai  $Kappa = 0,86$  (*Excellent agreement*) serta hasil uji sensitivitas (91,3%) dan spesifitas (94,7%). Dari hasil uji banding tersebut dapat disimpulkan bahwa Kit ELISA Jembrana produksi Pusvetma sudah dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi Jembrana setelah mendapatkan nomor registrasi dari POH karena memiliki kesesuaian yang baik dengan Kit ELISA Jembrana dari Balai Besar Veteriner Denpasar. Penelitian lanjutan ini untuk mengetahui tingkat kesesuaian antara Kit ELISA Jembrana produksi Pusvetma dengan Kit ELISA Jembrana BBVet Denpasar sebagai laboratorium rujukan untuk diagnosa penyakit Jembrana.

## 1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

- 1) Mengetahui kandungan protein JGag yang dapat dicoatingkan untuk Kit Elisa Jembrana.
- 2) Mengetahui pengenceran konjugat yang sesuai untuk Kit Elisa Jembrana.
- 3) Mengetahui waktu yang tepat untuk pemberian stopper pada Kit Elisa Jembrana.

Selain itu, tujuan penelitian ini untuk memenuhi kebutuhan konsumen Pusvetma dan untuk mengetahui titer antibodi penyakit jembrana.

## 1.3. Tinjauan Pustaka

Sapi bali (*Bos javanicus*) merupakan salah satu aset nasional Indonesia yang harus dilestarikan karena mempunyai karakter reproduksi yang baik sehingga mudah dikembangkan dan disebarkan ke berbagai tempat sebagai hewan ternak potensial. Salah satu penyakit yang menyerang sapi bali dan menyebabkan banyak kematian adalah penyakit Jembrana atau *Jembrana Disease Virus* (JDV).

Penyakit jembrana merupakan penyakit infeksi akut yang disebabkan Bovine lentivirus dengan morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi. Virus penyakit Jembrana (*Jembrana Disease Virus*) termasuk dalam lentivirus dengan genom RNA rantai tunggal (7.732 basa). Virus penyakit Jembrana (JDV) mengandung gen yang umum pada retrovirus seperti : gen *gag*, *pol*, *envelope*, dan *long terminal repeat* (LTR), serta memiliki gen tambahan yaitu: gen *tat* dan *rev*, yang khas pada lentivirus. Protein capsid (CA) yang disintesis oleh gen GAG subunit capsid (*gag-ca*) dan protein transmembran yang disintesis oleh gen env subunit transmembran (*env-tm*) dari JDV ternyata bereaksi positif dengan antibodi hewan yang terinfeksi JDV sehingga kedua protein ini dianggap epitop yang bersifat imunogenik (Hartaningsih, 1994).

Penyakit jembrana ditandai dengan depresi, anoreksia, demam, pendarahan extensive dibawah kulit, dan pembengkakan kelenjar limfe, terutama limfoglandula prefemorialis dan prescapularis serta diare berdarah (Subroto, 2000). Salah satu gejala yang paling mencolok adalah berkeriungat darah.



Keadaan ini biasanya terlihat setelah demam yaitu ketika suhu tubuh  $41^{\circ}\text{C}$  dan berlangsung 2-3 hari. Gejala ini terutama ditemukan di daerah panggul, punggung, tungkai, perut, dan skrotum. Keringat ini encer seperti air dan berwarna merah darah bilamana masih segar dan menetes dari permukaan kulit melalui sepanjang bulu rambut. Bila keringat ini menjadi kering, maka ia tertinggal menempel pada batang rambut sebagai kerak bertintil-bintil dan tidak melepas bila diusap dengan tangan. Penyakit ini terutama menyerang sapi bali dewasa dengan rata-rata umur 3-4 tahun. Pencegahan penyakit dilakukan dengan tindakan vaksinasi massal. Pengendalian penyakit jembrana dapat dilakukan dengan langkah-langkah antara lain yaitu regulasi penanggulangan penyakit jembrana, karantina yang ketat bagi hewan yang masuk atau keluar, pembinasaan segera hewan yang mati, kotoran atau material kandang yang tercemar harus dikremasi, desinfeksi kandang dan fasilitasnya, serta tindakan sanitasi dan higiene umum pada kandang dan personalia (Putro dan Prabowo, 2004).

Diagnosis ditentukan dengan melihat gejala klinis yang ada. Konfirmasi untuk meneguhkan diagnosa bisa dilakukan dengan uji ELISA (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*) dan AGP (*Agar Presipitation Gel*) di laboratorium. Uji ELISA terbukti lebih memberikan hasil yang memuaskan daripada AGP. ELISA merupakan teknik biokimia yang digunakan dalam imunologi untuk mendeteksi adanya antibodi spesifik penyakit pada serum sampel. Teknik penempelan (*coating*) antigen pada permukaan fase padat (mikroplate) dipengaruhi oleh beberapa hal seperti konsistensi antigen, pemilihan buffer coating, suhu penyimpanan, lama penyimpanan dan pemilihan jenis mikroplate (Crowther., 2001).

## II. MATERI DAN METODE

### 2.1. Materi

Alat yang digunakan adalah mikroplate *Maxisorp Loose*, gelas ukur, mikropipet volume  $\leq 10\mu\text{l}$ ,  $50\mu\text{l}$ ,  $300\mu\text{l}$ ,  $1000\mu\text{l}$ , gelas erlenmeyer, ELISA washer, inkubator  $37^{\circ}\text{C}$  dan ELISA reader (dengan panjang gelombang 405 nm).

Bahan-bahan yang digunakan yaitu antigen berupa *construct* rekombinan Jembrana JGag 6 histidine hasil purifikasi *construct* rekombinan virus protein Jembrana yang diperoleh dari Balai Besar Veteriner Denpasar Bali tahun 2009, serum kontrol positif (hiperimun serum), serum kontrol negatif, *carbonat bicarbonat buffer* (SIGMA C3041), *posphat buffer saline*, konjugat antibovine (SIGMA A5295), substrat HRP (BIORAD -172-1064), stopper (oxalic acid 2%), skim milk, thymerosal, Tween 20, buffer pH 7, buffer pH 9 dan plastik absorbent.

## 2.2. Metode

Metode yang dilakukan dalam pengkajian ini yaitu persiapan mikroplate dan pengujian Kit ELISA Jembrana.

Persiapan Kit Elisa Jembrana.

Persiapan yang dilakukan yaitu coating antigen Jembrana rekombinan protein JGag 6, blocking dan washing mikroplate. Pengukuran kandungan protein Jgag 6 dilakukan dengan spektrofotometer. Coating mikroplate yaitu 5 µg/well dan pengenceran 1:40. Antigen Jembrana rekombinan yang dicampur dengan *carbonat bicarbonat buffer capsule* dicoatingkan pada mikroplate kemudian disimpan pada suhu 4°C semalam. Sebelum blocking, mikroplate dicuci dengan PBST (*phospate buffer saline tween 20*) sebanyak 3 kali dengan *Elisa Washer*. Blocking dilakukan dengan memasukkam 50 µl larutan *Blocking buffer* (5% Skim Milk PBST) dan inkubasi 1 jam pada suhu ruangan. Mikroplate dicuci dengan washing buffer sebanyak 3 kali setelah itu tapping mikroplate dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dan simpan pada suhu 4°C.



**Gambar 1.** Susunan Sampel Mikroplat Kit ELISA Jembrana

**Pengujian Kit ELISA Jembrana.**

Pengujian Kit ELISA Jembrana dilakukan dengan mempersiapkan mikroplate yang siap uji, serum sampel serum, kontrol serum positif dan negatif.

Sampel serum yang akan diuji diencerkan 1:100 dalam skim milk 5%. Pengenceran serum kontrol positif yaitu 1:100, 1:200, 1:400 dalam skim milk 5%, sedangkan serum kontrol negatif diencerkan 1:100 s/d 1:200. Sebanyak 50 µl serum sampel, serum kontrol positif, serum kontrol negatif yang sudah diencerkan dimasukkan ke dalam mikroplate yang tercoating dengan antigen jembrana sesuai peta. Homogenkan dengan cara *shaker* mikroplate dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Mikroplate dicuci dengan PBST sebanyak 3 kali, kemudian *conjugate antibovine* (SIGMA A5295) sebanyak 50 µl dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran sesuai peta kerja. Pengenceran konjugat *conjugate antibovine* (SIGMA A5295) yaitu a). pengenceran 1:8.000 untuk coating dengan protein J Gag hasil purifikasi/Elusi Pusvetma (5 µg/well), (b) pengenceran 1:2.000 untuk coating dengan protein J Gag hasil purifikasi/Elusi Pusvetma (1:40) dan (c) pengenceran 1:2.000 untuk coating dengan protein J Gag hasil purifikasi/Elusi Denpasar (1:40). Inkubasi 37°C selama 1 jam. Setelah pencucian dengan PBST sebanyak 3 kali, ditambahkan substrate HRP (BIORAD-172-1064). Inkubasi pada suhu ruang dan tempat gelap. Baca dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 405 nm, setelah inkubasi selama 2 menit, 5 menit dan 10 menit. Selanjutnya ditambahkan stopper (*oxalic acid* 2%) di menit akhir pembacaan.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	K- 1:100	K- 1:100	S4	S4	K+ 1:100	K+ 1:100	S4	S4	K+ 1:100	K+ 1:100	S4	S4
<b>B</b>	K- 1:200	K- 1:200	S5	S5	K+ 1:200	K+ 1:200	S5	S5	K+ 1:200	K+ 1:200	S5	S5
<b>C</b>	K- 1:400	K- 1:400	S6	S6	K+ 1:400	K+ 1:400	S6	S6	K+ 1:400	K+ 1:400	S6	S6
<b>D</b>	K- 1:100	K- 1:100	S7	S7	K- 1:100	K- 1:100	S7	S7	K- 1:100	K- 1:100	S7	S7
<b>E</b>	K- 1:200	K- 1:200	S8	S8	K- 1:200	K- 1:200	S8	S8	K- 1:200	K- 1:200	S8	S8
<b>F</b>	S1	S1	S9	S9	S1	S1	S9	S9	S1	S1	S9	S9
<b>G</b>	S2	S2	S10	S10	S2	S2	S10	S10	S2	S2	S10	S10
<b>H</b>	S3	S3	S11	S11	S3	S3	S11	S11	S3	S3	S11	S11

**Gambar II.** Hasil Pengujian Kit ELISA Jembrana

Sampel Serum

S1 = {2002}

S2 = {+}

S3 = {-}

S4 = 001 - 13/3/2019

S5 = 003 - 13/3/2019

S6 = 001 - 1/4/2019 (1 bulan post vaksin)

S7 = 003 - 1/4/2019 (1 bulan post vaksin)

S8 = 01 - 6/5/2019 (2 bulan post vaksin)

S9 = 03 - 6/5/2019 (2 bulan post vaksin)

S10 = 01 - 3/6/2019 (3 bulan post vaksin)

S11 = 03 - 3/6/2019 (3 bulan post vaksin)

### Pembacaan dan Interpretasi Hasil

Hasil uji Kit ELISA Jembrana ditentukan dengan membandingkan nilai absorbance atau nilai *Optical Density* (OD) sampel dengan nilai absorbance kontrol positif pengenceran 1:100.

- apabila nilai  $OD \geq K$  1:100 atau  $OD > 1$  maka sampel serum dianggap positif mengandung antibodi jembrana.
- apabila  $OD \leq K$  1:100 atau  $OD < 1$  maka sampel serum dianggap negatif mengandung antibodi jembrana.

### III. HASIL.

Penelitian ini menggunakan protein JGag Jembrana yang dicoatingkan pada mikroplate Kit Elisa Jembrana yaitu protein JGag hasil purifikasi/Elusi Pusvetma dengan kandungan protein 5 µg/well (baris 1-4) dan pengenceran 1:40 (baris 5-8) serta protein JGag hasil purifikasi/Elusi Denpasar dengan pengenceran 1:40 (baris 9-12). Pengenceran konjugat conjugate antibovine (SIGMA A5295) yaitu pengenceran 1:8.000 untuk coating mikroplate baris 1-4, pengenceran 1:2.000 untuk coating mikroplate baris 5-8 dan pengenceran 1:2.000 untuk coating mikroplate baris 9-12. Serum sampel yang digunakan adalah serum sampel hasil efikasi vaksin (pre vaksinasi, 1 bulan post vaksinasi, 2 bulan post vaksinasi, dan 3 bulan post vaksinasi).



Hasil pengujian terhadap Kit ELISA Jembrana dapat dilihat pada tabel-tabel di bawah ini yaitu :

**Tabel I.** Hasil Optical Density serum sampel inkubasi 2 menit (Filter: 405)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,983	0,835	0,251	0,177	1,589	1,585	0,274	0,274	0,742	0,663	0,455	0,702
B	0,947	0,945	0,256	0,234	1,513	1,461	0,316	0,325	0,526	0,595	0,385	0,517
C	0,839	0,762	0,185	0,186	1,332	1,314	0,256	0,270	0,501	0,524	0,345	0,365
D	0,197	0,157	0,478	0,498	0,297	0,220	0,617	0,597	0,409	0,393	0,420	0,508
E	0,143	0,113	0,182	0,179	0,194	0,185	0,252	0,375	0,365	0,358	0,375	0,611
F	0,168	0,104	0,899	0,906	0,301	0,205	1,378	1,401	0,644	0,400	0,533	0,546
G	0,669	0,643	0,222	0,202	1,158	1,138	0,225	0,202	1,131	0,994	0,320	0,440
H	0,174	0,150	0,802	0,811	0,199	0,212	1,208	0,156	0,380	0,373	0,514	0,686

**Tabel II.** Hasil Optical Density serum sampel inkubasi 5 menit (Filter: 405)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,544	1,312	0,380	0,264	2,469	2,418	0,446	0,446	1,293	1,172	0,825	1,293
B	1,496	1,481	0,389	0,365	2,395	2,325	0,531	0,547	0,917	1,043	0,692	0,957
C	1,324	1,178	0,275	0,283	2,173	2,123	0,424	0,457	0,865	0,931	0,620	0,660
D	0,289	0,221	0,744	0,805	0,466	0,341	1,040	0,981	0,708	0,684	0,731	0,927
E	0,200	0,154	0,268	0,275	0,299	0,288	0,422	0,656	0,647	0,645	0,681	1,123
F	0,232	0,130	1,397	1,456	0,478	0,320	2,261	2,172	1,133	0,702	0,970	1,027
G	1,049	1,045	0,331	0,317	1,897	1,857	0,374	0,329	1,942	1,691	0,571	0,823
H	0,249	0,209	1,249	1,348	0,308	0,325	2,034	0,236	0,674	0,658	0,942	1,276

**Tabel III.** Hasil Optical Density (OD) serum sampel inkubasi 10 menit + stopper (Filter: 405)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,792	2,533	0,801	0,555	3,673	3,418	1,009	1,021	2,656	2,566	1,920	2,728
B	2,701	2,749	0,835	0,794	3,178	3,178	1,192	1,254	2,032	2,311	1,622	2,147
C	2,512	2,407	0,590	0,593	3,487	3,252	0,966	1,089	1,961	2,117	1,545	1,593
D	0,585	0,444	1,586	1,644	1,024	0,766	2,210	2,136	1,618	1,569	1,692	2,070
E	0,398	0,290	0,577	0,579	0,660	0,646	0,958	1,504	1,515	1,537	1,623	2,513
F	0,443	0,734	2,679	2,686	1,081	0,704	3,261	3,261	2,412	1,612	2,193	2,294
G	2,113	2,065	0,743	0,664	2,954	3,113	0,870	0,776	3,026	2,921	1,421	1,944
H	0,506	0,382	2,554	2,623	0,678	0,737	3,350	0,534	1,536	1,564	2,159	2,730



#### IV. PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil uji Kit Elisa Jembrana tersebut di atas (tabel 1-3) tampak bahwa nilai OD kontrol positif 1/100 yang dicoating dengan protein JGag hasil purifikasi/elusi Pusvetma dengan pengenceran 1:40 (2.469; 2.418) lebih besar dibandingkan nilai OD pada protein JGag hasil purifikasi/elusi Pusvetma dengan kandungan protein 5 µg/well (1.544; 1.312) dan protein JGag hasil purifikasi/Elusi Denpasar dengan pengenceran 1:40 (1.293; 1.172).

**Tabel IV.** Perbandingan Hasil Uji Kit Elisa Jembrana protein JGag hasil purifikasi/Elusi Pusvetma dengan protein JGag hasil purifikasi/Elusi Denpasar

No	Sampel	Hasil uji: tahun 2019	Perbandingan Nilai OD ( <i>Optical Density</i> )			Ket
			Bahan Elisa Pusvetma/ JGag Pusvetma Konjugate 1:8000	Bahan Elisa Pusvetma/ JGag Pusvetma Konjugate 1:2000	Bahan Elisa Pusvetma/ JGag BBVet Denpasar Konjugate 1:2000	
1	K1 1/100		1.544;1.312	2.469;2.418	1.293;1.172	positif
2	K+ 1/200		1.496;1.481	2.395;2.325	0.917;1.043	positif
3	K+ 1/400		1.324;1.178	2.173;2.122	0.806;0.931	positif
4	K- 1/100		0.289;0.221	0.466;0.341	0.708;0.654	negatif
5	K- 1/200		0.200;0.154	0.299;0.288	0.647;0.645	negatif
6	S1 (serum pre-vaksin no 2002)	0.645	0.252;0.130	0.478;0.420	1.133;0.732	negatif
7	S2 (serum positif BBVet Denpasar)		1.049;1.045	1.897;1.857	1.942;1.691	positif
8	S3 (serum negatif BBVet Denpasar)		0.249;0.209	0.408;0.325	0.675;0.658	negatif
9	S4 (001-18-Maret-2019, 2 minggu post vaksinasi)	0.580	0.380;0.264	0.446;0.446	0.825;1.293	negatif
10	S5 (003-18 Maret-2019, 2 minggu pasca vaksinasi)	0.793	0.389;0.265	0.531;0.547	0.692;0.957	negatif
11	S6 (001-14-2019, 1 bulan post vaksinasi)	0.453	0.375;0.383	0.424;0.457	0.630;0.660	negatif
12	S7 (003-14-2019, 1 bulan post vaksinasi)	1.006	0.744;0.803	1.040;0.981	0.731;0.927	positif
13	S8 (01-6/5/2019 Kontrol)	0.519 (sac 2)	0.268;0.275	0.422;0.656	0.681;1.123	negatif
14	S9 (03-6/5/2019 2 bulan post vaksin)	1.825	1.397;1.456	2.361;2.172	0.970;1.027	positif
15	S10 (01-3/6-2019 sas: kontrol, tanpa perlakuan)	0.697	0.331;0.317	0.374;0.329	0.571;0.823	negatif
16	S11 (03-3/6-2019 2 bulan post vaksin)	1.796	1.249;1.348	2.034;0.236	0.942;1.276	positif

Perbandingan nilai OD tersebut di atas menunjukkan bahwa pengenceran 1:40 memberikan hasil yang lebih baik untuk coating mikroplate Kit Elisa Jembrana. Pemberian konjugat dengan pengenceran 1:2.000 (baris 4-12) memberikan hasil OD yang lebih tinggi dibandingkan dengan pengenceran konjugat 1.8000 (baris 1-4). Pemberian stopper dapat diberikan setelah inkubasi mikroplate selama 5 menit karena inkubasi selama 2 menit, hasil OD belum menunjukkan hasil yang baik.

Hasil uji banding menunjukkan Kit Elisa Jembrana produksi Pusvetma memberikan kesesuaian yang baik dan sudah dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi Jembrana karena memiliki kesesuaian yang baik sesuai dengan protokol kerja Kit Elisa Jembrana BB Vet Denpasar.

#### **IV. KESIMPULAN DAN SARAN**

##### **4.1 Kesimpulan**

1. Kandungan protein JGag Jembrana yang dapat digunakan dalam coating mikroplate Kit Elisa Jembrana yaitu pengenceran 1:40.
2. Pengenceran konjugat Kit Elisa Jembrana adalah 1:2.000 sesuai dengan prosedur kerja Kit Elisa Jembrana Balai Besar Veteriner Denpasar.
3. Pemberian stopper dilakukan setelah inkubasi selama 5 menit.

##### **4.2. Saran**

- Pembuatan Elusi protein JGag Jembrana untuk coating mikroplate Kit Elisa Jembrana dengan konsentrasi protein 1 µg/mL.
- Perlu penelitian lanjutan untuk optimasi dan menguji stabilitas Kit Elisa Jembrana.

#### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Terima kasih disampaikan kepada Balai Besar Veteriner Denpasar atas kerjasama, dukungan dan saran yang diberikan selama penelitian Kit Elisa Jembrana.

## DAFTAR PUSTAKA

- Crowther, J.R..2001. *The Elisa Guidebook*. Humana Press. Springer Science & Business Media.
- Hartaningsih N., Wilcox G.E., Kertayadnya G., dan Astawa N., 1994. *Antibody Response Antigen (J Gag 6)*. Manual Diagnosa Laboratorik Penyakit Jembrana.
- Hartaningsih N., Agustini NJP., dan Desport, M., 2002. *Pembuatan Rekombinan Elisa Antigen (J Gag 6)*. Manual Diagnosa Laboratorik Penyakit Jembrana ACTAR BPPV.
- Ni Luh Putu Agustini dan I Ketut Diarmita. *Situasi Penyakit Jembrana di Provinsi Bali dan Kemungkinan Pembebasannya*. Balai Besar Vetriner Denpasar.
- Putro dan Prabowo, P. 2004. *Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasan Penyakit Hewan Memular Strategis Dalam Pengembangan Usaha Sapi Potong*. Lokakarya Nasional Sapi Potong 2004.
- Rosati S,M Profiti, R Lorenzetti, P Bandecchi, A Mannelli, M.Ortoffi, F Tolari dan I.M Ciabatti. 2004. *Development of Recombinant Capsid Antigen/Transmembrane epitop Fusion Protein for Serological Diagnosis of Animal lentivirus Infection Journal of Virological Methods* 121 (2004):73-78.
- Subroto. 2007. *Ilmu Penyakit Ternak II*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.



BBVF PUSVETMA

## UJI STABILITAS VAKSIN SEPTIVET®

Yanita Anjar Puspitasari<sup>1</sup>, Murtining Dyah Kusumastuti<sup>1</sup>, Noning Lestari<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Pusat Veteriner Farma

### ABSTRAK

Vaksin Septivet® adalah vaksin Septicaemia Epizootica (SE) inaktif produksi Pusat Veteriner Farma (Pusvetma). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas dan potensi vaksin Septivet® yang telah disimpan selama 2 tahun, sesuai masa kedaluwarsa vaksin yang selama ini telah ditetapkan. Penelitian dilakukan menggunakan 3 botol vaksin dari 3 nomor batch yang berbeda, dengan 5 macam perlakuan lama penyimpanan yaitu 0, 9, 12, 18, dan 24 bulan pada suhu 2-8°C. Metode uji yang dilakukan sesuai dengan standar Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) 2018 yaitu uji fisik, uji sterilitas, uji stabilitas emulsi, uji safety dan uji potensi. Hasil dari masing-masing pengujian, semua vaksin dengan 5 macam perlakuan lama penyimpanan semua masih memenuhi syarat. Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini, vaksin dengan lama penyimpanan sampai dengan 2 tahun pada suhu yang direkomendasikan yaitu 2-8°C masih memberikan keamanan (safety) 100% dan protektifitas (potensi)  $\geq 80\%$  sesuai standar FOHI (2018).

Kata kunci : uji stabilitas, *Septicaemia epizootica*, Septivet®, vaksin SE.

### 1. PENDAHULUAN

Penyakit *Septicaemia Epizootica* (SE)/*Haemorrhagic Septicaemia* (HS) atau disebut juga penyakit ngorok adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Pasteurella multocida*, menycrang sapi dan kerbau, bersifat akut dan mempunyai tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi (OIE, 2009 ; Priadi et al., 2000). Morbiditasnya akan semakin tinggi bila hewan memiliki kondisi imunitas yang rendah serta berada pada suatu lingkungan yang basah. Meskipun secara teoritis ternak sapi yang sakit SE dapat diobati dengan antibiotika dan serum hiperimun (kebal), namun umumnya pengobatan tidak efektif dan terlalu mahal, oleh sebab itu, usaha pengendaliannya dilakukan dengan vaksinasi (Astuti LS et al., 2014).

Pemantauan terhadap respon kekebalan SE penting untuk mengetahui kekebalan alam atau kekebalan aktif akibat vaksinasi. Beberapa cara pemantauan kekebalan atau antibodi terhadap SE yang telah dikembangkan antara lain uji aglutinasi, *serum bactericidal test*, *agar agglutination test* (Bain et al., 1982), *indirect haemagglutination test*, *active mouse protection test* (AMPT), *Passive Mouse Protection Test* (PMPT), ELISA dan *direct challenge*.

PMPT adalah uji yang sangat spesifik untuk memantau respon antibodi mencit terhadap bakteri penyebab SE. Hal yang harus diperhatikan dalam prosedur PMPT adalah organisme yang dipakai untuk menantang harus diseleksi dan dijamin kemurnian dan patogenesisnya. Dosis tantangan dari organisme harus distandarisasi dan uji ini membutuhkan sejumlah besar hewan percobaan (mencit) (Priadi *et al.*, 1997).

Vaksin Septivet® adalah vaksin SE inaktif yang diproduksi oleh Pusat Veteriner Farma (Pusvetma) Surabaya yang digunakan untuk pencegahan aktif terhadap penyakit ngorok/Septichaemia epizootica pada sapi, kerbau dan babi, di Indonesia digunakan strain Katha yang berasal dari Birma. Menurut WIIO (2006) vaksin yang telah memperoleh lisensi diperlukan pemantauan stabilitas vaksin yang berkelanjutan.

Penelitian uji stabilitas pada vaksin Septivet® ini untuk mengetahui stabilitas dan potensi vaksin Septivet® yang telah disimpan selama 2 tahun, sesuai masa kedaluwarsa vaksin yang selama ini telah ditetapkan yaitu selama 2 tahun. Hasil dari penelitian ini dapat digunakan untuk mendukung spesifikasi umur simpan vaksin.

## II. MATERI DAN METODE

### 2.1. Materi

Bahan :

Vaksin Septivet® nomor batch 10.16 ; 13.16 ; 15.16 masing-masing 5 botol; kapas; alkohol 70%; hewan uji (kelinci 9 ekor dan mencit 30 ekor untuk pengujian setiap nomor batch vaksin); media untuk uji sterilitas : *Heart Infusion Agar* (HIA) 3 buah, *Thioglycolate broth* (TGC) 4 tabung dan *Soybean Casein Digest* (SCD) 4 tabung untuk pengujian setiap nomor batch vaksin (FOII, 2018).

Alat :

Sprit kaca ukuran 1 ml dan 2 ml, *disposable spuit* (ukuran 1 ml, 3 ml, 5 ml), vortex mixer, tabung gelas ukuran 10 cc, *pipette* ukuran 1 ml, inkubator, BSC (*Bio Safety Cabinet*).



## 2.2. Metode

### a. Uji Fisik

Sediaan dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap sediaan mempunyai volume dan warna yang sama/seragam, serta tidak mengandung partikel asing dan harus homogen (FOHI, 2018).

### b. Uji Sterilitas

Inokulasi vaksin pada media dilakukan secara aseptik, sebanyak 1 ml vaksin diinokulasikan masing-masing pada 4 tabung yang berisi 20 ml media TGC, 4 tabung yang berisi 20 ml media SCD dan pada 3 media HIA (FOHI, 2018).

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

Media yang diinkubasi pada suhu 30-37°C digunakan untuk mendeteksi adanya kontaminasi bakteri, sedangkan media yang diinkubasikan pada suhu 20°-25°C digunakan untuk mendeteksi adanya kontaminasi fungi. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan fungi (kapang dan khamir) dalam 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/tidak rusak apabila pada akhir pengamatan, emulsi vaksin tidak mengalami *cracking* / pecah, apabila dikocok, vaksin akan kembali homogen (Bain *et al.*, 1982).

### d. Uji Keamanan

Enam ekor kelinci sehat dan peka, umur rata-rata 6 bulan, divaksinasi dengan 2 ml vaksin secara intra-muskular (IM). Kelinci diamati selama 2 minggu. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua kelinci tersebut tidak menunjukkan gejala abnormal (FOHI, 2018).

e. Uji Potensi dengan metode *Passive Mouse Protection Test* (PMPT)

Tiga ekor kelinci sehat dan peka, berat badan 1.800-2.200 gram, divaksinasi dengan 1 ml vaksin secara intra-muskular (IM) digunakan sebagai kelompok vaksinasi. Setelah 28 hari, masing-masing kelinci kelompok vaksinasi diambil darahnya, serum dipisahkan dan dibuat *pooled sera* dengan perbandingan volume yang sama (FOH, 2018).

Dua puluh ekor mencit, berat badan 18-22 gram, disuntik dengan 0,5 ml campuran serum secara sub-cutan (SC). Sepuluh ekor mencit lain digunakan sebagai mencit kontrol. Dua puluh empat jam kemudian, semua mencit ditantang dengan 0,1 ml biakan *Pasteurella multocida* B:2 strain lapang ganas, umur 6 jam, dengan konsentrasi 10 *mice lethal dose* 50 (10  $MLD_{50}$ ) secara sub-cutan (SC). Pengamatan dilakukan setiap hari selama 1 minggu (FOH, 2018).

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak kurang dari 80% mencit kelompok vaksinasi tetap hidup, sedangkan 100% kelompok kontrol mati (FOH, 2018).

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Hasil

Data diperoleh dari 3 batch vaksin yang sama yang diuji pada lama penyimpanan 0 bulan, 9 bulan, 12 bulan, 18 bulan dan 24 bulan. Perlakuan terhadap vaksin tersebut sama, yaitu disimpan pada suhu 2°-8°C sesuai dengan suhu penyimpanan yang direkomendasikan. Uji yang dilakukan antara lain, uji fisik, uji sterilitas, uji stabilitas emulsi, uji *safety* dan uji potensi.

**Tabel 1.** Hasil uji fisik, sterilitas, *safety* dan potensi vaksin Septivet® nomor *batch* 10.16 , 13.16 dan 15.16 dengan lama penyimpanan 0, 9, 12, 18 dan 24 bulan.

Lama Penyimpanan Vaksin	Nomor <i>Batch</i>	Jenis Uji				
		Fisik	Sterilitas	Stabilitas Emulsi	Safety	Potensi
0 bulan	10.16	Baik	Steril	Baik	100%	95%
	13.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
	15.16	Baik	Steril	Baik	100%	95%
9 bulan	10.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
	13.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
	15.16	Baik	Steril	Baik	100%	95%
Lama Penyimpanan Vaksin	Nomor <i>Batch</i>	Jenis Uji				
		Fisik	Sterilitas	Stabilitas Emulsi	Safety	Potensi
12 bulan	10.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
	13.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
	15.16	Baik	Steril	Baik	100%	95%
18 bulan	10.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
	13.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
	15.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
24 bulan	10.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
	13.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%
	15.16	Baik	Steril	Baik	100%	90%

### 3.2. Pembahasan

Hasil uji fisik, sterilitas, *safety* dan potensi vaksin Septivet® pada 3 batch vaksin dengan 5 macam lama waktu penyimpanan dapat dilihat pada tabel 1. Uji fisik menunjukkan warna, dan volume yang *uniform*/seragam, suspensinya homogen dan tidak ada partikel asing di dalam vaksin, sehingga dapat disimpulkan uji fisik dari semua vaksin yang diuji baik/memenuhi syarat pengujian (FOHI, 2018).

Hasil uji sterilitas, semua media yang digunakan untuk uji tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan fungi, sehingga uji sterilitas semua vaksin yang diuji steril/memenuhi syarat (FOHI, 2018).

Hasil uji stabilitas emulsi, setelah vaksin ditempatkan ke dalam inkubator suhu 37°C selama 14 hari tanpa digoyang-goyang, menunjukkan emulsi vaksin baik/tidak pecah (memenuhi syarat) (FOHI, 2018). Septivet® merupakan vaksin bentuk emulsi air dalam minyak dengan susunan suspensi *Pasteurella multocida* tipe B (Katha) inaktif sebanyak 50% dan adjuvant minyak sebanyak 50% (Pusvetma, 2018) sehingga sebelum digunakan disarankan untuk menempatkan vaksin pada suhu ruangan terlebih dahulu kemudian dikocok sampai rata (Pusvetma, 2018).

Hasil uji *safety* pada semua vaksin selama 2 minggu dapat dilihat pada Grafik 1. dari ke enam ekor kelinci tidak ada yang menunjukkan gejala abnormal/ uji *safety* sebesar 100% (memenuhi syarat) dan tidak ada tampak perubahan tingkat keamanan vaksin sciring dengan bertambahnya lama penyimpanan vaksin (FOHI, 2018).



**Grafik 1.** Hasil uji *safety* vaksin Septivet® nomor *batch* 10.16; 13.16 dan 15.16 dengan lama penyimpanan 0, 9, 12, 18 dan 24 bulan



**Grafik 2.** Hasil uji potensi vaksin Septivet® nomor *batch* 10.16; 13.16 dan 15.16 dengan lama penyimpanan 0, 9, 12, 18 dan 24 bulan



Grafik 2 memperlihatkan hasil uji potensi, pada vaksin Septivet® nomor *batch* 10.16 menunjukkan sedikit penurunan potensi, pada penyimpanan bulan ke 0 sebesar 95% sedangkan pada penyimpanan bulan ke 9, 12, 18 dan 24 menunjukkan potensi sebesar 90%. Nilai potensi vaksin Septivet® nomor *batch* 13.16 sebesar 90% dan tidak ada perubahan nilai potensi dengan variasi perlakuan lama penyimpanan vaksin. Nilai potensi vaksin Septivet® nomor *batch* 15.16 sebesar 90% pada lama penyimpanan 0 bulan, 9 bulan, 12 bulan dan menurun menjadi 90% pada lama penyimpanan 18 dan 24 bulan. Dari semua nilai potensi tersebut, semua vaksin Septivet® yang diuji memenuhi syarat pengujian yaitu sama dengan lebih besar 90% sesuai dengan persyaratan FOHI (2018) tidak kurang dari 80% mencit kelompok vaksinasi tetap hidup, sedangkan 100% kelompok kontrol mati.

Kelinci dan tikus merupakan hewan yang sangat rentan terinfeksi bakteri *Pasteurella multocida* sehingga merupakan model hewan yang paling sesuai untuk uji potensi *Pasteurella multocida* dalam skala laboratorium (Astuti L.S et al., 2014). Keunggulan vaksin SE isolat lokal multivalent memberikan respon antibodi lebih tinggi, reaksi terhadap komponen antigen lebih lengkap, dan titer antibodi yang lebih konsisten.

#### IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Vaksin Septivet® dengan lama penyimpanan sampai dengan 2 tahun pada suhu yang direkomendasikan yaitu 2°- 8°C masih memberikan keamanan (*safety*) dan protektifitas (potensi) yang baik sesuai standar FOHI (2018).

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan perlakuan masa penyimpanan vaksin di atas 2 tahun untuk mengetahui lama penyimpanan maksimal dan perlu adanya kajian tentang faktor eksternal yang dapat mempengaruhi kualitas vaksin Septivet®.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. *Product Knowledge* Pusvetma. Dalam leaflet “Septivet®”. Surabaya. Pusvetma
- Astuti L.S, Istiyaniingsih, Daulay K, Sarji, Amijaya D, Atikah N, Hayati M, Andesfha F. 2014. *Studi Mutu Vaksin Septicaemia Epizootica (SE) dan Durasi Imuniti Booster dan Non Booster Vaksinasi pada Sapi di Empat Provinsi di Indonesia Tahun 2014*. Bogor. Unit Uji Bakteriologi Balai Besar Pengujian dan Sertifikasi Obat Hewan.
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018. *Farmakope Obat Hewan Indonesia Edisi 5*. Jakarta. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- OIE. 2009. *Haemorrhagic Septicaemia*. The Center for Food Security & Public Health. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Paris. OIE Collaborating Center : 1-5.
- Priadi A, Natalia L. 1997. *Pengendalian Penyakit Septicaemia Epizootica pada Sapi dan Kerbau di Indonesia*. Disampaikan dalam Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner Tahun 1997.
- Priadi A, Natalia L. 2000. *Patogenesis Septicaemia Epizootica (SE) Pada Sapi/Kerbau: Gejala Klinis, Perubahan Patologis, Reisolasi, Deteksi Pasteurella multocida dengan Kultur dan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner 5(1): 65-71.
- Ramdani. 1997. *Pengembangan Vaksin SE dari Isolat Lokal untuk Pencegahan Penyakit Ngorok pada Sapi dan Kerbau*. Pros. Simposium Sehari Penyakit Ngorok (Septicacimia epizootica, SE). Bogor. 19 Agustus 1997. Bogor. Balitvet. Hal 44-46
- 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

BBVF PUSVETMA



**KEMENTERIAN PERTANIAN**  
**DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN**  
**PUSAT VETERINER FARMA**  
**(PUSVETMA)**

Jl. A. Yani 68-70 Surabaya 60231

Telp. (031) 8291124, 8291125 Fax. (031) 8291183

Telp Pengaduan (031) 8291477

Telp/Wa/SMS Pengaduan 0821 3143 3112

Website : [Pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id](http://Pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id)

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

**BBVF PUSVETMA**