

RESPON ANTIBODI KANDIDAT VAKSIN RABIES ISOLAT BALI PADA MENCIT BALB C

Ni Luh Putu Agustini¹, I Putu Gede Widnyana Aryawiguna², Nyoman Mantik Astawa²

¹ Balai Besar Veteriner Denpasar

² Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

E-mail :putuagustini67@yahoo.co.id

ABSTRAK

Rabies atau penyakit anjing gila merupakan penyakit zoonosis tertua di dunia yang sampai saat ini masih terus terjadi. Kasus Rabies pertama di Bali dilaporkan terjadi pada bulan November 2008 di Kecamatan Kuta Selatan, Kabupaten Badung Bali. Vaksinasi merupakan program utama dalam pencegahan Rabies di Bali dan sejak tahun 2009 pemerintah Provinsi Bali telah melakukan program vaksinasi massal di seluruh Kabupaten/kota di Bali. Beberapa jenis vaksin Rabies sudah pernah digunakan dalam program pencegahan dan pengendalian Rabies di Bali, namun sejauh ini belum ada vaksin Rabies yang diproduksi dari virus Rabies isolat Bali. Sehubungan dengan hal tersebut pada bulan April dan Mei 2017 telah dilakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan kandidat vaksin Rabies isolate Bali menginduksi respon antibodi dan memastikan apakah respon antibodi yang ditimbulkannya setara atau lebih tinggi dibandingkan vaksin Rabisin. Penelitian ini menggunakan mencit *Balb C* betina dan jantan umur 6-8 minggu sebanyak 24 ekor. Mencit dikelompokkan menjadi 8 kelompok dan diimunisasi menggunakan kandidat vaksin Rabies isolat Bali dan vaksin Rabisin sebagai pembanding dengan dosis 0.1 ml/ekor dan 0.2 ml/ekor. Dua minggu setelah vaksinasi pertama dilakukan pengambilan sampel serum dan pada minggu ketiga dilakukan *booster*. Satu minggu pasca *booster* dilakukan pengambilan sampel serum kedua. Semua sampel serum diuji ELISA menggunakan KIT ELISA produksi Pusat Veteriner Farma Surabaya. Data hasil uji ELISA dianalisis dengan sidik ragam apabila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT). Hasil penelitian menunjukkan kandidat vaksin Rabies isolat Bali mampu menginduksi respon imun dan menghasilkan titer antibodi yang setara dengan vaksin Rabisin pada mencit *Balb C*, 4 minggu pascavaksinasi dengan dosis 0.2 ml/ekor. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui respon antibodi yang ditimbulkan kandidat vaksin rabies isolat Bali pada anjing sebagai hospes alami Rabies.

Kata kunci: Rabies, Isolat Bali, Titer

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Rabies atau penyakit anjing gila merupakan penyakit zoonosis tertua di dunia yang sampai sekarang masih terus terjadi. Menurut WHO lebih dari 3 juta orang di dunia berisiko tertular rabies. Penyakit ini diperkirakan membunuh sekitar 50.000–60.000 manusia di 85 negara yang masih endemik rabies (WHO, 2004). Penyebab rabies adalah virus dari genus *Lyssavirus*, famili *Rhabdoviridae* (OIE, 2008). Virus rabies termasuk virus yang memiliki genom RNA untai tunggal berpolaritas negatif (*ss-RNA* virus), memiliki ukuran diameter 75 nm dan panjang 180 nm. Virus rabies memiliki lima jenis partikel protein yang berbeda yakni glikoprotein (G), matrik protein (M), RNA *polymerase* (L), nukleoprotein (N), dan *phosphoprotein* (P) (Coll, 1995). Virus rabies dikeluarkan bersama air liur hewan yang terinfeksi dan ditularkan melalui gigitan, cakaran atau melalui kulit yang terluka (Bingham, 2005; Kang *et al.*, 2007).

Rabies dilaporkan pertama kali oleh Stchorl pada tahun 1884, yaitu pada seekor kuda di Bekasi, Jawa Barat. Selanjutnya kasus rabies pada kerbau

dilaporkan pada tahun 1889, kemudian rabies pada anjing dilaporkan oleh Penning tahun 1890 di Tangerang. Saat ini, rabies bersifat endemik di beberapa daerah seperti di Flores Nusa Tenggara Timur, Sulawesi, Kalimantan, Sumatera Barat dan Maluku (Susetya *et al.*, 2008).

Di Provinsi Bali sumber penularan Rabies diduga berasal dari masuknya anjing dalam masa inkubasi yang dibawa oleh pelaut asal Sulawesi Selatan (Putra, *et.al.*, 2009). Sejak munculnya kasus Rabies di desa Kedonganan Kecamatan Kuta Selatan, Kabupaten Badung pada Bulan November 2008. Berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian No. : 1637.1/2008 tertanggal 1 Desember 2008 Provinsi Bali secara resmi dinyatakan sebagai daerah tertular Rabies. Penyebaran rabies di Bali tergolong cepat karena pada pertengahan tahun 2009 sudah menyebar ke beberapa wilayah seperti Kabupaten Tabanan, Kabupaten Karangasem, Kabupaten Buleleng, Kabupaten Bangli dan Kabupaten Gianyar. Selanjutnya pada tahun 2010 meluas ke Kabupaten Klungkung dan Jembrana. Dalam jangka waktu kurang lebih 2 tahun Rabies sudah menyebar ke seluruh wilayah Bali

Berbagai program pengendalian Rabies di Provinsi Bali sudah dilakukan seperti vaksinasi, pengendalian populasi hewan penular rabies (HPR), pengawasan lalu lintas HPR, sosialisasi dan eliminasi. Vaksinasi merupakan program utama dalam pencegahan Rabies di Bali. Sejak tahun 2009 pemerintah Provinsi Bali telah melakukan program vaksinasi massal di seluruh Kabupaten/kota di Bali.

Hasil penelitian Dibia, *et al.*, 2014 menemukan bahwa virus Rabies Bali memiliki penanda molekuler berupa asam amino Isoleusin pada posisi 308 (*open reading frame*) gen Nukleoprotein. Hal inilah yang membedakan virus Rabies Bali dengan virus Rabies lainnya.

Respon antibodi hasil vaksinasi sangat ditentukan oleh beberapa faktor antara lain : kondisi tubuh hewan, status gizi, status imun, kualitas dan kuantitas vaksin serta lingkungan. Selama ini pencegahan Rabies di provinsi Bali ada beberapa jenis vaksin yang digunakan antara lain vaksin Rabivet Supra, Rabisin, Biocan dan Caprivac. Hasil surveilans dan monitoring Balai Besar Veteriner (BBVet) Denpasar menunjukkan bahwa vaksinasi massal yang dilakukan mampu merangsang terbentuknya antibodi Rabies namun respon antibodi yang ditimbulkan belum mencapai 70% (Agustini, *et al.*, 2016).

Secara imunologi respon antibodi yang ditimbulkan oleh vaksin akan lebih baik jika strain virus yang digunakan sebagai seed vaksin berasal dari virus yang sama. Sampai saat ini vaksin Rabies yang dibuat dari isolat virus Bali belum tersedia. Mengingat bahwa virus Rabies isolat Bali telah dapat dipropagasi pada kultur sel Baby Hamster Kidney (BHK-21), potensi pengembangan vaksin Rabies menggunakan virus Rabies isolat lokal sangat dimungkinkan. Penelitian

ini bertujuan untuk : mengetahui kemampuan kandidat vaksin Rabies isolate Bali menginduksi respon antibodi dan mengetahui respon antibodi yang ditimbulkan setara atau lebih tinggi dibandingkan vaksin Rabisin.

MATERI DAN METODE

Materi

Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit *Balb/C* betina dan jantan umur 6-8 minggu sebanyak 24 ekor. Mencit dikelompokkan menjadi 8 kelompok dan ditempatkan dalam kandang terpisah (A, B, C, D, E, F, G, H) masing-masing kandang terdiri dari 3 ekor mencit. Dalam kandang (A, B, C, D) ditempatkan mencit jantan sedangkan kandang (E, F, G, H) ditempatkan mencit betina

Vaksin Rabies

Vaksin Rabies yang digunakan adalah Kandidat vaksin Rabies isolat Bali yang diproduksi oleh Mantik Astawa, tahun 2016 dan vaksin Rabisin sebagai pembanding dengan dosis 0.1 ml/ekor dan 0.2 ml/ekor.

Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : serum mencit, vaksin Rabisin, kandidat vaksin Rabies isolat Bali, Kit ELISA Rabies (Pusvetma Surabaya)

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan antara lain : S spuit 1ml, tabung *effendorf*, Mikroplate ELISA (Nunc), mikrotip 200 μ l, mikrotip 1000 μ l, *micropipete* (Effendorf), *multichannelpipete* (Effendorf), incubator 37° C, *waterbath*, *microshaker*, *ELISA washer* (BioRad 550), *ELISA reader* ((Thermo Scientific)

Metode

Tahapan Penelitian meliputi :

a. Imunisasi Mencit

Mencit dikelompokkan menjadi 8 kelompok dan ditempatkan pada kandang terpisah (A, B, C, D, E, F, G, H) masing-masing kandang terdiri dari 3 ekor mencit. Kandang (A, B, C, D) sebagai kandang mencit jantan sedangkan kandang (E, F, G, H) sebagai kandang mencit betina

Mencit di kandang A dan E diimunisasi dengan vaksin Rabisin dengan dosis 0,1 ml per ekor sedangkan di kandang B dan F diimunitasi dengan vaksin Rabisin dosis 0,2 ml per ekor. Mencit pada kandang C dan G diimunitasi dengan kandidat vaksin Rabies isolat Bali dengan dosis 0,1 ml per ekor, Sedangkan

mencit di kandang D dan H diimunisasi dengan kandidat vaksin Rabies isolat Bali dengan dosis 0.2 ml per ekor. Rute pemberian vaksin dilakukan secara intramuskuler. Dua minggu setelah imunisasi pertama dilakukan pengambilan sampel serum. Satu minggu setelah pengambilan serum dilakukan *booster* pada semua kelompok mencit dengan dosis dan rute yang sama seperti imunisasi pertama. Satu minggu kemudian dilakukan pengambilan sampel serum kedua

b. Inaktivasi Serum

Sebelum uji ELISA dilakukan inaktivasi sampel serum pada waterbath suhu 56°C selama 30 menit.

c. Uji ELISA

Semua sampel serum yang telah dikumpulkan diuji ELISA sesuai dengan prosedur KIT ELISA Rabies Pusvetma dengan tahapan sebagai berikut :

Sampel serum mencit yang akan diuji diencerkan 1 : 100 dengan cara menambahkan sebanyak 2.5 µl serum uji ke dalam 247.5 µl pelarut PBST pada mikroplate (template). Urutan sampel serum dalam template mikroplate didisain sedemikian rupa sehingga enceran sampel dapat dipindahkan ke dalam sumuran-sumuran pada mikroplate uji. Selanjutnya dilakukan pengenceran serum kontrol positif dengan cara menyiapkan sebanyak 6 tabung dan ke dalam masing-masing tabung dimasukkan sebanyak 500 µl PBST. Kecuali pada tabung pertama ditambahkan sebanyak 990 µl PBST. Setelah itu sebanyak 10 ul serum kontrol positif dimasukkan ke dalam tabung pertama kemudian dicampur sampai homogen sehingga diperoleh kontrol positif pengenceran (K4 EU). Selanjutnya 500 ul serum kontrol positif K4 EU dipindahkan ke dalam tabung kedua yang sudah berisi 500 ul PBST, dicampur sampai homogen sehingga diperoleh pengenceran K2 EU. Pengenceran kontrol positif K1 EU dibuat dengan cara memindahkan 500 ul kontrol positif K2 EU kedalam tabung ketiga yang sudah berisi 500 ul PBST. Selanjutnya 500 ul pengenceran K1 EU dimasukkan ke dalam tabung keempat yang telah berisi 500 ul PBST sehingga diperoleh pengenceran kontrol positif 0.5 EU. Tambahkan 500 ul kontrol positif pengenceran 0.5 EU ke dalam tabung kelima yang sudah berisi 500 ul PBST sehingga diperoleh pengenceran kontrol positif K 0.25 EU. Terakhir tambahkan 500 ul. Kontrol positif K 0.25 EU ke dalam tabung keenam yang telah berisi 500 ul PBST sehingga diperoleh pengenceran 0.125 EU. Pengenceran kontrol negatif dilakukan dengan cara menambahkan 2.5 ul kontrol negatif ke dalam 247.5 ul PBST, sedangkan untuk Pengenceran Kontrol Standar dilakukan dengan cara menambahkan 2.5 ul kontrol standar 1 EU ke dalam 247.5 ul PBST, dicampur sampai homogen. Setelah pengenceran kontrol positif, negatif dan kontrol standar selesai selanjutnya pindahkan enceran serum dengan pipet multichanel ke mikroplate uji sebanyak 100 µl. Sumuran H11 dan H12 sebagai kontrol pelarut. Selanjutnya pindahkan masing-masing sebanyak 100 ul serum kontrol positif ke dalam masing-masing sumuran : dimulai dari serum kontrol K4 EU ke dalam sumuran A1 dan A2, serum kontrol positif K2 EU ke dalam

sumuran B1 dan B2, serum kontrol K1 EU ke dalam sumuran C1 dan C2, serum kontrol 0.5 EU ke dalam sumuran D1 dan D2, serum kontrol 0.25 EU ke dalam sumuran E1 dan E2, dan serum kontrol 0.125 EU ke dalam sumuran F1 dan F2. Penambahan kontrol standar dilakukan dengan memasukkan 100 ul kontrol standar yang sudah diencerkan ke dalam sumuran G1 dan G2. Sedangkan untuk penambahan kontrol serum negatif dilakukan dengan cara memasukkan 100 ul kontrol serum negatif yang sudah diencerkan ke dalam sumuran H1 dan H2. Selanjutnya tutup mikroplate dengan plastik penutup dan inkubasikan pada suhu 37°C selama 45-60 menit. Siapkan conjugate/ antibodi sekunder (rec-protein A-HRP) pengenceran 16000 kali dengan PBST. Setelah diinkubasi selama 1 jam buang cairan serum pada mikroplate uji dan lakukan pencucian dengan PBST sebanyak minimal 5 kali dan keringkan cairan pencuci yang masih tersisa dalam jumlah kecil dengan cara memBalikkan mikroplate di atas kertas tisu tebal. Setelah mikroplate kering, tambahkan konjugate yang sudah diencerkan 1 : 16000 sebanyak masing-masing 100 µl pada semua sumuran dan tutup mikroplate dengan plastik penutup dan inkubasikan pada suhu 37°C selama 45-60 menit. Buang cairan dan lakukan pencucian seperti prosedur di atas. Tambahkan substrat sebanyak masing-masing 100 µl pada semua sumuran dan inkubasi mikroplate pada suhu kamar pada kondisi gelap selama 15-30 menit. Selama inkubasi diamati timbulnya warna kebiruan. Bila warna antara kontrol positif dan negatif bisa dibedakan secara visual maka dilakukan penghentian reaksi dengan penambahan *stop solution* sebanyak 100 µl pada semua lubang. Terakhir lakukan pembacaan hasil pada ELISA Reader dengan panjang gelombang 405 nm.

d. Perhitungan Hasil

Perhitungan hasil uji ELISA Rabies dilakukan menggunakan persamaan garis dengan program Excel

a. Cara Membuat Kurva.

X = Nilai Equivalent Unit K4 EU; K2 EU; K1 EU; K 0.5 EU; K 0.25 EU; dan K 0.125 EU

Y = nilai Optical Density rata-rata Kontrol positif

1. Blok X dan Y
 2. Arahkan kursor pada *chart wizard*, klik
 3. Pilih XY (*scatter*)
 4. Pilih gambar grafik *Scater with smooth line and markers*
 5. Arahkan kursor pada grafik, klik kanan
 6. Pilih *Add trendline*
 7. Pilih logaritmic
 8. Pilih *display equation on chart dan display R-squared value on chart*
- b. Keluar persamaan garis mis: $Y=(0.660\text{Ln}(X) + 1.402$ dan $R^2 = 0.978$.
Persamaan garis dapat diterima apabila R^2 mendekati angka 1 (antara 0.9-1)
- c. Masukkan persamaan garis $Y-1.402 = 0.660 \text{ Ln}(X)$
- d. $\text{Ln}X = (Y - 1.402)/0.660$
- e. $X = \text{Exp} (\text{Inverse Ln}X)$

Interpretasi Hasil

Jika nilai perhitungan hasil (Titer) sampel ≥ 0.5 IU maka sampel dikategorikan positif (nilai titer antibodi Rabies cukup). Jika nilai perhitungan hasil (Titer) sampel < 0.5 IU maka sampel dikategorikan negatif (nilai titer antibodi Rabies tidak cukup) (Pusvetma, 2013)

Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak kelompok dengan 4 jenis perlakuan (P1, P2, P3 dan P4) dan 2 kelompok (jantan dan betina). Setiap kelompok terdiri atas 3 ulangan sehingga jumlah mencit yang digunakan sebanyak 24 ekor, terdiri dari 12 ekor mencit jantan dan 12 ekor mencit betina (Tabel 1). Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah titer antibodi Rabies dengan satuan International Unit (IU). Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam dan dilanjutkan dengan analisis beda nyata terkecil

Tabel 1. Rancangan Acak Kelompok 4 perlakuan dan 2 Kelompok

Perlakuan	Kelompok	
	Jantan	Betina
P1	3	3
P2	3	3
P3	3	3
P4	3	3

Keterangan :

P1 : Rabisin 0.1 ml

P2 : Rabisin 0.2 ml

P3 : Vaksin isolat Bali 0,1 ml

P4 : Vaksin isolat Bali 0,2 ml

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di kandang hewan percobaan dan di Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner Denpasar, jalan Raya Sesetan 266 Denpasar, dan dilaksanakan pada bulan April sampai bulan Mei 2017.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil pengujian antibodi Rabies dari kelompok mencit yang divaksinasi dengan vaksin Rabisin dan kandidat vaksin Rabies isolat Bali dosis 0.1 ml/ekor dua minggu dan empat minggu pascavaksinasi (satu minggu pasca booster) ditampilkan pada Tabel 2. Tabel tersebut menunjukkan rerata titer antibodi yang bervariasi. Nilai rerata titer antibodi berkisar antara 0.4 - 6.9 EU/ml .

Respon antibodi dari vaksin Rabisin dua minggu pascavaksinasi tertinggi terdeteksi pada mencit betina (0,7) EU/ml, sedangkan rerata titer terendah (0,4) EU/ml. dihasilkan oleh kandidat vaksin Rabies isolat Bali pada mencit jantan dan betina .

Respon antibodi yang ditimbulkan kandidat vaksin Rabies isolat Bali ,empat minggu pascavaksinasi sangat nyata lebih tinggi dari vaksin Rabisin rerata titer antibodi tertinggi (6,9) EU/ml ditemukan pada kelompok mencit betina yang diimunisasi kandidat vaksin Rabies isolat Bali , sedangkan rerata terendah (1.7) EU/ml ditemukan pada serum kelompok mencit betina yang diimunisasi dengan vaksin Rabisin

Berdasarkan analisis sidik ragam diketahui bahwa jenis vaksin, dan jenis kelamin berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap titer antibodi, sedangkan interaksinya tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$). Hasil analisis sidik ragam ditampilkan pada tabel 3. Analisis uji Beda Nyata Terkecil (BNT), menunjukkan bahwa mencit betina menghasilkan titer antibodi lebih tinggi dari mencit jantan . (Tabel 4). Dari Uji BNT pengaruh jenis vaksin terhadap titer antibodi diperoleh hasil bahwa vaksin Rabisin menghasilkan rerata titer antibodi sangat nyata lebih tinggi dibandingkan dengan kandidat vaksin isolat Bali. pada dosis 0.1 ml//ekor (Tabel 5).

Tabel 2. Rerata titer antibodi mencit yang diimunisasi vaksin Rabisin dan Kandidat vaksin isolat Bali dosis 0.1 ml/ekor.

Perlakuan	Waktu pengambilan serum	Ulangan			Σ	X
		I	II	III		
V1D1S1 Jantan	I	0.5	0.3	0.6	1.4	0.5
V1D1S2 Betina	I	0.8	0.7	0.5	2.0	0.7
V2D1S1 Jantan	I	0.3	0.5	0.5	1.3	0.4
V2D1S2 Betina	I	0.5	0.3	0.5	1.3	0.4
V1D1S1 Jantan	II	3.3	2.5	1.3	7.1	2.4
V1D1S2 Betina	II	0.9	3	1.3	5.2	1.7
V2D1S1 Jantan	II	1.7	3	1.7	6.4	2.1
V2D1S2 Betina	II	13.1	3.7	4	20.8	6.9
		21.1	14	10.4	45.5	

Keterangan : :

V1 : Vaksin Rabisin

V2 : Kandidat vaksin Rabies isolat Bali

D1 : Dosis 0,1 ml/ekor

S1 : Jantan

S2 : Betina

I : Pengambilan serum dua minggu pascavaksinasi

II : Pengambilan serum satu minggu pasca booster

Tabel 3. Daftar sidik ragam pengaruh jenis vaksin jenis kelamin dan dosis 0,1ml/ekor terhadap titer antibodi.

Sumber keragaman	DB	JK	KT	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	7	14.27583	2.039404286	1.142856879*	3.5	6.19
Vaksin	2	219527.3571	109763.6786	61510.20469**	4.46	8.65
Sex	2	313864.43	6.37218E-06	3.57089E-06**	4.46	8.65
Vak .Sex	4	-533378	-7.49937E-06	-4.20256E-06NS	3.83	7.01
Acak	8	14.2758333	1.784479163			
Total	11					

Ket

* : berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

NS : Tidak signifikan

Tabel 4. Uji BNT pengaruh jenis kelamin terhadap titer antibodi

Perlakuan	X	22.8	1.4	0.9125	Notasi
Betina 2 minggu pasca vaksinasi pertama	114.92	92.1	113.5	114.0075	a
Jantan 2 minggu pasca vaksinasi pertama	22.8425		21.4	21.93	b
Betina 1 minggu pasca vaksinasi kedua	1.4425			0.53	c
Jantan 1 minggu pasca vaksinasi kedua	0.9125				d

Keterangan :

Huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Tabel 5. Uji BNT pengaruh jenis vaksin terhadap titer antibodi

Perlakuan	95.4	16.7	Notasi
Vaksin Rabisin	95.4	78.7	a
Vaksin Isolat Bali	16.682		b

Keterangan :

Huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Titer antibodi yang bervariasi juga terdeteksi pada serum mencit yang diimunisasi dengan vaksin Rabisin dan kandidat vaksin Rabies isolat Bali dosis 0.2 ml/ekor. Nilai rerata titer antibodi berkisar antara 0.4 - 5.1 EU/ml. Rerata titer antibodi tertinggi dua minggu pascavaksinasi (0.9) EU/ml ditemukan pada kelompok mencit jantan yang diimmunisasi kandidat vaksin Rabies isolat Bali, sebaliknya mencit jantan yang diimmunisasi vaksin Rabisin menunjukkan rerata titer antibodi terendah (0,4) EU/ml.

Hasil uji ELISA pengujian serum mencit empat minggu pascavaksinasi menunjukkan kandiati vaksin Rabies isolat Bali yang diimunisasasi pada mencit jantan menghasilkan rerata titer antibodi yang paling tinggi (5,1) EU/ml. dan rerata titer antibodi terendah terdeteksi pada kelompok mencit jantan yang diimunisasi dengan vaksin Rabisin (2,4) EUml. Profil titer antibodi selengkapnya pada Tabel 4.

Analisis statistik sidik ragam pada rerata titer antibodi dengan dosis 0,2 dimuat pada tabel 7. Hasil analisis menunjukan bahwa jenis vaksin dan jenis kelamin berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap titer antibodi sedangkan interaksinya tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$). Hasil analisis sidik ragam menunjukan berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT . Hasil uji BNT disajikan pada tabel 8 dan 9. Hasil dari uji BNT menunjukan bahwa kandidat vaksin isolat Bali menunjukkan rerata titer antibodi sangat nyata lebih tinggi dibandingkan dengan vaksin Rabisin ($P < 0,01$). Mencit jantan yang diimunisasi dengan vaksin Rabisin menunjukkan titer antibodi lebih tinggi daripada. mencit betina ($P < 0,01$)

Tabel. 6. Rerata titer antibodi mencit pada dua minggu pascavaksinasi dan satu minggu pasca booster dosis 0,2

Perlakuan	Sex	waktu	Ulangan			Σ	X
			I	II	III		
V1D2S1	Jantan	I	0.3	0.5	0.3	1.1	0.5
V1D2S2	Betina	I	0.4	0.5	0.4	1.3	0.4
V2D2S1	Jantan	I	1	0.5	1.1	2.6	0.9
V2D2S2	Betina	I	0.6	0.4	0.9	1.9	0.6
V1D2S1	Jantan	II	3	2.4	1.7	7.1	2.4
V1D2S2	Betina	II	5.8	1.6	1.5	8.9	3.0
V2D2S1	Jantan	II	4.9	9.4	1	15.3	5.1
V2D2S2	Betina	II	2.6	0.9	6.1	9.6	3.2
			18.6	16.2	13	47.8	

Keterangan :

V1 : Vaksin Rabisin

V2 : Kandidat vaksin isolat Bali

D1 : Dosis 0,2 ml/ekor

S1 : Jantan

S2 : Betina

I : Pengambilan serum dua minggu pascavaksinasi

II : Pengambilan serum empat minggu pascavaksinasi (satu minggu pasca booster)

Tabel 7. Daftar sidik ragam pengaruh jenis vaksin jenis kelamin dan dosis 0,2 ml/ekor terhadap titer antibodi.

Sumber keragaman	DB	JK	KT	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	7	28.77917	4.11131	2.303927155*	3.5	6.19
Vaksin	2	219527.3571	109763.6786	61510.20469**	4.46	8.65
Sex	2	313864.43	156932.215	87942.86776**	4.46	8.65
Vak .Sex	4	-533378	-133344.5	-74724.60469NS	3.83	7.01
Acak	8	14.2758333	1.784479163			
Total	11					

Keterangan :

* : berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

NS : Tidak signifikan

Tabel 8. Uji BNT terhadap pengaruh jenis kelamin

Perlakuan	x	42.84	1.9925	1.325	Notasi
Jantan 2 minggu pasca vaksinasi pertama	71.125	28.3	69.1	69.8	a
Betina 2 minggu pasca vaksinasi pertama	42.8425		40.9	41.5175	b
Jantan 1 minggu pasca vaksinasi kedua	1.9925			0.6675	c
Betina 1 minggu pasca vaksinasi kedua	1.325				d

Keterangan

Huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Tabel 9. Uji BNT terhadap pengaruh jenis vaksin

Perlakuan	67.3	26.504	Notasi
Vaksin Isolat Bali	67.3	40.8	a
Vaksin Rabisin	26.504		b

Keterangan :

Huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Pembahasan

Vaksinasi merupakan program pilihan utama dalam pengendalian dan pemberantasan Rabies di Indonesia , karena vaksinasi Rabies akan merangsang sistim imun membentuk antibodi sehingga mampu memberikan proteksi pada HPR terhadap infeksi Rabies.

Secara umum titer antibodi dikategorikan protektif apabila ≥ 0.5 IU/ml. Dalam penelitian ini pengukuran titer antibodi dilakukan dengan KIT Elisa

Rabies Pusvetma . Titer antibodi yang diukur dinyatakan dalam satuan Equivalen Unit (EU) yang sama dengan satu Internasional Unit (IU)

Hasil penelitian menunjukkan imunisasi/vaksinasi pada mencit mampu merangsang terbentuknya antibodi. Hal ini terbukti dengan adanya peningkatan titer antibodi pascavaksinasi. Hasil pengujian serum mencit yang divaksinasi vaksin Rabisin dengan dosis 0.1 ml/ekor dua minggu pascavaksinasi menunjukkan titer antibodi lebih tinggi dibandingkan dengan kandidat vaksin Rabies isolat Bali. Hasil ini bersesuaian dengan penelitian Minke *et al.* (2009) bahwa titer antibodi >0,5 EU sebesar 87% ditemukan pada hari 14 pascavaksinasi dengan vaksin Rabisin dan sebesar 100% pada anjing yang divaksinasi dengan vaksin Nobivac.

Pada penelitian ini ditemukan kandidat vaksin Rabies isolate Bali dosis 0.1ml/ekor dua minggu pascavaksinasi menghasilkan titer antibodi lebih rendah dibandingkan dengan vaksin Rabisin. Adanya perbedaan respon antibodi yang terdeteksi menurut Kennedy *et al.* (2007) disebabkan oleh formulasi dan perbedaan cara produksi, konsentrasi dan integritas kandungan antigen, serta adjuvan yang digunakan. Vaksin Rabisin menggunakan isolat Pasteur sebagai *seed* vaksin, cara produksinya sudah dilakukan secara pabrikan, sedangkan kandidat vaksin isolat Bali menggunakan virus Rabies isolat lokal (Bali) dan cara produksinya masih dilakukan secara konvensional belum memenuhi CPOHB (Cara Produksi Obat Hewan yang Baik. Walaupun demikian kandidat vaksin Rabies isolat Bali mampu menghasilkan titer antibodi yang sangat nyata lebih tinggi dibandingkan dengan vaksin Rabisin pada mencit empat minggu pascavaksinasi dengan dosis 0.2 ml/ekor. Hasil ini bersesuaian dengan penelitian Aubert (2006) yang menemukan titer antibodi mencapai titik yang protektif setelah lebih 2 minggu pascavaksinasi. Kinetika antibodi netralisasi akan mencapai titik tertinggi apabila dilakukan *booster* atau revaksinasi pada hewan sebelum nilai titer antibodi mencapai titik yang rendah. Jenis vaksin dan *adjuvant* yang digunakan juga akan mempengaruhi cepatnya antibodi mencapai level yang protektif.

Dalam produksinya kandidat vaksin Rabies isolat Bali menggunakan *Adjuvant Alumunium Hidroksida* (AIOH). Adjuvant tersebut merupakan adjuvant tradisional yang berperan membentuk kantong atau depo antigen sehingga antigen vaksin dikeluarkan secara perlahan-lahan sehingga respon antibodi akan lebih lambat terbentuk namun dapat bertahan lebih lama. Selain itu ada kecenderungan titer antibodi lebih tinggi pada hewan yang sudah pernah divaksinasi dibandingkan dengan hewan yang baru divaksinasi pertama kali . Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Simani *et al.*, 2004 yang menyatakan bahwa *booster* penting dilakukan untuk mempertahankan titer antibodi protektif . Hasil penelitian ini sesuai dengan yang di laporkan oleh Wilde dan Tepsumethanon (2010), bahwa satu dosis vaksin tidak akan menghasilkan antibodi netralisasi yang lama sehingga perlu dilakukan *booster*. Adanya variasi titer yang terbentuk

diantaranya dapat dipengaruhi oleh beberapa hal seperti kondisi tubuh hewan, status gizi, status imun, kualitas dan kuantitas vaksin serta lingkungan. Jenis vaksin dan *adjuvant* yang digunakan juga akan mempengaruhi cepatnya antibodi mencapai level yang protektif

Titer antibodi pada mencit yang diimunisasi kandidat vaksin Rabies isolat Bali dengan dosis 0.2 ml/ ekor sangat nyata lebih tinggi dibandingkan dengan vaksin Rabisin . Hasil ini kemungkinan dipengaruhi oleh *seed* virus yang digunakan Secara imunologi respon antibodi yang ditimbulkan oleh vaksin akan lebih optimal apabila virus yang digunakan sebagai *seed* vaksin berasal dari isolat virus yang sama. Hasil penelitian Dibia, *et al.*, 2014 menemukan bahwa virus Rabies Bali memiliki penanda molekuler berupa asam amino Isoleusin pada posisi 308 (*open reading frame*) gen Nukleoprotein. Hal inilah yang membedakan virus Rabies Bali dengan virus Rabies lainnya. Adanya perbedaan tersebut kemungkinan juga berpengaruh terhadap titer antibodi yang dihasilkan.

Jenis kelamin (*sex*) juga berpengaruh terhadap titer antibodi yang terbentuk. Hasil penelitian menunjukkan mencit betina yang diimunisasi vaksin dosis 0.1 ml/ekor, menunjukkan rerata titer antibodi lebih tinggi dibandingkan mencit jantan. Hasil ini bersesuaian dengan penelitian Klein, 2000 yang menemukan hewan jantan menunjukkan respon imunitas yang lebih rendah bila dibandingkan dengan hewan betina hal ini dipengaruhi oleh adanya efek immunosupresi pada androgen. Selain itu faktor siklus hormonal pada hewan betina akan berpengaruh pula terhadap tingginya respon imunitas pada anjing betina (Dodds 2008). Berbeda dengan hasil yang ditemukan oleh Klein, 2000 pada dosis 0.2 ml/ekor mencit jantan menunjukkan titer antibodi lebih tinggi dibandingkan dengan mencit betina. Adanya perbedaan ini kemungkinan dipengaruhi oleh dosis vaksin yang diaplikasikan dan dalam penelitian ini ada indikasi bahwa dosis vaksin juga berpengaruh terhadap antibodi yang terbentuk. Lebih tingginya dosis yang dibutuhkan untuk menimbulkan titer antibodi yang tinggi kemungkinan disebabkan karena titer virus yang digunakan pada kandidat vaksin Rabies isolat Bali lebih rendah dari vaksin Rabisin, sehingga untuk menimbulkan respon yang setara atau lebih dibutuhkan waktu yang lebih lama.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

- Kandidat vaksin rabies isolat Bali mampu merangsang terbentuknya antibodi pascavaksinasi dan booster
- Kandidat vaksin Rabies isolat Bali mampu menghasilkan respon antibodi yang setara bahkan lebih tinggi dari vaksin Rabisin pada 4 minggu pascavaksinasi dengan dosis 0.2 ml/ekor

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang respon antibodi yang ditimbulkan oleh kandidat vaksin Rabies isolat Bali pada anjing yang merupakan hospes alami Rabies

DAFTAR PUSTAKA

- Aubert MFA. 2006. Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs and results of a survey on rabies vaccination and quarantine for domestic carnivora in western europe. Centre national d'études vétérinaires et alimentaires, Laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages. <http://www.britfeld.com/rabies.htm>. Diakses 28 Januari 2017
- Agustini NLP, Dilasdita, KP; Puspitasari P, Mayun IK; Mundera ING dan Ekaana IW. 2016. Serosurveilans rabies di Propinsi Bali, Nusa Tenggara Barat dan Nusa Tenggara timur tahun 2016. Laporan teknis Balai Besar Veteriner Denpasar tahun 2016.
- Bingham J. 2005. Canine Rabies Ecology in Southern Africa. *Emerging Infectious Diseases*. 11(9). 1337-1341. www.cdc.org. Diakses Januari 2017
- Dibia, N., Sumiarto, B., Susetya, H., Putra, AAG. 2014. Phylogenetic analysis of Rabies virus in Bali, *Buletin Veteriner Vol. XXVI*:.84.1-14
- Kennedy L.J., M.Lunt, A.Barnes, L.McElhinney, A.R.Fooks, D.N.Baxer, and W.E.R.Ollier. 2007. Factor Influencing the Antibodi Response of Dogs Vaccinated Against Rabies. *Vaccine*. 25(2007) : 8500-8507.
- Menteri Pertanian. 2008. Surat Keputusan Menteri Pertanian Nomor 1637.1/Kpts/PD 640/12.2008. Tentang Pernyataan Berjangkitnya Wabah Penyakit Anjing Gila (Rabies) di Kabupaten Badung, Provinsi Bali.
- OIE (World Organisation for Animal Health). 2008. Rabies. Manual of standard for diagnostic techniques. Chapter 2.1.13. Terrestrial manual. P.304-323.
- PUSVETMA. 2013. Petunjuk Kerja Kit ELISA Rabies Pusat Veteriner Farma. Surabaya.
- Susetya H, Sugiyama M, Inagaki A, Ito N, Mudiarto, Minamoto N. 2008. Molecular epidemiology of rabies in Indonesia. *Virus Research* 135. 144-149.

- Simani S., A.Amirkhani, F.Farahtaj, B.Hooshmand, A.Nadim, J.Sharifion, N.Howaizi, N.Eslami, A.Gholami, A.Janami, and A.Fayas.2004. Evaluation of The Effectiveness of Pre Exposure Rabies Vaccination in Iran. Arch Med.7(4) : 251-255.
- Tepsumethanon V, Lumlertdacha B, Mitmoonpitak C, Sitprija V, Meslin FX, Wilde H. 2004. Survival of naturally infected rabid dogs and cats. Clin Infect Dis 39. 278–80.
- World Health Organization (WHO), 2004. *Expert Consultation on Rabies*. 1. Report. Geneva: WHO Tech. Rep. Series, 931. 121p.