PUSAT VETERINER FARMA
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
KEMENTERIAN PERTANIAN

Buletin VETERINER FARMA

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

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

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

UJI STABILITAS VAKSIN SEPTIVET
Yanita Anjar P, Murtining Dyah K

ISSN I 1410-6280
VOLUME : XVI NOMOR 1
2020

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

Sekretariat

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

Diterbitkan oleh

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

PENGARUH WAKTU INKUBASI DALAM OPTIMASI ANTIGEN ANTHRAX PUSVETMA

Petri Nandatina Saputri[1] , Febri Hartanti[1], Wiwin Sri Utami[1]

[1]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

I.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_2 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_2 memproduksi koloni yang halus dengan bentuk yang terdefinisi. Koloni ini kemudian dipasasekan 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 di ukur melalui teter antibody yang di hasilkan. 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, $NaHCO_3$, NaCl, KCl, KH_2HPO_4, Ammonium Sulfat, Na_2HPO_4, Serum Positif, *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7.4, Serum negatif, Carbonat buffer pH 9,6, dialysis tube, Skim milk, TMB, NaCl, H_2SO_4, 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 um, 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 µm 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 µl 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 µl setiap sumuran, inkubasi 1 jam pada suhu ruang dan dihomogenisasi. Setelah Inkubasi dapat di lakukan pencucian dengan PBST volume 200 µl 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 µl (duplo) dan di inkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Setelah inkubasi di lakukan pencucian dengan PBST volume 200 µl setiap sumuran 4-5 kali dan *tapping*. Konjugat Protein G Thermo scientific-Invitrogen ditambahkan dengan pengenceran 1 : 8000 pelarut PBST skim 1% sebanyak 50 µl setiap sumuran, inkubasi pada suhu ruang selama 60 menit dan dihomogenisasi, setelah itu dilakukan pencucian menggunakan PBST volume 200 µl setiap sumuran 4-5 kali dan *tapping*. Proses selanjutnya, penambahan larutan substrat (TMB) 50 µl 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 spektofotometri 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

PERLAKUAN		OD		RERATA
	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 x 10^{15} Mda. Kandungan protein tertinggi baik bila digunakan sebagai bahan antigen, dalam penggunaanya 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 pXO1 adalah 110 Mda dan pXO2 60 Mda. pXO1 terdiri dari 3 toksin anthrax yaitu, Proktektif antigen (83 kDa), faktor edema (89 Kda) dan Faktor lethal (90,2 Kda). PXO2 merupakan plasmid yang mengkode kapsul sehingga antigen anthrax PUSVETMA tidak memilikinya. Ukuran plasmid pXO1 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_2.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1. Kesimpulan :

Dari hasil penelitian kandungan protein tertinggi antigen anthraxs 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_2
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

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

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