



BULETIN VETERINER FARMA

MEDIA INFORMASI KEGIATAN
BALAI BESAR VETERINER FARMA PUSVETMA

Pembuatan Antigen Rabies untuk Kit ELISA Rabies Tahun 2020 - 2022

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

Pengembangan Produksi Vaksin Avian Influenza Bivalen
HPAI H5N1 dan LPAI H9N2

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

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



Suscribe Now!

pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id

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

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

¹Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

ABSTRAK

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

Kata Kunci: *ELISA, Inaktivasi, Pemanasan*

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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

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

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

1.2 Tujuan

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

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

1.3 Tinjauan Pustaka

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

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

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

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

II. MATERI DAN METODE

II.1 Materi

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

II.2 Metode

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

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

Pengujian ELISA

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

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

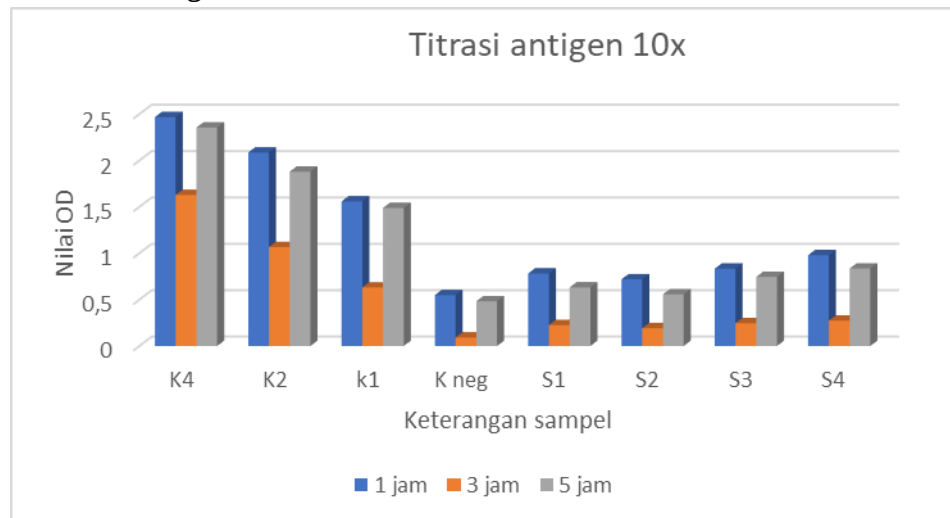
Metode inaktivasi virus rabies Pasteur pada penelitian ini adalah dengan pemanasan menggunakan indikator waktu yaitu 1 jam , 3 jam, 5 jam suhu 56°C. Konjugat Horseradish Peroxidase (HRP) Protein A dipergunakan pada penelitian sebagai label dalam enzim immunoassays, karena mengkatalisis oksidasi indikator redoks oleh H₂O₂. Indikator redoks yang umum dipergunakan adalah 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB), chromogen yang mudah diidentifikasi dengan spektrofotometri. Sebelum dibaca pada fotometri, reaksi TMB-HRP/H₂O₂ diakhiri dengan menurunkan pH campuran dengan asam kuat seperti H₂SO₄ untuk meningkatkan absorbansi dan dibaca pada Panjang gelombang 450 nm (Bally, 1989).

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

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

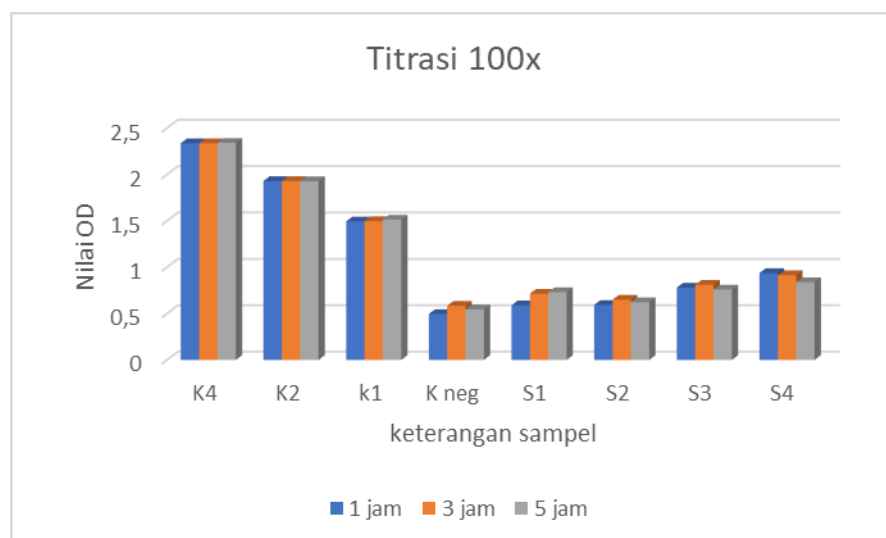
pemanasan 56°C dengan beberapa perlakuan waktu yaitu, 1 jam, 3 jam dan 5 jam. Hasil penelitian tertera pada tabel grafik berikut

Grafik 1. Titrasi antigen rabies 10x



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

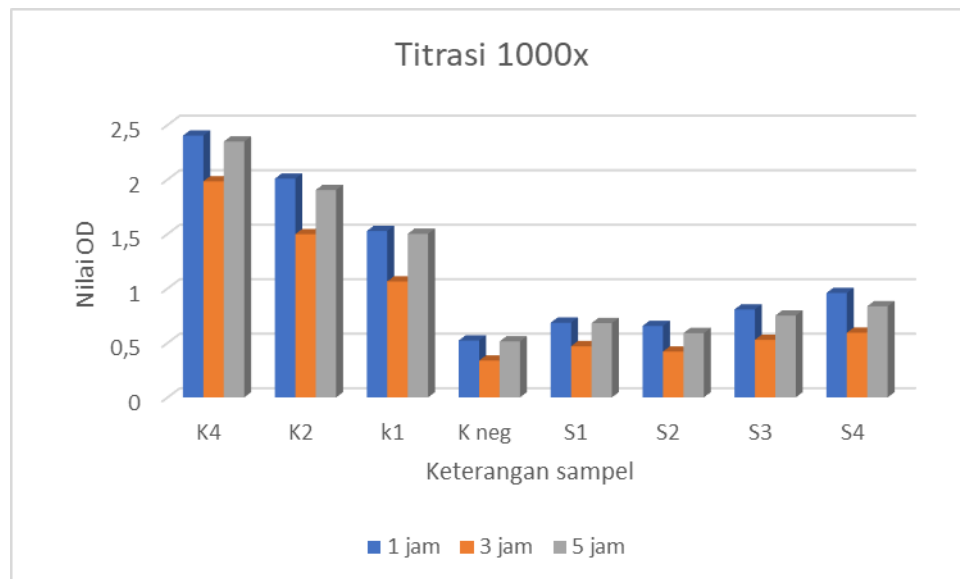
Grafik 2. Titrasi Antigen Rabies 100x



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

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

Grafik 3. Titrasi Antigen Rabies 1000x



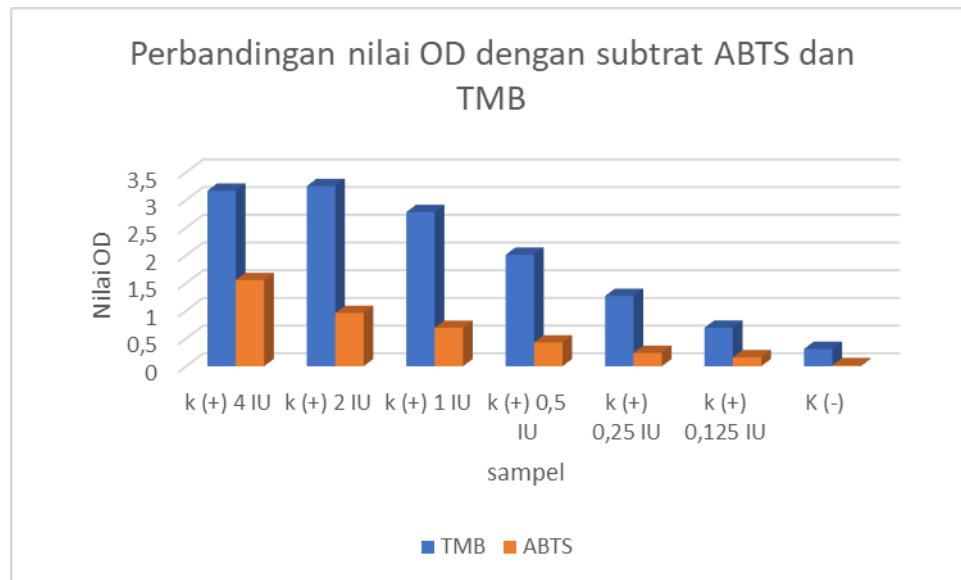
Grafik 3 menggambarkan hasil hasil titrasi antigen dalam larutan Carbonat Buffer pH 9,6 dengan pengenceran 1000x antara perlakuan waktu 1 jam menunjukkan variasi nilai OD yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan waktu 3 jam dan 5 jam, pada kontrol positif 4, kontrol positif 2, kontrol positif 1, kontrol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

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

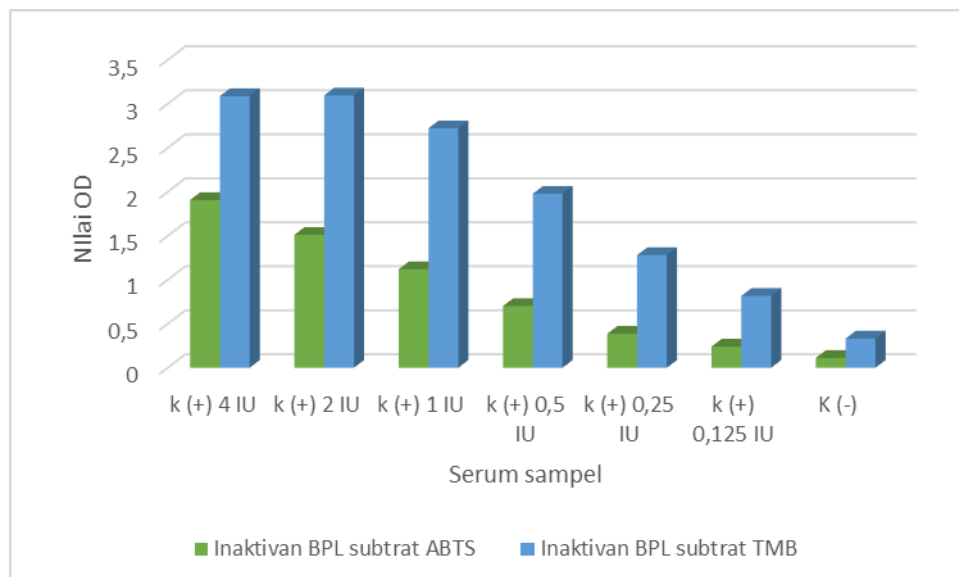
TMB merupakan chromogen untuk horseradish peroxidase menghasilkan produk reaksi dengan koefisien penyerapan tinggi dan tidak memiliki karsinogenisitas ([A Frey](#), 2000) sehingga dapat dipergunakan untuk menggantikan komponen karsinogenik seperti benzidine and o-phenylenediamine.([J Ashby](#),1982).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

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

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



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



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

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

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

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

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

V. DAFTAR PUSTAKA

- [A Frey](#), [B Meckelein](#), [D Externest](#), [M A Schmidt](#), 2000, A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays, J. Immunol Methods 2000 Jan 13;233(1-2):47-56. DOI (diakses di <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii> 15 September 2022)
- Anonim, 2022, Comparison of ABTS, TMB, and OPD Peroxidase Substrate Systems, (diakses di: <https://www.seracare.com/globalassets/seracare-resources/tg-comparison-of-abts-tmb-and-opd-peroxidase-substrate-systems.pdf> pada tanggal 15 September 2022)
- Bally R.W, 1989, 'Some Aspects of the Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as Hydrogen Donor in a Horseradish Peroxidase Assay' By R. W. Bally and T. C. J. Gribnau Scientific Development Group Organon Int. U.V. Oss, The Netherlands (Received October 28, 1988/June 21, 1989)
- D. Catty, 1989, A Practical Approach, Vol II
- Dorin H, Evgeni E, Timothy S. E., Robert S.M and Alfred I.Y, 2020, Enhanced Colorimetric Signal for Accurate Signal Detection in Paper-Based Biosensors, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167932/pdf/diagnostic-s-10-00028.pdf>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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