



# 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](http://pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id)

## PEMBUATAN ANTIGEN RABIES UNTUK KIT ELISA RABIES TAHUN 2020 - 2022

Kiki Dwi Restika<sup>1</sup>, Evy Indah Setyorinie<sup>1</sup>, Ismail Budi Wahyuri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

### ABSTRAK

Tingkat antibodi rabies paska vaksinasi dapat diukur dengan menggunakan kit elisa rabies. Mikroplat kit elisa rabies telah *dicoated* dengan antigen rabies yang sesuai, oleh karena itu antigen rabies merupakan bahan utama pembuatan kit elisa rabies. Pada tulisan ini diuraikan cara pembuatan antigen rabies yang akan dicoatingkan pada kit elisa rabies. Seed virus rabies strain pasteur diinokulasi pada kultur sel BHK-21 konfluen dengan dosis inokulasi 3 ml per botol roux menggunakan perhitungan *multiple of infection* (moi) 0.5. Sel diinkubasi pada suhu 35 °C selama 60 menit kemudian ditambahkan 100 ml media pertumbuhan virus dan diinkubasi kembali pada suhu 35 °C selama 96 jam. Suspensi virus diinaktivasi dengan betapropiolakton 10% kemudian diuji inaktivasi dan titrasi virus menggunakan mencit. Suspensi virus 200 ml dikoleksi. Hasil uji inaktivasi didapatkan inaktif dan hasil titrasi didapatkan titer  $10^{7.0}$  -  $10^{7.9}$ LD<sub>50</sub>/ml. Virus dimurnikan dengan filtrasi. Virus rabies inaktif dapat dicoatingkan pada mikroplate sebagai antigen rabies.

Kata kunci: rabies, kit elisa rabies, antigen rabies

## PENDAHULUAN

Virus rabies berasal dari genus *Lyssavirus* dan keluarga *Rhabdoviridae* (Wunnera, 2020). Rabies adalah penyakit neurologis akut fatal yang menyerang manusia dan mamalia yang ditularkan melalui air liur hewan pembawa rabies lewat gigitan atau cakaran. Penyakit ini berjalan di sepanjang neuron dari tempat infeksi ke sistem syaraf pusat dimana pada replikasi virus menyebabkan gejala klinis dan penyebaran sistemik. Kejadian pada manusia 99% disebabkan oleh anjing dan penyakit ini menyebabkan kematian pada 59.000 orang setiap tahun. Metode yang efektif untuk mengurangi kejadian rabies adalah dengan vaksinasi. (Brunker, 2018).

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) telah menetapkan target untuk eliminasi rabies dengan program *Global Framework for the Elimination of Human-Mediated Dog Rabies 2030*. Seiring dengan hal tersebut Indonesia juga mencanangkan program pembebasan Rabies secara bertahap melalui implementasi Prestasi Indonesia 2030 atau Pembebasan Rabies Bertahap Seluruh Indonesia 2030". Strategi utama pengendalian dan pemberantasan rabies adalah dengan cara vaksinasi dimana Kementerian Pertanian telah menyiapkan lebih dari 1 juta dosis vaksin dengan pembiayaan lebih dari 32,74 Milyar rupiah untuk membantu pemerintah daerah dalam penyediaan dan operasional kegiatan vaksinasi (Ditjen PKH, 2021).

Strategi pembebasan melalui program vaksinasi diperlukan monitoring antibodi rabies dengan mengukur tingkat antibodi yang dihasilkan untuk mengetahui keefektifan vaksin. *Enzym Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dapat digunakan sebagai uji untuk mendeteksi titer antibodi spesifik rabies setelah vaksinasi massal pada anjing (OIE, 2018). Prinsip dasar reaksi Elisa adalah mereaksikan antigen dengan antibodi yang berlabel enzim yang kemudian ditambah dengan substrat sehingga akan dihidrolisis menjadi presipitat warna yang dapat dideteksi menggunakan *Elisa reader* (Santosa, 2020). Uji Elisa memiliki beberapa kelebihan yaitu, uji dapat dilakukan secara cepat dalam 4 jam, tidak menggunakan virus hidup, dan tidak memerlukan laboratorium dengan fasilitas biosekuriti tinggi (Bili, 2014).

Tingkat antibodi rabies dalam serum darah anjing paska vaksinasi bisa diukur dengan menggunakan Kit Elisa rabies. Kit Elisa rabies adalah seperangkat alat uji elisa yang terdiri dari beberapa komponen seperti mikroplat, pengencer sampel, kontrol, standard atau kalibrator, konjugat, substrat, stop solution, dan wash buffer. Mikroplat kit elisa rabies telah *dicoated* dengan antigen rabies yang sesuai, oleh karena itu antigen rabies merupakan salah satu bahan utama pembuatan Kit Elisa Rabies. Pada penelitian ini akan diuraikan cara pembuatan antigen Rabies yang akan dicoatingkan pada Kit Elisa Rabies.

## MATERI DAN METODE

### Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan antara lain clean room, inkubator 37 °C dan 35 °C, botol roux 225 cm<sup>2</sup>, botol laboratorium, botol sampel, pipet, bulb, spuit, alat filtrasi, alat pelindung diri, spidol, karet, peralatan kandang, dan kain kassa.

Bahan yang digunakan terdiri dari eagle media, versen trypsin, phosphate buffer saline, bovine serum, betapropiolactone, thimerosale, alkohol 70%, hewan coba mencit, dan pakan mencit.

### Kultur Sel BHK-21

Sel BHK-21 ditumbuhkan pada botol roux kaca dengan Eagle Media mengandung 10% bovine serum dan 1% antibiotik penstrep. Botol roux kemudian diinkubasi dalam suhu 37 °C selama 48 jam sampai konfluent, untuk kemudian diinokulasi virus rabies.

### Inokulasi Virus

Sel BHK-21 yang telah konfluen diinokulasi seed virus rabies strain Pasteur dengan dosis inokulasi 3 ml per botol roux menggunakan perhitungan *multiple of infection* (moi) 0.5. Sel diinkubasi pada suhu 35 °C selama 60 menit kemudian ditambahkan media pertumbuhan virus dan diinkubasi kembali pada suhu 35 °C selama 96 jam. Pengamatan sel secara mikroskopis dilakukan setiap hari.

### Koleksi dan Inaktivasi Virus

Suspensi virus dikoleksi dari setiap kultur botol roux, dilakukan pengambilan sampel aktif, kemudian suspensi diinaktivasi menggunakan betapropiolactone (BPL) dengan konsentrasi 10%. Suspensi virus diputar pada suhu 3-5 °C selama 48 jam. Setelah suspensi virus inaktiv, ditambahkan bahan pengawet thimerosal 10% dan diputar kembali pada suhu 3-5 °C selama 24 jam.

### Uji Inaktivasi Virus

Hewan coba anak mencit sehat umur 1-3 hari diinjeksi 0.03 ml secara intracerebral (IC) dengan sampel suspensi virus yang telah diinaktivasi. Pengamatan dilakukan selama 14

hari. Suspensi dinyatakan inaktif apabila semua hewan coba tidak menunjukkan adanya gejala klinis terhadap penyakit rabies.

### **Penghitungan Titer Virus**

Sampel virus aktif dititrasi dengan pengenceran bertingkat dari tingkat pengenceran  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-6}$ . Setiap pengenceran diinjeksikan pada 10 ekor mencit remaja umur 2-3 minggu dengan berat badan 18-20 gram, dosis injeksi 0.03 ml/ekor secara intracerebral (IC). Pengamatan dilakukan selama 14 hari, seluruh kondisi mencit dicatat dari kondisi normal hingga yang menunjukkan gejala klinis rabies yaitu bulu berdiri, inkoordinasi, paralisa, dan kematian.

Penghitungan titer virus *lethal dose 50* ( $LD_{50}$ ) dilakukan dengan menghitung jumlah hewan positif menggunakan tabel metode Spearman Karber dengan tahapan sebagai berikut: 1) menentukan pengenceran terendah virus dimana semua hewan positif (contoh  $10^{-3}$  yaitu  $\log_{10} 10^{-3} = 3$ ); 2) menentukan jumlah total hewan positif pada seluruh pengenceran; 3) baca pada tabel untuk faktor pengenceran yang sesuai; 4) Nilai dari tahap 1 dan 3 dijumlahkan. Jumlah ini mewakili  $\log_{10}$  dari  $LD_{50}$ .

### **Purifikasi Virus**

Suspensi virus yang telah inaktiv dimurnikan dengan filtrasi menggunakan membran  $0.2 \mu\text{m}$  untuk menghilangkan sel-sel debris.

## **HASIL**

Suspensi virus rabies yang dihasilkan adalah 200 cc. Suspensi virus ini kemudian diinaktivasi menggunakan BPL 10%. Hasil uji inaktivasi menunjukkan bahwa semua hewan uji hidup tanpa menunjukkan gejala rabies, yang berarti virus telah inaktif dan dapat digunakan sebagai antigen.

Tabel 1 Suspensi virus rabies

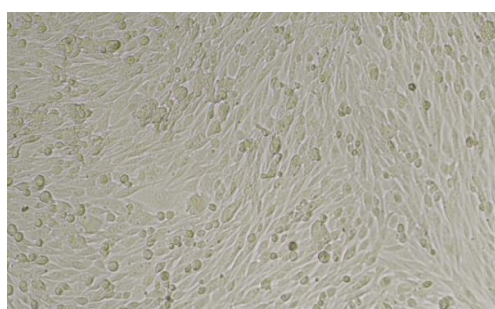
Tahun	Kode Antigen	Volume (ml)	Status Inaktivasi
2020	E 203.2603.05	200	Inaktif
	F 205.7145.06	200	Inaktif
2021-2022	F 213.1703.07	200	Inaktif

Penghitungan titer virus Rabies diperoleh hasil antara  $10^{7.0} - 10^{7.9}$  LD<sub>50</sub>/ml. Hasil pengamatan titer virus pada hewan coba adalah sebagai berikut:

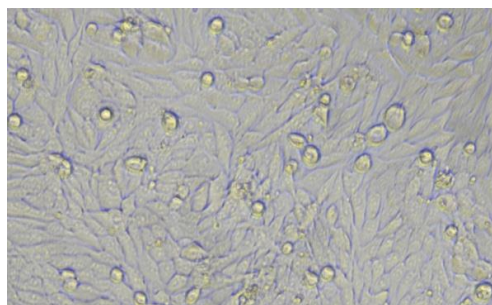
Tabel 2 Penghitungan titer virus rabies

Pengenceran virus (faktor pengenceran 10)	E 2003.2603.05		F 2005.7145.06		F 2103.1703.07	
	Hewan coba positif	Hewan coba negatif	Hewan coba positif	Hewan coba negatif	Hewan coba positif	Hewan coba negatif
10 <sup>-3</sup>	10	0	10	0	10	0
10 <sup>-4</sup>	9	1	9	1	10	0
10 <sup>-5</sup>	10	0	10	0	6	4
10 <sup>-6</sup>	10	0	7	3	4	6
Penghitungan						
Tahap:						
1.	1. 3		1. 3		1. 4	
	2. 39		2. 36		2. 20	
2.	3. 3.4		3. 3.1		3. 1.5	
	4. 6.4		4. 6.1		4. 5.5	
3.	10 <sup>-6.4</sup>		10 <sup>-6.1</sup>		10 <sup>-5.5</sup>	
4.	10 <sup>6.4</sup> LD <sub>50</sub>		10 <sup>6.1</sup> LD <sub>50</sub>		10 <sup>5.5</sup> LD <sub>50</sub>	
<i>End-point dilution</i>	10 <sup>7.9</sup> LD <sub>50</sub> /ml		10 <sup>7.6</sup> LD <sub>50</sub> /ml		10 <sup>7.0</sup> LD <sub>50</sub> /ml	
Titer virus						
Titer virus (LD <sub>50</sub> /ml)						

1. Pengenceran terendah seluruh hewan positif
2. Jumlah total hewan positif pada seluruh pengenceran
3. Nilai merujuk pada tabel metode Spearman Karber
4. Nilai dari tahap 1 dan 3 dijumlahkan

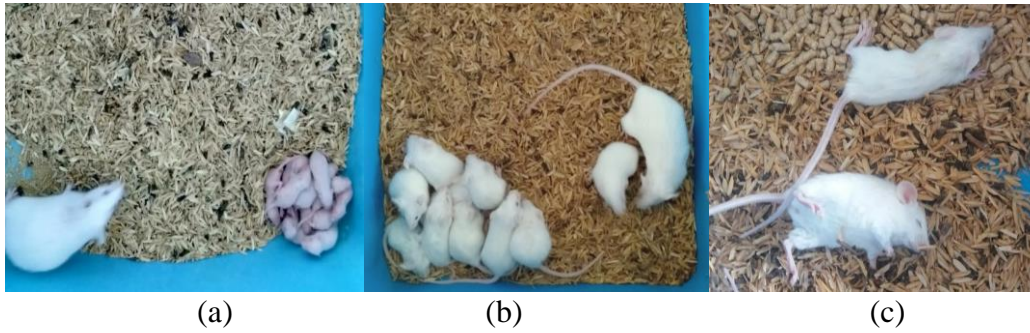


(a)



(b)

Gambar 1 Sel BHK-21 konfluen sebelum diinokulasi virus rabies dengan perbesaran 100x (a); Sel BHK-21 96 jam post inokulasi virus rabies dengan perbesaran 100x, tidak ada efek sitopatik (b)



Gambar 2 Uji inaktivasi virus rabies pada hewan coba anak mencit umur 3 hari (a) dan setelah 14 hari pengamatan anak mencit tetap hidup (b); titrasi virus rabies pada hewan coba mencit menunjukkan gejala positif rabies inkoordinasi, paralisa, kematian (c)

## PEMBAHASAN

Tehnik kultur jaringan pada penelitian tentang Rabies dikenalkan mulai tahun 1913 oleh Noguchi dan Levaditi. Propagasi pertama virus rabies berhasil dilakukan pada ganglia tulang belakang yang dipertahankan dalam media yang mengandung plasma monyet yang terkoagulasi. Sistem kultur jaringan yang bisa digunakan untuk virus rabies meliputi *Primary Culture*, *Diploid Cell Lines*, *Heteroploid Cell Lines* dan *Lymphocyt*. Penggunaan kultur sel untuk isolasi ataupun pertumbuhan berbagai macam strain virus Rabies dilakukan oleh Crick dan King dengan mengisolasi virus Rabies pada sel *baby Hamster Kidney* (BHK-21). Penelitian tentang isolasi virus Rabies lapangan yang dilakukan pada sel BHK-21 dan *Chick Embryo-Relates* (CER) dan sel neuroblastoma dengan immunofluoresen menunjukkan bahwa infeksi rabies pada sel terlihat mulai 4-5 jam sampai 5 hari sesudah infeksi. Sel BHK mempunyai kepekaan terhadap infeksi rabies lebih tinggi jika dibandingkan dengan mencit. Kepekaan infeksi pada sel tergantung pada asal sel syaraf yang digunakan serta strain virus infeksi (Meslin, 1996).

Metode paling umum yang digunakan untuk perbanyak virus Rabies adalah menggunakan kultur jaringan, baik itu menggunakan sel monolayer dalam flask yang *stationary* ataupun menggunakan botol roller yang bergerak atau dengan sel suspensi. Media yang digunakan adalah Eagle Media, sedangkan penambahan serum lebih berfungsi untuk melindungi virus dari inaktivasi akibat suhu daripada untuk replikasi virus (Meslin, 1996). Pertumbuhan optimal pada suhu inkubasi 32°C dan media dipertahankan pada pH 7.4 – 7.6 dengan penambahan sodium bikarbonas. Sel diinokulasi virus ketika sudah konfluent untuk mendapatkan hasil yang maksimal.

Efek sitopathologik infeksi virus Rabies pada sel BHK-21 monolayer tidak terlihat. Pada sel BHK-21 terinfeksi virus rabies yang terlihat adalah sel tampak tua dan mudah lepas dari permukaan flask dibandingkan dengan sel yang tidak terinfeksi. Efek sitopathologik terlihat pada sel neuroblastoma membentuk formasi sinsithia (Meslin, 1996).

Virus rabies harus diinaktivasi sebelum digunakan untuk antigen Kit Elisa Rabies. Inaktivan yang bisa digunakan untuk inaktivasi adalah betapropiolakton (BPL), acetyleneimine atau radiasi ultraviolet. Penyiapan antigen Rabies pada pembuatan antigen ini menggunakan inaktivan BPL dikarenakan BPL mempunyai sifat bisa membunuh bakteri dan virus tanpa berakibat pada antigenitas virus Rabies (Meslin, 1996).

Tingkat penyiapan antigen yang diperlukan untuk ELISA ditentukan oleh asal antigen, spesifisitas reagen dan tujuan dirancangnya ELISA, apakah untuk mengukur jumlah antigen spesifik atau sebagai kualitatif berspektrum lebar. Penyiapan antigen virus cukup digunakan cairan biakan sel terinfeksi kasar atau sel terinfeksi dirusak dengan deterjen atau bahan kimia lain kemudian diikuti sentrifugasi untuk menghilangkan serpihan sel (Burgess, 1995) atau di filter melewati membran filter 8  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , dan 1.2  $\mu\text{m}$  (Meslin, 1996). Preparat antigen kasar dalam elisa bermanfaat serodiagnosis pada sampel yang hanya sedikit diketahui mengenai sifat dan jumlah antigennya. Pemurnian antigen lebih lanjut diperlukan untuk menghindari reaksi silang dengan antigen lain yang mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat.

Penghitungan titer virus metode Spearman-Karber merupakan salah satu metode sederhana yang paling dikenal. Metode ini menggunakan faktor pengencer yang konstan dan kisaran pengenceran cukup lebar yang dapat mencakup pengenceran di bawah dan di atas 100% hewan biasanya akan positif dan pengenceran di bawah dan di atas 100% hewan biasanya negatif. Hewan positif dapat berupa hewan yang mati atau yang bertahan hidup tergantung pada jenis tes (Meslin, 1996). Pada pembuatan antigen rabies, dilakukan titrasi virus hidup sehingga hewan yang mati dihitung positif.

## **SIMPULAN DAN SARAN**

Antigen yang didapatkan dalam penelitian ini dapat digunakan sebagai coating antigen untuk kit elisa rabies. Antigen tersebut diperoleh melalui suspensi kultur virus rabies yang diinokulasikan pada sel BHK-21, telah diinaktivasi, dan dimurnikan dengan filtrasi. Penelitian lebih lanjut terkait proses pemurnian antigen Rabies, perlu dilakukan untuk meningkatkan spesifisitas kit yang dihasilkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bili, F.A.L. 2014. Serosurveilens pascavaksinasi rabies tahun 2014 di wilayah kerja upt veteriner Nusa Tenggara Timur. *Jurnal Kajian Veteriner*. Vol. 2 No. 2 : 119-126.
- Brunker, K., Mollentze, N., Rabies Virus. *Trends in Microbiology*. 2018. Month Year, Vol. xx, No. Yy. Elsevier Ltd.
- Ditjen PKH. 2021. <https://ditjenpkh.pertanian.go.id/berita/885-melalui-prestasi-indonesia-2030-kementan-dorong-target-bebas-rabies-indonesia-2030>
- Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H., *et al.* (1996). *Laboratory techniques in rabies* 4<sup>th</sup>ed. WHO.
- OIE terrestrial manual. Ch 3.1.1.8. Rabies (infection with rabies virus And other lyssaviruses). 2018.
- Santosa B. 2020. Teknik Elisa Metode Elisa untuk Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit. Semarang: Unimuss Press.
- Wunnera, W.H., Conzelmann, K., Rabies virus. 2020. 4th ed. *Scientific Basis of the Disease and its Management*. Pages 43-81. Elsevier.