

**PENGEMBANGAN METODE *INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST*  
(INDIRECT FAT) RABIES DENGAN MENGGUNAKAN  
ANTIBODI MONOKLONAL ISOLAT LAPANGAN BALI (1266)  
DI BALAI BESAR VETERINER DENPASAR**

***(Method Development of Indirect Fluorescent Antibody Test of  
Rabies Using Monoclonal Antibody from Field Isolate of Bali (1266)  
at Veterinary Center of Denpasar)***

Wirata. I. K., Masa Tenaya I. W., Dinar H. W. H.

Balai Besar Veteriner Denpasar

**ABSTRAK**

Balai Besar Veteriner Denpasar (BBV Denpasar) telah melakukan pengembangan metoda *indirect FAT* Rabies dengan menggunakan antibodi monoklonal yang berasal dari isolat lapangan (1266) Bali. Antibodi monoklonal (AbMo) Rabies dibuat berdasarkan kerjasama (MoU) antara BBV Denpasar dengan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana (FKH UNUD).

Pengujian dilakukan dengan mempergunakan sampel otak anjing yang diuji dengan teknik *direct FAT* dan *indirect FAT*. Teknik *direct FAT* mempergunakan AbMo Rabies komersial yang sudah dilabel FITC (*conjugate*) yang merupakan salah satu *conjugate* yang direkomendasikan oleh OIE. Sedangkan teknik *indirect FAT* mempergunakan AbMo dari isolat lapangan Bali (1266) sebagai antibodi primer dan FITC *conjugated - Goat Anti Mouse* komersial sebagai antibodi sekunder.

Analisa terhadap hasil pengujian dengan menggunakan tabel *2x2 contingency* menunjukkan bahwa hasil yang diperoleh dari pengujian *indirect FAT* tidak berbeda signifikan dengan hasil *direct FAT* yang selama ini digunakan di laboratorium BBVet Denpasar. Tingkat sensitifitas dan spesifisitas uji *indirect FAT* Rabies dengan menggunakan isolat lapangan Bali (1266) sebesar 100 % dibandingkan dengan uji referens OIE atau *Golden Test* pengujian Rabies *direct FAT* yang menggunakan isolat *Pasteur*.

Walaupun menunjukkan hasil kesesuaian yang tinggi dengan tingkat sensitifitas dan sensitifitas mencapai 100 %, namun tingkat kepercayaan atau *power Confidency* relatif rendah, mengingat jumlah sampel yang dipergunakan dan pengulangan pengujian masih relative kecil, sehingga diperlukan optimasi pengulangan pengujian dengan jumlah sampel yang lebih banyak untuk meningkatkan level *Power of Confidency* tersebut.

***Kata Kunci:*** Rabies, Antibodi Monoklonal, isolat lapangan, *indirect FAT*

**ABSTRACT**

Center for Veterinary Denpasar (BBV Denpasar) has made the development of Rabies indirect FAT method using monoclonal antibodies derived from field isolates of Bali (1266). Monoclonal antibodies (AbMo Rabies) made under of Memmorandum of Understanding (MoU) between BBV Denpasar and Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University (FKH UNUD).

Tests were performed by using the dog brain samples which were tested with the technique of direct and indirect FAT. The direct FAT technique using FITC labeled Rabies MoAb (conjugate) which is one of commercial conjugated recommended by OIE. While the indirect FAT technique using field isolates of Bali (1266) Rabies MoAb as the primary antibody and a commercial FITC-conjugated Goat Anti-Mouse as secondary antibody.

The test results analyzed using 2x2 contingency table shows that the results obtained from the testing of indirect FAT does not significantly different from the results of the direct FAT which has been used in laboratory of BBV Denpasar. The sensitivity and specificity of the indirect FAT using field isolates of Bali (1266) MoAb Rabies by 100% compared to direct FAT as the OIE reference test or *Golden Test* for Rabies which was using Pasteur isolates.

Although the results show a high conformity with the 100% sensitivities and specificities, but the Power of Confidency considering the number of samples used and repeatability testing is still relatively low, so that the optimization of the samples number and the repetitions of testing are needed to increase the Power of Confidencies.

**Keywords:** Rabies, Monoclonal Antibodies, field isolates, indirect FAT

## PENDAHULUAN

### Latar Belakang

Balai Besar Veteriner Denpasar adalah salah satu Unit Pelaksana Teknis di bawah Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan yang mempunyai tugas dan fungsi penyidikan dan pengujian veteriner, dan melaksanakan pengembangan metoda pengujian.

Dalam hal pengembangan metoda diagnosa penyakit hewan, Balai Besar Veteriner Denpasar fokus pada pengembangan metoda pengujian penyakit Rabies dan Jembrana. Namun demikian Balai Besar Veteriner Denpasar juga akan terus mengupayakan pengembangan metoda untuk uji-uji penyakit lainnya terutama yang terkait dengan penyakit dimana Balai Besar Veteriner Denpasar sebagai Laboratorium rujukan.

Pengembangan Metoda Diagnosa Penyakit Rabies akan

mengembangkan metoda *indirect FAT* dengan menggunakan antibodi monoklonal yang berasal dari isolat lapangan Bali (1266).

Penumbuhan virus Rabies dan pembuatan antibodi monoklonal telah dibuat berdasarkan kerjasama penelitian (MoU) antara BBV Denpasar dengan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Akan tetapi proses pembuatan antibodi monoklonal dijelaskan di bagian Metoda.

### Tujuan

Kegiatan pengembangan metoda ini bertujuan untuk mengaplikasikan hasil produksi antibodi monoklonal Rabies yang dibuat dari virus Rabies isolat lapangan Bali (1266). Pengembangan metoda ini juga sekaligus sebagai uji konfirmasi terhadap hasil produksi tersebut disamping uji-uji lain yang sudah dilakukan terhadap AbMo ini seperti: uji Western Blotting, ELISA dan IHK.

## Manfaat

Hasil produksi antibodi monoklonal (AbMo) Rabies yang dibuat dari virus Rabies isolat lapangan Bali (1266) yang telah terkonfirmasi, tervalidasi dan tersertifikasi, diharapkan mampu untuk mensubstitusi pemakaian bahan-bahan uji komersial untuk pengujian Rabies yang berbasis ikatan antigen-antibodi, sehingga diharapkan akan mengurangi ketergantungan pada bahan-bahan uji komersial (kit) dalam pengujian Rabies.

## MATERI DAN METODE

### MATERI

Materi yang dibutuhkan dalam pengembangan metoda *indirect FAT* dengan menggunakan antibodi monoklonal yang dibuat dari isolat lapangan (1266) Bali adalah sebagai berikut:

1. Antibodi monoklonal Rabies/ MoAb Rabies
2. Virus Rabies isolat 1266
3. Sampel otak anjing positif dan negatif Rabies
4. Konjugat (goat anti mouse FITC)
5. PBS tablet
6. Acetone pro analis
7. Slide glass
8. Cover glass
9. Glycerin
10. Mikroskop Fluorescent



Gambar 1.

Peralatan uji *direct* dan *indirect FAT* Rabies (Mikroskop Fluorescent dan incubator 37°C.)

## METODA

### Pembuatan Monoklonal Antibodi Rabies dengan Isolat Lokal Bali (1266)

Tahapan untuk memperoleh AbMo Rabies isolat lapangan Bali (1266), dilakukan berdasarkan kerja sama antara BBV Denpasar dengan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Adapun tahapan-tahapan tersebut meliputi:

1. Persiapan dan imunisasi mencit
2. Penyiapan sel myeloma
3. Pembuatan sel hybridoma
4. Seleksi hybridoma dengan media HAT
5. Skrining antibodi dengan ELISA
6. Penentuan protein yang bereaksi dengan AbMo
7. Penyimpanan sel hybridoma penghasil AbMo
8. Penentuan isotop

### Indirect Fluorescent Antibodi Test Rabies (Indirect FAT Rabies)

Teknik imunofluorescent (*indirect FAT Rabies*) dilakukan sesuai prosedur dijelaskan oleh OIE dan organisasi Kesehatan Dunia (WHO). Preparat ulas dari bagian hippocampus dibuat diatas slide glas kemudian difiksasi dalam aseton dingin (-20°C) selama 20 menit. Selanjutnya slide preparat dicuci sebanyak tiga kali dengan larutan dapar fosfat saline (PBS, pH 7.2), kemudian pada preparat ulas/ smear diaplikasikan monoklonal antibodi Rabies yang berasal dari isolat lapangan (1266) Bali dan diinkubasi selama

45 menit pada suhu 37°C dengan pemberian kelembaban secukupnya. Pencucian dengan larutan PBS dilakukan sebanyak tiga kali dan kemudian diwarnai dengan *fluorescent isothiocyanate* (FITC) - terkonjugasi goat-anti mouse IgA, IgG dan IgM komersil yang banyak terdapat dipasaran dan diinkubasikan lagi pada selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah dicuci dengan PBS, slide yang dikeringkan dan pemasangan buffered gliserin diaplikasikan. Slide diperiksa di bawah kaca penutup pada perbesaran 400 menggunakan mikroskop fluorescent (Nikon, Jepang). Positif dan negatif kontrol dijalankan bersama-sama dengan sampel uji. Slide menunjukkan fluoresensi spesifik dinyatakan sebagai hasil positif (Dong-Kun Yang *et. Al.* 2011).

### Analisis Hasil

Data hasil yang diperoleh pada penelitian ini selanjutnya akan dianalisis dengan menggunakan Tabel Kontingensi 2 x 2 seperti yang terlihat pada tabel di bawah

Tabel 1.  
Tabel Kontingensi 2 X 2

		DIRECT FAT		
		POS	NEG	TOTAL
INDIRECT FAT	POS	TP	FP	
	NEG	FN	TN	
	TOTAL			

Menurut OIE (2000), Persentase (%) sensitifitas dan spesifisitas dapat diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Sensitifitas} = \frac{\text{T positif}}{\text{T positif} + \text{F negatif}} \times 100\%$$

$$\text{Spesifisitas} = \frac{\text{T negatif}}{\text{T negatif} + \text{F positif}} \times 100\%$$

keterangan:

T positif (True positif) : sampel yang dinyatakan positif rabies dengan *direct FAT*, dan tetap menunjukkan hasil positif rabies dengan *indirect FAT*

F positif (False positif) : sampel yang dinyatakan negatif rabies dengan *direct FAT*, tetapi menunjukkan hasil

positif rabies dengan *indirect FAT*

F negatif (False negatif) : sampel yang dinyatakan positif rabies dengan *direct FAT*, tetapi menunjukkan hasil negatif rabies dengan *indirect FAT*

T negatif (True negatif) : sampel yang dinyatakan negatif rabies dengan *direct FAT*, dan tetap menunjukkan hasil negatif dengan *indirect FAT*

Dengan asumsi bahwa teknik *direct FAT* dengan mempergunakan AbMo komersial (*conjugate*) adalah "golden standard" untuk diagnosa rabies, dan dengan mempergunakan metoda analisa di atas, maka sensitifitas dan spesifisitas *indirect FAT* dengan mempergunakan AbMo Rabies isolat lapangan (1266) dapat ditentukan.

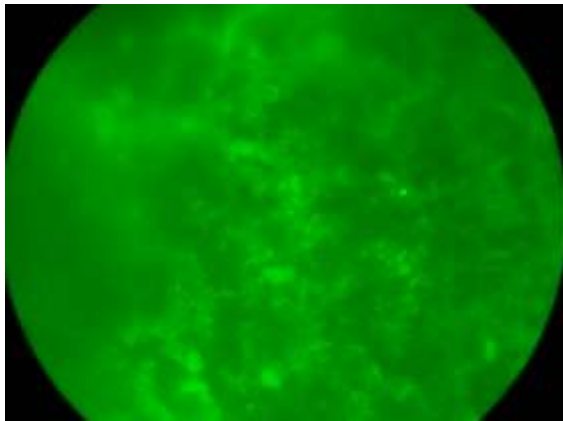
## HASIL

Antibodi monoklonal (AbMo Rabies) yang berasal dari isolat lapang (1266) dibuat berdasarkan kerjasama (MoU) antara BBV Denpasar dengan FKH Universitas Udayana. Sediaan AbMo yang berasal dari isolat lapang (1266) dibuat menjadi sediaan siap pakai dengan rasio 1:10. Pengujian dilakukan dengan 6 sampel otak anjing. Terhadap semua sampel tersebut dilakukan pengujian dengan teknik *direct FAT* dan *indirect FAT*. *Direct FAT* dilakukan dengan mempergunakan dengan monoklonal antibodi Rabies yang dilabel FITC (*conjugate*), pada pengujian ini dipergunakan *anti-rabies nucleocapsid conjugate* komersial produksi Bio-Rad. Untuk *indirect FAT*, pengujian dilakukan dengan mempergunakan monoklonal antibodi Rabies isolat lapang

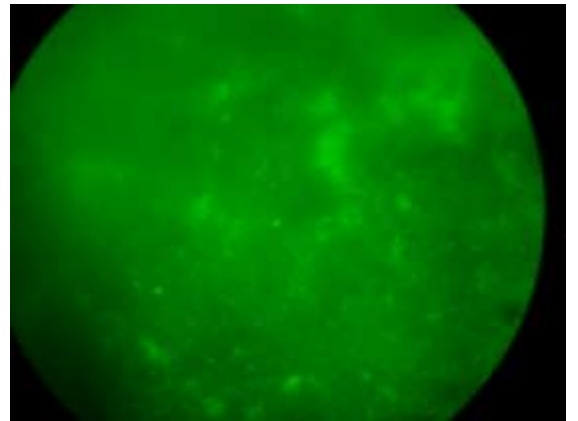
(1266) sebagai antibodi primer, *FITC-goat anti-mouse conjugated* komersial sebagai antibodi sekunder. Pemeriksaan terhadap preparat - preparat tersebut dilakukan dengan mempergunakan mikroskop flourescen.

Pengujian sampel baik dengan teknik *direct* maupun *indirect FAT* menunjukkan hasil yang sama. Sampel yang dinyatakan positif rabies dengan teknik *direct FAT* juga menunjukkan hasil positif dengan teknik *indirect FAT*. Begitu juga sebaliknya untuk sampel yang negative rabies dengan teknik *direct FAT* juga menunjukkan hasil negative dengan teknik *indirect FAT*.

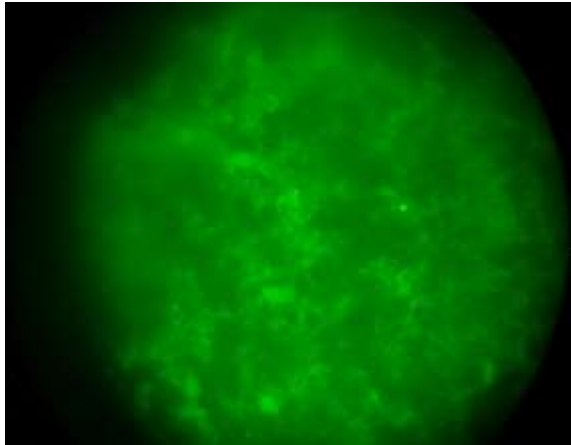
Berikut adalah gambar-gambar hasil pengujian sampel otak anjing yang dilakukan dibawah mikroskop flourescen.



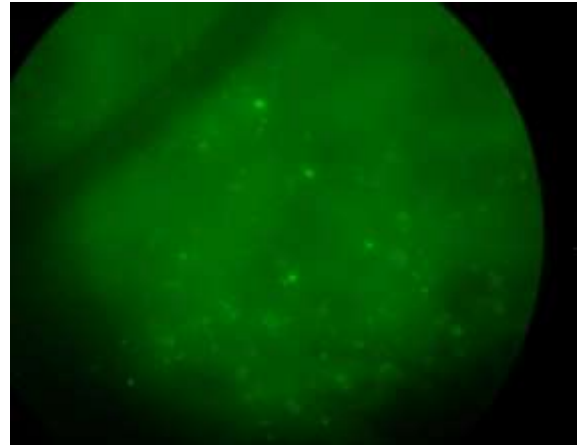
Gambar 1. Positif Rabies dengan *direct FAT*



Gambar 2. Positif Rabies dengan *indirect FAT*



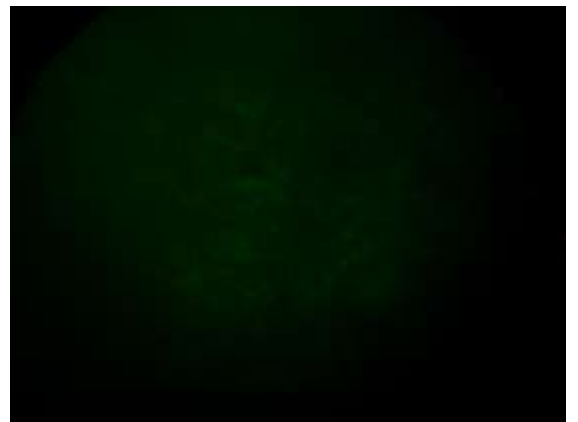
Gambar 3. Positif Rabies dengan *direct FAT*



Gambar 4. Positif Rabies dengan *indirect FAT*



Gambar 5. Negatif Rabies dengan *direct FAT*



Gambar 6. Negatif Rabies dengan *indirect FAT*

## PEMBAHASAN

Pengenceran AbMo isolat lapangan (1266) menjadi 1:10 dilakukan dengan menambahkan PBS tanpa skim milk. Pengenceran 1:10 adalah rasio yang paling optimal dan mampu memberikan hasil yang baik dari titrasi pengenceran. Pengenceran 1:5 memberikan hasil yang sama dengan pengenceran 1:10, pengenceran yang lebih tinggi (diatas 1:10) memberikan gambaran pendaran yang kurang jelas. Optimasi pengenceran monoklonal antibodi dilakukan berdasarkan pengulangan yang

dilakukan di tingkat laboratorium dengan metode *trial and error* sehingga diperoleh hasil konsentrasi yang efektif dan efisien.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari pengujian *indirect FAT*, perbandingan pendaran fluorescen pada slide yang positif tidak berbeda signifikan dengan hasil *direct FAT* yang selama ini digunakan di laboratorium BBVet Denpasar yang juga merupakan metode referens yang telah diakui oleh OIE. Analisa ini dilakukan hanya dengan gambaran satu layang pandang dengan



menggunakan mikroskop Fluorescen (Anonymous 2013).

Secara kualitatif hasil uji slide yang positif Rabies dengan uji *direct* FAT juga terdeteksi positif dengan menggunakan metode uji *indirect* FAT walaupun isolat yang digunakan untuk memproduksi imonoklonal antibodi berbeda. Hal tersebut kemungkinan disebabkan bahwa virus Rabies merupakan virus yang stabil dan tidak cepat bermutasi. Meskipun demikian, penggunaan isolat lokal yakni virus Rabies isolat Bali (1266) hampir dapat dipastikan memiliki

tingkat kesamaan atau homologi lebih tinggi dibandingkan dengan isolat asal Negara lain jika disandingkan secara genotype. Sehingga akurasi dan spesifisitas penggunaan isolat Bali (1266) dapat diasumsikan lebih tinggi untuk mendeteksi kasus Rabies khususnya di wilayah Bali, meskipun perbedaannya tidak terlalu signifikan.

Hasil pengujian sampel otak anjing dengan teknik *direct FAT* dan *indirect FAT* selanjutnya dianalisa dengan mempergunakan tabel *contingency 2x2* seperti berikut.

Tabel 2.

Tabel 2x2 untuk analisa teknik uji *direct FAT* dan *indirect FAT* Rabies

		DIRECT FAT		
		POS	NEG	TOTAL
INDIRECT FAT	POS	4	0	4
	NEG	0	2	2
	TOTAL	4	2	6

Berdasarkan hasil tabulasi diatas, dapat dihitung tingkat sensitifitas dan spesifisitas uji indirect FAT Rabies dengan menggunakan isolat Bali (1266) sebesar 100 % dibandingkan dengan uji referens OIE atau *Golden Test* pengujian Rabies *Direct FAT* menggunakan isolat *Pasteur*.

Sensitifitas uji merupakan kemampuan suatu metode pengujian untuk mendeteksi bahwa sampel yang terdeteksi positif memang benar positif Rabies, sebaliknya spesifisitas uji adalah kemampuan suatu metode uji untuk mendeteksi bahwa hasil uji yang terdeteksi negatif memang benar-benar negatif virus Rabies (OIE, 2000).

Keberhasilan dalam memproduksi monoklonal antibodi Rabies dengan menggunakan isolat lokal ini merupakan tahap awal dari pengembangan metode pengujian selanjutnya. Monoklonal tersebut dapat di isolasi dan dipurifikasi lagi sehingga dapat digunakan untuk optimasi pengujian lainnya seperti uji ELISA, imunohistokimia dan uji serologis lainnya yang berbasis ikatan antara antibodi dengan antigen virus tersebut. Selain itu, monoklonal antibodi isolat Rabies Bali (1266) ini dapat dijadikan langkah awal penggunaan metode uji alternatif sehingga dapat meminimalisir ketergantungan kegiatan pengujian terhadap bahan – bahan (kit) komersial untuk mendeteksi penyakit Rabies khususnya di wilayah kerja Balai Besar Veteriner Denpasar.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengembangan metode pengujian diatas dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Produksi monoklonal Rabies isolat Bali (1266) dapat digunakan sebagai bahan pengujian untuk mendeteksi virus Rabies menggunakan metode uji *Indirect FAT*.
2. Hasil perbandingan uji *Indirect FAT* dengan uji standar *Direct FAT* menunjukkan hasil kesesuaian yang tinggi dengan tingkat sensitifitas dan spesifisitas sebesar 100%.

### SARAN

Dari kesimpulan diatas, dapat direkomendasikan beberapa hal sebagai berikut:

1. Walaupun menunjukkan hasil kesesuaian yang tinggi dengan tingkat sensitifitas dan spesifisitas sebesar 100 %, namun tingkat kepercayaan atau *Power Confidency* dengan pengulangan pengujian sebanyak enam kali masih relatif rendah, sehingga diperlukan optimasi pengulangan pengujian dengan jumlah sampel yang lebih banyak untuk meningkatkan tingkat kepercayaan tersebut.
2. Pengembangan metode pengujian produksi monoklonal Rabies isolat Bali (1266) harus dilanjutkan untuk digunakan sebagai metode uji alternatif seperti uji ELISA, imunohistokimia dan uji serologis lainnya yang berbasis ikatan antara antibodi dengan antigen virus tersebut, sehingga dapat meminimalisir ketergantungan

kegiatan pengujian terhadap bahan – bahan (kit) komersial untuk mendeteksi penyakit Rabies kedepannya.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kepala Balai Besar Veteriner Denpasar atas dukungan moral dan material yang diberikan sehingga kegiatan pengembangan metoda ini dapat terlaksana. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada semua staf medik dan paramedik veteriner Laboratorium Patologi, Virologi dan Epidemiologi yang terlibat dalam pengambilan, penanganan dan pemeriksaan sampel Rabies di Balai Besar Veteriner Denpasar. Dan tidak lupa penulis juga mengucapkan terima kasih kepada pihak Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana yang telah melakukan kerjasama dalam pengembangan metoda ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous (2013). *OIE Terrestrial Manual 2013. Chapter 2.1.13. — Rabies*
- Bowen-Davies, J. and Lowings, P. (2000) Current perspectives on rabies.1. The biology of rabies and rabies-related viruses. In practice, March 2000, 118-124.
- Dong-Kun Yang *et. Al.* (2011). Comparison of four diagnostic methods for detecting rabies viruses circulating in Korea. *J. Vet. Sci.* (2012), 13(1), 43-48
- <http://virology-online.com/>, 2010. Rabies. <http://virology-online.com>, London, UK.
- J. A. Ramos-Vara, (2005). REVIEW ARTICLE. Technical Aspects of Immunohistochemistry. Animal Disease Diagnostic Laboratory and Department of Veterinary Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Purdue University, West Lafayette, IN1
- M. Donal McGavin, James F. Zachary, (2007). Pathologic Basis of Veterinary Disease. MOSBY ELSEVIER, 11830 Westline Industrial Drive, St. Louis, Missouri 63146. pp. 887-890
- Naipospos, T.S., 2010. Vaksin Oral Rabies. Buletin Veterinae, Center for Indonesian Veterinary Analytical Studies, Bogor, Indonesia, p. Opini.
- Niezgoda, M., (2010). Indirect immunofluorescence. CDC IFA Ppt.
- Office International des Epizooties (2000). Manual standards for Dignostic tests and vaccines. Rabies. <http://www.oie.int>.
- Wunner, W.H., (2002). Rabies Virus. In: Jackson, A.C., Wunner, W.H. (Eds.), RABIES. Elsevier Science (USA), London, UK, pp. 23-61