

COMPARISON OF ANTIBODY RESPONSE AND POST-VACCINATION REACTION IN MICE FOLLOWING SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF ASF DNA VACCINE FORMULATED WITH W/O/W AND POLYMER ADJUVANTS**Perbandingan Antibodi dan Reaksi Mencit Terhadap Vaksin DNA ASF Menggunakan Adjuvan W/O/W dan Polimer Pada Pemberian Secara Subkutan****I Gede Pande Krisnha Dharma^{1*}, I Gusti Ngurah Kade Mahardika², I Wayan Suardana³**¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Badung, Bali, 80362, Indonesia;²Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. Raya Sesetan, Gg. Markisa No. 6, Denpasar, Bali, Indonesia;³Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia;*Corresponding author email: gdpande093@student.unud.ac.id

How to cite: Dharma IGPK, Mahardika IGNK, Suardana IW. 2025. Comparison of antibody response and post-vaccination reaction in mice following subcutaneous administration of ASF DNA vaccine formulated with W/O/W and polymer adjuvants. *Bul. Vet. Udayana*. 17(4): 1331-1342. DOI: <https://doi.org/10.24843/bulvet.2025.v17.i04.p20>

Abstract

African Swine Fever (ASF) is a highly contagious hemorrhagic viral disease in pigs, and currently, no effective vaccine is available to prevent it. Among the vaccination strategies currently being explored is the DNA vaccine. This study aims to compare the antibody levels and post-vaccination reactions of the ASF DNA Vaccine containing A224L and A276R genes formulated with two types of adjuvants: W/O/W adjuvant (Montanide ISA 201 VG) and polymer adjuvant (MontanideGel01) in mice. Each mice was vaccinated subcutaneously with 25 µg of plasmid encapsulated with the respective adjuvant. Serum samples were collected at weeks 1, 2, 3, and 4. Antibody levels against A224L and A276R proteins were detected by ELISA test using synthetic peptides as antigens. The optical density (OD) values from the ELISA were statistically analyzed using the Kruskal-Wallis test with the SPSS version 30. Post-vaccination reactions were visually observed and documented through photographs at various stages of development. This study concludes that the formulation of ASF DNA vaccine with W/O/W and polymer adjuvants generates antibody levels that are not significantly different ($p > 0.05$), but the polymer adjuvant exhibited a better safety profile. Additional studies are necessary to explore different W/O/W adjuvant concentrations in order to reduce the risk of local reactions without affecting efficacy.

Keywords: African Swine Fever (ASF), DNA vaccine, adjuvant, antibody, ELISA, post-vaccination reaction.

Abstrak

African Swine Fever (ASF) merupakan penyakit virus hemoragik yang sangat menular pada babi dan hingga kini belum tersedia vaksin yang efektif untuk mencegahnya. Salah satu pendekatan vaksinasi yang dikembangkan adalah vaksin DNA. Penelitian ini bertujuan membandingkan kadar antibodi dan reaksi pasavaksinasi dari vaksin DNA 701 ASF yang mengandung gen A224L dan A276R diformulasikan dengan dua jenis adjuvan, yaitu adjuvan W/O/W (*Montanide ISA 201 VG*) dan adjuvan polimer (*Montanide Gel 01*) pada mencit. Setiap mencit divaksinasi secara subkutan dengan 25 µg plasmid yang dienkapsulasi menggunakan adjuvan tersebut. Serum dikumpulkan pada minggu ke-1, 2, 3, dan 4. Kadar antibodi terhadap protein A224L dan A276R dianalisis menggunakan uji ELISA dengan peptida sintetik sebagai antigen. Nilai *optical density* (OD) ELISA dianalisis secara statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* melalui perangkat lunak SPSS versi 30. Reaksi pascavaksinasi diamati secara visual dan didokumentasikan melalui foto pada berbagai tahap perkembangan reaksi. Penelitian ini menyimpulkan bahwa formulasi vaksin DNA ASF dengan adjuvan W/O/W dan polimer tidak menunjukkan perbedaan kadar antibodi yang signifikan ($p>0,05$), tetapi formulasi dengan adjuvan polimer menunjukkan profil keamanan yang lebih baik. Penelitian lanjutan terhadap variasi konsentrasi adjuvan W/O/W guna menurunkan resiko reaksi lokal tanpa mengurangi efektivitas perlu dilakukan.

Kata kunci: African Swine Fever (ASF), Vaksin DNA, adjuvan, antibodi, ELISA, reaksi pascavaksinasi.

PENDAHULUAN

African swine fever (ASF) atau demam babi afrika merupakan penyakit viral hemoragik yang sangat menular menyerang ternak babi dan babi liar (Malogolovkin *et al.*, 2015). Penyakit ini menyebabkan kerugian ekonomi yang signifikan bagi peternak babi di dunia karena morbiditas dan mortalitasnya yang tinggi. Di Indonesia, penyakit ASF pertama kali dilaporkan pada tahun 2019 di Sumatra Utara yang menyebabkan kematian ribuan babi (Panggabean *et al.*, 2019). Upaya untuk mengembangkan vaksin yang efektif menjadi sangat penting. Vaksin yang telah dikembangkan untuk ASF diantaranya vaksin berbasis virus yang dilemahkan, vaksin berbasis virus yang diinaktifkan, vaksin subunit, dan vaksin DNA (Sendow *et al.*, 2020). Meskipun beberapa vaksin telah dikembangkan, tetapi belum diperoleh vaksin yang efektif dan aman.

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana telah mengembangkan vaksin DNA 701 ASF untuk menangani penyakit ASF sebagai upaya dalam menghadapi tantangan yang ditimbulkan penyakit ini. Bibit plasmid vaksin DNA 701 ASF telah dipatenkan dengan nomor paten IDS000008591. Vaksin tersebut diberikan bersamaan dengan adjuvan polimer. Namun, beberapa saat setelah penyuntikan vaksin, berbagai reaksi syok anafilaksis telah teramati, termasuk gejala gemetar, batuk, dan diare (Prof IGNK Mahardika, Komunikasi Pribadi). Selain itu, hasil pengujian pada mencit percobaan menunjukkan terjadinya nekrosis jaringan pada area penyuntikan vaksin. Penemuan adjuvan yang lebih baik perlu dilakukan. Adjuvan adalah substansi yang ditambahkan ke dalam vaksin untuk meningkatkan respon imun terhadap antigen (Shipingana *et al.*, 2018). Berbagai jenis adjuvan telah dikembangkan, antara lain adjuvan polimer, adjuvan berbasis emulsi seperti W/O (*Water/Oil*), O/W (*Oil/Water*), dan W/O/W (*Water/Oil/Water*), serta adjuvant berbasis aluminium seperti *Aluminium hydroxide*. Salah satu alternatif yang dianggap cocok untuk menggantikan adjuvan polimer dalam pengembangan vaksin DNA ASF Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, adalah adjuvant berbasis W/O/W. Pilihan ini didasarkan pada sifat DNA yang larut dalam air serta kandungan minyak pada adjuvant W/O/W yang memungkinkan pelepasan plasmid vaksin secara bertahap melalui efek depot. Pendekatan ini diperkirakan dapat meningkatkan

efektivitas dan keamanan vaksin DNA.

Penelitian ini akan mengevaluasi efektivitas dan keamanan vaksin DNA 701 ASF menggunakan adjuvan W/O/W dibandingkan dengan adjuvan polimer. Efektivitas vaksin dinilai berdasarkan respon imun mencit pasca-vaksinasi dengan mengukur kadar antibodi dalam serum yang diukur melalui nilai *optical density* (OD) menggunakan teknik *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Selain itu, potensi reaksi lokal di area penyuntikan juga diamati untuk menilai tingkat keamanan vaksin. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan vaksin DNA ASF yang lebih aman dan efektif untuk aplikasi praktis.

METODE PENELITIAN

Kelaikan etik hewan coba

Seluruh prosedur penelitian yang dilakukan pada hewan coba telah melalui persetujuan etik dengan nomor sertifikat: B/7/UN14.2.9/PT.01.04/2023.

Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina berumur empat minggu yang sehat tanpa kelainan anatomi. Sebanyak 15 ekor mencit digunakan dalam penelitian ini yang kemudian dibagi ke dalam tiga kelompok dengan masing-masing terdiri dari lima ekor mencit.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan tiga kelompok perlakuan yakni kelompok mencit (*Mus musculus*) yang menerima vaksin DNA dengan adjuvan W/O/W (Montanide ISA 201 VG), kelompok dengan adjuvan polimer (Montanide Gel 01), dan kelompok kontrol tanpa vaksinasi. Vaksin DNA dengan adjuvan disuntikkan secara subkutan pada mencit perlakuan W/O/W dan polimer. Sampel serum diambil pada hari ke-0, ke-7, ke-14, ke-21, dan ke-28 kemudian diuji menggunakan ELISA. Reaksi pascavaksinasi berupa inflamasi lokal di area penyuntikan vaksin pada mencit diamati untuk mengevaluasi keamanan adjuvant yang digunakan.

Variabel Penelitian

Variable bebas dalam penelitian ini adalah jenis adjuvan yang digunakan pada vaksin DNA ASF, yaitu W/O/W dan polimer. Variabel terikat adalah kadar antibodi yang diukur berdasarkan nilai *optical density* (OD) dan reaksi mencit terhadap vaksin. Adapun variabel kontrol mencakup pemeliharaan mencit, metode pemberian vaksin, dosis vaksin, serta waktu pengambilan serum yang dilakukan secara konsisten.

Prosedur Pengambilan Data

Enkapsulasi Vaksin DNA 701 ASF dengan Adjuvan W/O/W

Formulasi vaksin dilakukan dengan metode homogenisasi menggunakan mesin vortex untuk kedua jenis adjuvan. Proses formulasi vaksin DNA701 ASF dengan adjuvan W/O/W dimulai dengan menyiapkan vaksin DNA 701 ASF sebanyak 1000 μ L (25 μ g plasmid/200 μ L). Kemudian, adjuvan W/O/W *Montanide ISA 201 VG* ditambahkan sebanyak 50 % dari volume vaksin, serta ditambahkan sebanyak 7,5 μ L polisorbitat sebagai emulsifier. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan mesin vortex selama dua jam, lalu dilakukan pemeriksaan dibawah mikroskop untuk memeriksa ukuran partikel emulsi. Campuran vaksin yang telah terenkapsulasi dibagi menjadi lima dosis dengan setiap dosis mengandung 25 μ g plasmid.

Enkapsulasi Vaksin DNA 701 ASF dengan Adjuvan Polimer

Proses enkapsulasi vaksin DNA 701 menggunakan adjuvan polimer dimulai dengan menyiapkan vaksin DNA 701 sebanyak 1000 μL (25 μg plasmid/200 μL). Setelah itu, adjuvan polimer *Seppic Montanide Gel 01* ditambahkan sebanyak 5% dari volume total vaksin. Campuran vaksin ini kemudian di homogenkan menggunakan mesin vortex selama 1 jam untuk memastikan plasmid DNA terenkapsulasi dengan baik dan homogen. Setelah proses enkapsulasi selesai, campuran vaksin yang telah terenkapsulasi dibagi menjadi lima dosis dengan setiap dosis mengandung 25 μg plasmid.

Prosedur Vaksinasi

Vaksin diinjeksikan secara subkutan dengan dosis per ekor 25 μg dalam 0,2 ml. Kelompok pertama menerima vaksin DNA 701 ASF yang diformulasikan dengan adjuvant W/O/W, kelompok kedua menerima vaksin DNA 701 ASF dengan adjuvant polimer, sedangkan kelompok ketiga sebagai kontrol tidak menerima perlakuan vaksinasi.

Pengambilan Sampel Serum

Sampel serum diambil pada waktu yang telah ditentukan untuk mengukur nilai *Optical Density* (OD) sebagai indikator kadar antibodi yang terbentuk pascavaksinasi. Serum diambil pada hari ke-0, ke-14, ke-28, dan ke-42. Sampel darah sebanyak 500 μL diambil dari *vena fascialis* menggunakan jarum 23G dan ditampung dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 ml. Setelah ditampung dalam tabung *microcentrifuge*, sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 7500 rpm selama 5 menit untuk memisahkan serum dari komponen padat darah. Serum yang telah diperoleh kemudian disimpan pada suhu -20 °C hingga siap untuk dianalisis.

Protokol Enzyme-Link Immunosorbent Assay (ELISA)

Sampel serum pada ke-0, ke-7, ke-14, ke-21, dan ke-28 dianalisis menggunakan metode ELISA untuk mengukur nilai OD (*Optical Density*). Tahapan dimulai dengan *coating microplate* menggunakan protein A224L dan A276R kemudian disimpan di dalam lemari es selama 24 jam. Setelah larutan *coating* dibuang, *microplate* dicuci tiga kali dengan PBS Tween. Lalu, setiap lubang *microplate* diisi dengan *blocking buffer*, yaitu larutan susu skim 10% dalam PBS Tween. *Microplate* didiamkan pada suhu kamar selama satu jam agar proses *blocking* sempurna. Setelah itu, larutan *blocking* dibuang dan *microplate* dicuci dengan PBS Tween sebanyak tiga kali. Pada setiap lubang *microplate*, ditambahkan 50 μL PBS Tween. Kemudian, serum ditambahkan sebanyak 1 μL pada setiap lubang sehingga pengenceran menjadi 1:50. *Microplate* diinkubasi pada suhu kamar selama satu jam, lalu dilakukan pencucian kembali. Setelah pencucian, setiap lubang diisi dengan larutan *anti-swine IgG AP (Alkaline Phosphatase)* yang diencerkan 1:1000 dalam PBS Tween. *Microplate* diinkubasi lagi pada suhu kamar selama satu jam, kemudian dicuci tiga kali dengan PBS Tween. Setelah pencucian, tambahkan 50 μL larutan substrat *Sigma Alkaline Phosphatase Yellow* (pNPP) ke setiap lubang. Perubahan warna diamati selama 30 menit. Nilai OD kemudian diukur menggunakan ELISA Reader pada panjang gelombang 405 nm.

Pengamatan Reaksi Pascavaksinasi

Reaksi pascavaksinasi berupa inflamasi lokal di area penyuntikan vaksin pada mencit diamati untuk mengevaluasi keamanan adjuvan yang digunakan. Pengamatan dilakukan secara visual selama empat minggu setelah penyuntikan vaksin dengan dokumentasi foto pada berbagai tahap perkembangan reaksi.

Analisis data

Data *Optical Density* (OD) ELISA dianalisis dengan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk

menentukan ada tidaknya perbedaan signifikan kadar antibodi antar kelompok perlakuan. Namun, jika data tidak terdistribusi normal atau tidak memenuhi asumsi homogenitas varians maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* sebagai alternatif non-parametrik. Jika ditemukan perbedaan signifikan pada uji ANOVA atau *Kruskal-Wallis*, analisis dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD* untuk mengetahui kelompok yang berbeda secara signifikan.

Analisis data reaksi inflamasi lokal pada mencit dilakukan secara deskriptif kualitatif dengan mengkaji dokumentasi foto untuk mengamati perkembangan kondisi area penyuntikan dari waktu ke waktu. Foto-foto yang paling representatif digunakan untuk menggambarkan kondisi mencit. Deskripsi kondisi mencit didasarkan pada dokumentasi visual yang tersedia dengan menyoroti pola perkembangan inflamasi pada masing-masing kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil pengukuran nilai OD pada berbagai waktu pengambilan serum yang berbeda disajikan dalam Tabel 1. Kelompok mencit yang menerima vaksin DNA 701 ASF dengan adjuvan W/O/W menunjukkan peningkatan rata-rata nilai OD yang lebih tinggi dibandingkan kelompok polimer pada setiap minggu pengambilan serum. Kelompok kontrol menunjukkan rata-rata nilai OD yang rendah di seluruh waktu pengukuran. Diagram batang dalam Grafik 1 memberikan ilustrasi yang lebih jelas mengenai perbedaan rata-rata nilai OD pada setiap kelompok.

Uji normalitas data dengan *Kolmogorov-Smirnov* pada Tabel 2 menunjukkan bahwa data nilai OD pada kelompok kontrol, W/O/W, dan polimer tidak terdistribusi secara normal ($p < 0.05$) sehingga pengujian nilai OD dilakukan dengan uji *Kruskal-Wallis*. Hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* yang ditampilkan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nilai OD yang signifikan antar kelompok kontrol, perlakuan W/O/W, dan perlakuan polimer ($p < 0.05$). Selain itu, hasil uji *Kruskal-Wallis* terhadap berbagai waktu pengambilan sampel pada Tabel 3 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara waktu pengambilan sampel terhadap nilai OD ($p > 0.05$).

Hasil analisis *Tukey Honestly Significant Difference* (Tukey HSD) pada Tabel 4 menunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok W/O/W ($p < 0.05$) dan kelompok polimer ($p < 0.05$). Sementara itu, tidak ditemukan perbedaan signifikan antara kelompok W/O/W dan Polimer ($p > 0.05$).

Pengamatan visual terhadap area penyuntikan dilakukan untuk mengevaluasi keamanan masing-masing adjuvant. Gambar 1 menunjukkan reaksi pascavaksinasi pada mencit yang menerima vaksin DNA 701 ASF dengan adjuvan W/O/W. Gambar (A) memperlihatkan mencit dengan rambut yang tampak basah setelah vaksinasi, teramati juga perilaku menggaruk area penyuntikan beberapa menit setelahnya. Gambar (B) menunjukkan salah satu mencit mengalami kematian satu hari pascavaksinasi. Pada Gambar (C), mencit mengalami nekrosis pada hari kedua pascavaksinasi. Gambar (D) dan (E) menggambarkan perkembangan nekrosis di area penyuntikan dari minggu pertama hingga minggu kedua pascavaksinasi. Pada minggu ketiga (F), area nekrosis telah sembuh total. Nekrosis terjadi pada seluruh mencit dalam kelompok ini.

Gambar 2 menunjukkan reaksi pascavaksinasi pada mencit yang menerima vaksin DNA 701 ASF dengan adjuvan polimer. Pada Gambar (A), mencit terlihat dalam kondisi normal setelah vaksinasi. Sementara itu, Gambar (B) menunjukkan mencit dalam kelompok polimer yang mengalami nekrosis di area penyuntikan pada minggu kedua pascavaksinasi. Gambar (C) memperlihatkan perkembangan nekrosis pada minggu ketiga pascavaksinasi, teramati mulai

terjadi penyembuhan pada area nekrosis. Pada minggu keempat (D), area nekrosis telah sembuh total. Tidak semua mencit dalam kelompok ini mengalami nekrosis, hanya dua mencit yang menunjukkan reaksi tersebut. Tidak ada mencit yang mengalami kematian dalam kelompok ini.

Pembahasan

Vaksin DNA merupakan vaksin yang bekerja dengan cara mengintroduksi plasmid yang disisipi materi genetik ke dalam sel inang, sehingga menstimulasi sel untuk memproduksi antigen dan memicu respon imun (Zhang *et al.*, 2017). Penggunaan vaksin DNA untuk virus ASF juga sudah dilaporkan, walaupun hasilnya belum baik (Sereda *et al.*, 2023). Efektivitas vaksin DNA sangat bergantung pada adjuvan yang digunakan, mengingat imunogenisitasnya cenderung rendah bila diformulasikan tanpa adjuvan (Shipingana *et al.*, 2018). Dalam penelitian ini, digunakan dua jenis adjuvan, yaitu adjuvan *Montanide ISA 201 VG* sebagai adjuvan emulsi W/O/W dan *Montanide Gel 01* sebagai adjuvan polimer yang diaplikasikan pada vaksin DNA ASF untuk membandingkan kadar antibodi dan reaksi pasavaksinasi guna mengevaluasi efektifitas serta keamanannya melalui hewan coba mencit.

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa penggunaan adjuvan polimer pada vaksin DNA ASF menunjukkan efektivitas yang baik (Kamil *et al.*, 2024). Sementara itu, adjuvan W/O/W juga telah dikenal luas menunjukkan efektifitas yang baik dalam menginduksi respon antibodi yang cepat, kuat, dan tahan lama pada vaksin inaktif (Hwang *et al.*, 2024; Ibrahim *et al.*, 2015). Pengujian adjuvan W/O/W pada vaksin DNA belum pernah dilaporkan.

Dalam penelitian ini, efektivitas vaksin diukur berdasarkan nilai OD ELISA sebagai indikator kadar antibodi. Berdasarkan nilai OD pada Tabel 1 dan Grafik 1, secara deskriptif, kelompok perlakuan W/O/W memiliki rata-rata nilai OD yang lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan polimer pada setiap minggu pengambilan serum. Hal ini mengindikasikan bahwa adjuvan W/O/W mampu mendorong produksi antibodi yang cepat dan kuat sejalan dengan temuan Ibrahim *et al.* (2015). Sebaliknya, kelompok polimer menunjukkan peningkatan antibodi yang lebih gradual, tetapi dengan rata-rata nilai OD yang lebih rendah dibandingkan W/O/W. Adjuvan polimer bekerja dengan menyerap antigen dan membentuk efek depot, sehingga memungkinkan pelepasan antigen secara perlahan dan merangsang respon imun yang bertahap dan stabil (Vialle *et al.*, 2010). Kelompok kontrol menunjukkan rata-rata nilai OD yang rendah di seluruh waktu pengukuran yang mengindikasikan respon antibodi yang terbentuk dipengaruhi oleh pemberian vaksin dan tidak ada pengaruh lingkungan. Dengan kata lain, penelitian ini valid.

Hasil uji *Tukey Honestly Significant Difference* pada Tabel 4 menunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok W/O/W ($p < 0.05$) dan kelompok polimer ($p < 0.05$). Sementara itu, tidak ditemukan perbedaan signifikan antara kelompok W/O/W dan polimer ($p > 0.05$). Hal ini mengindikasikan bahwa kedua adjuvan mampu meningkatkan produksi antibodi, tetapi efektifitasnya tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Temuan ini sejalan dengan hasil penelitian Encinosa *et al.* (2021) yang melaporkan bahwa penggunaan adjuvan polimer (*Montanide Gel 01*) dan adjuvan emulsi (*Montanide ISA 50*) pada vaksin subunit menghasilkan respon antibodi yang tidak berbeda secara signifikan.

Hasil analisis *Kruskal-Wallis* terhadap waktu pengambilan sampel pada Tabel 3 menunjukkan bahwa waktu pengambilan sampel tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap nilai OD serum mencit pada masing-masing kelompok perlakuan ($p > 0.05$). Meskipun secara statistik tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antar waktu pengambilan sampel, hasil observasi pada Grafik 1 menunjukkan adanya pola fluktuasi nilai OD serum antar minggu

pada kelompok perlakuan. Pada kelompok vaksin DNA dengan adjuvan W/O/W, terlihat adanya peningkatan OD pada minggu pertama, penurunan pada minggu kedua, peningkatan kembali pada minggu ketiga, dan penurunan di minggu keempat. Sementara pada kelompok vaksin DNA dengan adjuvan polimer, peningkatan nilai OD cenderung bersifat gradual dari minggu pertama hingga minggu ketiga, sebelum kemudian menurun pada minggu keempat. Pola ini menunjukkan bahwa respon imun yang terbentuk bersifat dinamis.

Panjang *error bar* pada Grafik 1 menunjukkan kelompok perlakuan W/O/W dan polimer memiliki sebaran data nilai OD yang relatif besar yang mengindikasikan ketidakseragaman respon imun antar mencit dalam kelompok tersebut. Ketidakseragaman ini juga terlihat dari data individual pada Tabel 1, yang menunjukkan adanya mencit dengan respon antibodi yang tinggi pascavaksinasi, tetapi mencit lainnya menunjukkan respon yang masih rendah atau belum menunjukkan respon yang berarti. Vaksin DNA diketahui memiliki imunogenisitas yang relatif rendah dibandingkan vaksin konvensional, terutama apabila belum disertai optimalisasi desain plasmid, metode pengantaran gen yang efektif, serta pemilihan adjuvan yang tepat (Shipingana *et al.*, 2018). Kurangnya optimalisasi pada aspek-aspek tersebut dapat menyebabkan stimulasi sistem imun yang tidak maksimal, sehingga berkontribusi terhadap munculnya variasi dan ketidakseragaman respons antibodi yang diamati dalam penelitian ini. Oleh karena itu, Pengembangan lebih lanjut terhadap formulasi vaksin DNA yang digunakan perlu dilakukan agar mampu menghasilkan respons imun yang lebih seragam.

Nilai OD yang diamati pada penelitian ini relatif sama dengan penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya nilai OD yang teramati bersekitaran 0,2-0,6 (Dewi *et al.*, 2023; Kamil *et al.*, 2024; Mahardika *et al.*, 2023), termasuk penelitian tentang vaksin DNA Orf di Cina (Wang *et al.*, 2022). Hal ini menunjukkan bahwa respon imun yang dihasilkan oleh vaksin DNA dalam penelitian ini masih sebanding dengan hasil yang diperoleh pada studi sebelumnya.

Selain efektivitas, aspek keamanan adjuvan menjadi pertimbangan penting. Adjuvan yang ideal adalah adjuvan yang mampu merangsang respons imun dengan baik serta memiliki profil keamanan yang tinggi (Parker *et al.*, 2009). Observasi terhadap reaksi pascavaksinasi pada gambar 1 dan 2 menunjukkan bahwa adjuvan W/O/W cenderung menyebabkan reaksi lokal lebih cepat di area penyuntikan berupa nekrosis jaringan. Nekrosis terjadi pada seluruh mencit dalam kelompok ini. Terdapat satu ekor mencit pada kelompok ini yang mengalami kematian. Selain itu, beberapa menit pasca vaksinasi, seluruh mencit perlakuan menunjukkan reaksi kegatalan. Hal ini diduga disebabkan oleh jenis minyak yang digunakan dalam adjuvan berbasis emulsi. Komposisi kimia dari minyak yang digunakan dalam adjuvan sangat berpengaruh terhadap profil keamanan dan efektifitas vaksin (Encinosa *et al.*, 2021). Emulsi berbasis minyak, khususnya yang mengandung *mineral oil*, diketahui mampu menstimulasi respons imun secara kuat, tetapi juga meningkatkan risiko terjadinya efek samping lokal dan sistemik (Parker *et al.*, 2009). Minyak mineral sulit untuk dimetabolisme dan diekskresikan sehingga menyebabkan reaksi inflamasi kronis di area penyuntikan. Kondisi ini berpotensi menyebabkan ulkus, abses steril, granuloma, nekrosis jaringan serta berpotensi menyebabkan reaksi alergi (Huang *et al.*, 2024). Sebaliknya, kelompok yang menerima adjuvan polimer juga mengalami reaksi lokal berupa nekrosis jaringan dengan tingkat keparahan yang lebih ringan. Hanya dua ekor mencit dalam kelompok ini yang menunjukkan reaksi tersebut. Adjuvan polimer diketahui dapat menyebabkan peradangan jangka pendek di area penyuntikan (Vialle *et al.*, 2010). Hal ini berpotensi mengurangi resiko efek samping jangka panjang pada area penyuntikan.

Reaksi pascavaksinasi pada kelompok W/O/W yang lebih berat dibandingkan kelompok polimer menunjukkan perlunya penelitian lanjutan mengenai variasi konsentrasi adjuvan tersebut guna menurunkan resiko reaksi lokal tanpa mengurangi efektivitas. Pada penelitian

ini, digunakan formulasi dengan konsentrasi adjuvan sebesar 50%, sedangkan konsentrasi adjuvan polimer yang digunakan hanya sebesar 5%, sesuai rekomendasi produsen dan pengalaman lab Biomedik FKH. Perbandingan tersebut menunjukkan adanya kemungkinan bahwa dosis tinggi adjuvan W/O/W turut berkontribusi terhadap timbulnya reaksi lokal yang lebih berat. Oleh karena itu, evaluasi terhadap variasi konsentrasi adjuvan, khususnya W/O/W, perlu dikaji lebih lanjut.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pemberian vaksin DNA ASF dengan adjuvant W/O/W dan polimer pada mencit menghasilkan kadar antibodi yang secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Kelompok mencit yang menerima vaksin dengan adjuvan W/O/W mengalami reaksi pascavaksinasi yang lebih berat dibandingkan dengan kelompok yang menerima adjuvan polimer.

Saran

Pengembangan lebih lanjut terhadap formulasi vaksin DNA yang digunakan agar mampu menghasilkan respons imun yang lebih beragam perlu dilakukan. Variasi konsentrasi adjuvan W/O/W perlu dikaji lebih lanjut untuk menurunkan risiko reaksi lokal tanpa mengurangi efektivitas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada dosen pembimbing dan penguji atas segala bimbingan, arahan, serta masukan yang berharga. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada staf Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, atas segala bantuan dan fasilitas yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Dewi, N., Mahardika, G., & Suardana, I. (2023). Studi Pendahuluan Pengembangan Vaksin DNA Menggunakan Gen Nukleoprotein Virus SARS-COV-2. *Buletin Veteriner Udayana*, 1002. <https://doi.org/10.24843/bulvet.2023.v15.i05.p37>
- Encinosa, P., Guzmán, E., Martin, A., Soto, Y., Luis, F., Ledesma Bravo, F., Herrera, W., Perez Heredia, C., Gómez, L., González, N., Estrada, M., & Rodriguez-Mallon, A. (2021). Journal of Veterinary Medicine and Animal Health Comparison of Montanide™ GEL01 and oily Montanide™ ISA50 in presenting a peptide to the immune system of dogs. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 13, 28-33. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2020.0867>
- Huang, Z., Gong, H., Sun, Q., Yang, J., Yan, X., & Xu, F. (2024). Research progress on emulsion vaccine adjuvants. *Heliyon*, 10(3), e24662. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24662>
- Ibrahim, S., Gamal, W. M., Hassan, A. I., Mahdy Sel, D., Hegazy, A. Z., & Abdel-Atty, M. M. (2015). Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine. *Vet World*, 8(10), 1189-1198. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.1189-1198>
- Kamil, S., Mahardika, I., & Suardana, I. (2024). Respons Imun Mencit terhadap Vaksin DNA Virus Demam Babi Afrika A224L dan A276R dengan Enkapsulasi Lipofektamin, Kolesterol dan Polimer. *Jurnal Veteriner*, 25, 132-142. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2024.25.1.132>
- Mahardika, G., Pharmawati, M., & Ramona, Y. (2023). Detection of mRNA and Antibody in

Mice Injected with Plasmid pCDNA3.1-SRM Carrying African Swine Fever Virus Gen Able to Produce Self-Replicating RNA. *Jurnal Veteriner*, 24, 201-208. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2023.24.2.201>

Malogolovkin., Burmakina, G., Titov, I., Sereda, A., Gogin, A., Baryshnikova, E., & Kolbasov, D. (2015). Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups. *Emerg Infect Dis*, 21(2), 312-315. <https://doi.org/10.3201/eid2102.140649>

Panggabean, R. H., Mayasari, N. L. P. I., Faisal, F., & Wibawan, I. W. T. (2019). Karakterisasi Molekuler dan Studi Filogenetik Virus African Swine Fever pada Kejadian Wabah di Sumatera Utara Tahun 2019-2023. *Jurnal Sain Veteriner*, 42(2), 252-264. <https://doi.org/10.22146/jsv.92348>

Parker, R., Deville, S., Dupuis, L., Bertrand, F., & Aucouturier, J. (2009). Adjuvant formulation for veterinary vaccines: Montanide™ Gel safety profile. *Procedia in Vaccinology*, 1(1), 140-147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.provac.2009.07.026>

Shipingana, L., Ts, G., Gk, C., & Nataraj, R. (2018). DNA Vaccines. <https://doi.org/10.23880/vvoa-16000122>

Sendow, I., Ratnawati, A., Dharmayanti, N., & Saepulloh, M. (2020). African Swine Fever: Penyakit Emerging yang Mengancam Peternakan Babi di Dunia. *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, 30(1), 15. <http://dx.doi.org/10.14334/wartazoa.v30i1.2479>

Sereda, A. D., Kazakova, A. S., Namsrayn, S. G., Vlasov, M. E., Sindryakova, I. P., & Kolbasov, D. V. (2023). Subsequent Immunization of Pigs with African Swine Fever Virus (ASFV) Seroimmunotype IV Vaccine Strain FK-32/135 and by Recombinant Plasmid DNA Containing the CD2v Derived from MK-200 ASFV Seroimmunotype III Strain Does Not Protect from Challenge with ASFV Seroimmunotype III. *Vaccines (Basel)*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/vaccines11051007>

Vialle, R., Dupuis, L., Deville, S., Bertrand, F., Gaucheron, J., & Aucouturier, J. (2010). Microgel particulate adjuvant: characterisation and mechanisms of action. *Procedia in Vaccinology*, 2(1), 12-16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.provac.2010.03.003>

Wang, Y., Zhao, K., Song, D., Du, L., Wang, X., Gao, F., Lu, H., & Guan, J. (2022). Evaluation of the Immune Response Afforded by Combined Immunization with Orf Virus DNA and Subunit Vaccine in Mice. *Vaccines (Basel)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/vaccines10091499>

Zhang, M., Hong, Y., Chen, W., & Wang, C. (2017). Polymers for DNA vaccine delivery. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(2), 108-125. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00418>

Tabel

Tabel 1. Nilai *Optical Density (OD)* Serum Mencit pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan yang Divaksinasi Dengan Vaksin DNA ASF 701 Menggunakan Adjuvan W/O/W dan Polimer, Diukur pada Minggu ke-1, ke-2, ke-3, dan ke-4

Waktu	Ulangan	Kontrol	W/O/W	Polimer
Minggu1	1	0,000	0,145	0,178
	2	0,000	0,000	0,118
	3	0,000	0,100	0,045
	4	0,000	0,846	0,071
	5	0,094		0,089
Rata-Rata		0,019	0,273	0,100
Minggu2	1	0,000	0,285	0,146
	2	0,000	0,031	0,272
	3	0,000	0,063	0,165
	4	0,000	0,640	0,080
	5	0,060		0,215
Rata-Rata		0,012	0,255	0,176
Minggu3	1	0,003	0,280	0,188
	2	0,016	0,060	0,398
	3	0,055	0,156	0,095
	4	0,000	0,738	0,082
	5	0,026		0,340
Rata-Rata		0,020	0,309	0,221
Minggu4	1	0,009	0,151	0,143
	2	0,014	0,083	0,427
	3	0,049	0,064	0,065
	4	0,001	0,483	0,108
	5	0,010		0,000
Rata-Rata		0,017	0,195	0,149

Tabel 2. Hasil Uji *Kolmogorov-Smirnov* Nilai OD pada Berbagai Kelompok Perlakuan

Perlakuan	Statistic	Sig.
Kontrol	0,771	<0,001
W/O/W	0,811	0,004
Polimer	0,891	0,028

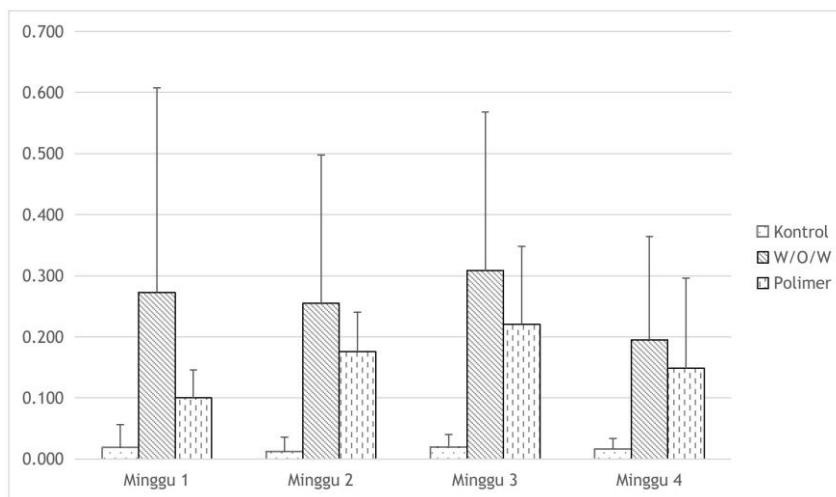
Tabel 3. Hasil Uji *Kruskal-Wallis* Nilai OD pada Berbagai Kelompok Perlakuan dan Berbagai Waktu Pengambilan Sampel

	Pengaruh Perlakuan	Pengaruh Waktu
Total N	56	56
Test Statistic	28.616	1.414
Asymptotic Sig. (2-sided test)	<0,001	0,702

Tabel 4. Perbandingan Nilai Rata-Rata OD Dengan Uji *Tukey Honestly Significant Difference* (TukeyHSD) pada Berbagai Kelompok Perlakuan

Sampel 1-Sampel 2	Test Statistic	Std. Error	Sig.
Kontrol-Polimer	-23.825	5.138	<0,001
Kontrol-W/O/W	-24.731	5.450	<0,001
Polimer-W/O/W	0,906	5.450	0,868

Grafik



Grafik 1. Diagram Batang Rata-Rata Nilai OD Setiap Kelompok Kontrol dan Perlakuan pada Setiap Minggu Pengamatan. Keterangan: 1. Kotak arsir titik-titik: kelompok kontrol; 2. Kotak arsir melintang: kelompok perlakuan W/O/W; 3. Kotak arsir garis putus-putus vertikal: kelompok perlakuan polimer

Gambar



Gambar 1. menunjukkan reaksi pascavaksinasi pada mencit yang menerima vaksin DNA 701 ASF dengan adjuvan W/O/W. Gambar (A) memperlihatkan mencit dengan rambut yang tampak basah setelah vaksinasi. Gambar (B) menunjukkan salah satu mencit mengalami kematian satu hari pascavaksinasi. Pada gambar (C), mencit mengalami nekrosis pada hari kedua pascavaksinasi. Gambar (D) dan (E) menggambarkan perkembangan nekrosis di area penyuntikan dari minggu pertama hingga minggu kedua pascavaksinasi. Pada minggu ketiga (F), area nekrosis telah sembuh total.



Gambar 2. menunjukkan reaksi pascavaksinasi pada mencit yang menerima vaksin DNA 701 ASF dengan adjuvan polimer. Pada gambar (A), mencit terlihat dalam kondisi normal setelah vaksinasi. Sementara itu, gambar (B) menunjukkan mencit dalam kelompok polimer yang mengalami nekrosis di area penyuntikan pada minggu kedua pascavaksinasi. Gambar (C) memperlihatkan perkembangan nekrosis pada minggu ketiga pascavaksinasi, teramati mulai terjadi penyembuhan pada area nekrosis. Pada minggu keempat (D), area nekrosis telah sembuh total.