

1-1 JUL 2003



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2001

SELESAI

**PEMANFAATAN SUPERNATAN KULTUR SEL FIBROBLAS EMBRIO
AYAM YANG DIAKTIVASI ANTIGEN SEBAGAI ADJUVAN DALAM
PELAKSANAAN VAKSINASI NEWCASTLE DISEASE**

Peneliti:

**YOLA RAHMAHANI, drh.
SUWARNO, M.Si., drh.
KUSNOTO, drh.**

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia

DIP Nomor : 059/XXIII--/2001 Tanggal 1 Januari 2001

Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001

Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 7

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2001

1. IMMUNE RESPONSE
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
2. CHICKENS - IMMUNOLOGY



KKC
KK
571.9646.
Rah
P

LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2001

**PEMANFAATAN SUPERNATAN KULTUR SEL FIBROBLAS EMBRIO
AYAM YANG DIAKTIVASI ANTIGEN SEBAGAI ADJUVAN DALAM
PELAKSANAAN VAKSINASI NEWCASTLE DISEASE**

Peneliti:

YOLA RAHMAHANI, drh.
SUWARNO, M.Si., drh.
KUSNOTO, drh.

3000323023141



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia

DIP Nomor : 059/XXIII/--/2001 Tanggal 1 Januari 2001

Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001

Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 7

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2001



LAPORAN PENELITIAN DAN HASIL
TANGGUNGJAWAB

PELAKSANAAN VAKSINASI NEWCASTLE DISEASE
AYAM YANG DIAKTIVASI ANTIGEN SEBAGAI ADJUVAN DALAM
EMANFAATAN SUPERNATAN KULTUR SEL FIBROBLAS EMBRIO

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SUKABAYA

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SUKABAYA

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Airlangga
Jl. M. Yoesoed, Kampus 1, Jember 60115
Telp. (031) 8533111-112, Faksimil (031) 8533113
E-mail: biologi@fsm.unair.ac.id

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

Jl. Mulyorejo Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246, Surabaya 60115

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

1.	a. Judul Penelitian: PEMANFAATAN SUPERNATAN KULTUR SEL FIBROBLAS EMBRIO AYAM YANG DIAKTIVASI ANTIGEN SEBAGAI ADJUVAN DALAM PELAKSANAAN VAKSINASI NEWCASTLE DISEASE
	b. Macam Penelitian: I / II / III
2.	<u>Kepala Proyek Penelitian:</u>
	a. Nama lengkap dengan gelar: Jola Rahmahani, MKes., drh.
	b. Jenis Kelamin: Perempuan
	c. Pangkat/Golongan dan NIP: Penata / III-c / 131576468
	d. Jabatan fungsional: Lektor
	e. Fakultas/Puslit/Jurusan: Fakultas Kedokteran Hewan
	f. Universitas: Universitas Airlangga
	g. Bidang Ilmu Yang Diteliti: Imunologi
3.	Jumlah Tim Peneliti: 3 orang
4.	Lokasi Penelitian: Lab. Virologi dan Imunologi, FKH Unair
5.	Bila penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan:
	a. Nama Instansi (kalau ada): -
	b. Alamat: -
6.	Jangka Waktu Penelitian: 6 bulan
7.	Biaya Yang Diperlukan: Rp5.000.000,- (Lima juta rupiah)

Mengetahui
Dean Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga,

Dr. Smudiono, M.S., Drh.

NIP. 130.687.297

Surabaya, 10 Desember 2001
Peneliti Utama,

J. Rah

Jola Rahmahani, MKes., drh.

NIP. 131 576 468

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga,

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS., drh.
NIP. 130 701 125

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

RINGKASAN

PEMANFAATAN SUPERNATAN KULTUR SEL FIBROBLAS EMBRIO AYAM YANG DIAKTIVASI ANTIGEN SEBAGAI ADJUVAN DALAM PELAKSANAAN VAKSINASI NEWCASTLE DISEASE (Jola Rahmahani, Suwarno, dan Kusnoto. 2001. 28 halaman)

Tingginya kasus penyakit Newcastle Disease (ND) dapat disebabkan oleh rendahnya titer antibodi yang terbentuk sebagai akibat kurang atau tidak adanya penambahan bahan yang bersifat imunostimulan dalam vaksin ND. Sebagai alternatif, supernatan kultur sel fibroblas embrio ayam (FEA) yang diaktivasi dengan berbagai antigen diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai adjuvan.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan peranan supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi dengan berbagai antigen diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai adjuvan vaksin ND dan mengetahui kemampuan adjuvan tersebut dalam meningkatkan respon imun humoral pada ayam.

Penelitian ini dibagi menjadi empat tahap. Tahap I menggunakan empat kelompok kultur sel, masing-masing kelompok diaktivasi dengan PBS, BSA, virus ND aktif, dan kuman *Listeria monocytogenes* inaktif. Empat hari kemudian supernatan dari masing-masing kelompok kultur sel dipanen dan digunakan sebagai adjuvan vaksin ND. Tahap II adalah produksi adjuvant. Tahap III adalah tahap vaksinasi pada ayam, yakni menggunakan 40 ekor ayam kampung yang dibagi menjadi empat kelompok, dan masing-masing kelompok divaksin ND dengan menggunakan adjuvan yang diperoleh dari tahap II. Tahap IV adalah pemeriksaan antibodi dengan menggunakan uji HI.

Data yang terkumpul, dianalisis dengan program statistik komputer *Univariate Analysis* pada *General Linear Model* dari SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) rel 10.0 for Windows, dengan tingkat signifikansi 99% .

Hasil penelitian menunjukkan adanya interaksi antara waktu pengamatan dengan perlakuan vaksinasi. Hasil terbaik diperoleh pada waktu

SUMMARY

THE USING OF SUPERNATANT CHICKENS EMBRYO FIBROBLAST CELL CULTURE THAT ACTIVATED WITH ANTIGEN AS AN ADJUVANT IN THE NEWCASTLE DISEASE VACCINATION PROGRAM (Jola Rahmahani, Suwarno and Kusnoto. 2001. 28 pages).

The low immune response about Newcastle Disease (ND) vaccine can be caused the adding of immunostimulant substance in the vaccine less or nothing. To over come this problem, an alternative way is to use supernatant chicken embryo fibroblast (CEF) cell culture that activated with several antigen as an immunologic adjuvant.

The aim of this study to prove the function of supernatant CEF cell culture that activated with several antigen as an adjuvant of ND vaccine and to know the ability this adjuvant in increase humoral immune response of chicken.

This study is divided by four stages. The first stage using four group of cell culture, every group activated with phosphate buffer saline (PBS), bovine serum albumin (BSA), active ND virus, or inactive *Listeria monocytogenes*. Separately after fourth day, the supernatant harvested and used as an adjuvant ND vaccine. The second stage, the adjuvant producing. The third, using 40 kampung chicken that divided into four group, and every subgroup vaccinated with ND vaccine by using every adjuvant from the second stage. The forth stage, the testing of antibody by HI test. The data is analyzed by using computer statistical *Univariate Analysis* in General Linear Model from Statistical Product and Service Solutions (SPSS) rel. 10.0 for Windows, with significance 99% .

The result of this work showed that there was an interaction between incubation period and treatment. The best result were found from group of chickens injected with ND vaccine in supernatant CEF cell culture that activated with inactive *L. monocytogenes*, was at third week.

KATA PENGANTAR

Penggunaan supernatan bekas medium pertumbuhan kultur sel atau jaringan tertentu sebagai sesuatu yang bermanfaat belum pernah dilaporkan. Padahal di dalam supernatan tersebut banyak ditemukan berbagai jenis sitokin, bergantung pada jenis sel dan aktivator yang digunakan. Penelitian ini mencoba untuk mengaktivasi kultur sel fiboblas embrio ayam (FEA) dengan menggunakan berbagai jenis aktivator (antigen), seperti *bovine serum albumin* (BSA), virus *Newcastle Disease* aktif dan kuman *Listeria monocytogenes* inaktif. Meskipun belum dapat diketahui jenis sitokin yang dihasilkan berdasar jenis aktivatornya, sebagai studi pendahuluan penggunaan supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi dengan kuman *L. monocytogenes* sebagai adjuvan imunologik vaksin ND, menunjukkan hasil yang menggembirakan. Sebagai adjuvan vaksin ND, ternyata supernatan kultur sel FEA hasil aktivasi tersebut mampu meningkatkan titer antibodi (HI) pada ayam.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Hj. Jajah Koeswara, selaku Pimpinan Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan/DP3M Ditjen Dikti Depdiknas; Prof. Dr. H. Soedarto, dr., DTM&H., selaku Rektor Universitas Airlangga; Prof. Dr. H. Sarmanu, drh. MS., selaku Ketua Lembaga Penelitian Unair; Dr. Ismudiono, drh., MS., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Unair dan semua pihak yang secara langsung ataupun tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga terselesainya laporan ini.

Semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan informasi yang berkaitan dengan teknik vaksinasi ND. Tentu penelitian ini masih banyak kekurangannya, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaannya.

Surabaya, Desember 2001
Penulis

4.9 Rancangan Penelitian dan Analisis Data	16
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	17
5.1 Hasil Penelitian	17
5.2 Pembahasan	20
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	22
6.1 Kesimpulan	22
6.2 Saran	22
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN	26

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Pengaruh Waktu dan Perlakuan Terhadap Titer HI (log 2) pada Ayam	17
5.2	Pengaruh Waktu Terhadap Titer HI (log 2) pada Berbagai Kelompok Ayam Perlakuan	18
5.3	Pengaruh Penggunaan Supernatan Kultur Sel FEA yang Diaktivasi Berbagai Antigen Terhadap Titer HI (log 2) pada Berbagai Waktu Pengamatan	18
5.4	Pengaruh Interaksi Antara Waktu Pengamatan dan Penggunaan Supernatan Kultur Sel FEA yang Diaktivasi Berbagai Antigen Terhadap Titer HI (log 2).....	19

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Vaksinasi merupakan usaha yang paling berharga dan mempunyai nilai ekonomis dalam mengontrol suatu penyakit, serta bermanfaat dalam pemberantasan penyakit. Banyak peneliti melaporkan tentang usaha-usaha untuk membuat vaksin menjadi lebih aman dan efektif, serta dapat meningkatkan respon imun melalui penambahan adjuvan.

Pemberian adjuvan pada intinya adalah untuk meningkatkan potensi vaksin, sehingga diperoleh respon imun lebih tinggi dan bertahan lebih lama. Health dan Playfair (1992) melaporkan bahwa sitokin dapat dimanfaatkan sebagai adjuvan. Sitokin yang merupakan produk dari sel-sel limfosit, makrofag dan fibroblas dapat merangsang sistem imun dengan jalan meningkatkan aktivitas sitosidal dari sel NK (*natural killer*), makrofag, sel T dan mengatur produksi antibodi oleh sel B.

Sitokin secara alamiah didapatkan secara *in vivo*, namun dengan teknik kultur sel sitokin dapat dihasilkan secara *in vitro*. Dengan membiakkan sel-sel immuno-kompeten dalam kultur *flask*, jenis-jenis sitokin yang dikehendaki dapat diperoleh (Wahl *et al.*, 1990; Young, 1991. Aktivasi terhadap makrofag secara *in vivo*, akan dihasilkan *interleukin-1* (IL-1), IL-8, *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF), *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF), *tumor necrosis factor* (TNF- α) dan *transforming growth factor* (TGF- α). Sementara itu dari sel fibroblas dapat dihasilkan IL-1, IL-6, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, *interferon* (IFN- α), dan IFN- β (Clemens, 1991).



Sitokin yang secara alamiah dapat diproduksi di dalam tubuh, merupakan pilihan sebagai adjuvan suatu vaksin, karena dapat meningkatkan respon imun terhadap vaksin, nilai protektivitas terhadap infeksi dan mengurangi efek negatif dari vaksin. Sitokin yang dihasilkan oleh sel-sel tubuh terhadap rangsangan antigen, macam dan kadarnya dapat ditentukan sesuai dengan jenis pengaktif yang diberikan. Sebagai contoh, apabila mencit diinjeksi secara intraperitoneal dengan *bovine serum albumin* (BSA) dapat dihasilkan IL-1. Injeksi dengan kuman *Haemophilus pleuropneumonia* akan menghasilkan IL-2, sedangkan pemberian virus *Vesicular stomatitis* akan menginduksi terbentuknya IFN- γ (Heath dan Playfair, 1992).

Penelitian ini menggunakan sel fibroblas embrio ayam (FEA) yang diaktivasi dengan kuman *Listeria monocytogenes* inaktif, BSA, atau virus ND aktif, untuk dapat menstimulasi pembentukan sitokin. Di antara sitokin yang dihasilkan oleh sel FEA, ada yang berfungsi untuk mengaktifkan makrofag, limfosit T atau limfosit B, sehingga penggunaannya sebagai adjuvan vaksin ND tentu akan dapat meningkatkan respon imun tubuh. Dengan demikian supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi dengan berbagai jenis antigen dapat dimanfaatkan sebagai adjuvan imunologik.

Dalam pembuatan kultur sel atau kultur jaringan tertentu, setelah sel-sel yang dibiakkan dipanen, supernatan bekas medium pertumbuhan biasanya dibuang dengan percuma. Hal ini dipandang sebagai suatu pemborosan, karena di dalam supernatan bisa ditemukan adanya sitokin yang dapat diisolasi dan dijadikan bahan-bahan penelitian selanjutnya (Boraschi, *et al.*, 1994). Berdasar latar belakang tersebut, maka penelitian ini menggunakan vaksin ND

sebagai model pembuatan vaksin inaktif dengan supernatan dari kultur sel makrofag dari fibroblas sebagai adjuvan.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah supernatan kultur sel fibroblas embrio ayam yang telah diaktivasi dengan berbagai jenis antigen (BSA, virus ND dan kuman *Listeria monocytogenes*) dapat dimanfaatkan sebagai adjuvan dalam pelaksanaan vaksinasi ND pada ayam?
- 2) Apakah waktu pengamatan berpengaruh terhadap titer HI pada ayam yang divaksin ND aktif dengan supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi berbagai jenis antigen (BSA, virus ND dan kuman *Listeria monocytogenes*)?
- 3) Apakah supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi dengan berbagai jenis antigen (BSA, virus ND dan kuman *Listeria monocytogenes*) sebagai adjuvan dapat meningkatkan respon imun humoral, khususnya terhadap pembentukan titer HI ND?

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sitokin dan Fungsinya

Sitokin adalah mediator yang dihasilkan oleh sel dalam reaksi radang atau imunologik dengan fungsi sebagai isyarat antara sel-sel untuk mengatur respon setempat dan kadang-kadang juga sistemik. Sitokin mempengaruhi peradangan dan imunitas melalui pengaturan pertumbuhan, mobilitas dan diferensiasi leukosit dan sel-sel jenis lain (Clemens, 1991; Health and Playfair, 1992). Sitokin berupa peptida atau glikoprotein yang disintesis dan disekresi oleh sel dalam menanggapi induksi oleh berbagai macam rangsangan. Substansi ini memiliki berat molekul antara 6.000 sampai 60.000 Dalton dan mempunyai potensi untuk merangsang target sel pada konsentrasi antara 10^{-10} hingga 10^{-15} mol/L (Oppenheim *et al.*, 1991).

Sitokin dapat bekerja secara langsung dengan jalan regulasi terhadap sel-sel di dekatnya. Secara tidak langsung, sitokin bekerja dengan menginduksi ekspresi reseptor untuk sitokin yang lain/bekerja sama dengan sitokin lain dalam merangsang sel (fungsi sinergisme) dan mencegah ekspresi reseptor/produksi sitokin lain (fungsi antagonisme) (Mizel, 1990; Young, 1991). Sitokin berfungsi sebagai sinyal interseluler yang mengatur respon inflamasi lokal dan kadang-kadang sistemik. Sitokin dapat mengendalikan respon imun dan reaksi inflamasi dengan cara mengatur pertumbuhan, mobilitas dan diferensiasi leukosit dan sel lainnya. Selain itu sitokin berperan dalam patofisiologi berbagai jenis penyakit (Oppenheim *et al.*, 1991).

Adanya rangsangan berupa pemberian antigen, menyebabkan sel-sel fibroblas dan makrofag akan menghasilkan IL-1, IL-6, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IFN- α , IFN- β , dan TNF- α . Interleukin-1 sebagai adjuvan dapat meningkatkan respon sel B terhadap antigen T-dependent (sel darah merah domba) maupun antigen T-independent (*Streptococcus pneumoniae*) sedangkan IL-2 dapat meningkatkan protektivitas mencit terhadap *Haemophilus pleuropneumoniae*, virus rabies dan herpes simpleks (Health dan Playfair, 1992).

Cotral *et al.* (1999) membagi sitokin menjadi lima jenis yaitu: 1) Sitokin yang memerantari kekebalan alamiah, meliputi: IL-1, TNF- α , IFN- α , dan IL-6; 2) Sitokin yang mengatur pertumbuhan dan deferensiasi limfosit, seperti IL-2, IL4, IL12, IL15, dan TGF- β ; 3) Sitokin yang mengaktifkan sel-sel inflamasi, seperti IFN- γ , TNF- α , TNF- β , dan *migration inhibitory factor* (MIF); 4) Sitokin yang mempengaruhi pergerakan leukosi, yakni *chemokine* C-X-C yang dihasilkan oleh makrofag yang teraktivasi dan sel-sel endotel, serta *chemokine* C-C yang diproduksi oleh sel T; dan 5) Sitokin yang menstimulir hematopoiesis, seperti *coloni stimulating factor* (CSF), *granulocyte-monocyte colony stimulating factor* (GM-CSF), *monocyte colony stimulating factor* (M-CSF)

Menurut Kunkel *et al.* (1996), berdasarkan aktivitas *inflammatory* sitokin dibagi menjadi empat, yakni: *recognition* (IL-1 dan TNF- α), *recruitment* (IL-8, *monocyte chemo-attractant protein* {MCP-1}), *removal* (IFN- γ , IL-2 dan IL-6), dan *repair* (*transforming growth factor* {TGF- β }, *fibroblast growth factor* {FGF}).

Interlukin-1 menginduksi pelepasan sejumlah mediator sekunder termasuk *platelet activating factor* (PAF), IL-6, TNF, CSF dan menginduksi IL-1 sendiri (Baratawidjaja, 1991). Secara *in vitro* IL-1 memperluas proliferasi, diferensiasi dan fungsi produksi antibodi oleh sel B. pengaruh IL-1 terhadap limfosit B dapat secara tidak langsung melalui T-helper. Oleh karena IL-1 dapat dihasilkan oleh limfosit B sendiri, maka interleukin ini dapat bertindak sebagai otokrin (Health dan Playfair, 1992).

Interleukin 6 selain dihasilkan oleh makrofag juga dihasilkan sel lain, seperti limfosit T, fibroblas dan sel-sel tumor, seperti glioblastoma dan sel karsinoma kandung kencing. Interleukin 6 mempunyai efek yang beragam terhadap sejumlah sel sasaran. Efek lain juga dimiliki oleh IL-1 dan TNF sehingga IL-6 dianggap pula sebagai mediator peradangan dan sistem imun yang utama (Health dan Playfair, 1992). Interleukin 6 dapat berfungsi sebagai penghubung antara sejumlah jenis sel dengan cara dengan cara berperan dalam mendorong proliferasi dan diferensiasi limfosit B, limfosit T, sel-sel induk darah, hepatosit (Stites *et al.*, 1997).

Efek anti virus dan anti bakteri yang berlangsung secara *in vitro* dan IFN- α dan IFN- β tidak saja disebabkan oleh pengaruh langsung IFN tersebut pada sel-sel, tetapi juga melalui respon imun, sehingga IFN- α dan IFN- β dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dan mikrobisidal dari makrofag, peningkatan produksi antibodi, peningkatan aktivitas sel NK dan CTL, yang semuanya dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi virus maupun non-virus. Dengan demikian IFN- α dan IFN- β dapat meningkatkan respon imun spesifik dan nonspesifik (Clemens, 1991).

membran sel untuk meningkatkan respon imun. Poliribonukleotida (Poli I:C) bertindak sebagai perangsang imun terhadap sel T dewasa (Tizard, 1988).

BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

- 1) Untuk membuktikan bahwa supernatan kultur sel fibroblas embrio ayam yang telah diaktivasi dengan berbagai jenis antigen dapat dimanfaatkan sebagai adjuvan vaksin ND.
- 2) Untuk mengetahui waktu yang diperlukan dalam pembentukan titer antibodi ND (HI) pada vaksinasi ND aktif yang menggunakan supernatan kultur sel FEA.
- 3) Untuk mengetahui kemampuan supernatan kultur sel fibroblas embrio ayam di dalam meningkatkan respon imun humoral, khususnya terhadap pembentukan titer antibodi ND.
- 4) Untuk menentukan jenis antigen terbaik sebagai aktivator kultur sel fibroblas embrio ayam, sehingga dapat menghasilkan sitokin yang secara optimal dapat meningkatkan pembentukan titer antibodi ND.

3.2 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan dalam bidang kedokteran hewan dan peternakan, tentang penggunaan adjuvan yang berasal dari kultur sel fibroblas embrio ayam dalam pelaksanaan program vaksinasi. Selain itu juga membuka peluang bagi para peternak untuk menggunakan adjuvan asal kultur sel dengan biaya murah, praktis dan tanpa efek samping, sebagai adjuvan dalam pelaksanaan vaksinasi di lapangan.

b. Medium pertumbuhan sel

Medium pertumbuhan sel berupa RPMI-1640 dan DMEM (yang mengandung 10% FCS, 100 µg/ml penstrep, 24 mMol NaHCO₃, 25mMol Hepes, pH 7,2).

d. Bahan aktivasi kultur sel

Bahan aktivasi kultur sel yang dipakai untuk adjuvant vaksin ND adalah *bovine serum albumin* (BSA), kuman *Listeria monocytogenes* inaktif, virus ND aktif, larutan *phosphate buffer saline* (PBS), tripsin 0,25%, zat anti koagulan (EDTA), eritrosit ayam 0,5%, antigen ND 4HA unit, serum darah ayam penelitian.

4.5 Alat Penelitian**a. Kandang penelitian**

Kandang untuk penelitian tahap I sebanyak 4 buah yang masing-masing diisi 10 ekor ayam perlakuan.

b. Peralatan untuk *tissue culture*

Peralatan untuk pembuatan kultur jaringan (*tissue culture*) adalah sebagai berikut: *magnetic stirrer*, sentrifus, bejana tripsinisasi dengan magnet di dalamnya, incubator CO₂, dan *inverted* mikroskop.

c. Peralatan untuk *HI test*

Peralatan untuk uji *haemagglutination inhibition* (HI) adalah sebagai berikut: mikroplate bentuk V, pipet mikro-*dropper* 25 µl, mikro-*diluter*

25 μ l, mikro-*shaker* tabung reaksi beserta rak, sentrifus dan tabungnya, tabung venojek.

d. Peralatan untuk vaksinasi

Peralatan untuk vaksinasi meliputi: tabung suntik berskala 1,0 ml (*tuberculin tube*), dan kapas beralkohol.

4.6 Unit Analisis

Penelitian ini menggunakan unit analisis berupa serum ayam yang diambil pada minggu ke-1, 2 dan 3 pasca vaksinasi pertama.

4.7 Variabel Penelitian

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah strain ayam petelur, jenis kelamin dan umur ayam.

Variabel bebas adalah pakan dengan kadar protein 15 dan 20 %, serta pemberian vaksin ND pada umur 3 dan 5 minggu.

Variabel tergantung adalah titer antibodi (titer HI) terhadap vaksin ND yang diukur dengan uji HI.

4.8 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi 4 tahap yaitu: 1) pembuatan kultur sel fibroblas embrio ayam (FEA), 2) pembuatan adjuvan, 3) perlakuan vaksinasi *Newcastle disease* (ND) pada ayam percobaan, dan 4) pelaksanaan uji HI.



kelompok, menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS). Selanjutnya dilakukan pembuatan vaksin. Virus ND aktif dengan kandungan 10^7 EID₅₀/0,25 ml disiapkan untuk dicampur dengan adjuvan volume sama banyak dan disimpan pada -70°C sampai saat digunakan.

Tahap III, perlakuan vaksinasi ND pada ayam. Tahap ini pada dasarnya adalah perlakuan vaksinasi ND pada ayam percobaan, yaitu dilaksanakan dengan cara sebagai berikut. Empat puluh ekor anak ayam umur 14 hari dibagi menjadi 4 kelompok, sehingga masing-masing kelompok terdapat 10 ekor ayam. Adapun pembagiannya adalah sebagai berikut: 1) Kelompok I, divaksin ND dalam pelarut PBS. 2) Kelompok II, divaksin ND dalam adjuvan asal kultur sel fibroblas yang diaktivasi dengan BSA dengan dosis 20 µg/0,1/flask; 3) Kelompok III, divaksin ND dalam adjuvan asal kultur sel fibroblas yang diaktivasi dengan virus ND aktif; dan 4) Kelompok IV, divaksin ND dalam adjuvan asal kultur sel fibroblas yang diaktivasi dengan *L. monocytogenes* inaktif.

Vaksinasi pertama dilakukan pada saat ayam berumur 14 hari dan vaksinasi ulangan (*booster*) dilakukan dengan vaksin yang sama pada umur 21 hari. Semua vaksinasi dilakukan secara intramuskuler dan tiap ekor ayam memperoleh vaksin sebanyak 10^7 EID₅₀/0,5 ml.

Variabel yang diukur adalah respon imun humoral (pembentukan titer antibodi) yang dilakukan dengan uji hambatan hemaglutinasi (HI) pada minggu 1, 2, 3 dan 4 pasca vaksinasi pertama.

Tahap IV, pelaksanaan uji HI. Pemeriksaan uji HI pada penelitian ini mengacu pada hasil Loka Karya Kesehatan Hewan II pada tahun 1978. Cara

pemeriksaan ini disebut Prosedur Beta, merupakan prosedur yang resmi digunakan di Indonesia (Ernawati dkk., 2001).

Cara kerja Prosedur Beta adalah sebagai berikut: 1) Lubang 1-2 dari mikroplat diisi dengan PBS pH 7,2 sebanyak 0,025 ml dengan mikro-dropper 25 μ l; 2) Lubang 1 diisi dengan 0,025 ml serum ayam percobaan yang diuji dengan menggunakan mikro-diluter 25 μ l; 3) Mikro-diluter diputar, kemudian dipindahkan pada lubang ke-2, dan seterusnya sampai dengan lubang ke-10 dengan demikian terjadi seri pengenceran kelipatan 2. Adapun lubang ke-11 digunakan sebagai kontrol antigen, sedangkan lubang ke-12 digunakan sebagai kontrol sel darah merah; 4) Pada lubang ke-1 sampai ke-11 ditambahkan 0,025 ml antigen ND 4 HA unit dengan mikro-dropper 25 μ l; 5) Larutan dikocok dengan mikro-shaker selama 30 detik, kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25 °C) selama 15 menit; dan 6) Ditambahkan 0,05 ml sel darah merah ayam 0,5% pada semua lubang kemudian dikocok lagi dengan mikro-shaker selama 30 detik, selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit kemudian dilakukan pembacaan hasil, pengenceran serum tertinggi yang masih dapat mengadakan hambatan hemaglutinasi sel darah merah ayam secara sempurna, merupakan nilai titer HI.

Adapun penentuan antigen 4 HA unit dilakukan titrasi antigen terlebih dulu dengan cara uji HA mikro, yaitu sebagai berikut: 1) Lubang ke-1 hingga ke-12 pada mikroplat pada baris I dan II diisi dengan PBS pH 7,2 sebanyak 0,025 ml dengan mikro-dropper 25 μ l (titrasi duplikat); 2) Lubang ke-1 baris I dan II diisi antigen 0,025 ml dengan pipet mikro-

dropper 25 μ l; 3) Antigen dan PBS pada lubang ke-1 dicampur dengan *mirko-diluter* cara memutar-mutar alat tersebut, kemudian dipindahkan ke lubang berikutnya, demikian seterusnya sampai lubang ke-11 dan ke-12 yang digunakan sebagai kontrol eritrosit (tanpa antigen); 4) Semua lubang diisi dengan 0,05 ml. eritrosit ayam 0,5%; dan 5) Diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian dibaca titernya.

HA sempurna 100% adalah aglutinasi terlihat jelas berupa lapisan eritrosit secara merata (*defuse*) pada dasar sumuran dan penjernihan dari cairan bagian atas tanpa terjadinya pengendapan eritrosit, terbentuk titik di tengah sumuran. Setelah titer antigen diketahui, dilanjutkan reitrasi dengan cara yang sama, yaitu uji HA mikro teknik.

4.9 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *factorial post only control group design* dengan 4 perlakuan waktu pengamatan x 4 perlakuan vaksinasi x 10 ulangan. Data yang terkumpul, berupa titer antibodi yang diukur dengan uji HI (*haemagglutination inhibition*) dalam bentuk log 2 (Ernawati dkk. 2001), selanjutnya dianalisis dengan program statistik komputer *Univariate Analysis* pada *General Linear Model* dari SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) rel 10.0 for Windows, dengan tingkat signifikansi 99% (Santoso, 2000).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Hasil secara keseluruhan terhadap pemeriksaan titer antibodi selama 4 minggu akibat perlakuan vaksinasi pada ayam dengan vaksin ND aktif menggunakan pelarut supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi berbagai antigen dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Pengaruh Waktu dan Perlakuan Terhadap Titer HI (log 2) pada Ayam

Jenis aktivator kultur sel FEA	Minggu ke...				Rata-rata titer HI (log 2)
	1	2	3	4	
Kontrol (PBS)	0,10	3,50	4,50	4,50	3,15
<i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA)	1,10	4,20	4,80	5,00	3,77
Virus ND aktif	1,20	4,40	5,10	4,70	3,85
<i>L. monocytogenes</i> inaktif	1,10	5,20	5,30	5,20	4,20
Rata-rata titer HI (log 2)	0,88	4,33	4,93	4,85	-

Pada penelitian ini, waktu pengamatan memberikan pengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap titer HI (log 2) seperti terlihat pada Tabel 5.2. Titer antibodi tertinggi didapatkan pada minggu ke-3 dan secara statistik tidak menunjukkan perbedaan dengan minggu ke-4 ($p > 0,05$), tetapi berbeda dengan minggu ke-2 atau ke-1 ($p < 0,01$). Titer antibodi yang terdeteksi pada minggu ke-1 sebesar $0,88 \pm 0,79$, minggu ke-2 sebesar $4,33 \pm 0,83$, minggu ke-3 sebesar $4,93 \pm 0,62$, dan minggu ke-4 sebesar $4,85 \pm 0,53$.

Tabel 5.2 Pengaruh Waktu Terhadap Titer HI (log 2) pada Berbagai Kelompok Ayam Perlakuan

Waktu Pengamatan (Minggu)	Titer HI (log 2)
Minggu ke-1	0,88 ^c ± 0,79
Minggu ke-2	4,33 ^b ± 0,83
Minggu ke-3	4,93 ^a ± 0,62
Minggu ke-4	4,85 ^a ± 0,53

^{a, b, c} superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$)

Pada Tabel 5.3 ditunjukkan pengaruh perlakuan terhadap titer HI (log 2). Vaksinasi yang menggunakan vaksin ND aktif dalam pelarut supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi antigen *L. monocytogenes* inaktif menunjukkan titer tertinggi dan berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan titer HI yang dihasilkan oleh kelompok ayam yang mendapatkan vaksin yang sama tetapi dalam pelarut supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi antigen virus ND aktif, BSA maupun kontrol (PBS). Titer HI pada kelompok ayam yang divaksin ND dengan pelarut supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi *L. monocytogenes* inaktif adalah $4,20 \pm 1,91$, virus ND aktif $3,85 \pm 1,69$, BSA $3,77 \pm 1,67$ dan kontrol $3,15 \pm 1,89$.

Tabel 5.3 Pengaruh Penggunaan Supernatan Kultur Sel FEA yang Diaktivasi Berbagai Antigen Terhadap Titer HI (log 2) pada Berbagai Waktu Pengamatan

Jenis aktivator kultur sel FEA	Rata-rata titer HI (log 2)
Kontrol (PBS)	3,15 ^c ± 1,89
<i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA)	3,77 ^b ± 1,67
Virus ND aktif	3,85 ^b ± 1,69
<i>L. monocytogenes</i> inaktif	4,20 ^a ± 1,91

^{a, b, c} superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$)

Pada penelitian ini terdapat interaksi antara waktu pengamatan (minggu) dengan perlakuan vaksinasi ($p < 0,05$) terhadap titer HI (log 2) seperti terlihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Pengaruh Interaksi Antara Waktu Pengamatan dan Penggunaan Supernatan Kultur Sel FEA yang Diaktivasi Berbagai Antigen Terhadap Titer HI (log 2)

Perlakuan Interaksi	Titer HI (log 2)
Minggu ke-1 ~ Kontrol	$0,10^h \pm 0,32$
Minggu ke-1 ~ BSA	$1,10^g \pm 0,57$
Minggu ke-1 ~ Virus ND	$1,20^g \pm 0,92$
Minggu ke-1 ~ <i>L.monocytogenes</i>	$1,10^g \pm 0,74$
Minggu ke-2 ~ Kontrol	$3,50^f \pm 0,53$
Minggu ke-2 ~ BSA	$4,20^e \pm 0,63$
Minggu ke-2 ~ Virus ND	$4,40^{de} \pm 0,52$
Minggu ke-2 ~ <i>L. monocytogenes</i>	$5,10^{ab} \pm 0,63$
Minggu ke-3 ~ Kontrol	$4,50^{ode} \pm 0,53$
Minggu ke-3 ~ BSA	$4,80^{abod} \pm 0,42$
Minggu ke-3 ~ Virus ND	$5,10^{ab} \pm 0,32$
Minggu ke-3 ~ <i>L. monocytogenes</i>	$5,30^a \pm 0,48$
Minggu ke-4 ~ Kontrol	$4,50^{ode} \pm 0,53$
Minggu ke-4 ~ BSA	$5,00^{abc} \pm 0,47$
Minggu ke-4 ~ Virus ND	$4,70^{bcde} \pm 0,67$
Minggu ke-4 ~ <i>L. monocytogenes</i>	$5,20^{ab} \pm 0,63$

^{a-h} superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$)

Titer HI tertinggi didapatkan pada perlakuan interaksi antara waktu pengamatan minggu ke-3 dengan penggunaan supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi *L. monocytogenes* sebagai pelarut vaksin ND aktif, yaitu sebesar $5,30 \pm 0,48$. Hasil yang sama juga didapatkan pada perlakuan interaksi, antara

lain: antara waktu pengamatan minggu ke-4 dengan pelarut yang diaktivasi *L. monocytogenes*, minggu ke-2 dengan pelarut yang diaktivasi *L. monocytogenes*, minggu ke-3 dengan pelarut yang diaktivasi virus ND, minggu ke-4 dengan pelarut yang diaktivasi BSA, dan minggu ke-3 dengan pelarut yang diaktivasi BSA. Sedangkan titer HI terendah didapatkan pada perlakuan interaksi antara waktu pengamatan minggu ke-1 dengan penggunaan supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi PBS sebagai pelarut vaksin ND aktif, yaitu sebesar $0,10 \pm 0,32$.

5.2 Pembahasan

Pada penelitian ini, titer HI (log 2) pada minggu pertama masih relatif rendah. Hal ini disebabkan adanya fase negatif, dimana vaksin ND memerlukan waktu sekitar 7 hari untuk dapat merangsang respon imun tubuh pada ayam. Titer HI berangsur-angsur meningkat dan mencapai puncaknya pada minggu ketiga untuk kemudian menurun. Namun demikian titer tertinggi pada minggu ketiga masih belum dapat dikatakan baik, karena standar minimal titer HI (log 2) untuk dapat bebas dari serangan ND adalah 5.

Jika dilihat dari masing-masing perlakuan, penggunaan supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi *L. monocytogenes* inaktif sebagai pelarut vaksin ND aktif, menghasilkan rata-rata titer HI (log 2) terbaik, yaitu sebesar 4,20. Bahkan pada minggu kedua dan keempat menghasilkan titer HI yang cukup tinggi dan memenuhi standar minimal, sehingga secara teoritik dapat dikatakan ayam yang divaksin tersebut dapat bebas dari serangan ND.

Tingginya titer HI yang dihasilkan, diduga disebabkan adanya IL-1 dan IL-6 pada supernatan kultur sel FEA yang diaktivasi *L. monocytogenes* inaktif. Seperti diketahui IL-1 dapat menginduksi sel B untuk menghasilkan antibodi.

Rangsangan produksi antibodi tersebut terjadi baik secara langsung pada sel B maupun melalui peningkatan aktivitas sel T_{helper} (T_h) untuk memproduksi *B cell growth factor* (BCGF). Karena sel B sendiri juga dapat menghasilkan IL-1, maka IL-1 diduga berperan sebagai sinyal untuk fungsi autoregulasi sel B (Stites *et al.*, 1997). Menurut Suwarno dkk. (2001), kuman *L. monocytogenes* merupakan aktivator terbaik untuk merangsang sel-sel imun (sel peritoneal mencit) untuk menghasilkan sitokin karena kuman ini bersifat intraseluler dan ekstraselular.

Penggunaan kultur sel FEA yang diaktivasi virus ND aktif atau BSA sebagai pelarut vaksin, ternyata menghasilkan titer HI yang tidak berbeda. Menurut Wahl *et al.* (1990) dan Boraschi *et al.* (1994), jenis sitokin lainnya, seperti IL-6, TNF, dan IFN yang dihasilkan oleh sel-sel fibroblas maupun makrofag yang diaktivasi dengan virus telah terbukti berperan sebagai adjuvan vaksin. Kusnoto dkk. (1999) melaporkan bahwa kultur sel fibroblas embrio mencit apabila diaktivasi dengan *bovine serum albumin* (BSA) dapat menghasilkan sitokin. Penggunaan sitokin tersebut telah terbukti dapat meningkatkan respon imun humoral, nilai protektivitas dari ujiantang dan mengurangi efek negatif pada aplikasinya terhadap vaksinasi *Listeria monocytogenes* pada mencit.

DAFTAR PUSTAKA

- Boraschi, D., L. Villa, G. Bossu, P. Censini, P. Ghiara. 1994. Differential activity of interleukin 1 α and interleukin 1 β in the stimulation of immune respons in vitro. *Eur. J. Immunol.* 20 : 317 – 321
- Clemens, M.J. 1991. *Cytokines*. Bios Scientific Publisher. London.
- Cotran, R.S.; V. Kumar, and T. Collins. 1999. *Pathologic Basic of Disease*. 6th Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Ernawati, R., A.P. Rahardjo, N. Sianita, J. Ramahani, W. Tjahjaningsih, F.A Rantam, dan Suwarno. 2001. *Petunjuk Praktikum Ilmu Penyakit Viral*. Lab. Virologi dan Imunologi FKH Unair.
- Heath, A.W., and J.H.L. Playfair. 1992. *Cytokines as Immunological Adjuvant*. *Vaccine* 10 : 427 – 434.
- Kunkel, S.L., N. Lukacs and R.M. Strieter. 1996. *Sitokin and inflammatory disease*. In: *Cellular and Molecular Pathogenesis*. Sirica A.E. Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 23-36
- Kusnoto, Suwarno, dan M.A. Al Arif. 1999. *Supernatan kultur sel fibroblas dan makrofag sebagai adjuvan dalam pelaksanaan vaksinasi *listeria monocytogen* pada mencit*. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Mizel, S.B. 1990. How does interleukin 1 activated cell ? Cyclic AMP and interleukin 1 signal transduction. *Immunol Today* 11 : 390 – 398.
- Oppenheim, J.J., F.W. Ruscetti, and C. Faltynek. 1996. *Cytokines*. In: *Basic and Clinical Immunology*. 8th Ed. Prentice Hall International Inc., USA: 78-100.
- Santoso, S. 2000. *Mengolah Data Statistik Secara Profesional*. SPSS versi 10. Penerbit PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta.
- Stites, D.P., A.I. Terr, T.G. Parlow. 1997. *Medical Immunology*. 9th Ed. A Simon & Schuster Company, Prentice-Hall International Inc. USA.
- Suwarno, M.A Al Arif, dan Kusnoto. 2001. *Penggunaan cairan peritoneal mencit sebagai adjuvan vaksin ND pada ayam dengan diet protein rendah*. *Media Kedokteran Hewan*. 17(2): 75-78.

- Tizard, I. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. Airlangga University Press. Surabaya.
- Zainuddin, M. 2000. Metodologi penelitian. Diktat Kuliah. Program Pascasarjana, Universitas Airlangga.
- Wahl, S.M., M. Francis, J.B. Allen, E.B. Dogherti, and S.F. Dogherti. 1990. Macrophag production of TGF-b and regulation by TGF-b. Ann NY.Acad. Sci. 593 : 188 – 207.
- Young, N.S. 1991. Hematopoietic Growth Factor : A summary of their biology in tissue culture animals, and clinical trial. Prog. Clin. Biol. Res. 337: 539–545.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Waktu	1	Minggu-I	40
	2	Minggu-II	40
	3	Minggu-III	40
	4	Minggu-IV	40
Perlakuan	0	Kontrol	40
	1	BSA	40
	2	ND	40
	3	Listeria	40

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Titer Ab ND

Waktu	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Minggu-I	Kontrol	.10	.32	10
	BSA	1.10	.57	10
	ND	1.20	.92	10
	Listeria	1.10	.74	10
	Total	.88	.79	40
Minggu-II	Kontrol	3.50	.53	10
	BSA	4.20	.63	10
	ND	4.40	.52	10
	Listeria	5.20	.63	10
	Total	4.33	.83	40
Minggu-III	Kontrol	4.50	.53	10
	BSA	4.80	.42	10
	ND	5.10	.32	10
	Listeria	5.30	.48	10
	Total	4.93	.53	40
Minggu-IV	Kontrol	4.50	.53	10
	BSA	5.00	.47	10
	ND	4.70	.67	10
	Listeria	5.20	.63	10
	Total	4.85	.62	40
Total	Kontrol	3.15	1.89	40
	BSA	3.77	1.67	40
	ND	3.85	1.69	40
	Listeria	4.20	1.91	40
	Total	3.74	1.82	160

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Titer Ab ND

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	476.794 ^a	15	31.786	95.958	.000
Intercept	2242.506	1	2242.506	6769.830	.000
TIME	447.469	3	149.156	450.283	.000
TRIAL	22.919	3	7.640	23.063	.000
TIME * TRIAL	6.406	9	.712	2.149	.029
Error	47.700	144	.331		
Total	2767.000	160			
Corrected Total	524.494	159			

a. R Squared = .909 (Adjusted R Squared = .900)

Post Hoc Tests

Waktu

Homogeneous Subsets

Titer Ab ND

Duncan^{a,b}

Waktu	N	Subset		
		1	2	3
Minggu-I	40	.88		
Minggu-II	40		4.33	
Minggu-IV	40			4.85
Minggu-III	40			4.93
Sig.		1.000	1.000	.560

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .331.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.000.

b. Alpha = .05.

Perlakuan

Titer Ab ND

Duncan^{a,b}

Perlakuan	N	Subset		
		1	2	3
Kontrol	40	3.15		
BSA	40		3.77	
ND	40		3.85	
Listeria	40			4.20
Sig.		1.000	.560	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .331.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.000.

b. Alpha = .05.

Waktu*Perlakuan

Titer Ab ND

Duncan^a

Duncan	N	Subset for alpha = .05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
MI-Kontrol	10	.10							
MI-BSA	10		1.10						
MI-Listeria	10		1.10						
MI-ND	10		1.20						
MII-Kontrol	10			3.50					
MII-BSA	10				4.20				
MII-ND	10				4.40	4.40			
MIII-Kontrol	10				4.50	4.50	4.50		
MIV-Kontrol	10				4.50	4.50	4.50		
MIV-ND	10				4.70	4.70	4.70	4.70	
MIII-BSA	10					4.80	4.80	4.80	4.80
MIV-BSA	10						5.00	5.00	5.00
MIII-ND	10							5.10	5.10
MII-Listeria	10							5.20	5.20
MIV-Listeria	10							5.20	5.20
MIII-Listeria	10								5.30
Sig.		1.000	.717	1.000	.084	.171	.084	.0	.090

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.





