

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Dan Rancangan Penelitian

Faktor yang diperbandingkan dalam penelitian adalah : Vaksin EDS'76 tunggal, Vaksin EDS'76 ganda dan kontrol (disuntik dengan adjuvan minyak); Media propagasi virus berupa cairan alantois dari telur bebek bertunas (TBB) umur 10 hari dan media propagasi virus dari biakan sel (TC) fibroblas embrio bebek berumur 10 hari; Aplikasi vaksin melalui suntikan dibawah kulit (sub kutan) dan melalui suntikan kedalam otot (intra muskuler). Penelitian dilakukan dengan percobaan sungguhan (*true experiment*) dengan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 4 x 2 x 2 seperti dapat dilihat pada bagan rancangan penelitian (tabella). Setiap kombinasi perlakuan digunakan lima ekor ayam umur 15 minggu termasuk kontrol dan vaksin komersial sebagai pembanding sehingga seluruhnya berjumlah 80 ekor.

Tabel 1a. Bagan rancangan penelitian

Aplikasi Vaksin	Jenis Media	Jenis Vaksin				ADJ	VK1	VK2	VK3	Jumlah
		Tunggal		Ganda						
		CA	TC	CA	TC					
sub kutan		5	5	5	5	5	5	5	5	40
Intra muskuler		5	5	5	5	5	5	5	5	40
Jumlah		10	10	10	10	10	10	10	10	80

Keterangan:

CA : Cairan Alantois TC : Tissue Culture (biakan sel)
 ADJ : Adjuvan (kontrol) VK1 : Vaksin komersial EDS'76 (tunggal)

VK2 : Vaksin komersial (ganda), EDS'76, ND, IB
 VK3 : Vaksin Komersial (ganda), EDS'76, ND, IBD

4.2. Variabel Penelitian

4.2.1. Klasifikasi Variabel

Variabel yang digunakan sebagai berikut :

1. Variabel bebas : jenis vaksin (EDS'76 tunggal dan EDS'76 ganda), jenis media propagasi virus (cairan alantois dan biakan sel dari TBB), aplikasi vaksin (sub kutan dan intra muskuler) dan kombinasi jenis vaksin, jenis media dan aplikasi vaksin.
2. Variabel terikat : tanggap kebal terhadap virus.
3. Variabel kendali : kepadatan kandang, umur, makanan ayam dan jenis ayam.

4.2.2. Definisi Operasional

Vaksin EDS'76 tunggal adalah vaksin *oil adjuvant* yang mengandung virus EDS'76 (virus berasal dari propagasi pada cairan alantois atau biakan sel TBB) dan adjuvan minyak Montanide Isa 70 dari Seppic.

Vaksin EDS'76 ganda adalah vaksin *oil adjuvant* yang terdiri dari campuran beberapa virus yaitu EDS'76, ND, IBD dan IB (virus berasal dari propagasi pada cairan alantois atau biakan sel) dan ditambah dengan adjuvan minyak Montanide Isa 70 dari Seppic.

Tanggap kebal (respon imun), secara umum adalah kemampuan tubuh untuk mengenali dan kemudian menghancurkan bahan yang dianggap asing (Tizard, 1982). Dalam penelitian ini, yang dimaksud dengan tanggap kebal adalah reaksi timbulnya resistensi hewan coba akibat pengalamannya dengan jasad penyebab

penyakit dengan menerima vaksin (Wesley and Margaret, 1984).

Tanggap kebal terhadap virus EDS'76 dan ND diukur dengan titer antibodi yang terbentuk yang dinyatakan dengan uji HI menurut modifikasi prosedur beta hasil lokakarya Keswan II (1978). Tanggap kebal terhadap virus IBD dan IB diukur dengan uji ELISA (*Enzyme Link Immunosorbant Assay*).

Titer HI adalah pengenceran serum tertinggi yang masih dapat mengadakan hambatan hemaglutinasi sel darah merah ayam secara sempurna. Titer antibodi rata-rata dinyatakan dalam GMT (*Geometric Mean Titer*) menurut Villegas et al. (1980).

Titer pada uji ELISA merupakan nilai absorpsi yang diperoleh dengan menggunakan ELISA reader.

Standar pengujian vaksin dilakukan menurut Petunjuk Teknis Pengujian Mutu Obat Hewan, Balai Pengujian Mutu Dan Sertifikasi Obat Hewan (BPMSOH) (1989), Farmakope Obat Hewan Indonesia (Biologik), Direktorat Jenderal Peternakan (1995), *British Pharmacope (Veterinary)*, London (1985), dan Palya, 1991 (*Food and Agricultural Organisation of the United Nation, Rome*).

4.3. Bahan Penelitian

4.3.1. Virus

Virus EDS'76 diperoleh dari BPMSOH, Gunung Sindur, Bogor 16340. Virus dilintaskan pada TBB umur 10 hari sebagai Master Seed Virus (MSV) pada lintasan pertama dan sebagai Working Seed Virus (WSV) pada lintasan kedua. MSV dan WSV disimpan dalam ben-

tuk kering beku dengan menambahkan 10 % *skim milk*. Virus ND, virus IBD dan virus IB diperoleh dari Bidang Produksi Vaksin dan Bidang Pengujian Mutu Vaksin Pusat Veterinaria Farma, Surabaya siap pakai. Virus yang digunakan untuk produksi mempunyai titer awal minimal 10^7 ELD50 atau 10^7 TCID50.

4.3.2. Serum Standar

Serum standar EDS'76, ND, IBD, dan IB diperoleh dari BPMSOH, Gunung Sindur, Bogor 16340.

4.3.3. Telur

TBB diperoleh dari peternakan rakyat di Mojosari.

TAB diperoleh dari Peternakan rakyat di Mojosari.

4.3.4. Hewan Percobaan

Ayam percobaan adalah jenis Lohmann Brown (Jerman Barat), berasal dari Peternakan Multi Breeder, Pasuruan, berumur 15 minggu dan belum divaksinasi dengan vaksin EDS'76, tetapi sudah divaksinasi dengan vaksin ND, IBD dan IB. Ayam sebelum digunakan diperiksa titer antibodinya terhadap virus EDS'76, ND, IBD dan IB. Khusus untuk titer antibodi EDS'76 harus 0. Ayam-ayam yang mengandung titer antibodi terhadap EDS'76 diafkir.

4.3.5. Media Dan Bahan Kimia

Media dan bahan kimia yang digunakan antara lain : media

Eagle (PUSVETMA), serum sapi (PUSVETMA), emulgator Montanide Isa 70 (SEPPIC), formalin (E. Merck), *Beta Propiolactone* (Ferrax), *Bromo Ethyleneamine Hydrobromide* (BDH), darah merah ayam (PUSVETMA), tripsin (PUSVETMA), PBS- (PUSVETMA), NaCl fisiologis (E. Merck), Polyethylene Glycol 6000 (E. Merck).

4.4. Alat

4.4.1. Alat Penelitian

Peralatan laboratorium untuk penelitian antara lain : botol *Roux*, cawan petri, tabung reaksi, *micro plate*, *disposibel spuite*, pipet, botol labu, erlenmeyer, emulsifier, sentrifus dingin, inkubator (37°C), ruang dingin ($4 - 8^{\circ}\text{C}$), *inverted microscope*, *magnetic stirer*, *magnetic bar*, *filter holder*.

4.4.2. Kandang Hewan Percobaan

Kandang ayam dibuat dengan sistem baterai, berukuran masing-masing 40 X 36 X 57 cm untuk satu ekor ayam.

4.5. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Pusat Veterinaria Farma, Surabaya.

4.6. Prosedur Penelitian

4.6.1. Pembuatan Vaksin EDS'76

4.6.1.1. Konsentrasi Virus EDS'76

Konsentrasi virus ini dimaksudkan untuk memisahkan virus dari cairan alantois atau media TC. Suspensi virus yang sudah diketahui titernya ditambah dengan *Poly Ethylene Glycol* (PEG) - 6000 8% dan NACL 0.85 % kemudian diputar dengan *magnetic stirer* pada suhu ruang 4⁰C selama satu hari. Hari berikutnya suspensi virus diputar dengan sentrifus dingin (6⁰C) selama 3 jam dengan kecepatan 6000 rpm. Pelet/endapan yang terjadi dipisahkan dengan menuang supernatannya kedalam tempat lain, kemudian endapan diencerkan dengan memperhitungkan titer virus yang akan digunakan yaitu 3.75×10^7 . Untuk menguji apakah virus betul-betul sudah mengendap, dilakukan uji aglutinasi dengan sel darah merah ayam 5% pada supernatan yang sudah dipisahkan dan hasilnya harus tidak terjadi aglutinasi.

4.6.1.2. Pembuatan Biakan Sel Duct Embryo Fibroblast (DEF)

Prosedur yang digunakan berdasar metode FAO, *Animal Production and Animal Health Paper* (Palya, V, 1991) sebagai berikut :

1. Teropong sejumlah TAB atau TBB umur 10 - 11 hari untuk melihat embrio yang hidup.
2. Bersihkan kulit telur dengan desinfektan.
3. Secara steril potong ujung kulit telur melingkar di bawah rongga udara dengan gunting hingga terbuka.
4. Pindahkan embrio pada cawan petri, kemudian buang kepala, sayap, kaki, dan bagian organ dalam.
5. Cuci potongan embrio dengan PBS sekurang kurangnya tiga

kali untuk menghilangkan darahnya

6. Pindahkan embrio dalam beker dan potong-potong dengan gunting.
7. Potong-potong kembali embrio hingga hancur.
8. Tambahkan 0,25% trypsine-versene + 10 ml per embrio dan pindahkan pada botol labu yang sudah dilengkapi potongan magnet.
9. Putar selama lima menit diatas pemutar magnet.
10. Saring dengan saringan teh yang dilapisi kain kasa rangkap tiga.
11. Tambahkan serum sapi dingin sama banyak dan putar dengan sentrifuge dingin selama 10 menit dengan kecepatan 2000 rpm.
12. Buang supernatan dan tambahkan serum sapi dingin sampai isinya mencapai volume semula.
13. Homogenkan dengan pipet dan putar kembali selama 10 menit dengan kecepatan 2000 rpm.
14. Buang bagian atas supernatan, tambahkan lima ml media eagle yang mengandung serum sapi 10%, homogenkan dan hitung jumlah sel dengan menggunakan hemositometer.
15. Bagikan sel kedalam botol Roux, petri, disposabel plate tergantung penggunaannya dengan jumlah $3 - 5 \times 10^5$ per ml per cm luas permukaan.
16. Inkubasikan pada inkubator selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C .
17. Keesokan harinya dilihat pertumbuhan selnya. Apabila pertumbuhan sel sudah penuh, sel siap ditanami virus.

4.6.1.3. Propagasi Virus EDS'76 Pada TBB

1. WSV dilarutkan dengan empat ml Na Cl fisiologis 0,85% kemudian disuntikkan kedalam ruang *chorio alantois* TBB umur 10 hari dengan dosis 0,1 ml tiap telur secara *lege-artis*.
2. TBB diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama lima hari. TBB yang mati selama observasi diafikir.

4.6.1.4. Panen Virus

1. Telur dicuci dengan desinfektan dan dipotong melingkar dibawah rongga udara sehingga terbuka.
2. Cairan alantois dikumpulkan dan ditambahkan Kanamycin sulfat 200 ug/ ml.
3. Kandungan virus dalam cairan alantois setelah ditetrasi minimal harus mengandung virus 10⁷ ELD50 /ml.

4.6.1.5. Propagasi Virus Pada Biakan Sel DEF

1. WSV dilarutkan dengan empat ml NaCl fisiologis 0, 85%.
2. Buang media biakan sel DEF, dan cuci dengan PBS- dua kali.
3. Inokulasikan empat ml suspensi virus tiap botol Roux pada pada biakan sel.
4. Inkubasikan pada 37⁰C selama satu jam, kemudian tambahkan 100 ml media tanam setiap botol Roux.
5. Inkubasikan kembali pada suhu 37⁰C selama lima hari.

4.6.1.6. Panen Virus

1. Lepaskan biakan sel yang masih melekat pada botol Roux dengan menyemprotkan suspensi virus ke dasar botol.
2. Tuang suspensi virus pada labu dan masukkan dalam *ultra low freezer*, kemudian lakukan *thawing* paling sedikit tiga kali untuk mengeluarkan virus yang masih berada dalam sel.
3. Putar suspensi virus dalam sentrifuge dingin selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm.
4. Tuang supernatannya dalam labu dan endapan dibuang.
5. Setelah ditetrasi, kandungan virus paling sedikit harus 10^7 TCID₅₀.

4.6.1.7. Inaktivasi Virus EDS⁷⁶, ND, IBD Dan IB

1. Virus EDS⁷⁶ diinaktifkan dengan *Bromo Ethylenamine Hydrobromide* 0,4 % selama 24 jam pada temperatur 37⁰C sedangkan Virus ND, IBD, dan IB diinaktifkan dengan *Beta Propiolactone* 0,3 - 0,4 % selama dua hari pada temperatur 2⁰C - 8⁰C. Selama inkubasi masing-masing virus diputar dengan menggunakan magnet pemutar.
2. Dilakukan uji inaktifasi dengan menggunakan TBB/TAB dan atau biakan sel TBB/TAB.

4.6.1.8. Uji Inaktifasi Pada Virus EDS⁷⁶ (British Pharmacopoeia - Veterinary, 1985)

1. Inokulasikan suspensi virus yang sudah diinaktif pada 10



butir TBB umur 10 hari dengan dosis 0,2 ml per telur ke dalam ruang *chorio alantois*.

2. Inkubasikan pada suhu 37⁰C selama tujuh hari.
3. Kumpulkan cairan alantoisnya dalam satu wadah.
4. Inokulasikan kembali pada 10 TBB umur 10 hari ke dalam ruang alantois dengan dosis 0.2 ml.
5. Inkubasikan pada suhu 37⁰C selama tujuh hari.
6. Periksa cairan alantois tiap telur dengan uji HA.
7. Semua telur harus menunjukkan uji HA negatif (tidak menunjukkan adanya hemaglutinasi).

4.6.1.9. Uji Inaktifasi Virus ND, IBD, IB (Palya, 1991)

1. Inokulasikan suspensi virus yang telah diinaktifasi (ND, IBD, IB) pada 10 butir TAB umur 9-10 hari untuk tiap jenis virus pada ruang *chorio alantois* dengan dosis 0,1 ml.
2. Inkubasikan pada suhu 37⁰C selama tujuh hari.
3. Kumpulkan cairan alantois menurut jenis virusnya dan pasasakan kembali pada 10 butir TAB umur 9-10 hari untuk tiap jenis virus dengan dosis 0,2 ml.
4. Inkubasikan pada suhu 37⁰C selama tujuh hari.
5. Untuk vaksin ND, periksa cairan alantois setiap telur dengan prosedur HA cepat. Suspensi virus dinyatakan inaktif apabila semua cairan alantois tidak terjadi hemaglutinasi
6. Untuk virus IBD, periksa perubahan patologis pada em-

brilio. Virus dinyatakan inaktif apabila tidak terjadi perubahan patologis pada embrio berupa bercak-bercak merah merah pada badan embrio. Di samping itu, tanamkan cairan alantois pada biakan sel fibroblas ayam. Tidak boleh terjadi adanya *Cito Pathogenic Effect* (CPE).

7. Untuk virus IB, periksa terhadap perubahan morfologi embrio ayam. Tidak boleh terlihat adanya kekerdilan dan gejala spesifik lainnya. Di samping itu inokulasikan cairan alantois pada biakan sel TBB. Tidak boleh terlihat adanya CPE.

4.6.1.10. Formulasi Vaksin EDS'76 Tunggal

Putar emulgator Montanide ISA 70 dalam emulsifier dan tambahkan sedikit demi sedikit suspensi virus EDS'76 dari bahan cairan alantois atau bahan media biakan virus pada biakan sel dengan perbandingan tiga bagian suspensi virus dan tujuh bagian emulgator.

4.6.1.11. Formulasi Vaksin EDS'76 Ganda

Putar emulgator Montanide ISA 70 dalam *emulsifier* dan tambahkan sedikit demi sedikit campuran suspensi virus EDS'76, ND, IBD, IB dengan perbandingan tiga bagian dari campuran virus dan tujuh bagian emulgator. Formulasi berlaku untuk virus dengan menggunakan bahan propagasi cairan alantois maupun bahan media biakan virus pada biakan jaringan.

4.7. Pengujian Vaksin

4.7.1. Uji Sterilitas

Vaksin ditanam pada media *Serum Dextrose Agar* (SDA), *SabourouX Agar* (SBA) dan *Thyoglycolate Agar* (TA) sebanyak 0,5 ml dan diratakan pada permukaanya. Media diinkubasikan selama satu minggu pada temperatur 37⁰C untuk SDA, dan dua minggu untuk SBA, dan TA pada temperatur kamar. Hasil uji dinyatakan baik apabila tidak ada pertumbuhan mikro organisme.

4.6.2. Uji Keamanan

4.6.2.1. Uji Keamanan Vaksin EDS'76 Tunggal

Sepuluh ekor ayam umur 14 - 28 hari disuntik dengan vaksin EDS'76 tunggal dua kali dosis vaksinasi intramuskuler. Pengamatan dilakukan selama 14 hari. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila selama pengamatan ayam-ayam tersebut tidak memperlihatkan gejala penyakit dan tidak terjadi reaksi abnormal di sekitar tempat suntikan.

4.6.2.2. Uji keamanan Vaksin EDS'76 Ganda

Sepuluh ekor ayam umur 28 - 35 hari dan 10 ekor ayam umur 21 hari disuntik dengan vaksin EDS'76 polivalen sebanyak satu dosis per ekor secara intramuskuler. Pengamatan dilakukan selama 14 hari. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila ayam-ayam yang divaksin tidak menunjukkan gejala abnormal terhadap penyakit EDS'76, ND, IBD dan IB.

4.6.2.3. Uji Tanggap Kebal

4.6.2.3.1. Uji tanggap Kebal Vaksin EDS'76 Tunggal

Uji ini menggunakan ayam ras petelur umur 16 minggu. Lima ekor ayam disuntik dengan vaksin EDS'76 tunggal secara sub kutan, lima ekor secara intra muskuler, lima ekor disuntik dengan adjuvan sebagai kontrol dan lima ekor lainnya disuntik dengan vaksin komersial sebagai pembanding. Pengamatan dilakukan selama 28 hari. Serum ayam baik yang divaksinasi, kontrol dan pembanding diambil dan diperiksa dengan Uji HI. Vaksin dinyatakan baik apabila titer HI dari ayam yang divaksin tidak kurang dari 1 : 128, sedang serum dari ayam kontrol tidak boleh lebih atau sama dengan 1 : 4. Di samping itu, kualitas telur yang diproduksi dari ayam perlakuan, kontrol dan pembanding secara fisik tidak boleh menunjukkan gejala abnormal.

4.6.2.3.2. Uji Tanggap Kebal Vaksin EDS'76 Ganda

Uji ini menggunakan ayam ras petelur umur 16 minggu. Lima ekor ayam disuntik dengan vaksin EDS'76 ganda sub kutan, lima ekor intra muskuler, lima ekor diberi suntikan adjuvan sebagai kontrol dan lima ekor lainnya disuntik dengan vaksin komersial sebagai pembanding. Pengamatan dilakukan selama 28 hari. Serum ayam baik yang divaksin, ayam kontrol dan pembanding diambil serumnya.

Tanggap kebal untuk EDS'76 dilakukan seperti pada indeks 4.6.2.3.1.

Tanggap kebal untuk ND dilakukan dengan mengukur titer HI. Vaksin dinyatakan baik apabila diperoleh titer kurang dari 1 : 64.

Tanggap kebal untuk IBD dan IB dilakukan dengan uji ELISA. Vaksin dianggap baik apabila mempunyai nilai absorpsi lebih besar dari serum kontrol negatif.

Di samping itu, kualitas telur yang dihasilkan dari ayam perlakuan, kontrol dan pembanding tidak boleh menunjukkan gejala abnormal secara fisik.

4.7. Analisis Data

Data titer antibodi sebelum dianalisa, ditransformasikan lebih dahulu kedalam akar ($\sqrt{Y + 0,5}$) menurut Steel dan Torie (1991). Hasil transformasi kemudian dianalisa dengan *Analysis Of Variance* (ANOVA). Apabila ada perbedaan yang bermakna dari beberapa faktor, dilanjutkan dengan uji t. Hasil Uji statistika bermakna, bila diperoleh harga $P \leq 0.05$ (Sarmanu, 1992).