

VACCINES.

KIK
TKD 24/00
yrt
S

T B S I S

STUDI BANDING PENGARUH ADJUVAN PARAFIN - LANOLIN
DAN MONTANIDE ISA 206 DALAM VAKSIN SEPTICAEMIA
EPIZOOTICA TERHADAP RESPON IMUN PADA KELINCI

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Oleh :

I R T I S A M
NIM. 099612232 M

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1999

**STUDI BANDING PENGARUH ADJUVAN PARAFIN - LANOLIN
DAN MONTANIDE ISA 206 DALAM VAKSIN SEPTICAEMIA
EPIZOOTICA TERHADAP RESPON IMUN PADA KELINCI**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK

TESIS

**untuk memperoleh Gelar Magister dalam
Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar pada
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**I R T I S A M
NIM. 099612232 M**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1999**

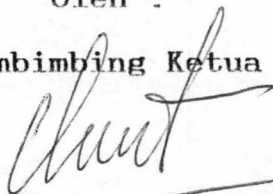
Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL : 12 Mei 1999

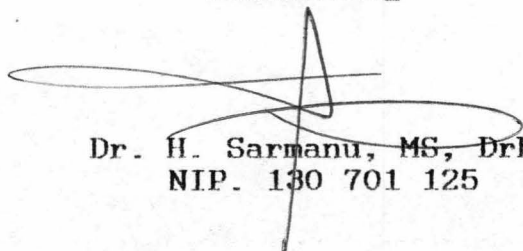
Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. IGB Amitaba, Drh
NIP. 130 078 266

Pembimbing



Dr. H. Sarmanu, MS, Drh.
NIP. 130 701 125

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Dr. Soejipto, MS, PhD.
NIP. 130 687 606

Telah diuji pada

Tanggal 12 Mei 1999

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Atasiati Idajadi, dr, SpMk.
Anggota : 1. Prof. IGB Amitaba, Drh.
2. Syamsul Bahri Siregar, MSc, Drh.
3. Dr. H. Sarmanu, MS, Drh.
4. Garry Cories De Vries, MS, MSc, Drh.

KATA PENGANTAR

"Bacalah dengan nama Tuhanmu yang telah menciptakan". Demikianlah bunyi ayat Kitab Suci Alquran yang pertama kali diturunkan kepada nabi Muhammad s.a.w. Ayat Tersebut mengandung makna perintah/suruhan untuk membaca ayat-ayat Allah. Ada 2 macam ayat Allah yaitu ayat-ayat yang terucap yang dikenal dengan ayat kauliyah dan ayat-ayat yang tercipta yang disebut ayat kauniyah.

Ciptaan Allah dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok. Kelompok pertama adalah ciptaan Allah yang tidak dapat ditangkap oleh indera manusia seperti ruh, malaikat, iblis dan sebagainya yang disebut dengan dunia non empiris atau alam ghoib. Oleh karena itu untuk dapat memahaminya manusia diberi tuntunan oleh Allah melalui jalan khusus yaitu Wahyu yang disampaikan melalui seorang utusan yang disebut rasul.

Kelompok kedua adalah ciptaan Allah yang dapat ditangkap oleh panca indera manusia baik secara langsung ataupun secara tidak langsung dengan memakai peralatan yang dikenal sebagai dunia empiris atau alam syahadah. Contohnya adalah manusia, binatang, tumbuh-tumbuhan, bakteri, virus, tanah, air, udara dan sebagainya.

Setiap makhluk Allah mempunyai ciri-ciri atau sifat-sifat. Ciri-ciri yang melekat pada setiap makhluk disebut sebagai sunnatullah, ketetapan Allah atau sering disebut dengan hukum alam. Misalnya bakteri Pasteurella yang masuk kedalam tubuh hewan akan menyebabkan respon imun pada hewan tersebut. Apabila tubuh hewan tersebut tidak mampu mengatasi maka hewan tersebut akan menjadi sakit.

Kerlinger mengungkapkan bahwa penelitian adalah kegiatan yang secara teratur dan terkendalikan serta secara empiris dan kritis, menyelidiki suatu pernyataan hipotesis mengenai hubungan yang terjalin antar fenomena alam.

Jadi penelitian merupakan suatu upaya memahami Sunnatullah sebagai wujud membaca ayat-ayat Allah.

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah S.W.T. atas rahmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul **STUDI BANDING PENGARUH ADJUVAN PARAFIN-LANOLIN DAN MONTANIDE ISA 206 DALAM VAKSIN SEPTICAEMIA EPIZOOTICA TERHADAP RESPON IMUN PADA KELINCI**"

Penulis mengucapkan terima kasih kepada

1. Prof. IGB Amitaba, Drh. sebagai dosen pembimbing utama yang telah membimbing penulis dan senantiasa menyediakan waktu untuk memberikan informasi dan arahan yang sangat berharga sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian ini.
2. Dr. H. Sarmanu, MS, Drh. sebagai dosen pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan terutama dalam masalah metodologi dan statistik penelitian.
3. Prof. Dr. Koentjoro Soehadi, dr. (almarhum) sebagai Ketua Minat Studi Biologi Kedokteran atas segala dorongan dan petunjuk selama penulis mengikuti pendidikan dan selama proses penyelesaian tesis ini.
4. Drh. Sjamsul Bahri Siregar, MSc., Drh. Budi Tri Akoso MSc, PhD. dan Dr. Th. Adat Peranginangin MS.Drh., masing-masing sebagai Kepala Pusat Veterinaria Farma dan mantan Kepala Pusat Veterinaria Farma Surabaya atas pemberian fasilitas dan

dukungan kepada penulis selama pendidikan Program pasca Sarjana.

5. Drh. Darmawan MSi, Kepala Bidang Produksi Aneka Vaksin dan Antiserum Pusat Veterinaria Farma beserta staf terutama Drh. Hardiati yang telah membantu dalam penyediaan media dan kuman *Pasteurella multocida*.
6. Drh. Enuh Raharjo Jusa, MSc. PhD. Kepala Bidang Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produksi Pusat Veterinaria Farma beserta seluruh staf, karyawan dan karyawan Bidang Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produksi terutama Dra. Dyah Estikoma yang telah membantu mulai dari awal sampai selesainya penelitian ini.
7. Seluruh staf, karyawan dan karyawan Bidang Pengujian Mutu Produksi yang telah membantu dalam pelaksanaan ujiantang.
8. Kepada semua pihak yang tidak mungkin penulis sebut satu persatu yang telah memberikan bantuan dan dorongan serta saran-sara terhadap terlaksana dan selesainya penelitian.

Penulis sadar bahwa tulisan ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu kritik dan saran dari semua pihak masih tetap penulis harapkan.

Akhirnya penulis berharap semoga tulisan ini berguna dalam dunia ilmu pengetahuan maupun aplikasinya di masyarakat.

Surabaya, Mei 1999

Penulis

RINGKASAN

Vaksinasi adalah cara yang terbaik untuk mengatasi penyakit SE. Dalam praktek tipe vaksin SE yang banyak di pergunakan adalah vaksin SE adjuvan parafin-lanolin karena dinilai paling baik. Tetapi vaksin ini terlalu kental sehingga menimbulkan masalah berupa kebengkakan ditempat suntikan dan kesulitan pada waktu penyuntikan. Oleh karena itu perlu dicari adjuvan yang dapat membuat vaksin lebih encer dan mempunyai respon imun juga baik atau bahkan lebih baik.

Dewasa ini telah ditemukan adjuvan montanide ISA 206 yang dapat menghasilkan vaksin yang lebih encer dan menimbulkan respon imun yang baik.

Penelitian telah dilakukan oleh penulis untuk membandingkan pengaruh adjuvan parafin-lanolin dengan adjuvan montanide ISA 206 dalam vaksin SE terhadap respon imun pada kelinci. Untuk itu dibuat dua formula vaksin SE dari sumber suspensi kuman *P. multocida* yang sama. Formula I dengan adjuvan parafin-lanolin dan formula II dengan adjuvan montanide ISA 206.

Kelinci dibagi dalam 3 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor. Kelompok I disuntik dengan vaksin SE adjuvan parafin-lanolin (P1). Kelompok II disuntik dengan vaksin SE montanide ISA 206 (P2) dan kelompok III sebagai kontrol (P3).

Titer antibodi diperiksa dengan ELISA pada minggu I,II,III dan IV. Daya proteksi diperiksa dengan uji perlindungan pasif pada minggu IV dan ukuran pusat germinal kelenjar limfe dan limpa diamati pada minggu IV pula.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ada peningkatan ukuran pusat germinal kelenjar limfe dan limpa yang nyata pada penyuntikan vaksin SE parafin-lanolin maupun pada penyuntikan vaksin SE Montanide ISA 206. Tetapi tidak ada perbedaan pengaruh yang nyata diantara kedua jenis adjuvan tersebut.

Titer antibodi pada minggu I belum menunjukkan kenaikan. Tetapi mulai pada minggu II sampai minggu IV terdapat kenaikan titer antibodi yang nyata pada P1 maupun P2. Demikian juga ada perbedaan kenaikan titer antibodi yang nyata antara P1 dan P2 dimana P2 lebih tinggi dari pada P1.

Uji perlindungan pasif menunjukkan bahwa P1 (95%) dan P2 (100%) lebih tinggi secara nyata dari P3 (0%), sedangkan P1 dan P2 tidak berbeda nyata.

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa pada vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 mempunyai pengaruh respon imun yang lebih baik dari pada adjuvan parafin-lanolin.

ABSTRACT

An experiment had been carried out to compare the effect of immun respon of parafin-lanolin and Montanide ISA 206 in HS vaccine in Rabbit. For this experiment it had been prepared two kind of HS vaccine using the same resourses of P. Multocida Suspension. First formula, used parafin lanolin as adjuvan and the second formula used montanide ISA 206 as adjuvan.

Rabbits were divided in to three group and each group contain 10 heads of Rabbits. First group of each Rabbit was injected parafin lanolin HS vaccine (P1). Second group was injected montanide ISA 206 HS vaccine (P2). And the third group as a control (P3).

Antibody titer was measured by ELISA technique every week up to forth week. The protection was examined by Passive mouse Protection Test (PMPT) at the forth week. And germinal centre size of lymph node and spleen also examined at forth week.

The result indicate that there are significant increasing of germinal centre of lymph node and spleen in both parafin lanolin HS vaccine and montanide ISA 206 HS vaccine injection. But there was no significant deferences effect between the two adjuvant.

There was no an increase of antibody titer at one week post vaccination. But at two until four week post vaccination, there were an significant increase of antibody titer in both P1 and P2. Antibody titer in P2 was significantly higher than in P1.

Passive Mouse Protection Test (PMPT) indicate that P1 (95%) and P2 (100%) was significantly higher than P3 (0%). P1 and P2 was not significantly defferent.

The conclution of this experiment is in the HS vaccine, montanide ISA 206 adjuvant induce better immun respon than parafin-lanolin adjuvant.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR LAMPIRAN	iv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Hasil Penelitian	6
BAB II. TINJAUAN KEPUSTAKAAN	7
2.1. <i>Pasteurella multocida</i>	7
2.2. Struktur antigen	8
2.3. Imunogen	9
2.4. Respon imun	12
2.5. Respon limfosit B terhadap antigen	16
2.6. Adjuvan	17
2.7. Adjuvan minyak	19
2.8. Vaksin SE	20
2.9. Pengukuran antibodi dengan ELISA	21
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	24
3.1.1. Kerangka Konseptual.	24
3.1.2. Alur Penelitian	25
3.2. Hipotesis Penelitian	25
BAB IV. METODE PENELITIAN	26
4.1. Rancangan Penelitian	26
4.2. Identifikasi variabel dan definisi operasional	26
4.3. Tempat dan Waktu	27
4.4. Bahan	27
4.5. Alat	28
4.6. Cara Kerja	29
4.7. Analisis Data	33

BAB V. HASIL PENELITIAN	34
BAB VI. PEMBAHASAN	39
BAB VII. SIMPULAN DAN SARAN	45
7.1. Simpulan	45
7.2. S a r a n	45
DAFTAR PUSTAKA	46

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Diameter pusat germinal kelenjar limfe kelinci kontrol, kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dan kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206. 35
Tabel 2. Diameter pusat germinal kelenjar limpa kelinci kontrol, kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dan kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206. 36
Tabel 3. Titer antibodi kelinci kontrol, kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dan kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 dari minggu I sampai dengan minggu IV. 37
Tabel 4. Hasil uji perlindungan pasif pada mencit dari kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin, kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 dan kelinci kontrol 38

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. DATA PENGAMATAN DIAMETER PUSAT GERMINAL KELENJAR LIMFE DAN LIMPA	50
Lampiran 2. DATA PEMERIKSAAN ANTIBODI DENGAN ELISA	51
Lampiran 3. ANALISIS STATISTIK	52
Lampiran 4. GAMBAR PUSAT GERMINAL KELENJAR LIMFE DAN LIMPA	79

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG MASALAH

Septicaemia Epizootica (SE) atau *Haemorrhagic Septicaemia* (HS) adalah penyakit bakterial yang bersifat per akut pada sapi, kerbau, babi dan kadang-kadang pada domba, kambing dan kuda serta ruminansia lain. Agen penyebabnya adalah serotipe tertentu dari *Pasteurella multocida* yaitu bakteri gram negatif yang berbentuk kokobasili yang motil (Bain, 1982).

Terminologi HS pertama kali digunakan oleh Hueppe pada (1886) sebagai nama kolektif untuk kholera unggas, *Septicaemia* kelinci, *Pasteurellosis* pada sapi dan *Swine plaque* dimana pada hewan-hewan yang terinfeksi tersebut dari darahnya dapat diisolasi *Pasteurella multocida*. Sejak 1903 HS digunakan sebagai nama umum dari semua tipe penyakit yang disebabkan oleh *Bacillus bovisseptica* (*P. multocida*) atau yang sejenis (Heddleston et al., 1967). Tetapi di Indonesia lebih dikenal dengan nama SE.

SE telah tersebar secara luas dan ditemukan di Asia, Timur Tengah, sebagian besar Afrika dan Eropa bagian selatan serta Amerika Serikat (Bain et al., 1982). Kejadian SE di Asia Tenggara sangat menonjol dan merupakan yang mempunyai pengaruh ekonomi yang sangat besar. SE tidak ditemukan di Australia, Oceania dan Jepang.

Kondisi stress merupakan penunjang kejadian SE. Di daerah tropis wabah SE sering terjadi pada permulaan musim hujan yaitu kondisi hewan kerja sangat jelek karena beban kerja meningkat.



Kerbau di daerah basah dan sekitar aliran air mempunyai resiko yang tinggi terhadap SE, sedangkan sapi yang digembalakan pada daerah yang lebih kering kurang berisiko terserang SE (De Alwis, 1992).

SE dapat menyebabkan penurunan berat badan, kehilangan tenaga kerja dan kematian pada hewan. Angka kematian tinggi, terutama pada penderita yang telah menunjukkan gejala klinis. Survey di Sri Lanka menunjukkan bahwa angka kematian penyakit SE antara 20 - 98%, Oleh karena itu penyakit SE dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar (Bain et al., 1982). Menurut laporan FAO tahun 1991 kerugian akibat SE di Indonesia mencapai 4.000.000 - 6.000.000 dolar AS, Laos 1.400.000 dolar AS dan Malaysia kira-kira 1.000.000 dolar AS setiap tahun (De Alwis, 1992).

SE disebabkan oleh *Pasteurella multocida* tipe 6B. Tetapi di Afrika SE disebabkan oleh *Pateurella multocida* tipe 6E. Kedua tipe ini menunjukkan sifat-sifat yang sama (Bain et al., 1982)

Sifat SE yang per akut menyebabkan pengobatan yang memberikan hasil yang baik sukar diperoleh. Oleh karena itu pencegahan dengan cara vaksinasi adalah cara yang terbaik untuk ditempuh (Subronto, 1985).

Ada berbagai tipe vaksin yang digunakan untuk pengebalan ternak terhadap penyakit SE.

Tipe vaksin tersebut yaitu sebagai berikut :

- a. Vaksin *broth bacterin* (BB) yaitu vaksin yang dipupuk pada media cair. Kemudian diinaktif dengan penambahan formalin. Kekebalan yang ditimbulkan hanya selama 4 - 6 minggu.

b. Vaksin alum presipitat

Pada vaksin tipe ini, suspensi kuman yang telah diinaktif dengan formalin, kemudian ditambah dengan aluminium kalium sulfat (alum). Kekebalan yang ditimbulkan selama 4 - 5 bulan.

c. Vaksin aluminium hidroksi gel

Suspensi kuman yang telah diinaktif ditambah dengan aluminium hidroksi gel sebagai adjuvan. Kekebalan yang ditimbulkan selama 5 bulan.

d. Vaksin adjuvan minyak atau *Oil Adjuvant Vaccine* (OAV)

Vaksin dibuat dari suspensi kuman inaktif, kemudian ditambah adjuvan minyak misalnya parafin-lanolin. Kekebalan yang ditimbulkan selama 12 bulan.

e. Vaksin aktif

Vaksin dibuat dari kuman yang hidup seperti yang telah dibuat oleh Myint, Carter dan Jone (1987) dari *Pasteurella multocida* serotipe B yang diisolasi dari *Follow deer*. Demikian juga Alwis dan Carter (1980) telah membuat vaksin SE aktif dari *Pasteurella multocida streptomycine dependent*.

Dari bermacam-macam tipe vaksin tersebut di atas masing-masing mempunyai kelebihan dan kekurangan. Dalam praktek yang banyak digunakan adalah OAV dengan parafin-lanolin sebagai adjuvan karena dinilai paling baik.

Semua adjuvan dapat menstimulasi makrofage sehingga ada peningkatan produksi interleukin 1 oleh makrofage (Roitt, 1988; Kuby, 1992). Interleukin 1 akan menggiatkan sel T pembantu untuk mengeluarkan limfokin. Peningkatan pengeluaran limfokin akan

meningkatkan diferensiasi sel B menjadi sel memori dan sel plasma penghasil antibodi. Jadi dengan penambahan adjuvan pada vaksin akan meningkatkan diferensiasi sel B sehingga produksi antibodi meningkat. Proses ini merupakan *Antigen dependent defferensiation* yang terjadi didalam jaringan limfoid perifer (Lodish et al., 1995). Limpa adalah jaringan limfoid yang paling produktif sebagai penghasil antibodi (Tizard, 1982). Proses diferensiasi sel B terjadi pada pulpa putih dimana folikel primer yang merupakan kumpulan dari sel B, dengan adanya rangsangan antigen berproliferasi secara cepat menjadi sel memori dan sel plasma sehingga terbentuk folikel sekunder yang berisi pusat germinal (Kuby, 1992).

Pada penyakit SE, kekebalan terjadi dengan berperantaraan antibodi (Bain, 1982). Dengan demikian kandungan antibodi dalam tubuh hewan sangat menentukan daya proteksi.

Penggunaan OAV yang diaplikasi setiap tahun telah dapat menurunkan kematian ternak yang disebabkan oleh SE. Indonesia telah berhasil menekan kasus SE menjadi nol dipulau Lombok. Tetapi di daerah yang endemik wabah SE masih sering terjadi (DE Alwis, 1992).

Setiyawan et al., (1983) mengatakan bahwa banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan vaksinasi antara lain adalah :

- a. Mutu vaksin
- b. Ketrampilan pelaksanaan vaksinasi di lapangan.
- c. Daya tahan tubuh ternak karena pengaruh kurang makan, banyak dipekerjakan, perubahan iklim, stres dan sebagainya.

Penggunaan parafin-lanolin sebagai adjuvan vaksin SE selalu menimbulkan masalah berupa kebengkakan ditempat suntikan dan terdapat kesulitan pada waktu penyuntikan (terlalu berat). Hal ini disebabkan karena vaksin terlalu kental meskipun telah dicoba dengan bermacam-macam formula. Adjuvan klasik, Freund bersifat encer dan secara nyata dapat memperbesar respon imun, akan tetapi harganya sangat mahal. Oleh karena itu dalam praktek hanya dipergunakan terbatas di laboratorium.

Dewasa ini perusahaan farmasi SEPPIC di Perancis telah memproduksi adjuvan minyak *montanide* dengan bermacam-macam tipe. Menurut keterangan yang telah dipublikasi penggunaan *montanide* dapat menghasilkan vaksin yang encer dan menimbulkan respon imun yang bagus. Percobaan penggunaan *montanide* untuk imunisasi kelinci terhadap *E. coli* menghasilkan respon imun yang lebih baik bila dibandingkan adjuvan *Freund's incomplete*.

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas penulis ingin melakukan penelitian tentang penggunaan *montanide* dalam formulasi vaksin SE dan dibandingkan dengan adjuvan parafin-lanolin

1.2. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan permasalahan diatas maka dapat disusun rumusan masalah sebagai berikut.

- 1) Apakah ada perbedaan efek parafin-lanolin dengan *montanide* pada proliferasi sel B pada limpa dan kelenjar limfe.
- 2) Apakah ada perbedaan efek parafin-lanolin dengan *montanide* pada kandungan antibodi SE.

- 3) Apakah ada perbedaan efek parafin-lanolin dengan montanide pada daya proteksi terhadap SE.

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan respon imun antara adjuvan parafin-lanolin dan montanide pada vaksin SE.

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1) untuk mengetahui perbedaan pengaruh adjuvan parafin-lanolin dengan montanide pada proliferasi sel B.
- 2) untuk mengetahui perbedaan pengaruh adjuvan parafin-lanolin dengan montanide dalam vaksin SE pada kandungan antibodi.
- 3) untuk mengetahui perbedaan pengaruh adjuvan parafin-lanolin dengan montanide dalam vaksin SE tentang daya proteksinya.

1.4. MANFAAT HASIL PENELITIAN

- 1) untuk meningkatkan mutu vaksin SE dalam rangka penyediaan sarana pengamanan ternak.
- 2) untuk memberikan kemudahan dalam pelaksanaan vaksinasi di lapangan.
- 3) memberikan sumbangan informasi dalam perkembangan ilmu pengetahuan.

BAB II

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

2.1. *Pasteurella multocida*

Pasteurella multocida pertama kali ditemukan oleh Pasteur pada tahun 1880 dari unggas yang menderita kholera. Pada waktu itu belum diketahui secara pasti bahwa penyebabnya adalah *Pasteurella*. Kemudian pada tahun 1997, TREVISAN mengelompokkan kuman penyebab beberapa penyakit yang terdiri dari genus *Pasteurella*, sebagai penghormatan kepada Pasteur.

Pada tahun 1900 LIGNIERES mengusulkan nama kuman sesuai dengan nama hewan yang diinfeksi misalnya : *P. aviseptica* pada ayam, *P. bovisseptica* pada sapi, *P. suisseptica* pada babi dan *P. oviseptica* pada kambing dan domba.

Menurut Buxton & Fraser (1977) yang dikutip oleh Suhendra (1985) kuman *Pasteurella* diklasifikasikan sebagai berikut.

Divisio : *Schizomycophyta*
Class : *Schizomycetes*
Ordo : *Eubacteriales*
Famili : *Brucellaceae*
Genus : *Pasteurella*
Species : *Pasteurella multocida*

Pasteurella multocida tumbuh baik pada media agar darah dalam keadaan anaerob dengan suhu optimum 37°C. Pada media agar darah ada 3 macam bentuk koloni.

1. *Mucoid* : bentuk koloni ini mempunyai diameter 2 - 3 mm dan bentuk ini mempunyai virulensi yang tinggi pada hewan.

2. *Smooth* : bentuk koloni ini mempunyai diameter 1 mm dan mempunyai virulensi sedang pada hewan.
3. *Rough* : bentuk koloni ini mempunyai diameter lebih kecil dari 1 mm dan mempunyai virulensi yang rendah.

Pasteurella multocida berbentuk *coccobacillus*, bersifat gram negatif dan mempunyai kapsul tetapi tidak mempunyai spora dan tidak bergerak (non motil). Kuman ini mempunyai ciri khusus bipoler yaitu mempunyai dua kutub (Bain et al., 1982).

2.2. Struktur antigen

Pasteurella multocida mempunyai struktur antigen yang kompleks, memiliki lebih dari 20 macam antigen somatik maupun kapsuler (Subronto, 1985). Antigen kapsul ada 2 macam yaitu alpha dan beta dan antigen somatik disebut dengan gamma. Pembentukan antigen tersebut tergantung dari faktor lingkungan misalnya medium, suhu dan juga perbedaan genotip. Hal ini menyebabkan adanya perbedaan imunologi dari reaksi serologis (Bain, 1982).

Berdasarkan perbedaan-perbedaan ini dapat dilakukan klasifikasi tipe *Pasteurella multocida*. Little dan Lyon membedakan *Pasteurella multocida* menjadi 3 tipe berdasarkan uji *slide agglutination* dan *pasive protection test*. Kemudian Robert menggunakan uji perlindungan pasif pada mencit membagi *Pasteurella multocida* menjadi 7 atau 8 tipe, tetapi yang paling banyak adalah tipe I sampai IV. Pada tahun 1955 Carter melaporkan ada 4 tipe *P. multocida* yaitu A, B, C dan D berdasarkan perbedaan kapsuler *polysaccharida* dengan uji *indirect hemoglubination (IHA) test*. Tetapi kemudian oleh sesuatu sebab tipe C dicabut

dari pembagian dan menambahkan tipe E. Selanjutnya Namioka dan Murata pada tahun 1961 membedakan *P. multocida* menjadi 15 tipe berdasarkan antigen Somatik dan antigen Kapsul (Brogden and Pacher, 1979).

Sekarang telah disetujui bahwa serotipe kuman *P. multocida* ditentukan dengan mengkombinasikan tipe antigen kapsul (antigen K) dan antigen Somatik (antigen O), misalnya kuman penyebab SE di Asia dengan serotipe 6B, SE di Afrika Tengah dengan 6E, kolera unggas dengan 5A dan sebagainya.

2.3. Imunogen

Imunogen adalah zat yang mempunyai kemampuan untuk membangkitkan respon imun spesifik yaitu pembentukan antibodi, pengembangan imunitas seluler atau keduanya. Antigen adalah zat yang dapat bereaksi dengan produk-produk dari respon imun spesifik, misalnya antibodi atau limfosit T yang tersensitisasi spesifik.

Imunogen selalu bersifat antigenik, sebaliknya antigen tidak selalu imunogenik. Sebagai contoh suatu zat yang mempunyai berat molekul rendah yang disebut haptan tidak bersifat imunogenik tetapi bersifat antigenik (Belanti, 1985).

Sifat imunogenesitas suatu zat dipengaruhi oleh berbagai macam faktor (Belanti, 1985; Subowo, 1991).

a. Keasingan

Dalam kondisi normal sudah dapat membedakan antara diri dan asing. Secara alami akan terjadi respon imun terhadap bahan/zat yang tidak ada dalam tubuh. Dengan kata lain zat yang asing bagi tubuh biasanya bersifat imunogenik. Misalnya

albumin kelinci yang disuntikkan pada kelinci lain yang sama galurnya tidak menimbulkan respon imun tetapi apabila disuntikkan kepada hewan lain marmut misalnya, maka akan terjadi respon imun. Derajat imunogenitas tergantung dari derajat keasingannya (Kuby, 1992). Walaupun demikian tidak semua bahan asing dapat merangsang respon imun. Misalnya karbon dalam bentuk debu arang tidak akan merangsang pembentukan antibodi.

b. Ukuran molekul

Zat-zat dengan molekul rendah tidak bersifat imunogenik. Imunogen mempunyai berat molekul (BM) diatas 10.000. Menurut Kuby (1992) imunogen yang paling baik mempunyai BM mendekati 100.000. Bahan-bahan dengan BM dibawah 10.000 dapat bersifat imunogenik bila bergabung dengan protein pembawa (carrier) sehingga mempunyai ukuran yang sesuai yaitu mempunyai BM yang lebih besar dari 10.000. Bahan demikian disebut hapten.

Smith (1988) mengatakan bahwa polipeptida yang besar dan protein dengan BM lebih besar dari 5000 telah dapat menstimulir respon imun yang kuat, terutama bila dalam bentuk dimer atau polimer atau dicampur adjuvan.

c. Kompleksitas zat

Sebuah molekul harus memiliki derajat kerumitan tertentu dari strukturnya agar dapat bersifat imunogenik. Tetapi tidak mudah untuk menentukan batas yang jelas kerumitan struktur agar sesuatu zat bersifat imunogenik. Hal ini hanya dapat dinyatakan bahwa makin rumit atau kompleks struktur molekulnya

semakin imunogenik (Subowo, 1991). Beberapa partikel buatan atau adjuvan seperti aluminium hidroksid dapat memperbesar imunogensitas (Belanti, 1985).

d. Dosis antigen

Apabila dosis minimal suatu antigen telah dilampaui maka makin tinggi dosisnya akan meningkatkan respon imun secara sebanding tetapi pada dosis tertentu sebaliknya akan terjadi penurunan respon imun bahkan dapat menghilangkan sama sekali yaitu suatu keadaan yang disebut torelansi imunologik (Subowo, 1991).

e. Metode pemasukan antigen

Cara pemasukan antigen ke dalam tubuh dapat langsung melalui kulit, pernafasan, saluran pencernaan, subkutan, intra peritoneal, intra venosa dan intra muskuler yang masing-masing menimbulkan respon imun yang berbeda intensitasnya.

Walaupun molekul-molekul besar merupakan imunogen tetapi hanya bagian-bagian tertentu dari molekul saja yang dapat berikatan dengan antibodi yang ditimbulkannya. Daerah-daerah tersebut juga sebagai penentu timbulnya respon imun dan dinamakan determinan antigen atau epitop (Subowo, 1991; Belanti, 1995; Tizard, 1987).

Pada protein determinan antigen itu terdiri dari sekitar 4 - 6 asam amino dan ditemukan pada tempat yang terbuka atau menonjol pada permukaan molekul. Pada umumnya jumlah epitop pada sebuah molekul adalah sekitar satu epitop untuk setiap 5000 dalton (Tizard, 1987).

Kebanyakan imunogen adalah protein baik sebagai protein murni atau berkombinasi dengan zat lain seperti lipid (lipo protein), asam nukleat (nukleo protein) atau karbohidrat (gliko protein). Lipo protein merupakan jenis khusus imunogen yang terdapat sebagai bagian dari membran sel (Belanti, 1985).

Polisakarida merupakan jenis imunogen lain. Dalam bentuk murni misalnya pada kapsul bakteri, atau dalam bentuk lipo polisakarida yang terdapat dalam dinding sel bakteri gram negatip (endotoksin). Lipo polisakarida bertanggung jawab pada patogenitas organisme gram negatip tertentu misalnya endotoksin kolera pada manusia (Belanti, 1985; Bain, 1982).

Pada jenis penyakit tertentu misalnya penyakit lupus eritematosus pada manusia, asam nukleat dapat bersifat imunogen. Namun demikian sangat sukar menginduksi respon imun terhadap asam nukleat murni kecuali dilakukan denaturasi lebih dulu (Subowo, 1991).

Pada penyakit SE, beberapa peneliti melaporkan bahwa molekul yang bersifat imunogenik adalah polisakarida kapsul (Nagy and Penn, 1976) dan endotoksin lipo polisakarida-protein kompleks (Ganfield et al., 1976; Penn & Nagy, 1976).

2.4. Respon imun

Hewan mempunyai kemampuan untuk mengenal suatu zat yang masuk kedalam tubuhnya sebagai asing terhadap dirinya. Selanjutnya tubuh akan mengadakan tindakan dalam bentuk netralisasi, melenyapkan atau memasukkan dalam proses metabolisme dengan akibat menguntungkan dirinya atau menimbulkan kerusakan

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

jaringan tubuh sendiri. Proses ini dinamakan respon imun.

Respon imun dapat dibedakan menjadi respon imun non spesifik dan respon imun spesifik. Respon imun non spesifik merupakan tanggapan pertama apabila tubuh menghadapi bahan asing. Tubuh menyediakan sejumlah substansi yang tidak spesifik misalnya komplemen dan interferon. Mekanisme ini disebut respon imun humoral. Disamping itu tubuh terdapat sel-sel yang mempunyai kemampuan fagositosis seperti makrofag dan netrofil. Kedua sistem tersebut bekerja saling membantu.

Respon imun spesifik juga dibedakan menjadi dua macam yaitu pertama respon imun humoral melalui pembentukan antibodi yang bersifat sangat spesifik. Kemudian yang kedua respon imun selluler yang melibatkan limfosit T. Respon Imun spesifik ini dijadikan dasar dalam meneliti kemungkinan pencegahan terhadap terjangkitnya penyakit infeksi dengan jalan vaksinasi melalui penggunaan bibit penyakit yang telah dilemahkan (Subowo, 1991).

Pada penyakit SE, vaksinasi akan menimbulkan respon imun humoral dan adanya antibodi dalam tubuh hewan mempunyai korelasi dengan imunitas. Tidak ada bukti yang kuat peranan imunitas berperantaraan sel pada penyakit SE (Brain, 1982). Kandungan antibodi dalam tubuh sapi yang dideteksi dengan *passive mouse protection test* (PMPT) menunjukkan bahwa imunitas terhadap SE adalah berperantaraan antibodi (Nagy dan Penn, 1976).

Respon imun humoral dilakukan oleh sekelompok limfosit yang berdeferensiasi di sumsum tulang yaitu limfosit B (sel B). Antibodi merupakan produk dari sel B baik terikat sel maupun

disekresi sebagai produk ekstraseluler setelah ada rangsangan imunogen (Belanti, 1985). Pada hewan dewasa selain di sumsum tulang produksi antibodi dilakukan pada limpa, kelenjar limfe, tonsil dan jaringan limfoid yang tersebar diseluruh tubuh terutama dalam saluran pencernaan, respirasi dan urogenital (Tizard, 1982).

Benda asing dapat masuk tubuh secara alami atau secara artifisial. Secara alami benda asing tersebut masuk melalui saluran pencernaan, respirasi atau permukaan tubuh seperti membrana mukosa. Pemasukan benda asing secara artifisial dapat dengan injeksi misalnya vaksinasi (Belanti, 1995).

Kuman *Pasteurella multocida* secara alami masuk melalui pernafasan. Gerbang utama pemasukan *Pasteurella* rupanya terletak pada daerah tonsil sehingga pembengkakan daerah tekak merupakan gejala awal dari penyakit SE. (Subronto, 1985).

Bila antigen termasuk kuman *Pasteurella multocida* masuk kedalam tubuh hewan maka antigen tersebut pertama-tama akan dijerat oleh sistem penjeratan yang dilakukan oleh sel yang mampu mengikat, menelan dan menghancurkan antigen (bahan asing) melalui proses-proses endositosis (fagositosis atau pinositosis). Apabila bahan asing berupa partikel, penelanan tersebut disebut fagositosis sedangkan bila benda asing berupa zat-zat non partikel misalnya tetes cairan maka disebut pinositosis (Belanti, 1985; Tizard, 1982). Sel fagositik ada dua macam yang komple-
menter.

Pertama, sistem mieloid yang terdiri dari sel yang bekerjanya cepat tetapi tidak mampu bertahan lama. Sistem ini terutama dilakukan oleh netrofil atau polimorfo nuklear (PMN) dan dalam jumlah kecil oleh easinofil. Basofil yang merupakan bagian dari sistem mieolid mempunyai fungsi untuk membangkitkan peradangan akut pada tempat deposisi antigen.

Kedua, sistem fagositik mononuklear yang terdiri dari sel yang bekerja lambat tetapi mampu melakukan fagositosis berulang-ulang. Sel fagositik mono nuklear mempunyai aktifitas fagositosis yang tahan lama, mengolah antigen dalam persiapan untuk tanggap kebal dan memberi kontribusi langsung pada perbaikan jaringan yang rusak (Belanti, 1985; Tizard, 1982).

Fagosit mono nuklear dihasilkan oleh sel induk didalam sumsum tulang. Mereka mengalami proliferasi dan dilepaskan kedalam darah setelah mengalami perubahan dari monoblast - promonosit - monosit. Kemudian dalam waktu singkat monosit bermigrasi ke jaringan untuk berdiferensiasi lebih lanjut menjadi makrofag. Di dalam jaringan makrofag masih mempunyai kemampuan membelah. (Belanti, 1985; Subowo, 1991).

Proses fagositosis dapat berjalan lebih lancar bila diawali dengan opsonisasi oleh antibodi (Ig) atau komplemen (C3) sehingga mudah ditangkap oleh reseptor Ig atau C3 pada makrofag (Subowo, 1991).

Antigen yang tidak tertangkap oleh makrofage akan ikut aliran darah atau limfe sesuai dengan bagaimana awal antigen masuk kedalam tubuh. Kemudian antigen sampai dan dilokalisasi

di jaringan limfoid seperti kelenjar limfe dan limpa yang kaya akan makrofage, sel dendrit yang menangkap dan memproses antigen, limfosit T dan B yang memperantai reaksi kebal (Belanti, 1985; Tizard 1982).

2.5. Respon limfosit B terhadap antigen

Respon limfosit B terhadap antigen dapat terjadi dengan bantuan makrofag yang mengolah antigen dan adanya sel T pembantu didekatnya. Makrofag yang dapat membantu respon limfosit B hanyalah makrofag yang memiliki antigen membran sel Ia (Major histocompatibility = MHC kelas II) pada tikus. Makrofag ini mengeluarkan interleukin 1 yang menggiatkan sel T pembantu memproduksi limfokin. Pengeluaran limfokin menyebabkan pembelahan dan diferensiasi limfosit B menjadi sel memori dan sel plasma yang menghasilkan antibodi (Tizard, 1982).

Limpa dan kelenjar limfe merupakan organ yang kaya akan makrofage, limfosit B dan T. Limpa terdiri dari pulpa putih dan pulpa merah. Pulpa putih sebagian besar terdiri dari limfosit B dan T yang letaknya mengelilingi arteri dan membentuk folikel primer. Bila ada rangsang imunogen, maka akan berubah menjadi folikel sekunder dengan bagian tengah disebut pusat germinal yang merupakan tempat pembelahan limfosit B (Kuby, 1992).

Kelenjar limfe terdiri dari korteks, para korteks dan medula. Pada korteks juga ditemukan folikel primer yang mayoritas terdiri dari limfosit B. Dengan adanya imunogen folikel primer juga akan berubah menjadi folikel sekunder (Kuby, 1992).

2.6. Adjuvan

Adjuvan berasal dari bahasa latin *adjuvare* yang berarti membantu, adalah substansi yang bila dicampur dengan antigen akan meningkatkan immunogenitas antigen tersebut. Adjuvan terutama sering ditambahkan pada antigen yang mempunyai immunogenitas rendah (Kuby, 1992). Adjuvan dapat merangsang terjadinya proliferasi, deferensiasi dan aktifasi sel-sel pengatur imun (Belanti, 1985). Jadi adjuvan mempunyai efek immunostimulasi spesifik.

Pertama kali immunostimulasi spesifik dilaporkan oleh Ramon pada tahun 1925, dengan menggunakan berbagai macam bahan seperti saponin, lecitin dan sebagainya yang ditambahkan pada vaksin difteria. Kemudian Glenny dan kawan-kawan pada tahun 1926 dan 1931 melaporkan penggunaan aluminium hidroksid sebagai adjuvan yang sampai sekarang masih banyak digunakan. Pada awal tahun 1937 dan 1944 Freund dan kawan-kawan melaporkan penggunaan formula *Water in oil* sebagai adjuvan yang dikenal dengan *Freund's incomplete adjuvant* (FIA). Disamping formula tersebut Freund menambahkan *mycobacteria* sehingga diperoleh formula *Freund's complete adjuvant* (FCA). Kedua macam adjuvan ini sampai sekarang dipakai sebagai adjuvan standar (Thein, 1988).

Tetapi *Freund's adjuvant* mempunyai beberapa efek samping seperti rasa sakit dan demam (Altman dan Dixon, 1989) sehingga pemakaian *Freund's adjuvant* hanya biasa dipakai dilaboratorium. Oleh karena itu penelitian terus berjalan untuk mendapatkan immunostimulan yang lebih baik (Thein, 1988).

Menurut Tizard (1995) mekanisme kerja adjuvan melalui berbagai cara diantaranya adalah sebagai berikut.

1. Pembentukan depo dan granuloma yang kaya makrofag dalam jaringan sehingga vaksin diserap perlahan-lahan. Dengan demikian ada efek booster dalam waktu yang relatif lama. Misalnya adalah sebagai berikut.

- a. Garam Aluminium seperti Aluminium fosfat, Aluminium hidroksid dan Alum.
- b. Adjuvan minyak seperti Parafin-Lanolin dan *Freund's incomplete adjuvant*.

2. Stimulasi makrofag

Termasuk dalam katagori ini adalah sebagai berikut.

- a. Fraksi bakteri seperti *lipopoli sakarida*, BCG dan *Coryne bacterium anaerobic*.
- b. Karbohidrat komplek seperti Glucans dan Dextran Sulfat.

3. Stimulasi limfosit seperti fraksi bakteri *Bordetella Pertussis*

4. Stimulasi processing antigen sehingga terjadi lokalisasi antigen pada kelenjar limfe.

Contoh dari adjuvan jenis ini adalah saponin dan *lysolecithin*.

Montanide ISA 206 merupakan adjuvan minyak yang terbentuk dari ester *Octa decenoic acid* dan *anhydromannitol* dalam minyak. Montanide ISA 206 berperan dalam meningkatkan aliran sel T dalam kelenjar limfe sehingga ada peningkatan peluang kontak antara antigen dan sel pengatur imun dan peningkatan prosesing antigen. Disamping itu juga dapat menstimulasi makrofage (SEPPIC, 1993).

Limfosit T pembantu yang terstimulir baik secara langsung oleh adjuvan atau oleh interleukin dari makrofage yang terstimulir akan menggiatkan pengeluaran limfokin. Peningkatan limfokin akan meningkatkan deferensiasi sel B menjadi sel memori dan sel plasma penghasil antibodi. Jadi akibat penambahan adjuvan maka ada peningkatan produksi antibodi (Kuby, 1992; Thein, 1988; Roitt, 1988).

2.7. Adjuvan Minyak

Vaksin dengan adjuvan minyak akan berbentuk emulsi, yaitu preparat yang mengadung dua fase cair yang tidak terlarut dan terdispersi satu dengan yang lain (Estikomah dan Irtisam, 1997). Ada 2 golongan minyak yang dapat digunakan sebagai adjuvan (Altman dan Dixon, 1989).

- a. *Mineral oil*, contohnya adalah parafin, MARCOL 52, MARCOL 82, DRACOEL 6 VR.
- b. *Metabolizable oil* seperti minyak kacang.

Penambahan minyak tersebut diatas pada suspensi antigen dalam formulasi vaksin akan menghasilkan vaksin bentuk emulsi sederhana yang tidak stabil. Untuk menstabilkannya perlu ditambahkan *emulsifying agent* seperti Arlasel A, lanolin, glycerol dan lecithin (Altman and Dixon, 1989; Bain et al., 1982; Bomford, 1985; Dalsgaard et al., 1990).

Vaksin adjuvan minyak ada 3 macam menurut bentuk emulsinya (Dalsgaard et al 1990).

- a. *Water in oil* (W/O), suspensi antigen terdispersi dalam minyak. Tipe ini dapat menimbulkan kekebalan yang lama.

- b. *Oil in water* (O/W), dimana minyak terdispersi dalam suspensi antigen. Tipe ini mempunyai potensi respon antibodi yang lemah dibanding tipe W/O (Altman and Dixon, 1989).
- c. *Water in oil in water* (W/O/W), dimana suspensi antigen (air) terdispersi dalam minyak yang terdispersi dalam air. Formula emulsi ini lebih encer tetapi kurang stabil.

2.8. Vaksin SE

Studi pada beberapa spesies menunjukkan bahwa kekebalan yang memberikan proteksi terhadap *Pasteurella multocida* berhubungan dengan antigen kapsul (Nagy dan Penn, 1976) atau antigen somatik atau keduanya. Walaupun demikian belum ada kesepakatan apakah salah satu atau kedua antigen tersebut yang paling penting dalam menginduksi kekebalan (Garfield et al., 1976).

Oleh karena itu vaksin SE yang digunakan dalam praktek adalah sel bakteri secara keseluruhan yang diinaktifkan dengan formalin yang kemudian ditambah atau tanpa adjuvan. Selain itu pembuatan sub unit vaksin SE hanya efisien dalam skala kecil (penelitian) sedangkan pada produksi dalam skala besar terdapat hambatan dalam memisahkan antigen kapsul atau antigen somatik.

Vaksin SE tanpa adjuvan biasanya dibuat dalam bentuk *Broth Bacterin* (BB). Jenis vaksin ini digunakan pada daerah wabah karena penyerapannya cepat sehingga respon imun yang ditimbulkan cepat, tetapi masa kekebalannya pendek yaitu sekitar 4 - 6 minggu.

Ada beberapa jenis adjuvan yang sering digunakan dalam vaksin SE yaitu *Alum potasium sulphate*, *Aluminium Hydroxide gel* dan adjuvan minyak. Dalam praktek yang banyak dipergunakan adalah

adjuvan minyak yaitu parafin-lanolin.

Di Indonesia penggunaan vaksin SE adjuvan minyak telah memberikan hasil yang sangat baik (Setiawan dkk., 1983) dan telah dapat membebaskan pulau Lombok terhadap penyakit SE.

Tetapi masih terdapat hambatan yaitu Vaksin SE dengan parafin-lanolin terlalu kental sehingga mengakibatkan kesulitan dalam penyuntikan (Chandrasekaran et al., 1994). Adjuvan montanide dikabarkan dapat menghasilkan vaksin yang encer dan respon imun yang baik (SEPPIC, 1993).

2.8. Pengukuran antibodi dengan ELISA

Untuk mengukur kandungan antibodi terhadap *Pasteurella multocida* dapat digunakan berbagai macam cara (Bain, 1982). Cara yang biasa digunakan adalah uji perlindungan pasif pada mencit. Tetapi cara ini membutuhkan serum yang relatif banyak dan waktu yang lama pada setiap tes serta tidak dapat dipakai untuk mengukur kandungan antibodi yang rendah (Johnson et al., 1988).

FAO/APHCA Sub-Group Meeting on Improvement of Haemorrhagic Septicaemia Vaccine 1987 dan 1990 di Bangkok merekomendasikan untuk menggunakan teknik ELISA dalam mengevaluasi kandungan antibodi terhadap *Pasteurella multocida*.

ELISA (*Enzyme linked immuno sorben assay*) adalah teknik pemeriksaan yang berdasarkan atas reaksi antigen-antibodi spesifik dimana salah satu reaktan (antibodi) dilabel dengan suatu enzim yang spesifik dan reaktan lainnya diabsorbsikan pada fase padat (*mikroplate*). Apabila dalam ikatan antigen-antibodi yang berlabel tadi ditambahkan suatu substrat yang sesuai akan terjadi perubahan warna yang spesifik. Intensitas warna dapat

diukur secara kuantitatif dengan *ELISA reader* (Burgess, 1988; Johnson, 1991).

Fase padat yang paling sering digunakan adalah mikroplak yang terbuat dari *polystyrene* atau *polyvinyl chloride* yang mempunyai kapasitas absorpsi 100 mg per lubang. Ada berbagai macam enzim yang digunakan yaitu *horseradish peroxidase* (HRPO), *alkaline phosphatase*, *urease*, *glucose oxidase* dan *B galactosidase*. HRPO merupakan enzim yang sering digunakan pada ELISA SE dengan substrat untuk HRPO yaitu ABTS, TMB, OPD, 5 AS dan O toluidine (Johnson, 1991).

Muncer et al (1994) menggunakan OPD untuk mengukur antibodi SE, sedangkan Johnson (1988) menggunakan ABTS sebagai substrat.

Dalam bidang kesehatan hewan ELISA digunakan untuk diagnosa, misalnya brucellosis, gumboro, ND dan SE. Ada berbagai macam variasi dalam teknologi ELISA yang secara umum dapat dikelompokkan sebagai berikut.

1. ELISA langsung yang biasanya digunakan untuk deteksi antigen.

Antigen diabsorbsikan pada fase padat.

2. ELISA tidak langsung.

Antigen diabsorbsikan pada fase primer dan kemudian direaksikan dengan antibodi anti spesies yang dilabel (konjugat) sebagai antibodi sekunder. Metode ini digunakan untuk mengukur kandungan antibodi.

3. *Antigen capture sandwich ELISA*

Metode ini digunakan untuk mendeteksi antigen atau mengukur kandungan antibodi, tergantung konfigurasi dari pemeriksaan.

Antibodi diabsorbsikan pada fase padat yang secara spesifik mengikat antigen.

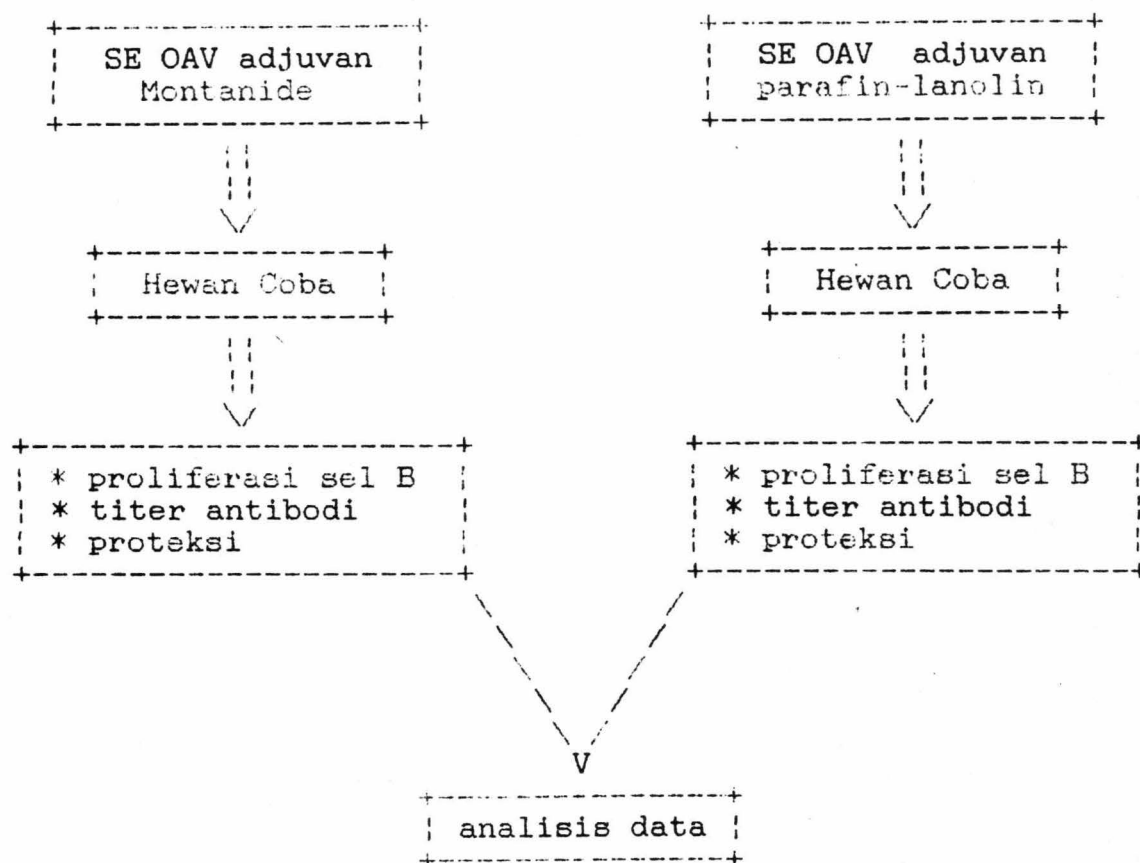
4. *Competitive and blocking ELISA*

Kompetisi dapat terjadi antar antigen atau antar antibodi dimana melibatkan imunoreaktan yang telah diketahui dengan yang belum diketahui (Johnson, 1991; Burgess, 1988).

Penggunaan ELISA untuk mengukur antibodi SE telah banyak dilakukan oleh para peneliti. Johnson (1988) berhasil menggunakan ELISA untuk mengukur antibodi SE dari serum kelinci, Muncer et al., (1994) dari serum kerbau muda, Chandrasekaran et al., (1994) dari serum kerbau, Sulaxono Hadi dkk. (1995) dari serum sapi dan sebagainya.



3.1.2. ALUR PENELITIAN



3.2. HIPOTESIS PENELITIAN

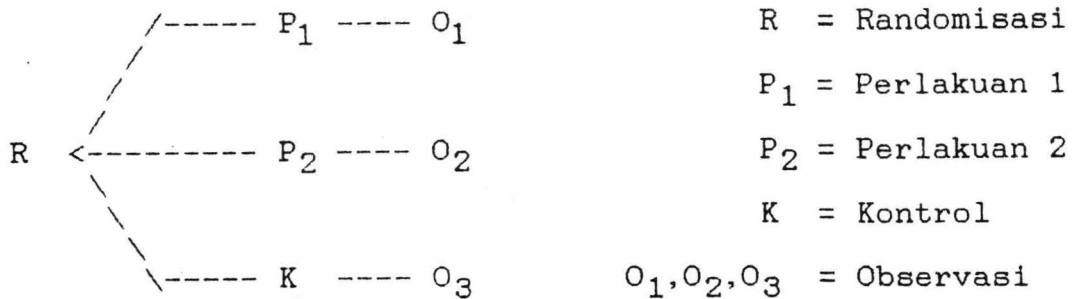
Pada penelitian ini dapat disusun beberapa hipotesis sebagai berikut.

1. Dalam vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 menyebabkan peningkatan proliferasi sel B yang lebih besar dari pada adjuvan parafin-lanolin pada limpa dan kelenjar limfe kelinci.
2. Dalam vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 menyebabkan pembentukan titer antibodi yang lebih tinggi dari pada adjuvan parafin-lanolin.
3. Dalam vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 memberikan daya proteksi yang lebih tinggi dari pada adjuvan parafin-lanolin

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental sesungguhnya (*true experiment*) menggunakan rancangan *post test only control group design* (Zainudin M, 1988).



4.2. Identifikasi variabel dan definisi operasional

4.2.1. Identifikasi

Dalam penelitian ini digunakan variabel sebagai berikut :

- 1) Variabel bebas : Jenis adjuvan (adjuvan parafin-lanolin dan montanide ISA 206 dalam vaksin SE).
- 2) Variabel terikat : Ukuran pusat germinal kelenjar limfe dan limpa, titer antibodi dan daya proteksi.
- 3) Variabel kendali : Berat badan kelinci, pakan dan kepadatan kandang serta kepadatan kuman.

4.2.2. Definisi Operasional

Vaksin SE parafin-lanolin adalah vaksin SE dengan menggunakan adjuvan parafin-lanolin. Vaksin SE montanide ISA 206 adalah vaksin SE dengan menggunakan adjuvan montanide ISA 206. Proliferasi sel B diukur berdasarkan ukuran pusat germinal. Yang diukur adalah diameter pusat germinal limpa dan kelenjar limfe. Ukuran pusat germinal adalah diameter pusat germinal.

Titer antibodi diukur dengan menggunakan ELISA menurut modifikasi metode Johnson (1988). Titer ELISA adalah pengenceran tertinggi serum yang memberikan *optical density* (OD) lebih tinggi dari 0,5.

Daya proteksi diukur dengan *Passive Mouse Protection Test* (PMPT). Proteksi dinyatakan dalam persen yaitu prosentase mencit yang hidup setelah disuntik serum dan kemudian setelah 24 jam ditantang dengan kuman *Pasteurella multocida* dosis $10^{1,5}LD_{50}$.

4.3. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Pusat Veterinaria Farma Surabaya, mulai tanggal 17 September 1998 sampai dengan tanggal 31 Oktober 1998.

4.4. Bahan

4.4.1. Kuman

Pada penelitian ini digunakan kuman *Pasteurella multocida* serotipe 6 B galur Katha.

4.4.2. Hewan Percobaan

Kelinci lokal dengan berat minimal 1,5 kg berasal dari daerah Batu - Malang.

Mencit galur Balb/c, umur 4-6 minggu dengan berat antara 18 - 22 gram diperoleh dari Instalasi Kandang Hewan Percobaan Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

4.4.3. Media dan Bahan Kimia

Media dan bahan kimia yang digunakan antara lain adalah *Heart Infusion Agar* (HIA), media cair yang terdiri dari *Acid digest of casein, Yeast extract, Tryptic digest of casein, Auto digest of Pancreas, Sucrose, MgSO₄7H₂O, Na₂HPO₄12H₂O, KH₂PO₄7H₂O*. Adjuvan parafin-lanolin, Montanide ISA 206.

Antigen untuk ELISA yang digunakan adalah *heat stable antigen*. Suspensi kuman *Pasteurella multocida* yang berisi 0,5% formalin direbus dalam *water bath* selama 1 jam. Kemudian di sentrifuge pada putaran 10.000 g selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai antigen.

Sedangkan konjugat anti kelinci yang digunakan adalah *Anti Rabbit IgG (Whole molecul) Peroksidase Conjugate* buatan Sigma.

4.5. Alat

4.5.1. Alat Laboratorium

Alat-alat laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah : telapa petri, *vortex tank, emulsifier, inkubator, mikroplak, tabung reaksi, disposable spuit* dan lain-lain.

4.5.2. Kandang Hewan Percobaan

Mencit dipelihara dalam kurungan khusus dari plastik, 10 ekor tiap kurungan. Kelinci dipelihara dalam kurungan khusus, 2 ekor tiap kurungan.

4.6. Cara Kerja

4.6.1. Formulasi Vaksin SE

Seed kuman *Pasteurella multocida* dalam bentuk kering beku diencerkan dengan larutan NaCl 0,85%. Kemudian dilintaskan pada media padat HIA dan dieramkan pada suhu 37°C selama 20 jam. Koloni yang tumbuh dilintaskan sekali lagi pada media yang sama. Setelah itu diambil 1 koloni untuk ditanam pada 250 ml media cair dan dieramkan selama 20 jam. Setelah diuji kemurniannya, kultur ini ditanam pada media cair dalam vortex tank dan dieramkan 37°C serta dialiri udara steril selama 20 jam.

Pada akhir pengeraman dilakukan pemeriksaan kemurnian dan kepekatan kuman dengan Mc Farland nomor 30. Kemudian suspensi kuman diinaktifasi dengan formalin 0,5%. Apabila kuman sudah inaktif maka dilakukan formulasi vaksin dengan penambahan adjuvan yang diinginkan (parafin-lanolin atau montanide) dengan menggunakan *emulsifier*.

4.6.2. Vaksinasi Hewan Percobaan

Kelinci dibagi menjadi 3 kelompok yang terdiri dari 10 ekor kelinci tiap kelompok secara acak.

No	Kelompok	Jumlah mencit	Perlakuan
1.	I	10 ekor	Vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dosis 1 ml, intra muskuler.
2.	II	10 ekor	Vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 dosis 1 ml, intra muskuler.
3.	III	10 ekor	Kontrol

4.6.3. Pengambilan darah, limpa dan kelenjar limfe.

Satu, dua, tiga dan empat minggu setelah vaksinasi kelinci dari tiap kelompok diambil darahnya melalui vena telinga. Serum darah dipisahkan untuk mengukur antibodi dengan uji ELISA. Serum diinaktifasi dengan jalan memanaskan pada suhu 56°C selama 30 menit.

Kemudian kelinci dimatikan dan diambil limpa dan kelenjar limfe yang kemudian dimasukkan dalam formalin 10% untuk dibuat preparat histologik dengan pewarnaan hematoxylin eosin (HE).

4.6.4. Pemeriksaan Respon sel B pada limpa dan kelenjar limfe.

Untuk mengetahui respon sel B pada limpa dan kelenjar limfe maka dibuat preparat histologis sebagai berikut :

a. Fiksasi jaringan dengan formalin

Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15-20 menit.

b. Dehidrasi :

Alkohol 70%	:	1 jam
-------------	---	-------

Alkohol 80%	:	1 jam
-------------	---	-------

Alkohol 95%	:	1 jam
-------------	---	-------

Alkohol 95%	:	1 jam
-------------	---	-------

Alkohol 100%	:	1 jam
--------------	---	-------

Alkohol 100%	:	1 jam
--------------	---	-------

Alkohol 100%	:	1 jam
--------------	---	-------

c. Clearing :

Xilol	:	1 jam
-------	---	-------

Xilol	:	1 jam
-------	---	-------

Xilol	:	1 jam
-------	---	-------

- d. Impregnasi : Parafin : 1 jam
 Parafin : 1 jam
 Parafin : 1 jam

e. Embedding menggunakan parafin

f. Penyayatan jaringan

Jaringan disayat menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-6 mikron. Jaringan yang telah disayat dilekatkan pada obyek glas yang telah dilapisi dengan *Mayer's egg albumin* dan dikeringkan pada suhu kamar. Setelah kering sayatan tersebut dimasukkan dalam oven yang suhunya 56°C antara 3 jam - semalam.

g. Pewarnaan jaringan

Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan Hematoxylin Eosin (HE).

Sayatan jaringan berturut-turut dimasukkan kedalam :

1. Xilol : 2 menit
2. Xilol : 2 menit
3. Alkohol absolut : 1 menit
4. Alkohol 95% : 1 menit
5. Alkohol 95% : 1 menit
6. Cuci air mengalir : 10 - 15 menit
7. Harris Hematoxylin : 15 menit
8. Cuci air mengalir : 15 - 20 menit
9. Alkohol asam : 3 - 10 celup sampai warna pink
10. Cuci dengan air : sampai pengaruh asam hilang.
11. Air amonia : sampai jaringan berwarna biru kembali (6 celupan).

12. Bilas dengan air : 15 - 20 menit
13. Eosin : 15 detik sampai 2 menit
14. Alkohol 80% : 2 menit
15. Alkohol 95% (3 X)_a : 2 menit
16. Alkohol absolut (2 X) _a : 2 menit
17. Xilol (3 X) _a : 2 menit
18. Tutup dengan Canada balsam.

Kemudian dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya. Adapun yang diamati adalah diameter pusat germinal yang diukur dengan mikrometer.

4.6.5. Uji ELISA

ELISA dilakukan menurut modifikasi metode Johnson (1988). Sebanyak 50 ul antigen dalam *carbonat coating buffer* dimasukkan kedalam tiap lubang cawan mikro (*mikroplate*) dan didiamkan dalam suhu 4°C selama satu malam. Antigen tersebut kemudian dicuci 3 kali dengan *Phosphate buffer saline* yang berisi 0,05% Tween 20 (PBS-T).

Serum yang diperoleh diencerkan mulai dari 1/50 sampai 1/25600 dengan PBS-T, kemudian tiap pengenceran serum sebanyak 0,1 ml dimasukkan ke dalam lubang cawan mikro yang sudah dilapisi antigen dan kemudian diinkubasikan selama 1 jam.

Setelah dicuci 3 kali kemudian ditambah konjugat dan diinkubasikan selama 1 jam. Kemudian dicuci 3 kali dengan PBS-T dan dikeringkan. Substrat OPD (O-phenylenediamine) ditambahkan kedalam cawan sebanyak 100 ul per lubang, diinkubasikan selama

1 jam. Perubahan warna yang terjadi diukur dengan menggunakan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 450 nm.

4.6.6. Uji Perlindungan Pasif (PMPT)

Dua puluh ekor mencit disuntik serum yang dikumpulkan dari tiap kelompok kelinci dengan dosis 0,5 ml secara sub kutan. Sepuluh mencit digunakan sebagai kontrol. Dua puluh empat jam kemudian semua mencit perlakuan dan kontrol ditantang dengan cara penyuntikkan kuman *Pasteurella multocida* ganas dosis $10^{1,5}LD_{50}$ dalam 0,1 ml secara sub kutan. Dalam pengamatan selama 1 minggu lalu dihitung jumlah kematian mencit. Persentase hidup dari mencit perlakuan menunjukkan daya proteksi dari vaksin.

4.7. Analisis Data

Untuk menguji hipotesis penelitian yang diajukan dipergunakan analisis varian dan uji chi square. Hasil uji bermakna bila diperoleh harga $p < 0,05$. Bila hasil uji bermakna maka dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil uji bermakna bila diperoleh harga $p < 0,05$. (Steel dan Torrie, 1991).

BAB V

HASIL PENELITIAN

Hasil pengamatan ukuran pusat germinal kelenjar limfe dapat dilihat pada Tabel 1. Penyuntikan antigen SE adjuvan parafin-lanolin (P1) maupun vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 (P2) terlihat meningkatkan ukuran pusat germinal kelenjar limfe dengan $p < 0,05$. Namun demikian tidak ada perbedaan peningkatan ukuran pusat germinal kelenjar limfe yang nyata antara aplikasi vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 dan vaksin SE adjuvan parafin lanolin.

Hasil yang sama pada pengamatan ukuran pusat germinal limpa yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 3 menunjukkan hasil pengamatan titer antibodi yang di uji dengan ELISA. Pada minggu I belum terlihat adanya peningkatan titer antibodi yang signifikan. Pada minggu II sampai dengan IV terlihat peningkatan titer antibodi yang belum signifikan pada vaksin SE adjuvan parafin-lanolin (P1). Pada vaksin SE adjuvan montadine ISA 206, kenaikan titer antibodi terlihat dengan nyata. Demikian juga respon antibodi terhadap vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 lebih tinggi secara nyata dari pada vaksin SE adjuvan parafin-lanolin.

Secara kumulatif terlihat adanya respon antibodi terhadap vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 dan vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dimana respon antibodi terhadap vaksin SE montanide ISA 206 lebih baik dibanding respon antibodi terhadap vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dengan $p < 0,05$. Respon antibodi terhadap vaksin SE adjuvan parafin-lanolin tidak terlihat nyata.

Pada Tabel 4. terlihat bahwa kedua tipe vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dan adjuvan montanide ISA 206 memberikan proteksi yang nyata, tetapi daya proteksi diantara kedua tipe vaksin tersebut tidak berbeda secara nyata.

Tabel 1. Diameter pusat germinal kelenjar limfe kelinci kontrol, kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dan kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206.

	Perlakuan		
	P3	P1	P2
Rata-rata	9,1000 ^a	72,1250 ^b	77,9200 ^b
Simpangan baku	19,1859	5,6633	5,8074

Rata-rata pada baris sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

P1 = Kelinci disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin.

P2 = Kelinci disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206.

P3 = Kontrol.

Diameter pusat germinal diukur dengan mikrometer mikroskop pada perbesaran 40 X.

Tabel 2. Diameter pusat germinal kelenjar limpa kelinci kontrol, kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dan kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206.

	Perlakuan		
	P3	P1	P2
Rata-rata	7,8500 ^a	69,3550 ^b	75,6150 ^b
Simpangan baku	16,6701	11,0621	12,3970

Rata-rata pada baris sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

P1 = Kelinci disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin.

P2 = Kelinci disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206.

P3 = Kontrol.

Diameter pusat germinal diukur dengan mikrometer mikroskop pada perbesaran 40 X.

Tabel 3. Titer antibodi kelinci kontrol, kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dan kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 dari minggu I sampai dengan minggu IV.

Waktu pengambilan serum	Perlakuan		
	F3	P1	P2
Minggu I	65±24,1523 ^a	85±24,1523 ^a	75±26,3523 ^a
Minggu II	60±21,0819 ^a	130±48,3046 ^a	1500±1279,7569 ^b
Minggu III	110±51,6398 ^a	620±289,8275 ^a	5280±4336,1017 ^b
Minggu IV	110±51,6398 ^a	1420±1121,3088 ^a	8640±4722,3346 ^b
Kumulatif	85,9±25,9163 ^a	563,6±332,1031 ^a	3583,2±2158,7878 ^b

Rata-rata pada baris sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$).

± = Simpangan baku

P1 = Kelinci disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin.

P2 = Kelinci disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206.

P3 = Kontrol.

Tabel 4. Hasil uji perlindungan pasif pada mencit dari kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin, kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 dan kelinci kontrol.

Perlakuan	Persentase	
	Hidup	Mati
P ₁	95% ^a	5%
P ₂	100% ^a	0%
P ₃	0% ^b	100%

Persentase hidup pada kolom sama yang diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($P < 0,05$).

P₁ = Kelinci disuntik vaksin SE adjuvan parafin-lanolin.

P₂ = Kelinci disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206.

P₃ = Kontrol.

BAB VI

PEMBAHASAN

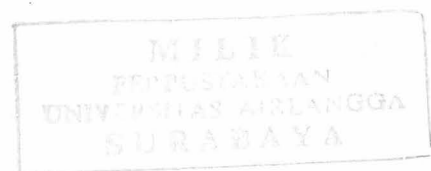
Hewan target vaksin SE adalah sapi dan kerbau. Sapi, kerbau, kelinci dan mencit adalah hewan yang peka terhadap *P. multocida* 6E (Bain et al., 1982). Oleh karena itu menurut QIE (1992) evaluasi vaksin SE dapat digunakan hewan sebagai berikut.

1. Vaksinasi sapi, diikuti dengan uji tantang langsung atau dengan uji perlindungan pasif pada mencit terhadap serum sapi.
2. Vaksinasi kelinci, diikuti dengan uji tantang langsung atau dengan uji perlindungan pasif pada mencit terhadap serum kelinci.
3. Vaksinasi mencit, diikuti dengan uji tantang langsung.

ASEAN - COFAF Coordinating Group on livestock (1991) merekomendasikan bahwa evaluasi potensi vaksin SE bentuk cair digunakan mencit, sedangkan untuk vaksin adjuvan minyak digunakan kelinci dengan uji perlindungan pasif pada mencit.

Penggunaan uji tantang tidak langsung didasarkan bahwa uji perlindungan pasif pada mencit mempunyai korelasi dengan uji tantang langsung (Nagy dan Penn, 1979).

Pemakaian adjuvan parafin-lanolin dalam vaksin menghasilkan vaksin adjuvan minyak dengan kekentalan > 300 cPs (Estikomah dan Irtisam, 1997). Tipe emulsi dari formula ini adalah *water in oil*. Penggunaan vaksin adjuvan minyak yang demikian kental akan membentuk depo antigen dan jaringan granuloma pada tempat suntikan (Thein, 1988). Demikian juga vaksin SE adjuvan parafin-lanolin jang penulis amati.



Antigen didalam granuloma secara pelan-pelan bocor keluar kedalam jaringan sehingga rangsangan antigen terjadi dalam waktu yang relatif lama. Secara normal keberadaan antigen tanpa adjuvan dalam tubuh hanya bertahan selama beberapa hari sampai beberapa minggu saja (Tizard, 1995).

Emulsi minyak akan merangsang reaksi peradangan lokal yang terdiri dari makrofag, limfosit dan sel plasma yang bertahan selama beberapa bulan. Reaksi lokal ini mungkin berperan dalam produksi mediator yang potensial dalam respon imun (Altman dan Dixon, 1989).

Parafin adalah minyak yang paling sering digunakan sebagai adjuvan (Dalsgaard et al., 1990), tetapi emulsi vaksin sederhana yang terbuat dari parafin ini tidak stabil.

Lanolin merupakan *emulsifying agent* yang berfungsi untuk menstabilkan emulsi (Bain, 1982). Lanolin juga bekerja untuk meningkatkan respon imun, tetapi cara kerjanya belum diketahui, mungkin dengan cara menekan pengrusakan antigen oleh lisosom (Tizard, 1982).

Formulasi vaksin SE adjuvan parafin-lanolin menghasilkan respon imun yang baik. Hal ini ditunjukkan oleh perkembangan follikel primer menjadi folikel sekunder sehingga terbentuk pusat germinal yang merupakan tanda adanya proliferasi sel B (Kuby, 1992). Selain itu terjadi deferensiasi sel B menjadi sel plasma yang ditunjukkan adanya titer antibodi yang cukup tinggi dengan pemeriksaan ELISA serta dapat memberikan proteksi yang cukup baik dengan uji perlindungan pasif pada mencit.

Sel plasma merupakan salah satu bentuk stadium final dari proliferasi dan diferensiasi sel B. Sel ini mempunyai sitoplasma yang lebih besar dengan *endoplasmic reticulum* lebih banyak dan kehilangan kemampuan proliferasi. Perubahan sel plasma tersifat dengan adanya peningkatan sintesis dan sekresi antibodi yang kemudian akan mati setelah beberapa hari produksi antibodi.

Selain sel plasma bentuk turunan sel B yang lain adalah sel B memori yang merupakan sel paling aktif pada respon imun sekunder. Sel ini dapat bertahan hidup antara 1 minggu sampai 1 tahun (Lodish et al., 1995).

Penggunaan adjuvan parafin-lanolin dalam vaksin SE dimulai pada tahun 1952 di Burma/Myanmar. Kemudian meluas ke Thailand atas rekomendasi FAO (Bain et al, 1982). Vaksin SE tipe ini dapat menginduksi kekebalan mencapai 1 tahun, sedangkan vaksin SE alum presipitat dan aluminium hidroksi gel hanya dapat menimbulkan kekebalan selama 4 - 6 bulan (De Alwis, 1992). Berdasarkan kelebihan tersebut maka vaksin SE parafin-lanolin sampai sekarang masih digunakan secara luas terutama di Sri Lanka, Malaysia, Irak, Mesir dan Indonesia.

Bentuk vaksin yang sangat kental merupakan kelemahan dari vaksin SE parafin-lanolin tetapi mungkin justru kekentalan ini menyebabkan pembentukan depo pada tempat suntikan lebih efektif sehingga dapat menimbulkan kekebalan yang lama. Yang menjadi pertanyaan kapan depo vaksin dalam jaringan tersebut hilang, belum diketahui.

Penelitian telah banyak dilakukan dalam formulasi vaksin adjuvan minyak yang lebih encer dengan potensi yang baik bahkan

lebih baik. Adjuvan montanide ISA 206 telah dicoba untuk formulsi vaksin *E.Coli* dan menghasilkan respon imun yang lebih baik bila dibandingkan dengan adjuvan *Freund's incomplete*. Oleh karena itu formula vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 tentunya akan menghasilkan respon imun yang lebih baik dibandingkan vaksin SE adjuvan parafin-lanolin.

Penggunaan adjuvan montanide ISA 206 menghasilkan formula vaksin adjuvan minyak dengan kekentalan 50 cPs (Ganne et al, 1994). Penyuntikan hewan dengan formula vaksin ini akan membentuk depo tidak hanya terpusat pada tempat penyuntikan tetapi juga menyebar ke jaringan sekitar (Bomford, 1985). Demikian juga formula vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 yang penulis amati.

Seperti vaksin SE adjuvan parafin-lanolin (vaksin adjuvan minyak), formula vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 ini menginduksi proliferasi sel B yang terlihat dengan adanya pusat germinal. Titer antibodi yang sangat tinggi menunjukkan adanya deferensiasi sel B menjadi sel plasma dan kenaikan sintesis serta sekresi antibodi.

Peningkatan ukuran pusat germinal kelenjar limfe dan limpa pasca penyuntikan vaksin SE adjuvan parafin-lanolin terlihat nyata. Tetapi kenaikan titer antibodi tidak nyata walaupun cukup memberikan proteksi (95%) pada uji perlindungan pasif pada mencit. Hal ini mungkin karena adjuvan parafin lanolin hanya berfungsi dalam pembentukan depo dan jaringan granuloma sehingga pengaruhnya hanya pada proliferasi sel B dan efek pada deferensiasi sel B menjadi sel plasma relatif rendah.

Sedangkan pada penggunaan adjuvan montanide ISA 206 disamping mempunyai efek pada pembentukan depo dan jaringan granuloma, juga secara khusus menyebabkan respon Interleukin 6 (IL6). IL6 ini mempunyai aktifitas menyebabkan deferensiasi sel B dan stimulasi sekresi antibodi (Ganne et al., 1994). Jadi induksi IL6 ini merupakan sebab mengapa walaupun peningkatan ukuran pusat germinal kelenjar limfe dan limpa akibat pengaruh vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 tidak berbeda nyata dengan vaksin SE adjuvan parafin-lanolin tetapi respon antibodi terhadap vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 lebih tinggi secara nyata dari pada antibodi terhadap vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dan memberikan proteksi 100% dengan uji perlindungan pasif pada mencit.

Oleh karena itu perlu penelitian lebih lanjut tentang perbandingan jumlah sel plasma dan IL6 akibat pengaruh dari kedua macam adjuvan tersebut.

Titer antibodi kelinci kontrol (P3) tidak terlihat adanya peningkatan dan pada uji perlindungan pasif tidak memberikan proteksi (0%).

Titer antibodi P1 dan P2 dari minggu I sampai minggu IV terlihat kecenderungan naik terus dan mungkin belum mencapai puncaknya. Oleh karena itu perlu penelitian lebih lanjut tentang jangka waktu kekebalan dan kapan puncak titer antibodi dapat dicapai.

Perbedaan titer antibodi yang nyata antara efek vaksin SE adjuvan parafin-lanolin dan vaksin SE adjuvan montanide ISA 206

merupakan perbedaan efek dari parafin-lanolin dengan montanide ISA 206 karena kedua jenis formula vaksin tersebut dibuat dari sumber suspensi kuman *P. multocida* yang sama.

Melihat data hasil pengamatan bahwa rata-rata diameter pusat germinal $P2 > P1 > P3$ (perbedaan $P1$ dan $P2$ tidak nyata); rata-rata titer antibodi $P2 > P1 > P3$ (perbedaan $P1$ dan $P3$ tidak nyata) dan daya proteksi $P2$ dan $P1$ lebih tinggi dari $P3$ maka terlihat bahwa ada korelasi antara pertambahan ukuran pusat germinal, titer antibodi dan daya proteksi. Titer antibodi $P2 > P1$ tetapi daya proteksi $P2$ tidak berbeda nyata dengan $P1$. Hal ini karena walaupun titer antibodi $P1$ rendah tetapi telah mencapai batas minimum untuk dapat melindungi tantangan infeksi kuman *P. multocida*.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

7.1. SIMPULAN

Dari penelitian yang telah penulis lakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Tidak ada perbedaan pengaruh yang nyata antara adjuvan parafin-lanolin dengan montanide ISA 206 pada proliferasi sel B pada kelenjar limfe dan limpa.
2. Ada perbedaan pengaruh yang nyata antara adjuvan parafin-lanolin dengan montanide ISA 206 dalam vaksin SE pada titer antibodi dimana adjuvan montanide ISA 206 lebih baik dari pada adjuvan parafin-lanolin.
3. Dalam vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 mempunyai pengaruh daya proteksi yang tidak berbeda nyata dibanding adjuvan parafin-lanolin.
4. Pada vaksin SE adjuvan montanide ISA 206 mempunyai pengaruh respon imun yang lebih baik dari pada adjuvan parafin-lanolin.

7.2. S A R A N

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang perbedaan pengaruh adjuvan parafin-lanolin dengan montanide ISA 206 dalam hal kandungan sel plasma pada pusat germinal dan IL6.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang stabilitas dan jangka waktu kekebalan dari vaksin SE adjuvan montanide ISA 206.

DAFTAR PUSTAKA

- Altman, A. and Frank J. Dixon (1989). Immunomodifiers in Vaccines. Advances in Veterinary Science and Comperative medicine. 33 : pp 301 - 339.
- Audiberd, F.M. and L. D. Lise (1993) adjuvants : Current Status, clinicol perspectives and future prospects. Immunology Today. 14.6. pp 281 - 284.
- Bain, R.V.S., M.C.L. De Alwis, G.R. Carter, and B.K. Gupta,(1982). Haemorrhagic septicaemia. FAO Animal Production and Health Paper No.33 : 22.
- Bellanti, J.A. (1985). Immunology III. diterjemahkan oleh A. Samik Wahab. 1993. Immunologi III, Cetakan pertama. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 18-211.
- Bomford, R. (1985) Adjuvants in Animal Cell Biotechnogy. Academic Press Inc. London. 2 : pp 235 - 250.
- BPM SOH (1989). Petunjuk Teknis Pengujjian Mutu Obat Hewan. Bogor.
- Brogden, K.A and R.A. Packer, (1979). Comparison of Pasteurella multocida serotyping system. Am.J.Vet.Res.,40 : 1332 - 1335.
- Burgess, G.W. (1988). Basic Principles of ELISA and Variation in Configuration in ELISA Technology in Diagnosis and Research. Editor. Burgess, G.W. James Cook University of North Queensland. Australia. pp 27 - 36.
- Carter, G.R. (1955). Studies on Pasteurella multocida. I. A Haemagglutination Test for the Identification of Serological Types. Am.J.Vet.Res.,16 : 481 - 484.
- Chandrasekaran, S., L. Kennett, P.C. Yeap and N. Muniandy, (1994). Characterization of immune response and duration of protection in buffaloes immunized with haemorrhagic septicaemia vaccines. Vet.mic. 41 : 213 - 219.
- Dalsgaard, K. Luuk Hilgers and Gerard Trove (1990). Classical and New Approaches to Adjuvant Use in Domestic Food Animals. Advances in Veterinary Science and Comperative medicine. 35 : pp 121 - 128.
- De Alwis, M.C.L. (1992). Haemorrhagic Septicaemia - A General Review. Br. Vet. J. 148.2 : 99 - 112
- Estikomah, D. dan Irtisam (1997) Percobaan Pembuatan Preparat Emulsi dengan Beberapa Formula. Bulletin Veterinaria Farma 1.2 : 19-25.

- Ganne, V., M. Eloit, A. Laval, M. Adam and G. Trouve (1994). Enhancement of the efficacy of a replication-defective adenovirus-vectored vaccine by the addition of oil adjuvants. *Vaccine* 12.13 : pp 1190 - 1196.
- Garfield, J., P.A. Reber, and K.L. Heddlestone (1976). Immunogenic and toxic properties of purified lipopolysaccharide - protein complex from *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 14 : 990 - 999.
- Headdleston, K.,L., K.R. Rhodes, and P.A. Rebers, (1967). Experimental Pasteurellosis : Comperatis Studies on *Pasteurella multocida* from Asia, Africa and North America. *Am.J.Vet.Res* 22:125 : 1003 - 1012
- Hadi, S., S.M. Astuti, K. Ketaren, SS. Tambunan dan Endang. I.W. (1995). Evaluasi Respon Kekebalan sapi terhadap Vaksinasi SE dengan *Oil Adjuvant Vaccine (OAV)* pada kondisi pangan di Kalimantan Selatan. Balai Penyidikan Penyakit Hewan Wilayah V Banjarbaru. hal. 1 - 4.
- Johnson, R.B., H.J.S. Dawkin, and T.L. Spencer, (1988). Strategies For The Development of an ELISA Assy For Hemorrhagic Septicaemia in ELISA Technology in Diagnosis and Research. Editor. Burgess. G.W. James Cook University of North Queensland. Australia. pp. 244-253
- Johnson,R.B. (1991). Introduction to ELISA Work Shop on the Application of ELIA in Agriculture and Food Sciences. Balitvet. Bogor. pp 1 - 2.
- Kuby, J. (1992). Immunology. W.H. Freeman and company. New york.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, and J. Darnell, 1995. Molecular Cell Biology. cientific American Books. New York. p.p : 1295-1339.
- Maidie, M.,S., Iwan T. Budiarso dan W. Rumawas (1976). Teknik Histologi dan Histopatologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Hal. 1-57.
- Nagy, L.K. and C.W. Penn, (1976). Protection of Cattle againts experimental haemorrhagic septicaemia by capsular antigens of *Pasteurella* type B and E. *Res.Vet.Sci.*, 20 : 249 - 253
- OIE. (1992). Manual of Standards For Diagnostics And Vaccines. Paris pp. 313-321
- Penn, C.W. and L.K. Nagy, (1976). Isolation of a protective non-toxic capsular antigen from *Pasteurella multocida* type B and E. *Res.Vet.Sci.* 20 : 90-96.

- Reddy, G.S., K. Anand Rao and V, A. Srinivasan (1996). Immunity conferred by oil-adjuvant haemorrhagic septicaemia vaccine. *Indian Journal of Animal Sciences*. 66.7 : pp 703 - 704.
- Roitt I.M., J. Brostoff, D.K. Male, (1993). *Imunology*. Third Edition. Mosby Year Book Europe Limited. London.
- Sarmanu, (1992). *Statistika Parametrik : Uji t dan Anova satu arah*. Penataran Metodologi Penelitian Statistika dan Komputer. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya. Hal. 1-22.
- SEPPIC. Montanide. Adjuvants for oil based vaccines and injectables. PARIS.
- Setiawan, E.D., A.N. Hamidjojo, P. Ronahardjo, dan A. Sjamsudin, (1983). Penggunaan Vaksin Haemorrhagic septicaemia (Septicaemia Epizootica) di Sulawesi Selatan (1970 - 1979) *Penyakit Hewan*, XV. 25 : 73 - 77.
- Smith, J.R., (1988). Production of Hyperimmune Serum in ELISA Technology in Diagnosis and Research. Editor. Burgess, G.W. James Cook University of North Queensland. Australia. pp 7 - 16.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie, (1991). *Prinsip dan Procedur Statistika suatu Pendekatan Biometrik*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Subowo, 1993. *Imunobiologi*. Angkasa - Bandung.
- Subronto (1985). *Ilmu Penyakit Ternak I*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. : 367 - 373.
- Sudiana, I.K. (1995). Perbedaan Responsifitas limfosit B di kelenjar getah bening dan di limfa mencit pada pemberian Toksoid Tetanus secara intra peritoneal. Tesis Prog. P.S Unair Surabaya.
- Suhendra, G.S. (1985). Pengaruh umur pada pembentukan antibodi sebagai respon dari vaksinasi Septicaemia Epizootica pada babi strain silang. Tesis. Universitas Nasional Jakarta.
- Thein, P. (1988). Adjuvant : Immunomodulation and Immunostimulation. *Vet.med.Rev.*, 59. pp. 3 - 8.
- Tizard, I.R. (1977) *An Introduction to Veterinary Immunology*. diterjemahkan oleh Masduki Partodiredjo. 1987. Airlangga University Press. Surabaya. 18 - 278.

Tizard, I., R., (1995). Immunology, An Introduction. Saunders college Publishing Harcourt Brace College Publisher. USA. pp 359 - 376.

Zainudin, M. (1988). Metodologi Penelitian. Surabaya.

Lampiran 1

Diameter Pusat Germinal Kelenjar Limfe dan Limpa Pasca Vaksinasi

Kelompok	No	Diameter Pusat Germinal	
		Kelenjar Limfe	L i m p a
I Parafin- lanolin	1	80	91,7
	2	71,5	65
	3	77,5	74,3
	4	69	65
	5	65	62,5
	6	71	65
	7	75	72,3
	8	71,75	67
	9	78	80
	10	62,5	50,75
II Montanide ISA 206	1	81,7	79
	2	76,5	70,75
	3	71,5	66,5
	4	86,4	100
	5	77,5	72,85
	6	82,4	81
	7	77,5	70,85
	8	83,7	89
	9	67,5	55,4
	10	74,5	70,8
III Kontrol	1	45	35
	2	0	0
	3	0	0
	4	46	43,5
	5	0	0
	6	0	0
	7	0	0
	8	0	0
	9	0	0
	10	0	0

Lampiran 2

Titer Antibodi Kelinci setelah vaksinasi SE

Kelompok	No	Titer Antibodi			
		Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV
I Parafin- lanolin	1	100	200	800	3200
	2	50	100	200	1600
	3	100	100	800	1600
	4	100	100	800	200
	5	50	100	200	200
	6	100	200	800	800
	7	100	100	800	1600
	8	100	100	800	1600
	9	100	200	800	3200
	10	50	100	200	200
II Montanide ISA 206	1	50	200	1600	12800
	2	100	3200	3200	6400
	3	50	800	6400	1600
	4	100	1600	12800	12800
	5	50	3200	1600	12800
	6	100	200	3200	12800
	7	100	800	6400	6400
	8	50	1600	12800	12800
	9	50	200	1600	1600
	10	100	3200	3200	6400
III Kontrol	1	100	50	200	200
	2	50	50	100	100
	3	50	100	100	100
	4	50	50	100	50
	5	100	50	200	100
	6	50	50	100	50
	7	50	100	100	200
	8	50	50	100	100
	9	50	50	50	100
	10	100	50	50	100

Lampiran 3

07 Mar 99 SPSS for MS WINDOWS Release 6.0

Page 1

	PERLAKUA	KELLIMFE	LIMPA
1	1	80.00	91.70
2	1	71.50	65.00
3	1	77.50	74.30
4	1	69.00	65.00
5	1	65.00	62.50
6	1	71.00	65.00
7	1	75.00	72.30
8	1	71.75	67.00
9	1	78.00	80.00
10	1	62.50	50.75
11	2	81.70	79.00
12	2	76.50	70.75
13	2	71.50	66.50
14	2	86.40	100.00
15	2	77.50	72.85
16	2	82.40	81.00
17	2	77.50	70.85
18	2	83.70	89.00
19	2	67.50	55.40
20	2	74.50	70.80
21	3	45.00	35.00
22	3	.00	.00
23	3	.00	.00
24	3	46.00	43.50
25	3	.00	.00
26	3	.00	.00
27	3	.00	.00
28	3	.00	.00
29	3	.00	.00
30	3	.00	.00

Number of cases read: 30

Number of cases listed: 30

07 Mar 99 SPSS for MS WINDOWS Release 6.0

Page 2

- - Description of Subpopulations - -

Summaries of KELLIMFE
By levels of PERLAKUA

Variable	Value	Label	Mean	Std Dev	Cases
For Entire Population			53.0483	33.7561	30
PERLAKUA	1		72.1250	5.6633	10
PERLAKUA	2		77.9200	5.8074	10
PERLAKUA	3		9.1000	19.1859	10

Total Cases = 30

- - Description of Subpopulations - -

Summaries of LIMPA
By levels of PERLAKUA

Variable	Value	Label	Mean	Std Dev	Cases
For Entire Population			50.9400	33.7499	30
PERLAKUA	1		69.3550	11.0621	10
PERLAKUA	2		75.6150	12.3970	10
PERLAKUA	3		7.8500	16.6701	10

Total Cases = 30

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable KELLIMFE
By Variable PERLAKUA

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	29139.7502	14569.8751	100.7368	.0000
Within Groups	27	3905.0923	144.6330		
Total	29	33044.8424			

----- O N E W A Y -----

Variable KELLIMFE
By Variable PERLAKUA

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 8.5039 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
with the following value(s) for RANGE: 2.90

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

			G G G
			r r r
			p p p
			3 1 2
Mean	PERLAKUA		
9.1000	Grp 3		
72.1250	Grp 1	*	
77.9200	Grp 2	*	

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3
Mean	9.1000

Subset 2

Group	Grp 1	Grp 2
Mean	72.1250	77.9200

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable LIMPA
By Variable PERLAKUA

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	28047.1595	14023.5798	75.9472	.0000
Within Groups	27	4985.5225	184.6490		
Total	29	33032.6820			

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable LIMPA
By Variable PERLAKUA

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 9.6086 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.90

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

			G G G
			r r r
			p p p
			3 1 2
Mean	PERLAKUA		
7.8500	Grp 3		
69.3550	Grp 1	*	
75.6150	Grp 2	*	

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3
Mean	7.8500

Subset 2

Group	Grp 1	Grp 2
Mean	69.3550	75.6150

	PERLAKUA	M1	M2	M3	M4	MK
1	1	100	200	800	3200	1075
2	1	50	100	200	1600	487
3	1	100	100	800	1600	650
4	1	100	100	800	200	300
5	1	50	100	200	200	137
6	1	100	200	800	800	475
7	1	100	100	800	1600	650
8	1	100	100	800	1600	650
9	1	100	200	800	3200	1075
10	1	50	100	200	200	137
11	2	50	200	1600	12800	3662
12	2	100	3200	3200	6400	3225
13	2	50	800	6400	1600	2212
14	2	100	1600	12800	12800	6825
15	2	50	3200	1600	12800	4412
16	2	100	200	3200	12800	4075
17	2	100	800	6400	6400	3425
18	2	50	1600	12800	12800	6812
19	2	50	200	1600	1600	862
20	2	100	3200	3200	6400	322
21	3	100	50	200	200	137
22	3	50	50	100	100	75
23	3	50	100	100	100	87
24	3	50	50	100	50	62
25	3	100	50	200	100	112
26	3	50	50	100	50	62
27	3	50	100	100	200	112
28	3	50	50	100	100	75
29	3	50	50	50	100	62
30	3	100	50	50	100	75

Number of cases read: 30

Number of cases listed: 30

- - Description of Subpopulations - -

Summaries of M1
By levels of PERLAKUA perlakuan

Variable	Value	Label	Mean	Std Dev	Cases
For Entire Population			75.0000	25.4274	30
PERLAKUA	1	Parafin-Lanolin	85.0000	24.1523	10
PERLAKUA	2	Montanide ISA 206	75.0000	26.3523	10
PERLAKUA	3	Kontrol	65.0000	24.1523	10

Total Cases = 30

- - Description of Subpopulations - -

Summaries of M2
 By levels of PERLAKUA perlakuan

Variable	Value	Label	Mean	Std Dev	Cases
For Entire Population			563.3333	981.7238	30
PERLAKUA	1	Parafin-Lanolin	130.0000	48.3046	10
PERLAKUA	2	Montanide ISA 206	1500.0000	1279.7569	10
PERLAKUA	3	Kontrol	60.0000	21.0819	10

Total Cases = 30

- - Description of Subpopulations - -

Summaries of M3
 By levels of PERLAKUA perlakuan

Variable	Value	Label	Mean	Std Dev	Cases
For Entire Population			2003.3333	3385.2859	30
PERLAKUA	1	Parafin-Lanolin	620.0000	289.8275	10
PERLAKUA	2	Montanide ISA 206	5280.0000	4336.1017	10
PERLAKUA	3	Kontrol	110.0000	51.6398	10

Total Cases = 30



- - Description of Subpopulations - -

Summaries of M4
 By levels of PERLAKUA perlakuan

Variable	Value	Label	Mean	Std Dev	Cases
For Entire Population			3390.0000	4675.9178	30
PERLAKUA	1	Parafin-Lanolin	1420.0000	1121.3088	10
PERLAKUA	2	Montanide ISA 206	8640.0000	4722.3346	10
PERLAKUA	3	Kontrol	110.0000	51.6398	10

Total Cases = 30

- - Description of Subpopulations - -

Summaries of MK
 By levels of PERLAKUA perlakuan

Variable	Value	Label	Mean	Std Dev	Cases
For Entire Population			1410.9000	1990.2023	30
PERLAKUA	1	Parafin-Lanolin	563.6000	332.1031	10
PERLAKUA	2	Montanide ISA 206	3583.2000	2158.7878	10
PERLAKUA	3	Kontrol	85.9000	25.9163	10

Total Cases = 30

----- O N E W A Y -----

Variable M1
By Variable PERLAKUA perlakuan

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	2000.0000	1000.0000	1.6119	.2181
Within Groups	27	16750.0000	620.3704		
Total	29	18750.0000			

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable M1
By Variable PERILAKUA perlakuan

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 17.6121 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.90

- No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 2	Grp 1
Mean	65.0000	75.0000	85.0000

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable M2
By Variable PERLAKUA perlakuan

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	13184666.67	6592333.333	12.0551	.0002
Within Groups	27	14765000.00	546851.8519		
Total	29	27949666.67			

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable M2
By Variable PERLAKUA perlakuan

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 522.9014 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.90

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	PERLAKUA	
		G G G
		r r r
		p p p
		3 1 2
60.0000	Grp 3	
130.0000	Grp 1	
1500.0000	Grp 2	* *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 1
Mean	60.0000	130.0000

Subset 2

Group	Grp 2
Mean	1500.0000

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable M3
By Variable PERLAKUA perlakuan

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	162348666.7	81174333.33	12.8927	.0001
Within Groups	27	169996000.0	6296148.148		
Total	29	332344666.7			

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable M3
By Variable PERLAKUA perlakuan

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 1774.2813 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 2.90

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

			G G G
			r r r
			p p p
			3 1 2
Mean	PERLAKUA		
110.0000	Grp 3		
620.0000	Grp 1		
5280.0000	Grp 2	* *	

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 1
Mean	110.0000	620.0000

Subset 2

Group	Grp 2
Mean	5280.0000

----- O N E W A Y -----

Variable M4
By Variable PERLAKUA perlakuan

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	422018000.0	211009000.0	26.8682	.0000
Within Groups	27	212044000.0	7853481.481		
Total	29	634062000.0			

----- O N E W A Y -----

Variable M4
By Variable PERLAKUA perlakuan

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 1981.6006 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
with the following value(s) for RANGE: 2.90

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

		G G G
		r r r
		p p p
		3 1 2
Mean	PERLAKUA	
110.0000	Grp 3	
1420.0000	Grp 1	
8640.0000	Grp 2	* *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 1
Mean	110.0000	1420.0000

Subset 2

Group	Grp 2
Mean	8640.0000

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable MK
 By Variable PERLAKUA perlakuan

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	71924295.80	35962147.90	22.6114	.0000
Within Groups	27	42941958.90	1590442.922		
Total	29	114866254.7			

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Variable MK
By Variable PERLAKUA perlakuan

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 891.7519 * RANGE * SQRT(1/N(I) + 1/N(J))$
 with the following value(s) for RANGE: 2.90

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

		G G G
		r r r
		p p p
		3 1 2
Mean	PERLAKUA	
85.9000	Grp 3	
563.6000	Grp 1	
3583.2000	Grp 2	* *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 1
Mean	85.9000	563.6000

Subset 2

Group	Grp 2
Mean	3583.2000

----- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS -----
 OBSERVED VALUES (Cell format: count/ percent:total/ percent:row/ percent:col)

	HIDUP	MATI	TOTAL
P1	1 2.50 5.00 100.00	19 47.50 95.00 48.72	20 50.00
P2	0 .00 .00 .00	20 50.00 100.00 51.28	20 50.00
TOTAL	1 2.50	39 97.50	40 100.00

CHI-SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = .000, PROB.=1.0000

CHI-SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 1.026, PROB.= .3112

D.F. = 1

FISHER EXACT PROBABILITY: Lower Tail =1.0000, Upper Tail = .5000

----- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS -----
 OBSERVED VALUES (Cell format: count/ percent:total/ percent:row/ percent:col)

	MATI	HIDUP	TOTAL
P1	1 1.67 5.00 4.76	19 31.67 95.00 48.72	20 33.33
P2	0 .00 .00 .00	20 33.33 100.00 51.28	20 33.33
P3	20 33.33 100.00 95.24	0 .00 .00 .00	20 33.33
TOTAL	21 35.00	39 65.00	60 100.00

CHI-SQUARE = 55.824, D.F. = 2, PROB. = 8.100E-13

----- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS -----
 OBSERVED VALUES (Cell format: count/ percent:total/ percent:row/ percent:col)

	MATI	HIDUP	TOTAL
P1	1 2.50 5.00 4.76	19 47.50 95.00 100.00	20 50.00
P3	20 50.00 100.00 95.24	0 .00 .00 .00	20 50.00
TOTAL	21 52.50	19 47.50	40 100.00

CHI-SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 32.481, PROB.= 1.211E-08

CHI-SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 36.190, PROB.= 1.865E-09

D.F. = 1

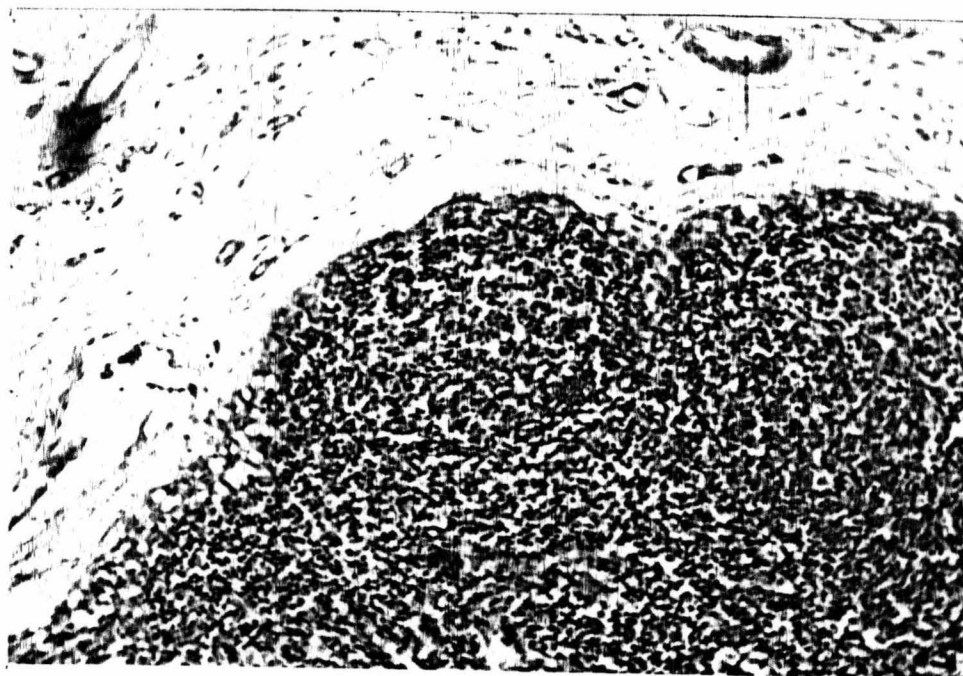
----- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS -----
 OBSERVED VALUES (Cell format: count/ percent:total/ percent:row/ percent:col)

	MATI	HIDUP	TOTAL
P2	0 .00 .00 .00	20 50.00 100.00 100.00	20 50.00
P3	20 50.00 100.00 100.00	0 .00 .00 .00	20 50.00
TOTAL	20 50.00	20 50.00	40 100.00

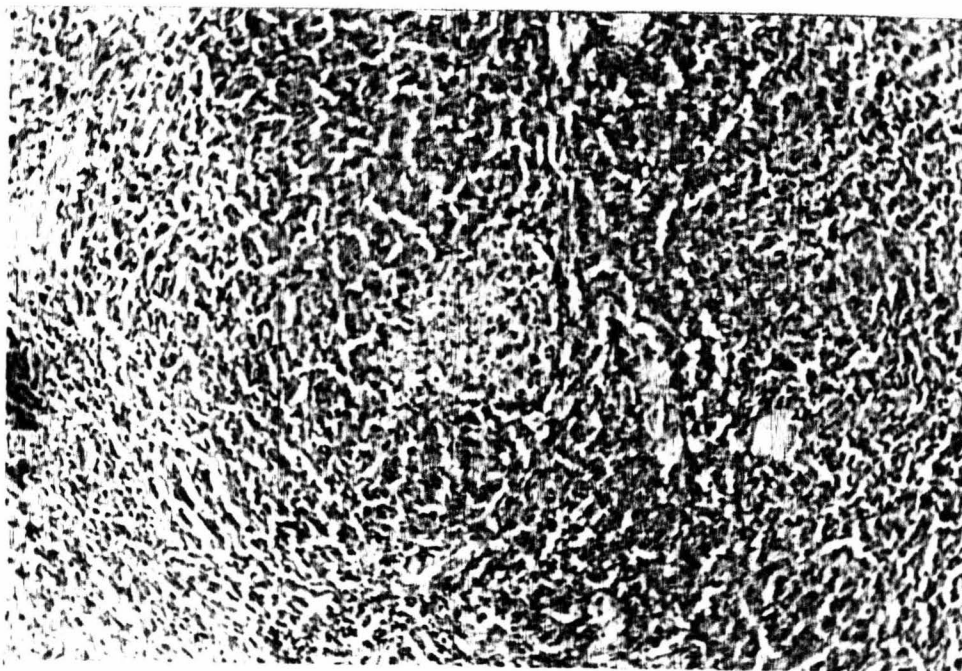
CHI-SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 36.100, PROB.= 1.950E-09

CHI-SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 40.000, PROB.= 3.293E-10

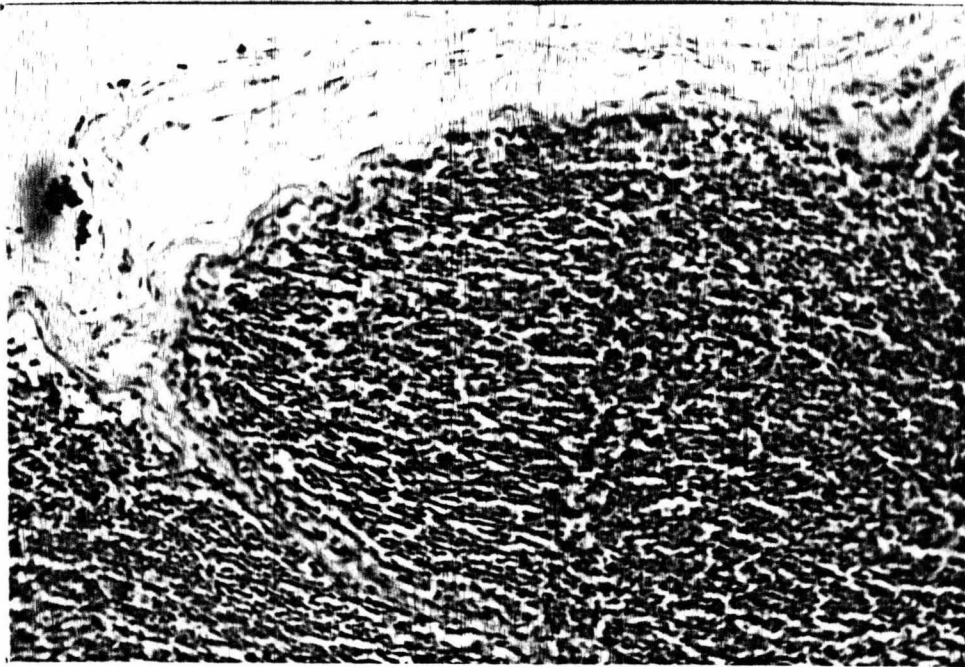
D.F. = 1



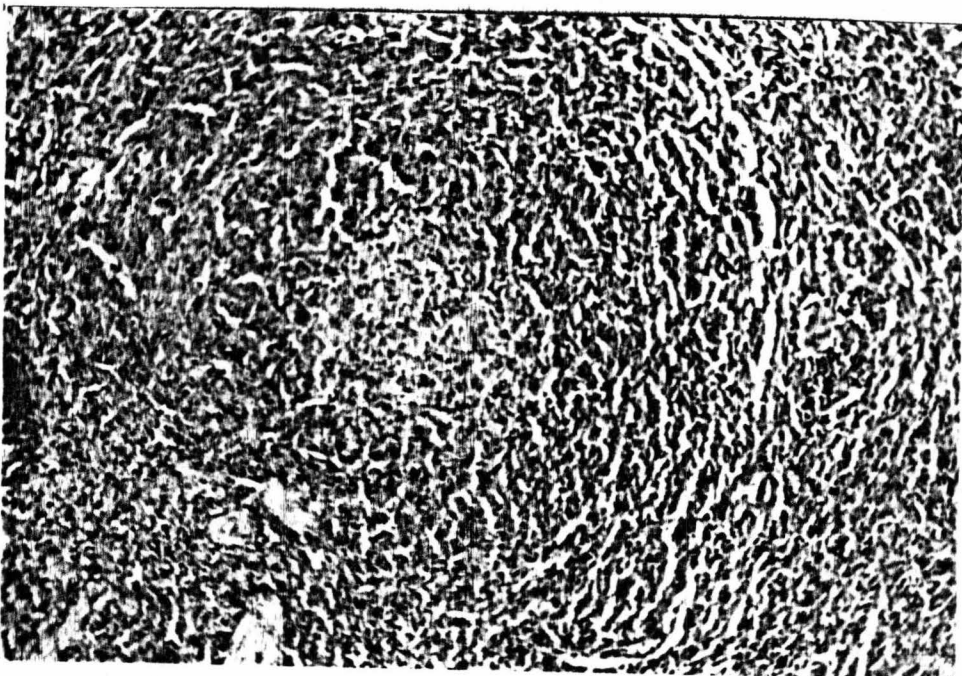
Gambar 1. Pusat germinal kelenjar limfe dari kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafinlanolin.



Gambar 2. Pusat germinal limpa dari kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan parafinlanolin.



Gambar 3. Pusat germinal kelenjar limfe dari kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206.



Gambar 4. Pusat germinal limpa dari kelinci yang disuntik vaksin SE adjuvan montanide ISA 206.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA