

SKRIPSI

PENGGUNAAN CAIRAN PERITONIAL DARI MENCIT YANG DIRANGSANG DENGAN BERBAGAI MACAM ANTIGEN SEBAGAI ADJUVAN VAKSIN ND AKTIF



OLEH :

BAGUS SUKARLAN

BLORA - JAWA TENGAH

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
S U R A B A Y A
1 9 9 8**

PENGGUNAAN CAIRAN PERITONIAL DARI MENCIT
YANG DIRANGSANG DENGAN BERBAGAI MACAM ANTIGEN
SEBAGAI ADJUVAN VAKSIN ND AKTIF

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

OLEH :

BAGUS SUKARLAN

069311990

Menyetujui
Komisi Pembimbing



BUDI SANTOSO, Drh
(Pembimbing Pertama)



SUWARNO, M.Si., Drh
(Pembimbing Kedua)

**PENGGUNAAN CAIRAN PERITONIAL DARI MENCIT
YANG DIRANGSANG DENGAN BERBAGAI MACAM ANTIGEN
SEBAGAI ADJUVAN VAKSIN ND AKTIF**

BAGUS SUKARLAN

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas cairan peritoneal dari mencit yang sebelumnya dirangsang dengan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dan virus ND aktif sebagai adjuvan vaksin ND aktif.

Sebanyak 8 ekor mencit dibagi secara acak menjadi 2 kelompok. Mencit kelompok pertama disuntik dengan BSA dan kelompok ke dua dengan virus ND aktif secara intra peritoneal. Satu minggu setelah penyuntikan dilakukan pemanenan cairan peritoneal, untuk dipakai sebagai adjuvan vaksin ND aktif.

Sebanyak 27 ekor ayam jantan petelur CP 909 dibagi secara acak menjadi tiga kelompok, yaitu K1, K2 dan K3. Umur 3 hari semua ayam divaksin ND stain Lasota dengan cara tetes mata.

Ayam ketika berumur tiga minggu dilakukan vaksinasi ke dua. Kelompok perlakuan pertama (K1) divaksin dengan vaksin ND yang dicampur dengan cairan peritoneal yang dirangsang dengan BSA; kelompok perlakuan ke dua (K2) dengan vaksin ND yang dicampur cairan peritoneal yang dirangsang dengan virus ND aktif; dan kelompok perlakuan ke tiga (K3) sebagai kontrol dengan vaksin ND yang dicampur dengan NaCl fisiologis 0,9%. Vaksinasi dilakukan dengan cara intra muskular.

Pemeriksaan titer antibodi dengan menggunakan uji hambatan hemaglutinasi (HI) dilakukan satu hari sebelum vaksinasi ke dua serta satu, dua, dan tiga minggu paska vaksinasi ke dua.

Hasil penelitian menunjukkan cairan peritoneal mencit yang sebelumnya dirangsang dengan BSA mampu meningkatkan titer antibodi ayam dan berbeda nyata dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Vaksinasi dengan campuran cairan peritoneal mencit yang sebelumnya dirangsang dengan virus ND aktif tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok kontrol ($p > 0,05$).

KATA PENGANTAR

Pemakaian adjuvan vaksin merupakan salah satu pilihan untuk meningkatkan tanggap kebal. Sampai saat ini adjuvan sudah banyak macamnya yang salah satunya adalah Sitokin. Dalam tulisan ini dibahas pemakaian cairan peritoneal men-
cit sebagai adjuvan vaksin yang sebelumnya dirangsang dengan berbagai antigen, sehingga didalam cairan peritoneal tersebut mengandung berbagai macam sitokin.

Pada kesempatan ini Penulis sampaikan terima kasih yang setulusnya kepada:

1. Bapak Budi Santoso, M.S., Drh selaku dosen pembimbing pertama dan Bapak Suwarno, M.S., Drh selaku dosen pembimbing kedua yang sudah sudi memberikan bimbingan, saran, nasehat dan informasi penulis dari awal hingga akhir dalam menyelesaikan tulisan ini.
2. Kepala Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga beserta semua staf dan karyawannya.
3. Dr. Fedik Abdul Ratam, Drh; Susilohadi Widjayanto, M.S., Drh; Anita Asali, M.S., Drh yang sudah memberi petunjuk sehingga tulisan ini bisa menjadi lebih baik.

4. Bapak dan Ibu tercinta, kakak-kakak, serta keponakan tersayang atas dorongan, nasehat, doa restu yang tiada henti.
5. Rekan-rekan, teman-teman dan sahabatku yang tidak bisa saya sebutkan secara satu persatu atas batuan baik moril maupun material yang sudah diberikan selama ini.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna, tetapi penulis senantiasa berharap hasil-hasil yang dituangkan dalam tulisan ini memberikan manfaat terutama bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Juli 1998

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
INTISARI.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I : PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan.....	4
1.4. Manfaat.....	4
1.5. Landasan Teori.....	4
1.6. Hipotesis.....	6
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Pencegahan Penyakit ND.....	7
2.2. Adjuvan Vaksin.....	8
2.3. Sitokin.....	9
2.4. Sitokin sebagai adjuvan Vaksin	11
2.5. Sistem Kekebalan Tubuh	12
BAB III : MATERI DAN METODE.....	17
3.1. Tempat dan waktu	17
3.2. Materi.....	17
3.2.1. Bahan.....	17

3.2.2. Alat.....	17
3.3. Metode.....	18
3.3.1. Penyiapan Adjuvan.....	18
a. Perlakuan Mencit.....	18
b. Pemanenan Adjuvan.....	18
c. Pencampuran Adjuvan dengan vaksin ND aktif.....	20
3.3.2. Perlakuan Ayam.....	20
a. Sampel.....	20
b. Perlakuan Vaksinasi.....	31
3.3.3. Pengamatan.....	22
a. Cara membuat Suspensi eritrosit 0,5%	22
b. Uji Haemaglutinasi (HA) Mikroteknis.....	23
c. Cara Membuat Antigen 4HA Unit.....	24
d. Uji Hambatan Haemaglutinasi (HI) Mikroteknik.....	25
e. Analisis Hasil Penelitian.....	26
BAB IV : HASIL PENELITIAN.....	27
BAB V : PEMBAHASAN.....	29

BAB VI	: KESIMPULAN DAN SARAN.....	33
	6.1. Kesimpulan.....	33
	6.2. Saran.....	33
RINGKASAN.....		34
DAFTAR PUSTAKA.....		36
LAMPIRAN.....		38

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Sitokin dan Sumbernya, Sasaran dan Pengaruhnya...	11
2. Beberapa Limfokin bukan Khusus Antigen yang di hasilkan oleh Sel T setelah Rangsangan Antigen Invitro.....	15
3. Rata-rata Titer Antibodi Ayam Masing-masing Kelompok Perlakuan Paska Vaksinasi Kedua.....	28
4. Rata-rata Titer Antibodi Ayam Satu, Dua dan Tiga Minggu Paska Vaksinasi Kedua.....	28

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Tanggap sel B terhadap Antigen.....	16

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Titer Antibodi Satu Hari Sebelum Vaksinasi Kedua...	38
2. Titer Antibodi Satu, Dua, dan Tiga Minggu Paska Vaksinasi Kedua.....	39
3. Perhitungan Rancangan Acak Terbagi Titer Antibodi Paska Vaksinasi Kedua.....	40
4. Sidik Ragam Rancangan Petak Terbagi Titer Antibodi paska vaksinasi kedua.....	42
5. Uji BNJ 5 % Titer Antibodi Ayam Satu, Dua dan Tiga minggu paska vaksinasi Kedua	43
6. Uji BNJ 5 % Titer Antibodi ND Ayam masing-masing Kelompok Perlakuan Paska Vaksinasi Kedua.....	44

EAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Newcastle Disease (ND) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus. Pada negara-negara berkembang seperti Indonesia, ND merupakan penyakit menular yang sangat merugikan pada peternakan unggas (Anonimus, 1988). Kerugian itu antara lain disebabkan karena kematian unggas, merosotnya produksi telur, biaya operasional, biaya obat dan biaya vaksin (Anonimus, 1995).

Pencegahan penyakit virus dengan menggunakan vaksin menggambarkan suatu kemajuan imunologi yang sangat penting, karena agen terapeutik tidak efektif melawan penyakit virus. Pemakaian vaksin untuk mencegah penyakit virus merupakan pilihan utama, tetapi perkembangan menyeluruh dalam pembuatan vaksin bukan tanpa resiko. Banyak vaksin baru yang telah dikembangkan punya reaksi yang merugikan (Bellanti dan Robinson, 1993).

Tujuan utama dari vaksinasi adalah menghindari kerugian akibat serangan dari suatu penyakit dengan memberikan suatu zat yang dapat merangsang kekebalan pada hewan, namun demikian kegagalan vaksinasi masih sering terjadi (Suripto, 1993). Salah satu cara untuk mengurangi resiko kegagalan dalam vaksinasi dapat diantisipasi dengan memberikan bahan tambahan untuk meningkatkan tanggap kebal.

Bahan tambahan yang dapat membantu meningkatkan reaksi kebal tersebut disebut adjuvan (Tizard, 1988).

Menurut Roitt (1988) dalam cairan peritoneal rodensia mengandung sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag. Peran utama dari makrofag adalah melakukan fagositosis dan menghancurkan partikel asing serta jaringan mati dan mengolah bahan asing sedemikian rupa sehingga bahan asing tersebut dapat membangkitkan tanggap kebal (Tizard, 1988). Sel NK berperan utama dalam tanggap kebal terhadap virus, yaitu dalam mengolah dan menyajikan antigen. Sel NK (*Natural Killer*) mempunyai kemampuan untuk membunuh sel terinfeksi virus. Pengaktifan sel NK dirangsang oleh virus diperantarai interferon yang bekerja sinergis dengan IL-2 (*Interleukin 2*). Sel NK itu sendiri dalam membunuh sel terinfeksi virus mengeluarkan berbagai sitokin termasuk interferon dan TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (Fenner *et al.*, 1995).

Dalam melakukan aktivitasnya makrofag menghasilkan monokin. Monokin merupakan mediator untuk menimbulkan reaksi demam akibat suatu infeksi yang kini bisa diketahui terdiri empat jenis yaitu IL-1 (*Interleukin 1*), INF- α (*Interferon alfa*), IL-6 (*Interleukin 6*) dan TNF. *Interleukin 1* berperan meningkatkan fungsi limfosit T dan merangsang produksi limfokin seperti IL-2, CSF (*Colony Stimulating Factor*) dan LDCF (*Lymphocyte Derive Chemotactic Factor*) (Subowo, 1991).

Monokin dihasilkan oleh monosit/makrofag dan limfokin yang dihasilkan oleh limfosit merupakan jenis sitokin berdasarkan sel penghasil utamanya (Subowo, 1991). Sitokin mempunyai kepentingan yang sangat efektif sebagai adjuvan vaksin dari berbagai reaksi yang di induksi virus, bakteri dan parasit. Sitokin sebagai adjuvan dimungkinkan akan bisa meningkatkan efek perlindungan dan mengurangi efek negatif yang ditimbulkan vaksin. Hal tersebut sudah dibuktikan ketika IL-1 digunakan sebagai adjuvan vaksin malaria pada mencit, sebagai hewan coba bisa meningkatkan perlindungan terhadap infeksi penyakit tersebut. Interferon gamma (INF-g) juga pernah digunakan sebagai adjuvan vaksin *Plasmodium yoellip* pada tikus yang digunakan sebagai hewan coba dengan sistim kekebalan tidak normal. Hasil dari pemakaian interferon gamma sebagai adjuvan vaksin tersebut dapat memberi perlindungan sampai mencapai 100%. Juga pemakaian IL-2 bisa meningkatkan perlindungan terhadap *Haemophilus pleuropneumoniae* (Heath dan Playfair, 1992).

1.2. Rumusan Masalah

Bertitik tolak dari latar belakang di atas maka timbul permasalahan:

1. Apakah cairan peritoneal dari mencit yang dirangsang dengan virus ND dan BSA, dapat digunakan sebagai adjuvan vaksin?

2. Apakah terdapat peningkatan titer antibodi pada ayam yang divaksin ND aktif dengan menggunakan adjuvan cairan peritoneal mencit?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui:

1. Mengetahui cairan peritoneal dari mencit yang dirangsang dengan virus ND aktif dan BSA (*Bovin Serum Albumin*) dapat digunakan sebagai adjuvan vaksin ND, sehingga dapat membantu meningkatkan keberhasilan vaksinasi.
2. Mengetahui adanya peningkatan titer antibodi pada ayam setelah divaksin ND aktif dengan adjuvan cairan peritoneal mencit.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian diharapkan bisa memberikan suatu informasi tentang pemanfaatan cairan peritoneal mencit sebagai adjuvan vaksin yang bisa meningkatkan tanggap kebal ayam terhadap penyakit ND. Sehingga pada akhirnya bisa dikembangkan lebih lanjut untuk mencegah penyakit virus pada umumnya.

1.5. Landasan Teori

Sel-sel imun pada cairan peritoneal mencit apabila dirangsang dengan suatu imunogen, akan dapat menghasilkan

sitokin. Sitokin sudah terbukti dapat berperan sebagai adjuvan (Heath dan Playfair, 1992).

Bovin Serum Albumin (BSA) dapat merangsang mencit untuk memproduksi IL-1. Menurut laporan Staruch dan Wood (1983) disunting Heath dan Playfair (1992) ketika menyuntikan BSA setelah dua hari dapat diperoleh 1000 - 3000 *limfosit activating factor* (LAF) yang merupakan IL-1 alami. *Limfosit activating factor* bisa diperoleh dari biakan sel-sel yang melekat pada daerah perifer (monosit) dan substansi tersebut dibakukan namanya menjadi IL-1 (Subowo, 1991).

Virus ND aktif, seperti juga virus Rabies dan Herpes Simplex, sangat memungkinkan digunakan merangsang mencit untuk menghasilkan sitokin yang dapat digunakan sebagai adjuvan. Virus Rabies dan virus Herpes simplex dapat merangsang mencit menghasilkan IL-2, setelah lima sampai tujuh hari dari waktu penyuntikan (Heath dan Playfair, 1992).

Penyuntikan BSA dan virus ND aktif pada mencit dilakukan secara intra peritoneal. Menurut Artama (1992) penyuntikan antigen secara intra peritoneal tidak akan mengurangi tanggapan kebal yang sebenarnya. Sehingga dengan menyuntik antigen dengan cara diatas apabila peritoneal dikuras, maka cairan peritoneal yang didapat diharapkan akan mengandung sitokin. Seperti pendapat dari Subowo (1991) sitokin merupakan mediator yang dihasilkan oleh sel

dalam reaksi radang imunologis yang berfungsi sebagai isyarat antara sel-sel untuk mengatur respon setempat dan kadang-kadang sistemik.

Penyuntikan secara intra peritoneal yang dilakukan pada mencit sehingga dapat menghasilkan sitokin sudah dibuktikan, yaitu dengan menyuntikan *Paracoccidioidomycosis* (PCM). Cairan peritoneal mencit yang didapat setelah diriksa mengandung IL-2, IFN-g, IL-4, IL-5 dan IL-10 (Calich dan Kashino, 1998)

1.5. Hipotesis Penelitian

1. Cairan peritoneal dari mencit yang dirangsang dengan virus ND dan BSA akan mengandung sitokin, sehingga cairan peritoneal mencit tersebut dapat dimanfaatkan sebagai adjuvan vaksin.
2. Vaksin ND aktif yang dicampurkan dengan cairan peritoneal mencit yang dirangsang dengan BSA dan virus ND dapat meningkatkan titer antibodi ayam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pencegahan Penyakit ND

Penyakit ND disebabkan oleh virus yang tergolong virus Paramikso. Virus tersebut mempunyai ciri-ciri sebagai berikut: virionnya pleomorfik dengan diameter 150 nm atau lebih, yang terdiri dari *nukleokapsid* berbentuk *heliks*, amplopnya mengandung dua glikoprotein dan genomnya adalah RNA (Ressang, 1984).

Penularan penyakit ND dapat melalui makanan atau minuman yang tercemar dan udara. Pekerja kandang dan alat-alat transportasi yang tercemar virus juga dapat menjadi sumber penularan. Penularan juga bisa terjadi secara vertikal melalui telur dari induk yang sakit, apabila telur itu menetas maka anak ayam tersebut terinfeksi virus ND (Anonimus, 1988).

Hewan supaya tidak terserang penyakit ND dapat dicegah dengan manajemen sanitasi dan pelaksanaan vaksinasi (Azmiyah, 1989). Tindakan vaksinasi pada ayam sangat mutlak dan harus dilakukan untuk mencegah penyakit ini, karena antibodi yang terbentuk akibat vaksinasi dapat melindungi ayam terhadap serangan virus ND (Anonimus, 1988).

Banyak faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan program vaksinasi yaitu adanya respon hewan, mutu vaksin, cara vaksinasi, lingkungan dan tata laksana pemeliharaan hewan. Dalam melakukan vaksinasi, penggunaan adjuvan sering merupakan upaya pilihan untuk membantu meningkatkan tanggap kebal ternak terhadap penyakit infeksi (Naibaho, 1991).

2.2. Adjuvan Vaksin

Bahan yang dicampurkan dengan vaksin untuk meningkatkan respon kekebalan dinamakan adjuvan. Adjuvan bekerja dengan cara memperpanjang masa respon imunogen, memperbesar efektivitas imunogen dan merangsang makrofag atau sel imun lainnya untuk mengenal antigen yang masuk. Adjuvan bisa bekerja dengan salah satu atau lebih dengan cara yang telah disebutkan diatas (Daniel *et al.*, 1994).

Menurut Belanti dan Robinson (1993) zat-zat yang bisa digunakan sebagai potensiator sistim kekebalan secara tidak spesifik dinamakan adjuvan. Adjuvan sekarang ini terdiri dari banyak macam yaitu emulsi minyak dan air misalnya adjuvan Freund, mikroorganisme misalnya BCG (*Bacille calmette guerin*), polinukleotida sintetik misalnya asam poliinosinat, komponen-komponen mikroorganisme misalnya lipopolisakarida dan endotoksin, agen farmakologi misalnya levamisol, dan limfokin misalnya interleukin dan interferon.

Adjuvan disamping bisa meningkatkan respon imun juga bisa menimbulkan efek negatif sehingga penggunaannya dibatasi misalnya adjuvan Freund yang terdiri campuran minyak dengan mikobakterium yang dimatikan dilarang digunakan pada manusia, karena bisa menimbulkan granuloma (Bellanti dan Robinson, 1993). Minyak yang berada dalam adjuvan mendorong terjadinya reaksi peradangan lokal dan membentuk granuloma disekitar tempat suntikan. Adjuvan lainya yang bekerja dengan cara membentuk depo seperti alumunium hidroksida, alumunium fosfat, alumunium kalium sulfat (alum) dan berilium sulfat, apabila digunakan dengan disuntikan pada hewan maka akan terbentuk suatu granuloma lokal (Tizard, 1988).

2.3. Sitokin

Sitokin berdasarkan jenis sel penghasil utamanya dibedakan menjadi monokin sebagai hasil dari monosit/makrofag dan limfokin sebagai hasil dari limfosit. Limfokin merupakan termasuk golongan protein yang diproduksi oleh limfosit, bisa diaktifkan pada tanggap kebal selular (Subowo, 1991). Menurut Baratawidjaja (1991) limfokin ternyata banyak diproduksi bukan dari limfosit saja. Oleh karena itu istilah yang lebih tepat adalah sitokin. Hal itu sama juga dengan INF yang sekarang ternyata diproduksi limfosit sehingga dapat pula digolongkan sebagai limfokin, keduanya bisa disebut sitokin meskipun

istilah limfokin dan interferon masih tetap digunakan.

Limfokin dihasilkan oleh limfosit T. Dalam keluarga limfokin ini dapat diidentifikasi dan diisolasi dengan nama, IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 dan GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*). Limfokin berperan dalam banyak tanggapan kebal seperti aktifitas sel T, sel B, monosit, dan makrofag, induksi sitotoksitas dan inflamasi (Baratawidjaja, 1991).

Monokin merupakan mediator yang muncul di daerah infeksi. Monokin sebagai hasil utama dari monosit/makrofag tetapi bisa dihasilkan dari sel lain. Monokin dapat diidentifikasi menjadi beberapa jenis yaitu IL-1, TNF, IFN- α , dan IL-6 (Subowo, 1991).

Sitokin (Tabel 2.1) dapat mempengaruhi patogenitas dari virus melalui berbagai cara: (1) meningkatkan tanggapan kebal, misalnya dari sel T sitotoksik oleh faktor nekrosis tumor atau IFN- γ yang mengatur tingkat ekspresi protein; (2) pengaturan respon imun misalnya, pengalihan antibodi oleh IL-4, IL-5, IL-6, atau IFN- γ ; (3) penekanan sistem kekebalan, misalnya IL-10 bisa menghambat sintesis IFN- γ ; (4) penghambatan replikasi virus oleh interferon; (5) pengaturan-meningkat dari ekspresi gen virus, misalnya TNF- α dan IL-6, yang berikatan dengan reseptornya pada sel T (Fenner *et al.*, 1995).

Tabel 2.1. Sitokin dan Sumbernya, Sasaran, dan Pengaruhnya

Sitokin	Sumber utama	Prinsip Sasaran/Pengaruhnya
IL-1	Monosit/makrofag	Proliferasi sel T; ekspresi reseptor IL-2; antibodi; demam
IL-2	Sel T	Proliferasi dan diferensiasi sel T
IL-3	Sel T	Hematopoiesis, sel batang dan sel mast
IL-4	Sel T, sel stroma sussum tulang	Proliferasi dan diferensiasi B, T, M, berubah ke Ig G1, IgE
IL-5	Sel T	Proliferasi dan diferensiasi B, E; berubah ke IgA
IL-6	sel T, makrofag, yang lain	Proliferasi dan diferensiasi limfosit; antibodi; demam
IL-7	Sel stroma, sussum tulang	Proliferasi sel pra-B dan pra-T
IL-8	Beragam	Kematosis, neutrofil dan sel T
TNF α , β	Monosit, yang lain	Proliferasi dan diferensiasi sel batang, T, B, M, N, F, demam
TGF β	Beragam	Proliferasi mencegah T, B dan sel batang
INF α , β	Lukosit, yang lain	Anti virus, demam
INF- γ	Sel Th	Anti virus; penaktifan M, NK IgG2a; pengaturan mensek MHC
GM-CSF	T, M, F, endotel	Hematopoiesis, granulasit, monosit

Sumber: Fenner *et al.*, (1995)

2.4. Sitokin Sebagai Adjuvan Vaksin

Dua aktivitas penting suatu zat yang mempunyai efek sebagai adjuvan adalah: berikatan dengan antigen sehingga bisa mempengaruhi limfosit dengan membentuk depo dan induksi sitokin sehingga merangsang fungsi limfosit untuk berproliferasi dan berdeferensiasi (Roitt *et al.*, 1996). Sitokin mampu menambah reaktivitas imunologis dengan meningkatkan sistim kekebalan secara tidak spesifik atau umum. Sitokin bisa meningkatkan tanggap kebal humoral dan sellular terhadap antigen yang sangat bervariasi sehingga merangsang terjadinya proliferasi, diferensiasi dan aktivitas sel-sel pengatur sistim kekebalan (Bellanti dan Robinson, 1993).

Sitokin (*natural mediator*) yang sudah pernah diguna-

kan penelitian sebagai adjuvan vaksin untuk manusia antara lain IL-1, IL-2 dan INF-g (Roitt *et al.*, 1996). Interleukin 1 ketika digunakan sebagai adjuvan bisa meningkatkan produksi antibodi terhadap rangsangan suatu antigen. Interleukin-1 merangsang peningkatan produksi dan aktivasi Th (T helper) (Heath dan Playfair, 1992), sehingga bisa memperkuat proliferasi, difrensiasi dan fungsi produksi antibodi oleh limfosit B (Subowo, 1991). Interleukin-2 sebagai adjuvan kerjanya hampir sama dengan IL-1, yaitu dengan cara meningkatkan aktivitas sel Th (Heath dan Playfair, 1992)

2.5. Sistim Kekebalan Tubuh

Masuknya zat asing ke dalam tubuh makhluk hidup akan merangsang timbulnya mekanisme kekebalan di dalam makhluk hidup. Mekanisme kekebalan ini dibentuk oleh tubuh dengan tujuan untuk mempertahankan dan melindungi diri dari serangan zat asing yang masuk (Tizard, 1988).

Tubuh vertebrata terdapat dua macam mekanisme kekebalan yaitu kekebalan tidak spesifik dan kekebalan spesifik. Mekanisme kekebalan spesifik terdiri dari dua macam yaitu kekebalan berperantara sel dan kekebalan humoral (Frandsen, 1986).

Antigen yang masuk ke dalam tubuh akan ditelan makrofag atau monosit untuk diolah sedemikian rupa hingga bersifat imunogenik (bahan yang dapat menimbulkan tanggapan kebal). Selanjutnya makrofag akan berkontak erat dengan

sel imunokompeten, yang dalam hal ini adalah sel limfosit T (Tizard, 1988). Pada hewan baik mamalia maupun unggas sel limfosit T berasal dari sel-sel sumsum tulang yang diproses didalam timus (organ limfoid primer) yang kemudian bergerak menuju ke jaringan limfoid sekunder (Frandsen, 1986).

Pada kontak pertama di bawah pengaruh imunogen, sel limfosit T akan berproliferasi menghasilkan sel T teraktivasi (sel T efektor) dan sel T memori. Interaksi antara antigen spesifik dengan sel T teraktivasi, akan menyebabkan sel T teraktivasi membebaskan limfokin. Limfokin merupakan protein biologi aktif, terdiri dari berbagai faktor yang terlarut di dalamnya (tabel 2.2). Limfokin selanjutnya akan berinteraksi dengan makrofag untuk menghancurkan dan mematikan antigen. Sementara itu, dengan adanya sel T memori tanggap kebal seolah-olah menyimpan ingatan tentang kejadian ini, sehingga pada kontak ulang dengan antigen yang sama, tanggap kebal akan bekerja jauh lebih efisien bila dibanding dengan tanggap kebal pada kontak pertama. Hal ini terjadi karena pada kontak ulang dengan antigen yang sama, sel T memori akan lebih cepat berproliferasi menjadi sel T teraktivasi untuk selanjutnya mengulang kembali tanggap kebal sebagaimana sebelumnya (Tizard, 1988).

Imunogen juga disajikan oleh makrofag kepada sel limfosit B. Pada unggas, organ limfoid primer yang ber-

fungsi mengatur produksi dan diferensiasi sel limfosit B adalah bursa Fabricius, suatu organ yang terletak di bagian dorsal kloaka. Seperti halnya timus, pada ayam bursa Fabricius mencapai ukuran maksimal pada saat ayam berumur satu sampai dua minggu dan setelah itu organ akan mengalami involusi secara perlahan (Tizard, 1988).

Respon sel limfosit B terhadap antigen dapat terjadi karena sel limfosit B memiliki reseptor imunoglobulin (sekaligus merupakan reseptor antigen spesifik) pada permukaannya. Pengikatan antigen pada sel limfosit B ini tidak cukup dengan sendirinya mencetuskan suatu respon kebal. Pemiakan sel limfosit B dikontrol dengan teliti dan biasanya hanya akan terjadi dalam kondisi kritis tertentu. Kondisi krisis tersebut adalah pertama, antigen yang diolah oleh makrofag hanya akan diberikan kepada sel limfosit B, jika antigen tersebut difiksasi pada permukaan makrofag dan kedua, sel limfosit T tertentu yang ada di dekatnya yang disebut sel pembantu, juga harus menanggapi antigen yang sama (Tizard, 1988).

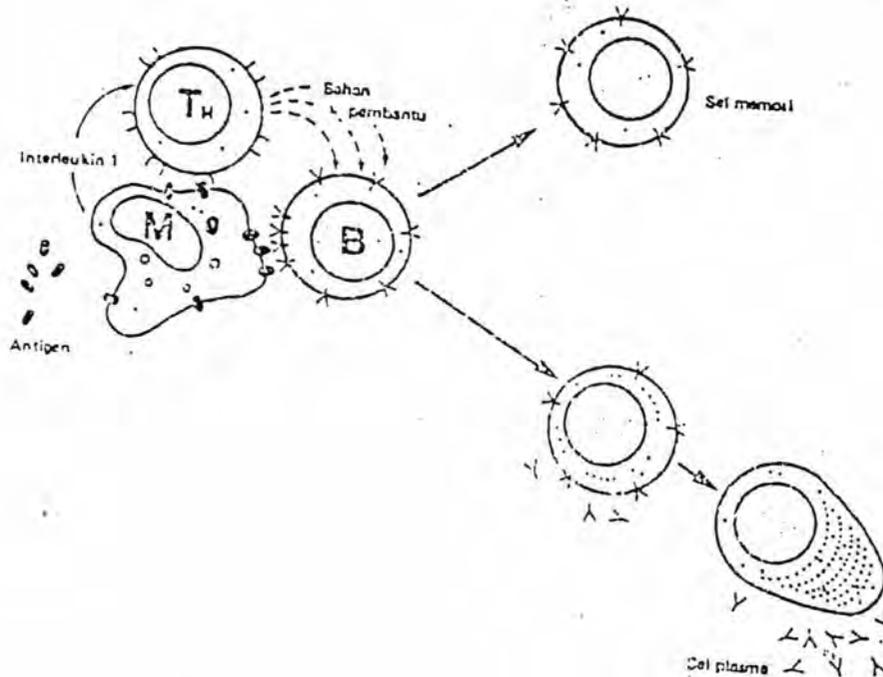
Sel limfosit B dan sel limfosit Th hanya akan tanggap terhadap antigen, bila antigen tersebut terikat pada makrofag. Makrofag akan meningkatkan respon sel limfosit B dengan mengeluarkan bahan pembantu yang disebut IL-1 yang juga berguna untuk mengaktifkan sel Th. Selanjutnya pada saat bertemu dengan antigen terikat makrofag, sel T pembantu mengeluarkan bahan pembantu yang disebut IL-2

yang berguna untuk meningkatkan respon sel limfosit B terhadap antigen. Sekali dirangsang oleh IL-1 dan IL-2, sel limfosit B akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi dua populasi sel yaitu sel plasma dan sel memori sebagaimana terlihat pada gambar 3 dibawah (Tizard, 1988).

Tabel 2.2. Beberapa Limfokin Bukan Khusus Antigen yang dihasilkan Oleh Sel T Setelah Rangsangan Antigen In Vitro

Jenis Faktor	Faktor	Sifat
Faktor yang mempengaruhi makrofag	Faktor hambatan migrasi (FHM) Faktor agregasi makrofag (FAM) Faktor penghilang makrofag (FPHM) Faktor keatolitik makrofag (FKM) Faktor persenjataan makrofag khusus (FPKM) Faktor perangsang makrofag (FPM)	Mencegah migrasi makrofag Menyebabkan agregasi makrofag Membuat makrofag peritoneal melekat pada serosa Menarik makrofag Merangsang aktivitas sitolitik makrofag Merangsang migrasi makrofag
Faktor keatolitik untuk faktor sitolitik dan hambatan pertumbuhan	Neofil, Basofil, Eosinofil, Limfosit (LT) Penghambatan pembuatan AMD (PPA) Faktor penghambat proliferasi (FPP) Faktor supresor	Membunuh sel target Menghambat pembelahan sel yang menjadi sasaran Menghambat proliferasi sel yang menjadi sasaran Menekan reaksi kebal
Faktor perangsang pertumbuhan	Faktor mitogen (FM) Faktor Pengaktivasi Limfosit Interleukin 2 (IL-2) Faktor pembantu Interferon (INF)	Merangsang Pembikisan Limfosit Merangsang tanggap limfosit terhadap antigen Diperlukan untuk aktivasi sel T pembantu Memperantarai aktivasi T-pembantu Meningkatkan reaksi kebal

Sumber : Tizard, 1988.



Gambar 2.1. Tanggap sel B terhadap Antigen.
 Sel B menanggapi perangsang gabungan dari antigen terikat makrofag dan bahan pembantu yang diperoleh dari Sel T dengan berdeferensiasi menjadi sel memori maupun sel plasma penghasil antibodi.

Sumber : Tizard, 1988.

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Materi

3.1.1. Bahan

Ayam petelur jantan CP 909 (30 ekor), mencit (mice) Balb/C yang berumur empat minggu (8 ekor) dari PUSVETMA, BSA, virus ND aktif, pakan ayam komersial, vaksin ND aktif strain lasota produksi dari MEDIVAK, NaCl fisiologis 0,9%, serum ayam, alkohol 70%, klorofom, formalin 10%, KMNO₄, aquadest, antigen ND.

3.1.2. Alat

Kandang jenis *litter* dengan perlengkapannya, kandang mencit dengan perlengkapannya, gunting, pinset, jarum pentul, alas operasi, alat suntik lima dan satu mililiter, tabung serologis, tabung reaksi, freezer, sentrifuse, mikroplet bentuk V, pipet dropper 0,025 ml dan 0,050 ml, mikrodiluter 0,025 ml, venojek, pembakar busen dan korek.

3.2. Tempat dan Waktu

Pemeliharaan ayam dilakukan di Laboratorium Produksi Ternak Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya selama enam minggu. Dimulai pada tanggal 2 Maret sampai tanggal 13 April 1998.

Pemeliharaan mencit dan pemanenan cairan peritoneal mencit dilakukan di Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya selama sebelas hari, yaitu dimulai pada tanggal 16 maret dan pemanenannya dilakukan pada tanggal 23 maret 1998.

3.3 Metode

Penelitian ini dilaksanakan dalam tiga tahap, yaitu penyiapan adjuvan, perlakuan ayam, serta pengamatan.

3.3.1. Penyiapan Adjuvan

a. Perlakuan Mencit

Mencit yang digunakan sebanyak delapan ekor. Dipelihara dalam dua kandang, yang masing-masing kandang diisi empat ekor dan diberi nama sesuai dengan kandangnya.

1. Mencit pada kandang pertama disuntik dengan BSA 20 g/ekor/intra peritoneal.
2. Mencit pada kandang kedua disuntik dengan virus ND aktif 1 dosis/ekor/intra peritoneal.

Setelah masing-masing mencit dalam kandang tersebut diperlakukan seperti di atas ditunggu satu minggu dan dilakukan pemanenan cairan peritoneal.

b. Pemanenan Adjuvan

Pemanenan dilakukan satu minggu setelah penyuntikan antigen. Pemanenan dilakukan secara sendiri-sendiri yaitu dimulai dari kandang pertama dan kedua.

Mencit diambil dari kandang secara satu-persatu kemudian dibunuh dengan menggunakan kloroform yang dimasukkan dalam tabung. Mencit yang sudah mati diambil dan diletakan terlentang pada alas operasi dan difiksasi dengan kanul. Bulu dibagian dada dibasahi dengan alkohol 70%. Dengan menggunakan pinset, kulit dibagian antara rongga perut dan dada diangkat dan selanjutnya dipotong dengan gunting. Dengan teknik preparasi dipisahkan kulit dengan perut dan dada dengan jalan menarik kedua potongan tersebut kedua arah berbeda (ke depan kearah kepala dan ke belakang kearah ekor) sehingga terlihat rongga perut (Artama, 1992).

Larutan NaCl fisiologis sebanyak 5 ml disuntikkan kedalam rongga peritoneal, kemudian dipijat (*masage*) selama lima menit. Cairan yang berada dirongga peritoneal tersebut diisap kembali dengan menggunakan suntikan, kemudian ditampung ditabung reaksi yang telah diberi tanda sesuai dengan kandang. Dari 5 ml yang disuntikkan dapat diperoleh kembali cairan peritoneal mencit antara 3 - 4 ml, sehingga dari 4 ekor tersebut bisa diperoleh 12 -16 ml. Tabung yang telah berisi cairan peritoneal disentrifus dengan kecepatan 1250 rpm selama lima menit pada suhu kamar.

Supernatan yang didapat ditampung dalam tabung reaksi. Supernatan diharapkan akan mengandung sitokin, sehingga bisa dimanfaatkan sebagai adjuvan vaksin.

c. Pencampuran Adjuvan dengan Vaksin ND Aktif

Vaksin yang digunakan adalah vaksin aktif ND strain Lasota produksi dari Medivak sebanyak satu vial. Satu vial mengandung 50 dosis. Vaksin tersebut di encerkan dengan NaCl fisiologis sehingga volumenya menjadi 5 ml. Kemudian dibagi menjadi 3 bagian, yang masing masing volumenya 1,5 ml, sisa dari pengenceran dibuang. Vaksin tersebut kemudian diencerkan lagi dengan cara sebagai berikut; bagian pertama dengan cairan peritoneal dari mencit yang dirangsang dengan BSA, bagian kedua dengan cairan peritoneal dari mencit yang dirangsang dengan virus ND aktif dan bagian ketiga diencerkan dengan NaCl fisiologis. Pengenceran tersebut diatas sampai volumenya mencapai 7,5 ml.

Pengenceran yang sudah dilakukan mengandung maksud supaya vaksinasi yang dilakukan pada setiap ekor ayam adalah 0,5 ml yang mengandung satu dosis.

3.3.2. Perlakuan Ayam

a. Sampel

Penelitian menggunakan dua puluh tujuh ayam petelur jantan jenis CP 909. Dua puluh tujuh ayam tersebut dibagi secara acak menjadi tiga kelompok dengan demikian setiap kelompok terdiri dari sembilan ekor. Ayam yang berada dalam satu kelompok diberi nomor urut yang ditalikan pada kaki.

Untuk mendapatkan serum yang akan diperiksa titer antibodinya, maka setiap ayam dalam kelompok diambil darahnya (satu sampai satu setengah mililiter) sebanyak empat kali. Pengambilan dimulai dari ayam berumur dua puluh hari, kemudian empat minggu, lima minggu, terakhir berumur enam minggu. Pengambilan melalui vena axillaris dengan menggunakan suntikan satu mililiter. Pengukuran antibodi dimulai ayam berumur dua puluh hari.

b. Perlakuan Vaksinasi

Vaksinasi tahap pertama dilakukan pada saat ayam berumur tiga hari dengan menggunakan vaksin ND aktif strain Lasota secara tetes mata. Dosis yang digunakan sebanyak satu dosis yaitu satu tetes (0,05 ml) untuk semua kelompok.

Vaksinasi kedua dilakukan waktu ayam berumur tiga minggu dengan perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok I : divaksin dengan vaksin ND aktif strain lasota secara intra muskuler yang dicampur cairan peritoneal yang dirangsang dengan BSA.
2. Kelompok II : divaksin dengan vaksin ND aktif strain lasota secara intra muskuler yang dicampur dengan cairan peritoneal yang dirangsang dengan virus ND aktif.

3. Kelompok III : divaksin dengan vaksin ND aktif strain lasota secara intra muskuler yang dicampur dengan NaCl fisiologis (tanpa cairan peritoneal) yang diperlakukan sebagai kontrol.

3.3.3. Pengamatan

Pengamatan antibodi ayam dengan menggunakan uji hambatan hemaglutinasi (HI) dilakukan pada saat ayam berumur dua puluh hari, empat minggu, lima minggu, dan enam minggu.

a. Cara Membuat Suspensi Eritrosit 0,5%

Dalam melaksanakan uji HA mikroteknik dan uji HI mikroteknik, diperlukan suspensi eritrosit dengan konsentrasi 0,5%. Cara untuk mendapatkan eritrosit dengan konsentrasi 0,5% adalah sebagai berikut : darah ayam yang mana ayam tersebut belum pernah mendapatkan vaksinasi atau terkena penyakit diambil dari vena axillaris secukupnya kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diisi dengan EDTA (*Etylene Diamine Tetra acetic Acid*). Darah tersebut dipusingkan selama 15 menit dengan kecepatan 2000 rpm, supernatan dibuang dan sisa endapannya yang berupa sel darah merah pekat dicuci dengan menambahkan NaCl, kemudian dipusingkan lagi selama 15 menit. Setelah terjadi endapan kembali supernatannya dibuang. Pencucian tersebut diulangi sampai tiga kali dengan cara seperti diatas. Untuk mendapatkan suspensi eritrosit 0,5%, darah

ayam pekat diambil 0,5 ml kemudian ditambahkan NaCl fisiologis sampai volumenya mencapai 100 ml kemudian dikocok secara perlahan.

b. Uji Haemaglutinasi (HA) Mikroteknik

Prosedur untuk melakukan uji HA mikroteknis diawali dengan mengisi lubang mikroplate nomor satu sampai nomor duabelas pada baris pertama dan kedua (untuk titrasi duplikat) dengan 0,025 ml NaCl fisiologis. Alat yang digunakan untuk mengisi lubang mikroplate dengan NaCl fisiologis adalah pipet dropper dengan volume 0,025 ml. Pada lubang nomor satu (baris pertama dan kedua) diisi dengan antigen 0,025 ml dengan menggunakan pipet dropper 0,025 ml. NaCl fisiologis 0,9% dan antigen pada lubang nomor satu tersebut dicampur dengan cara memutar diluter beberapa saat, kemudian diluter dipindah ke nomor berikutnya. Demikian seterusnya sampai lubang nomor sebelas, sedangkan lubang nomor duabelas digunakan sebagai kontrol eritrosit (tanpa antigen). Langkah selanjutnya mengisi semua lubang mikroplate dengan eritrosit 0,5 % sebanyak 0,05 ml. Mikroplate diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit atau sampai kontrol eritrosit pada lubang nomor duabelas tampak sebagai lapisan eritrosit yang merata pada dasar lubang dan cairan bagian atasnya tampak jernih (tidak terjadi aglutinasi eritrosit berbentuk titik di tengah lubang (Ernawati dkk, 1998)).

c. Cara Membuat Antigen Empat HA Unit

Pada uji HI antigen yang diperlukan adalah 4 HA unit/0,025 ml, sehingga berdasarkan titer antigen yang didapat, perlu dilakukan pengenceran sampai mencapai 4 HA unit. Misalkan pada pengukuran antigen yang didapat adalah 128/0,025 ml, maka dilakukan pengenceran 1/128 dikalikan 4, hasilnya 1/32. Dengan demikian berarti 1 ml antigen ditambah dengan 31 ml NaCl fisiologis (Ernawati, 1997)

Untuk menguji ketepatan pengenceran perlu dilakukan retitrasi dengan cara yang sama seperti pada uji HA, tetapi dengan menggunakan antigen yang telah diencerkan. Retitrasi dilakukan dengan mengisiskan 0,025 ml PZ kedalam lubang mikroplate nomor satu sampai nomor lima dengan menggunakan pipet dropper. Kemudian lubang nomor satu sampai lubang nomor empat diisi dengan 0,025 ml antigen 4 HA unit. Dengan memakai diluter NaCl fisiologis dan antigen dicampur dengan cara memutar-mutar dari lubang nomor satu ke lubang berikutnya. Selanjutnya semua lubang diisi eritrosit ayam 0,5% sebanyak 0,05 ml. Bila pengenceran pada uji HA tepat, maka pada lubang nomor satu dan nomor dua akan terjadi aglutinasi (Ernawati dkk, 1998).

d. Uji hambatan Haemaglutinasi (HI) Mikroteknik

Langkah-langkah dalam melakukan uji HI mikroteknik adalah sebagai berikut: Lubang mikroplate diisi NaCl fisiologis sebanyak 0,025 ml dengan menggunakan pipet dropper volume 0,025 ml dari lubang nomor satu sampai nomor duabelas. Lubang nomor satu dan nomor duabelas diisi dengan serum yang diperiksa, sebanyak 0,025 ml dengan menggunakan pipet dropper volume 0,025 ml. NaCl fisiologis dan serum pada lubang nomor satu dicampur dengan cara memutar-mutar diluter selama beberapa saat, kemudian diluter dipindahkan ke lubang nomor berikutnya. Demikian seterusnya hingga lubang nomor sepuluh. Lubang nomor satu sampai sepuluh diisi dengan antigen 4 HA unit dengan menggunakan pipet dropper sebanyak 0,025 ml. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Semua lubang diisi eritrosit 0,05 % sebanyak 0,05 ml dengan menggunakan pipet dropper 0,05 ml. Selanjutnya diinkubasi lagi selama 30 menit pada suhu kamar atau sampai kontrol eritrosit pada nomor sebelas dapat dibaca. Pada kontrol terjadi endapan eritrosit seperti titik merah pada dasar lubang mikroplate. Pada lubang nomor duabelas merupakan kontrol serum (Ernawati dkk, 1998).

e. Analisis Hasil Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Petak terbagi, dengan tiga macam perlakuan dan ulangan yang dilakukan sebanyak sembilan kali. Bila terdapat perbedaan yang nyata dari perlakuan tersebut maka dilakukan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan tingkat kepercayaan 95 % (Kusrianingrum, 1989).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Pemeriksaan titer antibodi ayam satu hari sebelum vaksinasi ke dua dan satu, dua, tiga minggu paska vaksinasi ke dua dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2.

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 4) untuk faktor B (Kelompok Perlakuan) terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Kelompok perlakuan K1 yaitu vaksinasi dengan menggunakan campuran cairan peritoneal mencit yang sebelumnya mencit dirangsang dengan BSA merupakan titer antibodi tertinggi, berbeda sangat nyata dengan kelompok perlakuan K2 (virus ND aktif) dan kelompok perlakuan K3 (tanpa campuran cairan peritoneal). Kelompok perlakuan K2 yaitu vaksinasi dengan menggunakan campuran peritoneal mencit yang sebelumnya dirangsang dengan virus ND aktif menempati urutan ke dua tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan K3 (Tabel 4.3).

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 4) untuk faktor A (Waktu titer) terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Titer antibodi minggu ketiga paska vaksinasi ke dua merupakan titer tertinggi berbeda nyata dengan minggu ke dua dan berbeda sangat nyata dengan minggu pertama paska vaksinasi ke dua. Titer antibodi minggu ke dua menempati urutan ke dua dan berbeda nyata dengan minggu pertama paska vaksinasi ke dua (Tabel 4.4).

Rata-rata titer antibodi ayam, masing-masing kelompok perlakuan dan setiap minggu paska vaksinasi dapat dilihat pada tabel 4.3 dan 4.4 dibawah ini.

Tabel 4.3 : Rata-Rata Titer Antibodi Ayam Masing-Masing Kelompok Perlakuan Paska Vaksinasi ke Dua

Kel. perlakuan	Rata-rata titer
K1 (BSA)	3,44 ^a
K2 (virus ND aktif)	2,70 ^b
K3 (NaCl 0,9%)	2,44 ^b

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Tabel 4.4 : Rata-rata Titer Antibodi Ayam Satu, Dua dan Tiga Minggu Paska Vaksinasi Kedua

Waktu titer	Rata-rata titer
III (tiga minggu)	3,22 ^a
II (dua minggu)	3,04 ^{ab}
I (satu minggu)	2,33 ^b

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

BAB V

PEMBAHASAN

Penelitian mengenai penggunaan cairan peritoneal dari mencit yang dirangsang dengan BSA (K1) dan Virus ND aktif (K2) sebagai adjuvan vaksin ND aktif serta NaCl fisiologis sebagai kontrol setelah dilakukan uji ENJ 5 % menunjukkan perbedaan yang nyata antara kelompok K1 dibandingkan dengan kelompok K2 dan K3. Kelompok perlakuan K2 tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan K3 (kontrol).

Perlakuan K1 yaitu penggunaan peritoneal dari mencit yang dirangsang dengan BSA sebagai adjuvan vaksin ND terbukti efektif, hal ini ditunjukkan dengan peningkatan titer antibodi dibandingkan dengan perlakuan K3. Bovin Serum Albumin (BSA) yang disuntikkan kedalam rongga peritoneal mencit mampu menghasilkan sitokin sehingga bisa membantu meningkatkan titer antibodi. Hal ini mengacu pada pendapat Fenner *et al.*, (1995) sitokin banyak dihasilkan oleh limfosit T (limfokin) atau monosit/makrofag (monokin) dan bekerja mengatur respon kekebalan dengan mengkoordinasi aktifitas dari berbagai tipe sel yang terlibat, dan kerjanya dirangsang oleh antigen. Menurut Heath dan Playfair (1992) IL-1 yang dihasilkan oleh makrofag sebagai tanggap kebal terhadap BSA bisa menambah produksi IL-2 dan meningkatkan aktifitas sel Th. Sel Th merupakan sumber utama dari IL-4, IL-5, IL-6, atau INF-g sebagai pengatur

respon kekebalan antibodi (Fenner et al. 1995). Menurut Subowo (1991) sel *T helper* bisa menginduksi proliferasi sel B, dengan memproduksi *T cell replacing factor* (TRF), yang terdiri atas berbagai macam sitokin seperti IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 dan IL-6. Menurut pendapat Baratawidjaja (1991) sel *Th* yang dirangsang melepaskan limfokin yang mengaktifkan sel B dalam tiga tingkat yaitu aktivasi, proliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma, yang memproduksi Ig (Imunoglobulin).

Kelompok perlakuan K2 dan kelompok perlakuan K3 (kontrol) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, hal ini menunjukkan bahwa cairan peritoneal dari mencit yang sebelumnya dirangsang dengan virus ND aktif belum mampu meningkatkan titer antibodi sehingga belum bisa digunakan sebagai adjuvan. Kemungkinan virus ND aktif yang disuntikkan pada mencit belum mampu merangsang mencit untuk menghasilkan sitokin sebagai reaksi tanggap kebal. Sitokin sebagai reaksi tanggap kebal belum mampu dihasilkan oleh mencit kemungkinannya banyak sekali yaitu antara lain, efektivitas antigen, dosis dan tanggap kebal mencit itu sendiri.

Menurut Tizard (1988) dosis virus yang menginvasi dapat berperan terhadap virulensi virus. Menurut Subowo (1991) tanggap kebal terhadap suatu antigen tergantung dari dosis dan cara memasukkan ke dalam tubuh. Menurut Suwarno (1996) imunogen akan dapat menimbulkan tanggap

kebal apabila memiliki berat molekul tinggi, strukturnya kompleks, dikenal asing oleh tubuh, cocok dengan keadaan hewan yang bersangkutan, serta dosis dan cara pemberian yang tepat. Dosis antigen yang sangat rendah atau tinggi dapat menghamburkan respon yang akan datang pada suntikan berikutnya dengan dosis yang dapat menimbulkan reaksi kekebalan (Bellanti dan Robinson, 1993).

Ketidakmampuan menghasilkan sitokin juga bisa disebabkan karena virus untuk merangsang mencit kurang efektif. Menurut Fenner *et al.*, (1995) terjadinya reaksi kebal untuk melawan invasi virus tergantung pada perimbangan virulensi virus dan ketahanan hewan tersebut. Dalam penelitian ini yang dipakai untuk merangsang mencit digunakan virus ND aktif yang diperoleh dari vaksin ND aktif yang menurut Fenner *et al.*, (1995) vaksin virus hidup rentan terhadap inaktivasi oleh temperatur sekitar yang tinggi, itu suatu masalah yang khas terjadi didaerah tropis.

Kemungkinan lain virus ND aktif yang disuntikkan pada mencit sudah menghasilkan sitokin, bahkan antibodi sebagai tanggapan kebal telah terbentuk. Adanya antibodi terhadap virus ND pada cairan peritoneal mencit apabila ditambahkan antigen sejenis (vaksin ND) maka akan terjadi reaksi antigen-antibodi. Reaksi antigen-antibodi ini dapat menyebabkan aktifitas virus yang ada pada vaksin ND berkurang, sehingga kalau digunakan untuk vaksinasi tidak

efektif. Menurut Fenner *et al.*. (1995) produksi antibodi berlangsung dengan cepat antibodi bisa diamati dalam waktu 4 - 6 hari setelah infeksi virus ND dan menetap paling tidak 2 tahun. Menurut Tizard (1988) reaksi antigen-antibodi dapat terjadi jika reseptornya cocok.

Uji ENJ (beda nyata jujur) 5 % untuk kelompok waktu yaitu pada minggu ketiga berbeda nyata dengan minggu ke dua dan berbeda sangat nyata dengan minggu pertama. Titer pada minggu kedua berbeda nyata dengan minggu pertama.

Menurut pendapat Partadiredja (1988) bagi peternakan kecil vaksinasi dengan cara intramuskuler merupakan cara yang paling sesuai karena pelaksanaannya mudah dan alatnya relatif murah, sedang tingkat kekebalannya dicapai cukup memuaskan. Menurut pendapat Tizard (1988) antibodi baru ditemukan dalam serum sekitar satu minggu setelah pemberian antigen pertama dan akan meningkat mencapai puncak setelah 10 - 14 hari sebelum menurun dengan cepat. Menurut pendapat dari Bellanti dan Robinson (1993) keuntungan yang paling penting pada imunisasi aktif dibandingkan dengan imunisasi pasif adalah lama proteksi lebih panjang. Proteksi ini dihubungkan dengan beberapa faktor imunitas (selluler dan humoral), tetapi biasanya diukur dengan adanya antibodi dalam serum.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. KESIMPULAN

1. Cairan peritoneal mencit yang sebelumnya dirangsang dengan BSA, dapat digunakan sebagai adjuvan vaksin ND aktif.
2. Cairan peritoneal mencit yang sebelumnya dirangsang dengan virus ND aktif kurang mampu digunakan sebagai adjuvan vaksin ND.

6.2. SARAN

1. Disarankan menggunakan cairan peritoneal mencit yang sebelumnya dirangsang dengan BSA, sebagai adjuvan vaksin ND.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai cairan peritoneal mencit sebagai adjuvan vaksin untuk peningkatan reaksi kebal pada penyakit virus yang lain.
3. Perlu diperhatikan dalam menggunakan antigen sebagai perangsang mencit, supaya tidak digunakan untuk campuran vaksin sejenis. Karena dimungkinkan cairan peritoneal mengandung antibodi yang sejenis dengan antigen dalam vaksin.

RINGKASAN

Bagus Sukarlan. Mencit yang rongga peritonealnya disuntik dengan BSA atau virus ND apabila cairan peritonealnya dikuras cairan tersebut mengandung berbagai macam sitokin.

Efektivitas cairan peritoneal mencit yang sebelumnya dirangsang dengan antigen tersebut digunakan sebagai adjuvan vaksin ND aktif.

Sebanyak 27 ekor ayam jantan petelur digunakan dalam penelitian ini. Umur 3 hari ayam divaksin ND secara tetes mata. Hewan percobaan dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan pertama divaksin dengan menggunakan campuran cairan peritoneal mencit yang dirangsang dengan BSA, ke dua dirangsang dengan virus ND aktif dan ke tiga tanpa cairan peritoneal yaitu dengan NaCl fisiologis digunakan sebagai kontrol. Vaksinasi dilakukan dengan cara intra muskular waktu ayam berumur 3 minggu.

Perubahan yang diamati adalah titer antibodi ND, diti ter pada saat satu hari sebelum vaksinasi ke dua dan 1, 2, 3 minggu paska vaksinasi ke dua. Titer antibodi diperiksa dengan menggunakan uji hambatan hemaglutinasi (HI).

Rancangan percobaan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola Petak Terbagi bila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) 0,05.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa cairan peritoneal dari mencit yang sebelumnya dirangsang dengan BSA mampu meningkatkan titer antibodi, berbeda sangat nyata dengan kontrol, sehingga efektif bila digunakan sebagai adjuvan vaksin. Cairan peritoneal mencit yang sebelumnya mencit dirangsang dengan virus ND aktif belum mampu meningkatkan titer antibodi tidak berbeda nyata dengan kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 1995. Pengendalian Newcastle Disease pada ayam kampung Wartazoa. Majalah Seni Ilmiah peternakan Pusat penelitian dan Pengembangan peternakan. Badan Penelitian dan Pengembangan pertanian. Departemen Pertanian Bogor. (4) : 1 - 3.
- Anonimus. 1988. Aspek-aspek Immunologis dari penyakit ayam yang sering ditemukan pada peternakan ayam ras di Indonesia. Technical service Departemen Eurindo Combained. Jakarta. 1 - 10.
- Artama. W.T. 1992. Pedoman kuliah antibodi monoklonal, teori, produksi, karakterisasi dan penerapan. 53 - 74.
- Azmijah, A. 1989. Penyakit unggas. Laboratorium patologi veteriner. Universitas Airlangga.
- Baratawidjaja, K.G. 1991. Immunologi dasar. Edisi kedua. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 45 - 61
- Bellanti, J.A. dan A.Robinson. 1993. Immunologi III. Edisi 2. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 10 - 102
- Calich, V.L.G. and S.S.Kashino. 1998. Cytocines Produced by Susceptible and Resisten mice in the Course of Paracoccidioides Brasilliensis infection. Braz J Med Biol res. Volume 31 (5). Departamento de Immunologi Instituto de Ciencias Biomedicos. Universidade de Sao Paulo. Brasil. 1 - 3.
- Daniel, P.S,I.T.Abbo and G.P. Tristrom. 1994. Basic & Clinical Immunology. 8th Ed. Prentice-Hall International Inc. 118 - 131
- Ernawati, R., A.P.Raharjo, N.Sianita, J.Rahmahani, F.A.Ratam, W. Cahyaningtyas dan Suwarno. 1998. Petunjuk Praktikum Penyakit Viral. Laboratorium Immunologi dan Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga .Surabaya
- Fenner, F.J., Paul, J.G., Federik. A.M., R. Root, M.J.Studdert, D.O.White. 1995. Diterjemahkan oleh D.K. Haryo putro. Virologi veteriner. Edisi 2. IKIP Semarang Press. 290 - 361

- Frandsen, R.D. 1986. Anatomy dan Physiology of Farm Animal. Lea and Febiger. Philadelphia. USA. 434 - 436
- Heath, A.W. and J.H.L. Playfair. 1992. Cytocines as Immunological Adjuvan Vaccin. 10 (7) : 427 - 433.
- Kusriningrum R. 1989. Dasar Perancangan Percobaan Dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Naibaho, M. 1991. Adjuvan Bakteri Pasteurella Miltocida dan Eschericia Coli terhadap Vaksin Brucella Abortus inaktif pada kelinci percobaan. Tesis. Fakultas Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yokyakarta.
- Partadiredja, M. 1988. Perbandingan Daya Guna Tiga Cara Aplikasi vaksinasi ND. Hemerezoa. Majalah Ilmu Kehewan Indonesia. Volume 73 No.I. Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia. Institut Pertanian Bogor. 15 - 20
- Ressang, A.A. 1984. Patologi khusus veteriner. Edisi 2. Percetakan Bali. 71 - 75
- Roiit I., J. Brostoff and D.Male. 1988. Immunology. 2nd Ed. 93 - 99.
- Roiit I., J. Brostoff and D.Male. 1996. Immunology. 4th Ed. Times Mirror International Publishes Limited. London. England. 81 - 85
- Subowo. 1991. Imunnobiologi. Edisi I. Pijar. Bandung Indonesia. 181 - 214
- Suripto. H. 1993. Vaksinasi mengapa gagal ?. No. 165 Th/XIII. Poultry Indonesia. 30 - 35
- Suwarno. 1996. Sistim Kekebalan dan Hubunganya Dengan Tangap Kebal Pada Ayam. Buku Panduan. Pelatihan Pencegahan dan Penanganan Penyakit Infeksi. Dinas Peternakan Daerah Jawa Timur. Surabaya. 57 - 77
- Tizard I.R. 1988. Pengantar Immunologi veteriner. Airlangga University Press. Surabaya. 11 - 65

Lampiran 1.

Titer Antibodi Ayam Satu Hari Sebelum Vaksinasi ke Dua

Perlakuan		U l a n g a n									To- tal
Waktu Titer	Kelompok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	3
	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
	3	0	0	0	1	2	0	0	1	0	4
	Total	2	1	0	1	3	1	0	1	0	9

Keterangan : titer atibodi masih dalam penyebaran yang normal.

Lampiran 2.

Titer Antibodi Satu, Dua, dan Tiga Minggu Paska
Vaksinasi ke Dua

Perlakuan		U l a n g a n									To- tal
Waktu Titer	Kelompok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	1	2	4	3	2	3	3	2	1	2	22
	2	2	2	2	0	3	4	3	2	3	21
	3	2	3	2	3	4	3	0	2	1	20
	Total	6	9	7	5	10	10	5	5	6	63
II	1	4	3	5	3	3	4	3	2	5	32
	2	3	3	4	2	2	3	3	2	3	25
	3	3	2	2	4	3	3	3	2	3	25
	Total	10	8	11	9	8	10	9	6	11	82
III	1	6	5	5	6	5	3	3	1	5	39
	2	2	5	3	2	3	2	2	3	5	27
	3	2	3	2	2	2	3	1	3	3	21
	Total	10	13	10	10	10	8	6	7	13	87
total kesel- uruhan		26	30	28	24	28	28	20	18	30	232

Lampiran 3

Perhitungan Rancangan Acak Terbagi Titer Antibodi Paska
Vaksinasi ke Dua

$$FK = \frac{232^2}{3 \times 4 \times 9} = 664,49$$

$$JKA = \frac{63^2 + 82^2 + 87^2}{3 \times 9} - FK$$

$$= \frac{18262}{27} - 664,49$$

$$= 11,877$$

$$JKT_1 = \frac{2 + 4^2 + \dots + 13^2}{3} - FK$$

$$= \frac{2132}{3} - FK$$

$$= 46,173$$

$$JKSa = JKT_1 - JKA$$

$$= 34,296$$

$$JKB = \frac{93^2 + 73^2 + 66^2}{3 \times 9} - FK$$

$$= \frac{18334}{27} - FK$$

$$= 14,543$$

$$JKAB = \frac{22^2 + 21^2 + \dots + 39^2}{9} - FK - JKA - JKB$$

$$= 7,975$$

$$\begin{aligned} \text{JKT}_2 &= 2^2 + 4^2 + \dots + 3^2 - \text{FK} \\ &= 780 - 664,49 \\ &= 115,506 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKSb} &= \text{JKT}_2 - \text{JKT}_1 - \text{JKB} - \text{JKAB} \\ &= 46,815 \end{aligned}$$

Lampiran 4

Sidik Ragam Rancangan Petak Terbagi Titer Antibodi Ayam Paska vaksinasi ke Dua

SK	db	JK	KT	F hit	F tabel	
					0,05	0,01
Analisis Petak Utama						
Faktor A	2	11,877	5,939	4,156	3,43	5,61
Sisa (a)	24	46,173	1,129			
Total (1)	35	178,546				
Analisis Anak Petak						
Faktor B	2	14,543	7,271	7,459	3,19	5,08
Interaksi A X B	4	7,975	1,994	2,045	2,55	3,70
Sisa (b)	48	46,815	0,975			
Total (2)	80	115,506				

Kesimpulan : terdapat perbedaan yang nyata antara waktu titer antibodi (faktor A). Terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kelompok perlakuan (faktor B). Tidak terdapat perbedaan yang nyata pada interaksi antara kelompok perlakuan dengan waktu titer antibodi.

$$\begin{aligned}
 \text{s.e. (dua nilai tengah A / petak utama)} &= \sqrt{\frac{KT_{Sa}}{9 \times 3}} \\
 &= \sqrt{\frac{1,429}{27}} \\
 &= 0,230
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{BNJ 5\%} &= \text{alfa } Q (0,05) (3,24) \times \text{se} \\
 &= 3,53 \times 0,230 \\
 &= 0,812
 \end{aligned}$$

Lampiran 5

Uji BNJ 5 % titer antibodi ayam satu, dua dan tiga minggu paska vaksinasi ke dua

Minggu	Rata-rata (x)	Beda rata-rata		BNJ 5%
		X-3 (K-1)	X-2 (Y-2)	
III 1 ^a	3,22 <i>KV = 63</i>	0,89*	0,183	0,812
II 2 ^{ab}	3,04	0,71		
I 3 ^b	2,33			

lm14

Kesimpulan : Pengukuran titer antibodi pada minggu ke tiga paska vaksinasi ke dua menempati urutan tertinggi, berbeda nyata dengan minggu ke dua dan berbeda sangat nyata dengan minggu pertama. Minggu ke dua menempati urutan ke dua dan berbeda nyata dengan minggu pertama paska vaksinasi ke dua.

$$\begin{aligned}
 \text{s.e. (dua nilai tengah B / anak petak)} &= \sqrt{\frac{KTSa^2}{29}} \\
 &= \sqrt{\frac{0,975}{29}} \\
 &= 0,183
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{BNJ 5\%} &= Q (0,05) (3,48) \times \text{se} \\
 &= 3,424 \times 0,183 \\
 &= 0,63
 \end{aligned}$$

Lampiran 6

Uji BNJ 5 % Titer Antibodi ND Ayam masing-masing Kelompok Perlakuan Paska Vaksinasi ke Dua

Kelompok	Rata-rata (x)	Beda rata-rata		BNJ 5%
		X-3	X-2	
K 1 ^a	3,44	1*	0,74*	0,63
K 2 ^b	2,7	0,26		
K 3 ^b	2,44			

Kesimpulan : Kelompok perlakuan pertama (K1) merupakan kelompok perlakuan dengan hasil tertinggi berbeda sangat nyata dengan kelompok perlakuan ke dua (K2) dan ke tiga (K3). Kelompok perlakuan kedua menempati urutan ke dua tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan ke tiga (K3).