

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan dua tahap, antara lain tahap pertama untuk mendapatkan bahan serum pasca vaksinasi yang dilaksanakan di Taman Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan (*Teaching Farm*) Kabupaten Gresik dan tahap kedua adalah uji serologis yang dilakukan di Laboratorium Virologi dan Imunologi, Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya dari bulan Juli 2014 hingga bulan September 2014.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat penelitian

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microtube* 1,5 ml steril, rak tabung reaksi, *yellow tips*, labu erlenmeyer, *water bath* (Retsch), *centrifuge* (Hettich), tabung *centrifuge*, tabung conical, pipet volumetrik (graduated pipettes) ukuran 5 ml dan 10 ml, *microplate* "V" (Kartell), *micropipette singlechannel* 10 μ l-100 μ l (Socorex), *micropipette multichannel* 20 μ l-200 μ l (Transferpette), spuit disposable 3ml dan 1ml, gunting, glove dan masker (Sensi), *thermobox*, lemari es.

3.2.2 Bahan penelitian serum pasca vaksinasi

3.2.2.1 Hewan percobaan

Hewan yang digunakan untuk proses vaksinasi adalah DOC (*Day Old Chic*) ayam jantan petelur strain ISA Brown. Jumlah ayam yang diamati sebanyak

35 ekor yang dibagi menjadi dua kelompok yaitu 10 ekor ayam kontrol dan 25 ekor ayam perlakuan. Sepuluh ekor ayam berfungsi sebagai kelompok kontrol untuk memastikan tidak adanya paparan virus *Avian Influenza* secara alami. Pada kelompok perlakuan menggunakan 25 ekor ayam yang divaksin dengan vaksin AI H5N1 *clade* 2.3.2 yang diperiksa dengan uji *Haemagglutination Inhibition* (HI) baik menggunakan antigen *clade* 2.3.2 maupun antigen *clade* 2.1.3.

3.2.2.2 Vaksin AI

Vaksin AI yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaksin AI inaktif (*Killed Vaccine*) yang mengandung virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 dari salah satu industri vaksin.

3.2.2.3 Antigen

Antigen yang digunakan yaitu antigen virus AI H5N1 *clade* 2.1.3 (*strain* Subang) dan antigen virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 (*strain* Sukoharjo).

3.2.2.4 Reagensia penelitian

Bahan reagensia yaitu EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acid*), suspensi DMA (Darah Merah Ayam) 0,5%, NaCl Fisiologis (Otsuka), serum uji diperoleh dari hasil vaksinasi ayam coba, alkohol 70 %.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Vaksinasi hewan coba

Pada penelitian ini dilakukan vaksinasi dengan vaksin AI inaktif yang dilakukan pada saat ayam berumur 4 minggu dan diulangi pada umur 8 minggu.

Rute vaksinasi pertama subkutan di daerah pangkal leher dengan dosis yang diberikan yaitu 0,15 ml / ekor pada ayam berumur 4 minggu dengan kondisi tidak adanya antibodi maternal, sedangkan vaksinasi ke dua secara intramuskular di otot dada dengan dosis 0,3 ml / ekor pada ayam berumur 8 minggu sebagai vaksinasi ulang (*booster*) untuk mendapatkan titer antibodi yang tinggi. Dosis vaksin yang diberikan berdasarkan anjuran dari produsen vaksin dengan cara penggunaan di lapangan.

3.3.2 Pengambilan darah dan preparasi sampel

Pengambilan darah dilakukan pada umur ayam 12 minggu (4 minggu pasca vaksinasi kedua untuk mendapatkan titer antibodi yang tinggi). Ayam diambil darahnya di daerah sayap yaitu dari vena brachialis secara *legart* dengan menggunakan spuit 3 ml. Darah tersebut selanjutnya dibawa ke Laboratorium Virologi dan Imunologi FKH-UA. Darah dibiarkan tetap berada di dalam spuit dan disimpan dalam *refrigerator* selama satu malam. Dilakukan langkah pemisahan serum dengan cara menuangkan serum yang terbentuk ke dalam *microtube* lalu serum tersebut disentrifus. Hasil sentrifus akan memisahkan serum dengan sisa – sisa eritrosit, yang kemudian menampung serumnya pada *microtube* (OIE, 2014). Serum yang sudah diperoleh kemudian dimasukkan dalam *waterbath* semuanya dengan suhu 56 °C selama 30 menit untuk proses inaktivasi yang akan digunakan untuk uji HI selanjutnya.

3.3.3 Penyediaan DMA untuk uji HI

Pengambilan DMA (Darah Merah Ayam) dengan syarat ayam sehat dan tidak pernah divaksin, digunakan untuk memanfaatkan eritrosit murninya saja (100 %) dan pembuatan suspensi eritrosit (0,5 %). Teknik untuk pengambilan DMA yaitu dengan mengambil darah pada vena Brachialis. Pembuatan eritrosit diawali dengan memasukkan 5 ml darah ayam dalam tabung reaksi yang telah berisi antikoagulan EDTA dengan dosis 1 mg EDTA per 1 ml darah. Tabung tersebut ditutup dan dikocok pelan dengan lintasan membentuk angka 8 (hal itu perlu dilakukan agar darah tidak mengalami koagulasi dan tidak terjadi lisis), kemudian disentrifus.. Supernatan plasma dan *buffy coat* dibuang disisakan endapan eritrositnya. Selanjutnya dilakukan pencucian terhadap endapan dengan menambahkan NaCl sebanyak 10ml, kocok dan disentrifuse lagi. Setelah terjadi endapan, supernatan dan sisa *buffy coat* dibuang kembali. Kegiatan ini diulang dua sampai tiga kali kemudian supernatan dibuang untuk mendapatkan DMA (100 %).

3.3.4 Pembuatan suspensi eritrosit 0,5 %

Pada uji HI mikroteknik diperlukan suspensi eritrosit dengan konsentrasi 0,5 %. Untuk mendapatkan suspensi eritrosit 0,5 %, caranya adalah menambahkan NaCl fisiologis kedalam labu *erlenmeyer* kemudian ditambah endapan eritrosit murni (Ernawati, 2007). Suspensi eritrosit 100% dijadikan suspensi 0,5% dengan rumus: $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$

3.3.5 Uji Hemaglutinasi (HA)

Langkah selanjutnya adalah titrasi antigen AI H5N1 *clade* 2.3.2 dan *clade* 2.1.3 untuk menentukan jumlah HA unit sebelum dilakukan uji HI. Uji HA dilakukan secara duplo pada sumuran mikroplat baris A dan B. Langkah-langkah dalam uji HA mikroteknik, diawali dengan memasukkan 25 μ l NaCl fisiologis ke dalam sumuran pertama dari baris A *microplate* "V" sampai sumuran terakhir atau kedua belas. Kemudian tambahkan 25 μ l antigen ke dalam sumuran pertama, campur lalu pindahkan 25 μ l ke sumuran dua, kemudian dikocok dengan mikropipet dan diambil 25 μ l ke sumuran tiga dan seterusnya hingga sumuran ke dua belas, lalu 25 μ l dari sumur terakhir dibuang. Langkah selanjutnya dengan menambahkan 50 μ l DMA (0,5 %) ke tiap sumuran, kocok perlahan dan dibiarkan sekitar 30 menit pada suhu kamar, lalu di baca titernya. Disamping itu pada baris C tidak dilakukan penambahan antigen dimana pada semua sumuran berisikan 25 μ l NaCl fisiologis kemudian ditambahkan 50 μ l DMA (0,5 %) yang berfungsi sebagai kontrol eritrosit. HA positif yaitu jika pada sumuran terbentuk hemaglutinasi. HA negatif yaitu jika pada dasar sumuran terjadi endapan eritrosit dimana endapan tersebut akan turun ke bawah apabila *microplate* dimiringkan. Titer HA adalah jumlah terkecil dari pengenceran tertinggi antigen yang masih mampu menunjukkan reaksi hemaglutinasi sempurna (Ernawati dkk., 2012;OIE, 2014).

Uji HI memerlukan antigen 4 HA unit. Penghitungan HA unit dilakukan dengan cara menghitung sumuran yang positif dimulai enceran yang paling pekat (sumuran pertama), misalnya apabila hemaglutinasi terjadi sampai sumuran ke

lima, maka HA dinyatakan dengan nilai 2^5 atau $32 \text{ HA}/25 \mu\text{l}$ unit dan antigen harus diencerkan menjadi 4 HA unit. Sehingga antigen harus mengalami pengenceran sebanyak delapan kali, untuk melakukan pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 bagian antigen dengan titer 2^5 atau 32 HA unit lalu di campur dengan 7 bagian NaCl fisiologis. Setelah antigen di encerkan harus di lakukan retitrasi untuk melihat pengerjaan membuat antigen dengan titer 4 HA unit sudah benar (Ernawati dkk., 2012;OIE, 2014).

Retitrasi diawali dengan memasukkan 25 μl NaCl fisiologis ke dalam sumuran pertama dari baris A *microplate* "V" sampai sumuran lima kemudian tambahkan antigen 25 μl antigen ke dalam sumuran pertama, kocok lalu pindahkan 25 μl ke sumuran dua, kemudian dikocok dengan mikropipet dan diambil 25 μl ke sumuran tiga dan seterusnya hingga sumuran lima lalu 25 μl dari sumur ke lima dibuang, kemudian tambahkan pada semua sumuran DMA 0,5 %. Titer antigen dinyatakan 4 HA unit bila hemaglutinasi terjadi pada sumuran pertama dan kedua (Ernawati dkk., 2012;OIE, 2014).

3.3.6 Uji *Haemagglutination Inhibition* (HI)

Uji *Haemagglutination Inhibition* (HI) digunakan untuk mengetahui titer serum, dengan cara mereaksikan serum yang ingin diketahui titer antibodinya dengan antigen standar yang telah diketahui (Ernawati dkk., 2012). Langkah untuk melakukan Uji HI mikroteknik antara lain menggunakan *microplate bottom V* yang diisi dengan NaCl fisiologis sebanyak 25 μl pada sumuran pertama hingga sumuran dua belas menggunakan mikropipet. Tambahkan 25 μl serum ke dalam sumuran pertama, campur lalu pindahkan 25 μl ke sumuran dua, kemudian

dicampur dengan mikropipet dan diambil 25 μ l ke sumuran tiga dan seterusnya hingga sumuran sebelas kemudian sisa 25 μ l dibuang. Pada sumuran dua belas hanya diisi NaCl fisiologis dan serum. Langkah selanjutnya dengan menambahkan 25 μ l antigen 4 HA unit ke dalam sumuran pertama hingga ke-11. Inkubasikan pada suhu kamar selama 30 menit, lalu tambahkan 50 μ l DMA 0,5 % pada semua sumuran dengan menggunakan mikropipet. Selanjutnya diinkubasi lagi selama 30 menit hingga hasilnya dapat terbaca. Hal serupa dilakukan pada semua serum uji lainnya baik menggunakan antigen AI H5N1 *clade* 2.3.2 maupun antigen AI H5N1 *clade* 2.1.3. Pada hasil yang positif HI, maka terjadi pengendapan eritrosit berupa titik merah pada dasar sumuran mikroplat. Pada sumuran dua belas yang hanya diisi NaCl fisiologis 25 μ l, serum 25 μ l dan DMA 0,5 % berfungsi sebagai kontrol serum dan eritrosit harus mengendap. Kontrol eritrosit dilakukan juga dengan 25 μ l NaCl fisiologis dan 50 μ l eritrosit ayam 0,5 % dengan menggunakan mikroplat yang sama atau mikroplat yang lain (Ernawati dkk., 2012;OIE, 2014).

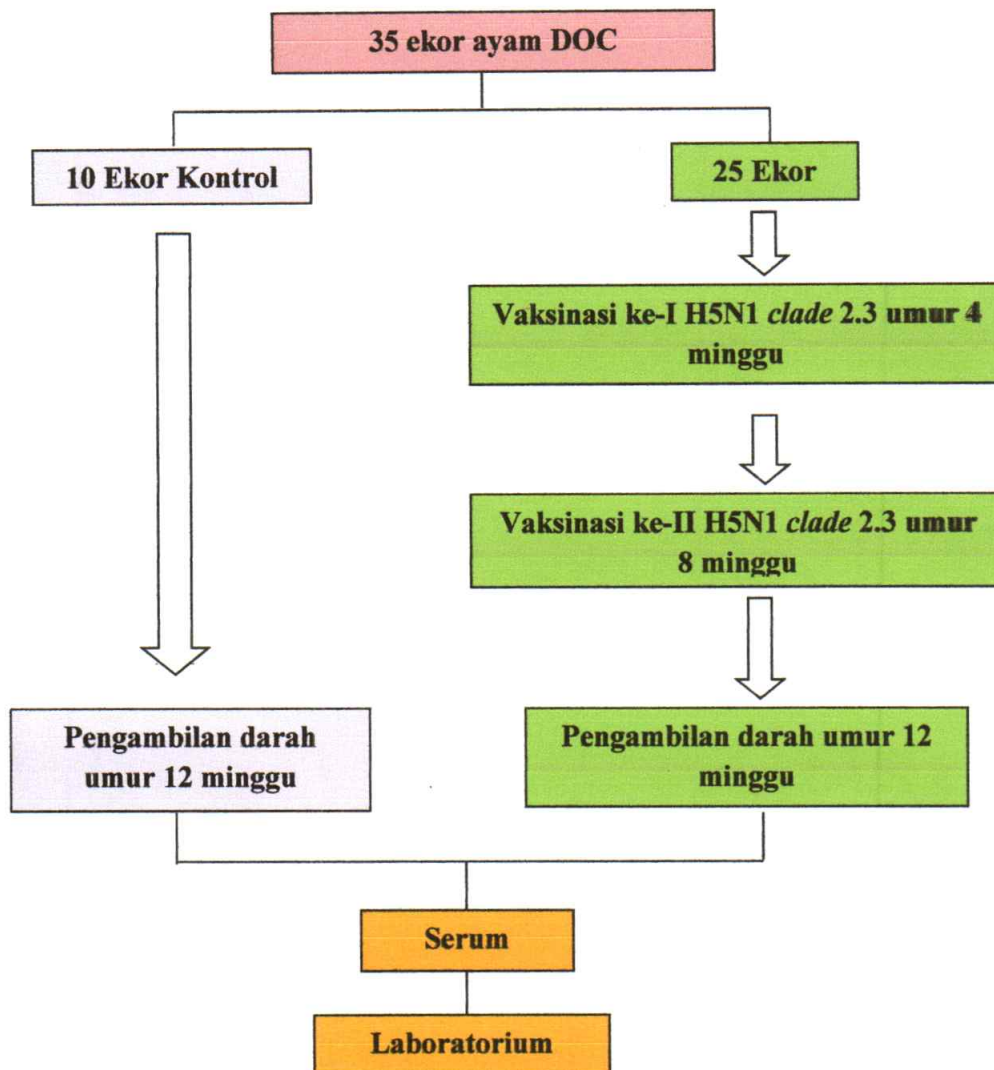
Pembacaan hambatan hemaglutinasi sempurna (100 %) adalah terjadinya pengendapan eritrosit pada dasar sumuran mikroplat yang terlihat seperti pada kontrol serum. Untuk mempermudah pembacaan yaitu dapat dilakukan dengan memiringkan mikroplat 45 derajat akan terlihat endapan seperti bentukan *Tear-Shape*. Titer serum adalah kebalikan dari pengenceran tertinggi antiserum yang masih mampu menghambat hemaglutinasi dengan sempurna (Ernawati dkk., 2012;OIE, 2014).

3.3.7 Analisa data

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif dengan analisa data uji T *paired comparison* untuk membedakan hasil titer antibodi serum ayam pasca vaksinasi *Avian Influenza H5N1 clade 2.3.2* yang direaksikan dengan antigen *clade 2.3.2* dan antigen *clade 2.1.3*. Perbedaan hasil titer tersebut akan dicari t hitung kemudian dibandingkan dengan t tabel. Pada daftar t tersebut terdapat dua taraf signifikansi sebesar 5% dan 1% yang akan didapatkan ada tiga kemungkinan:

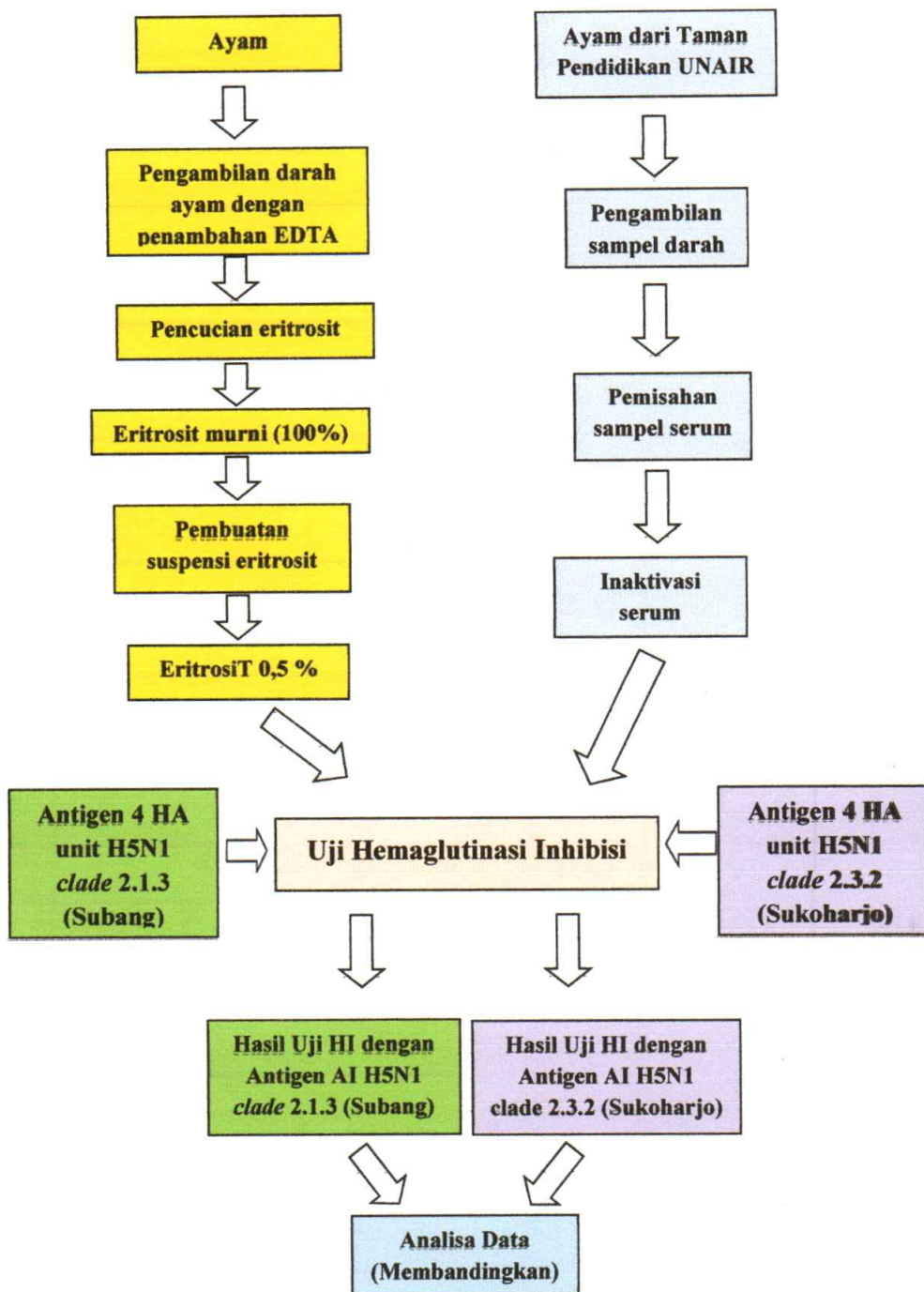
- (1) Bila t hitung $>$ t tabel 5 %, tetapi $<$ t tabel 1 %, maka perbedaan tersebut sifatnya nyata (*significance*).
- (2) Bila t hitung $>$ t tabel, maka perbedaan tersebut sifatnya sangat nyata (*highly significance*).
- (3) Bila t hitung $<$ t tabel 5 %, maka perbedaan tersebut sifatnya tidak nyata (*non significance*) (Rochiman, 2012).

3.3.8 Diagram alir proses pengambilan serum pasca vaksinasi



Gambar 3.1 Diagram Alir

3.3.9 Skema Alur Kerja Laboratorium



Gambar 3.2 Skema Alur Kerja