

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB III MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Taman Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan (*Teaching Farm*) Universitas Airlangga dan Laboratorium Virologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga dari bulan Juni 2014 sampai bulan Februari 2015.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

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

3.2.2 Bahan Penelitian

a . Hewan percobaan

Hewan coba ayam jantan petelur strain ISA Brown umur 3 minggu. Jumlah ayam yang diamati sebanyak 45 ekor. Ayam tersebut dibagi menjadi 3 kandang terbuka, masing masing kandang terdiri dari, kandang 1 diisi dengan 15 ekor ayam, kandang 2 diisi dengan 15 ekor ayam dan kandang 3 diisi dengan 15 ekor ayam

b. Vaksin *Avian Influenza*

Vaksin *Avian Influenza* yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaksin *Avian Influenza* inaktif (*Killed Vaccine*) yang mengandung virus *Avian Influenza* H5N1. Produk vaksin yang digunakan yaitu vaksin *Avian Influenza* subtipe H5N1 *clade* 2.1.3 dan vaksin *Avian Influenza* subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 dari salah satu merek vaksin komersial.

c. Serum Pasca Vaksinasi

Serum diperoleh dari hasil vaksinasi, yaitu serum ayam pasca vaksinasi virus *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.1.3 Strain PWT dan serum pasca vaksinasi virus *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.3.2 Strain Sukoharjo.

d. Antigen

Antigen yang digunakan yaitu antigen virus *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.1.3 Strain PWT dan antigen virus *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.3.2 Strain Sukoharjo dengan titer 4 HAU/ 25 μ l.

e. Reagensia Penelitian

Bahan reagensia yaitu suspensi Eritrosit 0,5%, NaCl Fisiologis (Otsuka), dan EDTA.

3.3 Metode Penelitian**3.3.1 Definisi Operasioanal**

Pengertian reaksi silang dalam penelitian ini adalah reaksi yang terjadi antara serum ayam pasca vaksinasi virus *Avian Influenza* H5N1 dan antigen virus

Avian Influenza H5N1 dari *clade* yang berbeda yaitu *clade* 2.3.2 dan *clade* 2.1.3. *Clade* merupakan pengelompokan virus *Avian Influenza* H5N1 berdasarkan perbedaan antigen HA(Hemagglutinin) yang dimiliki virus.

3.3.2 Perlakuan Hewan Percobaan

Ayam sejumlah 45 ekor masing – masing dilakukan vaksinasi kecuali pada 15 ayam kontrol (tanpa vaksinasi). 15 ekor ayam pada kandang A di vaksin dengan virus *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.1.3 dan 15 ekor pada kandang B di vaksin dengan virus *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.3.2, sedangkan 15 ekor pada kandang C tidak di vaksin (kontrol).

3.3.3 Vaksinasi Ayam

Pada penelitian ini dilakukan vaksinasi dengan vaksin *Avian Influenza* inaktif. Rute vaksinasi pertama sub cutan dan dosis yang diberikan yaitu 0,15 ml / ekor sedangkan vaksinasi ke dua secara intramuscular dengan dosis 0,3 ml / ekor. Vaksinasi dilakukan sebanyak dua kali pada saat ayam berumur 3 minggu dan 7 minggu. Dari kandang 1,2 dan 3 diambil darah dari masing masing 15,15 dan 15 ekor ayam sebagai serum darah uji. Sampel darah diambil saat sebelum dan setelah vaksinasi sesuai jadwal. Serum yang diambil dititrasi antibodinya terhadap virus *Avian Influenza* dengan uji HI

3.3.4 Pengambilan Darah dan Evaluasi Titer Antibodi

Darah diambil sebanyak 3 kali, yaitu pengambilan darah pertama dilakukan pada umur ayam 3 minggu (untuk evaluasi adanya antibodi maternal), pengambilan darah kedua pada umur ayam 7 minggu (4 minggu pasca

vakisnasi pertama) dan pengambilan darah ke tiga pada umur ayam 11 minggu (4 minggu pasca vakinasi ke dua). Ayam diambil darahnya di daerah sayap yaitu pada vena brachialis secara legeartis dengan menggunakan spuit tuberkulin dan spuit 3 ml. Darah tersebut selanjutnya dibawa ke Laboratorium Virologi FKH-UA. Darah dibiarkan tetap berada di dalam spuit dan disimpan dalam refrigerator selama satu malam. Kemudian dilakukan langkah pemisahan serum dari darah dengan cara sentrifus. Selanjutnya serum yang terpisah dari darah diambil dan dilakukan pemeriksaan titer antibodi dengan uji HI.

3.3.5 Prosedur Penyiapan Eritosit Uji

Pembuatan eritrosit diawali dengan memasukkan 5 ml darah ayam (*Gallus gallus domesticus*) dalam tabung reaksi yang telah berisi EDTA. Tabung digoyang secara perlahan dengan gerakan membentuk angka delapan, agar tidak menggumpal dan tidak terjadi lisis. PZ ditambahkan pada darah sebanyak 10 ml untuk proses pencucian. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dan *buffcoat* dibuang kemudian ditambah PZ dan disentrifuse lagi. Kegiatan ini diulang dua sampai tiga kali atau kemudian supernatan dibuang untuk mendapatkan sel darah merah 100% (WHO, 2002).

3.3.6 Pembuatan Suspensi Eritrosit 0,5%

Suspensi eritrosit 0,5% dibuat dengan mengencerkan 0,5 ml eritrosit dengan 100 ml PZ.

3.3.7 Pembuatan Antigen 4HA Unit dan Retitrasi Antigen 4HA Unit

Pembuatan antigen 4 HA unit dari antigen pekat virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 dan *clade* 2.1.3 kemudian diencerkan sampai pada standart 4HA. Standart antigen yang digunakan pada uji HI adalah 4 HA unit/25 µl (WHO, 2002). Pengenceran di hitung sesuai dengan nilai titer antigen pekat sebelum pengenceran dan kebutuhan antigen dalam penelitian.

Untuk mengetahui ketepatan antigen 4 HA unit yang telah dibuat, diperlukan pengujian dengan retitrasi antigen.

Prosedur untuk retitrasi antigen 4HA Unit adalah dengan memasukkan 25 µl NaCl Fisiologis ke dalam lubang mikroplate "V" *bottom* nomor satu sampai 5, kemudian memasukkan antigen virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 dan *clade* 2.1.3 yang sudah diencerkan menjadi 4HA Unit sebanyak 25 µl ke dalam lubang nomor satu, dan lubang dibawahnya (untuk antigen *clade* 2.1.3) kemudian mencampur hingga homogen. Melakukan pengenceran serial dengan mengambil 25 µl dari lubang nomor satu dipindah ke lubang nomor dua dan mencampur hingga homogen, melakukan hal yang sama hingga pada lubang nomor empat. Lubang nomor lima digunakan sebagai kontrol negatif. Bila pengenceran antigen 4HA Unit tepat, maka pada lubang nomor satu dan dua akan terjadi hemaglutinasi(WHO, 2002) demikian pula untuk antigen 2.1.3 diperlakukan sama dengan antigen 2.3.2.

3.3.8 Uji Hambatan *Hemagglutination Inhibition* (HI Test) Mikroteknik

Uji serologik yang digunakan untuk menentukan titer antibodi virus *Avian Influenza* H5N1, yaitu uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI) sesuai dengan prosedur *Office International des Epizooties* (OIE,2012). Prinsipnya sebanyak 25 µl NaCl

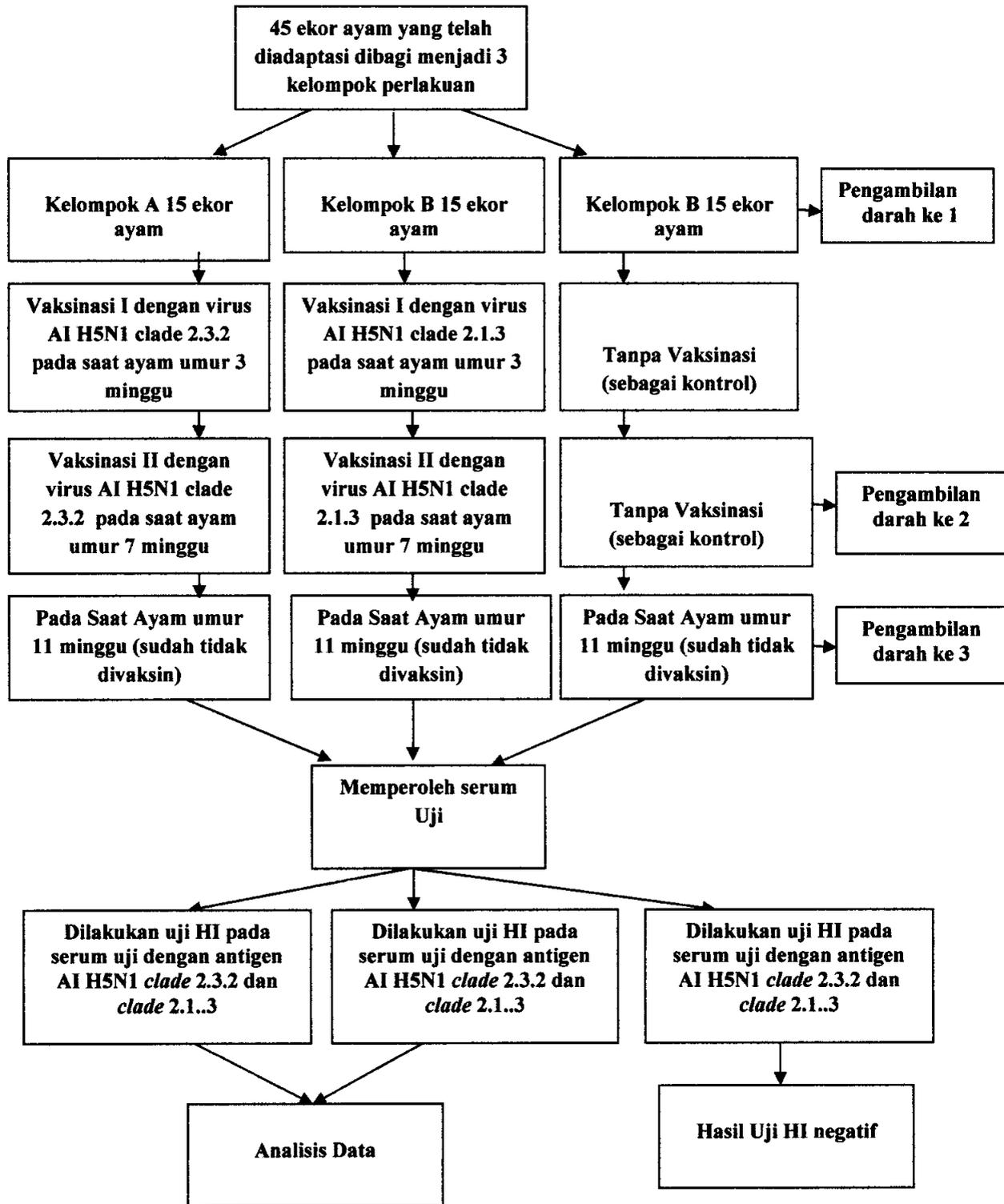
Fisiologis dimasukkan ke dalam lubang-lubang cawan mikro 96 lubang dengan dasar berbentuk V. Kemudian ditambahkan dengan 25 μ l serum-serum uji dan serum positif pada lubang ke-1 dan dilakukan pengenceran serial kelipatan 2 dari lubang pertama hingga lubang ke-11, sedangkan lubang ke duabelas dipergunakan sebagai kontrol serum. Sebanyak 25 μ l antigen virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 dan *clade* 2.1.3 (masing masing pada *microplate* yang berbeda) sebesar 4 HAU ditambahkan ke dalam setiap lubang, kecuali pada lubang- lubang ke duabelas ditambah 25 μ l NaCl Fisiologis dan selanjutnya dicampur dengan cara menggoyangkan *microplate* sebelum diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya sebanyak 50 μ l eritrosit 0,5 % ditambahkan ke dalam setiap lubang, kemudian dicampur dengan cara menggoyangkan *microplate* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Interpretasi hasil titer HI ditunjukkan pada pengenceran serum tertinggi yang masih memberikan inhibisi (hambatan) pada antigen 4 HAU. Inhibisi ditetapkan dengan melakukan pengamatan eritrosit pada sumuran *microplate*, bila *microplate* dimiringkan terlihat eritrosit membentuk tetesan air mata yang serupa dengan eritrosit kontrol serum, menunjukkan titer antibodi positif. Serum yang diujikan adalah serum hasil vaksinasi virus *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.1.3 dan *clade* 2.3.2 pada ayam layer dan antigen yang digunakan adalah antigen virus *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.1.3 dan *clade* 2.3.2 identik dengan yang digunakan untuk vaksinasi.

3.4 Analisa Data

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Percobaan Faktorial 2 x 2 yang terdiri dari 2 faktor yaitu serum ayam

pasca vaksinasi *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.3.2 dan *clade* 2.1.3 dengan Antigen *Avian Influenza* H5N1 *clade* 2.3.2 dan *clade* 2.1.3 untuk mengetahui interaksi antara kombinasi perlakuan. Jika terdapat interaksi dilanjutkan dengan Uji One Way ANOVA untuk mengetahui persamaan reaksi interaksi antara kombinasi perlakuan kemudian dilanjutkan dengan Uji BNJ jika terdapat hubungan yang signifikan antara kombinasi perlakuan.

3.5 Skema Alur Penelitian



Gambar 3.5 Skema Alur Penelitian