

## BAB III

## BAHAN DAN METODE

## Tempat dan waktu penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan pada dua tempat, yaitu untuk pemeliharaan ayam berlokasi di jalan Petemon I/ 79 Surabaya. Sedangkan untuk pemeriksaan titer antibodi dan bakteriologi dilakukan di laboratorium Bakteriologi FKH Universitas Airlangga. Penelitian ini dimulai pada tanggal 24 - Desember 1986 sampai dengan tanggal 7 - April 1987.

## A. Bahan

## 1. Vaksin

Vaksin yang digunakan adalah bakterin inaktif dari Haemophilus gallinarum (HG) buatan VETMA Surabaya. Adapun kandungan kuman dari bakterin tersebut adalah  $10^8$  kuman HG per dosis 0,1 ml.

## 2. Antigen

Antigen dibuat dari biakan isolat H. paragallinarum (VETMA) yang diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18 - 24 jam, kemudian dipanen dan dibuat suspensi yang mengandung atau berisi  $10^{8,15}$  kuman H. paragallinarum per 0,1 ml.

## 3. Media

Media untuk H. paragallinarum adalah Agaf darah yang mengandung ekstrak ragi dan serum kuda 1% dan media cair brain heart infusion (BHI).

## 4. Bahan kimia lain

Bahan kimia yang juga digunakan dalam penelitian ini antara lain; Phosfat buffer salin (PBS) PH. 7,2; alkohol 70%, formalin 0,025%.

## 5. Alat - alat

Microplate tipe U, pipet droplet 0,025 ml dan 0,05 ml, microdiluter 0,025 ml, venojeck, centrifuge, tabung 2 ml dan 5 ml, gelas beaker, rak tabung, spuit 1 ml dan 5 ml, cawan petri, ose, bunsen, inkubator, erlemayer dan pipet.

## 6. Hewan percobaan

Sebanyak 96 ekor ayam umur sehari ( kuri ) jenis Bromo 508 digunakan dalam penelitian ini yang terbagi atas ; 36 ekor digunakan untuk pemeriksaan terhadap ID<sub>50</sub> dan 60 ekor digunakan untuk penentuan respon kekebalan.

## B. Metoda

## 1. Persiapan penelitian

## a. Kandang

Kandang yang dipergunakan memakai sistem alas bambu. Kandang tersebut dibuat sedemikian rupa tergantung dari kebutuhan. Kandang untuk penghitungan terhadap ID<sub>50</sub> dibuat sebanyak 6 petak yang masing - masing petak berukuran 60 x 60 cm. Kandang ini juga digunakan untuk ujiantang. Sedang kandang yang dipergunakan untuk ayam yang divaksin dan tidak divaksin dibuat 4 petak yang masing - masing berukuran 50 x 100 cm.

## b. Pembuatan Eritrosit ayam 1 persen.

Darah ayam donor diambil sebanyak 2 ml melalui vena axillaris dengan vacum tainer yang berisi larutan anti pembekuan darah. Darah dicuci dengan PBS sambil dipusingkan dan supernatannya dibuang selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS sampai tiga kali dengan cara yang sama. Kemudian endapan eritrosit tersebut ditambah dengan PBS menurut keperluan.

c. Pembuktian isolat Haemophilus paragallinarum :

Isolat . . . diperoleh dari VETMA Surabaya, sebelum digunakan dalam penelitian ini dilakukan pembuktian. Isolat tersebut dibiakkan dalam Agar darah yang mengandung ekstrak ragi dan serum kuda 1 %. Disamping itu dilakukan pewarnaan Gram. Dua hari setelah pemupukan, biakkan tersebut dipupuk kembali ( pemurnian ). Hasil biakkan dari pupukan kedua dilanjutkan dengan uji biokimiawi dan gula gula untuk menentukan kuman H. paragallinarum.

d. Pembuatan suspensi kuman untuk ujiantang

Kuman penantang dipergunakan isolat H. paragallinarum. Sebelum dipakai sebagai kuman penantang dihitung dosis infeksi minimal 50 % (  $ID_{50}$  ) pada ayam umur 8 minggu. Isolat tersebut diambil dari media cair BHI, kemudian diencerkan secara seri kelipatan 10 mulai dari pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-11}$ . Masing-masing pengenceran tersebut dibiakkan dalam media BHI padat, yang selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah kuman. Disamping itu juga diinokulasi pada tubuh ayam. Penyuntikan tersebut dimulai dari pengenceran  $10^{-6}$  sampai  $10^{-11}$  pada setiap ekor ayam secara intra nasal. Ayam yang diinokulasi dari masing-masing pengenceran adalah 6 ekor, selanjutnya diamati gejala klinis pada ayam yang terinfeksi kuman . Pengamatan dilakukan selama 14 hari, ayam yang menunjukkan gejala klinik dilakukan pencatatan.  $ID_{50}$  dihitung dengan menggunakan metode REED dan MUENCH ( 1938 ) dikutip oleh YAMAMOTO, ( 1983 ).

## 2. Pelaksanaan penelitian

### a. Pemeriksaan antibodi maternal

100 ekor anak ayam petelur jantan umur 1 hari ( kuri ) jenis Bromo 508 pada umur 6 minggu diambil serumnya untuk dideteksi antibodi maternal dengan agglutinas plate. Ayam yang menunjukkan hasil uji positif dikeluarkan dan bila hasil uji negatif dipergunakan dalam penelitian.

### b. Vaksinasi dengan vaksin Coryvet

Sebanyak 60 ekor ayam jenis Bromo 508 berumur 8 minggu dibagi secara acak sama banyak menjadi kelompok I yang divaksinasi dengan menggunakan bakterin H. gallinarum produksi Vetma dengan dosis 0,5 ml (  $1 \times 10^8$  kuman ) lewat suntikan dibawah kulit leher dan kelompok II sebagai kontrol yang tidak divaksinasi.

### c. Penentuan efektivitas vaksin

#### 1. Pengukuran titer antibodi

Antibodi hasil vaksinasi diukur setiap minggu, yaitu pada minggu I, II, III, IV, V, dan VI setelah divaksinasi. Penghitungan titer antibodi dilakukan dengan uji hambatan agglutinas microtiter cara ALLAN ( 1978 ). Dalam uji tersebut digunakan antigen yang berasal dari isolat H. paragallinarum yang diperoleh dari Vetma.

#### 2. Uji tantang ( Challenge test )

Ayam umur 10 minggu atau 2 minggu setelah divaksinasi ditantang dengan menggunakan H. paragallinarum patogen

dari ayam dengan dosis  $10^{8,15}$  kuman per 0,1 ml. untuk setiap ekor ayam melalui lubang hidung ( RIMLER et.al., 1977 ). Jumlah masing - masing kelompok yang ditantang adalah sebagai berikut; kelompok I dan II masing - masing 30 ekor yang dibagi dalam 3 tahap. Tahap pertama, masing - masing 10 ekor ditantang pada minggu ke II setelah divaksinasi. Tahap kedua, masing - masing 10 ekor ditantang pada minggu ke IV dan tahap ketiga, masing - masing 10 ekor ditantang pada minggu VI setelah vaksinasi.

d. Isolasi dan identifikasi kuman

Ayam yang menunjukkan gejala klinik, maka eksudat yang terdapat dalam lubang hidung ayam tersebut diambil dengan menggunakan Cotton swab, material tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol yang telah mengandung PBS, selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram, dibiakkan pada agar darah yang telah ditambah ekstrak ragi dan serum kuda 1 % dilanjutkan dengan pemurnian. Hasil biakan dari pemurnian dilanjutkan dengan uji biokimia dan gula - gula untuk menentukan kuman H. paragallinarum.

e. Penghitungan titer antibodi ( BRUGH, 1978 ).

Titer antibodi rata - rata ( Geometrik Mean Titer ) dari tiap kelompok ayam adalah jumlah titer antibodi dari masing - masing kelompok dibagi dengan jumlah ayam dalam kelompok tersebut.

3. Analisa data

Data yang diperoleh, dikumpulkan dan diadakan tabulasi, ke-

mudian di uji secara statistik, dibandingkan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol yaitu;

- a. untuk perbedaan Geometrik Mean Titer dilakukan uji " t " student ( SUDJANA dkk, 1975 );
- b. untuk ujiantang digunakan uji "  $\chi^2$  " ( Chi - Kwadrat ) ( SUDJANA dkk, 1975 );
- c. untuk mengetahui apakah ada korelasi antara Geometrik Mean Titer hasil vaksinasi dengan ujiantang, digunakan uji korelasi ( " r " ) ( SUDJANA dkk, 1975 ).