

SKRIPSI

PERBANDINGAN TITER ANTIBODI ANTARA AYAM LAYER YANG DIVAKSIN IBD MONOVALEN INAKTIF DENGAN IBD POLIVALEN INAKTIF (IBD-IB-ND) MENGUNAKAN INDIRECT ELISA



Oleh :

FEBRY KUSUMANING ERLYTA SARI

NIM 060710191

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

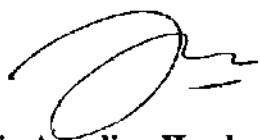
PERBANDINGAN TITER ANTIBODI ANTARA AYAM *LAYER* YANG
DIVAKSIN IBD MONOVALEN INAKTIF DENGAN IBD POLIVALEN
INAKTIF (IBD-IB-ND) MENGGUNAKAN *INDIRECT* ELISA

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk menempuh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Oleh :

FEBRY KUSUMANING ERLYTA SARI
NIM 060710191

Menyetujui,
Komisi Pembimbing



Gracia Angelina Hendarti, M.Si., drh
Pembimbing Pertama



Dr. Suwarno, M.Si., drh
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**PERBANDINGAN TITER ANTIBODI ANTARA AYAM *LAYER* YANG
DIVAKSIN IBD MONOVALEN INAKTIF DENGAN IBD POLIVALEN
INAKTIF (IBD-IB-ND) MENGGUNAKAN *INDIRECT ELISA***

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 28 Juli 2010



Febry Kusumaning Erlyta Sari
NIM. 060710191

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 19 Juli 2010

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

- Ketua : Adi Prijo Rahardjo, M.Kes., drh
Sekretaris : Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., drh
Anggota : Dr. Soeharsono, M.Si., drh
Pembimbing I : Gracia Angelina Hendarti, M.Si., drh
Pembimbing II : Dr. Suwarno, M.Si., drh

Telah diuji pada

Tanggal : 26 Juli 2010

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Adi Prijo Rahardjo, M.Kes., drh.

Anggota : Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., drh

Gracia Angelina Hendarti, M.Si., drh

Dr. Suwarno, M.Si., drh.

Surabaya, 28 Juli 2010

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh.
NIP. 130 687 305

**COMPARISON OF LAYER ANTIBODY TITER VACCINATED WITH
IBD MONOVALENT INACTIVE AND IBD POLYVALENT INACTIVE
(IBD-IB-ND) BY USING INDIRECT ELISA**

Febry Kusumaning Erlyta Sari

ABSTRACT

Infectious Bursal Disease is caused by Birnavirus, has a mortality rate up to 100% and immunosuppressive. The aim of this study was determine antibody titer difference of layer chicken vaccinated with IBD monovalent inactive vaccine and IBD polyvalent inactive (IBD-IB-ND) and to know the relationship between two types of vaccine administration with weeks of treatment vaccination. A total of 24 chicks were divided into four groups. Group 1 (P1), six chickens was vaccinated with IBD monovalent inactive (LV3UA) at the age of two weeks given 0.3 ml /chick with a dose of $10^{3.0}$ TCID₅₀/0,3ml virus. Group 2 (P2), six chickens was vaccinated with IBD polyvalent inactive (LV8UA) at the age of two weeks are given 0.5 ml /chick with a dose of IBD virus $10^{3.0}$ TCID₅₀/0,5ml, $10^{3.5}$ EID₅₀/0,5ml IB, ND $10^{5.0}$ EID₅₀ /0,5 ml. Group 3 (P3), six chickens as a control IBD monovalent inactive vaccine given 0.3 ml physiological NaCl /chick. Group 4 (P4), six chickens as a control vaccine IBD polyvalent inactive (IBD-IB-ND) given 0.3 ml physiological NaCl/chick. Blood sampling for antibody titer observations performed four times in all age groups for two week, four week, six week and eight week. Measurement of antibody titers was used indirect ELISA. Data analysis used the General Linear Models (GLM) and ANOVA. The results showed that 1) there is no difference antibody titers of vaccinated layer chickens with IBD monovalent inactive and IBD polyvalent inactive (IBD-IB-ND) vaccine, 2) There is a relation between the used of both vaccine treatment and weeks of vaccination.

Keywords : IBD, IB, ND, monovalent vaccine, polyvalent vaccine.

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur alhamdulillah atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat, berkah dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul "PERBANDINGAN TITER ANTIBODI PADA AYAM *LAYER* YANG DIVAKSIN IBD MONOVALEN INAKTIF DENGAN VAKSIN IBD POLIVALEN INAKTIF (IBD-IB-ND) MENGGUNAKAN *INDIRECT ELISA*" sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penulisan skripsi ini penulis telah banyak menerima bimbingan, arahan, dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Gracia Angelina Hendarti, M.Si., drh selaku pembimbing pertama dan Dr. Suwarno, M.Si., drh selaku pembimbing kedua yang selalu meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, petunjuk dan nasehat yang sangat berguna dalam penyusunan skripsi ini.
2. Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga beserta staff pimpinan atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
3. Adi Prijo Rahardjo, M.Kes., drh selaku ketua penguji seminar dan skripsi, Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., drh selaku penguji II dan Dr.

Soeharsono, M.Si., drh selaku penguji III atas dukungan serta saran-saran yang telah diberikan.

4. Tutik Juniastuti, M.Kes., drh sebagai dosen wali yang senantiasa memberikan dukungan moril, bimbingan sekaligus menjadi pengganti orang tua selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
5. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh dan seluruh staf pengajar serta karyawan di Laboratorium Virologi dan Imunologi yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium tersebut dan atas kebersamaannya selama ini.
6. Papa Sudjadi, Mama Sri Edo Kusumaning Rahayu serta adik-adik yaitu Bagus Maulidika Roufi dan Risqi Kukuh Pambudi yang penulis cintai dan sayangi atas cinta, kasih sayang yang tulus, pengorbanan seluruh jiwa, raga dan hidupnya, motivasi dan doa yang telah diberikan hingga saat ini.
7. Sahabat-sahabat penulis Mas Bowo, Septa, Rudi, Yunia, Desi, Putri dan seluruh rekan-rekan seperjuangan FKH angkatan 2006 terima kasih atas motivasi, dukungan dan kebersamaannya selama menimba ilmu di kampus ini dan juga tak lupa untuk Riski Arya Pradikta tercinta yang selalu setia menemani penulis selama ini dengan segala pengertian dan perhatiannya.

Penulis sepenuhnya menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan dan masih banyak terdapat kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan dan menerima segala bentuk kritik dan saran guna perbaikan lebih

lanjut, agar kelak hasil penulisan ini dapat bermanfaat bagi perkembangan dunia Kedokteran Hewan.

Semoga Allah SWT senantiasa melipatgandakan amal kebaikan semuanya dan selalu memberikan rahmat dan karuniaNya kepada kita semua. Amin

Surabaya, 28 Juli 2010

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
ABSTRACT.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Landasan Teori.....	6
1.4 Tujuan Penelitian.....	8
1.5 Manfaat Penelitian.....	8
1.6 Hipotesis.....	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 Sejarah Ayam Petelur.....	10
2.2 <i>Infectious Bursal Disease</i>	11
2.3 Etiologi.....	12
2.3.1 Morfologi.....	12
2.3.2 Klasifikasi.....	13
2.3.3 Sifat Virus.....	13
2.3.4 Serotipe.....	14
2.4 Diagnosis.....	15
2.5 Pencegahan dan Pengobatan.....	16

2.6 <i>Infectious Bronchitis</i>	17
2.7 Etiologi.....	17
2.7.1 Morfologi.....	17
2.7.2 Klasifikasi.....	18
2.7.3 Sifat Virus.....	18
2.7.4 Serotipe.....	18
2.8 Diagnosis.....	19
2.9 Pencegahan dan Pengobatan.....	19
2.10 <i>Newcastle Disease</i>	20
2.11 Etiologi.....	20
2.11.1 Morfologi.....	20
2.11.2 Klasifikasi.....	21
2.11.3 Sifat Virus.....	22
2.11.4 Serotipe.....	22
2.12 Diagnosis.....	23
2.13 Pencegahan dan Pengobatan.....	23
2.14 Vaksin.....	24
2.15 Antibodi.....	27
2.16 ELISA (<i>Enzyme – Linked Immunoabsorbent Assay</i>).....	28
2.17 Teknik <i>Indirect</i> ELISA.....	30
BAB 3 MATERI DAN METODE	32
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	32
3.2 Materi Penelitian.....	32
3.2.1 Hewan Percobaan.....	32
3.2.2 Pakan.....	32
3.2.3 Bahan dan Alat Penelitian.....	33
3.3 Metode Penelitian.....	33
3.3.1 Cara Pengambilan Serum.....	34
3.3.2 Prosedur Pemeriksaan Antibodi Hasil Vaksinasi IBD dengan Teknik <i>Indirect</i> ELISA.....	35

3.4 Variabel Penelitian.....	36
3.4.1 Variabel Bebas.....	36
3.4.2 Variabel Tergantung.....	36
3.4.3 Variabel Kendali.....	36
3.4.4 Definisi Operasional Variabel.....	36
3.5 Penghitungan Titer Antibodi.....	37
3.5 Rancangan Penelitian dan Analisis Statitik Data.....	38
Kerangka Operasional.....	39
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	40
4.1 Hasil Uji <i>Indirect</i> ELISA.....	40
4.2 Pengujian Antibodi Hasil Vaksinasi.....	41
BAB 5 PEMBAHASAN.....	46
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
RINGKASAN.....	54
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Prinsip Kerja ELISA.....	30
2.2 Prinsip Kerja <i>Indirect</i> ELISA.....	31
4.1 Hubungan antara titer antibodi dengan kedua vaksin perlakuan dan kontrol.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Rataan (mean) \pm SD (<i>Standard Deviation</i>) titer antibodi ayam pada minggu ke-0 (minggu sebelum diberikan vaksinasi perlakuan)	41
4.2	Rataan (mean) total tiap perlakuan dan kontrol kedua perlakuan	41

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Bagan Alur Penelitian dengan uji <i>Indirect</i> ELISA....	61
Lampiran 2	Bahan-Bahan yang digunakan untuk uji <i>Indirect</i> ELISA.....	62
Lampiran 3	Tabel Titer Antibodi antara Ayam Petelur yang divaksin IBD Monovalen inaktif dengan IBD Polivalen inaktif.....	68
Lampiran 4	Analisis Data.....	70
Lampiran 5	Alat-Alat yang Digunakan dalam Penelitian.....	91
Lampiran 6	Interpretasi Hasil ELISA.....	93

DAFTAR SINGKATAN

AGP	: <i>Agar Gel Presipitation</i>
Anova	: <i>Analysis of Variant</i>
AP	: <i>Alkaline Phospatase</i>
BNJ	: <i>Beda Nyata Jujur</i>
CEF	: <i>Chicken Embryo Fibroblast</i>
CPE	: <i>Cyto Pathogenic Effect</i>
DOC	: <i>Day Old Chick</i>
ds	: <i>double stranded</i>
EID	: <i>Egg Infective Dose</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GLM	: <i>General Linear Model</i>
HA	: <i>Hemaglutinasi</i>
HI	: <i>Hemaglutinasi Inhibisi</i>
HPAI	: <i>High Pathogenic Avian Influenza</i>
HRP	: <i>Horseradish Peroxidase</i>
IB	: <i>Infectious Bronchitis</i>
IBD	: <i>Infectious Bursal Disease</i>
MD	: <i>Marek's Disease</i>
ND	: <i>Newcastle Disease</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
OIE	: <i>Office Internatrional des Epizooties</i>
SD	: <i>Standard Deviation</i>
SHS	: <i>Swollen Head Syndrome</i>
SPSS	: <i>Statistical Program for Social Scientific</i>
ss	: <i>single stranded</i>
TAB	: <i>Telur Ayam Berembrio</i>
TCID	: <i>Tissue Culture Infective Dose</i>
VN	: <i>Virus Neutralization</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Perkembangan penyakit unggas mengalami kemajuan yang sangat pesat. Mutasi yang terjadi pada beberapa penyakit unggas membuat para peneliti berusaha mengembangkan jenis-jenis vaksin terbaru menggunakan strain yang cocok dengan strain di lapangan. Para peternak harus tanggap dalam menghadapi berbagai penyakit yang siap menjangkiti ternaknya (Rantam dan Asmara, 2010). Sejalan dengan kebutuhan akan protein hewani (daging, telur, susu) yang makin meningkat, kebutuhan akan vaksin hewan juga mengikuti kurva pemenuhan protein hewani. Perkembangan teknologi pembuatan vaksin hewan semakin pesat untuk mengatasi berbagai penyakit yang sering menjangkiti ternak unggas (Bahri dan Kusumaningsih, 2005).

Beberapa kendala penyakit masih sering menjangkiti ternak ayam sampai saat ini, di antaranya adalah penyakit *Infectious Bursal Disease* (IBD), penyakit *Newcastle Disease* (ND) dan *Infectious Bronchitis* (IB). Ketiga penyakit tersebut saling berkaitan karena biasanya setelah ayam terserang IBD maka akan mudah terserang penyakit seperti IB dan ND (Tabbu, 2000).

Penyakit IBD merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh *Birnavirus*, mempunyai angka mortalitas hingga 100% dan bersifat immunosupresif (Murphy *et al.*, 1999). Mortalitas penyakit IBD mencapai puncaknya dalam kurun waktu antara 2 sampai 3 hari. Jika ayam yang terserang penyakit ini mampu melewati batas waktu tersebut, maka tingkat mortalitas penyakit akan turun dan

secara perlahan ayam tersebut akan sembuh. Penyakit IBD resisten terhadap lingkungan, oleh karena itu letupan akan terjangkitnya penyakit yang terjadi pada suatu peternakan masih dapat terjadi (Tabbu, 2000). Penyakit IBD menimbulkan gangguan pada alat-alat pembentuk kekebalan terutama pada bursa fabrisius sehingga mengalami penghambatan dalam membentuk zat kebal. Akibatnya, selama hidup ayam mudah terserang penyakit seperti ND dan IB (Sivanan and Maheswaren, 1998).

Penyakit *Infectious Bronchitis* (IB) mulanya dilaporkan oleh Shalk dan Hawn di Dakota Utara, AS, pada tahun 1931. Penyakit yang disebabkan oleh *Coronavirus* ini menyerang alat pernafasan dan bersifat menular. Ayam yang terserang penyakit ini secara menciri ditandai dengan kesulitan bernafas yang diikuti oleh penurunan produksi telur secara tajam. Penyakit ini menyerang ayam muda (2 hari - 4 minggu) dari semua jenis, tetapi tidak menyerang kalkun atau unggas air (Saif, 2003). Morbiditas dapat mencapai 100% dalam waktu beberapa hari setelah infeksi virus IB oleh karena virus tersebut dapat menyebar secara cepat. Mortalitas dapat mencapai 25% atau lebih pada anak ayam yang berumur kurang dari 6 minggu (Quinn *et al.*, 2003).

Penyakit yang juga menyebabkan kerugian besar dan menjadi konsentrasi dunia veteriner adalah *Penyakit Newcastle Disease* (ND). *Newcastle Disease* merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh *Paramyxovirus unggas 1* dari famili *Paramyxoviridae* (Fenner *et al.*, 1995).

Penyakit ini menimbulkan kerugian yang sangat besar karena memiliki tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Sainsburi, 2000). Penyakit ND

ditemukan pertama kali oleh Kranevelt pada tahun 1926 di Jawa dan pada tahun yang sama juga ditemukan di Newcastle, Inggris (Murphy *et al.*, 1999). Tingkat mortalitasnya mencapai 80-100%. Kegagalan program pencegahan ND di antaranya tergantung oleh jenis vaksin yang digunakan, ayam yang divaksin dan manajemen vaksinasi (Tizard, 2000).

Identifikasi terhadap virus IBD dapat dilakukan dengan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), khususnya teknik *indirect* ELISA yang mengadopsi standard positif dan negatif dari serum kontrol. (Ramadass *et al.*, 2008). Di samping itu, teknik tersebut mempunyai variasi spesifisitas yang cukup tinggi (Burgess, 1995).

Pada ayam, terdapat dua sistem kekebalan tubuh primer yaitu, bursa Fabrisius dan timus. Bursa Fabrisius sebagian besar berisi sel B yang berperan dalam memproduksi antibodi humoral atau yang bersikulasi, sedang timus sebagian besar berisi sel T dengan fungsi mengenal dan menghancurkan sel yang terinfeksi bakteri atau virus, mengaktifkan makrofag dalam fagositosis serta membantu sel B dalam memproduksi antibodi (Van den Berg, 2000). Antibodi maternal masih dapat ditemukan pada ayam umur 7 hari (Kim *et al.*, 2000).

Vaksinasi dapat dilakukan dengan beberapa cara, seperti melalui injeksi, air minum, tetes mata atau hidung, semprot, maupun tusuk sayap (Ausvetplan, 2009). Vaksinasi untuk ayam petelur harus dilakukan selengkap mungkin, sebab peternakan ayam petelur memerlukan pemeliharaan jangka panjang (Lindahl, 2004).

Pada kenyataannya, vaksinasi secara tunggal dan berulang-ulang khususnya pada ayam petelur dapat mengakibatkan ayam tersebut stres. (Ernawati dkk., 1995). Penggunaan vaksin polivalen merupakan sebuah solusi untuk menjawab hal di atas. Beberapa vaksin kombinasi banyak diterapkan di Indonesia dan merupakan jawaban atas kebutuhan ekonomis para peternak unggas (Rantam dan Asmara, 2010) . Namun efektifitas dalam penggunaan vaksin polivalen masih diragukan dalam meningkatkan level antibodi dari ayam. Penggunaan vaksin polivalen juga tak lepas dari fenomena interferensi pada gabungan antigen yang diformulasikan dalam vaksin.

Salah satu vaksin kombinasi yang telah diteliti adalah gabungan vaksin ND-IB. Pada penelitiannya, Ernawati dkk, (1995) menyatakan bahwa virus vaksin ND-IB yang diinokulasi pada TAB (Telur Ayam Berembrio) menimbulkan perubahan spesifik IB lebih nyata yaitu timbulnya jari-jari kaki yang keriting. Rata-rata titer antibodi kelompok ayam yang divaksinasi ND-IB menunjukkan penurunan pada dua minggu setelah vaksinasi kemudian meningkat pada tiga minggu setelah vaksinasi dan selanjutnya menurun. Pada hasil penelitian dinyatakan pula bahwa titer antibodi yang dihasilkan oleh vaksin tunggal ND lebih tinggi dibanding dengan titer antibodi yang dihasilkan oleh vaksin kombinasi ND-IB.

Penelitian mengenai vaksin inaktif monovalen IBD yang dibandingkan dengan vaksin inaktif polivalen IBD-IB-ND pernah dilakukan di Bulgaria pada tahun 2000 oleh Tzvetkov. Namun strain vaksin IBD yang digunakan di Bulgaria berbeda dengan strain vaksin IBD yang akan digunakan pada penelitian ini. Di

Bulgaria menggunakan strain IBD dengan kode Itz-15 sedangkan pada penelitian kali ini digunakan strain IBD dengan kode #951.

Pada penelitian kali ini, pengukuran titer antibodi difokuskan terhadap IBD mengingat penyakit IBD seringkali menyerang suatu peternakan tertentu dan IBD akan menyerang secara berulang dari satu periode ke periode lain pemeliharaan DOC (*Day Old Chick*) dengan mortalitas dan tingkat kerugian ekonomi yang tinggi. Penyakit IBD juga mampu menekan sistem imun ayam sehingga memudahkan penyakit lain seperti IB dan ND menjangkiti ternak unggas. Walaupun kemampuan peternak untuk menanggulangi IBD sudah cukup baik, penyakit ini merupakan masalah utama di berbagai peternakan ayam pedaging maupun petelur (Tabbu, 2000). Menurut Bahri dan Kusumaningsih, (2005), terjadi peningkatan kebutuhan akan vaksin IBD di Indonesia yang menduduki peringkat kedua setelah ND dengan kebutuhan rata-rata 15,90% (sekitar 122,23 juta dosis). Selain itu, vaksin impor IBD yang menduduki peringkat pertama sebesar 94,29% (sekitar 271 juta dosis) mengungguli ND dan IB, seringkali gagal digunakan di lapangan karena ketidakcocokan strain vaksin impor IBD dengan strain virus lapangan disebabkan oleh kurang protektifnya vaksin tersebut terhadap strain virus IBD yang ada di Indonesia (Rudd *et al.*, 2002).

Berdasarkan latar belakang inilah yang mendorong peneliti untuk melakukan penelitian yaitu membandingkan efektivitas vaksin inaktif IBD monovalen terhadap vaksin inaktif IBD polivalen (IBD-IB-ND) melalui

pengukuran nilai titer antibodi kedua vaksin tersebut menggunakan uji *indirect* ELISA.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalahnya adalah:

1. Apakah terdapat perbedaan titer antibodi antara ayam petelur yang divaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND)?
2. Apakah terdapat hubungan antara pemberian kedua jenis vaksin perlakuan dengan waktu pengamatan ?

1.3 Landasan Teori

Vaksin monovalen merupakan vaksin yang terdiri dari satu jenis antigen atau satu jenis mikroorganisme dan hanya protektif terhadap satu jenis antigen atau mikroorganisme, sedangkan vaksin polivalen merupakan vaksin yang terdiri dari dua atau lebih jenis antigen atau mikroorganisme dan protektif terhadap lebih dari satu antigen atau mikroorganisme (Hoosen, 2009).

Melihat kenyataan bahwa vaksinasi secara tunggal berulang-ulang dapat menimbulkan stres, maka peternak lebih cenderung melakukan vaksinasi dengan vaksin kombinasi (polivalen). Namun efektifitas vaksin kombinasi dalam pembentukan antibodi masih diragukan, mengingat adanya fenomena interferensi (Ernawati dkk., 1995). Fenomena interferensi merupakan fenomena yang terjadi pada penggunaan vaksin kombinasi sehingga terdapat daya saing antar vaksin

hingga sampai pada respon antibodi masing-masing penyakit (Cardoso *et al.*, 2006).

Menurut Rantam dan Asmara (2010), secara imunologis, apabila ternak unggas divaksin dengan dua antigen strain virus yang berbeda maka akan menghasilkan dua antibodi yang berbeda. Secara hipotesis, semakin banyak strain dalam suatu vaksin maka ayam akan mempunyai kemungkinan lebih lambat dalam memproduksi tingkat antibodi yang memadai.

Pada penelitiannya, Cardoso *et al.* (2006), menjelaskan bahwa pada penggunaan vaksin aktif gabungan antara IBD-IB-ND, mempunyai efisiensi yang berbeda dibandingkan dengan vaksin IBD monovalen inaktif. Sama halnya dengan penggunaan vaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin inaktif gabungan antara IBD-IB-ND, di mana titer antibodi yang dihasilkan oleh vaksin inaktif gabungan IBD-IB-ND tidak cukup signifikan mengungguli vaksin inaktif IBD monovalen (Tzvetkov *et al.*, 2000).

Pada penggunaan vaksin inaktif gabungan IBD-IB-ND terhadap vaksin inaktif IBD, menunjukkan perbedaan titer antibodi cukup signifikan antara kedua vaksin yang diperiksa menggunakan uji neutralisasi. Pada vaksin IBD monovalen inaktif dihasilkan titer 139 (4 minggu *post* vaksinasi), 110 (12 minggu *post* vaksinasi) dan 65 (24 minggu *post* vaksinasi). Pada vaksin polivalen IBD (IBD-IB-ND) dihasilkan titer 110 (4 minggu *post* vaksinasi), 80 (12 minggu *post* vaksinasi) dan 45 (24 minggu *post* vaksinasi) (Tzvetkov *et al.*, 2000).

Dalam diagnosis penyakit infeksi, ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antigen (virus, parasit, bakteri, jamur) atau terhadap

antibodinya. Teknik *Indirect* ELISA dipakai untuk menentukan antibodi. Penentuan antibodi dapat dilakukan dengan pelabelan pada imunoglobulinnya yaitu dengan menggunakan model *Indirect* ELISA. Secara semi kuantitatif atau kuantitatif, ELISA dibaca dengan spektrofotometer (*ELISA reader*) yang berdasarkan pada nilai OD atau absorban atau kerapatan optik (*Optical Density/OD*) (Suwarno dkk., 2003).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui :

1. Perbedaan titer antibodi antara ayam petelur yang divaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) sehingga dapat dipilih vaksin yang efektif dalam mencegah penyakit ayam, protektif terhadap ayam dan efisien.
2. Hubungan antara pemberian kedua jenis vaksin perlakuan dengan waktu pengamatan.

1.5 Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah :

1. Manfaat penelitian secara teoritis yaitu dapat memberikan suatu pengetahuan dan informasi baru di bidang virologi tentang perbedaan titer antibodi pada ayam petelur setelah divaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) menggunakan uji *indirect* ELISA.

2. Manfaat penelitian secara praktis yaitu dapat memberikan pengetahuan dan inovasi baru dalam penggunaan jenis vaksin kepada peternak dalam usaha pencegahan penyakit pada unggas dan terkait kebutuhan ekonomis peternak.

1.6 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah di atas, hipotesis penelitian ini adalah :

1. Terdapat perbedaan titer antibodi antara ayam petelur yang divaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-ND-IB).
2. Terdapat hubungan antara pemberian kedua jenis vaksin perlakuan dengan waktu pengamatan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ayam Petelur (*layer*)

Ayam petelur merupakan ayam betina yang dipelihara khusus untuk diambil telurnya. Asal mula ayam adalah dari ayam hutan yang ditangkap dan dipelihara serta dapat bertelur cukup banyak. Tahun demi tahun ayam hutan di berbagai wilayah dunia diseleksi secara ketat oleh para pakar. Arah seleksi ditujukan pada jumlah produksi yang banyak dan mulai spesifik pada telur atau daging. Ayam yang terseleksi untuk produksi telur dikenal dengan ayam petelur (*layer*). Selain itu, seleksi juga diarahkan pada warna kulit telur sehingga kemudian dikenal ayam petelur putih dan ayam petelur coklat. Dalam setiap kali persilangan, sifat jelek dibuang dan sifat baik dipertahankan (terus dmurnikan) (Anonimus, 2008).

Ayam yang pertama masuk dan mulai dternakkan pada tahun 1980-an adalah ayam ras petelur *White leghorn* yang kurus setelah habis masa produktifnya. Pada tahun 1990-an, mulai merebak peternakan ayam petelur dwiguna atau ayam petelur coklat. Saat itulah masyarakat mulai sadar bahwa ayam ras mempunyai klasifikasi sebagai petelur handal (Sudarmono, 2003).

Jenis ayam petelur dibagi menjadi dua tipe yaitu, ayam petelur ringan dan ayam petelur medium. Pada ayam petelur ringan, biasa disebut dengan ayam petelur putih. Ayam petelur ringan ini mempunyai tubuh yang ramping dan mata yang bersinar. Bulunya berwarna putih dan berjengger merah. Ayam tersebut berasal dari galur murni *White leghorn*. Ayam jenis ini mampu bertelur lebih dari

260 telur per tahun. Sebagai petelur, ayam tipe ini memang khusus untuk bertelur saja sehingga semua kemampuan dirinya diarahkan untuk bertelur. Ayam petelur jenis ringan ini sensitif terhadap cuaca yang panas dan keributan. Hal tersebut dapat mengakibatkan turunnya produksi telur (Sudarmono, 2003).

Tipe yang kedua adalah ayam petelur medium atau biasa disebut dengan ayam petelur coklat. Tubuh ayam ini tidak kurus, tetapi juga tidak gemuk. Telurnya cukup banyak dan mampu menghasilkan daging yang banyak pula. Telurnya yang berwarna coklat seperti warna bulu ayam lebih disukai karena mempunyai berat yang lebih dibandingkan dengan telur yang berwarna putih (Sudarmono, 2003).

Pada proses pemeliharaan, tindakan sanitasi, biosekuriti dan vaksinasi menjadi hal yang penting dalam sebuah peternakan ayam petelur. Kebersihan lingkungan kandang pada areal peternakan merupakan usaha pencegahan terhadap terjangkitnya penyakit pada ayam. Tindakan vaksinasi juga merupakan salah satu cara pengendalian penyakit terutama yang disebabkan oleh virus, dengan cara menciptakan kekebalan tubuh ayam petelur (Anonimus, 2008).

2.2 *Infectious Bursal Disease*

Penyakit *Infectious Bursal Disease* (IBD) atau *Avian Nephrosis*. Penyakit ini disebabkan oleh virus yang menciri terhadap keluarga Birnaviridae dan menyerang anak ayam usia muda umur 2-14 minggu (Akoso, 1998). Penyakit ini pertama kali dilaporkan oleh Crosgrave pada tahun 1962 di daerah Gumboro, Delaware, USA (Lukert and Saif, 2003).

Infectious Bursal Disease merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh *Birnavirus* dan mempunyai angka mortalitas hingga 100% (Murphy *et al.*, 1999). Efek immunosupresif inilah yang menyebabkan ayam yang menderita Gumboro rentan terhadap penyakit lainnya seperti *New Castle Disease*(ND), *Infectious Bronchitis* (IB) dan lain sebagainya.

IBD memiliki predileksi khusus, yaitu pada bursa fabrisius yang merupakan penghasil sel B pada ayam. Selain bursa fabrisius, virus ini juga dapat ditemukan pada timus dan limpa yang juga merupakan organ penting dalam proses kekebalan (Murphy *et al.*, 1999). Disamping itu, IBD juga akan menyebabkan respon yang suboptimal terhadap program vaksinasi, misalnya vaksinasi terhadap ND dan IB (Tabbu, 2000).

2.3 Etiologi

2.3.1 Morfologi

Virus IBD mempunyai genom yang terdiri dari 2 segmen *double stranded* (ds) RNA sehingga diberi nama *Birnavirus*. Virus tersebut tidak mempunyai *envelope*, berbentuk *icosahedral* (Tabbu, 2000), dan mempunyai diameter 60 nm (Murphy *et al.*, 1999). Kapsid virus yang berbentuk *icosahedral* tersusun oleh 780 sub unit protein VP2 dan 600 kopi protein VP3 (Leong *et al.*, 2000).

Menurut Fenner *et al* (1995), genom dari virus IBD terdiri dari segmen ds-RNA, yaitu segmen A mempunyai panjang 3,1 kbp dan segmen B 2,9 kbp. Virus IBD juga merupakan prototipe dari virus *Pancreatic Necrosis* pada ikan (Lukert and Saif, 2003).

2.3.2 Klasifikasi

Virus IBD merupakan anggota dari famili *Birnaviridae*. Famili tersebut terdiri dari 3 subfamili yaitu, *Aquabirnavirus* yang di dalamnya termasuk *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*, di mana virus ini biasanya menginfeksi ikan, golongan moluska (siput) dan golongan *crustace* (udang-udangan). Subfamili kedua adalah *Avibirnavirus* yang di dalamnya termasuk *Infectious Bursal Disease*, di mana virus ini menginfeksi unggas. Sub famili yang ketiga adalah *Entomobirnavirus* yang di dalamnya termasuk *Drosophila X Virus*, dimana virus ini menginfeksi golongan insekta. Sebelum dibentuknya famili *Birnaviridae* dan sebelum adanya informasi lebih lanjut mengenai morfologi, sifat fisik dan kimiawi, virus IBD sempat digolongkan dalam famili *Picornaviridae* atau *Reoviridae* (Lukert and Saif, 2003).

2.3.3 Sifat Virus

Virus IBD dapat tumbuh pada telur ayam bertunas dan kultur jaringan yang berasal dari embrio ayam, kalkun, itik dan *mammalian cell lines* (untaian sel mamalia). Virus IBD dapat dibiakkan pada Telur Ayam Berembrio (TAB) umur 9-11 hari. Disamping itu, virus ini juga dapat dibiakkan pada media *tissue culture* (kultur jaringan), yang terdiri atas limfosit B dan *Chicken Embyo Fibroblast* (CEF). Perubahan yang terjadi pada sel terinfeksi adalah terlihat adanya *Cyto Pathogenic Effect* (CPE) setelah 24 jam infeksi selama 3-4 hari (Cardoso *et al.*, 2006).

Virus IBD melakukan replikasinya pada bagian sitoplasma (*cytoplasmic replication*), stabil pada pH 3 – 9 (Murphy *et al*, 1999), namun dapat dinaktivasi pada pH 12 (Tabbu, 2000). Gumboro masih tetap aktif pada temperatur 56°C selama lebih dari 5 jam. Virus ini tetap hidup pada temperatur 60°C selama 30 menit, tetapi akan mati pada temperatur 70°C dalam waktu 30 menit. Virus Gumboro tahan terhadap pelarut organik tetapi peka terhadap formalin dan kelompok idiofor. Virus tersebut dapat dinaktivasi dengan larutan 0,5% kloramin selama 10 menit. Virus tersebut tahan terhadap larutan 0,5% fenol dan 0,125% trimersal pada temperatur 30°C selama satu jam. Pemberian berbagai konsentrasi larutan kompleks yodium, turunan fenolik dan campuran amonium kuarterner selama 2 menit pada temperatur 23°C, menunjukkan bahwa hanya kompleks yodium yang dapat membunuh virus IBD pada perlakuan tersebut (Lukert and Saif, 2003; Tabbu, 2000).

2.3.4 Serotipe

Beberapa peneliti melaporkan adanya variasi antigenik isolat virus IBD dan dikenal 2 serotipe yaitu, serotipe 1 dan 2. Kesamaan antigenik antara beberapa galur serotipe 1 dan prototipe serotipe 1 hanya sebesar 30%. Sedangkan kesamaan antigenik antara 2 galur serotipe 2 hanya sebesar 33% (Lukert and Saif, 2003; Tabbu, 2000). Hal ini menunjukkan bahwa serotipe 2 virus IBD juga mempunyai variasi antigenik yang mirip dengan serotipe 1 (Tabbu, 2000).

Kedua serotipe tersebut tidak menunjukkan adanya reaksi silang (*Cross-antigenicity*) maupun kekebalan silang (*Cross-protection*) karena ayam yang

diinfeksi dengan serotipe 1 tidak menghasilkan antibodi terhadap serotipe 2. Demikian sebaliknya, ayam-ayam yang diinfeksi serotipe 2 tidak menampilkan gejala klinis, perubahan patologi anatomi, perubahan histopatologi, atau kematian, tetapi setelah diinfeksi dengan serotipe 1, semua perubahan terlihat nyata (Jackwood *et al.*, 1985). Hal ini menunjukkan bahwa serotipe 2 virus IBD juga mempunyai variasi antigenik yang mirip dengan serotipe 1 (Lindahl, 2004).

Vaksinasi terhadap virus IBD serotipe 2 tidak memberikan perlindungan terhadap infeksi serotipe 1. Uji silang terhadap serotipe 2 menggunakan vaksin IBD serotipe 1 tidak dapat dilakukan oleh karena tidak ada isolat virus serotipe 2 yang bersifat virulent pada ayam. Virus IBD serotipe 1 diisolasi dari ayam yang mempunyai virulensi bervariasi dari yang rendah sampai patogenik dan dapat menyebabkan mortalitas 50% jika menginfeksi ayam yang peka. Virus IBD serotipe 2 dapat diisolasi dari ayam dan kalkun tapi sejauh ini tidak menimbulkan penyakit pada kedua jenis unggas tersebut (Tabbu, 2000).

Lukert dan Saif, (2003) menambahkan bahwasanya terdapat satu lagi serotipe dari virus IBD yaitu serotipe klasik yang merupakan serotipe asli dari tempat kejadian penyakit (serotipe lapangan).

2.4 Diagnosis

Diagnosis sangkaan dapat didasarkan atas riwayat kasus, gejala klinik dan perubahan patologik. *Infectious Bursal Disease* bentuk akut lebih mudah dikenal sehubungan dengan adanya proses penyakit yang cepat, morbiditas yang tinggi, kurva mortalitas yang tajam dan proses kesembuhan yang cepat sekitar 5-7 hari.

Perubahan mikroskopik yang spesifik pada *Bursa Fabrisius* yang diperkuat oleh pemeriksaan mikroskopik, dapat dijadikan dasar diagnosis penyakit ini. Infeksi virus IBD pada ayam muda atau anak ayam yang mempunyai antibodi asal induk biasanya bersifat subklinis dan dapat didiagnosis berdasarkan pemeriksaan makroskopik ataupun mikroskopik pada *Bursa Fabrisius* yang mengalami atrofi. Infeksi pada ayam dengan virus IBD galur varian hanya dapat dideteksi dengan pemeriksaan histopatologik pada *Bursa Fabrisius*, isolasi dan identifikasi virus dengan uji serologik (Tabbu, 2000).

2.5 Pencegahan dan Pengobatan

Ayam yang terserang IBD tidak dapat diobati dengan antibiotik atau antibakteri tertentu. Pengobatan suportif pada ayam yang terserang IBD sangat diperlukan, misalnya dengan pemberian multivitamin dan elektrolit oleh karena ayam yang terserang penyakit tersebut akan mengalami penurunan atau kehilangan nafsu makan dan minum, diare dan dehidrasi (Tabbu, 2000). Kandang dan peralatan dibebashamakan dengan formalin 0,5%, khloramine 0,5% atau kompleks yodium (Akoso, 1998).

Vaksinasi IBD dapat dilakukan dengan pemberian beberapa kali vaksin aktif atau gabungan beberapa kali vaksin aktif atau vaksin inaktif. Vaksin inaktif tidak praktis jika digunakan untuk merangsang respon yang bersifat primer pada ayam muda. Jenis vaksin tersebut paling efektif jika diberikan pada ayam yang telah digertak dengan vaksinasi IBD atau telah kontak dengan virus lapangan (Lukert and Saif, 2003).

2.6 *Infectious Bronchitis*

Penyakit *Infectious Bronchitis* atau bronkhitis menular pada unggas adalah suatu penyakit yang menyerang alat pernapasan dan penyebabnya adalah virus Corona. Ayam yang terserang penyakit ini secara menciri ditandai oleh kesulitan bernafas dan "megap-megap" yang diikuti dengan penurunan produksi telur secara tajam. Penyakit IB menyerang ayam muda dari semua jenis tetapi tidak menyerang kalkun atau unggas air. Untuk pertama kali kejadian penyakit ini dilaporkan oleh Shalk dan Hawn di Dakota Utara, USA, pada tahun 1931 (Akoso, 1998). Virus IB dapat bermutasi secara cepat dan menjadi strain yang berbeda secara antigenik, begitu pula patogenitasnya atau muncul kelainan pada jaringan (Dharmayanti dkk, 2005).

2.7 Etiologi

2.7.1 Morfologi

Infectious Bronchitis disebabkan oleh virus yang tergolong *single stranded* (ss) RNA, famili *Coronaviridae* dan genus *Coronavirus*. Virus IB umumnya berbentuk bulat, walaupun dapat berbentuk pleomorfik. Virus ini mempunyai *envelope* dan berdiameter 90-200 nm (Tabbu, 2000).

Virus IB mengandung tiga protein virus utama yang spesifik yaitu *spike glycoprotein* (S), glikoprotein membran (M), dan protein *nucleocapsid internal* (N). Protein yang keempat adalah *small membrane protein* (sM) yang dihubungkan dengan amplop virion. Protein S terdiri atas dua atau tiga kopi yang

masing-masing mempunyai dua glikopolipeptida S1 dan S2, berturut-turut sekitar 520-620 asam amino (Dharmayanti dkk, 2005).

2.7.2 Klasifikasi

Virus IB merupakan anggota dari genus *Coronavirus* famili *Coronaviridae* dan ordo *Nidovirales*. Virus IB dan golongan *Cronavirus* lainnya yang menyerang unggas baik burung unta maupun kalkun, dogolongkan menjadi 3 kelompok *Coronavirus* (OIE, 2009).

2.7.3 Sifat Virus

Pada umumnya virus IB akan inaktif pada temperatur 56°C selama 15 menit dan temperatur 45°C selama 90 menit. Virus IB akan mati dengan cepat di luar tubuh ayam dan sensitif terhadap berbagai jenis desinfektan. Virus IB juga dapat tumbuh dengan baik pada telur ayam bertunas umur 10-11 hari. Kultur jaringan yang berasal dari ginjal embrio ayam dan ginjal ayam dapat juga dipakai untuk isolasi virus ini (Lindaht, 2004).

2.7.4 Serotipe

Sejumlah serotipe IB yang telah dilaporkan di berbagai negara di dunia adalah *Massachusetts (MS)* yang paling banyak ditemukan di lapangan, *Connecticut, Georgia, Delaware, Iowa, Newhampshire, Florida, JMK, T, Gray, Holte, Australia-T, Holland, Italian*. Di Indonesia juga banyak terdapat beberapa serotipe yang berbeda dengan serotipe *Mass* (Tabbu, 2000).

2.8 Diagnosis

Diagnosis sangkaan dapat didasarkan atas gejala klinik dan perubahan patologik, walaupun diagnosis akhir perlu dilakukan dengan cara isolasi dan identifikasi virus serta karakterisasi serologis isolat virus yang ditemukan. Metode diagnosis yang sering digunakan di lapangan adalah inokulasi ke dalam Telur Ayam Bertunas (TAB) atau kultur organ trakhea. Material yang digunakan untuk isolasi virus IB bentuk nefropatik terutama trakhea, paru, kantong udara, dan ginjal. Jika material yang diinokulasi mengandung virus IB, maka embrio akan terlihat kerdil dan melipat (Tabbu, 2000).

Pemeriksaan pada kerokan atau potongan trakhea dengan uji *immunofluorescence* juga banyak digunakan di lapangan sebagai cara diagnosis yang cepat. Namun jika hasilnya negatif, perlu dikonfirmasi lagi dengan metode diagnosis lainnya yang dinyatakan negatif terhadap virus IB (Tabbu, 2000). Uji serologik yang sering dilakukan di lapangan adalah metode netralisasi virus (VN), hemaglutinasi inhibisi (HI), agar gel presipitasi (AGP), dan ELISA (Saif, 2003).

2.9 Pencegahan dan Pengobatan

Pengamanan biologis yang ketat dan pelaksanaan aspek manajemen lainnya secara optimal diperlukan untuk menghilangkan faktor pendukung atau sumber infeksi virus IB. Praktek pemeliharaan ayam dari berbagai umur pada satu lokasi perlu diatur sedemikian rupa agar kandang DOC atau *grower* terpisah dari kandang ayam produksi. Di samping praktek manajemen yang ketat, IB juga dapat

dicegah dengan melakukan vaksinasi secara teratur menggunakan gabungan vaksin aktif dan inaktif (Tabbu, 2000).

Vaksin inaktif pada saat 3-4 minggu sebelum periode bertelur. Galur vaksin biasanya dipilih dari isolat virus yang dapat mewakili spektrum antigenik dari virus IB yang dapat diisolasi dari suatu daerah atau negara (Tabbu, 2000).

2.10 Newcastle Disease

Penyakit Newcastle Disease (ND) pertama kali dilaporkan pada tahun 1926 di Jawa, Indonesia dan di Newcastle, Inggris. Beberapa peneliti melaporkan bahwa ND mungkin telah ditemukan sebelumnya di Eropa, bahkan diduga penyakit ini telah meletup di Korea pada tahun 1924 (Tabbu, 2000). Di Indonesia, ND dapat ditemukan pada peternakan ayam pedaging dan petelur maupun ayam bukan ras ("*buras*") di berbagai daerah, terutama daerah yang padat peternakan ayam (Tabbu, 2000).

2.11 Etiologi

2.11.1 Morfologi

Penyakit ND disebabkan oleh virus yang tergolong genus *Avian Paramyxovirus* dan famili *Paramyxoviridae*, merupakan virus RNA yang mempunyai genom *single stranded* (ss) dengan polaritas negatif. *Paramyxovirus* berbentuk sangat pleomorfik, biasanya berbentuk bulat dengan diameter 100-500 nm, tetapi ada juga yang berbentuk filamen (Tabbu, 2000).

Virus ND memiliki enam jenis protein yaitu nucleoprotein (NP), fosfoprotein (protein P), polimerase (protein L), protein matriks (M), protein pada amplop yang terdiri dari dua protein penting yaitu protein hemagglutinin-neuramidase (HN), serta protein fusi (F) (Quinn *et al.*, 2004). Nukleoprotein berlekatan dengan genom dan membentuk nukleokapsid. Protein P dan protein L juga berikatan dengan kompleks genom dan berperan penting dalam replikasi virus. Kompleks genom tersebut dibungkus oleh protein matriks (M). Protein HN bertanggungjawab dalam perlekatan partikel virus pada reseptor sel hospes. Protein F berperan dalam memperantarai penggabungan amplop virus dengan membran sel dan juga membantu perlekatan virus (Fenner *et al.*, 1993).

2.11.2 Klasifikasi

Paramyxoviridae terdiri atas 3 genera, yaitu *Paramyxovirus*, *Morbilivirus* dan *Pneumovirus*. Genus *Morbilivirus* terdiri atas virus *Measles*, *Rinderpest* dan *Canine distemper*. Genus *Pneumovirus* terdiri atas *Mammalian respiratory syncytial viruses*, *Mouse pneumonia virus* dan *Avian pneumovirus* yang dihubungkan dengan *Swollen Head Syndrome* (SHS) pada ayam dan *Turkey rhinotracheitis* pada kalkun. Genus *Paramyxovirus* terdiri dari virus *Mammalian parainflueza*, virus *Mumps* dan *Avian paramyxovirus*. Virus ND merupakan prototipe dari genus ini (Tabbu, 2000).

2.11.3 Sifat Virus

Virus ND relatif lebih tahan terhadap panas (Fenner *et.al.*, 1993). Virus ND dapat dinaktifkan dengan pemanasan 56°C selama 3 jam atau 60°C selama 30 menit (OIE, 2004). Virus ini tetap efektif pada sumsum tulang dan otot ayam yang disembelih paling tidak selama enam bulan pada temperatur -20°C dan sampai empat bulan pada temperatur almari pendingin (Fenner *et al.*,1993). Selain itu, infektivitas virus juga dapat dirusak dengan radiasi ultraviolet dan bahan kimia seperti formalin, beta propiolaktion, fenol, lisol, dan kresol (Tabbu, 2000).

2.11.4 Serotipe

Ada sembilan serotipe Avian Paramyxovirus, yaitu *Paramyxovirus* tipe 1 (PMV-1) sampai PMV-9. Virus ND termasuk dalam *Paramyxovirus* tipe 1 (PMV-1). Berdasarkan virulensi atau patogenesisnya, virus ND dikelompokkan ke dalam lima tipe (OIE, 2004), yaitu: tipe Viscerotropik Velogenik, merupakan bentuk ND yang sangat patogenik yang menyebabkan lesi hemoragi pada intestinal dengan tingkat mortalitas yang tinggi; tipe Neurotropik Velogenik, menimbulkan gejala pernafasan dan gejala syaraf dengan tingkat mortalitas yang tinggi; tipe Mesogenik, menimbulkan gejala pernafasan, kadang-kadang terdapat gejala syaraf dengan tingkat mortalitas yang rendah; tipe Lentogenik, menimbulkan gejala pernafasan yang ringan atau subklinis dan tipe Asimptomatik Enterik, menimbulkan gejala pencernaan subklinis.

2.12 Diagnosis

Antibodi terhadap virus ND dapat diukur didalam serum menggunakan berbagai metode meliputi uji Hemaglutinasi (HA), Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI), ELISA, *Agar Gel Presipitation* (AGP), dan Uji Antibodi Monoklonal. Antigen virus dalam jaringan dapat di lacak dengan teknik imunohistokimi, imunofluorescence, *Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Tabbu, 2000).

Diagnosa definitif terhadap ND dapat dilakukan dengan cara isolasi dan identifikasi virus menggunakan berbagai jenis kultur jaringan. Metode isolasi virus ND yang paling praktis dan sering digunakan adalah pembiakan dalam telur ayam bertunas umur 9-10 hari. Bahan yang dipakai untuk isolasi virus adalah swab trakhea, paru-paru, feses, isi usus atau swab kloaka (Tabbu, 2000).

2.13 Pencegahan dan Pengobatan

Pemberian antibiotik hanya bertujuan untuk mengobati infeksi sekunder yang disebabkan oleh bakteri. Disamping antibiotik, perlu juga dilakukan pengobatan suportif untuk mempercepat kesembuhan jaringan yang rusak dengan cara pemberian multivitamin (Tabbu, 2000).

Cara efektif untuk mencegah timbulnya ND adalah melalui vaksinasi. Vaksin ND yang beredar dilapangan ada 2 jenis, yaitu vaksin aktif (*live vaccine*) dan vaksin inaktif (*killed vaccine*) (Saif, 2003).

2.14 Vaksin

Vaksin adalah suatu produk biologis, berisi sejumlah besar jasad renik yang diketahui sebagai penyebab suatu penyakit. Daya kerja vaksin adalah spesifik. Oleh sebab itu, terhadap setiap macam penyakit harus dipergunakan vaksin yang berbeda. Vaksin berisikan jasad renik hidup atau yang sudah mati (Akoso, 1998).

Ada dua jenis vaksin yang umum dikenal yaitu vaksin aktif dan vaksin inaktif. Vaksin aktif yaitu vaksin yang mengandung virus hidup atau virus yang telah dilemahkan. Vaksin inaktif (virus mati) adalah agen penyakit (virus) yang terdapat pada vaksin dalam keadaan mati. Biasanya didalamnya dicampurkan atau ditambahkan oil adjuvant. Untuk pencegahan penyakit, vaksin dapat dibuat dari jasad renik yang lain misalnya bakteri, parasit atau bahan toksin (Akoso, 1998). Vaksin inaktif dihasilkan melalui pengrusakan virulensinya, tapi imunogenitasnya masih ada. Vaksin ini aman karena tidak infeksius, tapi diperlukan dalam jumlah yang banyak untuk dapat merangsang respon imun. Sehingga *booster* sangat diperlukan, supaya imunitasnya cukup (Rantam, 2005). Keuntungan penggunaan vaksin inaktif adalah penyimpanannya yang lebih mudah dibandingkan dengan vaksin aktif; vaksin inaktif tidak dipengaruhi oleh antibodi asal induk (antibodi maternal); reaksi pasca vaksinasi sangat ringan.

Keberhasilan vaksinasi tergantung pada kualitas vaksin, cara penyimpanan vaksin, pengencer yang digunakan, jenis vaksin, saat vaksinasi, jarak waktu antara vaksinasi, tingkat titer antibodi maternal ayam yang divaksinasi, dan penyakit immunosupresif (Partadiredja dan Soejoedono, 1988 dikutip dari Martantri, 2009). Kegagalan vaksinasi dapat disebabkan oleh faktor keturunan, lingkungan,

infestasi parasit yang berat, malnutrisi, keadaan cekaman dan kekebalan pasif yang diperoleh dari induk (Tizard, 2000).

Program vaksinasi untuk penanggulangan penyakit IBD sangat diperlukan untuk mengurangi gejala klinis dan mortalitas dan terpenting mencegah adanya efek immunosupresi pada anak ayam. Namun tentu saja tidak cukup penanggulangan penyakit IBD hanya dengan melakukan tindakan vaksinasi saja. Agar vaksinasi dapat berhasil perlu beberapa upaya pendukung lainnya, seperti biosekuriti ketat dan tatalaksana peternakan yang optimal (Machdum, 2009).

Prinsip utama vaksinasi terhadap penyakit adalah vaksin harus diberikan terlebih dahulu sebelum terjadinya infeksi lapangan, vaksin tersebut harus dapat menstimulasi pembentukan antibodi secara cepat dan tinggi, kemudian melakukan tindakan biosekuriti yang ketat untuk mencegah jumlah virus lapang lebih besar dari jumlah antibodi yang terbentuk dalam tubuh ayam. Bila Jumlah virus lapang tidak dapat diperkecil oleh tindak biosekuriti yang dilakukan, setinggi apapun titer antibodi yang dihasilkan oleh vaksin akan tidak mampu untuk mencegah terjadinya penyakit (Machdum, 2009).

Vaksin IBD inaktif dan vaksin aktif yang dibuat dari galur varian dapat melindungi ayam terhadap penyakit yang ditimbulkan oleh galur varian atau standar, sedangkan vaksin IBD inaktif yang dibuat dari galur standar yang tidak dapat memberikan perlindungan terhadap uji tantang dengan galur varian (Tabbu, 2000).

Pemilihan vaksin yang cocok dengan virus di lapangan sangat penting. Pada saat ini ada banyak macam jenis vaksin yang dijual di pasaran. Dari yang

bersifat mild sampai yang intermediate plus. Vaksin yang tergolong mild virusnya bisa menembus titer antibodi induk pada angka 125 (menggunakan ELISA). Intermediate pada titer 250, sedangkan yang intermediate plus bisa menembus titer di angka 500-800. Vaksin yang mahal tidak selalu menjamin bebas dari kebocoran vaksinasi. Kecocokan strain virus dengan lingkungan setempat harus diutamakan. Jika suatu jenis vaksin sudah cocok di farm kita lebih baik jangan diubah. Virus vaksin yang terlalu keras sebaiknya hindari diberikan terlalu dini, karena bisa merusak sel-sel limfoid di bursa (Paniago and Turblin 2010).

Vaksin monovalen merupakan vaksin yang terdiri dari satu jenis antigen atau satu jenis mikroorganisme dan hanya protektif terhadap satu jenis antigen atau mikroorganisme. Sedangkan vaksin polivalen merupakan vaksin yang terdiri dari dua atau lebih jenis antigen atau mikroorganisme dan protektif terhadap lebih dari satu antigen atau mikroorganisme (Hoosen, 2009).

Penggunaan vaksin polivalen yang telah ada di Indonesia adalah gabungan antara vaksin AI dan ND. Saat ini Balai Penelitian Veteriner telah berhasil membuat vaksin inaktif kombinasi penyakit *Newcastle Disease* dan *Avian Influenza* (ND-AI), untuk mendukung upaya pengendalian penyakit AI. Keuntungan penggunaan vaksin ini adalah dapat mencegah infeksi dua penyakit penting dan berbahaya pada unggas, yaitu penyakit ND dan AI. Vaksin ini dikembangkan dari virus isolat lokal *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI). Formulasi vaksin inaktif kombinasi ND-AI yang telah berhasil dibuat adalah sebanyak 90.000 dosis dalam bentuk vaksin siap pakai dan sekitar 100.000 dosis belum diformulasikan. Uji potensi vaksin tersebut telah dilakukan pada ayam

petelur di laboratorium Balitvet, sedangkan pengamatan pengaruh pasca vaksinasi terhadap produksi telur belum selesai dilakukan (Balitvet, 2006).

Hasil sementara uji vaksin inaktif kombinasi ND-AI dalam skala laboratorium adalah sebagai berikut : vaksin inaktif kombinasi ND-AI bila diberikan 2 kali dapat memberikan perlindungan yang cukup baik pada ayam petelur, namun pemberian 3 kali dapat memberikan perlindungan yang lebih tinggi namun cenderung menurunkan produksi telur (Balitvet, 2006).

2.15 Antibodi

Antibodi merupakan senyawa protein yang disekresi oleh sel B dan mampu mengikat target yang disebut antigen. Antibodi diproduksi di dalam tubuh vertebrata dan berfungsi sebagai zat yang melakukan perlawanan terhadap infeksi ataupun peradangan (Alberts, 1998). Berat molekul antibodi berkisar 150.000 Da sampai 950.000 Da yang tergantung kelasnya. Semua molekul antibodi terdiri dari untaian pendek yang sama dikenal dengan *light chain*, sedang yang terdiri dari untaian peptida yang panjang disebut dengan *heavy chain*. Keduanya terjadi ikatan kovalen bersama yang disebut dengan *ikatan disulfida* (Rantam, 2003).

Sisi pengikat antigen atau sisi antibodi aktif yaitu molekul immunoglobulin adalah daerah yang bergabung dengan antigen spesifik. Pada daerah ini, spesifitas antibodi ditentukan oleh rangkaian asam amino yang memungkinkan berkombinasi dengan antigen yang sesuai (Bellanti, 1993).

2.16 ELISA (*Enzyme – Linked Immunoabsorbent Assay*)

Enzyme – Linked Immuniabsorbent Assay merupakan salah satu uji serologis yang saat ini banyak dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Dalam diagnosis penyakit infeksi, ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antigen (virus, parasit, bakteri, jamur) atau terhadap antibodinya. Pada penyakit non-infeksi, ELISA dapat digunakan untuk evaluasi program vaksinasi, monitor hormon, obat-obatan, antibiotika, toksin, pestisida, komponen serum, protein onkofetal, sitokin atau penyakit autoimun (Suwarno dkk, 2003).

Sejak diperkenalkan pada tahun 1971, ELISA telah mengalami perkembangan sesuai dengan tujuannya. Pada dasarnya ELISA dapat dibagi menjadi 3 jenis menurut komponen yang dilabel enzim, yaitu: pelabelan pada antibodi (ab), pelabelan pada antigen (ag) dan pelabelan pada anti immunoglobulin (Suwarno dkk, 2003).

Dua macam antibodi yang digunakan pada ELISA, antibodi pertama (*primary antibody*) mengikat pada antigen dan antibodi kedua (*secondary antibody*) atau antibodi anti-globulin mengikat pada antibodi pertama. Anti-globulin ini dilabel dengan enzim untuk mempermudah memonitor dengan adanya perubahan warna. Dengan adanya reaksi dari enzim secara kuantitatif antibodi pertama dapat dianalisis. Enzim yang biasa digunakan dalam ELISA adalah *horseradish peroxidase (HRP)*, *alkaline phosphatase (AP)*, *urease beta galaktose* dan *glukosa oksidase*. Pemilihan enzim berdasarkan atas; homogen, murah, spesifik dan stabil (Rantam, 2003).

Enzim yang dipakai untuk melabel antigen atau antibodi harus memenuhi beberapa persyaratan, diantaranya tidak boleh mengurangi sifat imunologik antigen atau antibodi, harus dapat diperoleh dalam keadaan murni serta stabil untuk dapat disimpan selama jangka waktu tertentu (Kresno, 1996). ELISA digunakan untuk mendeteksi antibodi daripada tes asai yang lain, karena ELISA lebih ekonomis dan kerja cepat untuk melakukan tes terhadap sampel. ELISA dapat mendeteksi antibodi dari serotipe 1 dan 2. Peran antibodi dalam ELISA sangat penting untuk mengukur tingkat kekebalan dalam tubuh sampai titernya cukup, yang dapat digunakan untuk membandingkan antibodi netralisasi dan penangkap antigen sehingga virus dapat dideteksi (Jackwood *et al.*, 1996).

Interpretasi ELISA dapat dilakukan secara kualitatif (visual) ataupun secara kuantitatif (dengan spektrofotometer). Secara kualitatif, ELISA dibaca dengan melihat perubahan warna antara kelompok yang diperiksa dengan kelompok kontrol (positif dan negatif). Secara semi kuantitatif atau kuantitatif, ELISA dibaca dengan spektrofotometer (ELISA *reader*) yang berdasarkan pada nilai titer atau absorban atau kerapatan optik (*Optical Density/OD*) (Suwarno dkk, 2003).

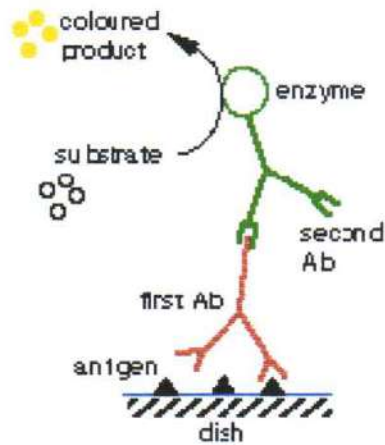
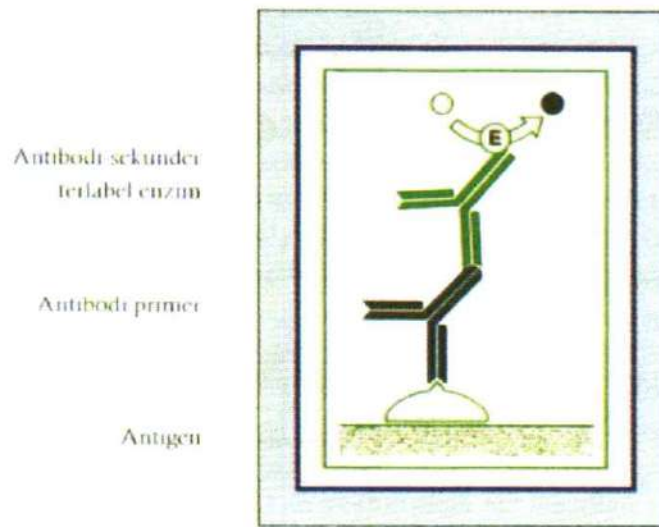


Figure 2 ELISA

Gambar 2.1 Prinsip Kerja ELISA. Sumber: Anonimus (2009).

2.17 Teknik *Indirect* ELISA

Teknik *Indirect* ELISA dipakai untuk menentukan antibodi. Serum dengan antibodi yang akan ditentukan, direaksikan dengan antigen yang telah diikat pada fase padat (polistiren dari *microplate*), selanjutnya dilakukan penambahan konjugat (Anti-immunoglobulin yang berlabel) dan akhirnya penambahan substrat. Aktivitas dari enzim yang terikat berbanding lurus dengan kadar antibodi dalam sampel. Aplikasi dari teknik ini sebagai penentu antibodi dari *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Candida*, *Gumboro*, *Toxoplasma* dan *Schistosoma*. Penentuan antibodi dapat dilakukan dengan pelabelan pada Ig-nya yaitu dengan menggunakan kode *Indirect* ELISA (Suwarno dkk, 2003).

ELISA melalui pelapisan antigen

Gambar 2.2 Prinsip Kerja *Indirect* ELISA. Sumber: Rantam (2003).

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi dan *Teaching Farm* milik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, pada Oktober 2009 sampai Desember 2009. Pelaksanaan uji ELISA dilakukan di Laboratorium Virologi dan Imunologi serta Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Hewan Percobaan

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor ayam petelur jantan dari PT. Multibreeder Adirama Indonesia jenis MB-502 yang berumur satu hari dibagi menjadi tiga kelompok, 6 ekor ayam untuk perlakuan pertama (vaksin IBD monovalen inaktif), 6 ekor ayam untuk perlakuan kedua (vaksin IBD polivalen inaktif), 6 ekor untuk kelompok kontrol vaksin IBD monovalen inaktif dan 6 ekor ayam untuk kelompok kontrol vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND).

3.2.2 Pakan

Pakan yang diberikan adalah pakan komersial fase starter dengan kode 511 Produksi P.T. Charoen Pokhpand, diberikan sebanyak dua kali sehari setiap pagi dan sore. Air minum diberikan secara *adlibitum*.

3.2.3 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan di dalam penelitian ini adalah vaksin IBD monovalen inaktif (LV3UA) dan vaksin IBD polivalen inaktif (LV8UA) buatan Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, sampel serum darah ayam, NaCl fisiologis, Alkohol 70%, antigen virus IBD, *coating buffer*, *washing buffer* (PBS Tween 20) yang terdiri dari *phosphate buffer* pH 7,4, 140 Mm NaCl dan 0,1 *sodium acide*, *milk blocking* 4%, *blocking buffer*, konjugat (*Anti-Chicken Ig G* yang dilabel dengan enzim *alkaline phosphatase*), substrat p-NPP, NaOH 3N (*stopper*).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari spuit *disposable* 3 ml, tabung reaksi, ELISA *microplate*, *yellow tip*, *mikropipet*, tabung *eppendorf*, *centrifuge*, *freezer*, kandang jenis litter dan kapas, *ice box*, *ice pack*, ELISA *reader*, *vortex*, cawan petri, *stire*, gelas ukur, *becker glass*.

3.3 Metode Penelitian

Prosedur perlakuan terhadap hewan coba adalah sebagai berikut :

Sebanyak 24 ekor anak ayam dibagi menjadi 4 kelompok,

Kelompok P1 : 6 ekor ayam divaksin IBD monovalen inaktif (LV3UA) pada umur 2 minggu

Kelompok P2 : 6 ekor ayam divaksin IBD-IB-ND polivalen inaktif (LV8UA) pada umur 2 minggu.

Kelompok K1: : 6 ekor ayam sebagai kontrol vaksin IBD monovalen inaktif diberikan NaCl fisiologis.

Kelompok K2 : 6 ekor ayam sebagai kontrol vaksin IBD polivalen inaktif diberikan NaCl fisiologis.

Kelompok P1 dan P2 : di *booster* pada umur 4 minggu .

Pemberian vaksinasi dengan cara intramuskular pada otot dada, dosis diberikan 0,3 ml/ekor dengan kandungan virus $10^{3,0}$ TCID₅₀/0,3ml (*Tissue Culture Infective Dose*) untuk kelompok P1. Kelompok P2 yang merupakan vaksin kombinasi diberikan 0,5 ml/ekor dengan kandungan virus IBD $10^{3,0}$ TCID₅₀/0,5ml, IB $10^{3,5}$ EID₅₀/0,5ml (*Egg Infective Dose*), ND $10^{5,0}$ EID₅₀/0,5ml.

Pengambilan darah untuk uji ELISA dilakukan sebanyak empat kali pada semua kelompok yaitu pengamatan titer antibodi umur 2 minggu, 4 minggu, 6 minggu dan 8 minggu. Pengukuran titer antibodi menggunakan uji *indirect* ELISA.

3.3.1 Cara Pengambilan Serum

Darah diambil melalui jantung ketika anak ayam umur 2 minggu, lalu pada anak ayam umur 4 minggu, 6 minggu dan 8 minggu pengambilan darah melalui sayap (vena brachialis) menggunakan spuit 3 ml *disposable* dan dibiarkan pada suhu kamar hingga beku setelah serum keluar, dipisahkan, kemudian disimpan pada suhu 4°C atau -20°C. Sebelum serum digunakan dalam uji *Indirect* ELISA, terlebih dahulu dilakukan inaktivasi dengan pemanasan pada suhu 56°C selama 30 menit, untuk menghilangkan zat yang tidak spesifik.

3.3.2 Prosedur Pemeriksaan Antibodi Hasil Vaksinasi IBD dengan Teknik *Indirect ELISA*

Coating Ag virus IBD konsentrasi 10^3 TCID 50/well dengan melapiskan 100 μ l/sumuran *microplate* yang sudah diencerkan dengan pengenceran 1/100 suhu 4°C semalam. Selanjutnya *microplate* dicuci dengan *washing buufer* (PBS Tween 20) 200 μ l/sumuran sebanyak 3 x 1 menit. *Microplate* kemudian di blok dengan *milk blocking* 4% sebanyak 100 μ l/sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci dengan *washing buffer* (PBS Tween 20) 200 μ l/sumuran sebanyak 3 x 1 menit. Antibodi hasil vaksinasi virus IBD diencerkan 1/100 dengan *blocking buffer*, selanjutnya dimasukkan sebanyak 100 μ l/sumuran dan diinkubasi suhu 37°C selama 1 jam, setelah itu dicuci dengan *washing buffer* (PBS Tween 20) 200 μ l/sumuran sebanyak 3 x 1 menit, kemudian diikuti dengan penambahan konjugat (*Anti-Chicken* Ig G yang dilabel dengan enzim *alkaline phosphatase*) yang diencerkan dengan *blocking buffer* dengan pengenceran 1:2500 sebanyak 100 μ l/sumuran dan diinkubasi suhu 37°C selama 1 jam. Berikutnya *microplate* dicuci kembali dengan *washing buffer* (PBS Tween 20) 200 μ l/sumuran sebanyak 3 x 1 menit, kemudian ditambahkan substrat p-NPP sebanyak 100 μ l/sumuran dan disimpan dalam ruangan gelap selama 1 jam. Tahapan selanjutnya, larutan *stopper* NaOH 3N ditambahkan sebanyak 50 μ l/sumuran untuk menghentikan reaksi. Absorban kemudian dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu, vaksin IBD monovalen inaktif dan vaksin IBD polivalen inaktif.

3.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu, nilai titer antibodi.

3.4.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini meliputi spesies hewan, jenis kelamin, umur dan kandang.

3.4.4 Definisi Operasional Variabel

- a Vaksin IBD monovalen inaktif: vaksin yang didalamnya terdapat satu jenis strain virus IBD dalam keadaan inaktif.
- b Vaksin IBD polivalen inaktif: vaksin yang didalamnya tidak hanya terdapat satu strain virus IBD, tetapi juga terdapat strain virus IB dan ND dalam keadaan inaktif.
- c Titer antibodi: nilai kerapatan antibodi yang diinduksi dari serum ayam dan dapat dideteksi dengan uji *indirect* ELISA serta hasilnya dibaca secara kuantitatif.

- d Spesies hewan: menunjukkan jenis hewan saat pertama kali digunakan sebagai hewan coba untuk pemberian vaksin IBD monovalen inaktif dan polivalen inaktif, yaitu jenis *leghorn* strain *isabrown*.
- e Jenis kelamin: menunjukkan jenis kelamin hewan yang digunakan sebagai hewan coba untuk pemberian vaksin IBD monovalen inaktif dan IBD polivalen inaktif, yaitu ayam dengan jenis kelamin jantan. Digunakan jenis kelamin jantan karena tingkat pertumbuhan ayam petelur jantan lebih cepat dibandingkan dengan ayam petelur betina. Tingkat pertumbuhan yang lebih cepat pada ayam petelur jantan turut mempengaruhi meningkatnya sistem antibodi pada ayam.
- f Umur ayam: menunjukkan umur ayam yang digunakan sebagai hewan coba untuk pemberian vaksin IBD monovalen inaktif dan IBD polivalen inaktif, yaitu ketika ayam umur 1 hari (DOC).
- g Kandang: menunjukkan tempat pemeliharaan yang digunakan hewan coba selama pemberian vaksin IBD monovalen inaktif dan IBD polivalen inaktif, yaitu dengan ukuran kandang $\pm 3\text{m} \times 3\text{m}$ dengan alas kandang berupa sekam dan sistem pemanas berupa lampu.

3.5 Penghitungan Titer Antibodi

Nilai OD yang didapatkan dari hasil uji *indirect* ELISA untuk masing-masing perlakuan dan kontrol kedua perlakuan dihitung dengan terlebih dahulu menetapkan satu nilai OD yang ideal pada kontrol negatif dan kontrol positif di

masing-masing minggu yang akan dijadikan patokan awal penghitungan.

Penghitungan rumus didasarkan atas nilai S/P.

$$S/P = \frac{S - K(-)}{K(+) - K(-)}$$

Keterangan :

K(-) = Kontrol negatif S = Sampel

K(+) = Kontrol positif

Setelah diketahui hasil masing-masing komponen penghitungan di atas, kemudian dapat diketahui titer masing-masing perlakuan dan kontrol kedua perlakuan sebagai berikut :

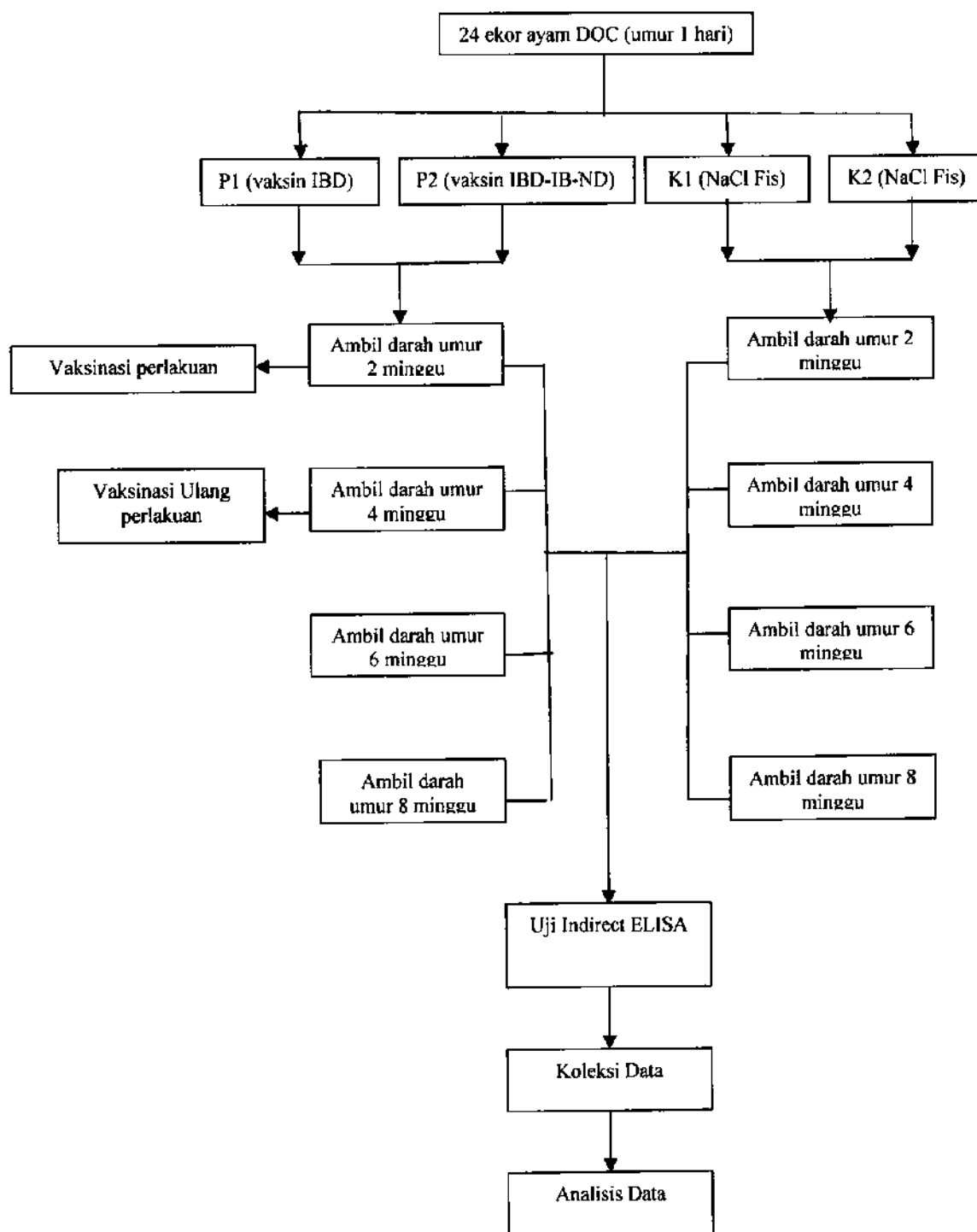
$$\text{Titer} = 1,09 (\log S/P) + 3,36$$

Setelah diketahui nilai titer antibodi masing-masing perlakuan dan kontrol kedua perlakuan, hasil tersebut di konversikan dalam antilog.

3.6 Rancangan Penelitian dan Analisis Statistik Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah uji General Linear Model (GLM) dan *Analysis of Variant* (Anova). Apabila terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji BNJ 5% (Beda Nyata Jujur) untuk membandingkan setiap perlakuan (Kusriningrum, 2008). Semua data dianalisis dengan program SPSS (*Statistical Program for Social Scientific*).

Kerangka Operasional Penelitian



BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Hasil Uji *Indirect* ELISA

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi titer antibodi antara vaksin IBD monovalen inaktif, vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) serta kontrol dari vaksin monovalen dan polivalen. Pada uji *indirect* ELISA kerja antibodi dalam menetralkan antigen adalah dengan melalui ikatan antara antigen dan antibodi dalam hal ini adalah anti virus IBD. Pengamatan secara visual telah dilakukan untuk melihat adanya reaksi perubahan warna, yang menunjukkan adanya reaksi atau ikatan antara konjugat berlabel enzim, dan substrat. Perubahan warna yang terjadi berwarna kuning, fase warna kuning tergantung pada banyaknya enzim yang terserap (Lampiran 6).

Pada hasil *Indirect* ELISA pada minggu ke-0 (Lampiran 6a), perubahan warna kuning pada tiap plate masing-masing perlakuan tidak jauh berbeda. Pada minggu ke-2 (Lampiran 6b) mulai terlihat perbedaan warna dimana pada plate yang berisi sampel serum ayam hasil vaksinasi menggunakan vaksin inaktif monovalen IBD sedikit lebih kuning dibandingkan dengan sampel serum hasil vaksinasi menggunakan vaksin inaktif polivalen IBD-IBND dan kontrol kedua vaksin perlakuan. Pada minggu ke-4 (Lampiran 6c), terlihat terjadi perubahan yang cukup signifikan dimana sampel serum ayam hasil vaksinasi menggunakan vaksin inaktif monovalen IBD terlihat lebih kuning dibandingkan dengan sampel serum ayam hasil

vaksinasi menggunakan vaksin polivalen IBD-IB-ND dan kontrol kedua vaksin perlakuan. Pada minggu ke-6 (Lampiran 6d), terlihat perbedaan warna dimana pada plate yang berisi sampel serum ayam hasil vaksinasi menggunakan vaksin IBD monovalen inaktif sedikit lebih kuning dibandingkan dengan sampel serum hasil vaksinasi menggunakan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) dan kontrol kedua vaksin perlakuan.

4.2 Pengujian Antibodi Hasil Vaksinasi

Hasil penelitian dengan teknik *indirect* ELISA (Tabel 4.1) menunjukkan tidak terdapat perbedaan titer antibodi hasil vaksinasi dimana vaksin IBD monovalen inaktif menghasilkan titer antibodi yang tidak berbeda dengan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) dan kontrol kecuali pada minggu ke-4

Tabel 4.1 Rataan (mean) \pm SD (*Standard Deviation*) titer antibodi ayam hasil vaksinasi menggunakan teknik *Indirect* ELISA (dilihat berdasarkan vaksin perlakuan)

PERLAKUAN	Minggu ke-0	Minggu ke-2 (Post Vaksinasi)	Minggu ke-4 (Post Vaksinasi)	Minggu ke-6 (Post Vaksinasi)
V. IBD Monovalen	3149 ^{ab} \pm 1286	3827 ^a \pm 610	10602 ^a \pm 2245	15798 ^a \pm 8313
V. IBD Polivalen	4105 ^a \pm 316	3618 ^{ab} \pm 550	7539 ^b \pm 240	14494 ^{ab} \pm 4368
V. IBD Polivalen (K)	3860 ^{ab} \pm 936	1407 ^b \pm 550	1328 ^c \pm 4255	328 ^b \pm 377
V. IBD Monovalen (K)	3707 ^{ab} \pm 882	1398 ^b \pm 511	1348 ^c \pm 506	287 ^b \pm 285

a,b,c

superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$)

Tabel 4.2 Rataan (mean) total tiap perlakuan dan kontrol kedua perlakuan

PERLAKUAN	Rataan (mean) Total
V. IBD Monovalen	8344 ^a
V. IBD Polivalen	7439 ^{ab}
V. IBD Polivalen (K)	1720 ^b
V. IBD Monovalen (K)	1695 ^b

a,b,c

superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$)

Titer antibodi yang dihasilkan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) antara vaksin IBD monovalen inaktif dan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) serta antara kontrol vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) dan kontrol vaksin IBD monovalen inaktif. Perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) terlihat antara vaksin IBD polivalen inaktif dengan kontrol vaksin IBD polivalen inaktif dan kontrol vaksin IBD monovalen inaktif. Hal yang sama terjadi antara vaksin IBD monovalen inaktif dengan kontrol vaksin IBD polivalen inaktif dan kontrol vaksin IBD monovalen inaktif (Tabel 4.1) maka selanjutnya diperlukan uji BNJ 5% untuk menentukan jenis vaksin IBD yang mampu menginduksi titer antibodi lebih tinggi terhadap ayam layer yang divaksin dengan dua jenis vaksin serta dibandingkan dengan kontrol.

Pada hasil uji statistik menggunakan BNJ 5% titer antibodi yang dihasilkan berdasarkan jenis perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) antara vaksin monovalen dan vaksin polivalen, sama halnya dengan kontrol vaksin monovalen dengan kontrol vaksin polivalen. Terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara vaksin monovalen dan kontrol vaksin monovalen, sama halnya dengan vaksin polivalen yang berbeda nyata dengan kontrol vaksin polivalen (Lampiran 4).

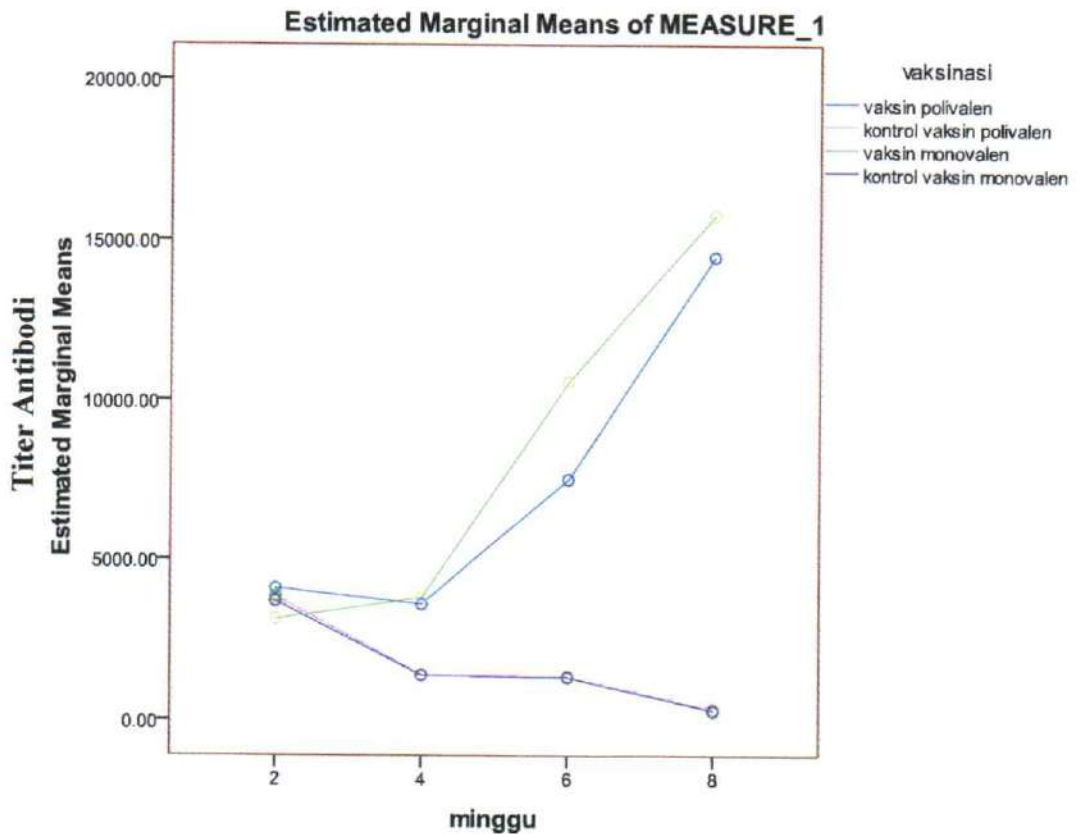
Pada minggu ke-2 pasca vaksinasi dan minggu ke-6 pasca vaksinasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) antara vaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif. Pada minggu ke-4 pasca vaksinasi menunjukkan perbedaan yang nyata antara vaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif. Untuk kontrol kedua vaksin tidak menunjukkan perbedaan yang

nyata ($p > 0.05$) pada minggu ke-2 pasca vaksinasi, minggu ke-4 pasca vaksinasi dan minggu ke-6 pasca vaksinasi. Terjadi perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) antara kedua vaksin perlakuan dengan kedua kontrol vaksin perlakuan (Lampiran 4).

Titer antibodi menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) antara minggu ke-2 yang merupakan minggu vaksinasi perlakuan, minggu ke-4 yang merupakan minggu vaksinasi ulang perlakuan dan minggu ke-6 yang merupakan minggu tanpa vaksinasi maka selanjutnya diperlukan uji BNP 5% untuk mengetahui minggu yang menghasilkan titer antibodi tertinggi dengan pemberian kedua jenis vaksin perlakuan. Terjadi interaksi titer antibodi tiap minggu dimana vaksin inaktif IBD monovalen inaktif dan vaksin IBD polivalen inaktif mengalami peningkatan dan kontrol kedua vaksin perlakuan semakin mengalami penurunan.

Pada hasil uji statistik menggunakan BNP 5% titer antibodi yang dihasilkan seluruh perlakuan terhadap minggu vaksinasi menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) minggu ke-2 pasca vaksinasi dengan minggu ke-4 pasca vaksinasi, minggu ke-2 pasca vaksinasi dengan minggu ke-6 pasca vaksinasi dan minggu ke-4 pasca vaksinasi dengan minggu ke-6 pasca vaksinasi. Minggu yang menghasilkan titer antibodi tertinggi terdapat pada minggu ke-6 pasca vaksinasi (Lampiran 4).

Grafik yang menunjukkan hubungan keseluruhan antara vaksin IBD monovalen inaktif dan vaksin IBD polivalen inaktif beserta kontrol masing-masing vaksin dapat dilihat pada Gambar 4.1 di bawah ini.



Gambar 4.1 Hubungan antara titer antibodi dengan kedua vaksin perlakuan dan kontrol.

Pada gambar 4.1 menunjukkan adanya peningkatan titer antibodi ayam layer pada minggu ke-2 yang merupakan minggu vaksinasi, minggu ke-4 yang merupakan minggu vaksinasi ulang, minggu ke-6 dan 8 yang merupakan minggu tanpa vaksinasi. Pada vaksin IBD monovalen inaktif, titer antibodi yang terbentuk mengungguli vaksin IBD polivalen inaktif. Pada kontrol kedua jenis vaksin mengalami penurunan dari minggu ke minggu. Pada grafik di atas dapat diketahui bahwasannya terdapat dua kelompok yang berlawanan yaitu antara kedua vaksin perlakuan dan kedua kontrol vaksin perlakuan. Kedua vaksin perlakuan secara bersamaan mengalami

peningkatan sedangkan kedua kontrol vaksin perlakuan secara bersamaan mengalami penurunan. Pada grafik yang menggambarkan titer antibodi hasil vaksinasi kedua vaksin perlakuan, terjadi perpotongan pada minggu ke-4 yang selanjutnya mengalami sedikit pelebaran pada minggu ke-6 dan mengalami penyempitan garis pada minggu ke-8. Pada grafik kontrol kedua vaksin perlakuan kedua garis bertemu dan sama-sama mengalami penurunan.

BAB 5
PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Infectious Bursal Disease (IBD) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus yang hingga kini belum ditemukan pengobatan yang efektif untuk penanggulannya. Penanggulangan IBD di Indonesia selama ini adalah dengan pemberian vaksin yang teratur, terutama pada induk ayam bibit komersial dengan tujuan anak ayam memperoleh kekebalan yang cukup. Sampai saat ini belum ditemukan vaksin yang sesuai dengan strain yang ada begitupun dengan pencegahan dan pengobatan terhadap IB dan ND (Dirjen Pronak, 2002). Penggunaan vaksin inaktif dalam penanggulangan IBD sering ditunjang dengan vaksin aktif. Vaksin inaktif dihasilkan dari pengrusakan virulensinya namun imunogenitasnya masih ada (Rantam, 2005). Modifikasi penggunaan vaksin inaktif kini mengalami perkembangan, salah satunya dengan pembuatan vaksin inaktif polivalen yang bertujuan terhadap efisiensi ekonomi peternakan serta menghindarkan ternak dari resiko stress *post* vaksinasi (Rantam dan Asmara, 2010).

Penelitian ini menggunakan dua jenis vaksin yaitu vaksin IBD monovalen inaktif dan vaksin IBD polivalen inaktif yang diujicobakan pada tubuh ayam layer untu mengetahui level antibodi ayam dari minggu ke minggu. Vaksin monovalen merupakan vaksin yang terdiri dari satu jenis antigen atau satu jenis mikroorganisme dan hanya protektif terhadap satu jenis antigen atau mikroorganisme, sedangkan vasin polivalen merupakan vaksin yang terdiri dari dari dua atau lebih jenis antigen

atau mikroorganisme dan protektif terhadap lebih dari satu jenis antigen atau mikroorganisme (Hoosen, 2009).

Antibodi yang digunakan pada penelitian ini adalah antibodi yang dihasilkan dari ayam yang divaksinasi karena ayam merupakan induk semang utama virus IBD, IB dan ND sehingga sesuai dengan penyakit secara alamiah. Antibodi adalah protein yang dikenal sebagai immunoglobulin. Antibodi yang terbentuk adalah sebagai respon imun terhadap suatu antigen yang bereaksi spesifik dengan antigen pembentuknya (Rantam, 2003).

Titer antibodi yang terbentuk tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antara vaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif pada minggu ke-2, 4 dan 6. Uji Anova yang diterapkan untuk memperkuat uji GLM menunjukkan fluktuasi signifikansi titer antibodi ayam layer tiap minggunya. Pada uji Anova tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antara vaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif pada minggu ke-2 pasca vaksinasi dan minggu ke-6 pasca vaksinasi sedangkan pada minggu ke-4 pasca vaksinasi menunjukkan perbedaan yang nyata. Berdasarkan analisis tersebut, hasil yang menunjukkan tidak ada perbedaan antara vaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif pada uji GLM dipengaruhi oleh hasil pada minggu ke-0, 2 pasca vaksinasi dan 6 pasca vaksinasi (uji Anova) yang menutupi hasil signifikansi pada minggu ke-4 pasca vaksinasi (uji Anova).

Titer antibodi yang terbentuk menunjukkan perbedaan yang nyata disetiap minggunya. Hal ini disebabkan terdapat beberapa level induksi antibodi di tiap minggunya. Pada minggu ke-0 titer antibodi ayam masih tinggi walaupun belum diberikan perlakuan menggunakan kedua jenis vaksin. Hal ini disebabkan oleh karena masih terdapat antibodi maternal pada tubuh anak ayam. Antibodi maternal terdapat pada ayam hingga usia 2 minggu dengan kadar yang makin menurun pada akhir minggu ke-2 (Tabbu, 2000). Pada minggu ke-2 keberadaan antibodi maternal masih ada dan dilakukan vaksinasi perlakuan menggunakan vaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif. Pada minggu ke-4 keberadaan maternal antibodi sudah tidak ada lagi dan dilakukan vaksinasi ulang (*booster*) pada ayam layer agar titer antibodi tetap stabil mengalami peningkatan pada minggu berikutnya karena kedua jenis vaksin yang diujicobakan merupakan vaksin inaktif. Pada penggunaan vaksin inaktif diperlukan dalam jumlah banyak untuk dapat merangsang respon imun sehingga *booster* sangat diperlukan agar imunitas ayam mencukupi (Rantam 2005). Pada minggu ke-4 titer antibodi juga meningkat yang merupakan hasil dari vaksinasi perlakuan pada minggu ke-2. Pada minggu ke-6 titer antibodi terus meningkat karena ada pengaruh vaksinasi ulang pada minggu ke-4.

Pada grafik secara keseluruhan menunjukkan bahwasannya terjadi peningkatan titer antibodi dari minggu ke-2 yang merupakan minggu vaksinasi awal, minggu ke-4 yang merupakan minggu vaksinasi ulang, minggu ke-6 dan 8 yang merupakan minggu tanpa vaksinasi pada ayam layer yang diujicobakan dengan

vaksin IBD monovalen inaktif dan vaksin IBD polivalen inaktif. Hanya saja titer antibodi vaksin IBD monovalen inaktif mengungguli vaksin IBD polivaen inaktif. Hal ini dapat terjadi karena pada vaksin monovalen kerja satu jenis strain virus yang diformulasikan pada vaksin tidak terganggu oleh strain lain, jadi kerja dari vaksin monovalen lebih optimal. Pada vaksin polivalen yang terdapat lebih dari satu strain virus terjadi daya kompetisi atau daya interferensi masing-masing strain virus sehingga titer antibodi yang dihasilkan tidak mengungguli vaksin monovalen. Daya interferensi merupakan daya yang terjadi pada penggunaan vaksin kombinasi sehingga terdapat daya saing antar vaksin hingga sampai pada respon antibodi masing-masing penyakit (Cardoso *et al.*, 2006). Secara imunologis, apabila ternak unggas divaksin dengan dua antigen strain virus yang berbeda maka akan menghasilkan dua antibodi yang berbeda. Secara hipotesis, semakin banyak strain dalam suatu vaksin maka ayam akan mempunyai kemungkinan lebih lambat dalam memproduksi tingkat antibodi yang memadai (Rantam dan Asmara, 2010). Pada grafik terlihat adanya perpotongan garis antara vaksin IBD monovalen inaktif dengan IBD polivalen inaktif pada minggu ke-4, garis sedikit melebar pada minggu ke 6 dan kedua garis sedikit menyempit pada minggu ke-8. Kontrol kedua jenis vaksin yang terlihat pada grafik mengalami penurunan di tiap minggunya. Hal ini disebabkan oleh level antibodi maternal pada ayam yang semakin menurun hingga hilang. Minggu yang menghasilkan titer antibodi paling tinggi adalah minggu ke-8 karena telah

dilakukan *boster* pada minggu ke-4 sehingga level antibodi dimungkinkan akan meningkat.

Minggu titer antibodi tertinggi yang dicapai dapat dijadikan sebagai acuan dalam pelaksanaan program vaksinasi pada ayam layer dengan menggunakan vaksin IBD monovalen inaktif dan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND). Selain itu dari hasil tersebut juga dapat menggambarkan keefektifan dari penggunaan vaksin IBD monovalen inaktif dan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND).

Kekebalan terhadap bibit penyakit dapat ditimbulkan dengan vaksinasi. Zat yang menyebabkan kekebalan dapat ditemukan dalam serum darah yaitu antibodi. Antigen (virus) yang dimasukkan ke dalam tubuh akan diikat sebagai benda asing dan akan dikenali dengan dikirimkan ke sel pembentuk antibodi atau sistem kekebalan tubuh. Sistem ini akan menanggapi dengan membentuk antibodi yang hanya berikatan khusus dengan antigen yang merangsang pembentuknya. Bila serum yang mengandung antibodi ayam hasil vaksinasi ini direaksikan dengan antigen yang sama dengan virus yang disuntikkan maka reaksi yang terjadi lebih cepat dan antibodi mencapai tingkat yang jauh lebih tinggi dibanding dengan isolat lain. Sistem kekebalan atau pembentuk antibodi mempunyai kemampuan untuk "mengingat" keterpaparan dengan antigen sebelumnya (Tizard, 2000).

Hasil penelitian pada uji *Indirect* ELISA tampak adanya reaksi perubahan warna dari vaksin IBD monovalen inaktif, vaksin IBD polivalen inaktif dan kontrol dari kedua vaksin. Perubahan warna yang nyata terlihat berasal dari ikatan antara

konjugat berlabel enzim *Alkaline Phosphatase* dan substrat pada serum sampel IBD monovalen inaktif. Semakin kuning warna yang dihasilkan akan menunjukkan semakin tinggi nilai OD yang terbaca dan semakin tinggi jumlah analit yang terdeteksi (Suwarno dkk, 2008). Perubahan warna ini menunjukkan banyak sedikitnya enzim yang terserap sehingga pada saat diberikan substrat, terjadi perubahan warna kuning yang lebih tajam ataupun lebih pudar. Antibodi dalam serum sampel lebih banyak mengenal epitop yang merupakan bagian dari antigen virus vaksin IBD monoalen inaktif. Pada sampel serum ayam yang divaksin dengan vaksin IBD polivalen inaktif menunjukkan reaksi yang lebih lambat dengan perubahan warna yang tidak terlalu kuning daripada vaksin IBD monovalen inaktif dikarenakan antibodi harus mengenal beberapa epitop yang berbeda dari 3 strain virus yang terdapat dalam vaksin IBD polialen inaktif.

Hasil uji ELISA tergantung pada ketelitian dalam mengoptimisasi kondisi dari tes. Pendekatan untuk optimalisasi asai dapat dimulai dari pelapisan (*coating*) antigen, penambahan sampel, penambahan detektor untuk melacak terjadinya ikatan antigen dan antibodi yang meliputi penambahan konjugat, penambahan substrat serta pembacaan hasil asai. Untuk menciptakan kondisi yang optimal pada uji ELISA perlu diperhatikan pula kadar antibodi, antigen dan pengenceran konjugat.

Hasil uji *Indirect* ELISA untuk diagnosis antigen maupun antibodi lebih spesifik dibandingkan dengan uji *Direct* ELISA (Rantam, 2003). Antibodi primer (antibodi antivirus IBD) yang berasal dari hasil vaksinasi pada ayam berikatan

dengan antibodi sekunder yaitu konjugat Ig *Anti-Chicken* berlabel enzim. Akhirnya tampak adanya reaksi perubahan warna. Antibodi sekunder ini sangat penting dalam uji *Indirect* ELISA karena mempunyai aktivitas spesifik yang tinggi (Piercenet, 2002).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan yaitu:

1. Tidak terdapat perbedaan titer antibodi antara ayam *layer* yang divaksin menggunakan vaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) dengan teknik *Indirect ELISA*.
2. Terdapat hubungan antara penggunaan kedua vaksin perlakuan dengan minggu dilakukannya vaksinasi.

6.2 Saran

Saran dari hasil penelitian ini adalah perlunya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui tingkat imunogenitas vaksin inaktif monovalen IBD dan vaksin inaktif polivalen IBD (IBD-IB-ND) melalui *challenge test*.

RINGKASAN

RINGKASAN

Febry Kusumaning Erlyta Sari. PERBANDINGAN TITER ANTIBODI ANTARA AYAM *LAYER* YANG DIVAKSIN IBD MONOVALEN INAKTIF DENGAN IBP POLIVALEN INAKTIF (IBD-IB-ND) MENGGUNAKAN *INDIRECT* ELISA. Penelitian ini di bawah bimbingan Gracia Angelina Hendarti, M.Si., drh selaku pembimbing pertama dan Dr. Suwarno, M.Si., drh selaku pembimbing kedua.

Penyakit IBP merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh *Birnavirus*, mempunyai angka mortalitas hingga 100% dan bersifat immunosupresif. Penyakit IBP menimbulkan gangguan pada alat-alat pembentuk kekebalan terutama pada bursa fabrisius sehingga mengalami penghambatan dalam membentuk zat kebal. Akibatnya, selama hidup ayam mudah terserang penyakit seperti ND dan IB.

Identifikasi terhadap virus IBP dapat dilakukan dengan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Penentuan antibodi dapat dilakukan dengan pelabelan pada imunoglobulinnya yaitu dengan menggunakan model *Indirect* ELISA. Secara semi kuantitatif atau kuantitatif, ELISA dibaca dengan spektrofotometer (*ELISA reader*) yang berdasarkan pada nilai titer atau absorban atau kerapatan optik (*Optical Density/OD*).

Vaksinasi secara tunggal dan berulang-ulang khususnya pada ayam petelur dapat mengakibatkan ayam tersebut stres. Penggunaan vaksin polivalen

merupakan sebuah solusi untuk menjawab hal diatas. Beberapa vaksin kombinasi telah banyak diterapkan di Indonesia.

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober sampai Desember 2009. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan titer antibodi antara ayam petelur yang divaksin IBD monovalen inaktif dengan vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) sehingga dapat dipilih vaksin yang efektif dalam mencegah penyakit ayam, protektif terhadap ayam dan efisien serta mengetahui hubungan antara pemberian kedua jenis vaksin perlakuan dengan waktu pengamatan.

Penelitian dilakukan pada 24 ekor ayam yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok (P1), 6 ekor ayam divaksin IBD monovalen inaktif (LV3UA) pada umur 2 minggu diberikan 0,3 ml/ekor dengan dosis virus $10^{3,0}$ TCID50/ml. Kelompok (P2), 6 ekor ayam divaksin IBD polivalen inaktif (LV8UA) pada umur 2 minggu diberikan 0,5 ml/ekor dengan dosis virus IBD $10^{3,0}$ TCID50/ml, IB $10^{3,5}$ EID50/ml, ND $10^{5,0}$ EID50/ml. Kelompok (P3), 6 ekor ayam sebagai kontrol vaksin IBD monovalen inaktif diberikan NaCl fisiologis 0,3 ml/ekor. Kelompok (P4), 6 ekor ayam sebagai kontrol vaksin IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND). Pengambilan darah pada ayam dilakukan pada umur 2 minggu, 4 minggu, 6 minggu dan 8 minggu, selanjutnya pengukuran titer antibodi dilakukan dengan teknik *indirect* ELISA.

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) antara ayam layer yang divaksin monovalen IBD inaktif dengan IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND). Hal ini menunjukkan potensi yang sama dalam menstimulir antibodi antara kedua vaksin perlakuan. Titer antibodi antara ayam layer yang

divaksin IBD monovalen inaktif dengan IBD polivalen inaktif (IBD-IB-ND) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) di tiap minggunya. Minggu yang menghasilkan titer antibodi tertinggi adalah pada minggu ke-6. Hal ini menunjukkan adanya hubungan antara kedua vaksin perlakuan dengan waktu pengamatan.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

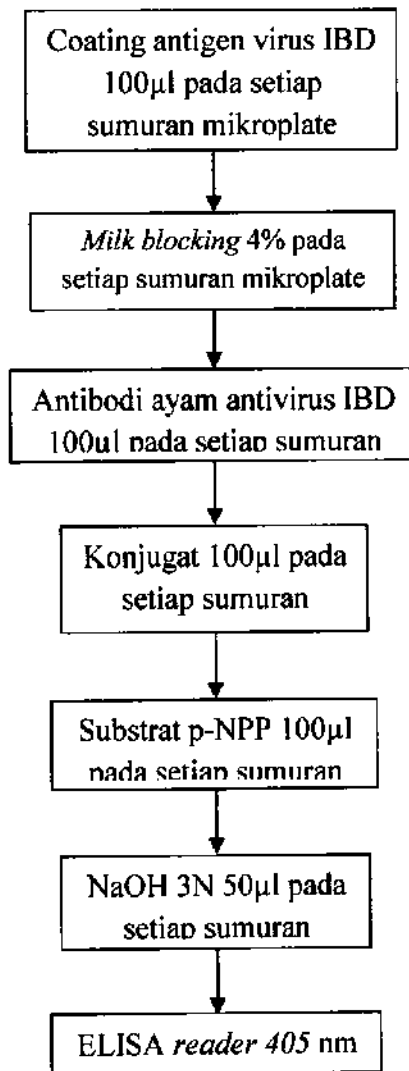
- Akoso, Budi Tri. 1998. Kesehatan Unggas. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Alberts., B. Johnson and R. Roberts. 1998. Antibodies. Garland Publishing. Prancis.
- Anonimus. 2008. Budidaya Ayam Ras Petelur. Bapenas. Jakarta.
- Anonimus. 2009. ELISA-an Important Clinical Analytical Technique: Theory. United Kingdom.
- AUSVETPLAN. 2009. Infectious Bursal Disease Caused by Very Virulent IBV Virus or Exotic Antigenic Variant Strain of IBV Virus. Animal Health Australia. IBV-22 PROOF. Ver. 3.0.
- Bahri, Sjamsul dan A. Kusumaningsih. Potensi, Peluang dan Strategi Pengembangan Vaksin Hewan di Indonesia. Jurnal Litbang Pertanian. 24(3).
- Balitvet. 2006. Prototipe Vaksin Kombinasi Penyakit ND dan Flu Burung. (5 Mei 2006).
- Bellanti, J.A. 1993. Immunologi III. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Butcher, G.D and R.D. Miller. 2009. Infectious Bursal Disease (Gumboro) in Commercial Broilers. University of Florida IFAS Extension. VM 84.
- Burgess, G.W. 1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Cardoso, W.M., J.L.C. Aguiar Filho., J.M. Ramao., R.P.R. Salles., S.R. Camara., A.A. Siquiera., W.F. Oliveira., M.H.N.R. Sobral and R.S.C. Txeira. 2006. Interference of Infectious Bursal Disease Virus on Antibody Production against Newcastle Disease and Infectious Bronchitis Virus. Brazilian of Poultry Science. v.8/n.3/177-182.
- Dharmayanti, NLP.I., W. Asmoro., W.T. Artama., R. Indriani dan Darminto. 2005. Hubungan Kekebalan Virus Infectious Bronchitis Isolat Lapangan Indonesia. Jurnal Bioteknologi Pertanian. Vol. 10. pp. 15-23.

- Direktorat Jenderal Prodksi Ternak. 2002. Keterpaduan Kebijakan Pembangunan Sektor Peternakan dan Perikanan. Seminar Nasional Fakultas Kedokteran Hewan. Unair. Surabaya.
- Ernawati, R., W. Tjahjaningsih., N. Sianita., J. Rahmahani dan Suwarno. 1995. Pengaruh Pemberian Vaksin Kombinasi Newcastle Disease dan Infectious Bronchitis Terhadap Titer Antibodi pada Ayam serta Petumbuhan dan Perubahan Histopatologi pada Telur Ayam Bertunas. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Fenner, F.J., E.P.J Gibbs., F.A. Murphy., R. Rott., M.J. Studdert and D.O. White. 1993. *Veterinary Virology*. Edisi Kedua. Penerjemah D.K. Harya Putra. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Fenner, F.J., E.P.J Gibbs., F.A. Murphy., R. Rott., M.J. Studdert and D.O. White. 1995. *Veterinary Virology*. Edisi Kedua. Penerjemah D.K. Harya Putra. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Hardiyanto, Tri. 2009. Peternakan Harus Jadi Aset Nasional. *Suara Agribisnis*. Edisi 114 Maret 2009.
- Hoosen, Anwar. 2009. Update on Combined Vaccines: Traditional and New Vaccines. SAVIC GAUTENG 2009 EPI SYMPOSIUM. Johannesburg.
- Jackwood, D.J., Y.M Saif and P.D Moohead. 1985. Immunogenicity and Antigenicity of Infectious Bursal Disease Virus Serotype 1 and 2 in chicken. *Avian Dis.* 29 (4) : 1184-1194.
- Jackwood, D.J., K.S. Henderson and R.J. Jackwood. 1996. Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay Detection of Antibodies to Antigenic Subtype of Infectious Bursal Disease Viruses of Chickens. *Ohio State University*. Ohio. (34): 456-462.
- Kim, Jeong-In., S.K. You., H. Kim., H.Y. Yeh and J.M. Sharmal. 2000. Characteristics of Bursal T Lymphocytes Induced by Infectious Bursal Disease Virus. *Journal of Virology*. Vol. 74 No. 19. p. 8884-8892.
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Leong, J.C.D., D. Brown., P. Dobos., F.S.B. Kibenge., J.E. Ludest., H. Miller., E. Mundt and B. Nicholson. 2000. Family Birnaviridae. P. 481-490. In MH V. Van Rengen Mortel, C.M Fauquet, DHL Bishop, e.B. Castens, MK Esks, SM Lemon, D.J Mc Goch, J Manillof, M.A. Mayo, C.R. Pring le, Commites on The Taxonomy of Virus. Academy Press Inc. San Diego. California.

- Lindhahl, Johanna. 2004. Infectious Bronchitis Virus and Infectious Bursal Disease Virus. A study Performed at the Universidad Nacional of Costa Rica. Examensarbete 2004:48.
- Lukert, Phil.D and Y.M. Saif. 2003. Infectious Bursal Disease. Disease of Poultry. Second Edition. Iowa State Press. USA.
- Machdum, Nurvidia. 2009. Gumboro pada Ayam Broiler Modern. Infonet. Edisi 174. 20 Januari.
- Murphy, F.A., E.P.J. Gibbs., M.C. Horzinek and M.J. Studdert. 1999. Veterinary Virology. Third Edition. Academic Press. London.
- OIE. 2009. Infectious Bronchitis. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 10.2. Article 10.2.1.
- OIE. 2004. Newcastle Disease. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.15.
- Partadiredja, M dan R.D. Soejoedomo. 1988. Perbandingan Daya Guna Tiga Cara Aplikasi Vaksin Newcastle Disease. Hemerazoa. 73: 19-24.
- Paniago, Marcelo and V. Turblin. 2010. Prevention Strategy of Infectious Bursal Disease. Vat No. 647. Inggris.
- Piercenet. 2002. Proteomics ELISA. 20 Juli 2006.
- Qiunn, P.J., B.K Markey., M.E Carter., W.J Donnelly and F.C Leonard. 2003. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing. Oxford.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Rantam, F.A. 2005. Virologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Rantam, F.A dan W. Asmara. 2010. Akankah Vaksin Polivalen Menggeser Monovalen. Majalah Poultry Indonesia. Edisi Februari Vol.V. Hlm. 68-70.
- Ramadass, Phacaikani., M. Parthiban., V. Thiagarajan., M. Chandrasekar., M.N. Vidhya and G.D. Raj. 2008. Development of Single Serum Diluion ELISA for Detection of Infectious Bursal Disease Virus Antibodies. Veterinarski Arhiv 78(1): 23-30.

- Rudd, M.F., H.G Heine., S.I. Sapats., L. Parede and J. Ignjatovic. 2002. Characterisation of an Indonesian Very Virulent Strain of Infectious Bursal Disease Virus. *Arch Virol.* 147: 1.303-1.322.
- Saif, Y.M. 2003. *Infectious Bronchitis. Disease of Poultry.* Eleventh Edition. Iowa State Press. USA.
- Samour, Jaime. 2000. *Newcastle Disease. Avian Medicine.* Mosby. London.
- Sivanan and S.K Maheswaren. 1998. Immune Profile of IBD II. Effect of IBD Virus on Poke Weed Mitogen Stimulated. *Avian Dis.* 24:734-741.
- Sudarmono, A.S. 2003. *Pedoman Pemeliharaan Ayam Buras Petelur.* Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Sudaryani, T dan H. Santoso. 1997. *Pemeliharaan Ayam Buras Petelur Kandang Baterai.* Cetakan Ketujuh. Penerbit Swadaya. Jakarta.
- Suwarno., E. Rahayu., A.P. Rahardjo., N. Sianita., J. Rahmahani dan F.A. Rantam. 2003. *Prinsip Dasar Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA.* Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR. Surabaya.
- Tabbu, C.R. 2000. *Penyakit dan Penanggulanga, Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral.* Volume 1. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Tizard, I.R. 2000. *Pengantar Imunologi Veteriner.* Penerjemah Soekardjo Hardjosworo. Airlangga University Press. Surabaya.
- Tzvetkov, Petko., K. Genova and N. Djambazova. 2000. *Preparaton of Trivalent Inactivated Vaccine Against Newcastle Disease, Infectious Bursal Disease and Infectious Bronchitis in chickens.* Bulgarian Academy of Science. Bulgaria.
- Van den Berg, T.P. 2000. *Acute Infectious Bursal Disease in Poultry: a riview.* *Avian Pathology.* 29:175-194

LAMPIRAN

LAMPIRANLampiran 1. Bagan Alur Penelitian dengan uji *Indirect* ELISA

Lampiran 2. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji *Indirect* ELISA

1. **PBS (*Phosphate Buffer Saline*)**

pH : 7,4

Konsentrasi : fosfat: 10 mmol/l

NaCl : 140 mmol/l

Timbang : NaCl : 8 g

KCl : 0,2 g

KH₂PO₄ : 0,2 g

Na₂HPO₄·12H₂O : 2,89 g

Aquades ad 1 liter

Simpan pada 4⁰C

PBS-Triton x

Triton x : 0,5 ml

NaN₃ : 200 mg

PBS ad 1 liter

2. **Bufer Carbonat (Bufer untuk *coating* Ag)**

Ph : 9,6

Konsentrasi : 50 mmol/l

Timbang :

Na₂CO₃ : 1,59 g

Lanjutan lampiran 2

NaHCO_3 : 2,93 g

Aquades ad 1 liter

Simpan pada suhu 4°C tidak lebih dari 2 minggu.

Katalog :

Na_2CO_3 (Natrium Carbonat Wasserfrei) 500.323 A763692 Art 6392. Merck

NaHCO_3 (Natrium Hidrogen Carbonat) Art 6392

3. Buffer Washing (Bufer untuk pencuci)**a. NaCl-Tween pH: 8,6**

Konsentrasi : NaCl : 154 mmol/l

Tween-20 : 1 ml

Timbang :

NaCl : 9 g

Tween-20 : 1 ml

Aquades ad 1 liter

Buat pH : 8,6 dengan NaOH

b. NaCl Triton x

Konsentrasi : NaCl : 0,154 m/l

Triton x 100 : 0,05%

Lanjutan lampiran 2

NaN_3 : 0,02%

Timbang :

NaCl : 0,9%

Triton x 100 : 0,05%

NaN_3 : 20 mg

Aquades ad 100 ml

c. PBS-Tween

Timbang : Tween-20 : 1 ml

PBS ad 1 liter

Katalog :

- NaCl (lihat Blocking Buffer)
- Tween-20 (lihat Blocking Buffer)
- Triton x-100 (lihat Blocking Buffer)
- NaN_3 (lihat Substrat Buffer)

4. Buffer Blocking (Bufer untuk pengencer/blocking)**a. PBS-Tween-BSA pH : 7,4**

Konsentrasi : Fosfat : 10 mmol/l

NaCl : 140 mmol/l

Lanjutan lampiran 2

Tween-20 : 1 ml

BSA : 5 g

Timbang :

BSA : 0,5 g

PBS Tween ad 100 ml

b. PBS-Triton x-BSA

pH : 7,0

Timbang :

BSA : 0,5 g

PBS-Triton x ad 100 ml

Katalog :

- Bovine Albumin Fraction V. Albumin : 95% 25 mg cat. No. 11018017. Lot. No. 1018736 GIBCO BRL
- Tween-20. 500 ml cat. 20605 cas : 9005-64-5 Lot. 107989.USB
- NaCl (Sodium Chloride Analytical Reagent) 1 kg. 31434 Riedel-dehaen
- Triton x 100. 1 liter. Lot 103 H0421 SIGMA

Lanjutan lampiran 2

5. Buffer Substrat

Konsentrasi : Diethanolamine (DEA) 1 mol/l pH : 9,8

Timbang :

MgCl₂ : 10 mg

Diethanolamine : 9,7 ml

NaN₃ : 20 mg

Aqua : 80 mg

HCl pekat sampai pH : 9,8

Aquades ad 100 ml

Disimpan pada suhu kamar

DEA 1 M

MgCl₂ 0,5 M

pH : 9,8

Katalog :

- MgCl₂ : 1 kg 405 A 852233. Art. 5833 Merck
- Diethanolamine : 500 g O-8885 Lot 45 H 0950 SIGMA
- NaN₃ : 100g 405 B 320148880 Art 6688 Merck

Lanjutan lampiran 2

6. Konjugat

Alkaline Phosphatase-Anti Chicken Ig G Conjugate

Encerkan dengan buffer blocking 1:1000-1:3000

Lampiran 3. Tabel titer antibodi antara ayam petelur yang divaksin IBD monovalen inaktif dengan IBD polivalen inaktif.

Minggu ke-0				
	V. Monovalen IBD	V. Monovalen IBD (K)	V. Polivalen IBD-IB-ND	V. Polivalen IBD-IB-ND (K)
1	3123	3377	4147	2972
2	4199	3225	3718	2871
3	3683	3326	3855	3275
4	3039	3547	3975	5017
5	3718	4789	4406	4720
6	4130	3975	4528	4303
Rata-rata	3149	3707	4105	3860
SD	1286	592	316	936
Minggu ke-2				
1	3437	2112	3861	2209
2	3657	1567	4049	1583
3	4825	1099	3539	1099
4	3319	677	2934	662
5	3404	1192	4289	1254
6	4323	1742	3034	1726
Rata-rata	3827	1398	3618	1407

SD	610	511	550	550
Minggu ke-4				
1	9081	2203	7555	1813
2	12700	1642	7442	1444
3	12818	745	7813	1015
4	9458	209	7619	483
5	12113	1458	7121	1430
6	7442	1828	7684	1785
Rata-rata	10602	1348	7539	1328
SD	2245	738	240	506
Minggu ke-6				
1	27143	886	23236	637
2	17131	108	13257	306
3	16417	29	13467	19
4	11899	73	11086	40
5	16008	144	12803	96
6	16899	733	13117	623
Rata-rata	15798	7727	14494	287
SD	8313	377	4367	285

Lampiran 4 Analisis Data

General Linear Model**Within-Subjects
Factors**

Measure: MEASURE_1

ming gu	Dependent Variable
1	tab_mg_0
2	tab_mg_2
3	tab_mg_4
4	tab_mg_6

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
vaksinasi	1	vaksin polivalen	6
	2	kontrol vaksin polivalen	6
	3	vaksin monovalen	6
	4	kontrol vaksin monovalen	6

Descriptive Statistics

	vaksinasi	Mean	Std. Deviation	N
titer antibodi mg ke 0	vaksin polivalen	4104.8333	316.37409	6
	kontrol vaksin polivalen	3859.6667	936.31056	6
	vaksin monovalen	3148.6667	1286.27783	6
	kontrol vaksin monovalen	3706.5000	592.37345	6
	Total	3704.9167	881.46913	24
titer antibodi mg ke 2	vaksin polivalen	3617.6667	549.58227	6
	kontrol vaksin polivalen	1407.1667	550.05069	6
	vaksin monovalen	3827.3333	610.05890	6
	kontrol vaksin monovalen	1398.0000	511.26197	6

Descriptive Statistics

vaksinasi		Mean	Std. Deviation	N
titer antibodi mg ke 2	Total	2562.5417	1295.72874	24
titer antibodi mg ke 4	vaksin polivalen	7539.0000	239.53705	6
	kontrol vaksin polivalen	1328.3333	505.95006	6
	vaksin monovalen	10602.0000	2245.13510	6
	kontrol vaksin monovalen	1347.5000	737.68415	6
	Total	5204.2083	4254.89459	24
titer antibodi mg ke 6	vaksin polivalen	14494.3333	4367.55161	6
	kontrol vaksin polivalen	286.8333	284.62988	6
	vaksin monovalen	15797.6667	8313.19500	6
	kontrol vaksin monovalen	328.3333	377.29705	6
	Total	7726.7917	8768.05784	24

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df
minggu	Pillai's Trace	.904	56.402 ^a	3.000
	Wilks' Lambda	.096	56.402 ^a	3.000
	Hotelling's Trace	9.400	56.402 ^a	3.000
	Roy's Largest Root	9.400	56.402 ^a	3.000
minggu * perlakuan	Pillai's Trace	1.041	3.541	9.000
	Wilks' Lambda	.074	9.358	9.000
	Hotelling's Trace	10.978	20.330	9.000
	Roy's Largest Root	10.836	72.239 ^b	3.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept + perlakuan
Within Subjects Design: minggu

Multivariate Tests^c

Effect		Error df	Sig.
minggu	Pillai's Trace	18.000	.000
	Wilks' Lambda	18.000	.000
	Hotelling's Trace	18.000	.000
	Roy's Largest Root	18.000	.000
minggu * perlakuan	Pillai's Trace	60.000	.001
	Wilks' Lambda	43.958	.000
	Hotelling's Trace	50.000	.000
	Roy's Largest Root	20.000	.000

c. Design: Intercept + perlakuan
Within Subjects Design: minggu

Mauchly's Test of Sphericity^b

Measure: MEASURE_1

Within Subject's Effect	a			
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.
minggu	.037	61.978	5	.000

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

b. Design: Intercept + perlakuan
Within Subjects Design: minggu

Mauchly's Test of Sphericity^b

Measure: MEASURE_1

Within Subject's Effect	Epsilon ^a		
	Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
minggu	.403	.479	.333

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

b. Design: Intercept + perlakuan
Within Subjects Design: minggu

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square
minggu	Sphericity Assumed	3.584E8	3	1.195E8
	Greenhouse-Geisser	3.584E8	1.209	2.965E8
	Huynh-Feldt	3.584E8	1.437	2.494E8
	Lower-bound	3.584E8	1.000	3.584E8
minggu * perlakuan	Sphericity Assumed	8.209E8	9	9.121E7
	Greenhouse-Geisser	8.209E8	3.626	2.264E8
	Huynh-Feldt	8.209E8	4.312	1.904E8
	Lower-bound	8.209E8	3.000	2.736E8
Error(minggu)	Sphericity Assumed	3.623E8	60	6038170.513
	Greenhouse-Geisser	3.623E8	24.174	1.499E7
	Huynh-Feldt	3.623E8	28.746	1.260E7
	Lower-bound	3.623E8	20.000	1.811E7

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		F	Sig.
minggu	Sphericity Assumed	19.787	.000
	Greenhouse-Geisser	19.787	.000
	Huynh-Feldt	19.787	.000
	Lower-bound	19.787	.000
minggu * perlakuan	Sphericity Assumed	15.106	.000
	Greenhouse-Geisser	15.106	.000
	Huynh-Feldt	15.106	.000
	Lower-bound	15.106	.000

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	minggu	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F
minggu	Linear	2.596E8	1	2.596E8	25.558
	Quadratic	8.059E7	1	8.059E7	13.105
	Cubic	1.828E7	1	1.828E7	10.104
minggu * perlakuan	Linear	7.759E8	3	2.586E8	25.467

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	minggu	Sig.
minggu	Linear	.000
	Quadratic	.002
	Cubic	.005
minggu * perlakuan	Linear	.000

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	minggu	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F
minggu * perlakuan	Quadratic	3.858E7	3	1.286E7	2.091
	Cubic	6419950.223	3	2139983.408	1.183
Error(minggu)	Linear	2.031E8	20	1.016E7	
	Quadratic	1.230E8	20	6149463.135	
	Cubic	3.618E7	20	1809234.080	

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	minggu	Sig.
minggu * perlakuan	Quadratic	.134
	Cubic	.341

Tests of Between-Subjects EffectsMeasure: MEASURE_1
Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	2.211E9	1	2.211E9	339.334	.000
perlakuan	9.275E8	3	3.092E8	47.441	.000
Error	1.303E8	20	6517139.069		

Estimated Marginal Means**1. vaksinasi****Estimates**

Measure: MEASURE_1

vaksinasi	95% Confidence Interval			
	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	7438.958	521.102	6351.958	8525.958

Estimates

Measure: MEASURE_1

vaksinasi	95% Confidence interval			
	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
kontrol vaksin polivalen	1720.500	521.102	633.500	2807.500
vaksin monovalen	8343.917	521.102	7256.917	9430.917
kontrol vaksin monovalen	1695.083	521.102	608.083	2782.083

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	a		
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	5718.458 [*]	736.950	.000
	vaksin monovalen	-904.958	736.950	.234
	kontrol vaksin monovalen	5743.875 [*]	736.950	.000
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-5718.458 [*]	736.950	.000
	vaksin monovalen	-6623.417 [*]	736.950	.000
	kontrol vaksin monovalen	25.417	736.950	.973
vaksin monovalen	vaksin polivalen	904.958	736.950	.234
	kontrol vaksin polivalen	6623.417 [*]	736.950	.000
	kontrol vaksin monovalen	6648.833 [*]	736.950	.000
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	-5743.875 [*]	736.950	.000
	kontrol vaksin polivalen	-25.417	736.950	.973
	vaksin monovalen	-6648.833 [*]	736.950	.000

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	95% Confidence Interval for Difference ^a	
		Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	4181.208	7255.709
	vaksin monovalen	-2442.209	632.292
	kontrol vaksin monovalen	4206.625	7281.125
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-7255.709	-4181.208
	vaksin monovalen	-8160.667	-5086.166
	kontrol vaksin monovalen	-1511.834	1562.667
vaksin monovalen	vaksin polivalen	-632.292	2442.209
	kontrol vaksin polivalen	5086.166	8160.667
	kontrol vaksin monovalen	5111.583	8186.084
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	-7281.125	-4206.625
	kontrol vaksin polivalen	-1562.667	1511.834
	vaksin monovalen	-8186.084	-5111.583

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Measure: MEASURE_1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	2.319E8	3	7.729E7	47.441	.000
Error	3.259E7	20	1629284.767		

The F tests the effect of vaksinasi. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

2. minggu

Estimates

Measure: MEASURE_1

minggu	95% Confidence Interval			
	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
1	3704.917	176.251	3337.263	4072.570
2	2562.542	113.567	2325.645	2799.438
3	5204.208	247.870	4687.162	5721.255
4	7726.792	959.644	5725.008	9728.575

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) ming gu	(J) ming gu	a			95% Confidence Interval for Difference ^a	
		Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig. ^a	Lower Bound	Upper Bound
0	2	1142.375 *	208.465	.000	707.524	1577.226
	4	-1499.292 *	331.296	.000	-2190.363	-808.221
	6	-4021.875 *	968.028	.000	-6041.146	-2002.604
2	0	-1142.375 *	208.465	.000	-1577.226	-707.524
	4	-2641.667 *	244.967	.000	-3152.659	-2130.675
	6	-5164.250 *	946.653	.000	-7138.934	-3189.566
4	0	1499.292 *	331.296	.000	808.221	2190.363
	2	2641.667 *	244.967	.000	2130.675	3152.659
	6	-2522.583 *	986.220	.019	-4579.803	-465.364
6	0	4021.875 *	968.028	.000	2002.604	6041.146
	2	5164.250 *	946.653	.000	3189.566	7138.934
	4	2522.583 *	986.220	.019	465.364	4579.803

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.904	56.402 ^a	3.000	18.000	.000
Wilks' lambda	.096	56.402 ^a	3.000	18.000	.000
Hotelling's trace	9.400	56.402 ^a	3.000	18.000	.000
Roy's largest root	9.400	56.402 ^a	3.000	18.000	.000

Each F tests the multivariate effect of minggu. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

a. Exact statistic

3. vaksinasi * minggu

Measure: MEASURE_1

vaksinasi	ming gu	95% Confidence Interval			
		Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	0	4104.833	352.502	3369.527	4840.140
	2	3617.667	227.134	3143.873	4091.460
	4	7539.000	495.739	6504.906	8573.094
	6	14494.333	1919.289	10490.767	18497.900

3. vaksinasi * minggu

Measure: MEASURE_1

vaksinasi	minggu	95% Confidence Interval			
		Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
kontrol vaksin polivalen	0	3859.667	352.502	3124.360	4594.973
	2	1407.167	227.134	933.373	1880.960
	4	1328.333	495.739	294.240	2362.427
	6	286.833	1919.289	-3716.733	4290.400
vaksin monovalen	0	3148.667	352.502	2413.360	3883.973
	2	3827.333	227.134	3353.540	4301.127
	4	10802.000	495.739	9567.906	11636.094
	6	15797.667	1919.289	11794.100	19801.233
kontrol vaksin monovalen	0	3706.500	352.502	2971.193	4441.807
	2	1398.000	227.134	924.207	1871.793
	4	1347.500	495.739	313.406	2381.594
	6	328.333	1919.289	-3675.233	4331.900

Post Hoc Tests

vaksinasi

Multiple Comparisons

MEASURE_1
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	Mean Difference (I-J)		
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	5718.4583 *	736.94974	.000
	vaksin monovalen	-904.9583	736.94974	.617
	kontrol vaksin monovalen	5743.8750 *	736.94974	.000
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-5718.4583 *	736.94974	.000
	vaksin monovalen	-6623.4167 *	736.94974	.000
	kontrol vaksin monovalen	25.4167	736.94974	1.000
vaksin monovalen	vaksin polivalen	904.9583	736.94974	.617
	kontrol vaksin polivalen	6623.4167 *	736.94974	.000
	kontrol vaksin monovalen	6648.8333 *	736.94974	.000

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1629284.767.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

MEASURE_1
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	3655.7830	7781.1337
	vaksin monovalen	-2967.6337	1157.7170
	kontrol vaksin monovalen	3681.1997	7806.5503
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-7781.1337	-3655.7830
	vaksin monovalen	-8686.0920	-4560.7413
	kontrol vaksin monovalen	-2037.2587	2088.0920
vaksin monovalen	vaksin polivalen	-1157.7170	2967.6337
	kontrol vaksin polivalen	4560.7413	8686.0920
	kontrol vaksin monovalen	4586.1580	8711.5087

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1629284.767.

Multiple Comparisons

MEASURE_1
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	-5743.8750 *	736.94974	.000
	kontrol vaksin polivalen	-25.4167	736.94974	1.000
	vaksin monovalen	-6648.8333 *	736.94974	.000

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1629284.767.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

MEASURE_1
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	-7806.5503	-3681.1997
	kontrol vaksin polivalen	-2088.0920	2037.2587
	vaksin monovalen	-8711.5087	-4586.1580

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1629284.767.

Homogeneous Subsets

MEASURE_1

Tukey HSD^{a,b,c}

vaksinasi	Subset		
	N	1	2
kontrol vaksin monovalen	6	1695.0833	
kontrol vaksin polivalen	6	1720.5000	
vaksin polivalen	6		7438.9583
vaksin monovalen	6		8343.9167
Sig.		1.000	.617

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1629284.767.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = .05.

Lanjutan lampiran 4

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
titer antibodi mg ke 2 * vaksinasi	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

ONEWAY tab_mg_2 BY perlakuan
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=DUKEY ALPHA(0.05).

Oneway

ANOVA

titer antibodi mg ke 2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.242E7	3	1.081E7	34.917	.000
Within Groups	6190785.500	20	309539.275		
Total	3.861E7	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 2
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	2210.50000 *	321.21606	.000
	vaksin monovalen	-209.66667	321.21606	.913

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 2
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	1311.4367	3109.5633
	vaksin monovalen	-1108.7299	689.3966

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 2
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
		vaksin polivalen	kontrol vaksin monovalen	2219.66667 *
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-2210.50000 *	321.21606	.000
	vaksin monovalen	-2420.16667 *	321.21606	.000
vaksin monovalen	kontrol vaksin monovalen	9.16667	321.21606	1.000
	vaksin polivalen	209.66667	321.21606	.913
	kontrol vaksin polivalen	2420.16667 *	321.21606	.000
kontrol vaksin monovalen	kontrol vaksin monovalen	2429.33333 *	321.21606	.000
	vaksin polivalen	-2219.66667 *	321.21606	.000
	kontrol vaksin polivalen	-9.16667	321.21606	1.000
	vaksin monovalen	-2429.33333 *	321.21606	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 2
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	kontrol vaksin monovalen	1320.6034	3118.7299
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-3109.5633	-1311.4367
	vaksin monovalen	-3319.2299	-1521.1034
	kontrol vaksin monovalen	-889.8966	908.2299
vaksin monovalen	vaksin polivalen	-689.3966	1108.7299
	kontrol vaksin polivalen	1521.1034	3319.2299
	kontrol vaksin monovalen	1530.2701	3328.3966
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	-3118.7299	-1320.6034
	kontrol vaksin polivalen	-908.2299	889.8966
	vaksin monovalen	-3328.3966	-1530.2701

Homogeneous Subsets

titer antibodi mg ke 2

Tukey HSD^a

vaksinasi	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol vaksin monovalen	6	1398.0000	
kontrol vaksin polivalen	6	1407.1667	
vaksin polivalen	6		3617.6667
vaksin monovalen	6		3827.3333
Sig.		1.000	.913

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lanjutan lampiran 4

Summarize**Case Processing Summary^a**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
titer antibodi mg ke 4 * vaksinasi	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

ONEWAY tab_mg_4 BY perlakuan
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).

Oneway**ANOVA**

titer antibodi mg ke 4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.869E8	3	1.290E8	87.463	.000
Within Groups	2.949E7	20	1474543.242		
Total	4.164E8	23			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**titer antibodi mg ke 4
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	6210.66667 *	701.08089	.000
	vaksin monovalen	-3063.00000 *	701.08089	.002

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 4
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	4248.3860	8172.9474
	vaksin monovalen	-5025.2807	-1100.7193

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 4
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
vaksin polivalen	kontrol vaksin monovalen	6191.50000 *	701.08089	.000
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-6210.66667 *	701.08089	.000
	vaksin monovalen	-9273.66667 *	701.08089	.000
	kontrol vaksin monovalen	-19.16667	701.08089	1.000
vaksin monovalen	vaksin polivalen	3063.00000 *	701.08089	.002
	kontrol vaksin polivalen	9273.66667 *	701.08089	.000
	kontrol vaksin monovalen	9254.50000 *	701.08089	.000
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	-6191.50000 *	701.08089	.000
	kontrol vaksin polivalen	19.16667	701.08089	1.000
	vaksin monovalen	-9254.50000 *	701.08089	.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 4
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	kontrol vaksin monovalen	4229.2193	8153.7807
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-8172.9474	-4248.3860
	vaksin monovalen	-11235.9474	-7311.3860
	kontrol vaksin monovalen	-1981.4474	1943.1140
vaksin monovalen	vaksin polivalen	1100.7193	5025.2807
	kontrol vaksin polivalen	7311.3860	11235.9474
	kontrol vaksin monovalen	7292.2193	11216.7807
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	-8153.7807	-4229.2193
	kontrol vaksin polivalen	-1943.1140	1981.4474
	vaksin monovalen	-11216.7807	-7292.2193

Homogeneous Subsets

titer antibodi mg ke 4

Tukey HSD^a

vaksinasi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol vaksin polivalen	6	1328.3333		
kontrol vaksin monovalen	6	1347.5000		
vaksin polivalen	6		7539.0000	
vaksin monovalen	6			10602.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lanjutan lampiran 4

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
titer antibodi mg ke 6 * vaksinasi	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

ONEWAY tab_mg_6 BY perlakuan
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).

Oneway

ANOVA

titer antibodi mg ke 6

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.328E9	3	4.421E8	20.001	.000
Within Groups	4.420E8	20	2.210E7		
Total	1.768E9	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 6
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	14207.50000 *	2714.28452
	vaksin monovalen	-1303.33333	2714.28452

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 6
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	Sig.
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	.000
	vaksin monovalen	.963

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 6
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	kontrol vaksin polivalen	6610.3908	21804.6092
	vaksin monovalen	-8900.4426	6293.7759

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 6
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error
		vaksin polivalen	kontrol vaksin monovalen
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-1.42075E4	2714.28452
	vaksin monovalen	-1.55108E4	2714.28452
	kontrol vaksin monovalen	-41.50000	2714.28452
vaksin monovalen	vaksin polivalen	1303.33333	2714.28452
	kontrol vaksin polivalen	15510.83333 *	2714.28452
	kontrol vaksin monovalen	15469.33333 *	2714.28452
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	-1.41660E4	2714.28452
	kontrol vaksin polivalen	41.50000	2714.28452
	vaksin monovalen	-1.54693E4	2714.28452

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 6
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	Sig.
vaksin polivalen	kontrol vaksin monovalen	.000
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	.000
	vaksin monovalen	.000
	kontrol vaksin monovalen	1.000
vaksin monovalen	vaksin polivalen	.963
	kontrol vaksin polivalen	.000
	kontrol vaksin monovalen	.000
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	.000
	kontrol vaksin polivalen	1.000
	vaksin monovalen	.000

Multiple Comparisons

titer antibodi mg ke 6
Tukey HSD

(I) vaksinasi	(J) vaksinasi	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
vaksin polivalen	kontrol vaksin monovalen	6568.8908	21763.1092
kontrol vaksin polivalen	vaksin polivalen	-21804.6092	-6610.3908
	vaksin monovalen	-23107.9426	-7913.7241
	kontrol vaksin monovalen	-7638.6092	7555.6092
vaksin monovalen	vaksin polivalen	-6293.7759	8900.4426
	kontrol vaksin polivalen	7913.7241	23107.9426
	kontrol vaksin monovalen	7872.2241	23066.4426
kontrol vaksin monovalen	vaksin polivalen	-21763.1092	-6568.8908
	kontrol vaksin polivalen	-7555.6092	7638.6092
	vaksin monovalen	-23066.4426	-7872.2241

Homogeneous Subsets

titer antibodi mg ke 6

Tukey HSD^a

vaksinasi	Subset for alpha = 0.05		
	N	1	2
kontrol vaksin polivalen	6	286.8333	
kontrol vaksin monovalen	6	328.3333	
vaksin polivalen	6		14494.3333
vaksin monovalen	6		15797.6667
Sig.		1.000	.963

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 5. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian



1. Keterangan : 1) Vortex, 2) Pipet, 3) Cawan Petri, 4) Microplet ELISA, 5) Gelas Ukur, 6) *Yellow Tip*, 7) *Becker Glass*, 8) *Tabung Eppendorf*, 9) Mikropipet

2.



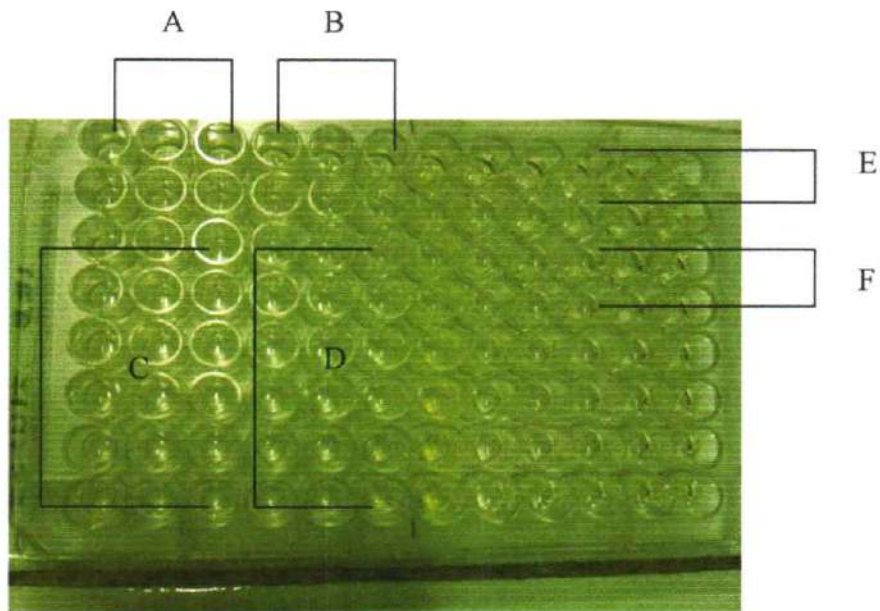
Keterangan : Spektrofotometer

3.



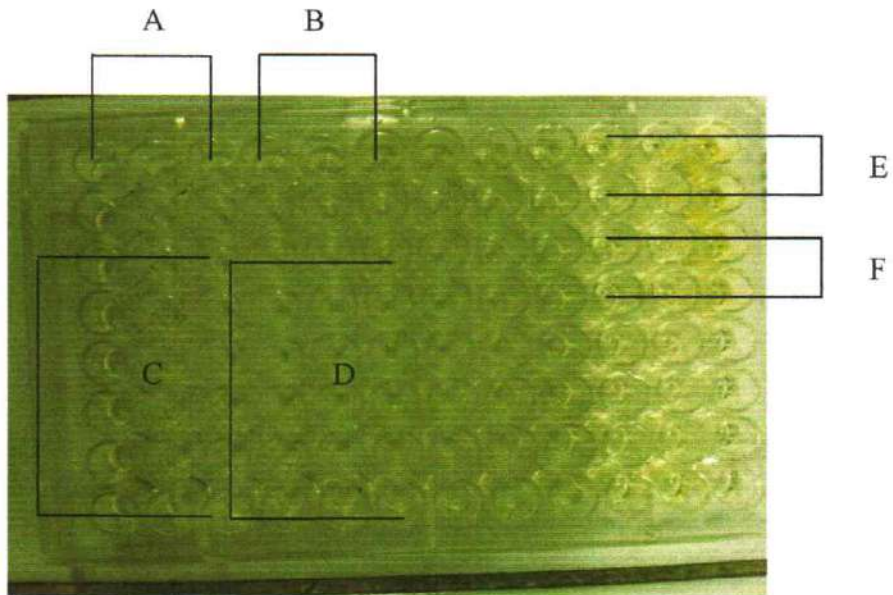
Keterangan : Stire

Lampiran 6. Interpretasi Hasil ELISA

(a) Hasil *indirect* ELISA minggu ke-0

Keterangan:

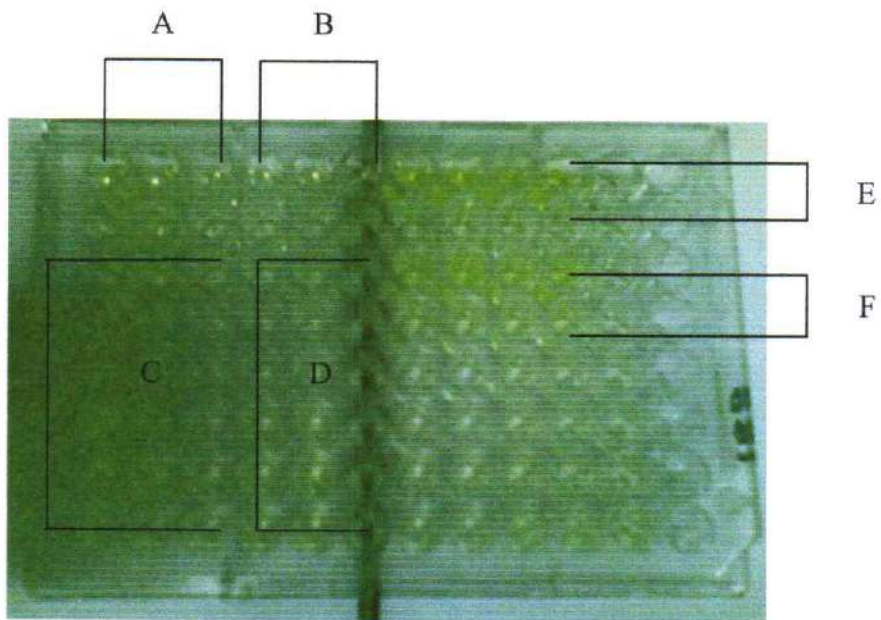
- A = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin monovalen IBD
- B = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin polivalen IBD-IB-ND
- C = Kontrol vaksin monovalen IBD
- D = Kontrol vaksin polivalen IBD-IB-ND
- E = Kontrol positif
- F = Kontrol negatif



(b) Hasil *indirect* ELISA pada minggu ke-2

Keterangan:

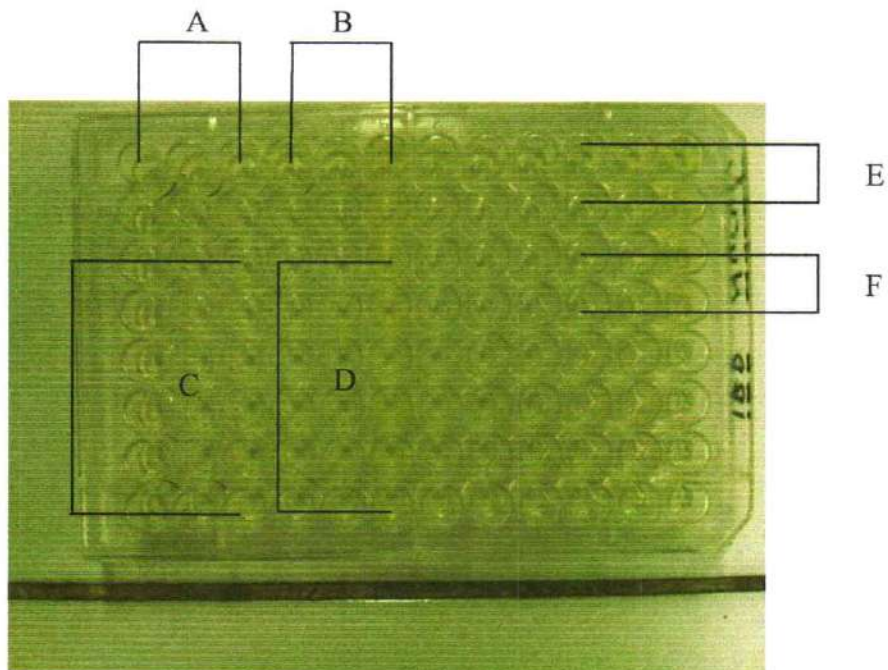
- A = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin monovalen IBD
- B = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin polivalen IBD-IB-ND
- C = Kontrol vaksin monovalen IBD
- D = Kontrol vaksin polivalen IBD-IB-ND
- E = Kontrol positif
- F = Kontrol negatif



(c) Hasil *indirect* ELISA pada minggu ke-4

Keterangan:

- A = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin monovalen IBD
- B = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin polivalen IBD-IB-ND
- C = Kontrol vaksin monovalen IBD
- D = Kontrol vaksin polivalen IBD-IB-ND
- E = Kontrol positif
- F = Kontrol negatif



(d) Hasil *indirect* ELISA pada minggu ke-6

Keterangan:

- A = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin monovalen IBD
- B = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin polivalen IBD-IB-ND
- C = Kontrol vaksin monovalen IBD
- D = Kontrol vaksin polivalen IBD-IB-ND
- E = Kontrol positif
- F = Kontrol negatif