

TESIS

**GAMBARAN HISTOPATOLOGI OTAK DAN PARU MENCIT YANG DI
VAKSINASI VIRUS AVIAN INFLUENZA *REVERSE GENETIC*
SETELAH UJI TANTANG**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh

KUNTI TIRTASARI
061142012

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2014**

**GAMBARAN HISTOPATOLOGI OTAK DAN PARU MENCIT
YANG DI VAKSINASI VIRUS AVIAN INFLUENZA *REVERSE*
GENETIC
SETELAH UJI TANTANG**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

**KUNTI TIRTASARI
NIM 061142012**

**PROGRAM STUDI ILMU PENYAKIT DAN
KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2014**

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
Tanggal 22 September 2014**

Oleh:

Pembimbing Ketua




**Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno Lastuti, M.S., drh
NIP. 195304181978032001**

Pembimbing

**Dr. Nenny Harijani M.Si., drh
NIP. 195806021988032001**

Mengetahui :

**Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga**



**Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.
NIP. 196208281989032001**

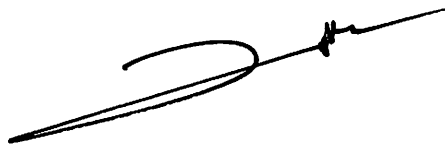
Laporan penelitian tesis ini telah diujikan Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan dinilai
Oleh panitia penguji pada

Pada Tanggal, 22 September 2014

Panitia Penguji

1. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., MS
2. Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc
3. Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes
4. Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno Lastuti, drh., MS
5. Dr. Nenny Harijani, drh., M.Si

Program Studi Magister
Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga Surabaya
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D.
NIP. 195312161978062001

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan Nama Allah yang Maha Pengasih dan Penyayang, segala puja dan puji syukur penulis panjatkan ke hadirat-Nya yang Maha Tinggi, serta shalawat dan salam saya haturkan kepada Baginda Rasulullah, keluarga dan sahabat-sahabatnya. Atas segala rahmat dan hidayah Allah SWT sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian tesis yang merupakan syarat kelulusan yang berjudul **GAMBARAN HISTOPATOLOGI OTAK DAN PARU MENCIT YANG DI VAKSINASI VIRUS AVIAN INFLUENZA *REVERSE GENETIC* SETELAH UJI TANTANG.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada kedua pembimbing sekaligus dosen pengajar selama menempuh pendidikan pasca sarjana yaitu Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno Lastuti, drh., MS dan Dr. Nenny Harijani, drh., M.Si atas bimbingan, dorongan dan saran yang telah diberikan sampai dengan selesainya penelitian ini. Semoga Allah SWT membalasnya dengan limpahan Rahmat.

Penulis menyampaikan dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati ucapan terima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., MS., Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc dan Dr. Hani Plumeriastuti, drh.,

M.Kes selaku dosen penguji penelitian yang dengan ikhlas meluangkan waktu serta dengan sabar menguji dan membimbing, memberikan masukan, serta motivasi yang tiada hentinya hingga selesainya penelitian tesis ini. Semoga Allah SWT membalasnya dengan limpahan Rahmat.

Ucapan terima kasih juga penulis haturkan kepada ketua *Avian Influenza Research Centre* (AIRC) Universitas Airlangga, Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., MS beserta seluruh tim kerja (Dr. Kadek Rachmawati, drh., M.Kes., Kuncoro Puguh, drh., M.Kes, dr. Emma M.Kes, Reviany V Nidom, Apt., M.Farm, Setyarina Indrasari drh., M.Vet, Elsa Bahar drh., M.S, Amalia drh., M.Vet, Alfian, Apt., M.Farm, Dr. Yusuf Alamudi., M.Kes, dan mas Surip) serta teman-teman sepenelitian yang telah memberikan segala bentuk bantuan sehingga membantu kelancaran penulis selama melaksanakan penelitian.

Terima kasih penulis sampaikan pula kepada ibu Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P., selaku dosen Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Terimakasih kepada bapak Djoko Legowo drh., M.Kes, Terimakasih kepada bapak Djoko Galijono drh., M.S, bapak Dr. Anwar Maruf drh., M.Kes, ibu Dr. Sri Pantja Madyawati drh., M.Si, bapak Prof.Dr. Pudji Srianto drh., M.Kes, ibu Retno Sri Wahyuni drh., M.S dan ibu Erma Safitri drh., M.Si atas dukungan, doa dan dorongan semangat

Terima kasih kepada Papa R. Hadi Kuntjoro dan Mama Maria Mudjiarti yang telah memberikan segalanya, baik bantuan doa, dorongan, semangat, bantuan materil serta spirituil. Terima kasih pada adik drh. Marga Restu, terima

kasih pada saudara-saudara, adik Yuse Iflaka Saadyah drh., M.Sc, adik dr. Pratika Sari Putri, adik Bimo Tiar ,Apt dan teh Versa Ratna Dewi S.Par. Terima kasih pada drh. Rahmen, drh. Reyna, drh. Pradita, drh. Agung dan drh. Cindy serta teman-teman FKH 2004 Universitas Airlangga, sahabat-sahabat alumni SMP Negeri 1 Surabaya dan SMA Negeri 2 Surabaya, seluruh staf karyawan FKH Universitas Airlangga serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu tetapi sudah membantu dalam penyusunan tesis ini, terimakasih banyak atas bantuan kalian. Semoga kita semua mendapat berkah dari Allah SWT.

Demikian, semoga penelitian ini dapat menjadi informasi yang berharga bagi dunia veteriner.

Surabaya, 22 September 2014

Penulis

RINGKASAN

Avian Influenza (AI) atau yang lebih dikenal dengan penyakit Flu Burung adalah penyakit menular pada unggas yang perlu diwaspadai hingga saat ini. Penyakit ini disebabkan oleh virus Influenza tipe A dari famili *Orthomyxoviridae*, merupakan salah satu penyebab penyakit *zoonosis* penting karena sifatnya sangat *patogen* berpotensi menyebabkan wabah penyakit parah pada burung dan manusia (Nidom *et al.*, 2012).

Virus influenza diklasifikasikan menjadi tiga yaitu influenza A, B dan C. Virus influenza A memiliki kemampuan untuk menginfeksi manusia, mamalia dan unggas, sedangkan virus influenza B dan C hanya menginfeksi pada manusia. Virus influenza A terdiri dari 16 sub tipe berdasarkan pada gen Haemagglutinin dan 9 sub tipe berdasarkan pada gen Neuraminidase.

Virus influenza A memiliki delapan fragmen yang akan menghasilkan sepuluh macam protein yaitu fragmen HA (Heamgglutinin), NA (Neuraminidase), PB1 (Polymerase Base-1), PB-2 (polymerase Base-2), PA (Polymerase Acidic), NP (Non-protein); M (matrix); NS (non struktural). Fragmen HA akan mengenali reseptor yang ada pada permukaan sel epitel saluran pernafasan yang terpapar virus flu burung sehingga virus flu burung dapat masuk ke dalam sel, bereplikasi, menyebar pada saluran pernafasan secara cepat dan menyebabkan kerusakan pada organ dan jaringan pada hospes *multiorgans failure* (Swayne, 2000).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat kerusakan otak dan paru mencit (*mus musculus*) yang divaksin dengan vaksin Flu burung H5N1 *reverse genetic* setelah ujiantang. Penelitian ini dibagi dalam lima kelompok Perlakuan dengan lima ekor mencit/perlakuan yang diinjeksikan vaksin *reverse genetic* secara *intra muscular* (IM) dengan konsentrasi 7µg HA pada empat kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif (K-) hanya diinjeksikan PBS steril. Pada hari ke-14 dilakukan *booster* dengan konsentrasi yang sama. Pengamatan dilakukan selama 21 hari dan pada hari ke-22 dilakukan *challenge test*

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan (P2) yang divaksin dengan vaksin *Avian Influenza Reverse Genetic low-high pathogenic* basis telur secara gambaran histopatologi otak maupun paru menunjukkan hasil yang lebih baik berdasarkan hasil nilai skoring dibandingkan dengan kelompok perlakuan (P1) yang divaksin dengan vaksin *Avian Influenza Reverse Genetic low-low pathogenic* basis telur, kelompok perlakuan (P3) yang divaksin dengan vaksin *Avian Influenza Reverse Genetic low-low pathogenic* basis sel, kelompok perlakuan (P4) yang divaksin dengan vaksin *Avian Influenza Reverse Genetic low-high pathogenic* basis sel. Kelompok P5 sebagai kontrol negatif memiliki perbedaan yang nyata dibandingkan dengan keempat perlakuan tersebut.

SUMMARY

The Histopathology of Brains and Lungs from Mice Which Had Been Vaccinated By Reverse Genetics of Avian Influenza Virus After Challenge Test.

Avian Influenza (AI), or is commonly known as H5N1, is an infectious disease detected in avian that needs to be alerted nowadays. The disease is caused by Influenza Virus type A from *Orthomyxoviridae* family. This type of virus can cause wide spectrum of *zoonotic* diseases because its character has a high proportion of pathogen that potentially brings severe disease outbreaks in birds and humans (Nidom *et al.*, 2012).

Influenza virus can be classified into three, namely influenza A, B and C. Influenza type A Virus has the ability to infect humans, mammals and avians. Different from Influenza Type B and C Virus that are only capable of infecting humans. Influenza type A Virus is divided into subtypes based on two proteins on the surface of the virus in which there are 16 different Hemagglutinin (HA) and 9 Neuraminidase (NA).

Influenza type A Virus has eight fragments that will produce ten kinds of protein; they are Fragmen HA (Heamgglutinin), NA (Neuraminidase), PB1 (Polymerase Base-1), PB-2 (polymerase Base-2), PA (Polymerase Acidic), NP (Non-protein); M (matrix); NS (non-structural). Fragmen HA will recognize receptor on the surface of the epithelial cells of the respiratory tract that is exposed to avian influenza, therefore it can get into the cell, replicate, spread on

respiratory tract quickly, and cause damage to the organs and tissues at hospes *multiorgans failure* (Swayne., 2000).

The aim of present study was to find out the level of brain damage and pulmonary (*mus musculus*) which had been vaccinated by the reverse genetic of H5N1 Avian Influenza after challenge test. This research was divided into five groups of treatment to five mice or treatments which were injected by the *reverse genetic* vaccine thoroughly the *intra muscular* (IM) with 7µg HA concentration on four groups treatment. The group of negative control (K-) only injected the sterile PBS. On day 14th, the booster has been done by the same concentration. The observation was conducted in 21 days and on day 22nd the virus infection was done.

Based on histopathology description of the brains and lungs, the treatment group (P2), which was vaccinated with the egg based *low-high pathogenic Reverse Genetic Vaccine of Avian Influenza*, showed a better result compared with both the treatment group which was vaccinated with the egg based (P1) and cell based (P3) *low-low pathogenic Reverse Genetic Vaccine of Avian Influenza*, and treatment group (P4), which was vaccinated with the *low-high pathogenic Reverse Genetic Cell Base Vaccine of Avian Influenza*. In addition, the treatment group (P5) as the negative control showed a significant difference compared with the other four treatments.

The Histopathology of Brains and Lungs from Mice Which Had Been Vaccinated By Reverse Genetics of Avian Influenza Virus After Challenge Test.

Kunti Tirtasari

ABSTRACT

Avian Influenza can cause wide spectrum of *zoonotic* diseases because its character has a high proportion of pathogen that potentially brings severe disease outbreaks in birds and humans. Avian influenza virus can get into the cell, replicate, spread on respiratory tract quickly, and cause damage to the organs and tissues at hospes *multiorgans failure*. The aim of present study was to find out the level of brain damage and pulmonary (*mus musculus*) which had been vaccinated by the reverse genetic of H5N1 Avian Influenza after challenge test based on histopathology description. The result showed that group (P2), which was vaccinated with the egg based *low-high pathogenic Reverse Genetic Vaccine of Avian Influenza*, showed a better result compared with group (P4) which was vaccinated with the cell based from the same vaccine and group which was vaccinated with the *low-low pathogenic Reverse Genetic Vaccine of Avian Influenza* from egg based (P1) and cell based (P3). H5N1 virus derived from avian which can adapt well to the egg medium. It is related to the receptor of host origin adapted to the virus.

Keywords : Histopathology, Brains and lungs, RG vaccine of H5N1

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	iii
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	x
ABSTRACT.....	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.3.1. Tujuan umum	7
1.3.2. Tujuan khusus	7
1.4. Manfaat Penelitian	7
1.4.1. Manfaat teoritis	7
1.4.2. Manfaat praktis	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Mencit (<i>Mus musculus</i>)	8
2.2. Virus <i>Avian Influenza</i>	9
2.3. Virus <i>Avian Influenza</i> yang ada di Indonesia	10
2.4. Transkripsi dan Replikasi Virus Influenza	11
2.5. Vaksin	14
2.6. Jenis Vaksin	14
2.6.1. Vaksin Rekombinan	15
2.7. Respon Imun Terhadap Virus Flu Burung	15
2.8. Vaksin Influenza Konvensional	16
2.9. Pengembangan Vaksin Influenza <i>Reverse Genetic</i>	17
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN	19
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	21

BAB 4 MATERI DAN METODE	22
4.1. Jenis Penelitian	22
4.2. Materi Penelitian	22
4.2.1. Alat dan Bahan Penelitian	22
4.3. Variabel Penelitian	23
4.3.1. Variabel Bebas	23
4.3.2. Variabel Tergantung	23
4.3.3. Variabel Kendali	23
4.3.4. Definisi Operasional Variabel	24
4.4. Populasi dan Besar Sampel	24
4.4.1. Populasi	24
4.4.2. Besar sampel	25
4.5. Metode dan Prosedur Penelitian	25
4.5.1. Vaksinasi Pada Mencit	25
4.5.2. Infeksi Virus Pada Mencit (<i>Challenge Test</i>)	26
4.5.3. Penanganan Sampel di Laboratorium	26
4.5.3.1. Preparasi Organ	26
4.5.3.1.1. Preparasi Jaringan	27
4.5.3.1.2. Pewarnaan Histopatologi Paru dan Otak Mencit dengan Hematoxilin-Eosin	28
4.6.3.2. Pemeriksaan Histopatologik	29
4.6. Kerangka operasional	30
4.7. Pengolahan Data	31
4.8. Penanganan Limbah Infeksius.....	31
BAB 5 HASIL PENELITIAN	
5.1. Otak.....	32
5.1.1. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Histopatologis Otak Mencit...	32
5.2. Paru.....	35
5.2.1 Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Histopatologis Paru-paru Mencit	36
BAB 6 PEMBAHASAN	38
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	43
7.1. Kesimpulan	43
7.2. Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Mencit (<i>Mus musculus</i>)	8
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	21
4.3 Kerangka Operasional Penelitian	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Metode Skoring pada Otak.....	49
Lampiran 2. Metode Skoring pada Paru.....	50
Lampiran 3. Skor Perubahan Histopatologi pada Otak.....	52
Lampiran 4. Skor Perubahan Histopatologi pada Paru.....	53
Lampiran 5. Uji Kruskal Wallis dan Mann Whitney.....	54
Lampiran 6. Animal welfare.....	55

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ABSL3	: <i>Animal Biosafety Level 3</i>
AI	: <i>Avian Influenza</i>
AIRC	: <i>Avian Influenza Research Centre</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BCG	: <i>Bacillus Calmette Guerin</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
CD4 ⁺	: <i>Cluster of Differentiation 4⁺</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleatic Acid</i>
HA	: <i>Hemagglutinin</i>
HI	: <i>Haemagglutination Inhibition</i>
HPAI	: <i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i>
Ig	: <i>Imunoglobulin</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IF	: <i>Interferon</i>
LPAI	: <i>Low Pathogenic Avian Influenza</i>
M	: <i>Matriks</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NA	: <i>Neuraminidase</i>
NP	: <i>Nucleoprotein</i>
NS	: <i>Non Structural</i>
M	: <i>Matrix</i>
OIE	: <i>Office International des Epizooties</i>
PA	: <i>Polymerase Acidic</i>
PB	: <i>Polymerase Basic</i>
PBS	: <i>Phospat Buffer Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RNP	: <i>Ribonukleoprotein</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
Th	: <i>T helper</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
α	: <i>Alfa</i>
μg	: <i>Mikrogram</i>
μl	: <i>Mikroliter</i>

BAB 1
PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Avian Influenza (AI) atau yang lebih dikenal dengan penyakit Flu Burung adalah penyakit menular pada unggas yang perlu diwaspadai hingga saat ini. Penyakit ini disebabkan oleh virus Influenza tipe A dari famili *Orthomyxoviridae*, merupakan salah satu penyebab penyakit *zoonosis* penting karena sifatnya sangat *patogen* berpotensi menyebabkan wabah penyakit parah pada burung dan manusia (Nidom *et al.*, 2012).

Virus influenza diklasifikasikan menjadi tiga yaitu influenza A, B dan C. Virus influenza A memiliki kemampuan untuk menginfeksi manusia, mamalia dan unggas, sedangkan virus influenza B dan C hanya menginfeksi pada manusia. Virus influenza A terdiri dari 16 sub tipe berdasarkan pada gen Haemagglutinin dan 9 sub tipe berdasarkan pada gen Neuraminidase. Virus *Influenza A* mudah bermutasi terutama pada gen HA dan NA yang disebabkan karena virus ini mampu mengubah diri melalui proses *antigenic drift* dan *antigenic shift* (Raharjo dan Nidom, 2004)

Virus influenza A memiliki delapan fragmen yang akan menghasilkan sepuluh macam protein yaitu fragmen HA (Heamgglutinin), NA (Neuraminidase), PB1 (Polymerase Base-1), PB-2 (polymerase Base-2), PA (Polymerase Acidic), NP (Non-protein); M (matrix); NS (non struktural). Fragmen HA akan mengenali reseptor yang ada pada permukaan sel epitel saluran pernafasan yang terpapar virus flu burung sehingga virus flu burung

dapat masuk ke dalam sel, bereplikasi, menyebar pada saluran pernafasan secara cepat dan menyebabkan kerusakan pada organ dan jaringan pada hospes *multiorgans failure* (Swayne, 2000).

Virus *Avian Influenza* (AI) subtype H5N1 merupakan virus yang *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan pertama kali ditemukan pada angsa di provinsi Guangdong, Cina tahun 1996. Pada tahun 1997, virus H5N1 menyebabkan *outbreaks* pada ayam di Hong Kong dan menular secara langsung dari unggas ke manusia. Gen HA virus tersebut berasal dari *A/goose/Guangdong/1/96* (H5N1) dan tujuh gen lain berasal dari virus unggas lainnya (Neumann *et al.*, 2010).

Infeksi HPAI H5N1 pada unggas telah menjadi ancaman untuk mamalia termasuk manusia. Infeksi alami virus *influenza* A H5N1 telah dilaporkan pada beberapa spesies mamalia meliputi kucing domestik, harimau dan macan tutul, anjing dan babi yang sampai saat ini virus H5N1 telah berkembang dan masih bersirkulasi di Indonesia, maka dari itu penelitian ini menggunakan hewan coba mencit sebagai mamalia terhadap efektivitas vaksin avian influenza. Adanya kemiripan antara virus yang diisolasi dapat diartikan bahwa virus ini dapat menyebar melalui transportasi ayam terinfeksi atau melalui migrasi burung liar (Nidom *et al.*, 2012). Wabah pertama virus *influenza* H5N1 di Indonesia dilaporkan pada November 2003 dan sampai saat ini telah menyebar di 32 dari 34 provinsi (Nidom *et al.*, 2010; OIE, 2011).

Program vaksinasi dilakukan ketika program *stamping out* untuk mencegah penyebaran virus flu burung tidak efektif. Vaksin juga digunakan untuk mencegah terjadinya gejala klinis dan kematian pada unggas, menjaga stabilitas perekonomian dan keamanan pangan. Program vaksinasi harus diikuti dengan biosekuriti, karantina, surveilan dan diagnostik, edukasi dan eliminasi infeksi flu burung pada peternakan. Vaksin flu burung jika digunakan dengan tepat dapat mencegah penyakit dan kematian, meningkatkan kekebalan terhadap infeksi, mereduksi penyebaran virus di lingkungan dan replikasi. Kegagalan vaksinasi pada Negara yang menggunakan program vaksinasi dalam mencegah penyebaran dan infeksi virus flu burung disebabkan vaksin yang tidak cukup kuat di dalam memberikan *coverage* pada spesies target. Vaksin yang gagal di dalam memberikan perlindungan atau daya proteksi akan menyebabkan *antigenic drift* pada virus flu burung seperti yang terjadi pada China, Mesir, Indonesia, Hong Kong, dan Vietnam (Swayne,2006).

Gambaran histopatologi pada paru dan otak sangat penting karena kematian manusia dan hewan akibat gangguan respirasi dan gangguan pada otak. Menurut WHO 2012, menyatakan bahwa standar keamanan vaksinasi, antigen yang digunakan sebagai isolate vaksin tidak akan terdapat di otak dan paru. Keberhasilan suatu program vaksinasi salah satunya sangat tergantung pada isolat virus dan teknologi yang digunakan untuk konstruksi dan memproduksi seed vaksin yang berhubungan dengan respon imun sehingga tidak terjadi patologi pada organ hospes. Pada saat ini data tentang gambaran

histopatologi mengenai infeksi H5N1 pada hewan coba yang divaksinasi sangat minim untuk menjelaskan pathogenesis *Avian Influenza* (AI) subtype H5N1, sedangkan gambaran histopat tersebut sebagai indikatornya, maka sangatlah penting penelitian ini mengamati perubahan histopatologi organ targetnya yaitu otak dan paru mencit.

Sejak pelaksanaan program vaksinasi pada berbagai sektor peternakan yang telah diterapkan pemerintah untuk menanggulangi wabah virus AI H5N1 masih juga didapatkan kasus penyakit *Avian Influenza* (AI) pada unggas dan mamalia, maka mulai dipikirkan tentang perkembangan pembuatan vaksin untuk menanggulangi *pandemic influenza*. Vaksin yang telah dikembangkan untuk mengantisipasi terjadinya *pandemic influenza* adalah subunit vaksin, DNA vaksin dan rekombinan vaksin, namun dari beberapa perkembangan vaksin tersebut belum dijelaskan mengenai daya protektifitasnya. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa vaksin *Avian Influenza* (AI) sub virion inaktif dalam menginduksi antibodi masih rendah setelah diuji dengan *hemagglutination-inhibition* (HI) dan *microneutralization* (MN) (Treanor *et al*, 2006). Hal tersebut menyatakan bahwa vaksin yang sub virion tidak dapat memproteksi apabila terjadi *pandemic influenza*. Tingkat protektifitas suatu vaksin salah satunya tergantung antigen yang digunakan dalam isolat virus dalam menginduksi antibodi. Konstruksi vaksin yang ideal akan menginduksi terbentuknya antibodi baik secara *innate* dan *adaptive immunity*.

Perubahan patologik pada paru akibat infeksi Avian Influenza subtipe H5N1 menyebabkan kematian sekitar 250.000 sampai 500.000 dari 5 juta yang terinfeksi dengan gangguan penyakit pernapasan (WHO, 2009). Gangguan pernapasan terjadi akibat adanya perubahan patologik pada sel alveolar paru. Sel epitel alveolar paru akan mengalami apoptosis dengan hipertropi disertai infiltrasi sel leukosit. Pada pemeriksaan lebih lanjut didapatkan peningkatan TNF- α yang diduga sebagai trigger apoptosis sel paru (Uprasertkul *et al*, 2007). Data terbaru pada kasus *influenza A* subtipe H5N1 pada manusia di Indonesia dilaporkan telah terjadi kasus 195 orang terinfeksi dan yang meninggal dunia sebanyak 163 orang (WHO, 2014). Kematian tersebut tidak hanya disebabkan oleh perubahan patologik pada paru tetapi dicurigai juga pada sel otak. Infeksi pada tikus menunjukkan bahwa virus H5N1 dapat masuk ke otak dan menyebabkan kerusakan yang menyerupai parkinson pada manusia, yang mengakibatkan kehilangan sel-sel otak hingga menyebabkan gangguan motorik, daya ingat dan fungsi hati dan fungsi intelektual (Smeyne, 2009).

Universitas Airlangga, melalui Avian Influenza Research Center (AIRC-UA) pada tahun 2011 telah menghasilkan *seed virus* dengan menggunakan teknologi *reverse genetic* sebagai vaksin flu burung untuk manusia. Isolat yang digunakan adalah reassortants antara *strain wild-type* dan yang telah dilemahkan, yaitu *strain low-growth human A/PR/8/34*. Vaksin Flu Burung dengan konstruksi *low-low dan low-high pathogenic* tersebut akan diamati sampai seberapa jauh dapat menghambat atau memproteksi infeksi virus Flu

Burung. Metode *Reverse Genetic* merupakan metode yang menggabungkan enam segmen gen single strand RNA (NP, M, NS, PB1, PB2 dan PA) dari *high-growth human* dengan segmen HA dan NA *strain wild type*. Vaksin *low-low reverse genetic* berasal dari segmen gen protein HA dan NA dari virus *low* patogen, sedangkan vaksin *low-high* berasal dari segmen gen protein HA dari virus *low* patogen dan NA dari virus *high* patogen (Smith, 2007)

Penelitian ini dilakukan pada hewan coba mencit (*Mus musculus*), untuk mengetahui tingkat kerusakan pada otak dan paru mencit yang divaksin dan yang tidak divaksin, yang kemudian diuji tantang dengan virus Flu Burung yang telah menginfeksi manusia. Analisis dilakukan dengan melakukan pengamatan gambaran histopatologis pada otak dan paru hewan coba yang ditantang dengan virus avian influenza. Teknologi *reverse genetic* memiliki beberapa keuntungan apabila digunakan di dalam produksi vaksin. Keuntungan tersebut adalah *seed vaccine* yang dihasilkan dari teknologi *reverse genetic* mampu menghasilkan titer virus yang optimal untuk produksi vaksin secara cepat, mampu mengeliminasi kontaminasi dari berbagai agen patogen yang lain seperti virus-virus pada saluran pernafasan dan komponen yang tidak diketahui dari sel yang digunakan untuk mengisolasi virus H5N1 (Lipatov, *et al.*, 2005).

1.2 Perumusan Masalah

Bagaimanakah gambaran histopatologi otak dan paru mencit (*mus musculus*) yang divaksin dengan vaksin Flu burung H5N1 *Reverse Genetic* setelah uji tantang?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk memperoleh data ilmiah mengenai efektivitas vaksin flu burung H5N1 *reverse genetic* dengan yang diujikan secara *in vivo* pada hewan coba mencit

1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk mengetahui tingkat kerusakan otak dan paru mencit (*mus musculus*) yang divaksin dengan vaksin Flu burung H5N1 *reverse genetic* setelah ujiantang.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan tentang kemampuan vaksin *Avian Influenza subtype H5N1 reverse genetic* pada mencit ketika diujiantang dengan virus tersebut sehingga dapat dijadikan dasar untuk penelitian vaksin *Avian Influenza* pada mamalia.

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi kepada produsen dan pengguna vaksin tentang keefektifan vaksin Virus *Avian Influenza* yang diujikan pada mamalia berdasarkan kerusakan yang terjadi pada organ otak dan paru.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mencit (*Mus Musculus*)

Mencit yang memiliki nama latin *Mus Musculus* adalah anggota dari *Muridae*. Taksonomi mencit adalah seperti di bawah ini :

Kerajaan : Animalia
 Filum : Chordata
 Kelas : Mammalia
 Ordo : Rodentia
 Famili : Muridae
 Upafamil : Murinae
 Genus : *Mus*
 Spesies : *Mus musculus*
 (Sumber : IUCN ,2007)

Hewan ini diduga sebagai mamalia terbanyak kedua di dunia, setelah manusia. Mencit sangat mudah menyesuaikan diri dengan perubahan yang dibuat manusia, bahkan jumlahnya yang hidup liar di hutan barangkali lebih sedikit daripada yang tinggal di perkotaan. Mencit adalah binatang asli Asia, India, dan Eropa Barat. Jenis ini sekarang ditemukan di seluruh dunia karena pengenalan oleh manusia. Mencit peliharaan memiliki periode kegiatan selama siang dan malam.



Gambar. 2.1. Mencit (*Mus Musculus*). (AIRC, 2014)

Mencit memiliki masa hidup atau umur antara 1.5 – 3 tahun dengan berat rata-rata dewasa 25 - 40 g, rata-rata suhu normal pada mencit adalah 33 - 34° C. Bagian perut dibagi menjadi bagian nonglandular proksimal dan bagian distal kelenjar. Kedua bagian yang terlalu berbeda. Ini mirip dengan perut kuda. Paru kiri terdiri dari satu lobus, sedangkan paru kanan terdiri dari empat lobus. *Bedding* harus dilakukan dua kali seminggu dengan pemberian alas gergaji kayu agar penyerapan urin baik. Mencit harus diberi makan pelet komersial tikus atau hewan pengerat. Makanan asupan sekitar 20g/100g BB/hari; asupan air sekitar 15 ml/100g BB / hari. (*IUCN Red List of Threatened Species*.2007)

2.2 Virus Avian Influenza

Virus *Avian Influenza* atau Flu Burung diklasifikasikan dalam *genus Influenza A*, Famili *Orthomyxoviridae*, subtipe nya diidentifikasi berdasarkan sifat antigenik dari glikoproteinnya, terdiri dari 16 hemagglutinin (HA) dan 9 neuraminidase (NA) (Fouchier *et al.*, 2005). Virus *Avian Influenza* merupakan virus RNA yang *single stranded*. Genomnya terdiri dari 8 segmen yang mengkode 10 protein. Diameter virus sekitar 80 X 120 nm. Karakteristik virus ini berkapsul yang mengandung glikoprotein dan merupakan antigen permukaan (Kumala, 2005). Menurut Fouchier dkk Virus *influenza A* banyak diisolasi dari spesies hewan, seperti babi, kuda, mamalia laut dan berbagai burung domestik dan liar serta manusia (Murphy dan Webster,1996). Virus *influenza* tipe A cepat bermutasi karena antigennya bersifat *drift* dan *shift*. perubahan mayor pada protein HA maupun Na melalui *genetic reassortment* (Kumala, 2005). Demikian juga yang

dinyatakan oleh Nidom (2008) bahwa Virus RNA, tidak seperti virus DNA, menunjukkan kecenderungan mudah terjadi mutasi. Mutasi yang terjadi dalam virus Influenza ada dua macam : antigenik *drift* dan antigenik *shift*. Antigenik *drift* disebabkan karena terjadi mutasi secara acak (random), kebanyakan mutasi titik, sementara itu antigenik *shift* kejadiannya 99,9%.

Berdasarkan patogenitasnya *Avian Influenza* dibedakan atas *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Virus *Avian Influenza* yang patogen (HPAI) merupakan penyakit menular pada unggas dan mengakibatkan kematian tinggi yang disebabkan oleh *subtype* H5 dan H7 dari *type* A. Namun sebagian besar *strain* virus *Avian Influenza* adalah patogenik ringan yang menyebabkan infeksi subklinis ringan atau penyakit pernafasan / reproduksi pada species burung peliharaan dan burung liar. Pada OIE, *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) termasuk dalam penyakit daftar A (*list A disease*), sedangkan virus *Avian Influenza* yang patogenitasnya ringan termasuk dalam penyakit daftar B (*list B disease*). Pada tahun 1955, sejumlah 18 wabah penyakit *Avian Influenza* pada unggas teridentifikasi virus *Avian Influenza* HPAI sebagai penyebabnya telah didokumentasikan (Swayne dan Suarez, 2000).

2.3 Virus *Avian Influenza* yang ada di Indonesia

Agen penyebab wabah penyakit unggas di Indonesia adalah virus *Avian Influenza subtype* H5 berdasarkan uji serologi, isolasi dan karakterisasi virus menggunakan antisera referen *swine influenza* dan dengan pemeriksaan mikroskop elektron. Berdasarkan hasil karakterisasi dengan menggunakan

antisera referen H1 hingga H15 menunjukkan bahwa kemungkinan besar *subtype* virus *Avian Influenza* tersebut adalah H5N1 (Wiyono dkk, 2004). Deteksi eksistensi gen H5 dan H7 dalam genom virus *Avian Influenza* yang menggunakan RT-PCR hasilnya diindikasikan bahwa adanya wabah AI pada unggas di Indonesia disebabkan oleh virus *Avian Influenza subtype* H5 (Asmara dkk, 2005).

2.4 Transkripsi dan Replikasi Virus Influenza

Viral RNA (vRNA) berfungsi sebagai template untuk sintesis (*messenger RNA*) mRNA dan *capped RNA* (cRNA), namun untuk inisiasi sintesis cRNA terjadi tanpa primer cap dan molekul cRNA dikopi dari *full-length* vRNA. *Negative sense-RNA* virus kemudian akan ditranskripsi menjadi *positive-sense m-RNA* oleh kompleks RNA polimerase di dalam inti sel. Virus juga menggunakan protein milik inang untuk inisiasi sintesis mRNA yaitu RNA polimerase II yang selanjutnya mRNA memerlukan *primer 5 capped* yang dicuri dari mRNA sel inang (Swayne, 2008). Proses ini dikenal dengan nama *cap snatching* yang melibatkan fungsi pengikatan cap oleh protein PB2 dan fungsi enoduklease dari protein PB1 (Knipe, 2007).

Positive-sense mRNA virus kemudian bermigrasi dari inti sel ke sitoplasma untuk memulai translasi protein di dalam sitoplasma dengan memakai mesin milik sel inang. Selain itu *positive-sense* RNA juga berfungsi sebagai *template* untuk menghasilkan *negative-sense* RNA virus baru yang akan dikemas menjadi virion (Swayne, 2008). Protein viral M1 dan NEP sangat penting untuk perjalanan virus

dari dan ke dalam nukleus. Protein M1 juga berperan di dalam perakitan serta struktur virion.

Setelah sintesis protein di dalam ribosom selesai, maka ketiga protein integral yang terbentuk yaitu HA, NA dan M2 akan masuk kedalam retikulum endoplasmik (ER) tempat proses *folding* dan glikosolasi protein (kecuali protein M2 tidak mengalami glikosilasi) serta tempat perakitan protein dimana protein HA akan dirakit sebagai trimer sedangkan protein NA dan M2 sebagai tetramer. Selanjutnya protein tersebut ditransport ke dalam Golgi aparatus dimana residu sistein pada protein HA dan M2 mengalami proses palmitoilasi di dalam *cis-Golgi network*. Untuk virus influenza yang memiliki *multibasic amino acid* pada regio *cleavage site* dari gen HA (khususnya untuk subtype H5 dan H7) maka proses pembelahan oleh furin pada gen HA menjadi subunit HA1 dan HA 2 terjadi di dalam *trans-Golgi network*. Dari Golgi aparatus selanjutnya ketiga protein integral tersebut akan bergerak ke tempat perakitan virus pada bagian apikal membran plasma (Knipe, 2007).

Protein virus baru yang merupakan hasil translasi dari mRNA bersama dengan RNA virus replikasi dari template negative-sense RNA virus baru dikemas menjadi kapsid dengan bantuan protein NP. Setelah kapsid terbentuk dan memperoleh protein matriks baru maka kemudian kapsid akan ditranspot ke tempat di mana komponen envelope virus (HA dan NA) yang berasal dari bagian permukaan membran sel akan masuk menjadi bagian dari kapsid membentuk virion baru (Webster, 1992; Brown, 2000).

Setelah replikasi virus berjalan maka kompleks RNP baru yang terbentuk akan dirakit sehingga RNP tersebut harus dikeluarkan dari intisel ke sitoplasma. Dua protein virus yaitu protein matriks (M1) dan *nuclear export protein* (NEP/NS2) terlibat dalam peristiwa keluarnya RNP ke sitoplasma. Proses perakitan serta *packaging* semua segment genom RNA virus diperlukan untuk membentuk virion yang infeksius (Van Reeth, 2007).

Selanjutnya virion baru tersebut akan keluar dari sel host melalui proses budding. Proses *budding* yang efektif memerlukan aktivitas enzimatik dari protein NA untuk mengeluarkan asam sialat dari glikoprotein permukaan khususnya protein HA. Hal ini bertujuan untuk mencegah pengikatan (*self-binding*) oleh protein serta agregasi virus pada permukaan sel (Swayne, 2008). Hal ini nampaknya memiliki peranan penting pada patogenesis serta *tissue tropism* virus karena virus yang *budding* dari permukaan dalam sel cenderung menyebabkan penyakit sistemik, sedangkan virus influenza yang *budding* dari permukaan eksternal sel pada umumnya memiliki *tissue tropism* yang terbatas (Knipe, 2007). Pada penelitian eksperimental juga diperoleh bahwa penurunan aktivitas sialidase dari NA akan menyebabkan agregasi virus pada permukaan sel karena partikel virus saling melekat satu sama lain sehingga berdampak pada penurunan titer virus (Cross et al., 2001). Berkaitan dengan hal ini maka protein HA dan NA mengenali molekul yang sama yaitu asam sialat tetapi memiliki efek berlawanan (pengikatan reseptor dengan perusakan reseptor) sehingga harus ada keseimbangan antara fungsi HA dan NA pada saat infeksi virus influenza ke sel inang (Whittaker, 2001).

2.5 Vaksin

Vaksin merupakan sediaan biologis yang dapat meningkatkan sistem imun terhadap suatu penyakit. Vaksin mempunyai sesuatu yang khas dibanding sediaan yang lain, yaitu berisi suatu agen yang menyerupai mikroorganisme yang menyebabkan penyakit dan terbuat dari mikroorganisme yang dilemahkan atau dalam keadaan mati dengan toksin atau beberapa protein permukaannya. Agen yang dimasukkan dalam tubuh manusia akan menstimulasi sistem imun, mengenali agen sebagai benda asing, menghancurkan dan mengingatnya lagi sehingga sistem imun akan lebih mudah mengenali dan menghancurkan mikroorganisme mirip agen yang akan menyerang berikutnya. Vaksin bisa sebagai profilaksis, yaitu pencegahan terhadap infeksi yang diakibatkan oleh lingkungan. Istilah vaksin atau vaccine berasal dari Edward Jenners tahun 1777 yang menggunakan anak sapi yang diinfeksi smallpox (cacar), dimana berasal dari bahasa latin variola vaccinia yang diadaptasi dari vaccine-us yang berarti sapi. Antibodi dari sapi tersebut diinokulasikan pada manusia untuk memberikan proteksi terhadap smallpox (Riedel, 2005).

2.6 Jenis Vaksin

Vaksin dibagi menjadi dua, yaitu vaksin konvensional dan vaksin modern. Yang termasuk dalam vaksin tradisional antara lain vaksin *inactivated*, vaksin *live attenuated*, vaksin toxoid dan vaksin sub unit. Vaksin modern dibagi menjadi vaksin konjugat, vaksin rekombinan dan vaksin DNA. Vaksin yang diproduksi harus memenuhi persyaratan vaksin yang ideal, antara lain: aman, memberikan

imunitas yang lama, dapat menginduksi imunitas selular dan humoral, tidak menginduksi autoimun atau hipersensitivitas, produksinya tidak terlalu mahal, mudah dalam penyimpanan dan aplikasi ke pasien. (Rao, 2006).

2.6.1 Vaksin Rekombinan

Vaksin rekombinan diproduksi menggunakan teknologi DNA rekombinan atau teknik genetik. Vaksin rekombinan menggunakan gen virus yang diinginkan dan dimasukkan dalam sebuah vektor, kemudian vektor tersebut diekspresikan dalam sel prokariot atau eukariot seperti bakteri *escherichia coli*, mutant *Salmonella* spp dan BCG, sehingga memungkinkan produksi protein virus dalam jumlah besar. Penggunaan virus sebagai vektor untuk membawa gen sebagai antigen pelindung dari virus lainnya dengan stimulasi antibodi. Beberapa vaksin rekombinan lain dibuat dengan sistem mutasi, yaitu dengan menghilangkan bagian dari DNA yang dapat menyebabkan penurunan patogenitas, sehingga menghasilkan vaksin live attenuated, dapat juga dibuat dengan menggabungkan (*reassortment*) antara genom strain yang virulen dan tidak virulen (vaksin *reverse genetic*). (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2011)

2.7 Respon Imun Terhadap Virus Flu Burung

Respon terhadap virus influenza sangat kompleks dan meliputi respon humoral dan seluler, antibodi secara spesifik yang disekresikan memiliki korelasi dengan daya proteksi terhadap infeksi. Respon imun seluler memiliki peranan yang penting dalam proses pemulihan kembali dari infeksi. Memori sel T (CD8+)

dapat melindungi infeksi virus influenza yang berbeda subtipe. Selain itu, sel T memory mampu menginduksi respon imun terhadap virus influenza musiman dan virus flu burung (H5N1). Pada hewan coba mencit, ferret dan maccaca secara umum virus H5N1 menunjukkan peningkatan virulensi, replikasi virus dan anomali pada respon imun yang ditimbulkan oleh hospes. Mencit yang terinfeksi oleh H5N1 memicu timbulnya respon sitokin dan chemokin yaitu IL-1b, IFN-g, tumor necrosis factor (TNF)-a, macrophage inflammatory protein (MIP)-1a, IL-6 dan MIP-2, *monocyte chemotactic protein-1*, KC protein (IL-8), IL-1a. Respon imun tersebut muncul pada hari ke-3 sampai dengan 5 pasca infeksi dan memiliki hubungan dengan ekspresi makrofag dan neutrofil pada paru yang menyebabkan inflamasi pada paru-paru (Peiris,*et al.*, 2009).

2.8 Vaksin Influenza konvensional

Vaksin influenza konvensional terdiri dari vaksin inaktif (homolog dan heterolog) dan vaksin dengan menggunakan virus influenza yang dilemahkan atau yang dikenal dengan *live attenuated vaccine* (Ellebedy dan Webby, 2009). Kedua jenis vaksin memiliki keunggulan dan kelemahan. Vaksin inaktif homolog merupakan vaksin yang dibuat dengan menggunakan *seed vaccine* yang sama dengan virus H5N1 di lapangan. Vaksin inaktif homolog memiliki kelemahan yaitu antibodi yang dihasilkan tidak dapat dibedakan dari hasil vaksinasi atau infeksi H5N1 dari lapangan. Vaksin inaktif heterolog merupakan vaksin H5N1 yang menggunakan isolat yang berbeda dengan H5N1 lapangan yaitu memiliki perbedaan pada gen neuraminidase. Vaksin ini memiliki keunggulan yaitu dapat

digunakan sebagai marker pembeda antara antibodi yang dihasilkan berasal dari vaksin H5N1 heterolog dengan antibodi yang dihasilkan dari infeksi H5N1 yang berasal dari lapangan (Capua dan Marangon 2005).

2.9 Pengembangan vaksin Influenza Reverse Genetic

Vaksin influenza konvensional kurang imunogenik sehingga untuk meningkatkan imunogenisitas vaksin masih diperlukan dua dosis dan perlu ditambahkan adjuvan. Pandemi yang disebabkan oleh virus influenza A seperti subtype H5N1 dapat membuat vaksin influenza konvensional tidak mampu menghindarkan seseorang dari infeksi dan penyakit. Perbedaan antigenik pada *reservoir* virus influenza A dan timbulnya *strain* baru yang menginfeksi manusia baik berasal dari alam ataupun buatan manusia membuat beberapa masalah dalam desain vaksin yang efektif. HA merupakan unsur utama yang harus diperhatikan dalam pembuatan vaksin karena HA merupakan glikoprotein permukaan yang menempel dan merupakan awal masuknya virus ke sel hospes. Antibodi yang dihasilkan dari vaksin harus bisa mengikat HA yang akan mengeliminasi virus yang masuk. Metode *plasmid based reverse genetics* dapat mengikuti perkembangan *strain* virus influenza melalui komposisi genetik. Teknologi ini sudah sukses diproduksi untuk vaksin *inactivated* dan LAIV H5N1. (Ellebedy dan Webby, 2009)

Teknologi *reverse genetic* sebagai vaksin flu burung untuk manusia. Isolat yang digunakan adalah *reassortants* antara *strain wild-type* dan yang telah dilemahkan, yaitu *strain low-growth human A/PR/8/34*. Metode yang digunakan adalah *reverse genetic* yang menggabungkan antara 6 segmen gen single strand RNA (NP,MP,NS,PB1,PB2 dan PA) dari *strain high-growth human* dengan segmen gen HA dan NA dari *strain wild-type* (Smith, 2007).

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL
PENELITIAN

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

Avian Influenza atau yang dikenal dengan Virus Flu Burung di kalangan peternak bukan merupakan penyakit ataupun kasus baru, tetapi karena bersifat *zoonosis* dan berpotensi dapat menimbulkan pandemi pada manusia, sehingga masih mendapat perhatian Pemerintah. Virus *Avian Influenza* disebut sebagai kontributor munculnya pandemi Influenza pada manusia (Horimoto dan Kawaoka, 2009).

Penyakit *Influenza* pada unggas (*Avian Influenza/ AI*) adalah penyakit yang disebabkan oleh virus *Influenza A* dari famili *Orthomyxoviridae*. Virus ini dapat menimbulkan gejala penyakit pernafasan pada unggas, mulai ringan (*low pathogenic*) sampai yang bersifat fatal (*highly pathogenic*). Akhir tahun 2003 sejumlah Negara telah tertular penyakit ini dan bersifat pandemik di benua Asia seperti Korea Selatan, Jepang, Vietnam, Thailand, Taiwan, Kamboja, Hongkong, Laos, Republik Rakyat China dan Pakistan termasuk Indonesia. Penyakit ini menimbulkan kematian yang sangat tinggi (hampir 90%) pada beberapa peternakan dan menyebabkan kerugian ekonomi bagi peternak. Kemungkinan penularan pada manusia dapat terjadi apabila virus *Avian Influenza* bermutasi (Dirjen Bina Produksi Peternakan Deptan, 2004).

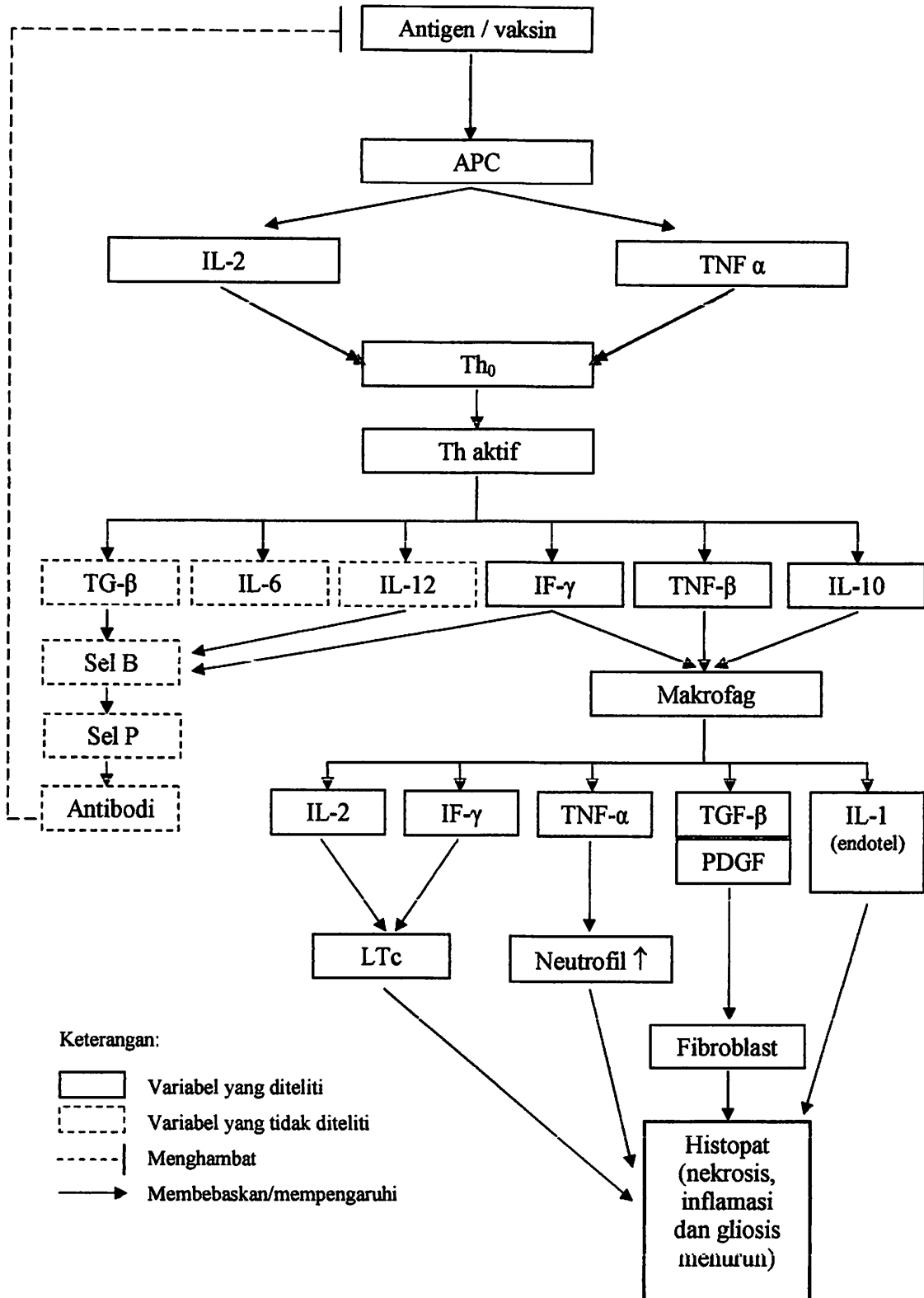
Vaksinasi merupakan salah satu upaya preventif yang efektif untuk menanggulangi kasus infeksi yang disebabkan oleh virus flu burung (Murakami *et al.*, 2011). Pengembangan vaksin saat ini untuk produksi vaksin H5N1 menggunakan metode *reverse genetic*. Pembuatan vaksin dengan metode *reverse*

genetic dengan menggabungkan gen antara 6 segmen gen *single strand* RNA (NP, M, NS, PB1, PB2 dan PA) dari strain *high-growth human* dengan segmen gen HA dan NA dari strain *wild-type*.

Konstruksi vaksin yang baik pada *innate immunity*, antigen virus yang digunakan sebagai bahan vaksin akan menginduksi sel imun untuk melepaskan interferon α/β yang dapat mengerakkan neutrofil dan granulosit, makrofag serta sel *natural killer* ke tempat infeksi untuk mengeliminasi antigen virus sehingga mencegah terjadinya patologi pada organ hospes. Pada *adaptive immunity* antigen dengan konstruksi yang baik oleh sel dendrit akan diperkenalkan kepada Thelper melalui MHC II.

Agen infeksius/patogen masuk ke jaringan, maka akan ditangkap oleh APC untuk disajikan pada sel Thelper yang kemudian mensekresikan berbagai sitokin seperti TNF α dan IL2. TNF α merupakan sitokin yang banyak disekresi oleh makrofag dan memiliki banyak peran metabolisme seperti proliferasi sel, sedangkan IL2 sebagai stimulan dalam proliferasi sel B dan sel T. Thelper merupakan sistem kekebalan tubuh, mengaktivasi sel imun dan mensekresi sitokin seperti IL6, TNF dan IL1 yang berperan menginduksi reaksi inflamasi. TGF β berfungsi menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah, proses pematangan sel B ke dalam sel Plasma dan memproduksi antibodi (Pham, 2009). Apabila hal-hal tersebut terjadi maka perubahan patologi pada organ paru dan otak tidak akan terjadi.

3.1 Kerangka konseptual



BAB 4
MATERI DAN METODE

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Dilaksanakan di Laboratorium Avian Influenza Research Centre Universitas Airlangga (AIRC-UA) Surabaya dalam fasilitas ABSL-3. Penelitian ini berlangsung selama empat bulan, dimulai pada bulan Mei 2014 sampai dengan Agustus 2014.

Vaksin yang digunakan adalah Vaksin *Avian Influenza H5N1 Reverse Genetic* yang diperoleh dari AIRC-UA.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah kandang mencit yang dilengkapi dengan wadah untuk meletakkan mencit. Tiap kandang dilengkapi dengan tempat minum yang terbuat dari plastik. Peralatan lain yang digunakan untuk penelitian adalah BSC (*Bio Safety Cabinet*), *inkubator 37 °C*, *freezer -80 °C* (untuk penyimpanan virus), kertas label, timbangan, thermometer, peralatan bedah (gunting bedah, scapel, mata scapel, pinset sirurgis, pinset anatomis), spuit, appendorf, styrofoam yang dilapisi aluminium foil, kantong sampah. Peralatan yang digunakan untuk membuat preparat histopatologi meliputi *hot plate*, mikrotom, oven, cetakan blok, alat *clearing*, *object glass* (kaca obyek), *cover glass* (kaca penutup) dan *microscope*.

Bahan yang digunakan dalam pengujian ini antara lain adalah, Alkohol 96%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% , *Phosphat Buffer Saline* (PBS), Formalin 10%,

Xilen, Xilol I, Xilol II, Parafin, Vaksin *Avian Influenza* H5N1 *reverse genetic* hasil konstruksi di laboratorium AIRC Unair yang berasal dari virus lapangan (*wild type*) dan enam segmen single strand RNA dari strain *high-growth human* A/PR/8/34. Vaksin Flu Burung konstruksi AIRC-UA terdiri dari dua macam yaitu *low-high pathogenic vaccine* dan *low-low pathogenic vaccine*.

Virus Flu Burung H5N1 *wild type* yang digunakan sebagai virusantang berasal dari virus yang menginfeksi manusia dan diperoleh dari Kementerian Kesehatan, yang telah menjadi kolega AIRC-UA dengan kode D-4.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Vaksin *Avian Influenza* H5N1 *reverse genetic* A/PR/8/34.

4.3.2 Variabel Tergantung

a) Pemeriksaan histopatologik organ otak mencit pasca vaksinasi vaksin *Avian Influenza* H5N1 *reverse genetic low-low* (LL) dan *reverse genetic low-high* (LH).

b) Pemeriksaan histopatologi organ paru mencit pasca vaksinasi vaksin *Avian Influenza* H5N1 *reverse genetic low-low* (LL) dan *reverse genetic low-high* (LH).

4.3.3 Variabel Kendali

a) Jenis hewan coba, umur, berat badan, pakan

- b) Pemeliharaan hewan coba
- c) Cara pemberian dan dosis perlakuan

4.3.4 Definisi Operasional Variabel

Pemeriksaan histopatologi organ otak dan paru mencit pasca vaksinasi vaksin *Avian Influenza H5N1 reverse genetic low-low (LL)* dan *reverse genetik low-high (LH)* adalah pemberian vaksin pada mencit kemudian dilakukan ujiantang dan dilakukan pemeriksaan kerusakan organ otak dan paru mencit secara histopatologi (mikroskopis) kemudian di analisa tingkat kerusakan dan efektifitas vaksin pada besarnya kerusakan yang ditimbulkan oleh ujiantang virus tersebut.

4.4 Populasi dan Sampel

4.4.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit sebagai unit hewan coba laboratorium. Kriteria yang dipakai dalam penelitian adalah Balb/c yang berumur sekitar enam sampai delapan minggu (HU *et al.*, 2011) dengan berat badan 15 - 30 gram dalam keadaan sehat dengan ciri-ciri bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak didapatkan adanya bekas luka dan belum pernah digunakan untuk penelitian lain. Mencit diperoleh dari Pusvetma, Surabaya yang akan dikondisikan selama satu minggu di Animal Biosafety Laboratory Level 3 (A-BSL3) Unair.

4.4.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini organ otak dan paru dari 25 ekor mencit.

4.5 Metode dan Prosedur Penelitian

4.5.1 Vaksinasi pada Mencit

Kelompok mencit/perlakuan 5 ekor diinjeksikan vaksin *reverse genetic* secara *intra muscular* (IM) dengan konsentrasi 7 μ g HA. Kelompok kontrol negatif (K-) hanya diinjeksikan PBS steril. Pada hari ke-14 dilakukan *booster* dengan konsentrasi yang sama. Pengamatan dilakukan selama 21 hari.

Kelompok perlakuan meliputi :

- Perlakuan 1 : 5 ekor mencit yang diberi vaksin *low-low reverse genetic* basis telur.
- Perlakuan 2 : 5 ekor mencit yang diberi vaksin *low-high reverse genetic* basis telur.
- Perlakuan 3 : 5 ekor mencit yang diberi vaksin *low-low reverse genetic* basis sel.
- Perlakuan 4 : 5 ekor mencit yang diberi vaksin *low-high reverse genetic* basis sel.
- Perlakuan 5 : 5 ekor mencit diberi PBS, tanpa diberi vaksin (kontrol negatif).

4.5.2 Teknik Infeksi Virus pada Mencit (challenge test)

Mencit yang akan di uji dikelompokkan dalam kandang kelompok. Setiap kelompok terdiri atas 20 ekor mencit untuk perlakuan dan 5 ekor mencit untuk kontrol. Mencit divaksin pada hari pertama dan dibooster pada hari ke-14, pengamatan dilakukan selama 21 hari dan pada hari ke-22 dilakukan infeksi virus. Sebelum dilakukan infeksi virus, mencit dianestesi terlebih dahulu dengan diinjeksi ketamin sebanyak 0,1ml per ekor. Infeksi pada mencit dilakukan dengan memegang bagian ekor dari mencit, kulit bagian tengkuk dan bagian ekor kemudian dilakukan infeksi virus secara intranasal. Virus diinfeksi ke mencit secara intranasal sebanyak 50 μ l per ekor mencit dengan konsentrasi 2×10^7 pfu/50 μ l pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Semua perlakuan dilakukan dengan teknik yang steril di dalam *Bio Safety Cabinet* (BSC). Mencit yang sudah diinfeksi, kemudian dipelihara dan diamati selama 7 hari. Pengamatan setiap 24 jam untuk mengetahui keadaan mencit yang telah diinfeksi, apabila ada yang mati segera dilakukan pembedahan dan diambil organ paru dan otak dari setiap mencit dan dimasukkan pada formalin dengan konsentrasi 10%. Pada hari ke 7, apabila ada yang masih hidup dilakukan eutanasia kemudian dibedah untuk diambil organ paru-paru serta otaknya.

4.5.3 Penanganan Sampel di Laboratorium

4.5.3.1 Preparasi Organ

Pengamatan akhir dilakukan nekropsi terhadap hewan uji. Analisis histopatologik dilakukan terhadap organ paru dan otak mencit untuk mengetahui

keadaan histopatogik serta tingkat keparahannya. Proses pembuatan preparat H&E meliputi proses jaringan dan pewarnaan H&E.

4.5.3.1.1 Preparasi Jaringan

Menghindari kerusakan jaringan oleh enzim-enzim (autolisis) atau bakteri serta untuk melindungi struktur fisik, potongan organ harus diperlakukan dengan tepat dan memadai sesegera mungkin setelah dikeluarkan dari tubuh hewan uji. Oleh karena itu dilakukan perendaman jaringan di dalam zat-zat kimia tertentu untuk sedapat mungkin memelihara sifat-sifat morfologik dan kimia jaringan, yang disebut proses fiksasi (Junqueira dan Canerio,1990; Afrianto,2006). Fiksatif yang digunakan untuk penelitian ini adalah formalin 10%. Selanjutnya masing-masing organ tersebut dipotong kira-kira setebal 3-5 mm.

Guna diperoleh potongan yang tipis, jaringan yang akan diamati dipotong dengan melihat melalui mikroskop optic, maka setelah proses fiksasi, jaringan harus mengalami proses *embedding*, yaitu proses infiltrasi suatu jaringan dengan suatu zat yang dapat member konsistensi yang kuat agar dapat dilakukan pemotongan dengan menggunakan mikrotom. Zat-zat yang dapat digunakan antara lain gelatin, seloidin, paraffin, resin atau bahan liat lainnya (Junqueira dan Canerio,1990; Afrianto,2006). Pada penelitian ini jaringan dilakukan proses *embedding* dengan menggunakan Parafin.

Proses *embedding* atau impregnasi jaringan biasanya di dahului dengan proses dehidrasi dan penjernihan (Junqueira dan Canerio,1990; Afrianto,2006). Dehidrasi dilakukan melalui perendaman jaringan dalam serangkaian campuran etanol dan air yang makin lama makin pekat (etanol 80% sampai 100%). Etanol

kemudian digantikan dengan pelarut lemak, yaitu xilen. Peresapan xilen dalam jaringan menyebabkan jaringan menjadi transparan atau jernih selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam paraffin yang dicairkan diatas penangas dengan suhu 58°C sampai dengan 60°C. Pemanasan menyebabkan pelarut menguap dan ruangan yang tertinggal terisi oleh paraffin. Blok paraffin kecil yang mengandung paraffin tersebut kemudian diiris (*sectioning*) dengan pisau baja mikrotom menjadi setebal 5-7µm. potongan tersebut dimasukkan ke dalam air hangat dan dipindahkan keatas *object glass*. (Afrianto,2006)

4.5.3.1.2 Pewarnaan Histopatologik Paru dan Otak Mencit dengan

Hematoxilin-Eosin.

Jaringan paru dan otak mencit difiksasi dengan buffer formalin 10%. Selanjutnya dilakukan proses pewarnaan menggunakan hematoksilin dan eosin. Pewarnaan diawali dengan perendamaan gelas obyek ke dalam xilol I dan xilol II masing-masing selama 2 menit, dilanjutkan perendaman dalam alkohol absolut (96%), 95%, 90%, 80%, 70%, dan 50% masing-masing selama 2 menit. Setelah itu, obyek dibilas dengan akuades selama 2 menit. Kemudian obyek dimasukkan ke dalam pewarna hematoksilin selama 7 menit dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kelebihan zat warna yang tidak diserap. Obyek direndam kembali dalam pewarna eosin selama 3 menit dan dicuci kembali dengan akuades. Preparat jaringan kemudian direndam dalam alkohol 50%, 70%, 85%, 90%, 96%, 96%, xilol I, xilol II masing-masing selama 2 menit.

4.5.3.1.3 Pemeriksaan Histopatologik

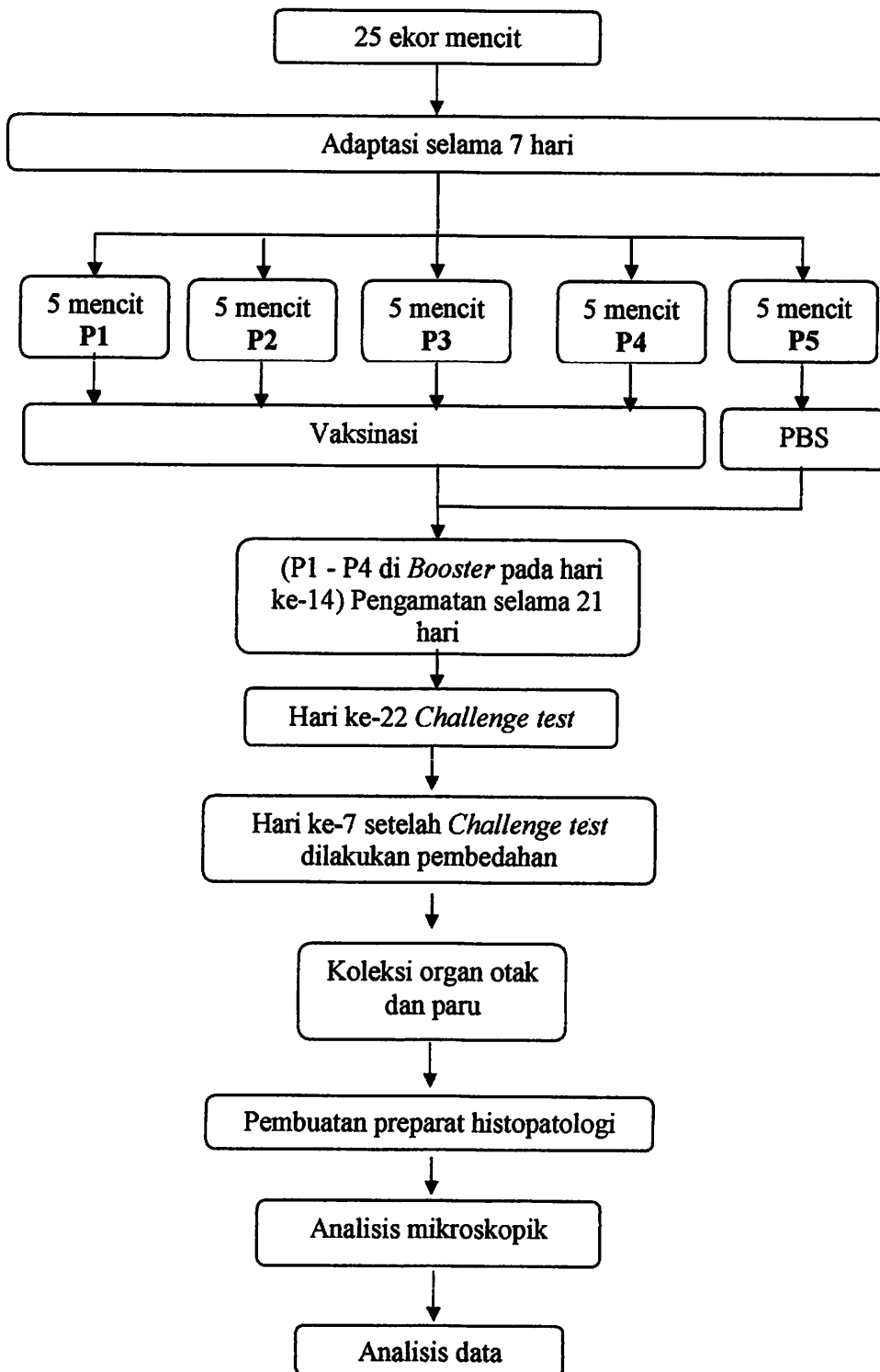
Pengamatan histopatologik dilakukan secara deskriptif (kualitatif) dan skoring (kuantitatif) yang diamati pada lima lapang pandang menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali (10x objektif dan 10x okuler), 400 kali (40x objektif dan 10x okuler), serta 1000 kali (100x objektif dan 10x okuler) (Lampiran 1 dan 2), dilakukan pengamatan pada 5 (lima) ulangan dari masing-masing organ dan masing-masing perlakuan (P1, P2, P3, P4 dan K). Organ yang diamati adalah paru mencit dan otak mencit. Perubahan gambaran histopatologi ditentukan dengan melakukan skoring pada sel yang mengalami kerusakan dan kerusakan jaringan pada setiap lapang pandang.

Pemeriksaan histopatologi ini ditujukan untuk menilai derajat kerusakan paru akibat suatu perlakuan (Lampiran 4). Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan *soft ware* pengolah gambar Nikon Image System.

Metode skoring yang digunakan merupakan modifikasi dari metode Klopffleisch (2013) dan Rohonczy *et al* (1996), dimana skor derajat kerusakan atau Indeks histopatologi (HP) setiap sampel ditentukan dengan cara menjumlah skor (multiparametric model) dari setiap bentuk lesi yang telah ditentukan sebagai variabel (determinat factor) kerusakan paru-paru.

Nilai skor tersebut diterapkan pada setiap lapang pandang yg diamati kemudian dirata-rata untuk setiap ulangannya agar didapatkan nilai median pada uji statistiknya.

4.6. Kerangka Operasional



4.7 Pengolahan Data

Data yang diperoleh pada masing-masing perlakuan, hasil pengamatan mikroskopis adalah perubahan gambaran histopatologi otak dan paru mencit (*Mus Musculus*) disajikan dalam bentuk foto. Nilai hasil skoring (kualitatif) perubahan histopatologik dari organ otak dan paru (Lampiran 1 dan 2), kemudian diolah dengan analisa statistika non parametik, menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, apabila hasil dari analisis menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) maka uji analisis dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. (Lampiran 5)

4.8 Penanganan Limbah Infeksius

Dekontaminasi semua peralatan dan sampah menggunakan desinfektan larutan sodium hipoklorit dan alkohol 70-80%, kemudian dilakukan sterilisasi. Semua material dimasukkan ke dalam kantong plastik rangkap, di *seal*, diberi *indicator tape* dan dimasukkan ke dalam kontainer khusus untuk proses sterilisasi dengan menggunakan *autoclave*. Sampah yang berupa benda tajam, dimasukkan dalam tempat sampah khusus. Semua material (sampah dan peralatan) harus di autoclave sebelum dicuci atau dibuang. Autoclave semua material selama 15 menit pada suhu 121°C. Sampah yang telah di autoclave dimasukkan ke dalam kantong plastik untuk insinerasi. (Arizona State University, 2012; International Committee of The Red Cross, 2011; WHO, 2004)

BAB 5
HASIL PENELITIAN

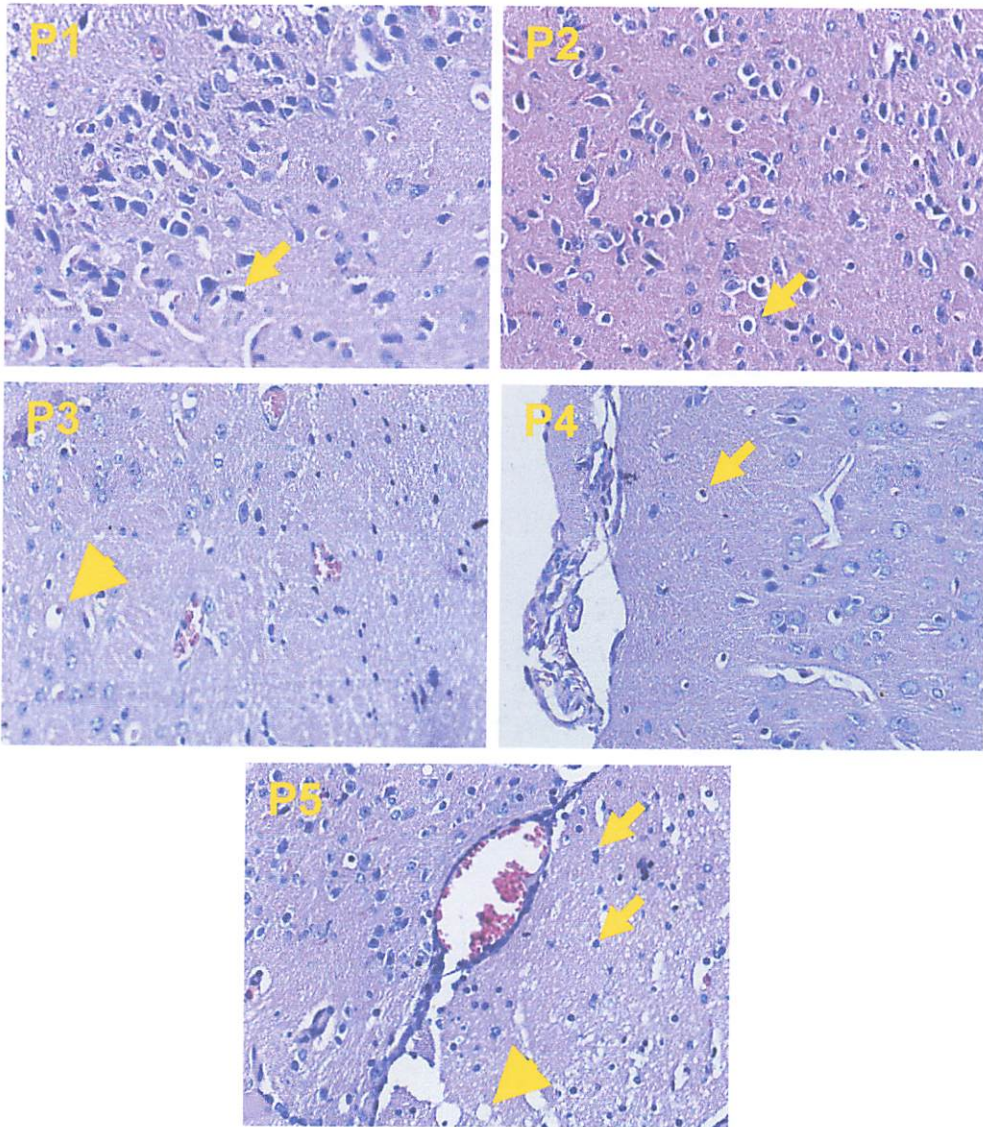
BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Otak

5.1.1 Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Histopatologi Otak Mencit

Dari hasil penelitian yang dilakukan terhadap mencit (*Mus musculus*) yang terbagi dalam 5 (lima) perlakuan, yaitu : P1, P2, P3, P4 dan P5 (K), dapat diketahui bahwa secara gambaran histopatologi terjadi perubahan pada masing - masing otak mencit yang divaksin maupun yang tidak divaksin. Gambaran histopatologi otak mencit yang divaksin menunjukkan perubahan yang bervariasi. Perubahan tersebut terlihat adanya gambaran histopatologi seperti nekrosis, inflamasi dan gliosis (Gambar 5.1).

Pada kelompok perlakuan (P2) yang diberi vaksin *low-high reverse genetic* basis telur menunjukkan gambaran histopatologi yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain dilihat berdasarkan nekrosis, inflamasi dan gliosis yang lebih ringan, sedangkan pada otak mencit yang tidak divaksin (P5) menunjukkan keadaan yang lebih parah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain berdasarkan nekrosis, inflamasi dan gliosis yang lebih berat, dengan gambaran sebagai berikut :



Gambar 5.1 Gambaran piknosis (panah) dan nekrosis (kepala panah) sel otak dengan perlakuan P1, P2, P3, P4 dan P5. Pada kelompok P2 lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan lainnya (*pewarnaan HE. Pembesaran 40x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel*).

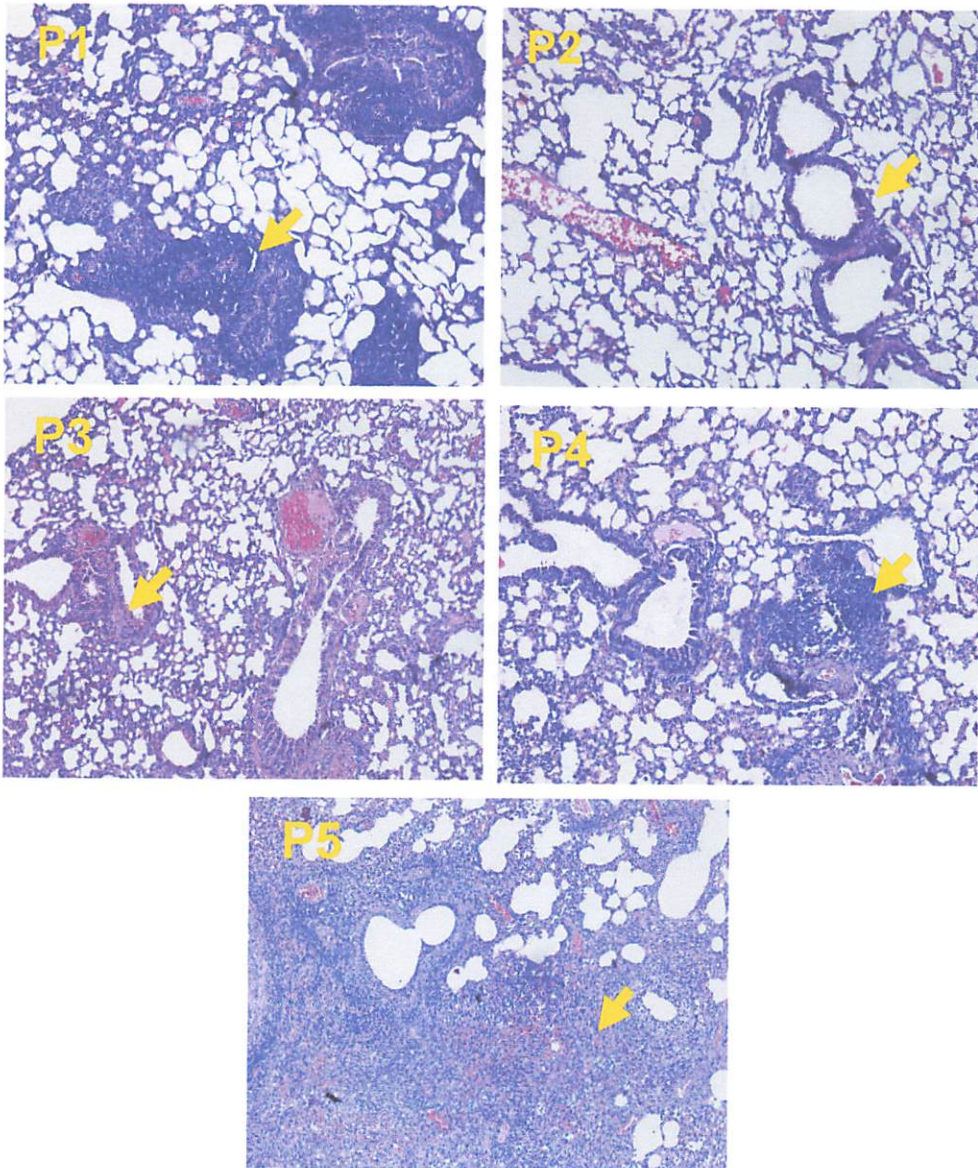
Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan mikroskopis dengan cara menjumlahkan skor kerusakan yang diamati (Lampiran 3), selanjutnya diolah secara statistik dengan menggunakan uji kruskal wallis dan dilanjutkan dengan uji mann whitney apabila terdapat perbedaan yang nyata. Pada kelompok perlakuan P1 secara statistik menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan P2, P4 dan P5. Akan tetapi, kelompok perlakuan P1 ini tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan P3. Sedangkan pada kelompok perlakuan P2 secara statistik menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) bila dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan yaitu P1, P3, P4 dan P5. Pada kelompok perlakuan P3, secara statistik menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan P2 dan P5. Akan tetapi kelompok perlakuan P3 ini secara statistik tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan kelompok perlakuan P1 dan P4. Pada kelompok perlakuan P4, secara statistik menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) dengan kelompok perlakuan P1, P2 dan P5, akan tetapi kelompok perlakuan P4 ini tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan P3. Pada kelompok perlakuan P5, secara statistik menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain yaitu P1, P2, P3 dan P4.

5.2 Paru

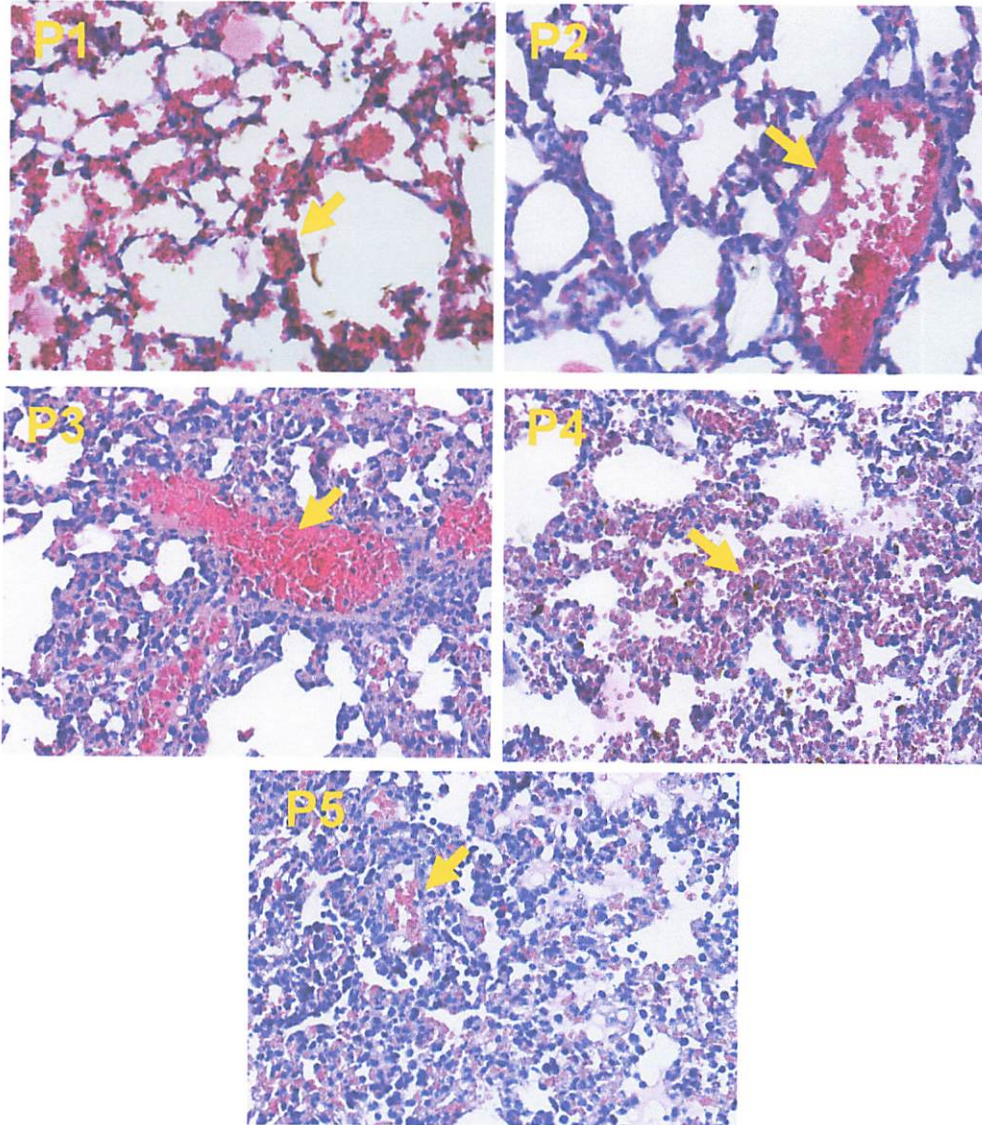
5.2.1 Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Histopatologik Paru Mencit

Hasil evaluasi terhadap pemeriksaan histopatologi sampel paru mencit yang divaksin dengan vaksin *Avian Influenza reverse genetic* menunjukkan adanya perubahan yang bervariasi berupa degenerasi, nekrosis, kongesti, oedema dan haemorrhagi, sedangkan (P5) untuk kelompok kontrol negatif yang mendapat perlakuan diberikan PBS steril menunjukkan adanya degenerasi, nekrosis, kongesti, oedema dan haemorrhagi, perubahan histopatologis yang signifikan.

Gambaran perubahan histopatologi pada paru mencit berupa nekrosis alveolar akibat peradangan pada kelompok P2 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya, sedangkan pada perlakuan kontrol (K) menunjukkan adanya gambaran perubahan histopatologi yang lebih parah (Lampiran 4), terlihat pada gambaran sebagai berikut :



Gambar 5.2. Gambaran nekrosis alveolar akibat peradangan (panah) pada kelompok P2 lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan lainnya (*pewarnaan HE. Pembesaran 100x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel*).



Gambar 5.3. Gambaran kongesti dan hemoragi pada setiap perlakuan (pewarnaan HE. Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).

BAB 6
PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vaksin *reverse genetic low-high* basis telur (P2) terbukti lebih efektif dibandingkan dengan jenis vaksin *reverse genetic* lainnya terhadap mencit yang di paparkan dengan virus avian influenza (Lampiran 3 & 4), berdasarkan pada nilai hasil skoring maupun perubahan histopatologik otak dan paru karena vaksin *reverse genetic low-high* basis telur (P2) baik bagi virus avian influenza.

Vaksin flu burung H5N1 *reverse genetic* dibuat dari virus influenza yang asal mula virus influenza terutama H5N1 berasal dari unggas, sehingga adaptasi virus terhadap media produksi yang berasal dari unggas, dalam hal ini adalah telur lebih baik dibanding media selain unggas seperti sel MDCK yang berasal dari hewan mamalia. Hal tersebut berhubungan dengan reseptor dari hospes yang disesuaikan dengan asal virus sehingga virus dapat menginfeksi dengan baik.

Pada kelompok P2 gambaran kongesti, oedema, haemorrhagi, vaskulitis, bronkiolitis dan kerusakan sel-sel pneumosit yang jelas nampak lebih ringan dibanding perlakuan lainnya (Gambar 5.2). Derajat kerusakan paru pada kelompok P2 terbukti lebih ringan dibanding dengan kelompok perlakuan lainnya karena Vaksin *reverse genetic low-high* mempunyai efektifitas lebih baik untuk menimbulkan antibodi dibanding vaksin *reverse genetic low-low*, hal tersebut kemungkinan karena konstruksi vaksin *low-high* mempunyai respon dengan sel T lebih baik, sehingga antibodi yang terbentuk banyak dan respon imun lebih baik.

Gangguan pada sistem vaskuler paru merupakan bentuk lesi yang paling

menonjol dibandingkan dengan gambaran infiltrasi sel-sel limfosit yg umum terjadi pada organ dan infeksi virus. Virus avian influenza menyerang alat pernafasan, mengakibatkan viremia dan dapat masuk ke dalam sel, bereplikasi, menyebar pada saluran pernafasan secara cepat menyebabkan kerusakan pada organ dan jaringan pada hospes *multiorgans failure*. Virus HPAI dapat bereplikasi dengan efisien di dalam endotel pembuluh darah dan sel parenkim perivaskular sehingga dapat menimbulkan infeksi sistemik (Harimoto dan Kawaoka, 2005).

Teknologi *reverse genetic* sebagai vaksin flu burung untuk manusia. Isolat yang digunakan adalah *reassortants* antara *strain wild-type* dan yang telah dilemahkan, yaitu *strain low-growth human A/PR/8/34*. Metode yang digunakan adalah *reverse genetic* yang menggabungkan antara 6 segmen gen single strand RNA (NP,MP,NS,PB1,PB2 dan PA) dari *strain high-growth human* dengan segmen gen HA dan NA dari *strain wild-type* (Smith, 2007) yang diharapkan mampu mengatasi penyakit *avian influenza*.

Respon imunitas *innate* maupun imunitas *adaptif* tergantung pada aktivitas sel darah putih dan leukosit. Imunitas *innate* dilakukan oleh sel-sel limfosit. Kemampuan kerja secara bersama-sama dari kedua sistem tersebut sangat menentukan efektivitas dalam mengeliminasi patogen yang masuk. Jika respon imun *innate* tidak bisa mengeliminasi patogen, maka akan memicu respon imun *adaptif* yang menimbulkan memori untuk melawan patogen yang sama (Moser dan Leo, 2010).

Otak mempunyai sejumlah sifat anatomis dan fisiologis yang sangat mempengaruhi keadaan klinis penyakit otak itu terjadi yang memberikan perlindungan terhadap suatu serangan penyakit, sebaliknya memungkinkan otak itu lebih mudah terserang oleh penyebab lainnya, karena itulah daerah yang berbeda dalam otak mempunyai fungsi yang berbeda sehingga menimbulkan kerusakan yang berbeda pula pada daerah tertentu. Lokalisasi inilah yang memberikan perbedaan yang sangat penting antara otak dan jaringan tubuh lainnya yang menimbulkan sejumlah konsekuensi. Konsekuensi patologis yang paling penting sebagai akibat dari adanya lokalisasi fungsi ini adalah, bahwa kerusakan setempat yang kecil didalam otak dapat menimbulkan gangguan fungsi secara selektif dan hebat, misalnya fungsi motorik pada lobus frontalis sehingga jaringan otak sangat peka pada kerusakan local yang kecil, yang tidak dijumpai pada organ lain seperti hati dan paru-paru. (Robbins dan kumar, 1995)

Hasil pengamatan histopatologik pada otak terlihat sel neuron mengalami cedera namun tidak terjadi kematian sel. Keadaan tersebut menunjukkan perubahan morfologis yang mudah dikenali. Secara potensial perubahan ini bersifat *reversible* yang disebut dengan perubahan degenerative yang cenderung melibatkan sitoplasma sel, sedangkan inti sel (nucleus) mempertahankan integritasnya selama sel tidak mengalami cedera letal. Kerusakan ini dapat berlanjut kearah ke kematian sel jika pengaruh yang berbahaya ini tidak diatasi. Kematian sel tersebut disebut sebagai proses nekrosis, bilamana suatu sel atau sekelompok sel dalam hospes yang hidup diketahui mati. Nekrosis sendiri merupakan kematian sel lokal yang dapat menyebabkan lisis sel (Price dan Wilson,

2006)

Umumnya perubahan-perubahan lisis terjadi dalam jaringan yang nekrotik dapat melibatkan sitoplasma, tetapi inti sel yang paling jelas menunjukkan perubahan kematian sel. Inti sel yang mati menyusut, batas-batasnya tidak teratur dan berwarna gelap. Proses ini dinamakan piknosis dan intinya disebut piknotik. Perubahan histologi yang sangat khas oleh karena infeksi virus adalah tersebarnya sel-sel mononukleus (limfosit, sel plasma, dan makrofag) umumnya berada disekitar pembuluh darah. (Robbins dan Kumar, 1995).

Pneumonia interstitialis merupakan salah satu tipe dari pneumonia (Lopez, 1995). Pneumonia interstitialis kronik merupakan akibat dari kerusakan persisten pada interstitial alveolar, septum alveolar, dan pada dinding alveolar akibat dari proses peradangan (Dungworth 1993; Lopez 1995; Dijk 2007). Patogenesis pneumonia interstitialis adalah kerusakan difusa dan menyeluruh atau kerusakan sebagian septum alveolar.

Pneumonia interstitialis ditunjukkan dengan adanya predominan eksudatif dan respon proliferasi pada dinding alveolar. Pneumonia interstitialis kronis idiopatik paling sering timbul dalam bentuk pneumonia interstitialis biasa (PIB), pneumonia interstitialis deskuamasi (PID) dan Pneumonia Interstitialis Limfositik. (Damjanov, 2000).

Menurut Kusumawidjaja (1996), keadaan klinik yang menyertai kongesti antara lain shock yang menyebabkan insufisiensi sirkulasi darah dan anoksia sistemik. Anoksia sistemik menyebabkan kerusakan pada susunan saraf pusat. Secara mikroskopis kongesti tampak sebagai dilatasi (pelebaran) kapiler pada

septum alveolus. Adanya kongesti maka pembuluh darah akan melebar dan menekan daerah sekitarnya sehingga kongesti selalu mengganggu fungsi pernafasan normal yang merupakan factor predisposisi terjadinya bronchopneumonia. (Kusumawidjaja, 1996). Akibat dari kongesti, lumen bronkiolus menjadi sempit sehingga terjadi obstruksi udara. Bronkiolus memiliki dinding yang tipis dan diameter lumen yang kecil sehingga lebih rentan terhadap efek patologis yang terjadi pada parenkhim alveolar sekitarnya. (Dungworth, 1993).

Kongesti berat pada pembuluh darah akan menimbulkan perdarahan yang ditandai dengan lepasnya eritrosit dari pembuluh darah ke jaringan sekitarnya. Pada perdarahan paru-paru, alveolus akan terisi oleh darah yang keluar dari pembuluhnya. (Damjanov, 2000).

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan yaitu kelompok perlakuan (P2) yang divaksin dengan vaksin *Avian Influenza Reverse Genetic low-high pathogenic* basis telur secara gambaran histopatologi otak maupun paru menunjukkan hasil yang lebih baik (berdasarkan nilai skor) dibandingkan dengan kelompok perlakuan (P1) yang divaksin dengan vaksin *Avian Influenza Reverse Genetic low-low pathogenic* basis telur, kelompok perlakuan (P3) yang divaksin dengan vaksin *Avian Influenza Reverse Genetic low-low pathogenic* basis sel, kelompok perlakuan (P4) yang divaksin dengan vaksin *Avian Influenza Reverse Genetic low-high pathogenic* basis sel. Kelompok P5 sebagai kontrol negatif memiliki perbedaan yang nyata dibandingkan dengan keempat perlakuan tersebut.

7.2 Saran

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan uji imunohistokimia pada sel otak dan paru mencit yang divaksin *Avian Influenza Reverse Genetic*.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, Y. 2006. Efek Antiproliferasil Ekstrak daun Benalu Nangka(*Macrosolen cochinchinensis (Lour) van Tiegh.*) Terhadap Sel Tumor Paru Pada Mencit Jantan Post Inisiasi Benzo pirena. Skripsi, fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Arizona State University, 2012. Animal Biosafety Manual
- Asmara,W, M. H. Wibowo, C. R Tabbu. 2005. Identifikasi Subtipe Hemaglutinin Virus *Avian Influenza* pada Berbagai Species Unggas dengan RT-PCR. Jurnal Sain Veteriner, vol : 1.
- Brown, E.G. 2000. Influenza Virus Genetics. Biomed & Pharmacother 2000;54
- Capua I, Marangon S, Dalla Pozza M, Terregino C, Cattoli G. 2003. Avian Influenza in Italy 1997-2001. Avian Dis; 47: Suppl: 839-43.
- Cross K.J, Burleigh LM, Steinhauer DA. 2001. Mechanisms of Cell Entry by Influenza Virus. Expert Reveiws in Molecular Medicine.
- Damjanov, I. 2000. Buku Teks dan Atlas Berwarna Histologi. Pendit UB, penerjemah Himawan M, editor. Jakarta: Widya Medika. Terjemahan dari Histopatologi A Color Atlas and Textbook.
- DEPTAN, 2012. Kebijakan Pengendalian dan Penanggulangan *Avian Influenza* pada Unggas. Direktorat Kesehatan Hewan dalam Proseding Rapat Koordinasi Nasional Pengendalian Penyakit AI Departemen Pertanian Republik Indonesia. 10-12 November 2012. Makasar.
- Dirjen Bina Produksi Peternakan. 2004. Bagaimana Terhindar Dari Flu Burung (*Avian Influenza*).
- Dungworth D.L. 1993. The Respiratory System. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, editor. Pathology of domestic Animals. Ed ke-4. Vol 1. San Diego: academic Press.
- Eliyani, H. 2009. Identifikasi Sub-Tipe Virus *Avian Influenza* di Indonesia
- Fouchier, R .A. M., V. M.Anders., Wallensten., T. M. Bestebroer.,S. Herfst.,D. Smith.,G. F. Rimmelzwaan.,B. Olsen and A. D. M. E. Osterhausl. 2005. *Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls.* Journal of Virology, 79 : 2814-2822.

- Gorman O.T., W.J Bean and R.G Webster. 1992. Evolutionary Processes in *Influenza Viruses: Divergence, Rapid Evolution, And Stasis*. *Curr Top Microbiol Immunology*; 176: 75-97.
- Horimoto T. and Kawaoka Y., 2005 *Influenza: Lessons from Past Pandemics, warnings from current incidents*. Nature Publishing group vol 3.
- Horimoto T. and Kawaoka Y. 2009. A Viruses Pandemic Threat Posed by *Avian Influenza* . *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14(1):129. DOI:10.1128/CMR.14.1.129-149.2001.
- Hu A. Y. C., Tseng Y.F., Weng T.C., Liao C.C., Wu J., Chou A.H., Chao H.J., Gu A., Chen J., Lin S.C., Hsiao C.H., Wu S.H., Chong P., 2011. Production of Inactivated Influenza H5N1 Vaccines from MDCK Cells in Serum-Free Medium. *PloS ONE* 6(1): e14578
- International Committee of The Red Cross. 2011. *Medical Waste Management*.
- IUCN. 2007. *IUCN red list of threatened species*.
- Junqueira L.C and Carnerio, J. 1990, *Histologi dasar*, Edisi 3, diterjemahkan oleh Adji Darma, EGC Penerbit Buku kedokteran, Jakarta.
- Klopfleisch R. 2013. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology - a systematic review.
- Knipe D.M, Peter M.H. 2007. *Fields Virology*. 5th edition vol 2 Lippincott Williams & Wilkins 1691-1740.
- Kumala W. 2005. *Avian Influenza : Profil dan Penularannya pada Manusia*. *Universa Medicina*, Oktober-Desember, Vol.24, No. 4.
- Kusumawidjaja. 1996. *Patologi Anatomi* Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Lipatov A.S., Webby R.J., Govorkova E.A., Krauss S., Webster R.G., 2005. Efficacy of H5 Influenza Vaccines Produced by Reverse Genetics in a Lethal Mouse Model. *The Journal of Infectious Diseases*. 191:1216-20
- Lopez A. 1995. *Respiratory System*. Carlton WW, Mcgavin MD, editor. *Thomsons Special Veterinary pathology*. Ed ke-2. St Louis: Mosby
- Moser M dan Leo O. 2010. *Key Concepts in Immunology*. *Vaccine* 28S (2010) C2-C13

- Murakami S., Horimoto, T., Ito M., Takano,R., Katsura,H., Shimojima,M and Kawaokaa, Y. 2011. Enhanced Growth of Influenza Vaccine Seed Viruses in Vero Cells Mediated by Broadening the Optimal pH Range for Virus Membrane Fusion. *J. Virol.* 2012, 86(3):1405. DOI: 10.1128/JVI.06009-11.
- Murphy B. R. and R. G. Webster. 1996. Orthomyxoviruses. *Fields Virology* Lippincott-RavenPublishers, Philadelphia, PA. 1397-1445.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2011. Reverse Geneticc. U.S. Departement of Helath and Human Services. www.niaid.nih.gov
- Neumann G., H. Chen, G.F. Gao, Y. Shu and Y. Kawaoka. 2010. H5N1 *Influenza* Viruses: Outbreaks and Biological Properties. *Cell Research* 20:51-61
- NIBSC Potters Bar. 2003. National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Hertfordshire, United Kingdom.
- Nidom, C.A. 2008. Analisis Molekuler Genoma Virus *Avian Influenza* H5N1 di Indonesia. ADLN digital collection Universitas Airlangga, www.unair.id. Akses 31 Juli 2009.
- Nidom, C.A. R. Takano, S. Yamada, YS. Tagawa, Y. Kawaoka 2010. Influenza A H5N1 Viruses from Pigs in Indonesia.
- Nidom, C.A., Yamada S. Nidom R. V., Rahmawati K., Alamudi M. Y., Kholik., Indrasari S., Hayati R.S. 2012. Genetic characterization of H5N1 influenza viruses isolated from chickens in Indonesia in 2010
- OIE 2001. Manual os Standards for Diagnostic Test and Vaccines. 4th Edition. Office International des Epizooties, 12 rue de Prony. Paris, France.
- OIE 2005 (World Organisation for Animal Health). Highly Pathogenic *Avian Influenza* In Mongolia: In Migratory Birds. http://www.oie.int/eng/info/hebdo/ais_55.htm. Akses 31 oktober 2005.
- Pham, N.C. 2009. *The Immugenicity of Intranasal Adjvanted Pandemic Avian Influenza Vaccine in Murine Model*. Centre of Pharmacy and Influenza Centre, and The Gade Institute University of Bergen.
- Price S.A dan Wilson, lorraine M.C., 2006. Patofisiologi Clinical Concepts of Diseases Process, Ed 6, Vol 2. Brahm u, EGC: Jakarta
- Raharjo J. dan Nidom CA., 2004. *Avian Influenza : Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya*. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. Gita Pustaka. Jakarta. ISBN: 979-98585-0-X.

- Rao S. 2006. Vaccines. Dept. Of Microbiology JJMMC, Davangere India.
www.microrao.com
- Riedel S. 2005. *Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. Proceedings* (Bayl Univ Med Cent) 18 (1): 21-25
- Robbins dan Kumar. 1995. Patologi II. Edisi 4. Alih bahasa Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga
- Rohonczy E B, A V Balachandran, T W Dukes, J B Payeur, J C Rhyan, D A Saari, T L Whiting, S H Wilson, and J L Jarnagin. 1996. A comparison of gross pathology, histopathology, and mycobacterial culture for the diagnosis of tuberculosis in elk (*Cervus elaphus*). *Can J Vet Res.* 60(2): 108–114.
- Seo SH, Hoffman E, Webster RG (2002). Lethal H5N1 Influenza Viruses Escape Host Anti-viral Cytokine Responses. *Nature Medicine*, 9:950-954
- Smeyne, 2009, Avian Influenza Strain Primes Brain for Parkinsons Disease, St. Jude Childrens Research Hospital.
- Smith K. 2007. The Use of Plasmid-based Reverse Genetic to Generate Influenza Virus Strain for Improved Vaccine Production. *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal* 2007 3: 123-130.
- Swayne D.E. dan D.L. Suarez. 2000. Highly Pathogenic *Avian Influenza*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19 (2) : 463-482.
- Swayne D.E, Lee C.W., and Spackman E, 2006. Inactivated North American and European H5N2 Avian Influenza Virus Vaccines Protect Chickens from Asian H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus. *5*: 141-146
- Swayne D.E. 2008. *Avian Influenza*. Blackwell Publish.
- Treanor J.J., Campbell, J.D., Zangwill, K.M., Rowe, T., Wolff, M. 2006. Safety and Immunogenicity of An Inactivated Subvirion Influenza A (H5N1) Vaccine. *New Engl J Med.* 354:1343–51.
- Uiprasertkul M., Kitphati,R., Puthavathana,P., Kriwong,R., Kongchanagul,A., Ungchusak,K., Angkasekwinai,S.,C hokephaibulkit,K., Srisook,K., Vanprapar,N and Auewarakul, P. 2007. Apoptosis and Pathogenesis of Avian Infl uenza A (H5N1) Virus in Humans. *Emerging Infectious Diseases Journal.* 13(5): 708-712

- Van Reeth K. 2007. Avian and Swine Influenza Viruses: our current understanding of zoonotic risk. *Vet.Res.* 38. Pp.243-260.
- Webby R. J., S. L. Swenson, S. L. Krauss, P. J. Gerrish, S. M. Goyal and R. G. Webster. 2000. Evolution of swine H3N2 *influenza* viruses in the United States. *J. Virol.* 74:8243-8251.
- Webster R.G. 1998. *Influenza: An Emerging Disease.* *Emerg Infect Dis*; 4:436-41.
- Webster R.G. 1992. Evolution and Ecology of influenza A Viruses. *Microbiological Reviews* 56 (1). 152-179.
- WHO. 2002. WHO Manual on Animal *Influenza* Diagnosis and Surveillance. Departemen of Communicable Disease Surveillance and Respon. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.
- WHO. 2003. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, Laboratory of Respiratory Viruses, National Institute of Health, Toyama, Shinjuku Ku, Tokyo, Japan.
- WHO. 2004. Laboratory Biosafety Manual Thrid Edition
- WHO. 2009. WHO Manual on Animal *Influenza* Diagnosis and Surveillance. Departemen of Communicable Disease Surveillance and Respon. WHO. 2012. H5N1 Avian *Influenza: Timeline of Major Events.*
- WHO. 2014. Cumulative Number Of Confirmed Human Cases Of Avian *Influenza* A (H5N1) Reported To WHO. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/CumulativeNumberH5N1cases.pdf.
- Whittaker GR. 2001. Intercellular Trafficking of Influenza Virus: Clinical Implications for Molecular Medicine. Cambridge University Press.
- Wiyono A., R. Indriani., N.L.P.I. Dharmayanti., R. Damayanti dan Darminto. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H5Dari Ayam Asal Wabah Di Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak Vet.* IX (2) : 136-143.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1**METODE SKORING**

Pada Otak:

A. Sel Nekrosis : Dikategorikan dalam 5 (lima) skala

Skor

- 0 (nol) : tidak terjadi perubahan nekrotik
 5 (lima) : jika jumlah sel alveolar nekrotik < 25% LP
 7 (tujuh) : jika jumlah sel alveolar nekrotik antara 26–50% LP
 9 (sembilan) : jika jumlah sel alveolar nekrotik antara 51 – 75% LP
 11 (sebelas) : jika jumlah sel alveolar nekrotik >75 LP

B. Inflamasi : Dikategorikan dalam 5 (lima) skala

Skor

- 0 (nol) : tidak ditemukan sel radang/perivascular cuffing
 2 (dua) : bila ditemukan sel radang <10% pembuluh darah
 4 (empat) : bila ditemukan sel radang 10%-50% pembuluh darah
 6 (enam) : bila ditemukan sel radang 51%-80% pembuluh darah
 8 (delapan) : bila ditemukan sel radang >80% pembuluh darah

C. Gliosis : Dikategorikan dalam 4 (empat) skala

Skor

- 0 (nol) : bila jumlah sel glia <10/ LP (perbesara 1000x)
 3 (satu) : bila jumlah sel glia 10-50/ LP (perbesara 1000x)
 6 (dua) : bila jumlah sel glia 50-100/ LP (perbesara 1000x)
 9 (tiga) : bila jumlah sel glia >100/ LP (perbesara 1000x)

LAMPIRAN 2**METODE SKORING****Pemeriksaan Paru**

A. Degenerasi : Dikategorikan dalam 5 (lima) skala

Skor

- 0 (nol) : tidak terjadi perubahan degeneratif
 1 (satu) : jika jumlah sel alveolar degeratif < 25% dari Lapangan Pandang (LP)
 2 (dua) : jika jumlah sel degeratif alveolar antara 26–50% LP
 3 (tiga) : jika jumlah sel degeratif alveolar antara 51 – 75% LP)
 4 (empat) : jika jumlah sel degeratif alveolar >75 LP

B. Sel Nekrosis : Dikategorikan dalam 5 (lima) skala

Skor

- 0 (nol) : tidak terjadi perubahan nekrotik
 5 (lima) : jika jumlah sel alveolar nekrotik < 25% LP
 7 (tujuh) : jika jumlah sel alveolar nekrotik antara 26–50% LP
 9 (sembilan) : jika jumlah sel alveolar nekrotik antara 51 – 75% LP
 11 (sebelas) : jika jumlah sel alveolar nekrotik >75 LP

C. Kongesti : Dikategorikan dalam 5 (lima) skala

Skor

- 0 (nol) : tidak terjadi kongesti
 1 (satu) : bila area kongesti < 25% dari Lapangan Pandang LP
 2 (dua) : bila area kongesti antara 26% -50% LP
 3 (tiga) : bila area kongesti antara 51 – 75% LP
 4 (empat) : bila area kongesti >75 LP

D. Oedema : Dikategorikan dalam 4 (empat) skala**Skor**

- 0 (nol) : tidak terjadi edema
 1 (satu) : bila area oedema < 25% LP
 2 (dua) : bila area oedema antara 26% -50% LP
 3 (tiga) : bila area oedema antara 51 – 75% LP
 4 (empat) : bila area kongesti >75 LP

E. Hemoragi : Dikategorikan dalam 4 (empat) skala point**Skor**

- 0 (nol) : tidak terjadi hemoragi
 1 (satu) : bila Luas daerah hemoragi antara < 25% dari LP
 2(dua) : bila Luas daerah hemoragi antara 26- 50% dari LP
 3(tiga) : bila Luas daerah hemoragi antara 51 – 75% LP
 4(empat) : bila Luas daerah fibrosis >75 LP

F. Alveolitis :

Skor 0 : Tidak terdapat sel inflamasi pada dinding alveoli

Skor 1 : sel inflamasi dominan MN pada dinding alveoli

Skor 2 : sel inflamasi dominan MN pada dinding alveoli, luas < 10 %

Skor 3 : sel inflamasi dominan MN pada dinding alveoli, luas > 10 %

Skor 4 : Terdapat sel inflamasi intraalveolar < 10%

Skor 5 : Terdapat sel inflamasi intraalveolar > 10%

G. Perivaskulitis :

Skor 0 : Tidak terdapat sel inflamasi pada dinding kapiler

Skor 1 : Terdapat sel inflamasi dominan MN pada dinding kapiler

Skor 2 : Terdapat sel inflamasi dominan MN pada dinding kapiler, ketebalan < 5 μ m

Skor 3 : Terdapat sel inflamasi dominan MN pada dinding kapiler , ketebalan 5 – 10 μ m

Skor 4: Terdapat sel inflamasi dominan MN pada dinding kapiler, ketebalan > 10 μ m

Skor 5 : Terdapat sel inflamasi dan kerusakan endotel bronkiolus.

LAMPIRAN 3

Skoring otak

KODE PREPARAT	SKOR PERUBAHAN HISTOPATOLOGI			TOTAL SKOR
	A	B	C	
P1.1	5.0	4.0	6.0	15.0
P1.2	5.0	2.0	6.0	13.0
P1.3	5.0	4.0	9.0	18.0
P1.4	5.0	4.0	6.0	15.0
P2.1	5.0	2.0	0.0	7.0
P2.2	5.0	2.0	3.0	10.0
P2.3	5.0	0.0	0.0	5.0
P2.4	5.0	2.0	0.0	7.0
P3.1	7.0	6.0	6.0	19.0
P3.2	7.0	6.0	6.0	19.0
P3.3	9.0	4.0	6.0	19.0
P3.4	7.0	4.0	6.0	17.0
P4.1	7.0	6.0	6.0	19.0
P4.2	7.0	6.0	9.0	22.0
P4.3	9.0	4.0	9.0	22.0
P4.4	7.0	6.0	6.0	19.0
P5.1	9.0	6.0	9.0	24.0
P5.2	9.0	8.0	9.0	26.0
P5.3	11.0	6.0	6.0	23.0
P5.4	9.0	6.0	9.0	24.0

LAMPIRAN 4

Skoring paru

KODE PREPARAT	SKOR PERUBAHAN HISTOPATOLOGI							TOTAL SKOR
	A	B	C	D	E	F	G	
P1.1	1	5.0	2.0	0.0	1.0	1.0	1.0	11.0
P1.2	2	7.0	2.0	0.0	1.0	3.0	4.0	19.0
P1.3	1	5.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	14.0
P1.4	1	7.0	2.0	0.0	1.0	2.0	2.0	15.0
P2.1	1	5.0	2.0	1.0	1.0	0.0	1.0	11.0
P2.2	1	7.0	1.0	0.0	1.0	1.0	2.0	13.0
P2.3	2	5.0	1.0	0.0	2.0	1.0	1.0	12.0
P2.4	1	5.0	2.0	1.0	1.0	2.0	1.0	13.0
P3.1	2.0	7.0	3.0	1.0	1.0	2.0	2.0	18.0
P3.2	2.0	7.0	2.0	3.0	2.0	3.0	3.0	22.0
P3.3	1.0	5.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	17.0
P3.4	3.0	7.0	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0	21.0
P4.1	3.0	9.0	3.0	3.0	3.0	4.0	4.0	29.0
P4.2	3.0	7.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	25.0
P4.3	2.0	9.0	4.0	2.0	2.0	4.0	4.0	27.0
P4.4	3.0	9.0	3.0	3.0	3.0	3.0	4.0	28.0
P5.1	4.0	11.0	3.0	3.0	3.0	5.0	3.0	32.0
P5.2	4.0	9.0	4.0	3.0	3.0	4.0	3.0	30.0
P5.3	3.0	11.0	4.0	4.0	4.0	5.0	2.0	33.0
P5.4	4.0	11.0	3.0	3.0	3.0	4.0	3.0	31.0

LAMPIRAN 5

Kruskal-Wallis Test Otak

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank
TOTAL_SKOR	P1	4	6.75
	P2	4	2.50
	P3	4	11.00
	P4	4	13.75
	P5	4	18.50
	Total	20	

Test Statistics^{a,b}

	TOTAL_SKOR
Chi-Square	17.792
Df	4
Asymptotic Significance	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Mann-Whitney Test

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P1	4	6.50	26.00
	P2	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.337
Asymptotic Significance (2-tailed)	.019
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Mann-Whitney Test

Ranks

PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR P1	4	2.75	11.00
_ P3	4	6.25	25.00
Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.084
Asymptotic Significance (2-tailed)	.037
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.057 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Mann-Whitney Test

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P1	4	2.50	10.00
	P4	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.352
Asymptotic Significance (2-tailed)	.019
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Mann-Whitney Test

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P1	4	2.50	10.00
	P5	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.337
Asymptotic Significance (2-tailed)	.019
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P2	4	2.50	10.00
	P3	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.381
Asymptotic Significance (2-tailed)	.017
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P2	4	2.50	10.00
	_ P4	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.352
Asymptotic Significance (2-tailed)	.019
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P2	4	2.50	10.00
	_ P5	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.337
Asymptotic Significance (2-tailed)	.019
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P3	4	3.25	13.00
	P4	4	5.75	23.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	13.000
Z	-1.667
Asymptotic Significance (2-tailed)	.096
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P3	4	2.50	10.00
	_ P5	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.381
Asymptotic Significance (2-tailed)	.017
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P4	4	2.50	10.00
	_ P5	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.352
Asymptotic Significance (2-tailed)	.019
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
NEKROSIS * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
INFLAMASI * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
GLIOSIS * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
TOTAL_SKOR * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

PERLAKUAN			NEKROSIS	INFLAMASI	GLIOSIS	TOTAL SKOR	
P1	1		5	4	6	15	
	2		5	2	6	13	
	3		5	4	9	18	
	4		5	4	6	15	
	Total	N	4	4	4	4	
		Mean	5.00	3.50	6.75	15.25	
		Median	5.00	4.00	6.00	15.00	
		Std. Deviation	.000	1.000	1.500	2.062	
	P2	1		5	2	0	7
		2		5	2	3	10
		3		5	0	0	5
		4		5	2	0	7
		Total	N	4	4	4	4
		Mean	5.00	1.50	.75	7.25	
	Median	5.00	2.00	.00	7.00		
	Std. Deviation	.000	1.000	1.500	2.062		
P3	1		7	6	6	19	
	2		7	6	6	19	
	3		9	4	6	19	
	4		7	4	6	17	
	Total	N	4	4	4	4	
		Mean	7.50	5.00	6.00	18.50	
	Median	7.00	5.00	6.00	19.00		
	Std. Deviation	1.000	1.155	.000	1.000		
P4	1		7	6	6	19	
	2		7	6	9	22	
	3		9	4	9	22	
	4		7	6	6	19	
	Total	N	4	4	4	4	
		Mean	7.50	5.50	7.50	20.50	
	Median	7.00	6.00	7.50	20.50		
	Std. Deviation	1.000	1.000	1.732	1.732		
P5	1		9	6	9	24	
	2		9	8	9	26	
	3		11	6	6	23	
	4		9	6	9	24	
	Total	N	4	4	4	4	
		Mean	9.50	6.50	8.25	24.25	
	Median	9.00	6.00	9.00	24.00		
	Std. Deviation	1.000	1.000	1.500	1.258		
Total	N		20	20	20	20	
	Mean		6.90	4.40	5.85	17.15	
	Median		7.00	4.00	6.00	19.00	
	Std. Deviation		1.889	2.010	2.996	6.081	

a. Limited to first 100 cases.

Kruskal-Wallis Test Paru-Paru

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank
TOTAL_SKOR	P1	4	6.13
	P2	4	3.38
	P3	4	10.00
	P4	4	14.50
	P5	4	18.50
	Total	20	

Test Statistics^{a,b}

	TOTAL_SKOR
Chi-Square	17.187
Df	4
Asymptotic Significance	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Mann-Whitney Test

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P1	4	5.63	22.50
	P2	4	3.38	13.50
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	3.500
Wilcoxon W	13.500
Z	-1.315
Asymptotic Significance (2-tailed)	.189
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR P1	4	3.00	12.00
P3	4	6.00	24.00
Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.732
Asymptotic Significance (2-tailed)	.083
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.114 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR P1	4	2.50	10.00
P4	4	6.50	26.00
Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymptotic Significance (2-tailed)	.021
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P1	4	2.50	10.00
	P5	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymptotic Significance (2-tailed)	.021
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P2	4	2.50	10.00
	P3	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymptotic Significance (2-tailed)	.020
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymptotic Significance (2-tailed)	.020
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR P2	4	2.50	10.00
P4	4	6.50	26.00
Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymptotic Significance (2-tailed)	.020
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P2	4	2.50	10.00
	_ P5	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymptotic Significance (2-tailed)	.020
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN		N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR	P3	4	2.50	10.00
	_ P4	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymptotic Significance (2-tailed)	.021
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR P3	4	2.50	10.00
_ P5	4	6.50	26.00
Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymptotic Significance (2-tailed)	.021
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Ranks

PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
TOTAL_SKOR P4	4	2.50	10.00
_ P5	4	6.50	26.00
Total	8		

Test Statistics^b

	TOTAL_SKOR
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymptotic Significance (2-tailed)	.021
Exact Significance [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
DEGENERASI * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
NEKROSIS * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
KONGESTI * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
OEDEMA * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
HEMORAGHI * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
ALVEOITIS * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
PERIVASCULITIS * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
TOTAL_SKOR * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		DEGENERASI	NEKROSIS	KONGESTI	OEDEMA	HEMORAGI	ALVEOITIS	PERIVASCULITIS	TOTAL	
PERLAKUAN	P1	1	1	5	2	0	1	1	11	
		2	2	7	2	0	1	3	19	
		3	1	5	1	1	2	2	14	
		4	1	7	2	0	1	2	15	
	Tot	N	4	4	4	4	4	4	4	
	al	Mean	1.25	6.00	1.75	.25	1.25	2.00	2.25	14.75
		Median	1.00	6.00	2.00	.00	1.00	2.00	2.00	14.50
		Std. Deviation	.500	1.155	.500	.500	.500	.816	1.258	3.304
	P2	1	1	5	2	1	1	0	1	11
		2	1	7	1	0	1	1	2	13
		3	2	5	1	0	2	1	1	12
		4	1	5	2	1	1	2	1	13
	Tot	N	4	4	4	4	4	4	4	4
	al	Mean	1.25	5.50	1.50	.50	1.25	1.00	1.25	12.25
		Median	1.00	5.00	1.50	.50	1.00	1.00	1.00	12.50
		Std. Deviation	.500	1.000	.577	.577	.500	.816	.500	.957
	P3	1	2	7	3	1	1	2	2	18
		2	2	7	2	3	2	3	3	22
		3	1	5	2	2	2	2	3	17
		4	3	7	3	2	1	3	2	21
Tot	N	4	4	4	4	4	4	4	4	
al	Mean	2.00	6.50	2.50	2.00	1.50	2.50	2.50	19.50	
	Median	2.00	7.00	2.50	2.00	1.50	2.50	2.50	19.50	
	Std. Deviation	.816	1.000	.577	.816	.577	.577	.577	2.380	
P4	1	3	9	3	3	3	4	4	29	
	2	3	7	3	3	3	3	3	25	
	3	2	9	4	2	2	4	4	27	
	4	3	9	3	3	3	3	4	28	
Tot	N	4	4	4	4	4	4	4	4	
al	Mean	2.75	8.50	3.25	2.75	2.75	3.50	3.75	27.25	
	Median	3.00	9.00	3.00	3.00	3.00	3.50	4.00	27.50	
	Std. Deviation	.500	1.000	.500	.500	.500	.577	.500	1.708	
P5	1	4	11	3	3	3	5	3	32	
	2	4	9	4	3	3	4	3	30	
	3	3	11	4	4	4	5	2	33	
	4	4	11	3	3	3	4	3	31	
Tot	N	4	4	4	4	4	4	4	4	
al	Mean	3.75	10.50	3.50	3.25	3.25	4.50	2.75	31.50	
	Median	4.00	11.00	3.50	3.00	3.00	4.50	3.00	31.50	
	Std. Deviation	.500	1.000	.577	.500	.500	.577	.500	1.291	
Tot	N	20	20	20	20	20	20	20	20	
al	Mean	2.20	7.40	2.50	1.75	2.00	2.70	2.50	21.05	
	Median	2.00	7.00	2.50	2.00	2.00	3.00	2.50	20.00	
	Std. Deviation	1.105	2.113	.946	1.333	.973	1.380	1.051	7.729	

a. Limited to first 100 cases.

Lampiran 1
Animal Welfare



DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES

Public Health Service

National Institutes of Health

FOR US POSTAL SERVICE DELIVERY:

Office of Laboratory Animal Welfare
6705 Rockledge Drive
RKL1, Suite 360, MSC 7982
Bethesda, Maryland 20892-7982

<http://www.nih.gov/grants/olaw/olaw>

FOR EXPRESS MAIL:

Office of Laboratory Animal Welfare
6705 Rockledge Drive-Suite 360
Bethesda, Maryland 20817
Telephone: 301-496-7163
FAX: 301-402-7065

February 12, 2014

Animal Welfare Assurance #A5966-01
Institution: Universitas Airlangga

Dr. Chairul A. Nidom
Chairman of Avian Influenza Research Center
Universitas Airlangga
Jl. Mulyorejo, C-Campus
Surabaya, Indonesia 60115

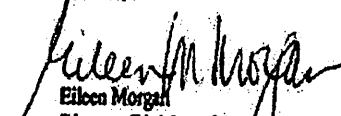
Dear Dr. Nidom:

The Animal Welfare Assurance for foreign institutions that you recently submitted to the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) has been reviewed and accepted. A copy of the signed Assurance is enclosed.

Your Assurance bears the identification number A5966-01 and became effective on February 12, 2014. The approval period is for five years, covers all Public Health Service (PHS) supported activities involving live vertebrate animals, and will expire on February 28, 2019.

Please include the Assurance number when corresponding with OLAW or with any funding component of the PHS.

Sincerely,


Eileen Morgan
Director, Division of Assurance
Office of Laboratory Animal Welfare

Enclosure

cc:
Dr. Ema Qurnianingsih
Dr. Pudji Srianto
Mr. Chuong Huynh, BARDA