

**SKRIPSI**

**RESPONS IMUN HUMORAL MENCIT TERHADAP  
BERBAGAI JENIS VAKSIN *AVIAN INFLUENZA*  
SUBTIPE H5 YANG DIUKUR DENGAN  
*INDIRECT ELISA***



OLEH :

**ANITA TRI PARYANTI**  
NIM 060413362

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2008**

**RESPONS IMUN HUMORAL MENCIT TERHADAP BERBAGAI  
JENIS VAKSIN AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5  
YANG DIUKUR DENGAN *INDIRECT ELISA***

**Skripsi**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan  
Pada  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga**

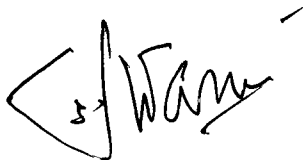
**Oleh**

**ANITA TRI PARYANTI**

**NIM 060413362**

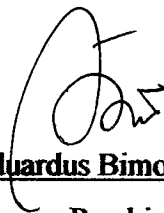
**Menyetujui**

**Komisi Pembimbing**



**(Dr. Suwarno, M.Si., drh)**

**Pembimbing Pertama**



**(Dr. Eduardus Bimo Aksono, M.Kes., drh)**

**Pembimbing Kedua**

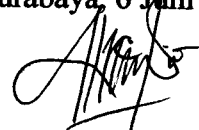
## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**RESPONS IMUN HUMORAL MENCIT TERHADAP BERBAGAI JENIS  
VAKSIN *AVIAN INFLUENZA* SUBTIPE H5 YANG  
DIUKUR DENGAN INDIRECT ELISA**

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

Surabaya, 6 Juni 2008



Anita Tri Paryanti  
NIM 060413362

**Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian**

**Tanggal : 21 Juli 2008**

**KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN**

- Ketua** : Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., drh
- Sekretaris** : Garry Cores de Vries, M.Sc., M.S., drh
- Anggota** : Jola Rahmahani, M.Kes., drh
- Pembimbing I** : Dr. Suwarno, M.Si., drh
- Pembimbing II** : Eduardus Bimo Aksono, M.Kes., drh

Telah diuji pada

Tanggal : 4 Agustus 2008

**KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

**Ketua** : Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., drh

**Sekretaris** : Garry Cores de Vries, M.Sc., M.S., drh

**Anggota** : Jola Rahmahani, M.Kes.,drh

**Pembimbing I** : Dr. Suwarno, M.Si., drh

**Pembimbing II** : Eduardus Bimo Aksono, M.Kes., drh

Surabaya, 6 Agustus 2008

**Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan,**



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

**HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF MICE TO VACCINE VARIETIES  
OF AVIAN INFLUENZA SUBTYPE H5 WHICH  
MEASURED WITH ELISA INDIRECT**

**ANITA TRI PARYANTI**

**ABSTRACT**

The main purpose of this research was to know the humoral immune response of mice to vaccine varieties of avian influenza subtype H5 which measured with ELISA indirect. For design study was Completely Randomized Design with four treatments and six replications. Group I (vaccine of avian influenza H5N1 treatment), group II (vaccine of avian influenza H5N2 treatment), group III (vaccine of avian influenza H5N9 treatment), and group IV (as control without vaccine treatment). The result showed an extremely actual differences ( $p < 0,01$ ) of OD value of antibodies. Thus all of the group have differences of OD value in antibodies, group I has the highest OD value and group III has the lowest of OD value which is not so different with group IV as a control.

Keywords : *Avian influenza, vaccine, ELISA*

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala nikmat dan karunia-Nya yang dilimpahkan selama ini sehingga penelitian yang berjudul : “Respons Imun Humoral Mencit Terhadap Berbagai Jenis Vaksin *Avian Influenza* Subtipe H5 Yang Diukur Dengan *Indirect ELISA*” dapat terselesaikan.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih yang kepada: Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Dr. Suwarno, M.Si., drh selaku dosen pembimbing pertama dan Dr. Eduardus Bimo Aksono, M.Kes., drh selaku dosen pembimbing kedua atas segala bantuan dan bimbingan serta dorongan semangat yang telah diberikan kepada penulis sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik; Kepada Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., drh; Dr. Garry Cores de Vries, M.Sc, M.S., drh; Jola Rahmahani, M.Kes., drh selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan berupa saran dan kritik yang sangat berharga demi perbaikan tulisan ini; seluruh staf Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga; Kepada Bapak dan Ibu Tercinta (Pardi, S.Pd. dan Siti Mutmainah, S.Pd.) yang telah mendidik penulis dengan rasa ikhlas dan sabar; Kepada Mas Arys Eko Parwanto, ST., Mbak Ary Dwi Parwanti, SE., serta semua keluargaku semoga perjuangan penulis ini bisa bermanfaat untuk kita semua.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Kadek Rachmawati. M.Kes., Drh. Selaku dosen wali yang selama ini selalu memberikan dorongan dan motivasi kepada penulis agar tetap semangat menempuh kuliah, dan kepada semua pihak yang telah membantu baik moril maupun materiil sampai terselesainya penelitian ini, semoga Allah SWT membalasnya dengan yang jauh lebih baik.

Penulis menyadari bahwa dalam tulisan ini masih banyak kekurangan dan masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk dijadikan sebagai koreksi demi perbaikan tulisan ini. Dengan segala kerendahan hati, penulis berharap semoga penelitian ini dapat memberikan sumbangan pemikiran di bidang Kedokteran Hewan serta semua pihak yang membutuhkan.

Surabaya, 6 Agustus 2008

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG</b> .....	xiv
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Landasan Teori.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
1.6 Hipotesis Penelitian.....	6
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	7
2.1 Tinjauan Tentang <i>Avian Influenza</i> .....	7
2.1.1 Kejadian Penyakit <i>Avian Influenza</i> .....	7
2.1.2 Etiologi dan Morfologi .....	10
2.1.3 Sifat Virus .....	13
2.1.4 Patogenesis .....	15
2.1.5 Gejala Klinis dan Patologi Anatomi .....	17
2.2 Sistem Kekebalan Tubuh.....	19
2.2.1 Sistem Imun.....	19
2.2.2 Vaksin.....	20
2.3 Uji <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i> .....	21
2.3.1 Teknik <i>Indirect ELISA</i> .....	23
2.4 Tinjauan Mengenai Mencit.....	24
<b>BAB III. MATERI DAN METODE PENELITIAN</b> .....	26
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	26
3.2 Materi Penelitian.....	26
3.2.1 Bahan dan Alat Penelitian.....	26
3.2.1.1 Bahan Penelitian.....	26
3.2.1.2 Alat Penelitian.....	26
3.3 Metode Penelitian.....	27
3.3.1 Prosedur Penelitian.....	27
3.3.1.1 Vaksinasi Hewan Coba.....	27
3.3.1.2 Pengambilan Serum untuk Uji <i>Indirect ELISA</i> .....	27

3.3.1.3 Uji <i>Indirect</i> ELISA.....	28
3.3.1.4 Peubah yang Diamati.....	29
3.3.1.5 Variabel Penelitian.....	29
3.3.1.6 Rancangan Percobaan dan Analisis Data.....	29
3.3.1.7 Kerangka Operasional .....	31
<b>BAB 4 HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>32</b>
<b>BAB 5 PEMBAHASAN.....</b>	<b>35</b>
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>40</b>
6.1 Kesimpulan.....	40
6.2 Saran.....	40
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>41</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>44</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>49</b>

**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
2.1. Wabah penyakit <i>avian influenza (Highly Pathogenic Avian Influenza)</i> di beberapa negara berdasarkan waktu kejadian, negara dan subtipe .....	9
4.1. Data statistik rata-rata nilai <i>Optical Density (OD)</i> yang diuji dengan <i>indirect ELISA</i> .....	32

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Ilustrasi virus <i>avian influenza</i> H5N1.....	12
2.2. <i>Electron micrograph of Influenza A viruses</i> .....	13
2.3. Penularan global virus <i>avian influenza</i> .....	16
3.1. Bagan alur penelitian.....	31
4.1. Grafik statistik nilai OD antibodi pada tiap perlakuan yang diamati pada waktu pengamatan 10 menit.....	33
4.2. Grafik statistik nilai OD antibodi pada tiap perlakuan yang diamati pada waktu pengamatan 15 menit.....	33
4.3. Peningkatan nilai <i>optical density</i> (OD) antibodi yang diuji dengan <i>indirect</i> ELISA pada waktu pengamatan 10 menit dan 15 menit.....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji <i>indirect</i> ELISA.....	49
2. Tabel hasil pembacaan uji <i>indirect</i> ELISA menggunakan ELISA <i>reader</i> .....	51
3. Analisis statistik (ANOVA dan BNJ 5%) uji <i>indirect</i> ELISA pada waktu pengamatan 10 menit.....	52
4. Analisis statistik (ANOVA dan BNJ 5%) uji <i>indirect</i> ELISA pada waktu pengamatan 15 menit.....	53
5. Hasil uji <i>indirect</i> ELISA pada mikroplate datar.....	54
6. Jenis vaksin yang digunakan.....	54
7. Proses pengambilan darah pada mencit.....	54

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

AI	: <i>Avian Influenza</i>
ANOVA	: <i>Analisis Of Variance</i>
BNJ	: <i>Beda Nyata Jujur</i>
CEF	: <i>Chicken Embryo Fibroblast</i>
CFR	: <i>Case Fatality Rate</i>
ELISA	: <i>Enzim Linked Imunosorbent Assay</i>
HA	: <i>Hemaglutinin</i>
HPAI	: <i>Highly Pathogenecity Avian Influenza</i>
Ig G	: <i>Imunoglobulin G</i>
LPAI	: <i>Low Pathogenicity Avian Influenza</i>
ml	: <i>milliliter</i>
NA	: <i>Neuraminidase</i>
nm	: <i>nanometer</i>
NK	: <i>Natural Killer (cell)</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
OIE	: <i>Office International des Epizooties</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
p-NPP	: <i>para Nitrophenyl Phosphate</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
RNA	: <i>Ribonucleid Acid</i>
RPM	: <i>Rotation per Minute</i>

**SPSS** : *Statistical Program and Service Solution*

**TAB** : *Telur Ayam Bertunas*

**WHO** : *World Health Organization*

**μl** : *Mikroliter*

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kasus *Avian Influenza* (AI) pada ayam pertama kali dilaporkan di Indonesia pada tahun 2004. Ada kasus kematian ayam ternak yang luar biasa terjadi di 11 Propinsi di Indonesia (terutama di Bali, Bogor, Tangerang, Bekasi, Jawa Timur, Jawa Tengah, Kalimantan Barat dan Jawa Barat). Awalnya kematian tersebut diduga disebabkan oleh virus *New Castle Disease*, namun konfirmasi terakhir oleh Departemen Pertanian kasus kematian ayam ternak tersebut disebabkan oleh virus *avian influenza*. Jumlah unggas yang mati akibat wabah penyakit *avian influenza* sangat besar yaitu 3.842.275 ekor (4,77%) dan jumlah kematian yang paling tinggi terjadi di Jawa barat (1.541.427 ekor). Pada bulan Juli 2005, untuk pertama kalinya dilaporkan kasus *avian influenza* pada manusia dan pada kasus tersebut penderita meninggal dunia. Sejak saat itu kasus terus terjadi di Indonesia (Martini, 2007).

Wabah penyakit *avian influenza* juga telah melanda dunia, khususnya kawasan Asia antara lain : Cina, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia. Penyakit ini juga telah menyerang kawasan Eropa dan Afrika. *Avian influenza* merupakan salah satu penyakit yang penting pada industri perunggasan karena mortalitas dan morbiditas yang tinggi pada unggas dan sangat merugikan para peternak. Penularan *avian influenza* dapat terjadi secara horizontal baik secara kontak langsung dengan ayam sakit, maupun secara tidak langsung melalui pakan atau air minum, pekerja atau staf peternakan, kandang atau perlengkapan



peternakan, *egg trays* atau peti telur, keranjang ayam dan alat transportasi yang tercemar virus tersebut (OIE, 2005; Stevens *et al.*, 2006 ).

Menurut WHO (2005), pencegahan dan pemberantasan virus *avian influenza* dapat dilakukan dengan kombinasi biosekuriti yang terprogram dan vaksinasi. Penggunaan vaksin yang terus menerus tanpa terkontrol secara baik dapat menimbulkan suatu kondisi yang merugikan, terutama yang berkaitan dengan kemampuan virus *avian influenza* dalam melakukan mutasi. Efektivitas vaksinasi dan tingkat kegagalannya tergantung dari beberapa faktor antara lain : kualitas vaksin, kondisi ayam dan cara vaksinasi. Vaksin yang digunakan untuk mencegah penyebaran *avian influenza* harus mampu menimbulkan antibodi dan memberikan perlindungan kolektif atau respons imun pada hospes (Machdum, 2007).

Vaksin inaktif H5N1 mulai digunakan untuk mengendalikan wabah *avian influenza* di Indonesia sejak awal ditemukannya wabah dan langkah itu dapat dikatakan efektif karena jenis vaksin yang digunakan sesuai dengan jenis virusnya, tetapi distribusi vaksin *avian influenza* di Indonesia lebih didominasi oleh vaksin H5N2 dan vaksin H5N9. Pemerintah juga telah menerapkan kebijaksanaan vaksinasi massal terhadap unggas dengan menggunakan vaksin H5N2 dan vaksin H5N9. Departemen Pertanian juga mengungkapkan masih mempertahankan pemakaian vaksin H5N2 dan H5N9 untuk mengatasi virus *avian influenza* pada unggas karena jenis vaksin tersebut dianggap lebih aman sebab vaksin H5N2 dan vaksin H5N9 bersifat *low pathogenic* sehingga bagus untuk

memberikan imunitas kepada unggas, padahal virus yang menyerang di Indonesia adalah virus *avian influenza* dari sub tipe H5N1 (Utama, 2005; Machdum, 2007).

Untuk mendeteksi adanya antibodi dalam memacu respons imun diperlukan suatu uji serologis. Uji *indirect* ELISA merupakan konfigurasi paling sederhana yang sering digunakan untuk mengukur titer antibodi karena bahan yang digunakan untuk uji ini sudah banyak dipasarkan dan mudah dibeli dipasaran (Rantam, 2003). Mencit merupakan binatang laboratorium yang sering digunakan untuk tujuan medis (60-80%) dan uji serologis karena mencit murah, mudah berkembang biak, mudah dipelihara, daya tahannya tinggi dan mudah diambil darahnya (Smith, 1995).

Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan suatu penelitian untuk mengetahui kemampuan vaksin *avian influenza* H5N1, H5N2, dan vaksin H5N9 yang banyak beredar di Indonesia untuk memproduksi antibodi dalam memacu respons imun mencit (*Mus musculus*) terhadap virus *avian influenza* yang diukur dengan menggunakan uji *indirect* ELISA.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan di atas maka dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu bagaimanakah respons imun humoral mencit (*Mus musculus*) pasca vaksinasi terhadap berbagai jenis vaksin *avian influenza* sub tipe H5 ?

### 1.3 Landasan Teori

*Avian influenza* merupakan virus influenza tipe A dari famili *Orthomyxoviridae*. Virus ini merupakan virus RNA yang mempunyai hemaglutinin dan neuraminidase (Harimoto and Kawaoka, 2001). Virus ini pertama kali dilaporkan pada unggas di Italia Utara kemudian menyebar ke beberapa Negara dan kasus *avian influenza* di Indonesia dilaporkan terjadi pada tahun 2004 (Ito *et al.*, 2001).

Machdum (2007) menyebutkan bahwa wabah *avian influenza* mempunyai arti yang sangat penting karena sangat merugikan para peternak dengan tingkat kematian yang tinggi pada unggas, sehingga sangat berpengaruh terhadap stabilitas ekonomi. Vaksinasi diperlukan dalam penanganan *avian influenza* karena akan melindungi gejala klinis, mortalitas, mengurangi populasi yang rentan dan juga mengurangi pencemaran atau *shedding* virus di lokasi peternakan. Kunci keberhasilan vaksinasi ditentukan oleh penggunaan vaksin yang berkualitas tinggi yang harus didukung oleh manajemen optimal, terutama biosekuriti yang ketat. Vaksin harus diberikan terlebih dahulu sebelum terjadinya infeksi oleh agen infeksi lapang dan harus mampu merangsang sistem kekebalan untuk mengaktifkan pembentukan antibodi.

Imunitas adalah resistensi terhadap penyakit terutama penyakit infeksi. Gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi disebut sistem imun. Respons imun merupakan reaksi yang dikoordinasi sel-sel, molekul-molekul terhadap mikroba dan bahan lainnya (Baratawidjaja, 2006).

Pemerintah telah menerapkan kebijaksanaan vaksinasi massal terhadap unggas dengan menggunakan vaksin H5N2 dan vaksin H5N9. Departemen Pertanian juga mengungkapkan masih mempertahankan pemakaian vaksin H5N2 dan H5N9 untuk mengatasi virus *avian influenza* pada unggas, karena jenis vaksin tersebut dianggap lebih aman (Suatmodjo, 2007).

ELISA adalah salah satu metode yang sensitif untuk mendeteksi antibodi (Rantam, 2003). Pada kebanyakan penelitian uji serologis, mencit adalah hewan coba yang sering digunakan karena yang murah, cepat berkembang biak, mudah dalam perawatannya, memiliki daya tahan yang tinggi serta mudah untuk diambil darahnya. Mencit juga merupakan hewan coba yang dapat digunakan dalam pembuatan antibodi monoklonal (Smith, 1995; Cucchi *et al.*, 2005).

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Mengetahui respons imun humoral mencit (*Mus musculus*) terhadap berbagai jenis vaksin *avian influenza* subtipe H5.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Apabila tujuan penelitian ini tercapai, maka akan dapat diketahui vaksin mana yang dapat menunjukkan nilai OD antibodi tertinggi dalam memacu respons imun humoral yang paling baik terhadap virus *avian influenza* H5N1, sehingga dapat dijadikan salah satu sumber informasi ilmiah serta dapat digunakan sebagai referensi bagi semua pihak yang membutuhkan.

## 1.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah terdapat perbedaan nilai OD antibodi pada mencit yang telah diberi perlakuan dengan berbagai vaksin *avian influenza* sub tipe H5.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Tentang *Avian Influenza*

#### 2.1.1 Kejadian Penyakit *Avian Influenza*

*Avian influenza* merupakan suatu penyakit yang biasanya menyerang unggas yang disebabkan oleh virus influenza tipe A. Penyakit ini dikenal juga dengan nama *avian flu* dan dapat menimbulkan penyakit dengan derajat keparahan yang bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat asimtomatik sampai penyakit yang fatal dan bersifat multisistemik (Swayne and Suarez, 2003).

Rahardjo dan Nidom (2004) menyebutkan penyakit *avian influenza* pertama kali dilaporkan terjadi di Italia pada tahun 1878 sebagai "*Fowl Plaque*". Pada tahun 1959 ditemukan virus *avian influenza* subtipe H5N1 yang menyerang ternak unggas dan menular ke manusia di Skotlandia. Tahun 1961 ditemukan penyakit *avian influenza* di Afrika Selatan dengan subtipe H5N3. Wabah *avian influenza* berjangkit di beberapa Negara antara lain : Eropa, Afrika Selatan, Inggris, Australia, Belanda, Belgia. Australia dan Inggris merupakan dua negara yang banyak mengalami kasus *avian influenza* (Stevens *et al.*, 2006).

Kasus *avian influenza* kembali terjadi dan menggemparkan masyarakat dunia dengan ditemukannya kasus *avian influenza* pada peternakan angsa di Guandong (Cina) pada tahun 1996 dengan subtipe virus H5N1 yang sangat pathogen (*highly pathogenic avian influenza*), kemudian pada tahun 1997 menyusul kasus di Hongkong yang ditemukan *avian influenza* pada peternakan ayam dan pasar hewan. Pada tahun yang sama, dilaporkan pertama kali 18 kasus

*avian influenza* pada manusia di Hongkong dengan subtipe virus H5N1 (Gauthier *et al.*, 2007).

Stevens *et al.*, (2006) menyebutkan bahwa hospes alami dan reservoir virus *avian influenza* adalah unggas air liar. Jenis unggas tersebut biasanya menunjukkan infeksi pencernaan asimtomatik, tetapi dapat membebaskan virus *avian influenza* dalam jumlah yang besar melalui feses. Virus *avian influenza* yang ganas jarang ditemukan pada reservoir unggas liar, tapi sumber infeksi virus tersebut dapat ditemukan pada unggas peliharaan. Sejak akhir 2003 virus *avian influenza* subtipe H5N1 telah menyebar dipeternakan unggas beberapa negara Asia termasuk Cina, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, bahkan menyerang populasi unggas di Eropa dan Afrika. Kasus yang terjadi di Eropa Barat pada Februari 2006 setelah musim dingin menunjukkan virus ini dapat menginfeksi dan menyebar melalui burung-burung liar yang melakukan perjalanan jarak pendek atau migrasi musiman. Terdapat sekitar 65 negara telah melaporkan kepada WHO adanya kasus *avian influenza* dengan area geografis yang luas atau menyebar ke seluruh dunia. Virus *avian influenza* dapat menyerang mamalia terutama manusia. Tidak kurang dari 191 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus *avian influenza* H5N1 dan 108 diantaranya meninggal. Di Indonesia sendiri sampai dengan Februari 2007 tercatat 83 orang terinfeksi dengan virus *avian influenza* dan 63 orang diantaranya meninggal, sehingga diperlukan pemahaman yang benar dalam pengendalian wabah dan pencegahan terjadinya pandemi influenza.

Tabel 2.1. Wabah Penyakit *avian influenza* (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) di beberapa negara berdasarkan waktu kejadian, negara dan sub tipe (Liu *et al.*, 2005).

Waktu kejadian	Negara	Subtipe
Desember 2003	Korea Selatan	H5N1
Januari 2004	Vietnam	H5N1
	Thailand	H5N1
	Korea Utara	H5N1
	Jepang	H5N1
	Laos	H5
	Kamboja	H5N1
	Pakistan	H7
	Taiwan	H5N2
	Hongkong	H5N1
Februari 2004	Vietnam	H5N1
	Indonesia	H5N1
	Korea Utara	H5N1
	Jepang	H5N1
	RRT	H5N1
	Amerika Serikat	H2N2,H5N2,H7N2
Maret 2004	Vietnam	H5
	Kanada	H7N3
April 2004	Thailand	H5
Agustus 2004	Malaysia	H5N1
	Afrika Selatan	H5N2
April 2005	Korea Utara	H7
Juni 2005	Jepang	H5N2
Juli 2005	Filipina	H5
	Rusia	H5N1
Agustus 2005	Kazakhstan	H5
	Mongolia	H5N1
Oktober 2005	Rumania	H5N1
	Turki	H5N1
	Kroasia	H5N1
November 2005	Vietnam	H5N1
Awal 2007	Korea Selatan, Laos, Vietnam, Jepang, Thailand, Cina, Kamboja, Taiwan, Pakistan, Indonesia.	H5N1



Di Indonesia, kasus *avian influenza* pada unggas pertama kali dilaporkan pada tahun 2004. Kasus *avian influenza* tersebut terjadi pada peternakan ayam di 11 propinsi dan wabah tersebut terus berlanjut sampai sekarang. Pada bulan Juli 2005 pertama kalinya kasus *avian influenza* terjadi di manusia di Tangerang Propinsi Banten. Penyakit ini membawa korban tiga orang meninggal dalam satu keluarga. Kasus *avian influenza* pada manusia di Indonesia telah terjadi di 10 propinsi dengan jumlah penderita 94 orang dan sebanyak 74 orang diantaranya meninggal. Propinsi Jawa Barat dan DKI Jakarta menduduki tempat teratas dalam jumlah kasus *avian influenza*. Berdasarkan data tersebut, tampak bahwa penyakit *avian influenza* sangat mematikan karena *case fatality rate* (CFR)-nya hampir 80% (Judarwanto, 2006).

### 2.1.2 Etiologi dan Morfologi

Virus *avian influenza* termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae* dan merupakan virus influenza tipe A. Virus *avian influenza* mempunyai aktivitas Hemaglutinin dan Neuraminidase dan merupakan virus RNA (Ito *et al.*, 2001). Virus influenza terdiri atas tiga tipe antigenik yang berbeda yaitu influenza tipe A, influenza tipe B dan influenza tipe C. Setiap tipe dari virus influenza ditentukan oleh struktur antigenik protein nuklei dan matriks antigen yang saling berhubungan erat di antara virus tertentu. Virus influenza A menyerang ayam dan manusia, virus influenza B menyerang manusia dan virus influenza C menyerang babi dan manusia. Virus influenza tipe A dapat menyebabkan epidemik dan pandemik pada unggas dan mamalia, termasuk manusia (Hoffmann *et al.*, 2000;

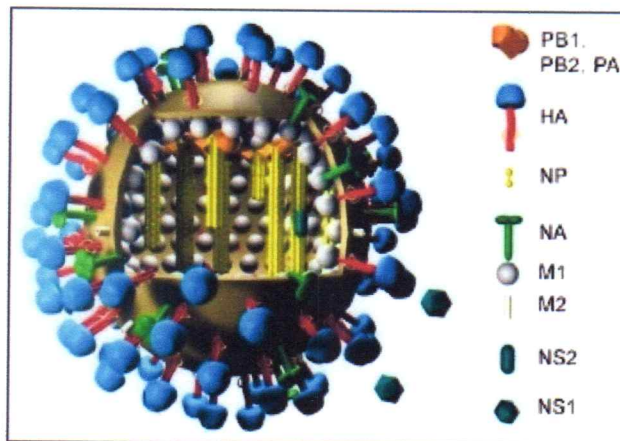
Clavigo *et al*, 2001; Donateli *et al*, 2001). Virus influenza B dan C hanya dapat menimbulkan sakit ringan dan tidak menyebabkan epidemik (Radji, 2006).

Genom dari virus influenza tipe A berupa RNA tunggal, *sense negative*, sepanjang kurang lebih 13.588 nukleotida yang tersusun dalam delapan segmen yang menyandi 10 macam protein. Bentuk virus *avian influenza* seperti bola atau ramping yang memiliki diameter 80-120 nm. Virus ini mempunyai amplop dengan lipid bilayer yang berasal dari hospes dan ditutupi dengan sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktivitas hemaglutinasi dan neuraminidase (Kenneth, 2007).

Harder and Werner (2006) menyebutkan berdasarkan atas struktur antigen permukaan yaitu Hemaglutinin (H) dan Neuraminidase (N), tipe virus influenza A dikelompokkan menjadi 16 subtipe H (H1-H16) dan 9 subtipe N (N1-N9). Diantara 16 subtipe H, hanya H5 dan H7 yang bersifat ganas (virulen) pada unggas. Hanya virus influenza tipe A dengan kombinasi semua H dan N yang diketahui dapat berperan sebagai penyebab infeksi alam pada berbagai jenis bangsa burung, dan kombinasi ini menyebabkan banyaknya variasi antigenik dari virus *avian influenza*. Dari kombinasi keduanya ini diperoleh sejumlah 135 macam subtipe virus influenza (Akoso, 2006).

Hemaglutinin (HA) adalah molekul glikoprotein selubung virus yang berfungsi untuk mengikatkan virus ke reseptor sel target dan mengawali terjadinya infeksi (Fouchier *et al.*, 2005), sedangkan neuraminidase (NA) adalah suatu enzim yang dibutuhkan virus untuk melepas keturunan virus dari sel yang

terinfeksi dan juga mempunyai aktivitas melepas ikatan antara hemagglutinin dengan permukaan eritrosit (Vines *et al.*, 1998).



Keterangan :

- HA : Hemagglutinin
- NA : Neuraminidase
- NP : Nukleokapsid protein, virus influenza tipe A, B dan C dibedakan berdasarkan nucleoprotein yang dimiliki.
- M1 dan M2 : M1 membentuk protein matrix (hanya pada virus Influenza tipe A), M2 berfungsi untuk menurunkan Ph endosom.
- NS : Protein nonstruktural
- PA : Protein Polymerase A
- PB1 : Protein Polymerase B1
- PB2 : Protein Polymerase B2

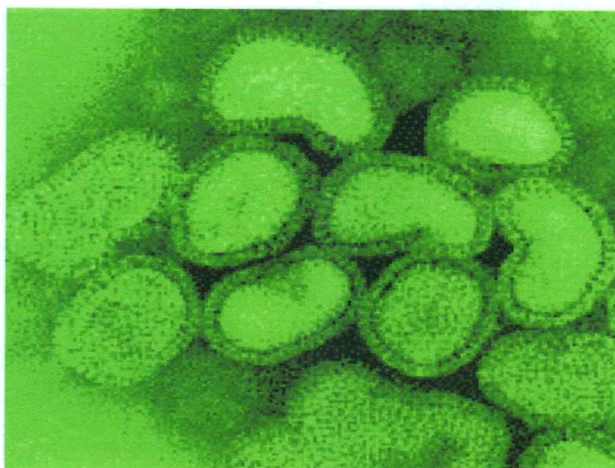
Gambar 2.1. Ilustrasi virus *avian influenza* H5N1(Gürtler, 2006)

Tumpey *et al.*, (2002) mengungkapkan variasi antigenik dari *virus influenza* dapat ditemukan dengan frekuensi yang tinggi dan terjadi melalui dua cara, yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift*. *Antigenic drift* atau penyimpangan antigen adalah perubahan kecil pada virus yang terjadi setiap saat. *Antigenic drift* memunculkan virus yang berbeda dengan sebelumnya, sehingga tidak dapat dikenali oleh sistem kekebalan tubuh. Akibatnya orang yang telah kebal terhadap virus sebelumnya karena terpapar menjadi beresiko untuk sakit kembali,

sedangkan *antigenic shift* adalah kemampuan virus influenza untuk mengubah molekul-molekul H dan N.

### 2.1.3 Sifat Virus

Virus *avian influenza* relatif tidak stabil di lingkungan. Virus ini dapat inaktif oleh faktor-faktor lingkungan seperti panas, pH yang ekstrim, kekeringan dan kondisi non isotonik. Karena virus ini mempunyai membran lipid dibagian luarnya maka virus ini peka terhadap pelarut organik, detergen dan desinfektan seperti ammonium kuartener, aldehid dan iodine (Siegel, 2006).



Gambar 2.2 *Electron micrograph of influenza A viruses* (Nicholls, 2006)

Virus *avian influenza* terlindung oleh bahan organik yang ada dalam kandang seperti lendir, darah dan tinja. Virus *avian influenza* masih tetap infeksius dalam feses selama 30-35 hari pada temperatur 4°C dan selama 7 hari pada temperatur 20°C. Virus *avian influenza* yang bersifat infeksius dapat diisolasi dari cairan kotoran ayam selama 105 hari setelah depopulasi ayam pada saat terjadinya

letupan *avian influenza*. Virus *avian influenza* dapat bertahan hidup di air sampai 4 hari pada suhu 22<sup>0</sup>C dan lebih dari 30 hari pada suhu 0<sup>0</sup> C. Virus akan mati pada pemanasan 60<sup>0</sup> C selama 30 menit atau 56<sup>0</sup> C selama 3 jam. Virus *avian influenza* dapat diisolasi dari air danau atau kolam yang terletak di daerah yang banyak dihuni oleh unggas air, virus *avian influenza* tidak dapat diisolasi setelah unggas air meninggalkan daerah tersebut. Keadaan ini sesuai dengan pendapat Hal ini dapat menunjukkan bahwa virus *avian influenza* dapat bertahan di lingkungan tetapi tidak dalam waktu yang lama. Virus *avian influenza* tumbuh di dalam telur ayam bertunas umur 9-11 hari. Virus ini juga tumbuh pada kultur jaringan *chicken embryo fibroblast* (CEF) dan uji in vivo dapat dilakukan pada ayam, kalkun dan itik (Tabbu, 2000).

Virus *avian influenza* secara umum dibedakan menjadi dua yaitu HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) dan LPAI (*Low Pathogenic Avian Influenza*) (Jones and Swayne, 2003).

#### 1. LPAI (*Low Pathogenic Avian Influenza*)

Menurut Fadilah dkk. (2007), Hampir sebagian besar subtipe virus AI termasuk golongan ini, yaitu virus AI yang menyerang ayam dengan gejala ringan, tidak bersifat ganas, dan biasanya tidak menimbulkan infeksi sekunder. Virus AI golongan ini berasal dari virus subtipe H1 hingga H16.

Virus golongan LPAI menyerang pada alat pernapasan dan saluran pencernaan. Ayam yang terinfeksi LPAI dapat sembuh dalam waktu seminggu dengan gejala pernapasan. Ayam yang sembuh ini dapat menularkan virus melalui

feses. Virus LPAI mampu mengalami mutasi atau *antigenic drift* menjadi HPAI (Jones and Swayne, 2003).

## 2. HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*)

Virus HPAI dapat menyerang selain pada alat pernapasan dan pencernaan, sehingga mampu menyerang dan merusak hampir semua organ tubuh, termasuk sistem syaraf dan peredaran darah. Kematian akibat HPAI berlangsung cepat yang didahului dengan gejala pernafasan atau kadang tanpa gejala. Angka kematian dan morbiditas dapat mencapai 100 persen (Jones and Swayne, 2003). Virus jenis HPAI dengan sub tipe H5N1 inilah yang mengakibatkan wabah AI di Indonesia sejak tahun 2003 (Fadilah dkk., 2007).

### 2.1.4 Patogenesis

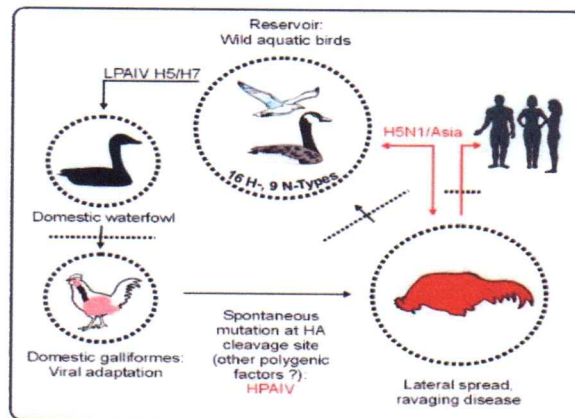
*Avian influenza* dapat ditularkan melalui kontak langsung dari unggas yang terinfeksi dan tinja. Penularan juga dapat secara tidak langsung misalnya melalui debu yang mengandung virus, air minum, kendaraan, kandang ayam, burung, mamalia, dan lain-lain (Tabbu, 2000).

Burung liar dan unggas domestikasi (ternak) dapat menjadi sumber penyebaran H5N1. Kasus *avian influenza* di Asia Tenggara penularannya melalui jalur transportasi peternakan unggas dan jalur migrasi burung liar (Stilianakis *et al.*, 2007). Virus ini dapat menular melalui udara ataupun kontak melalui makanan dan sentuhan, tetapi virus ini akan mati dalam suhu yang tinggi. Daging dan telur harus dimasak dengan matang untuk menghindari penularan. Kebersihan diri



perlu dijaga pula dengan mencuci tangan dengan antiseptik dan kebersihan tubuh dan pakaian juga perlu dijaga (Martini, 2007).

Beard (2004) menyebutkan belum ada bukti yang mendukung mengenai penularan *avian influenza* secara vertikal (melalui telur). Induk ayam yang terinfeksi *avian influenza* akan menghasilkan telur dengan permukaan kerabang dan bagian dalam telur yang terkontaminasi virus, tetapi telur yang tercemar virus ini tidak akan menetas.



Gambar 2.3 Penularan global virus *avian influenza* (Ungchusak *et al.*, 2005)

Virus dapat bertahan hidup pada suhu dingin. Bahan makanan yang didinginkan atau dibekukan dapat menyimpan virus. Tangan harus dicuci sebelum dan setelah memasak atau menyentuh bahan makanan mentah. Unggas sebaiknya tidak dipelihara di dalam rumah atau ruangan tempat tinggal. Peternakan harus dijauhkan dari perumahan untuk mengurangi resiko penularan, karena virus *avian influenza* selalu bermutasi dan dapat membahayakan keselamatan manusia (Martini, 2007).

Proses infeksi pertama terjadi secara inhalasi (menghirup) atau ingesti (memakan) virus *avian influenza*. Tahap keduanya, virion masuk ke submukosa melalui kapiler. Virus mengalami replikasi dalam sel endotel dan menyebar melalui sistem peredaran darah atau sistem limfatik untuk menginfeksi dan replikasi dalam bermacam-macam tipe sel organ visceral, otak dan kulit. Gejala klinis dan kematian disebabkan kegagalan multiplikasi sel. Kerusakan yang disebabkan virus *avian influenza* terdiri dari tiga proses antara lain : Proses perbanyakan diri virus secara langsung dalam sel dan jaringan dan otak, yang kedua efek secara tidak langsung dari produksi mediator seluler seperti sitokin, dan ketiga Iskemia (suplai darah yang tidak mencukupi) akibat adanya bekuan darah (thrombus) dalam jantung atau pembuluh darah. Tahap ketiga dari patogenesis penyakit *avian influenza* yaitu replikasi virus biasanya terbatas pada saluran pernapasan dan pencernaan. Morbiditas dan mortalitas terutama akibat kerusakan pada saluran pernapasan khususnya jika terjadi komplikasi dengan infeksi sekunder oleh bakteri. *Avian influenza* menyebar secara sistemik, memperbanyak diri dan menimbulkan kerusakan pada ginjal dan sel-sel organ yang lain (Pandhi *et al.*, 2004).

### **2.1.5 Gejala Klinis dan Patologi Anatomi**

Masa inkubasi *avian influenza* pada unggas berkisar antara beberapa jam sampai beberapa hari. Masa inkubasi tersebut tergantung pada dosis virus, rute kontak, dan spesies unggas yang terserang. *Avian influenza* dapat ditemukan dalam 2 bentuk, yaitu bentuk akut (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) dan



bentuk ringan (*Low Pathogenic Avian Influenza*) (Fenner *et al.*, 1995). Gejala *avian influenza* pada manusia pada dasarnya mirip seperti flu biasa, hanya cenderung lebih cepat menjadi parah. Masa inkubasinya antara 2-4 hari atau dapat lebih panjang, yang diikuti dengan demam, sakit kepala, nyeri otot dan sendi, sakit tenggorokan, batuk dan kesulitan bernafas, jika terlambat dapat berkembang menjadi *multiorgan failure* dan berakhir dengan kematian (Asmara, 2007).

Bentuk akut ditandai oleh adanya proses penyakit yang cepat yang disertai mortalitas tinggi, gangguan pernapasan, lakrimasi yang berlebihan, sinusitis, edema didaerah kepala dan muka, perdarahan jaringan subcutan yang diikuti oleh sianosis pada kulit, terutama didaerah muka, jengger, pial, dada, tungkai dan telapak kaki, diare, gangguan produksi telur dan gangguan syaraf. Gejala tersebut dapat ditemukan pada satu kasus, tetapi dapat juga merupakan kombinasi dari berbagai kasus. Pada kasus tertentu, penyakit ini dapat berlangsung sangat cepat dan ayam dapat mati mendadak tanpa didahului oleh gejala tertentu, sehingga morbiditas dan mortalitas dapat mencapai 100%. (Harimoto and Kawaoka, 2001).

Bentuk ringan bila tidak diikuti infeksi sekunder, akan terlihat adanya penurunan produksi atau produksi telur terhenti, gangguan pernapasan, anoreksia, depresi, sinusitis dan mortalitas yang rendah tetapi cenderung meningkat, jika terdapat infeksi sekunder oleh bakteri atau ayam dalam keadaan stres akibat lingkungan, gejala klinik dapat menjadi parah. Tampilan patologik anatomi ayam yang menderita *avian influenza* sangat bervariasi tergantung pada galur virus yang menginfeksi, jangka waktu mulai sakit sampai terjadi kematian, umur, dan spesies unggas yang terinfeksi. Pada *avian influenza* bentuk ringan, penyakit ini sering

muncul tanpa gejala yang jelas dan hanya terjadi gangguan pernafasan ringan yang perubahan patilogiknya tidak dapat dikenali, karena terdapat cairan mukus kental atau mukopurulen pada sinus dan kantong udara berubah menebal (Asmara, 2007).

## **2.2 Sistem Kekebalan Tubuh**

### **2.2.1 Sistem Imun**

Imunitas (kekebalan) merupakan jawaban reaksi tubuh terhadap bahan asing secara molekuler maupun seluler (Rantam, 2003). Pada proses ini terjadi serangkaian mekanisme yang meliputi pengenalan, penempatan, netralisasi dan eliminasi bahan-bahan dari dalam tubuh. Secara garis besar mekanisme kekebalan terbagi menjadi dua, yaitu :

1. *Innate immunity* (kekebalan bawaan/sistem imun tidak spesifik)
2. *Adaptive immunity* (kekebalan dapatan/sistem imun spesifik)

*Innate immunity* adalah pertahanan tubuh yang didapat karena adanya respon yang tidak spesifik dan merupakan bagian dari sistem imun yang berfungsi sebagai barrier terdepan pada awal terjadinya penyakit. Perangkat imun yang berperan pada sistem imun tidak spesifik ini adalah makrofag, sel darah merah, sel assesoris, monosit, NK (*Natural Killer cell*), sel-sel toksik dan sekresi lisosim. *Adaptive immunity* merupakan pertahanan tubuh lapis kedua, apabila *innate immunity* tidak mampu mengeliminasi agen penyakit. Hal ini terjadi akibat fagosit tidak mampu mengenali agen infeksius. Penanggulangannya diperlukan molekul spesifik yang akan berkaitan langsung dengan agen infeksius yang dikenal dengan

antibodi, sehingga dapat menstimulisir proses fagositosis (Rantam, 2003).

### 2.2.2 Vaksin

Menurut Ernawati dkk (2002), vaksin hanya mengandung komponen virus yang diperlukan untuk merangsang terbentuknya antibodi. Macam vaksin ada dua yaitu vaksin aktif (vaksin hidup) dan vaksin inaktif (vaksin mati). Vaksin aktif berasal dari virus hidup yang telah dilemahkan dengan cara di pasasekan secara teratur pada binatang percobaan, TAB atau perbenihan jaringan. Virus yang telah mengalami atenuasi ini sifat-sifat antigennya tidak berubah atau sedikit sekali berubah, tetapi masih menimbulkan kekebalan pada hewan yang ditulari tanpa menimbulkan penyakit. Virus yang terdapat pada vaksin ini berkembang biak dalam tubuh hewan yang ditulari untuk merangsang pembentukan antibodi secara aktif. Strain virus yang sesuai untuk pembuatan vaksin hidup adalah strain yang lemah secara alamiah. Vaksin inaktif dibuat dari virus hidup yang masih utuh (virion) yang diinaktifkan dengan cara fisis misalnya dengan pemanasan, penyinaran, ultra violet. Vaksin inaktif yang diinaktifkan dengan cara chemis misalnya dengan penambahan bahan kimia fenol, chloroform, beta propiolakton, asetiletlenimin, merthiolat.

Menurut Fenner *et al.* (1995), respon kekebalan tubuh yang bersifat aktif merupakan hasil vaksinasi, dan materi yang berkaitan dengan respon kekebalan humoral aktif adalah antigen, epitop, antibodi. Respon kekebalan tubuh yang bersifat pasif merupakan hasil transfer atau perolehan kekebalan asal induk. Perolehan kekebalan pasif yang didapatkan anak ayam dari induknya biasanya

tidak seragam. Kekebalan yang diperoleh tergantung dari titer antibodi induk dan akan habis dalam waktu yang relatif singkat, hal inilah yang perlu diperhitungkan dalam menyusun program vaksinasi.

Efektivitas dan tingkat kegagalan vaksinasi tergantung dari beberapa faktor diantaranya adalah kualitas vaksin, kondisi ayam dan cara vaksinasinya (Soejoedono dan Handharyani, 2005).

### **2.3 Uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)**

Uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan salah satu uji serologis yang saat ini banyak dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Diagnosis penyakit infeksi ELISA dapat diarahkan untuk mendeteksi adanya antigen (virus, bakteri, parasit atau jamur) atau terhadap antibodinya. Pada penyakit non-infeksi, ELISA dapat digunakan untuk evaluasi program vaksinasi, memonitor hormon, obat-obatan, antibiotika, toksin, peptisida, komponen serum, sitokin ataupun penyakit-penyakit autoimun. Sejak diperkenalkan pada tahun 1971, ELISA telah mengalami banyak perkembangan sesuai dengan tujuan asalnya. Pada dasarnya ELISA dapat dibagi menjadi 3 jenis menurut komponen yang dilabel enzim, yakni pelabelan pada antibodi (Ab), antigen (Ag) atau anti-immunoglobulin (Anti-Ig) (Suwarno dkk., 2008).

Dua macam antibodi yang digunakan dalam ELISA, antibodi pertama (*Primary antibody*) mengikat pada antigen dan antibodi kedua (*Secondary antibody*) atau antibodi anti-globulin mengikat pada antibodi pertama. Anti-globulin ini dilabel dengan enzim seperti *horseradish peroxidase*, *alkaline*

*phosphatase* yang mempermudah untuk monitor dengan adanya perubahan warna. Adanya reaksi dari enzim ini secara kuantitatif antibodi pertama dapat dianalisis (Rantam, 2003).

ELISA terbagi menjadi dua sistem yaitu sistem homogen dan sistem heterogen. Sistem homogen dipengaruhi oleh aktivitas enzim dan tidak diperlukan pencucian serta reaksinya bertahap. Kerugian tes ini adalah tidak sensitif sehingga tidak digunakan untuk skrining. Sistem heterogen adalah sistem uji yang tidak dipengaruhi oleh aktivitas enzim, jadi konjugat tidak mempengaruhi reaksi antigen-antibodi. Sistem ini terdapat dua model yaitu kompetitif ELISA dan non kompetitif ELISA. Kompetitif ELISA digunakan untuk pengukuran antigen melalui kompetitif antara antigen yang tidak dilabel dan antigen yang dilabel pada antibodi yang dilapiskan pada mikroplate polystirol dan polyvinil. Non kompetitif ELISA banyak digunakan dan dikembangkan karena lebih sensitif dibandingkan model sistem lainnya. Salah satu contoh dari sistem ini adalah metode *indirect* ELISA (Rantam, 2003).

Interpretasi ELISA dapat dilakukan secara kualitatif (dengan mata terlanjang/visual) ataupun secara kuantitatif (dengan spektrofotometer). Secara kualitatif ELISA dibaca dengan melihat perubahan warna antara kelompok yang diperiksa dengan kelompok kontrol (positif dan negatif). Secara semi kuantitatif atau kuantitatif, ELISA dibaca dengan spektrofotometer (ELISA *reader*) yang bekerja berdasarkan pada nilai absorban atau kerapatan optik (*Optical Density* atau OD) (Suwarno dkk., 2008).

### 2.3.1 Teknik *Indirect* ELISA

Menurut Suwarno dkk. (2008), teknik *indirect* ELISA dipakai untuk menentukan antibodi. Serum dengan antibodi yang akan ditentukan direaksikan dengan antigen yang telah diikatkan pada fase padat, selanjutnya dilakukan penambahan konjugat (Anti-immunoglobulin yang berlabel) dan diakhiri dengan penambahan substrat. Aktivitas dari enzim yang terikat berbanding terbalik dengan kadar antibodi dalam sampel.

*Indirect* ELISA merupakan model ELISA yang banyak digunakan di berbagai tingkatan laboratorium, karena bahan yang digunakan untuk uji ini sudah banyak dipasaran dan mudah untuk dibeli. Model ini tidak memerlukan keahlian khusus untuk konjugasi hanya saja dari segi biaya sedikit lebih besar, ini disebabkan karena model ini memerlukan konjugat fragmen immunoglobulin anti immunoglobulin yang akan dideteksi. Misalnya yang akan dideteksi adalah IgG maka diperlukan konjugat fragmen immunoglobulin anti IgG. Hasil dari uji ini lebih spesifik dibandingkan dengan direct ELISA. Model ini sering digunakan secara rutin untuk diagnosis antigen maupun antibodi (Rantam, 2003).

Enzim yang dipakai untuk melabel antigen atau antibodi harus memenuhi persyaratan, di antaranya tidak boleh mengurangi sifat imunologi antigen maupun antibodi, harus dapat diperoleh dalam keadaan murni serta stabil untuk disimpan selama jangka waktu tertentu (Kresno, 2000).

## 2.5 Tinjauan Mengenai Mencit

Terszowski (2006) menyatakan bahwa mencit (*mus musculus*) merupakan binatang riset yang paling umum digunakan dengan beratus-ratus pertumbuhan *outbred*, *inbred* dan *transgenic strain*. Mencit mempunyai genome haploid sekitar 3 milyar dengan panjang (3000Mb dengan 20 kromosom) oleh karena itu sepadan dengan genom manusia. Mencit merupakan binatang *nocturnal* dan mempunyai sedikit atau bahkan tidak mempunyai vision warna. Mereka memiliki pendengaran yang tajam dan dapat merasakan *ultrasound* 100 kHz.

Menurut Ballenger (1999), mencit dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Subfilum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>M. musculus</i>
Nama Binomial	: <i>Mus musculus</i>

Mencit (*Mus musculus*) adalah anggota *Muridae* (tikus-tikusan) yang berukuran kecil. 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 lebih sedikit daripada

yang tinggal di perkotaan (Kimoto *et al.*, 2005). Mencit juga merupakan binatang laboratorium yang sering digunakan untuk tujuan medis (60-80%) dan uji serologis karena mencit murah dan mudah berkembang biak (Cucchi *et al.*, 2005).



## BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

### 3.1 Materi Penelitian

#### 3.1.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini berlangsung selama tujuh bulan, dimulai pada bulan Oktober 2007 sampai dengan April 2008.

#### 3.2.1 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.2.1.1 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*). Jenis vaksin *avian influenza* yang digunakan yaitu vaksin H5N1, vaksin H5N2, dan vaksin H5N9. Bahan yang digunakan pada uji *indirect* ELISA meliputi serum mencit pasca vaksinasi, antigen *avian influenza* H5N1, *Buffer coating*, *Buffer washing* (NaCl Tween), PBS steril, *Buffer blocking (creamer 4%)*, *Alkaline Fosfatase* (Anti-chicken Ig G), Substrat p-NPP, NaOH 3N untuk stop reaksi.

##### 3.2.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang dibutuhkan untuk mendukung penelitian ini adalah sebagai berikut : spuit ukuran 1 ml dan 3 ml digunakan untuk penyuntikan vaksin pada hewan coba dan pengambilan sampel darah dari hewan coba, *microtube* untuk tempat penyimpanan serum hewan coba, *centrifuge* untuk memisahkan serum dengan eritrosit, *freezer* untuk tempat penyimpanan sampel, pipet Pasteur, pipet 1 ml, pipet 5 ml, pipet 10 ml, petri dish, mikropipet ukuran 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l,

*yellow tip* dan *blue tip*, *tissue*, beker gelas, *incubator*, *magnetic bar* dan *magnetic stirrer*, mikroplate, aluminium foil, ELISA reader.

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Prosedur Penelitian**

##### **3.3.1.1 Vaksinasi Hewan Coba**

Hewan coba dalam penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus*) dan terbagi menjadi empat kelompok dengan setiap kelompok terdiri dari enam ekor hewan coba.

- kelompok I : mencit yang diberi perlakuan dengan menggunakan vaksin *avian influenza H5N1*.
- kelompok II : mencit yang diberi perlakuan dengan menggunakan vaksin *avian influenza H5N2*.
- kelompok III : mencit yang diberi perlakuan dengan menggunakan vaksin *avian influenza H5N9*.
- Kelompok IV : mencit diinjeksi dengan PBS atau disebut kelompok kontrol

Vaksinasi dilakukan melalui subkutan dengan dosis yang sama yaitu 1 ml/ekor dan dilakukan vaksinasi ulang (*booster*) sebanyak enam kali dengan interval tiap dua minggu sekali. Setelah vaksinasi keenam, semua hewan coba pada kelompok I, II, III dan IV diambil serumnya untuk digunakan dalam uji *indirect* ELISA.

##### **3.3.1.2 Pengambilan Serum**

Pengambilan darah dilakukan satu kali setelah vaksinasi keenam pada kelompok I, II, III dan IV melalui jantung dengan spuit. Darah dikeluarkan dari

sprit dan dimasukkan dalam *microtube*. Kemudian dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit untuk pemisahan serum. Setelah serum dan sel-sel darah benar-benar terpisah, buang presipitasi lalu pindahkan supernatan atau serum kedalam *microtube* yang baru. Sebelum dan sesudah pemakaian serum disimpan dalam freezer.

### 3.3.1.3 Uji *Indirect* ELISA

Metode *Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) pada penelitian ini dilakukan sebagai berikut : 1. *Coating* Ag avian influenza H5N1 dengan cara mengencerkan Ag dalam *carbonate buffer* dengan konsentrasi 10 µg/ml selanjutnya dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100 µl. Dibiarkan semalam dalam suhu 4°C. Lalu dicuci dengan *washing buffer* yaitu NaCl Tween sebanyak tiga kali. 2. *Blocking*, setiap sumuran diisi dengan 200 µl *blocking buffer* (*creamer* 4%). Kemudian didiamkan selama satu jam dalam suhu kamar. Lalu dicuci dengan *washing buffer* (NaCl Tween) sebanyak tiga kali. 3. Inkubasi serum, diencerkan serum yang akan diperiksa dengan *blocking buffer* (*creamer* 4%) 1:100. Dimasukkan 100 µl serum pada tiap sumuran dan diamkan selama satu jam pada suhu kamar, setelah itu lakukan pencucian dengan *washing buffer* (NaCl Tween) sebanyak tiga kali. 4. Inkubasi konjugat, konjugat (alkaline phosphatase) dengan *blocking buffer* 1:1000. Dimasukkan 100 µl konjugat dalam tiap sumuran dan diamkan selama satu jam pada suhu kamar. Kemudian dicuci dengan *washing buffer* (NaCl Tween) sebanyak tiga kali. 5. Inkubasi substrat, dimasukkan 100 µl substrat (p-NPP) dalam tiap sumuran dan diamkan selama 30

menit pada suhu kamar diruang gelap dan tutup dengan aluminium foil. Ditambahkan 50  $\mu$ l 3N NaOH pada tiap sumuran untuk stop reaksi. Hasil dibaca dengan ELISA *reader* pada  $\lambda = 405$  nm.

#### 3.3.1.4 Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah nilai *Optical Density* (OD) antibodi pada mencit yang telah diberi beberapa perlakuan yaitu pada kelompok pertama mencit divaksin dengan vaksin H5N1, pada kelompok kedua divaksin dengan vaksin H5N2, pada kelompok ketiga mencit divaksin dengan vaksin H5N9, dan pada kelompok keempat mencit diinjeksi PBS karena digunakan sebagai kelompok kontrol.

#### 3.3.1.5 Variabel Penelitian

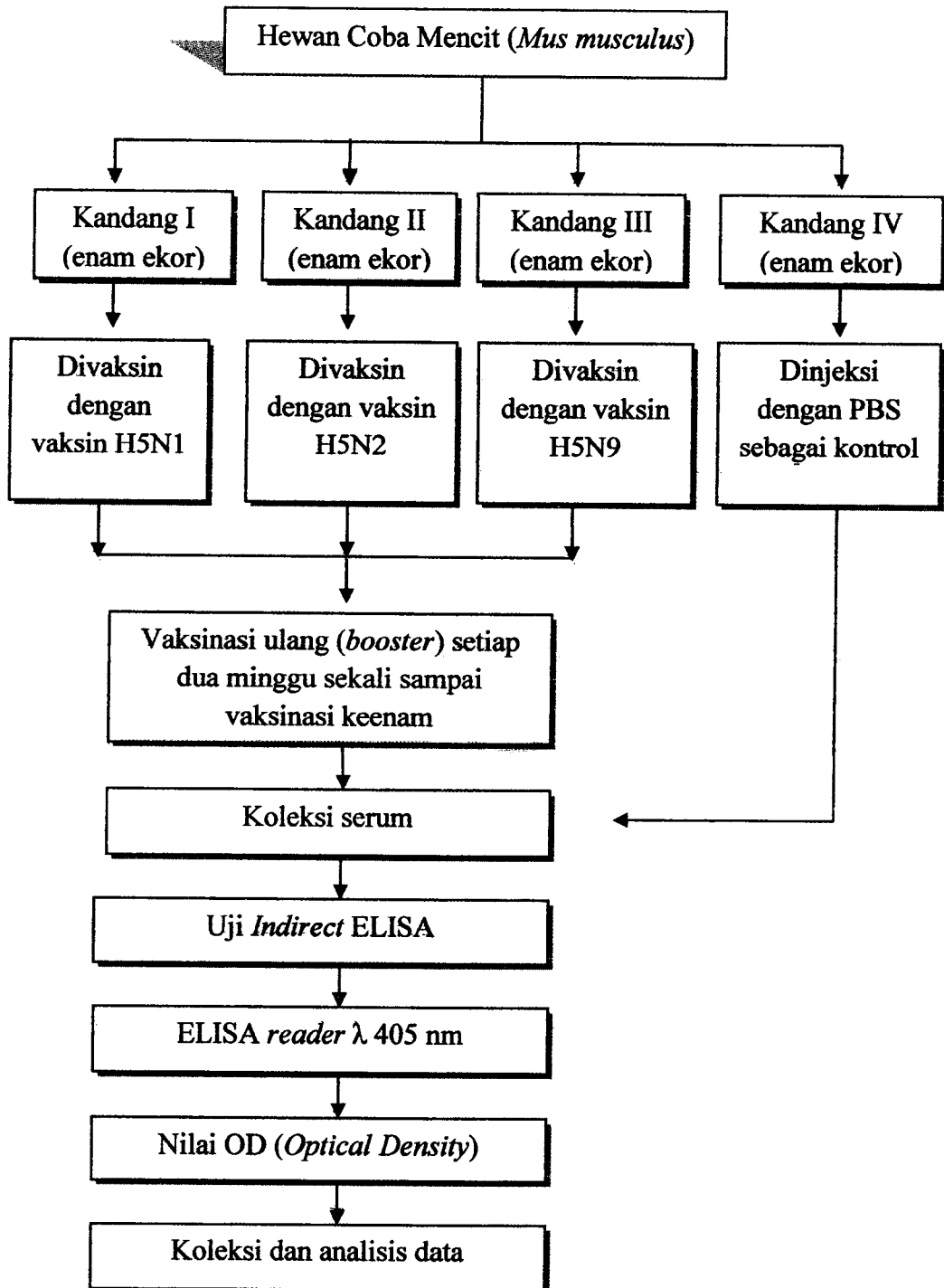
Penelitian ini mengandung variabel bebas atau *independent* yaitu jenis vaksin *avian influenza* antara lain vaksin H5N1, vaksin H5N2, dan Vaksin H5N9. Variabel terikat atau *dependent* yaitu nilai OD antibodi dan respons imun. Variabel terkendalinya yaitu suhu inkubator 4°C.

#### 3.3.1.6 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan enam ulangan, untuk masing-masing perlakuan. Data yang diperoleh, dikumpulkan kemudian dilakukan Analisis Sidik Ragam (ANAVA) menggunakan program perangkat lunak *Statistical Program and Service Solution* (SPSS) rel. 10 for Windows (Santoso,

2000). Apabila ada perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf signifikansi 5% (Kusriningrum, 2008).

### 3.3.1.7 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.1. Bagan alur penelitian

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

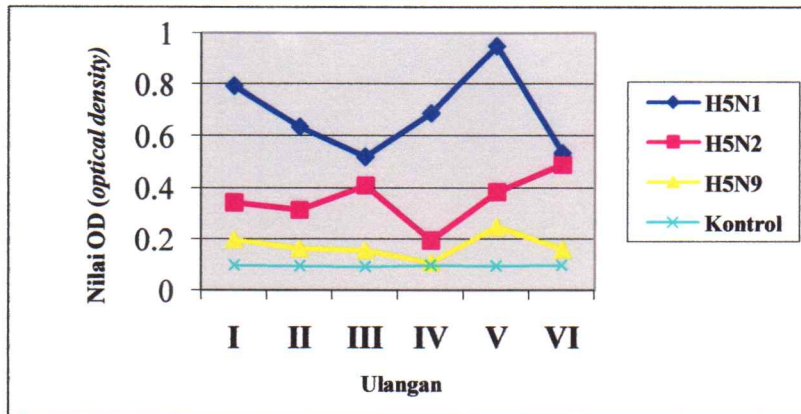
Hasil uji *indirect* ELISA diperoleh dari pembacaan serum dengan menggunakan ELISA *reader* berdasarkan pada nilai absorban atau kerapatan optik (*optical density*) pada panjang gelombang 405 nm. Hasil nilai OD antibodi secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 2.

Tabel 4.1. Data statistik rata-rata nilai *optical density* (OD) antibodi yang diuji dengan *indirect* ELISA

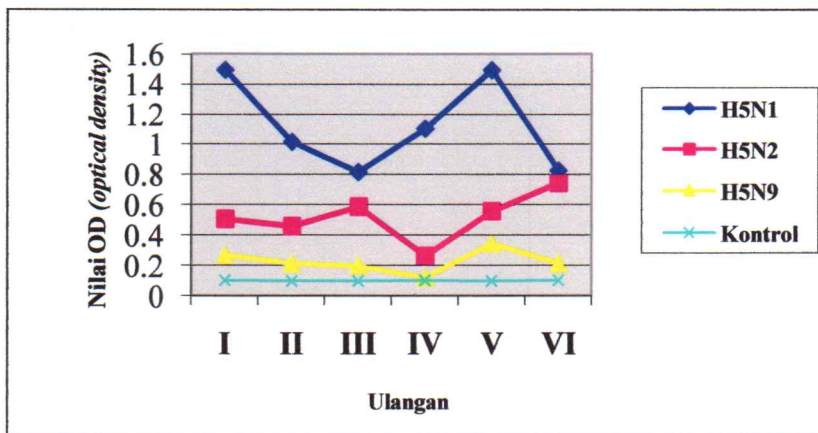
Jenis Perlakuan	N	Nilai OD ( $\bar{X} \pm SD$ )	
		10 menit	15 menit
H5N1	6	0.68667 <sup>a</sup> $\pm$ 0.163956	1.12533 <sup>a</sup> $\pm$ 0.307858
H5N2	6	0.35583 <sup>b</sup> $\pm$ 0.100484	0.51700 <sup>b</sup> $\pm$ 0.158185
H5N9	6	0.17167 <sup>c</sup> $\pm$ 0.046586	0.22500 <sup>c</sup> $\pm$ 0.075001
Kontrol	6	0.09600 <sup>c</sup> $\pm$ 0.002000	0.09850 <sup>c</sup> $\pm$ 0.002074

Ket : \* <sup>a)</sup> berbeda sangat nyata dengan <sup>b)</sup> dan <sup>c)</sup>  
 \* <sup>b)</sup> berbeda sangat nyata dengan <sup>c)</sup>

Secara umum, pada tabel diatas menunjukkan rata-rata hasil nilai OD antibodi mencit dari empat perlakuan dengan enam ulangan yaitu kelompok I mencit diberi perlakuan dengan vaksin *avian influenza* H5N1, kelompok II mencit divaksin dengan vaksin H5N2, kelompok III mencit divaksin dengan vaksin H5N9, dan kelompok IV atau kelompok kontrol mencit diinjeksi dengan PBS yang dihitung dengan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji BNJ 5% dengan aplikasi SPSS. Pengukuran nilai OD antibodi dilakukan setelah vaksinasi keenam dan diuji dengan *indirect* ELISA.



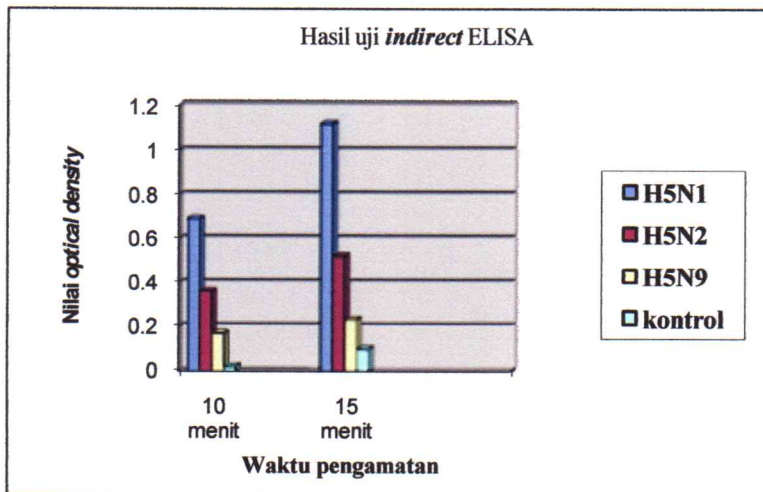
Gambar 4.1. Grafik statistik nilai OD antibodi pada tiap perlakuan yang diamati pada waktu pengamatan 10 menit.



Gambar 4.2. Grafik statistik nilai OD antibodi pada tiap perlakuan yang diamati pada waktu pengamatan 15 menit.

Gambar 4.1, 4.2 dan 4.3 menunjukkan adanya peningkatan nilai OD antibodi yang sangat signifikan antara waktu pengamatan 10 menit dan waktu pengamatan 15 menit. Mencit yang diberi perlakuan dengan vaksin *avian influenza* H5N1 menunjukkan peningkatan rata-rata nilai OD antibodi yang sangat signifikan atau berbeda sangat nyata dibandingkan dengan tiga perlakuan yang lainnya, sedangkan peningkatan rata-rata nilai OD antibodi pada mencit yang diberi perlakuan dengan vaksin H5N2 sangat signifikan jika dibandingkan dengan mencit yang diberi perlakuan dengan vaksin H5N9 dan kontrol.





Gambar 4.3. Peningkatan nilai OD antibodi yang diuji dengan *indirect* ELISA pada waktu pengamatan 10 menit dan 15 menit.

Berdasarkan hasil perhitungan statistik terhadap nilai OD antibodi dari hasil uji *indirect* ELISA yang dilakukan, terdapat perbedaan yang sangat signifikan atau berbeda sangat nyata ( $p < 0,01$ ) antara mencit yang divaksin dengan vaksin *avian influenza* H5N1, vaksin H5N2 dan vaksin H5N9. Nilai OD antibodi tertinggi diperoleh pada mencit yang divaksin dengan vaksin *avian influenza* H5N1 yang berbeda sangat nyata ( $p < 0,01$ ) dengan mencit yang divaksin dengan vaksin *avian influenza* H5N2.

## BAB 5 PEMBAHASAN

Vaksin yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaksin *avian influenza* H5N1, H5N2 dan vaksin H5N9. Ketiga vaksin tersebut adalah termasuk jenis vaksin inaktif. Vaksin inaktif berasal melalui pengrusakan virulensinya, tapi imunogenitas masih ada. Rantam (2003) menyebutkan bahwa vaksin inaktif sangat aman karena tidak infeksius, tapi diperlukan dalam jumlah banyak untuk dapat merangsang respons imun. Vaksin *avian influenza* H5N1 merupakan vaksin homolog. Vaksin homolog mengandung virus dengan sub tipe yang sama dengan virus yang ada dilapangan (*field isolate*) yaitu virus *avian influenza* H5N1, sedangkan vaksin *avian influenza* H5N2 dan vaksin H5N9 adalah vaksin heterolog. Vaksin heterolog membawa virus yang mempunyai molekul HA yang sama dengan penyebab wabah tetapi mempunyai molekul NA yang berbeda (Sudarisman, 2006; Fadilah dkk, 2007).

Antigen yang digunakan dalam uji *indirect* ELISA yaitu virus *avian influenza* sub tipe H5N1 yang diperoleh dari Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya. Mencit sebagai hewan coba penelitian karena murah, memiliki daya tahan tubuh yang tinggi, mudah dalam perawatannya dan mencit juga merupakan hewan coba yang dapat dimanfaatkan dalam pembuatan antibodi monoklonal (Smith, 1995). Uji ELISA merupakan salah satu metode yang memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi dalam mendeteksi antibodi (Rantam, 2003). Menurut Kresno (2001) uji *indirect* ELISA merupakan salah satu bagian dari model ELISA non kompetitif dan sering digunakan dalam

diagnosis antigen maupun antibodi dengan menggunakan sampel dari serum atau plasma.

Manfaat uji serologik terhadap hasil vaksinasi *avian influenza* adalah dapat memberikan gambaran tentang kualitas vaksin, program vaksinasi, kesehatan ayam waktu di vaksinasi dan kemungkinan kontak dengan virus yang berasal dari lapangan (*field isolate*). Vaksinasi diperlukan dalam penanganan *avian influenza* karena akan melindungi gejala klinis dan mortalitas disebabkan oleh virus HPAI. Vaksinasi akan mengurangi populasi hewan yang rentan, mengurangi pencemaran atau *shedding* virus dilokasi peternakan dan tujuan utama vaksinasi adalah mencegah kerugian ekonomi (Sudarisman, 2006).

Prinsip dasar pemakaian vaksin *avian influenza* yaitu virus vaksin ( master seed ) harus homolog dengan subtipe H atau subtipe H dan N virus asal lapang. Vaksin inaktif menghasilkan reson imun yang lebih panjang bila dibuat dengan tepat. Vaksin ini pada prinsipnya dapat diberikan pada semua umur. Respons antibodi maksimal kira-kira dapat mencapai 2-4 minggu setelah pemberian vaksin (Machdum, 2007).

Dari hasil uji *indirect* ELISA yang telah dilakukan diperoleh nilai *Optical Density* (OD) antibodi mencit pada kelompok I yang diberi perlakuan dengan vaksin H5N1, kelompok II dengan vaksin H5N2, kelompok III dengan vaksin H5N9 dan kelompok IV mencit diinjeksi PBS (Tabel 4.1). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa mencit yang diberi perlakuan dengan vaksin H5N1 memiliki rata-rata nilai OD antibodi tertinggi yang sangat berbeda nyata dengan kelompok perlakuan yang diberi perlakuan dengan vaksin H5N2 dan vaksin H5N9. Hal

tersebut menunjukkan bahwa respons imun yang ditimbulkan dari vaksin H5N1 memberikan respons imun humoral yang lebih baik karena vaksin yang digunakan homolog dengan antigen *avian influenza* H5N1. Kelompok perlakuan yang divaksin dengan vaksin H5N2 dan vaksin H5N9 memberikan respons imun humoral yang kurang begitu baik dikarenakan vaksin yang digunakan heterolog dengan antigen *avian influenza* H5N1. Satu jenis vaksin *avian influenza* akan efektif apabila memenuhi beberapa syarat antara lain, aspek *antigenic match* (kecocokan dengan virus lapang) dan aspek *antigenic mass* (jumlah titer yang dihasilkan tinggi). Maka dalam menentukan pilihan vaksin, tujuan akhirnya adalah bagaimana mendapatkan vaksin dengan tingkat kecocokan tinggi terhadap virus yang beredar di lapang (homolog) (Suatmodjo, 2007).

Dari penelitian yang dilakukan Sudarisman (2006) menyatakan bahwa ayam yang divaksin dengan vaksin heterolog H5N2 memperlihatkan pola kematian yang nyata ketika ayam-ayam tersebut terserang wabah meskipun dari hasil pemeriksaan serologis pasca vaksinasi menunjukkan titer antibodi yang baik. Hal ini disebabkan oleh perbedaan NA virus dengan antibodi NA dari vaksin. Berdasarkan kajian Nidom (2006) dan Matrosovich dkk (2004), bahwa protein NA ternyata ikut berperan dalam proses masuknya virus H5N1 dalam sel. Keterkaitan HA dan NA sangat penting dalam mengetahui patogenitas dan efisiensi vaksinasi. Tizard (1988) menyebutkan bahwa salah satu glikoprotein permukaan yang dimiliki virus *avian influenza* adalah hemagglutinin. Antibodi terhadap hemagglutinin tertentu dapat memberikan kekebalan terhadap infeksi ulangan dari galur virus yang mengandung hemagglutinin yang sama.

Menurut Baratawidjaja (2006), respons imun merupakan reaksi yang dikoordinasi sel-sel, molekul-molekul terhadap mikroba dan bahan lainnya. Pemeran utama dalam sistem imun spesifik humoral adalah limfosit B atau sel B. Bila sel B dirangsang oleh benda asing, sel tersebut akan berproliferasi, berdiferensiasi dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi. Proses terbentuknya antibodi merupakan bagian dari respons imun mencit dalam menanggapi antigen yang dimunisasikan, dalam hal ini antigen yang dimaksudkan adalah vaksin H5N1, vaksin H5N2, dan vaksin H5N9. Adapun proses tersebut diawali dengan penangkapan antigen oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yang merupakan bagian dari makrofag, untuk dipresentasikan kepada sel limfosit dalam bentuk yang dikenalnya. Pada uji *indirect* ELISA tersebut konjugat yang digunakan adalah konjugat *anti chicken* Ig G yang telah dilabel dengan enzim *alkaline fosfatase*. Untuk pemilihan enzim tentu saja berdasarkan atas homogen, murah, spesifik dan stabil (Rantam, 2003).

Waktu pengamatan 10 menit dan 15 menit digunakan untuk mengetahui adanya peningkatan rata-rata nilai OD antibodi pada setiap perlakuan. Kestabilan antara *second* antibodi dengan substrat terjadi pada waktu 10 menit, sedangkan pada waktu 15 menit warna semakin jelas dan terang yang mengindikasikan bahwa ikatan antara substrat, stop solution dan antibodi semakin kuat atau semakin reaktif sehingga terjadi peningkatan nilai OD yang signifikan pada mencit kelompok I yang divaksin dengan vaksin H5N1 yang diuji dengan *indirect* ELISA menggunakan antigen *avian influenza* H5N1.

Pada penelitian ini aplikasi imunisasi yang dilakukan secara subcutan dengan harapan melalui cara tersebut depo protein dapat dilepas secara bertahap. Dosis penyuntikan 1 ml/ekor, kemudian dilakukan *booster* dengan interval dua minggu bertujuan untuk memperoleh nilai OD antibodi yang optimal sehingga diharapkan respons imun mencit dalam membentuk antibodi dapat optimal dan kadarnya tetap terjaga dalam darah. Hal ini tampaknya sesuai dengan pendapat Machdum (2007) bahwa vaksinasi *avian influenza* harus dilakukan sedikitnya dua kali agar tercapai tingkat kekebalan yang optimal. Selama ini belum terjadi vaksinasi *avian influenza* yang hanya sekali mampu menghasilkan keberhasilan vaksinasi.

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian serta pembahasan yang telah diuraikan, maka dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa mencit yang divaksin dengan vaksin *avian influenza* H5N1 memberikan respons imun humoral yang lebih baik dengan uji *indirect* ELISA menggunakan antigen H5N1 dibandingkan dengan vaksin yang lain. Terlihat dari rata-rata nilai OD antibodi yang tinggi pada mencit yang divaksin dengan vaksin *avian influenza* H5N1.

### 6.2 Saran

Berdasarkan dari hasil penelitian, hasil pembahasan maupun dari kesimpulan yang diambil, terdapat saran-saran yang perlu dilaksanakan untuk penelitian ke depan yaitu :

1. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang protein yang memiliki respon terhadap berbagai vaksin *avian influenza* dari antibodi mencit sehingga bisa digunakan sebagai antibodi monoklonal.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang protein yang imunogenik dari mencit yang telah divaksin dengan berbagai vaksin *avian influenza*.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan melakukan uji tantang terhadap ayam yang divaksin untuk mengetahui efektifitas vaksin.

## RINGKASAN

**Anita Tri Paryanti.** Penelitian dengan judul “Respons Imun Humoral Mencit Terhadap Berbagai Jenis Vaksin *Avian Influenza* Subtipe H5 Yang Diukur Dengan Uji *Indirect* ELISA” di bawah bimbingan Dr. Suwarno, M.Si., drh, selaku dosen pembimbing pertama dan Dr. Eduardus Bimo Aksono, M.Kes., drh, selaku dosen pembimbing kedua.

*Avian influenza* atau biasa disebut Flu Burung adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh virus influenza tipe A dari famili *Orthomyxoviridae*, yang merupakan virus RNA dan mempunyai aktivitas Hemaglutinin dan Neuraminidase. Virus ini dapat menyebabkan epidemik dan pandemik pada unggas, selain itu juga dikhawatirkan dapat menyebabkan epidemik dan pandemik pada golongan mamalia karena dapat menginfeksi hewan dari golongan mamalia. Wabah penyakit *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) atau *avian influenza* di Indonesia mulai merebak sekitar pertengahan tahun 2003 dan telah menyebar dengan cepat ke berbagai daerah di Indonesia.

Wabah *avian influenza* ini sangat merugikan para peternak karena tingkat kematian yang tinggi pada unggas, sehingga sangat berpengaruh terhadap stabilitas ekonomi, sosial, kesehatan, lingkungan dan psikologi masyarakat, serta sumber daya manusia. Pada awal tahun 2004, tingkatan perhatian tentang *avian influenza* terutama virus H5N1 semakin meningkat dan kasus Avian Influenza ini terjadi pada manusia. Diantara 18 kasus penyakit Avian Influenza, 6 orang meninggal dunia, hal tersebut menunjukkan *Case Fatality Rate* (CFR) sebesar 30%.



Pemerintah dalam mengatasi wabah *avian influenza* telah melakukan beberapa upaya, salah satunya yaitu menerapkan kebijaksanaan vaksinasi massal terhadap unggas. Vaksin yang banyak digunakan untuk mengatasi wabah *avian influenza* yaitu menggunakan vaksin H5N2 dan H5N9, padahal virus yang menyerang di Indonesia adalah *avian influenza* sub tipe H5N1. Hewan coba yang sering digunakan dalam uji serologis yaitu mencit karena mencit mudah berkembang biak, murah, mudah dipelihara, daya tahannya tinggi dan mudah untuk diambil darahnya. Lebih dari 500  $\mu$ l-800  $\mu$ l darah dapat dikumpulkan per-minggu. Uji *indirect* ELISA merupakan konfigurasi paling sederhana yang dapat digunakan untuk mengukur titer antibodi.

Penelitian ini bertujuan mengetahui respons imun humoral mencit (*Mus musculus*) terhadap berbagai jenis vaksin *avian influenza* sub tipe H5. Hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor mencit (*Mus musculus*) yang terbagi menjadi empat perlakuan. Kelompok I divaksin dengan vaksin *avian influenza* H5N1, kelompok II divaksin dengan vaksin H5N2, kelompok III divaksin dengan vaksin H5N9 dan kelompok IV diinjeksi dengan PBS. Vaksinasi dilakukan melalui subkutan dengan dosis yang sama yaitu 1 ml/ekor dan dilakukan vaksinasi ulang (*booster*) sebanyak enam kali dengan interval tiap dua minggu sekali pada kelompok I, II, dan III. Pengambilan sampel darah dilakukan sekali setelah vaksinasi keenam pada semua hewan coba kelompok I, II, III dan IV untuk digunakan dalam uji *indirect* ELISA. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan data dianalisis menggunakan analisis ragam *Analysis Of Variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji BNJ 5% yang diaplikasikan dengan

menggunakan program perangkat lunak *Statistical Program and Service Solution* (SPSS) rel. 10 *for Windows*.

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata nilai OD antibodi pada kelompok I yang sangat signifikan atau berbeda sangat nyata dibanding kelompok II, III dan IV ( $p < 0.01$ ). Rata-rata nilai OD antibodi tertinggi diperoleh pada kelompok I menunjukkan mencit yang diberi perlakuan dengan vaksin H5N1 akan memberikan respons imun humoral yang lebih baik dengan uji *indirect* ELISA menggunakan antigen H5N1. Berdasarkan hasil penelitian maka disarankan untuk melakukan uji tantang terhadap ayam yang divaksin untuk mengetahui efektifitas vaksin serta perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang protein yang memiliki respons terhadap berbagai vaksin *avian influenza* dari antibodi mencit sehingga bisa digunakan sebagai antibodi monoklonal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akoso, B.T. 2006. Waspada Flu Burung : Penyakit Menular Pada Hewan dan Manusia. Kanisius. Yogyakarta.
- Asmara, W. 2007. Peran Biologi Molekuler Dalam Pengendalian Avian Influenza dan Flu Burung. Pidato Pengukuhan Guru Besar Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Ballenger, L. 1999. "Mus musculus", Animal Diversity Web. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus\\_musculus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus_musculus.html). Accessed April 07, 2008.
- Baratawidjaja, K.G. 2006. Imunologi Dasar. Edisi ketujuh. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal. 6
- Beard, C.W. 2004. Avian Influenza (Fowl Plaque). <http://www.vet.uga.edu/VPP/gray-book/FAD/aka.htm>.
- Clavigo, A., J. Riva and J. Copps. 2001. Assessment of the pathogenicity of an emu-origin influenza A H5 Virus in Ostriches (*Struthio camelus*). Avian Pathol. 30: 89.
- Cucchi, T., J.D. Vigne and J.C. Auffray. 2005. First occurrence of the house mouse (*Mus musculus domesticus* Schwarz & Schwarz, 1943) in the Western Mediterranean: a zooarchaeological revision of subfossil occurrences. Biological Journal of the Linnean Society. 84: 429-445.
- Donateli, I., L. Campitelli and L. Trani. 2001. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian poultry. Journal Virology. 82 : 623-630.
- Easterday, B.C. and C.W. Bread. 1984. Avian Influenza. In: M.S. Hofstad, (Ed.). Diseases of Poultry. 8<sup>th</sup> ed. Iowa: Iowa State University Press, Ames. 482-494.
- Ernawati, R., Soelistiyanto, A. P. Raharjdo, N. Sianita, F.A. Rantam, , J. Rahmahani, dan Suwarno. 2002. Virologi Veteriner. Laboratorium Virologi Dan Imunologi FKH UNAIR. Surabaya.
- Fadilah, R., Iswandari, A. Polana. 2007. Berternak Unggas Bebas Flu Burung. Agromedia Pustaka. Jakarta.

- Fenner, F. J., E.P.J. Gibss, F.A. Murphy, R. Rott, M.J. Studdert and D.O. White. 1995. *Veterinary Virology*. 2nd Ed. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Fouchier, R. A. M., V. Munster, A. Wallensten, T.M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan and B. Olsen. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal Virology*. 79 (5): 2814-2822.
- Gauthier, C. M., C. Lebarbenchon and F. Thomas. 2007. Recent expansion of highly pathogenic avian influenza H5N1: a critical review. *The International Journal of Avian Science*. 149:202-14.
- Gürtler, L. 2006. *Virology of Human Influenza*. <http://www.influenzareport.com/ir/ai.htm>. March 20. 2006.
- Harder, T.C. and O. Werner. 2006. "Avian Influenza", in Kamps, B. S., Hoffman, C. and Preiser, W. (ed.): *Influenza Report 2006*. Paris, France: Flying Publisher. ISBN 3-924774-51-X.
- Harimoto, T. and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic Threat Posed By Avian Influenza A Viruses. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 14:129-149.
- Hoffmann, E., J. Stech, I. Leneva, S. Krauss, C. Scholtissek, P.S. Chin, M. Peiris, K.F. Shortridge and R.G. Webster. 2000. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in Southern China : Was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1. *Journal Virology*. 74(14) : 6309-6315.
- Ito, T., H. Goto, E. Yamamoto, H. Tanaka, M. Takeuchi, M. Kuwayama, Y. Kawaoka and K. Otsuki. 2001. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *Journal Virology*. 75: 4439 – 4443.
- Jones, Y. L and D.E. Swayne. 2003. Comparative Pathobiology of Low and High Pathogenicity H<sub>7</sub>N<sub>3</sub> Chilean Avian Influenza Virus in Chicken. *Avian Diseases*. 48: 119-128.
- Judarwanto, W. 2006. Implikasi Flu Burung Pada Manusia. <http://alergianak.bravehost.com>. diakses pada tanggal 24 September 2006.
- Kartika, H. 2008. Respon Imun Outline. 1 Januari. [hennykartika@gmail.com](mailto:hennykartika@gmail.com).
- Kenneth, 2007. *Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology*. [www.bact.wisc.edu/.../Anim](http://www.bact.wisc.edu/.../Anim)

- Kimoto, H., S. Haga, K. Sato and K. Touhara. 2005. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature*, 437: 898 – 901.
- Kresno, S.B. 2000. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed. 3. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kusriningrum, R. 2008. *Perancangan Percobaan*, Airlangga University Press. Surabaya.
- Liu, J., H. Xiao, F. Lei, Q. Zhu, K. Qin and X.W. Zhang. 2005. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*. 309: 1206.
- Matrosovich, MN and H.D. Klenk. 2004. Neuraminidase is Important for initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *Journal Virology* vol: 78.
- Machdum, N. 2007. Avian Influenza (Perkembangan Kasus Avian Influenza). *Infvet* edisi Agustus 2007. [www.infovet.blogspot.com](http://www.infovet.blogspot.com).
- Martin, V., A. Forman and J. Luborth. 2006. *Preparing For Highly Pathogenic Avian Influenza* Food and Agriculture Organization for Animal Health. Rome.
- Martini, S. 2007. Epidemiologi dan Bahaya Pandemi Virus Flu Burung di Indonesia. Dalam seminar Tanggap Flu Burung di FK UNAIR Surabaya. 21 April.
- Nicholls, H. 2006. Pandemic Influenza: The Inside Story. *PLoS Biol* 4(2): e50 doi:10.1371/journal.pbio.0040050.
- Nidom, C.A. 2005. Analisis Molekuler Genoma Virus Avian Influenza H5N1 Di Indonesia. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- OIE, 2005. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. [http://www.oie.int/eng/normes/manual/A\\_0037.htm](http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_0037.htm). 4 November 2005.
- Pandhi, S., P.K. Panigrahi, A. Mahapatra, and S. Mahapatra. 2004. Avian Influenza (H5N1) : A Preliminary Review. *Indian J. Med. Microbiol*. 22(3):143-146.

- Pollack, R.A., F. Lorraine, M. Walter and R.R. Modesto. 2002. *Laboratory Exercises In Microbiology*. Second Edition. John Wiley & Sons. Inc. United States of America.
- Radji, M. 2006. Avian Influenza A (H5N1) : Patogenesis, Pencegahan dan Penyebaran pada Manusia. *Majalah Ilmu Kefarmasian Vol III* : 55-56.
- Raharjo, Y. dan C.A. Nidom. 2004. Avian Influenza; Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. GITA Pustaka. Jakarta.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Immunologi*. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 148-162.
- Santoso, S. 2000. *SPSS Statistik Parametrik*. PT. Elex Media Komputindo. Kelompok Gramedia. Jakarta. Hal. 23.
- Siegel Marc , M.D. 2006. *Flu Burung Serangan Wabah Ganas dan Perlindungan Terhadapnya*. Bandung. November 2006.
- Smith, J.R. 1995. *Produksi Serum Hiperimun. Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian* (Burgess, G.W.ed). Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Soejoedono, R.D. dan E. Handharyani. 2005. *Flu Burung*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Stevens, J., O. Blixt, T.M. Tumpey, J.K. Taunberger, J.C. Paulson and I.A. Wilson. 2006. Structure and receptor spesificity of hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. 312: 404-410.
- Stilianakis, I. Nikolaos, Weber and P. Thomas. 2007. *Ecologic Immunology of Avian Influenza (H5N1) in Migratory Birds*. *EID Journal Home*. 13: 8.
- Suatmodjo, M. 2007. *Pemakaian H5N2 dan H5N9 Lebih Aman Untuk Mengatasi Flu Burung*. [info@depkominfo.go.id](mailto:info@depkominfo.go.id) . 06 Juni 2007.
- Sudarisman, 2006. *Vaksin Avian Influenza versus H5N2*. *Infovet*. Jakarta, Edisi 147 Oktober 2006 : 58-60.
- Suwarno, E. Rahayu, N. Sianita, J. Rahmahani, A.P. Raharjo, F.A. Rantam dan R. Ernawati. 2008. *ELISA, Teori dan Protokol*. Departemen Mikrobiologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Swayne, D.E., and D.L. Suarez. 2003. Biology of avian influenza especially the changes of low pathogenicity virus to high pathogenicity. Proc. Latin American Poultry Congress. Oct.7.2003.
- Tabbu, C.R. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya : Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral. Kanisius. Yogyakarta.
- Terszowski G. 2006. Evidence for a Functional Second Thymus in Mice. *Science*. March 2. 2006. PMID 16513945.
- Tizard, R. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Airlangga University Press Surabaya.
- Tumpey, T.M., D.L. Suarez, L.E.L. Perkin, D.A. Senne, J.G. Lee, Y.J. Lee, I.P. Mo and D.E. Swayne. 2002. Characterization of highly pathogenic H5N1 Avian Influenza A virus isolated from duck meat. *Journal Virology*. 76(12): 6344-6355.
- Ungchusak K., P. Auewarakul, S.F. Dowell, R. Kitphati and W. Auwanit. 2005. Probable person-to-person transmission of avian influenza (H5N1). *N Engl J Med* 352:333-340.
- Utama, A. 2005. Flu Burung: Kita Tidak Perlu Takut. *Infovet* edisi Mei 2005. [[www.infovet.blogspot.com](http://www.infovet.blogspot.com)].
- Vines A., K. Wells, M. Matrosovich, M. R. Castrucci, T. Ito and Y. Kawaoka. 1998. The Role of Influenza A Virus Hemagglutinin Residues 226 and 228 in Receptor Specificity and Host Range Restriction. *Journal Virology* 72 : 7626 – 7631.
- World Health Organization (WHO), 2005. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. *NEJ. Med.* 353: 1374-1385.

## LAMPIRAN

Lampiran 1 . Bahan-bahan yang digunakan untuk uji *indirect* ELISA

### 1. PBS (Phosphat Buffer Saline)

pH : 7,4

Konsentrasi : Fosfat : 10 mmol/l

NaCl : 140 mmol/l

Timbang : NaCl : 8 g

KCl : 0,2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O : 2,89 G

Aquades ad : 1 liter

Simpan pada 4° C

### 2. CARBONATE BUFFER (Buffer untuk coating Ag)

pH : 9,6

Konsentrasi : 50 mmol/l

Timbang : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : 1,59 g

NaHCO<sub>3</sub> : 2,93 g

Aquades ad : 1 liter

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

KATALOG :

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Natrium Carbonat Wasserfrei) 500.323 A763692 Art 6392.

MERCK



-  $\text{NaHCO}_3$  (Natrium Hidrogen Carbonat) Art 6329

**3. WASHING BUFFER (Buffer untuk pencuci)**

NaCl-Tween pH : 8,6

Konsentrasi : NaCl : 154 MMOL/L

Tween-20 : 1 ml

Timbang : NaCl : 9 g

Tween-20 : 1 ml

Aquades ad 1 liter

Buat pH : 8,6 dengan NaOH

**4. BLOCKING BUFFER (Buffer untuk pengencer/blocking)**

*Creamer 4%*

4 gram *creamers* ad 100 ml aquadest

**5. SUBSTRAT BUFFER**

pNPP - 20 mg (SIGMA CHEMICAL COMPANY).

**6. CONJUGAT**

Anti-chicken Ig G (whole molecule) *Alkaline Phosphatase Conjugate*  
(SIGMA).

Lampiran 2. Tabel Hasil Pembacaan Uji *indirect* ELISA menggunakan ELISA Reader .

Perlakuan	Kode Sampel	Nilai OD antibodi		Keterangan
		10 menit	15 menit	
1	1.1	0.793	1.496	vaksinasi dengan vaksin AI H5N1
	1.2	0.635	1.015	
	1.3	0.520	0.815	
	1.4	0.688	1.105	
	1.5	0.950	1.496	
	1.6	0.534	0.825	
2	2.1	0.342	0.503	vaksinasi dengan vaksin AI H5N2
	2.2	0.313	0.458	
	2.3	0.410	0.584	
	2.4	0.194	0.262	
	2.5	0.384	0.553	
	2.6	0.492	0.742	
3	3.1	0.197	0.267	vaksinasi dengan vaksin AI H5N9
	3.2	0.163	0.211	
	3.3	0.156	0.197	
	3.4	0.108	0.120	
	3.5	0.247	0.344	
	3.6	0.159	0.211	
4	4.1	0.097	0.100	Kandang control (tdk divaksin)
	4.2	0.095	0.097	
	4.3	0.093	0.096	
	4.4	0.098	0.101	
	4.5	0.095	0.097	
	4.6	0.098	0.100	

Lampiran 3. Hasil perhitungan nilai OD mencit (*Mus musculus*) dalam waktu pengamatan 10 menit menggunakan *Analisis Of Variance* (Anova) dengan aplikasi SPSS.

**Descriptives**

OD ELISA 10 menit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
H5N1	6	.68667	.163956	.066935	.520	.950
H5N2	6	.35583	.100484	.041022	.194	.492
H5N9	6	.17167	.046586	.019019	.108	.247
Kontrol	6	.09600	.002000	.000816	.093	.098
Total	24	.32754	.250377	.051108	.093	.950

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: OD ELISA 10 menit

Tukey HSD

(I) Vaksinasi	(J) Vaksinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
H5N1	H5N2	.330833*	.057120	.000	.17096	.49071
	H5N9	.515000*	.057120	.000	.35512	.67488
	Kontrol	.590667*	.057120	.000	.43079	.75054
H5N2	H5N1	-.330833*	.057120	.000	-.49071	-.17096
	H5N9	.184167*	.057120	.020	.02429	.34404
	Kontrol	.259833*	.057120	.001	.09996	.41971
H5N9	H5N1	-.515000*	.057120	.000	-.67488	-.35512
	H5N2	-.184167*	.057120	.020	-.34404	-.02429
	Kontrol	.075667	.057120	.559	-.08421	.23554
Kontrol	H5N1	-.590667*	.057120	.000	-.75054	-.43079
	H5N2	-.259833*	.057120	.001	-.41971	-.09996
	H5N9	-.075667	.057120	.559	-.23554	.08421

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

**OD ELISA 10 menit**

Tukey HSD <sup>a</sup>

Vaksinasi	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol	6	.09600		
H5N9	6	.17167		
H5N2	6		.35583	
H5N1	6			.68667
Sig.		.559	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 4. Hasil perhitungan nilai OD mencit (*Mus musculus*) dalam waktu pengamatan 15 menit menggunakan *Analisis Of Variance* (Anova) dengan aplikasi SPSS.

#### Descriptives

##### OD ELISA 15 menit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
H5N1	6	1.12533	.307858	.125682	.815	1.496
H5N2	6	.51700	.158185	.064579	.262	.742
H5N9	6	.22500	.075001	.030619	.120	.344
Kontrol	6	.09850	.002074	.000847	.096	.101
Total	24	.49146	.437102	.089223	.096	1.496

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD ELISA 15 menit

Tukey HSD

(I) Vaksinasi	(J) Vaksinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
H5N1	H5N2	.608333*	.102237	.000	.32218	.89449
	H5N9	.900333*	.102237	.000	.61418	1.18649
	Kontrol	1.026833*	.102237	.000	.74068	1.31299
H5N2	H5N1	-.608333*	.102237	.000	-.89449	-.32218
	H5N9	.292000*	.102237	.044	.00585	.57815
	Kontrol	.418500*	.102237	.003	.13235	.70465
H5N9	H5N1	-.900333*	.102237	.000	-1.18649	-.61418
	H5N2	-.292000*	.102237	.044	-.57815	-.00585
	Kontrol	.126500	.102237	.611	-.15965	.41265
Kontrol	H5N1	-1.026833*	.102237	.000	-1.31299	-.74068
	H5N2	-.418500*	.102237	.003	-.70465	-.13235
	H5N9	-.126500	.102237	.611	-.41265	.15965

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

#### OD ELISA 15 menit

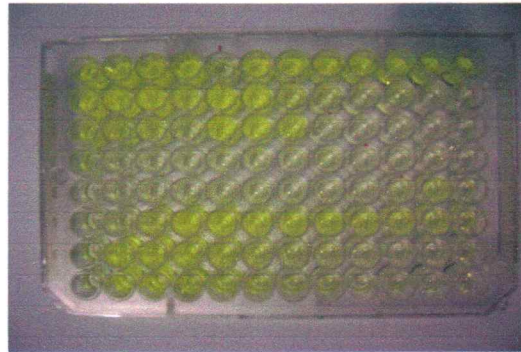
##### Tukey HSD<sup>a</sup>

Vaksinasi	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol	6	.09850		
H5N9	6	.22500		
H5N2	6		.51700	
H5N1	6			1.12533
Sig.		.611	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 5. Hasil uji *Indirect* ELISA pada mikroplate datar



Lampiran 6. Jenis vaksin yang digunakan



Lampiran 7. Proses pengambilan darah pada mencit

