

SKRIPSI

PERBEDAAN NILAI *OPTICAL DENSITY* (OD) ANTIBODI ANTARA AYAM LAYER YANG DIVAKSIN *INFECTIOUS BRONCHITIS* (IB) MONOVALEN INAKTIF DENGAN *INFECTIOUS BRONCHITIS* POLIVALEN INAKTIF (IB-ND-IBD) MENGGUNAKAN INDIRECT ELISA



Oleh :

MAYA RISMAYENI

NIM 060610055

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

**PERBEDAAN NILAI *OPTICAL DENSITY* (OD) ANTIBODI ANTARA
AYAM *LAYER* YANG DIVAKSIN *INFECTIOUS BRONCHITIS* (IB)
MONOVALEN INAKTIF DENGAN *INFECTIOUS BRONCHITIS*
POLIVALEN INAKTIF (IB-ND-IBD) MENGGUNAKAN
*INDIRECT ELISA***

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

MAYA RISMAYENI
060610055

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta



(Nanik Sianita Widjaja, S.U., drh.)
NIP.195309181982032002



(Dr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh.)
NIP. 196310021989032003

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

Perbedaan Nilai *Optical Density* (OD) Antibodi Antara Ayam *Layer* Yang Divaksin *Infectious Bronchitis* (IB) Monovalen Inaktif Dengan *Infectious Bronchitis* Polivalen Inaktif (IB-ND-IBD) Menggunakan *Indirect Elisa*

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

Surabaya, 17 Januari 2011



Maya Rismayeni
NIM. 060610055

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 4 Februari 2011

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

- Ketua** : Dr. Suwarno, M.Si., drh.
Sekretaris : Dr. Chairul Anwar Nidom, M.S., drh.
Anggota : Dr. Soeharsono, M.Si., drh.
Pembimbing I : Nanik Sianita Widjaja, S.U., drh.
Pembimbing II : Dr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh.

Telah diuji pada

Tanggal : 14 Februari 2011

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Suwarno, M.Si., drh.

Anggota : Dr. Chairul Anwar Nidom, M.S., drh.

Dr. Soeharsono, M.Si., drh.

Nanik Sianita Widjaja, S.U., drh.

Dr.Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh.

Surabaya, 23 Februari 2011

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Romziah Sidik, Ph.D., drh
NIP. 19531216 197806 2 001

COMPARISON THE VALUES OF ANTIBODY *OPTICAL DENSITY* (OD) BETWEEN *INFECTIOUS BRONCHITIS* (IB) MONOVALENT INACTIVE WITH *INFECTIOUS BRONCHITIS* POLIVALENT INACTIVE (IB-ND-IBD) BY USING INDIRECT ELISA

Maya Rismayeni

ABSTRACT

Infectious bronchitis is a contagious and acute respiratory disease in chickens caused by Coronavirus. The aim of this study was determine antibody *Optical Density* (OD) values difference of layer chicken vaccinated with IB monovalent inactive vaccine and IB polyvalent inactive vaccine (IB-ND-IBD). The samples was classified into three group from 24 chicks overall. Group 1 (P1), eight chickens was vaccinated with IB monovalent inactive (LV4UA). Group 2 (P2), eight chickens was vaccinated with IB polyvalent inactive (LV8UA) and group 3 (P3), eight chickens as a control given physiological NaCl/chick. Blood sampling for antibody titer through OD values observations performed four times in all age groups for two week, four week, six week and eight week. Measurement of *Optical Density* values was used *indirect* ELISA. Data analysis used one way ANOVA. The result of this research showed that there is no difference antibody *Optical Density* values of vaccinated layer chickens with IB monovalent inactive and IB polyvalent inactive (IB-ND-IBD).

Key word : infectious bronchitis, monovalent vaccine, polyvalent vaccine, elisa

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur Alhamdulillah atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat, berkah dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul **Perbedaan Nilai *Optical Density* (OD) Antibodi Antara Ayam Layer Yang Divaksin *Infectious Bronchitis* (IB) Monovalen Inaktif Dengan Vaksin *Infectious Bronchitis* Polivalen Inaktif (IB-ND-IBD) Menggunakan *Indirect Elisa*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

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.

Ibu Nanik Sianita Widjaja, S.U., drh. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr.Sri Pantja Madyawati, M. Si., drh. selaku Dosen Pembimbing Serta yang selalu meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, petunjuk dan nasehat yang sangat berguna dalam penyusunan skripsi ini.

Dr. Suwarno, M.Si., drh. selaku ketua penguji seminar dan skripsi serta selaku dosen penelitian, Dr. C.A. Nidom, M.S., drh. selaku sekretaris penguji dan Dr. Soeharsono, M.Si., drh. selaku anggota penguji atas dukungan serta saran-saran yang telah diberikan.

Ibu Soetji Prawesthirini, S.U., drh. sebagai dosen wali yang senantiasa memberikan dukungan moril, bimbingan dan nasehat akademis sekaligus menjadi pengganti orang tua selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh staf pengajar serta karyawan di Laboratorium Virologi dan Imunologi atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan dan membantu dalam proses penelitian di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan dan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Keluarga tercinta papa Suswandi, mama Munifah serta adik Dyah Selvia Putri atas do'a, dukungan, motivasi, semangat dan bantuan dalam pembuatan skripsi.

Teman-teman penelitian Febri, Dikta, Iwan, Mas Poundra, Mas Wachid, Mas Hari, Mbak Dita, dan Mbak Icha yang telah memberikan semangat dan kerja sama yang baik sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Sahabat-sahabatku, Djono, Linda, Panji, Feri, Dina, Tantra dan seluruh teman-teman angkatan 2006 yang tidak bisa saya sebutkan namanya satu-persatu.

Penulis sepenuhnya menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan dan masih banyak terdapat kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan dan menerima segala bentuk kritik dan saran guna perbaikan lebih lanjut sehingga skripsi ini bermanfaat bagi ilmu pengetahuan Kedokteran Hewan dan semua pihak yang membutuhkan

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

Surabaya, 17 Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
HALAMAN PERNYATAAN	ii
HALAMAN IDENTITAS	iii
ABSTRACT	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Landasan Teori.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
1.6 Hipotesis Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Infectious Bronchitis</i>	6
2.1.1 Etiologi.....	6
2.1.2 Diagnosis.....	8
2.2 <i>Newcastle Disease</i>	8
2.2.1 Etiologi.....	8
2.2.2 Diagnosis.....	10
2.3 <i>Infectious Bursal Disease</i>	10
2.3.1 Etiologi.....	11
2.3.2 Diagnosis.....	12
2.4 Respon imun ayam	12
2.5 Vaksin.....	14
2.6 ELISA (<i>Enzyme – Linked Immunoabsorbent Assay</i>).....	18
2.7 Teknik <i>Indirect</i> ELISA	19
BAB 3 MATERI DAN METODE	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.2 Materi Penelitian.....	21
3.2.1 Hewan percobaan	21
3.2.2 Pakan	21
3.2.3 Bahan dan Alat penelitian.....	22

3.3 Metode Penelitian	22
3.3.1 Cara Pengambilan Serum	23
3.3.2 Pengujian antibodi hasil vaksinasi dengan teknik <i>Indirect</i> -ELISA.....	24
3.4 Variabel Penelitian.....	25
3.5 Rancangan Penelitian.....	25
3.6 Analisis Data.....	25
Kerangka Operasional.....	26
BAB 4 HASIL PENELITIAN	
4.1 Hasil <i>Indirect</i> ELISA Secara Kualitatif	27
4.2 Pengujian Nilai <i>Optical Density</i> Hasil Vaksinasi.....	27
BAB 5 PEMBAHASAN.....	32
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan.....	36
6.2 Saran	36
RINGKASAN	37
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Rataan (mean) \pm SD(<i>Standard Deviation</i>) Nilai OD antibodi ayam <i>layer</i> yang divaksin IB monovalen inaktif dengan IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD).....	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Morfologi virus.....	7
2.2 Prinsip Kerja <i>Indirect</i> ELISA.....	20
4.1 Grafik nilai <i>Optical Density</i> (OD) antibodi antara vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) dan antara kedua vaksin perlakuan dengan kontrol.....	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan Alur Penelitian dengan uji <i>Indirect</i> ELISA.....	44
2. Bahan-Bahan yang digunakan untuk uji <i>Indirect</i> ELISA.....	45
3. Analisis data.....	48
4. Alat-Alat yang digunakan dalam Penelitian.....	57

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

μ l	: <i>Microlitter</i>
p	: Probabilitas
$^{\circ}$ C	: Derajat celcius
AGP	: <i>Agar Gel Precipitation</i>
Anova	: <i>Analysis of Variant</i>
AP	: <i>Alkaline Phospatase</i>
BNJ	: Beda Nyata Jujur
CP	: Charoen Pokphand
DOC	: <i>Day Old Chick</i>
ds	: <i>double stranded</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>
EID	: <i>Egg Infective Dose</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GLM	: <i>General Linear Model</i>
HI	: Hemaglutinasi Inhibisi
IB	: <i>Infectious Bronchitis</i>
IBD	: <i>Infectious Bursal Disease</i>
MB	: Multi Breeder
ND	: <i>Newcastle Disease</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
OIE	: <i>Office International des Epizooties</i>
P-NPP	: Para-nitrophenyl-phosphatase
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
SPSS	: <i>Statistical Program for Social Scientific</i>
ss	: <i>single stranded</i>
TAB	: Telur Ayam Berembrio
TCID	: <i>Tissue Culture Infective Dose</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Ayam merupakan hewan yang rentan akan penyakit, beberapa jenis penyakit yang sering menginfeksi pada ayam antara lain penyakit *Infectious Bronchitis* (IB), *Newcastle Disease* (ND), *Infectious Bursal Disease* (IBD). Sampai saat ini, ketiga penyakit tersebut tidak dapat diobati, oleh karena itu pencegahan melalui vaksinasi sangat diperlukan untuk meminimalkan ayam terjangkit penyakit-penyakit tersebut (Lindahl, 2004).

Infectious Bronchitis (IB) adalah penyakit yang merugikan peternakan ayam baik ayam layer maupun ayam broiler. Penyakit ini ditandai dengan gejala klinis gangguan pernapasan yang ditandai oleh adanya pernapasan melalui mulut, batuk, bersin, dan leleran dari hidung. Penanggulangan IB masih belum maksimal di lapangan, hal ini disebabkan oleh penggunaan vaksin yang tidak sesuai dengan strain virus di lapangan. Sebagian besar, vaksin yang digunakan untuk pencegahan penyakit IB merupakan vaksin impor dimana vaksin tersebut kurang memiliki proteksi silang melawan virus IB galur lapangan/isolat lokal (Balitvet, 2006).

Pada ayam, terdapat dua sistem kekebalan tubuh primer yaitu, timus dan bursa fabrisius. Timus sebagian besar berisi sel T dengan fungsi mengenal dan menghancurkan sel yang terinfeksi virus, mengaktifkan makrofag dalam fagositosis serta membantu sel B dalam memproduksi antibodi, sedangkan bursa

fabrius sebagian besar berisi sel B yang berperan dalam memproduksi antibodi humoral (Wahab dan Julia, 2002).

Vaksinasi adalah suatu usaha untuk memberikan kekebalan kepada ayam sehingga ayam tersebut kebal terhadap serangan suatu penyakit. Vaksinasi dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain melalui injeksi, air minum, tetes mata atau tetes hidung, semprot, maupun tusuk sayap. Vaksinasi untuk ayam harus dilakukan selengkap mungkin sebab peternakan ayam *layer* merupakan pemeliharaan jangka panjang (Tabbu, 2000).

Pemakaian vaksin hingga saat ini pada umumnya masih menggunakan vaksin monovalen yaitu vaksin tunggal yang hanya memiliki protektivitas akan satu macam penyakit. Hal ini mengakibatkan adanya pemberian vaksin setiap kali ayam terjangkit penyakit sehingga dengan pemberian vaksin yang berulang-ulang, besar kemungkinan bagi ayam mengalami stres dan produksi ayam pun akan mengalami penurunan (Deptan, 2006). Untuk mengurangi dampak tersebut, maka penggunaan vaksin kombinasi yaitu vaksin IB-ND-IBD dapat dijadikan alternatif bagi peternak. Dengan vaksin polivalen ini, diharapkan peternak dapat menghemat waktu, tenaga, biaya manajemen serta menekan stres pada ayam *layer* sehingga peternak mendapat keuntungan.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan titer antibodi ayam yang divaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) melalui nilai *Optical Density* (OD) antibodi. Pengujian vaksin yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan uji *Indirect-Elisa*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan permasalahan, Apakah terdapat perbedaan nilai *Optical Density* (OD) antibodi antara ayam *layer* yang divaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) menggunakan uji *Indirect-ELISA*?

1.3 Landasan Teori

Antibodi merupakan suatu molekul protein yang dihasilkan oleh sel plasma sebagai akibat interaksi antara limfosit B dengan agen penyakit atau agen asing (termasuk vaksin). Antibodi ini berfungsi menetralkan bibit penyakit yang berhasil menginfeksi ke dalam tubuh ayam. Kemampuan titer antibodi dalam menetralkan bibit penyakit akan optimal jika titernya protektif (Alberts, 1998).

Vaksin adalah suatu produk biologis, berisi sejumlah besar jasad renik yang diketahui sebagai pencegah suatu penyakit. Daya kerja vaksin adalah spesifik. Oleh sebab itu, terhadap setiap macam penyakit harus dipergunakan vaksin yang berbeda. Vaksin dibagi menjadi dua jenis yang umum dikenal yaitu vaksin aktif dan vaksin inaktif. Vaksin aktif adalah vaksin yang mengandung virus hidup atau virus yang dilemahkan. Sedangkan vaksin inaktif adalah vaksin dimana virusnya telah dimatikan (Irawan, 1996).

Vaksin monovalen merupakan vaksin yang terdiri dari satu jenis antigen atau satu jenis mikroorganisme dan hanya protektif terhadap satu jenis antigen atau mikroorganisme, sedangkan vaksin polivalen merupakan vaksin yang terdiri

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

Menurut Tzvetkov *et al* (2000) penggunaan vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif antara IB-ND-IBD memiliki hasil yang berbeda, namun titer antibodi yang dihasilkan oleh vaksin inaktif gabungan IB-ND-IBD tidak cukup signifikan mengungguli vaksin IB monovalen inaktif. Hal ini dikarenakan bahwa apabila antigen yang berbeda dalam suatu campuran disuntikkan bersama-sama, terjadi kompetisi di antara antigen. Selain itu, dapat terjadi satu antigen dapat mendominasi campuran dan menghambat antigen yang lain (Tizard, 2000) sehingga vaksin tunggal lebih protektif melindungi ayam dari pada vaksin kombinasi, namun kedua vaksin tetap memberikan protektivitas yang cukup untuk ayam agar tidak mengalami mortalitas terhadap serangan virus (Ernawati dkk, 2002).

Dalam diagnosis penyakit infeksi, ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antigen (virus, parasit, bakteri, jamur) atau terhadap antibodinya. Teknik *Indirect* ELISA dipakai untuk menentukan antibodi. Pada uji *Indirect*-ELISA kerja antibodi dalam menetralsir antigen adalah melalui ikatan antara antigen dan antibodi. Penentuan antibodi dapat dilakukan dengan pelabelan pada anti-immunoglobulinnya yaitu dengan menggunakan model *Indirect*-ELISA. Secara semi kuantitatif atau kuantitatif, ELISA dibaca dengan spektrofotometer yang berdasarkan pada nilai kerapatan optik (*Optical Density/OD*) atau absorbans (Suwarno dkk., 2010).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan nilai *Optical Density* (OD) antibodi antara ayam *layer* yang divaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) menggunakan uji *Indirect-ELISA*.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai perbedaan nilai *Optical Density* (OD) antibodi antara ayam *layer* yang divaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) menggunakan uji *Indirect-ELISA* sehingga dapat diketahui jenis vaksin yang efektif dalam mencegah penyakit pada ayam.

1.6 Hipotesis

Dari kerangka pemikiran diatas maka dapat diambil hipotesis, Terdapat perbedaan nilai *Optical Density* (OD) antibodi antara ayam *layer* yang divaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) menggunakan uji *Indirect-ELISA*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

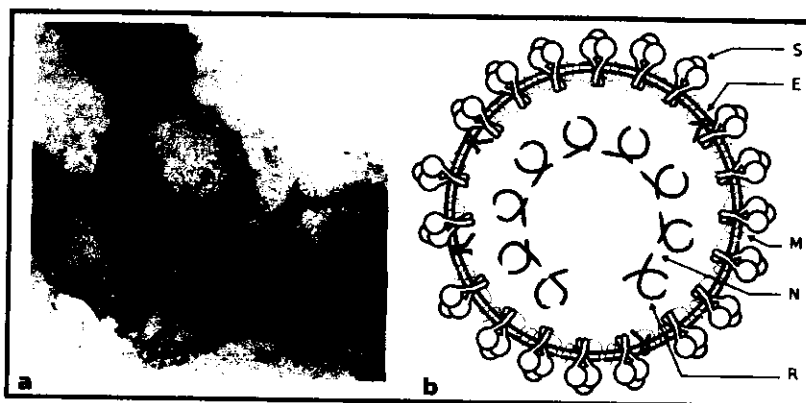
2.1 Infectious Bronchitis

Pada tahun 1931, *Infectious Bronchitis* (IB) pertama kali dilaporkan oleh Shalk dan Hawn di Utara Dakota, Amerika Serikat sebagai penyakit saluran pernafasan yang fatal terhadap ayam muda berumur tiga hari sampai empat minggu (Lindahl, 2004). Penyakit ini ditandai dengan pernapasan melalui mulut, batuk, bersin, ngorok basah (akibat adanya bunyi cairan yang melalui trakea) dan leleran dari hidung. Anak ayam akan terlihat lesu dan mungkin akan bergerombol dibawah pemanas (Tabbu, 2000).

Di Indonesia penyakit ini sudah lama diduga ada, tetapi pembuktian secara serologis dengan mengisolasi virusnya baru dilakukan tahun 1977 oleh Purnomo Ronohardjo (Tabbu, 2000). Virus IB dapat bermutasi secara cepat dan menjadi strain yang berbeda secara antigenik, begitu pula patogenitasnya atau muncul kelainan pada jaringan (Dharmayanti dkk, 2005).

2.1.1 Etiologi

Infectious Bronchitis disebabkan oleh virus yang berasal dari famili *Nidoviridae* dan genus *Coronavirus* (OIE, 2009). Virus IB memiliki genom berupa *single-stranded* (ss) RNA. Selain itu, virus ini memiliki *envelope* yang terdiri dari lipoprotein dan umumnya berbentuk sferik atau pleomorfi dengan diameter 60-220 nm (Lindahl, 2004).



Gambar 2.1. a. Gambar partikel coronavirus diambil dengan mikroskop electron. b. Gambar struktur coronavirus (keterangan: S: *spike glycoprotein*, E: *envelope*, M: glikoprotein membran, N: protein *nucleocapsid*, R: *single-stranded* (ss) RNA) (Sumber: Dewerchin, Hannah. 2008. *The Virus*. Laboratory of Virology, UGent.)

Virus IB mengandung tiga protein virus utama yang spesifik yaitu *spike glycoprotein* (S), glikoprotein membran (M), dan protein *nucleocapsid internal* (N). Protein yang keempat adalah *small membrane protein* yang dihubungkan dengan amplop virion (Dharmayanti dkk, 2005).

Sejumlah serotipe IB yang dilaporkan dari berbagai dunia, meliputi *Massachusetts (Mass)*, *Connecticut*, *Georgia*, *Delaware*, *Iowa*, *Newhampshire* dan *Australia-T*, *Italian*. Di Indonesia juga terdapat beberapa serotipe yang berbeda dengan serotipe *Mass* (Tabbu, 2000; Cavanagh, 2002).

Virus IB juga dapat tumbuh dengan baik pada telur ayam bertunas umur 10-11 hari. Kultur jaringan yang berasal dari ginjal embrio ayam dan ginjal ayam dapat juga dipakai untuk isolasi virus ini. Virus IB akan inaktif pada temperatur 56°C selama 15 menit dan temperatur 45°C selama 90 menit. Virus IB akan mati dengan cepat di luar tubuh ayam dan sensitif terhadap berbagai jenis desinfektan (Tabbu, 2000; Lindahl, 2004).

2.1.2 Diagnosis

Diagnosis dapat didasarkan atas gejala klinik dan perubahan patologik. Metode diagnosis yang sering ditemukan di lapangan adalah inokulasi ke dalam telur ayam bertunas atau kultur organ trakea. Pemeriksaan serologik untuk mengetahui titer antibodi sering kali menggunakan metode netralisasi virus (VN), hemaglutinasi inhibisi (HI), agar gel presipitasi (AGP) dan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Tabbu, 2000; Lukert and Saif, 2003).

2.2 Newcastle Disease

Penyakit *Newcastle Disease* (ND) merupakan suatu penyakit pernapasan dan sistemik, yang bersifat akut dan mudah sekali menular, yang disebabkan oleh virus dan menyerang berbagai jenis unggas terutama ayam (Tabbu, 2000). Penyakit ini dikenal juga dengan berbagai nama, yaitu disebut *Pseudovogel pest*, *Rhaniket disease*, *Pseudopoultry plaque* dan *Tetelo disease* (Murtidjo, 2006). Gejala yang ditunjukkan oleh penyakit ini antara lain, jengger dan pial sianosis, sekitar mata dan kepala bengkak, sesak nafas kemudian diikuti diare dan feses putih kehijauan sehingga unggas mengalami dehidrasi atau kekurusan yang cepat, leher terpuntir, kelumpuhan kaki dan sayap serta badan membungkuk disamping produksi telur menurun drastis (Soeharsono, 2005).

2.2.1 Etiologi

Penyakit ND disebabkan oleh virus yang termasuk dalam genus *Avian Paramyxovirus* dan Famili *Paramyxoviridae*. Virus berbentuk bundar, polimorfis,

helikal simetris atau filamen memanjang. Partikel virus yang lengkap berukuran antara 100-500 nm (Tabbu, 2000). Virus memiliki genom berupa asam inti ribonukleat berantai tunggal (ss RNA) yang terdapat dalam kapsid berbentuk heliks dan berpolaritas negatif (Fenner *et.al.*, 1993).

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

Berdasarkan atas kesamaan antigenik pada uji hemaglutinasi inhibisi, maka dikenal sembilan serotipe *Avian Paramyxovirus*, yaitu *Paramyxovirus* tipe 1 (PMV-1) sampai (PMV-9). Virus ND termasuk dalam *Paramyxovirus* tipe 1 (PMV-1) dimana tipe ini merupakan tipe terpenting pada unggas (Tabbu, 2000).

Berdasarkan virulensi atau patogenesisnya, virus ND dikelompokkan ke dalam lima tipe (OIE, 2004), yaitu tipe Viscerotropik Velogenik, bentuk ND yang sangat patogenik yang menyebabkan lesi hemoragi pada intestinal dengan tingkat mortalitas yang tinggi; tipe Neurotropik Velogenik, menimbulkan gejala pernafasan dan gejala syaraf dengan tingkat mortalitas yang tinggi; tipe

Mesogenik, menimbulkan gejala pernafasan, kadang-kadang terdapat gejala syaraf dengan tingkat mortalitas yang rendah; tipe Lentogenik, menimbulkan gejala pernafasan yang ringan atau subklinis dan tipe Asimptomatik Enterik, menimbulkan gejala pencernaan.

Virus ND relatif lebih tahan terhadap panas (Fenner *et al.*, 1993). Virus ND dapat diinaktifkan dengan pemanasan 56°C selama 3 jam atau 60°C selama 30 menit (OIE, 2002). Virus ini tetap efektif pada sumsum tulang dan otot ayam yang disembelih paling tidak selama enam bulan pada temperatur -20°C dan sampai empat bulan pada temperatur almari pendingin. Selain itu, infektivitas virus juga dapat dirusak oleh radiasi ultraviolet dan bahan kimia seperti formalin, fenol, lisol, dan kresol (Tabbu, 2000).

2.2.2 Diagnosis

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

2.3 Infectious Bursal Disease (IBD)

Infectious Bursal Disease dikenal sebagai Gumboro atau *Avian-nephrosis*. Penyakit ini pertama kali dilaporkan oleh Crosgrave pada tahun 1962 di daerah

Gumboro, Delaware, USA (Lukert and Saif, 2003). Penyakit Gumboro atau *Bursal Infectious Disease* (IBD) adalah penyakit akut, kontagius yang menyerang ayam muda terutama umur 4 – 6 minggu yang ditandai dengan diare, tremor, inkoordinasi serta peradangan dan pembesaran bursa fabrisius yang kemudian mengalami atropi (Tabbu, 2000).

Ayam yang terkena *Infectious Bursal Disease* akan mengalami penurunan kekebalan tubuh karena adanya efek immunosupresif. Efek immunosupresi yang ditimbulkan oleh IBD dapat mengakibatkan ayam lebih peka terhadap berbagai penyakit lain, hal ini disebabkan virus IBD menginfeksi bursa fabrisius, timus, limpa yang merupakan organ penting dalam proses respon imun (Van den Berg, 2000; Lindhal, 2004).

2.3.1 Etiologi

Virus IBD disebabkan oleh virus yang tergolong genus *Birnavirus* dan famili *Birnaviridae*. Virus pada famili tersebut mempunyai genome yang terdiri dari atas 2 segmen *doublestranded* (ds), sedangkan berat molekul masing-masing segmen adalah $2,2 \times 10^6$ (Cardoso *et al.*, 2006). Genom dari virus IBD terdiri dari dua segmen ds RNA dimana segmen A mempunyai panjang 3,2 kb untuk mengkode bentuk protein VP2, VP3, VP4 dan segmen B 2,8 kb mengkode bentuk protein VP1 (Yong-Chang *et al.*, 2005). Virus terdiri dari empat protein: VP1, VP2, VP3, VP4 (Fenner *et al.*, 1995). Virus IBD tidak mempunyai *envelope*, berbentuk *icosahedral* dan mempunyai diameter 55-65 nm (Yong-Chang *et al.*, 2005).

Virus IBD tahan terhadap pelarut organik tetapi peka terhadap formalin dan kelompok idiofor (Butcher and Miles, 2009). Virus juga resisten terhadap ester dan kloroform, dapat diinaktivasi pada pH 12, masih tetap aktif pada temperatur 56° C selama lebih dari 5 jam tapi tidak diketahui pada pH rendah yaitu pH 2. Virus ini tetap hidup pada temperatur 60°C selama 30 menit, tetapi akan mati pada temperatur 70°C dalam waktu 30 menit.

2.3.2 Diagnosis

Diagnosis dapat didasarkan atas riwayat kasus, gejala klinik dan perubahan patologik. Pemeriksaan antibodi terhadap virus IBD dapat dilakukan dengan uji serologik yaitu *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Jackwood, 1996). Uji tersebut dapat dipakai untuk mengevaluasi antibodi pada parent stock untuk mendapatkan informasi tentang tingkat respon imun pada suatu kelompok dan sebagai bahan pertimbangan untuk menyusun program vaksinasi ayam (Shiv and Gaurav, 2004).

2.4 Respon Imun Ayam

Respon imun terjadi apabila ke dalam tubuh terpapar oleh zat yang dianggap asing oleh tubuh yang dikenal dengan nama antigen, akibatnya akan menghasilkan suatu zat yang disebut dengan antibodi (Kresno, 2001). Respon imun dapat dibedakan menjadi dua yaitu respon imun non spesifik dan imun spesifik. Respon imun non spesifik merupakan imunitas bawaan artinya respon terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar

oleh zat tersebut. Respon imun non spesifik dapat melindungi hewan dari serangan agen infeksi yang bersifat umum dan bekerja terhadap berbagai jenis benda asing. Yang termasuk dalam respon imun non spesifik adalah kulit dan selaput lendir, enzim asam lambung (HCI), komponen sel yang melibatkan secara langsung sel yang mempunyai kemampuan fagositosis (Subowo, 1993).

Respon imun spesifik dapat melindungi hewan terhadap agen infeksi yang sudah pernah kontak sebelumnya. Mekanisme efektor dalam respon imun spesifik berupa respon imun seluler, respon imun humoral dan interaksi antara respon imun seluler dan respon imun humoral (Bellanti, 1993). Imunitas humoral diperankan oleh sel limfosit B yang terdiferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan antibodi humoral. Sel B bursa fabrisius merupakan organ limfoid primer dan hanya dimiliki oleh unggas. Bursa fabrisius terletak pada pertemuan kloaka-dermal unggas (Tizard, 2000), sedangkan respon imun seluler diperankan oleh sel limfosit T yang diperlukan untuk melawan mikroorganisme intraseluler (Subowo, 1993). Sel T juga merupakan organ limfoid primer, dimana terletak di kantong faring dan dimiliki oleh mamalia, unggas. Set T terdiri dari dua sub tipe utama, yaitu sel T-sitotoksik berfungsi membunuh sel-sel yang terinfeksi virus dan sel T-helper berfungsi membantu sel B memproduksi antibodi (Wahab dan Julia, 2002).

Antigen adalah zat-zat asing yang pada umumnya merupakan protein yang berkaitan dengan bakteri dan virus yang masuk ke dalam tubuh. Antigen bertindak sebagai benda asing atau nonself oleh seekor ternak dan akan merangsang timbulnya antibodi (Kresno, 2001).

Antibodi merupakan protein-protein yang terbentuk sebagai respon terhadap antigen yang masuk ke tubuh, yang bereaksi secara spesifik dengan antigen tersebut. Konfigurasi molekul antigen-antibodi sedemikian rupa sehingga hanya antibodi yang timbul sebagai respon terhadap suatu antigen tertentu saja yang cocok dengan permukaan antigen dan bereaksi dengannya (Rantam, 2003).

2.5 Vaksin

Vaksin merupakan sediaan biologis yang mengandung antigen baik berupa mikroorganisme yang mati maupun yang dilemahkan tanpa merusak potensi antigen itu sendiri. Vaksin ideal adalah vaksin yang dapat memberikan kekebalan kuat dalam waktu yang lama kepada hewan penderita dan fetus yang dikandung (Tizard, 2000).

Vaksin dibagi menjadi dua jenis yang umum dikenal yaitu vaksin aktif dan vaksin inaktif, dimana masing-masing digunakan sesuai dengan kebutuhan (Irawan, 1996). Vaksin aktif yaitu vaksin yang mengandung virus hidup dan telah dilemahkan, yang akan tumbuh dan berbiak dalam induk semang. Vaksin aktif tidak memerlukan adjuvan, tidak stabil dalam pemanasan, dapat berkembang biak dalam tubuh, dan merangsang respon imun tapi tidak menimbulkan penyakit. Vaksin aktif digunakan pada ayam pedaging dan untuk vaksinasi awal untuk ayam petelur ataupun ayam bibit (Tabbu, 2000). Keuntungan dari vaksin aktif, antara lain memberikan kekebalan yang kuat, tidak memerlukan adjuvan, resiko hipersensitivitasnya kurang, vaksin dapat merangsang produksi interferon sehingga memberikan perlindungan dini kepada hewan yang rentan. Adapun

kerugian dari vaksin hidup antara lain, diperlukan beberapa dosis ulangan sehingga hewan mengalami stres (Tizard, 2000).

Vaksin inaktif (virus mati) adalah agen penyakit (virus) yang terdapat pada vaksin dalam keadaan mati. Biasanya didalamnya dicampurkan atau ditambahkan oil adjuvant. Untuk pencegahan penyakit, vaksin dapat dibuat dari jasad renik yang lain misalnya bakteri, parasit atau bahan toksin (Tizard, 2000). Vaksin inaktif dihasilkan melalui pengrusakan virulensinya, tapi imunogenitasnya masih ada. Vaksin ini aman karena tidak infeksius, tapi diperlukan dalam jumlah yang banyak untuk dapat merangsang respon imun. Sehingga *booster* sangat diperlukan, supaya imunitasnya cukup (Rantam, 2005). Virus yang sudah di inaktifkan ini tidak mempunyai kemampuan untuk mengadakan *replikasi* di dalam tubuh ayam yang divaksinasi, tetapi masih mampu merangsang pembentukan kekebalan. Jika ditambahkan *adjuvant* pada vaksin inaktif maka akan dapat merangsang pembentukan antibodi yang lebih tinggi dan tidak menimbulkan stres pada ayam yang divaksin. Vaksin inaktif pada umumnya tersedia dalam bentuk cair dan vaksin ini seharusnya jangan dibekukan. Keuntungan penggunaan vaksin inaktif adalah penyimpanannya yang lebih mudah dibandingkan dengan vaksin aktif, aman dari virulensi residual atau kembali ke sifat semula, reaksi pasca vaksinasi sangat ringan. Kerugian vaksin inaktif adalah imunogen pada hewan lemah karena mengandung organisme mati, penggunaan adjuvan dapat menyebabkan reaksi hipersensitivitas, dalam proses produksi diperlukan ketelitian yang tinggi untuk membuat vaksin yang bebas dari virus virulen yang mungkin tertinggal dalam vaksin pada waktu mematikannya, imunitas yang ditimbulkannya

singkat, sehingga perlu diberikan imunisasi ulangan (*booster*), pemberian melalui suntikan maka tidak terbentuk kekebalan lokal (Tizard, 2000).

Keberhasilan vaksinasi tergantung pada status kesehatan unggas, kedewasaan sistem imunologis dan adanya antibodi maternal dari unggas yang divaksinasi, kualitas dan cara penanganan vaksin, cara penyimpanan vaksin, pengencer yang digunakan, jenis vaksin, saat vaksinasi, jarak waktu antara vaksinasi, tingkat titer antibodi maternal ayam yang divaksinasi, penyakit yang dapat menghalangi pembentukan antibodi serta potensi dari vaksin itu sendiri, virus virulen yang ada di lingkungan (Irawan, 1996). Kegagalan vaksinasi dapat disebabkan oleh faktor keturunan, lingkungan, infestasi parasit yang berat, malnutrisi, keadaan cekaman dan respon imun pasif yang diperoleh dari induk pada hewan muda (Tizard, 2000). Program vaksinasi seharusnya mengikuti program yang dianjurkan oleh pabrik vaksin tetapi di lapangan program tersebut sering tidak sesuai dan peternak melakukan vaksinasi berdasarkan pengalaman di lapangan (Soeharsono, 2005). Pemberian vaksin dapat menimbulkan dampak negatif diantaranya adalah hambatan pertumbuhan berat badan, penurunan konsumsi sehingga mengakibatkan penurunan performans tubuh ayam (Soeharsono, 1997).

Jadwal vaksinasi tidak selalu sesuai untuk setiap jenis vaksin veteriner yang tersedia. Vaksin yang berbeda jenis sudah pasti memiliki kandungan yang berbeda untuk masing-masing jenis vaksin sehingga jadwal vaksinasinya pun berbeda meskipun prinsip penggunaannya sama, yakni untuk mencegah terjadinya infeksi penyakit (Tizard, 2000).

Vaksinasi untuk penanggulangan penyakit IB sangat diperlukan untuk mengurangi gejala klinis dan mortalitas. Namun tentu saja tidak cukup penanggulangan penyakit IB hanya dengan melakukan tindakan vaksinasi saja. Agar vaksinasi dapat berhasil perlu beberapa upaya pendukung lainnya, seperti biosekuriti ketat dan tatalaksana peternakan yang optimal (Zhang *et al.*, 2005)

Pemilihan vaksin yang cocok dengan virus di lapangan sangat penting. Pada saat ini ada banyak macam jenis vaksin yang dijual di pasaran. Vaksin yang mahal tidak selalu menjamin bebas dari kebocoran vaksinasi. Kecocokan strain virus dengan lingkungan setempat harus diutamakan. Jika suatu jenis vaksin sudah cocok di farm kita lebih baik jangan diubah (Bahri dan Kusumaningsih, 2005).

Vaksin monovalen merupakan vaksin yang terdiri dari satu jenis antigen atau satu jenis mikroorganisme dan hanya protektif terhadap satu jenis antigen atau mikroorganisme. Keuntungan dari vaksin monovalen adalah lebih memberikan respon yang lebih cepat terhadap hewan, sedangkan kerugiannya adalah hewan menjadi stres karena terjadi pengulangan vaksinasi berkali-kali (Tizard, 2000). Vaksin polivalen merupakan vaksin yang terdiri dari dua atau lebih jenis antigen atau mikroorganisme dan protektif terhadap lebih dari satu antigen atau mikroorganisme (Hoosen, 2009). Keuntungan vaksin polivalen adalah penghematan dalam waktu, biaya, dan tenaga karena dapat melindungi hewan terhadap beberapa penyakit sekaligus. Sedangkan, kerugian vaksin ini adalah terjadinya kompetisi diantara antigen dan pendominasian salah satu antigen terhadap antigen yang lain (Tizard, 2000).

2.6 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Pertama kali *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) diperkenalkan oleh Engvall dan Perlman pada tahun 1971 dengan cara mengkonjugasikan enzim. ELISA merupakan salah satu metode sensitif untuk mendeteksi antigen, antibodi, hormon, obat-obatan, dan penyakit autoimun. Antibodi yang digunakan dalam metode ini, yaitu antibodi pertama (*primary antibody*) mengikat pada antigen dan antibodi kedua (*secondary antibody*) atau antibodi antiglobulin mengikat pada antibodi pertama. Antiglobulin ini dilabel dengan enzim seperti *Horseradish Peroxidase* (HRP), *Alkaline Phosphatase* (AP), *urease beta galaktose* dan *glukose oksidase* yang memudahkan memonitor warna. Adanya reaksi enzim ini, menyebabkan antibodi pertama dapat dianalisis secara kuantitatif (Suwarno dkk., 2003).

Pada dasarnya ELISA dapat dibagi menjadi 3 jenis menurut komponen yang dilabeli enzim, yaitu: pelabelan pada antibodi (Ab), pelabelan pada antigen (Ag), dan pelabelan pada anti-immunoglobulin. Pelabelan pada antibodi (Ab) meliputi *Direct-ELISA*, *Direct Sandwich-ELISA*, *Direct Inhibition ELISA*, *Inhibition ELISA*, *Indirect Capture ELISA*. Pelabelan antigen (Ag) meliputi *Antigen competitive-ELISA*, *Titration-ELISA*, *Direct Capture-ELISA*. Pelabelan Anti-Imunoglobulin meliputi *Indirect-ELISA*, *Indirect Sandwich-ELISA*, *Indirect Inhibition-ELISA*, *Isotyping-ELISA* (Suwarno dkk., 2010).

Interpretasi ELISA dapat dilakukan secara kualitatif (visual) ataupun secara kuantitatif (dengan spektrofotometer). Secara kualitatif ELISA dibaca dengan melihat perubahan warna antara kelompok yang diperiksa dengan kontrol

(positif dan negatif). Secara semi kuantitatif, ELISA dibaca dengan spektrofotometer yang berdasarkan pada nilai titer atau absorbans atau kerapatan optik (*Optical Density/OD*) (Suwarno dkk., 2010).

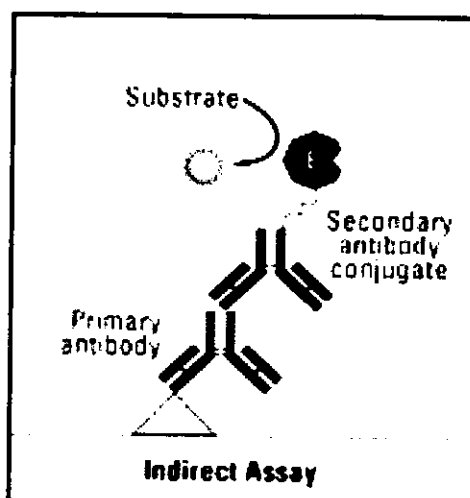
2.7 Teknik *Indirect* ELISA

Teknik *Indirect* ELISA merupakan model ELISA yang banyak digunakan pada berbagai tingkatan laboratorium, hasil uji ini juga lebih spesifik dibandingkan uji *direct*-ELISA. Teknik ini dipakai untuk menentukan antibodi. Serum dengan antibodi yang akan ditentukan, direaksikan dengan antigen yang telah diikatkan pada fase padat (polistiren dari *microplate*), kemudian ditambahkan konjugat (Anti-immunoglobulin yang berlabel) dan akhirnya penambahan substrat. Aktivasi dari enzim yang terikat berbanding lurus dengan kadar antibodi dalam sampel. Hasil akhir dari penentuan antibodi akan menghasilkan produk berwarna, sehingga dapat dilakukan pembacaan pada ELISA *reader* berdasarkan nilai kerapatan optik atau nilai absorbans (*Optical Density*) (Suwarno dkk., 2010). Nilai kerapatan optik adalah ukuran jumlah cahaya yang diserap oleh suspensi sel virus dengan penggunaan spektrofotometer. Nilai dapat digunakan untuk mengukur kekeruhan, yang pada gilirannya digunakan untuk memperkirakan jumlah virus atau konsentrasi molekul seperti protein) dalam suatu larutan.

Keuntungan dari *Indirect* ELISA antara lain, tingkat sensitivitas meningkat karena setiap antibodi yang diinginkan memiliki beberapa epitop yang bisa bereaksi dengan antibodi sekunder dan terdapat berbagai macam variasi

antibodi sekunder yang terjual secara komersial di pasar. Kelemahan dari *Indirect* ELISA adalah membutuhkan waktu pengujian yang relatif lebih lama daripada uji ELISA yang lain karena pada *Indirect* ELISA membutuhkan 2 kali waktu inkubasi yaitu pada saat terjadi interaksi antara antigen spesifik dengan antibodi yang diinginkan dan antara antibodi yang diinginkan dengan antibodi sekunder tertaut enzim (Piercenet, 2002).

Prinsip dasar *indirect*-ELISA adalah antigen teradsorpsi pada substrat padat. Antibodi primer tidak berlabel dapat diperoleh dari serum atau bermacam-macam cairan tubuh lain. Antibodi sekunder terikat pada enzim yang sesuai, antibodi ini biasanya disebut dengan konjugat. Antigen dan antibodi sekunder biasanya dibuat konstan dan yang berubah adalah antibodi primer. Hasil ELISA akan tampak bila ditambahkan substrat (Burgess, 1995).



Gambar 2.2. Prinsip Kerja *Indirect* ELISA

Sumber: Piercenet. 2010. Thermo Fisher Scientific Inc. *Overview of ELISA*. Rockford, USA.

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi dan Imunologi, Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, pada Desember 2009 sampai Maret 2010. Pemeliharaan sampel (*ayam layer*) dan pengambilan darah sampel dilakukan di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga. Pelaksanaan uji ELISA dilakukan di Laboratorium Virologi dan Imunologi serta Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Percobaan

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor ayam *layer* jantan jenis MB-502 yang berumur satu hari dibagi secara acak menjadi tiga kelompok, yakni masing-masing 8 ekor ayam untuk 2 kelompok perlakuan dan 8 ekor untuk kelompok kontrol.

3.2.2. Pakan

Pakan yang diberikan adalah pakan komersial fase starter dengan kode CP 511, diberikan sebanyak dua kali sehari setiap pagi dan sore. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

3.2.3. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan di dalam penelitian ini adalah vaksin IB inaktif (LV-4UA), vaksin ND-IB-IBD inaktif (LV-8UA) buatan Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, antigen virus IB, *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA), NaCl fisiologis, *coating buffer*, *washing buffer* (PBS Tween-20), *milk blocking* 4%, *blocking buffer*, substrat p-NPP, NaOH 3N (stopper), konjugat (*Anti-Chicken Ig G*) yang dilabel dengan enzim *Alkaline Phosphate*, Alkohol 70%.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari spuit *disposable* 3 ml, yellow tip, ELISA *microplate* bentuk datar, *mikropipet*, inkubator, tabung *eppendorf*, *microtube* steril, *centrifuge*, ELISA *reader*, kandang jenis litter dan kapas.

3.3. Metode Penelitian

Prosedur perlakuan terhadap hewan coba adalah sebagai berikut :

Satu minggu sebelum DOC datang dilakukan desinfeksi pada ruangan, kandang, dan peralatan lainnya. DOC yang berjumlah 24 ekor ayam *layer* diadaptasikan selama 14 hari. Selama pemeliharaan ayam diberi pakan dengan formulasi standar untuk *layer* tahap awal (*starter*) dengan kode CP 511 serta air minum diberikan secara *ad libitum*.

Sebanyak 24 ekor anak ayam dibagi menjadi 3 kelompok,

Kelompok P1 : 8 ekor ayam divaksin IB monovalen inaktif (LV- 4UA) pada umur 2 minggu

Kelompok P2 : 8 ekor ayam divaksin IB-ND-IBD polivalen inaktif (LV- 8UA) pada umur 2 minggu.

Kelompok K : 8 ekor ayam sebagai kontrol diberikan NaCl fisiologis.

Kelompok P1 dan P2: di *booster* pada saat ayam berumur 6 minggu. *Booster* menggunakan vaksin IB monovalen inaktif diberikan kepada P1 dan vaksin IB polivalen inaktif diberikan kepada P2.

Pemberian vaksinasi dengan cara intramuskular pada otot dada, dosis diberikan 0,3 ml/ekor untuk kelompok P1. Sedangkan P2 yang merupakan vaksin kombinasi diberikan dosis 0,5 ml/ekor.

Pengambilan darah untuk uji ELISA dilakukan sebanyak empat kali pada semua kelompok yaitu pada saat ayam berumur 2 minggu, 4 minggu (2 minggu pasca vaksinasi), 6 minggu (vaksinasi ulang/*booster*), dan 8 minggu (2 minggu pasca *booster*). Pengukuran nilai *Optical Density* (OD) menggunakan uji *Indirect-ELISA*.

3.3.1. Cara Pengambilan Serum

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

3.3.2. Pengujian antibodi hasil vaksinasi dengan teknik *Indirect-ELISA*

Dalam pengujian ini, langkah pertama adalah meng-*Coating* Ag virus IB dengan konsentrasi 10^3 EID50/sumuran. Antigen tersebut dilapiskan $100\mu\text{l}$ /sumuran pada mikroplate dengan suhu 4°C selama satu malam. Kemudian *microplate* dicuci dengan menggunakan *washing buffer* (PBS Tween 20) $200\mu\text{l}$ /sumuran sebanyak 3 x 1 menit. Setelah itu, *Microplate* di blok dengan milk blocking 4% sebanyak $100\mu\text{l}$ /sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya, dicuci kembali dengan *washing buffer* (PBS Tween 20) $200\mu\text{l}$ /sumuran sebanyak 3 x 1 menit. Antibodi hasil vaksinasi virus IB diencerkan 1/100 dengan *blocking buffer*, dan selanjutnya dimasukkan sebanyak $100\mu\text{l}$ /sumuran dan diinkubasi suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu dicuci dengan *washing buffer* (PBS Tween 20) $200\mu\text{l}$ /sumuran sebanyak 3 x 1 menit. Kemudian penambahan konjugat (*Anti-chicken Ig G* yang dilabel dengan enzim *alkaline phosphatase*) yang diencerkan dengan *blocking buffer* biasanya 1:2500 sebanyak $100\mu\text{l}$ /sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu, *microplate* dicuci dengan *washing buffer* (PBS Tween 20) $200\mu\text{l}$ /sumuran sebanyak 3 x 1 menit. Tahap akhir, *Microplate* ditambah dengan substrat p-NPP sebanyak $100\mu\text{l}$ /sumuran kemudian bagian permukaan *Microplate* ditutup dengan aluminium foil dan disimpan dalam ruangan gelap selama 30 menit. Selanjutnya tambahkan larutan stopper NaOH 3N sebanyak $50\mu\text{l}$ /sumuran untuk menghentikan reaksi. Absorban kemudian dibaca dengan spectofotometer pada panjang gelombang 405 nm.

3.4. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat beberapa variabel penelitian, antara lain :

Variabel bebas : vaksin IB monovalen dan vaksin IB polivalen.

Variabel tergantung : nilai *Optical Density* (OD) antibodi.

Variabel kendali : hewan, jenis kelamin, umur, kandang, dan pakan.

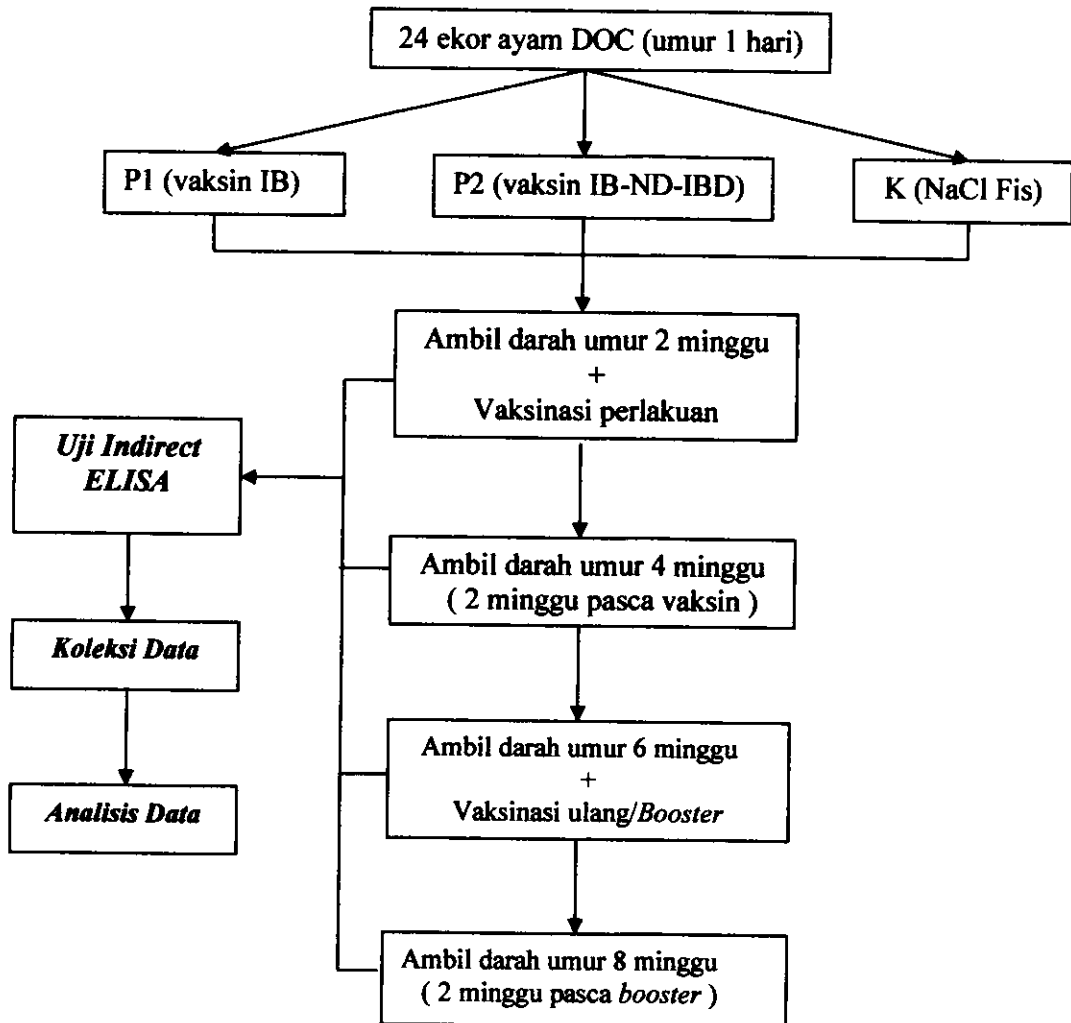
3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan acak pengukuran berulang yaitu pengukuran antibodi ayam *layer* pada umur dua, empat, enam, dan delapan minggu. Vaksin IB baik monovalen, polivalen, maupun kontrol berperan sebagai variabel bebas. Nilai OD sebagai variabel tergantung. Ayam, umur, jenis kelamin, kandang, dan pakan ayam bertindak sebagai variabel kendali.

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian disusun dalam tabel dan disajikan dalam bentuk rata-rata beserta simpang bakunya ($\bar{x} \pm sd$). Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh perlakuan dan waktu, data dianalisis menggunakan Anova Multivariat, sedangkan untuk mengetahui pengaruh perlakuan, data dianalisa menggunakan Anova Univariat. Hasil uji dinyatakan bermakna jika $p < 0.05$ atau berbeda nyata. Jika uji tersebut berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur). Pengerjaan analisa data menggunakan program SPSS (*Statistical Program for Social Scientific*) For Windows Versi 17.

Kerangka Operasional Penelitian



3.1 Kerangka operasional penelitian

BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Hasil *Indirect-ELISA* Secara Kualitatif

Hasil pemeriksaan *Indirect-Elisa* secara kualitatif memperlihatkan plate yang berisi sampel serum ayam hasil vaksinasi IB monovalen inaktif sedikit lebih kuning dibandingkan dengan plate yang berisi sampel serum ayam hasil vaksinasi IB polivalen inaktif dan kontrol (Lampiran 6).

4.2 Pengujian Nilai *Optical Density* Hasil Vaksinasi

Penelitian ini menggunakan teknik *Indirect-ELISA* yang menghasilkan data berupa nilai *Optical Density* (OD) yang dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 405 nm. Nilai OD antara perlakuan yang diberi vaksin IB monovalen inaktif dan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) dianalisis menggunakan uji *Analysis of Variance* (Anova) dan BNJ (Beda Nyata Jujur).

Tabel 4.1 Rataan (mean) \pm SD (*Standard Deviation*) Nilai OD ayam layer yang divaksin IB monovalen inaktif dengan IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD).

Umur Ayam (minggu ke)	Vaksin IB Monovalen	Vaksin IB Polivalen	Kontrol
2	0,2483 \pm 0,0311 ^a	0,2488 \pm 0,0322 ^a	0,2519 \pm 0,0307 ^a
4	0,3976 \pm 0,0601 ^b	0,3850 \pm 0,0427 ^b	0,2346 \pm 0,0520 ^a
6	0,4500 \pm 0,0877 ^b	0,4416 \pm 0,0469 ^b	0,1941 \pm 0,0417 ^a
8	0,4622 \pm 0,0514 ^b	0,4605 \pm 0,0405 ^b	0,1910 \pm 0,0394 ^a
Total rataan (mean)	0,3895 ^b	0,3839 ^b	0,2179 ^a

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$)

Nilai *Optical Density* antibodi pada ayam layer yang divaksin antara vaksin IB monovalen inaktif dan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) dengan analisis menggunakan uji Anova Univariat tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p>0.05$). Perbedaan yang nyata ($p<0.05$) terlihat antara kedua vaksin perlakuan dengan kontrol (Tabel 4.1), maka selanjutnya diperlukan uji *Analysis of Variance* (Anova) Multivariat untuk mengetahui perbedaan nilai OD antibodi setiap minggunya.

Pada hasil uji statistik menggunakan Anova, saat ayam berumur 2 minggu, nilai OD antibodi yang dihasilkan antara vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p>0.05$), dimana rata-rata nilai OD antibodi vaksin IB monovalen inaktif ($0,2483^a$) dan vaksin IB polivalen inaktif ($0,2488^a$). Nilai OD antibodi yang ditunjukkan antara kedua vaksin perlakuan dengan kontrol ($0,2519^a$) juga tidak berbeda nyata ($p>0.05$) (Tabel 4.1).

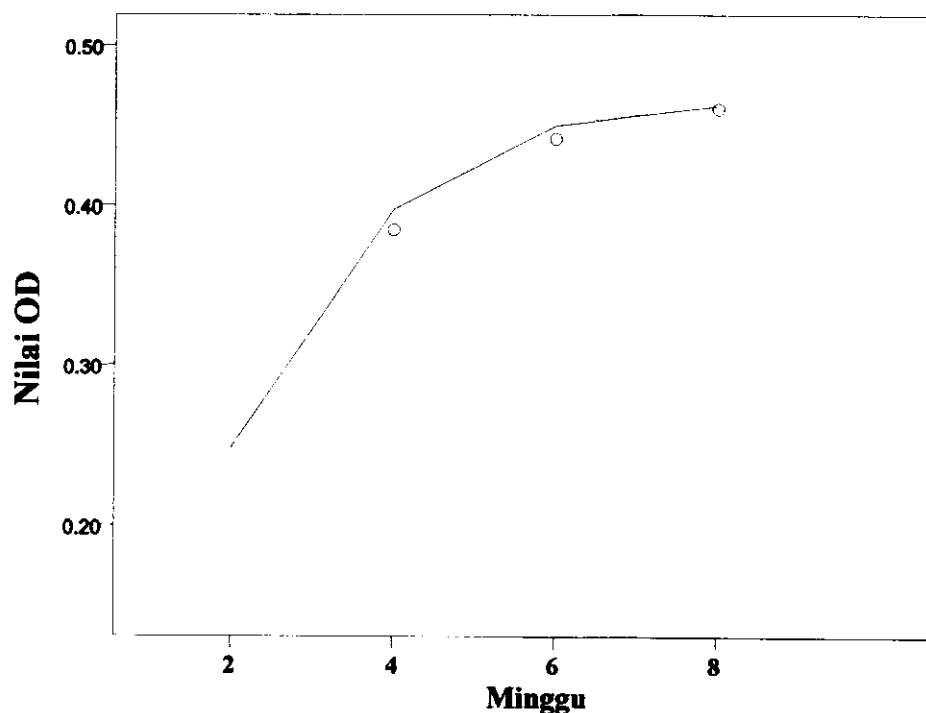
Pada saat ayam berumur 4 minggu (2 minggu pasca vaksinasi) nilai OD antibodi juga tidak terdapat perbedaan yang nyata antara vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif, rata-rata nilai OD antibodi vaksin IB monovalen yaitu ($0,3976^a$) dan vaksin IB polivalen yaitu ($0,3850^a$), rata-rata nilai OD antibodi vaksin monovalen mulai terlihat lebih tinggi daripada rata-rata nilai OD antibodi vaksin polivalen. Rata-rata nilai OD antibodi antara kedua vaksin perlakuan dan kontrol ($0,2346^b$) menunjukkan berbeda nyata, rata-rata nilai OD antibodi pada kontrol sudah tampak terlihat penurunan dari minggu sebelumnya.

Pada saat ayam berumur 6 minggu (4 minggu pasca vaksinasi), nilai OD antibodi antara vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif juga tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, dimana rata-rata nilai OD vaksin IB monovalen ($0,4500^a$) dan vaksin IB polivalen ($0,4416^a$). Rata-rata antara kedua vaksin perlakuan mengalami kenaikan, namun tidak signifikan. Perbedaan yang nyata ditunjukkan oleh kedua perlakuan yang divaksin dengan kontrol ($0,1941^b$), rata-rata nilai OD antibodi kontrol terus mengalami penurunan.

Pada saat ayam berumur 8 minggu (2 minggu pasca *booster*) nilai OD antara vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif menunjukkan tidak berbeda nyata, rata-rata nilai OD antibodi vaksin monovalen ($0,4622^a$) dan vaksin polivalen ($0,4605^a$), sedangkan rata-rata nilai OD antara kedua perlakuan yang diberi vaksin dengan kontrol ($0,1910^b$) terdapat perbedaan yang nyata maka selanjutnya diperlukan uji BNP 5% untuk mengetahui minggu yang menghasilkan nilai OD tertinggi dengan pemberian kedua jenis vaksin perlakuan serta dibandingkan dengan kontrol.

Hasil dari uji BNP 5% minggu yang menghasilkan nilai OD tertinggi terdapat pada saat ayam berumur 8 minggu (2 minggu pasca *booster*/vaksinasi ulang). Nilai OD antibodi antara vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif mengalami peningkatan setiap minggunya, sedangkan kontrol vaksin perlakuan semakin mengalami penurunan dari minggu ke minggu hingga tidak memiliki nilai OD antibodi.

Grafik yang menunjukkan nilai OD antibodi keseluruhan antara vaksin IB monovalen inaktif dan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) beserta kontrol disajikan pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Grafik nilai OD antibodi vaksin IB monovalen (garis hitam), vaksin IB polivalen (garis merah), kontrol (garis biru).

Berdasarkan gambar 4.1 secara keseluruhan menunjukkan peningkatan nilai OD antibodi ayam layer yang di vaksin IB monovalen inaktif dan di vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD). Pada ayam berumur 2 minggu hingga berumur 4 minggu (2 minggu pasca vaksin) nilai OD baik vaksin IB monovalen inaktif maupun vaksin IB polivalen inaktif mengalami peningkatan. Peningkatan nilai OD saat ayam berumur 4 minggu (2 minggu pasca vaksinasi) berlanjut hingga

ayam berumur 6 minggu dan 8 minggu yang merupakan 2 minggu pasca *booster*/vaksinasi ulang. Nilai OD mencapai titik tertinggi pada saat ayam berumur 8 minggu. Pada kontrol, terlihat nilai *Optical Density* pada awal minggu vaksinasi tinggi yang kemudian mengalami penurunan dari minggu ke minggu.

Pada grafik di atas, tampak terlihat antara kedua vaksin perlakuan dan kontrol berlawanan. Kedua vaksin perlakuan secara bersamaan mengalami peningkatan sedangkan kontrol mengalami penurunan. Pada minggu ke-2 nilai OD vaksin IB monovalen inaktif sebanding dengan vaksin IB polivalen inaktif. Pada minggu ke-4 (2minggu pasca vaksin), nilai OD antibodi vaksin IB monovalen inaktif mengungguli vaksin IB polivalen inaktif meskipun tidak signifikan. Hal ini juga tampak pada minggu ke-6 (minggu vaksin ulang/*booster*), sedangkan pada minggu ke-8, nilai OD vaksin IB monovalen inaktif dan vaksin IB polivalen inaktif hampir bertemu pada satu titik dan kedua vaksin tersebut mencapai nilai OD antibodi tertinggi. Berbeda dengan kontrol, pada minggu ke-2 nilai OD tinggi sehingga grafik naik, namun setelah minggu ke-4 garis pada grafik mulai terlihat penurunan sampai dengan minggu ke-8 (2 minggu pasca vaksinasi ulang/*booster*).

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan dua jenis vaksin inaktif yaitu vaksin *Infectious bronchitis* (IB) monovalen inaktif dan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) yang diujicobakan pada tubuh ayam *layer* untuk mengetahui tingkatan antibodi melalui nilai *Optical Density* (OD) ayam dari minggu ke minggu. Vaksin yang digunakan untuk vaksinasi IB adalah vaksin IB dibuat dari virus IB isolat lokal yang sudah diinaktifkan kemudian ditambahkan adjuvan, dimana fungsi adjuvan untuk meningkatkan kualitas vaksin (Tizard, 2000), sedangkan vaksin kombinasi IB-ND-IBD inaktif terbuat dari virus gabungan IB-ND-IBD isolat lokal yang sudah diinaktifkan dan ditambahkan adjuvan (Rantam, 2005).

Penelitian ini menggunakan uji serologis *Indirect-Elisa*, pembacaan Elisa dengan cara kualitatif (secara visual) dan semi kuantitatif atau kuantitatif (berupa nilai OD antibodi). Secara kualitatif menunjukkan adanya reaksi perubahan warna dari vaksin IB monovalen inaktif, vaksin IB polivalen inaktif dan kontrol. Perubahan warna yang terlihat berasal dari ikatan antara konjugat berlabel enzim *Alkaline Phosphatase* dan substrat p-NPP pada serum sampel IB monovalen inaktif. Perbedaan warna yang dihasilkan menunjukkan banyak sedikitnya enzim yang terserap sehingga pada saat diberikan substrat terjadi perubahan warna kuning menjadi lebih terang ataupun lebih pudar. Semakin kuning warna yang dihasilkan akan menunjukkan semakin tinggi nilai *Optical Density* OD yang terbaca dan semakin tinggi nilai analit yang terdeteksi (Suwarno dkk, 2010). Pembacaan Elisa secara semi-kuantitatif atau kuantitatif yaitu data berupa nilai

Optical Density (OD) antibodi antara vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif yang dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 405 nm. Vaksin IB monovalen inaktif dan vaksin IB polivalen inaktif menunjukkan peningkatan nilai OD antibodi setiap minggunya, sedangkan nilai OD antibodi pada kontrol menunjukkan penurunan di tiap minggunya. Hal ini disebabkan oleh level antibodi maternal pada ayam yang semakin hari semakin menurun hingga hilang (Cardoso *et al.*, 2005).

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh Ernawati, *et al.*, (1995), yaitu membandingkan vaksin ND dengan vaksin ND-IB. Namun, hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Tzvetkov *et al.*, (2000) yang membandingkan vaksin ND dengan vaksin ND-IB-IBD, yakni hasil titer antibodi yang dihasilkan vaksin polivalen tidak berbeda nyata dibandingkan dengan vaksin monovalen. Hal ini menunjukkan bahwa potensi vaksin polivalen yang digunakan dalam penelitian ini belum cukup mampu untuk menginduksi antibodi.

Pada vaksin monovalen kerja satu jenis strain virus yang diformulasikan pada vaksin tidak terganggu oleh strain lain sehingga kerja dari vaksin monovalen lebih optimal. Pada vaksin polivalen yang terdapat lebih dari satu jenis strain virus, maka terjadi daya kompetisi antara strain virus untuk menghasilkan antibodi (Tizard, 2000). Hal ini dikarenakan jumlah sel B yang ada di dalam tubuh hewan tidak sebanding dengan jumlah antigen/virus yang menginfeksi sel, sehingga terjadi persaingan antigen/virus mengikat reseptor sel B bursa fabricius melalui proteinnya (Wahab dan Julia, 2002). Antibodi yang dominan muncul

berasal dari virus telah terikat oleh reseptor pada permukaan sel B. Pada sel B didapatkan Ig M yang berfungsi sebagai reseptor antigen (Rahardjo dan Suwarno, 2005).

Berdasarkan penelitian terdahulu, titer antibodi antara vaksin monovalen dan vaksin polivalen berbeda (Ernawati *et al.*, 1995). Vaksin IB monovalen (tunggal) inaktif memiliki titer antibodi yang lebih tinggi dari pada ayam yang divaksin dengan vaksin polivalen (campuran) IB-ND-IBD inaktif, sedangkan hasil yang didapatkan penelitian ini menunjukkan titer antibodi melalui nilai *Optical Density* (OD) vaksin IB monovalen inaktif hampir sama dengan vaksin IB polivalen inaktif. Hal ini menunjukkan bahwa potensi vaksin IB polivalen inaktif sebanding dengan potensi vaksin IB monovalen inaktif dalam menginduksi antibodi.

Kunci keberhasilan vaksinasi ditentukan oleh penggunaan vaksin yang berkualitas tinggi dan juga harus didukung oleh manajemen yang optimal, terutama biosekuriti yang ketat. Vaksin harus diberikan terlebih dahulu sebelum terjadinya infeksi oleh agen infeksi lapangan. Vaksin juga harus dapat memberikan perlindungan kolektif pada semua ayam (Kabir, 2010). Selain itu juga diperlukan waktu vaksinasi yang tepat, untuk dapat menentukan waktu vaksinasi yang tepat, pengukuran maternal antibodi dibutuhkan untuk melihat tingkat keseragaman titer dan menghitung kecepatan penurunannya. Vaksinasi yang dilakukan pada saat titer antibodi maternal masih tinggi tidak akan efektif, virus vaksin justru akan dinetralisir oleh antibodi sehingga virus tidak akan bisa

multiplikasi dan pada akhirnya tidak akan muncul respon vaksinasi yang diharapkan (Suwadji, 2002).

Penggunaan vaksin memerlukan pemeriksaan secara serologis dengan menggunakan serum darah hewan percobaan (ayam *layer*) untuk mendeteksi terbentuknya antibodi sebagai respon terhadap vaksin yang diberikan (Ernawati dkk.,1996). Pemeriksaan dalam penelitian ini menggunakan uji serologis *Indirect-Elisa*. Hasil uji *Indirect-ELISA* untuk diagnosis antigen maupun antibodi lebih spesifik dibandingkan dengan uji *Direct-ELISA* (Rantam, 2005). Antibodi primer (antibodi antivirus IB) yang berasal dari hasil vaksinasi pada ayam berikatan dengan antibodi sekunder yaitu konjugat Ig *Anti-Chicken* berlabel enzim *Alkaline Phospatase*. Tampak adanya reaksi perubahan warna setelah penambahan substrat. Antibodi sekunder ini sangat penting dalam uji *Indirect-ELISA* karena mempunyai aktivitas spesifik yang tinggi (Piercenet, 2002).

Kekebalan terhadap bibit penyakit dapat ditimbulkan melalui vaksinasi. Zat yang menyebabkan kekebalan dapat ditemukan dalam serum darah yaitu antibodi. Antigen (virus) yang dimasukkan ke dalam tubuh akan difagosit sebagai benda asing oleh makrofag, tidak semua antigen terfagosit makrofag. Antigen yang tersisa kemudian merangsang pembentukan sel T-helper untuk membantu sel B menghasilkan antibodi atau sistem kekebalan tubuh (Grogan et al., 2008). Sistem pembentukan antibodi mempunyai kemampuan untuk "mengingat" keterpaparan dengan antigen sebelumnya (Tizard, 2000).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan yaitu tidak terdapat perbedaan nilai *Optical Density* (OD) antibodi antara ayam *layer* yang divaksin menggunakan vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif (IBD-IB-ND) dengan teknik *Indirect ELISA*.

6.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, tidak adanya perbedaan yang nyata antara vaksin IB monovalen inaktif dengan vaksin IB polivalen inaktif, sebaiknya lebih mengutamakan penggunaan vaksin IB polivalen inaktif daripada vaksin IB monovalen inaktif karena lebih menghemat waktu, tenaga, dan biaya.

Selain itu juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui tingkat protektivitas vaksin IB monovalen inaktif dan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) melalui *challenge test*.

RINGKASAN

RINGKASAN

Maya Rismayeni. Penelitian yang berjudul “ Perbedaan Nilai *Optical Density* (OD) Antibodi antara Ayam *Layer* yang Divaksin *Infectious Bronchitis* (IB) Monovalen Inaktif dengan *Infectious Bronchitis* Polivalen Inaktif (IB-ND-IBD) Menggunakan *Indirect* Elisa” di bawah bimbingan Nanik Sianita Widjaja, S.U., drh, selaku dosen pembimbing utama dan Dr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh, selaku dosen pembimbing serta. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan nilai *Optical Density* (OD) antibodi antara ayam yang divaksin IB monovalen inaktif dengan ayam yang divaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD) sehingga dapat dipilih jenis vaksin yang dapat menguntungkan bagi peternak.

Infectious Bronchitis termasuk salah satu jenis penyakit infeksi pada unggas yang disebabkan oleh *Coronavirus*. Penyakit IB biasanya menyerang anak ayam, mortalitas dapat terjadi di bawah 30% apabila tidak disertai dengan infeksi sekunder. Faktor tersebarnya penyakit ini di Indonesia adalah sistem pemasaran telur dalam *egg trays* yang berpindah dari satu peternakan ke peternakan lainnya dan lokasi peternakan satu dengan lainnya yang terlalu berdekatan. Penyakit ini ditandai dengan gejala klinis gangguan pernapasan yang ditandai oleh adanya pernapasan melalui mulut, batuk, bersin, ngorok basah (akibat adanya bunyi cairan yang melalui trakea) dan leleran dari hidung.

Penyakit IB tidak dapat diobati karena disebabkan oleh virus, namun dapat dicegah melalui vaksinasi. Pengobatan terhadap IB hanya membantu

menyelesaikan permasalahan penyakit sekunder yang menyertai sehingga produktivitas ayam sangat tergantung dengan keberhasilan program vaksin yang diberikan. Pemberian vaksin kepada suatu peternakan tidak mungkin hanya satu macam vaksin, melainkan beberapa macam vaksin, contohnya vaksin *Newcastle Disease* (ND) dan *Infectious Bursal Disease* (IBD). Hal ini mengakibatkan ayam mudah stres apabila terlalu sering kontak dengan peternak. Penggunaan vaksin polivalen merupakan alternatif bagi peternak untuk meminimalisasi tingkat stres ayam dan mencegah penurunan produksi ayam.

Diagnosa terhadap virus *Infectious Bronchitis* dapat dilakukan dengan uji ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Penentuan antibodi dapat dilakukan dengan pelabelan pada anti-imunoglobulinnya yaitu dengan menggunakan model *Indirect-ELISA*. Secara kualitatif, terlihat adanya perubahan warna pada *mikroplate*. Secara semi kuantitatif atau kuantitatif, ELISA dibaca dengan spektrofotometer (*ELISA reader*) dengan panjang gelombang 405 nm yang berdasarkan pada nilai titer atau absorban atau kerapatan optik (*Optical Density/OD*).

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2009 sampai bulan Maret 2010. Perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu Kelompok (P1), 8 ekor ayam divaksin IB monovalen inaktif (LV4UA), Kelompok (P2), 8 ekor ayam divaksin IBD polivalen inaktif (LV8UA), dan Kelompok (P3), 8 ekor ayam sebagai kontrol. Pengambilan darah pada ayam dilakukan pada umur 2 minggu, 4 minggu, 6 minggu dan 8 minggu, selanjutnya pengukuran nilai *Optical Density* (OD) antibodi dilakukan dengan teknik *Indirect-ELISA*.

Berdasarkan hasil pembacaan nilai *Optical Density* (OD) antibodi menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ($p>0.05$) antara antibodi ayam layer yang divaksin IB monovalen inaktif dengan IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD), sedangkan terdapat perbedaan yang nyata ($p<0.05$) antara kedua vaksin perlakuan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat potensi yang sama dalam menginduksi antibodi baik vaksin IB monovalen inaktif maupun vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD).

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

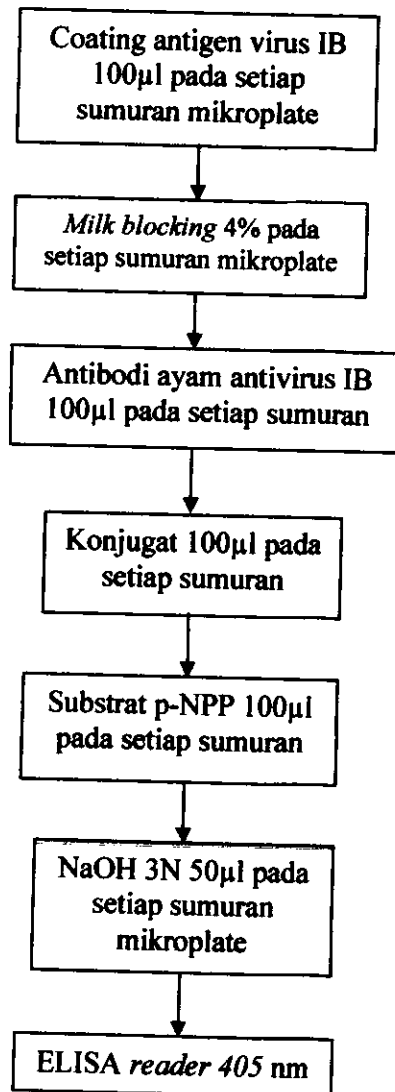
- Alberts., B. J. and R. Roberts. 1998. *Antibodies*. Garland Publishing. Prancis.
- Bahri, S., dan A. Kusumaningsih. 2005. *Potensi, Peluang, dan Strategi Pengembangan Vaksin Hewan di Indonesia*. Balai Penelitian Veteriner. Bogor. 113-120.
- Balai Penelitian Veteriner. 2006. *Kegagalan Vaksinasi IB pada Ayam*. (9 Agustus 2006).
- Butcher, G. D. and R. D. Miles. 2002. *Infectious Bursal Disease (Gumboro) in Commercial Broiler*. American Association of Avian Pathol.
- Cahyono, B. 2006. *Usaha Berternak Ayam Buras Petelur*. CV. Aneka Solo. Solo.
- Cardoso, W.M, J.L.C. Aguiam Filho, J.M. Ramao, R.P.R. Salles, S.R. Camara, A.A. Siquiera, W.F. Oliveira, M.H.N.R. Sobral and R.S.C. Txeira. 2005. *Effect of Associated Vaccines on the Interference between Newcastle Disease Virus and Infectious Bronchitis Virus in Broilers*. *Brazilian of Poultry Science*. v.7/n.3/181 – 184.
- Cardoso, W.M, J.L.C. Aguiam Filho, J.M. Ramao, R.P.R. Salles, S.R. Camara, A.A. Siquiera, W.F. Oliveira, M.H.N.R. Sobral and R.S.C. Txeira. 2006. *Interference of Infectious Bursal Disease Virus on Antibody Production against Newcastle Disease and Infectious Bronchitis Virus*. *Brazilian of Poultry Science*. v.8/n.3/177-182.
- Dharmayanti, NLP.I, W. Asmoro, W.T. Artama, R. Indriani dan Darminto. 2005. *Hubungan Kekebalan Virus Infectious Bronchitis Isolat Lapangan Indonesia*. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. Vol. 10. pp. 15-23.
- Ernawati, R., J. Rahmahani, N. Sianita, Suwarno dan W. Tjahjaningsih. 1995. *Pengaruh Pemberian Vaksin Kombinasi Newcastle Disease Dan Infectious Bronchitis Dengan Vaksin Tunggal Newcastle Disease Terhadap Titer Antibodi Pada Ayam Serta Pertumbuhan Dan Perubahan Histopatologis Pada Telur Ayam Bertunas*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.
- Ernawati, R., R. Soelistiyanto, A.P. Rahardjo, J. Rahmahani, F. A. Rantam, W. Tjahyaningsih, dan Suwarno. 1996. *Petunjuk Praktikum Viral*. *Laboratorium Virologi Dan Imunologi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga Surabaya.

- Ernawati, R., R. Soelistiyanto, A.P. Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmah, F.A. Rantam dan Suwarno. 2002. *Virologi Veteriner*. Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga Surabaya.
- Fenner, F.J, E.P.J Gibbs, F.A. Murphy, R. Rott, M.J. Studdert and D.O. White. 1995. *Veterinary Virology*. Edisi Kedua. Penerjemah D.K. Harya Putra. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Grogan, K.B., R.J. Fernandez, F.J.R. Barranon, H.G. Espinosa. 2008. *Avian Immune System*. <http://www.canadianpoultry.pdf> [6 Februari 2011]
- Hoosen, A. 2009. Update on Combined Vaccines: Traditional and New Vaccines. SAVIC GAUTENG 2009 EPI SYMPOSIUM. Johannesburg.
- Jackwood, D.J., K.S. Henderson and R.J. Jackwood. 1996. Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay Detection of Antibodies to Antigenic Subtype of Infectious Bursal Disease Viruses of Chickens. Ohio State University. Ohio. (34): 456-462.
- Irawan, G. 1996. *Aplikasi Teknik Nuklir dalam Bidang Vaksin*. Pusat Teknologi dan Keselamatan dan Metrologi Radiasi. Jakarta.
- Kabir, S.M.L. 2010. Threat of global pandemic is growing and it's impact on the developing countries' economy. Departemen of Microbiology and Hygiene. Faculty of Veterinary Science. Bangladesh University Mymensingh. Bangladesh. *African Journal of Microbiology Research* Vol 4(12). Pp 1192-1194. 18th june 2010.
- Kresno, S. B., 1996. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Lindahl, J. 2004. *Infectious Bronchitis Virus and Infectious Bursal Disease Virus. A study Performed at the Universidad Nacional of Costa Rica*. Examensarbete 2004:48.
- Lukert, P.D and Y.M Saif . 1997. *Infectious Bursal Disease. Disease of Poultry*. 7th Edition. Iowa State Press. USA.
- Litbang. 2006. Pototipe Vaksin Kombinasi Penyakit ND dan Flu Burung. <http://www.litbang.deptan.go.id/berr=ita/one/306.com> [5 Februari 2010]
- Murphy, F.A., E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek, and M.J. Studdert. 1999. *Veterinary Virology*. Third Edition. Academic Press. London.
- Murtidjo, B.A. 2006. *Pengendalian Hama dan Penyakit Ayam*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.

- OIE. 2009. Infectious Bronchitis. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 10.2. Article 10.2.1.
- OIE. 2004. Newcastle Disease. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.15.
- Paniago, M. and V. Turblin. 2010. Prevention Strategy of Infectious Bursal Disease. Vat No. 647. Inggris.
- Piercenet. 2002. Proteomics ELISA. 20 Juli 2006.
- Rahardjo, A.P dan Suwarno. 2005. Imunogenesitas Protein VP2 Virus *Infectious Bursal Disease* Isolat Lokal sebagai Dasar Pengembangan Vaksin Sub Unit. Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.Surabaya. Vol. 21, No. 1.
- Rantam, F.A. 2005. Virologi. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Rantam, F.A dan W. Asmara. 2010. Akankah Vaksin Polivalen Menggeser Monovalen. Majalah Poultry Indonesia. Edisi Februari Vol.V. Hlm. 68-70.
- Rudd, M.F., H.G Heine, S.I. Sapats, L. Parede and J. Ignjatovic. 2002. Characterisation of an Indonesian Very Virulent Strain of Infectious Bursal Disease Virus. Arch Virol. 147: 1.303-1.322.
- Saif, Y.M. 2003. Infectious Bronchitis. Disease of Poultry. Eleventh Edition. Iowa State Press. USA. Hal. 101-114.
- Shiv. C and G. Gaurav. 2004. *Infectious Bursal Disease Limitation with Respest to Development of Efficient Vaccine*. CCS Haryana Agriculture University.
- Soeharsono. 1997. Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Terhadap Penampilan Tubuh Dan Aktifitas Beberapa Organ Limfoid Ayam Pedaging Yang Divaksin Tetelo [Thesis]. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Soeharsono. 2005. Zoonosis Penyakit Menular dari Hewan ke Manusia. Kanisius. Yogyakarta. Hal. 65-68.
- Subowo. 1993. Imunologi Klinik. Angkasa. Bandung.

- Suwadji, R. 2002. Strategi Pengendalian Gumboro. Poultry Indonesia Edisi Online. Majalah Poultry Indonesia Jakarta. <http://www.poultryindonesia.com/modules>. [10 November 2010]
- Suwarno., E. Rahayu, A.P. Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmahani dan F.A. Rantam. 2003. Prinsip Dasar Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA. Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR. Surabaya.
- Suwarno., F.A. Rantam, E. Rahayu, N. Sianita, A.P. Rahardjo dan J. Rahmahani. 2010. ELISA, Teori dan Protokol. Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR. Surabaya.
- Tabbu, C. R. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangan, Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral, volume 1. Kanisius, Yogyakarta.
- Tizard, I.R. 2000. Pengantar Immunologi Veteriner. Penerjemah Soekardjo Hardjosworo. Airlangga University Press. Surabaya.
- Tzvetkov, P., K. Genova and N. Djambazova. 2000. Preparaton of Trivalent Inactivated Vaccine Against Newcastle Disease, Infectious Bursal Disease and Infectious Bronchitis in chickens. Bulgarian Academy of Science. Bulgaria.
- Van den Berg, T.P. 2000. Acute Infectious Bursal Disease in Poultry: a riview. Avian Pathology. 29:175-194.
- Wahab, S. dan M. Julia. 2002. Sistem Imun, Imunisasi dan Penyakit Imun. Widya Medika. Jakarta. Hal.15.
- Yong-Chang, Quan-Cheng SHI, Jing-Yun MA, Qing-Mei XIE and Ying-Zuo BI. 2005. Vaccination against Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Using Recombinant T4 Bacteriophage Displaying Viral Protein VP2. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 37(10):657-664.
- Zhang, D.Y., J.Y. Zhou, J. Fang, J.Q. Hu, J.X. Wu and A.X. Mu. 2005. An ELISA for Antibodies to Infectious Bronchitis Virus Based on Nucleocapsid Protein Produced in *Escherchia coli*. Vet. Med. 50(8): 336-344.

LAMPIRAN

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

Lampiran 2. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji *Indirect-ELISA***1. PBS (*Phosphate Buffer Saline*)**

pH : 7,4

Konsentrasi : Fosfat: 10 mmol/l

NaCl : 140 mmol/l

Timbang	: NaCl	: 8 g
	KH ₂ PO ₄	: 0,2 g
	KCl	: 0,2 g
	Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	: 2,89 g
	Aquades ad 1 liter	

Simpan pada 4⁰C.

Katalog :

- NaCl

- KCl, Kalium, Kalium Chloride (31248) Ident. Nr. 10-100-94 Vertrags
Nr.1082- KH₂PO₄, Kalium Dihydrogen Phosphat (30407) Ident. Nr. 10-100-94 EG.
Nr. 231-913-4-Na₂HPO₄ 12H₂O. Natrium Hydrogen Phosphate-2-hydrat.**2. Carbonat Buffer (Buffer untuk *coating* Ag)**

Ph : 9,6

Konsentrasi : 50 mmol/l

Timbang :

Na₂CO₃ : 1,59 gNaHCO₃ : 2,93 g

Aquades ad 1 liter

Simpan pada suhu 4⁰C dan tidak lebih dari 2 minggu.

Katalog :

-Na₂CO₃ (Natrium Carbonat Wasserfrei) 500.323 A763692 Art 6392.
MERCK.

-NaHCO₃ (Natrium Hidrogen Carbonat) Art 6392.MERCK.

3. Washing Buffer (Buffer untuk pencuci)

a. PBS-Tween

Timbang : Tween-20 : 1 ml

PBS ad 1 liter

Katalog :

- NaCl (lihat Blocking Buffer)
- Tween-20 (lihat Blocking Buffer)
- Triton x-100 (lihat Blocking Buffer)
- NaN₃ (lihat Substrat Buffer)

4. Buffer Blocking (Bufer untuk pengencer)

a. PBS-Tween-BSA

pH : 7,4

Konsentrasi : Fosfat : 10 mmol/l

NaCl : 140 mmol/

Tween-20 : 1 ml

BSA : 5 g

Timbang :

BSA : 0,5 g

PBS Tween ad 100 ml

Katalog :

- Tween-20. 500 ml cat. 20605 cas : 9005-64-5 Lot. 107989.USB
- NaCl (Sodium Chloride Analytical Reagent) 1 kg. 31434 Riedel-de-haen

-

5. Buffer Substrat

pH : 9,8

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

Timbang :

MgCl ₂	: 10 mg
Diethanolamine	: 9,7 ml
NaN ₃	: 20 mg
Aqua	: 80 mg
HCl pekat sampai pH	: 9,8
Aquades ad	100 ml

Disimpan pada suhu kamar

Katalog :

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

6. Konjugat

Alkaline Phosphatase-Anti Chicken Ig G Conjugate

Encerkan dengan buffer blocking 1:1000-1:3000

Lampiran 3. Hasil Perhitungan Nilai OD IB pada ayam layer menggunakan Analisis of Variance (Anova) dengan aplikasi SPSS.

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Nilai OD minggu 2 *	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%
Pertakuan						
Nilai OD minggu 4 *	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%
Pertakuan						
Nilai OD minggu 6 *	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%
Pertakuan						
Nilai OD minggu 8 *	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%
Pertakuan						

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

Kelompok		Nilai OD minggu 2	Nilai OD minggu 4	Nilai OD minggu 6	Nilai OD minggu 8
P1 (vaksin IB)	1	.26	.45	.54	.58
	2	.23	.40	.52	.47
	3	.25	.46	.47	.48
	4	.30	.34	.45	.46
	5	.29	.39	.56	.45
	6	.23	.48	.36	.42
	7	.22	.36	.31	.42
	8	.21	.31	.41	.42
	N	.8	.8	.8	.8
	Mean	.2483	.3976	.4500	.4622
Std. Deviation	.03114	.06017	.08777	0.5140	
P2 (vaksin IB-ND-IBD)	1	.25	.38	.42	.43
	2	.25	.35	.48	.49
	3	.21	.37	.44	.47
	4	.23	.40	.40	.53
	5	.27	.31	.36	.42
	6	.29	.41	.49	.41
	7	.29	.43	.46	.46
	8	.21	.44	.49	.49
	N	.8	.8	.8	.8
	Mean	.2488	.3850	.4416	.4805
Std. Deviation	.03277	.04267	.04688	.04046	
Kontrol	1	.27	.17	.18	.16
	2	.26	.21	.17	.23
	3	.22	.23	.19	.18
	4	.27	.20	.19	.19
	5	.25	.24	.15	.14
	6	.26	.25	.17	.17
	7	.30	.24	.22	.20
	8	.20	.35	.28	.26
	N	.8	.8	.8	.8
	Mean	.2519	.2346	.1941	.1910
Std. Deviation	.03087	.05207	.04171	.03933	
Total	N	.24	.24	.24	.24
	Mean	.2496	.3391	.3619	.3712
	Std. Deviation	.032002	.09056	.13507	.13684

Lampiran 3(Lanjutan). Hasil Perhitungan Nilai OD IB pada ayam *layer* menggunakan Analisis of Variance (Anova) dengan aplikasi SPSS.

Oneway

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Nilai OD minggu 2	Between Groups	.000	.000	.031	.969
	Within Groups	.021	.001		
	Total	.021	23		
Nilai OD minggu 4	Between Groups	.132	.066	24.211	.000
	Within Groups	.057	.003		
	Total	.189	23		
Nilai OD minggu 6	Between Groups	.338	.169	43.580	.000
	Within Groups	.081	.004		
	Total	.420	23		
Nilai OD minggu 8	Between Groups	.390	.195	100.386	.000
	Within Groups	.041	.002		
	Total	.431	23		

Lampiran 3(Lanjutan). Hasil Perhitungan Nilai OD IB pada ayam layer menggunakan Analisis of Variance (Anova) dengan aplikasi SPSS.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Nilai OD minggu 2	vaksin monovalen	vaksin polivalen	-.00050	.01568	.999	-.0400	.0390
		kontrol	-.00363	.01568	.971	-.0432	.0359
	vaksin polivalen	vaksin monovalen	.00050	.01568	.999	-.0390	.0400
		kontrol	-.00313	.01568	.978	-.0427	.0364
	kontrol	vaksin monovalen	.00363	.01568	.971	-.0359	.0432
		vaksin polivalen	.00313	.01568	.978	-.0364	.0427
Nilai OD minggu 4	vaksin monovalen	vaksin polivalen	.01262	.02606	.879	-.0531	.0783
		kontrol	.16300*	.02606	.000	.0973	.2287
	vaksin polivalen	vaksin monovalen	-.01262	.02606	.879	-.0783	.0531
		kontrol	.15037*	.02606	.000	.0847	.2161
	kontrol	vaksin monovalen	-.16300*	.02606	.000	-.2287	-.0973
		vaksin polivalen	-.15037*	.02606	.000	-.2161	-.0847

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

Lampiran 3(Lanjutan). Hasil Perhitungan Nilai OD IB pada ayam layer menggunakan Analisis of Variance (Anova) dengan aplikasi SPSS.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Nilai OD minggu 6	vaksin monovalen	vaksin polivalen	.00838	.03114	.961	-.0701	.0869
		kontrol	.25588*	.03114	.000	.1774	.3344
	vaksin polivalen	vaksin monovalen	-.00838	.03114	.961	-.0869	.0701
		kontrol	.24750*	.03114	.000	.1690	.3260
	kontrol	vaksin monovalen	-.25588*	.03114	.000	-.3344	-.1774
		vaksin polivalen	-.24750*	.03114	.000	-.3260	-.1690
Nilai OD minggu 8	vaksin monovalen	vaksin polivalen	.00175	.02203	.997	-.0538	.0573
		kontrol	.27125*	.02203	.000	.2157	.3268
	vaksin polivalen	vaksin monovalen	-.00175	.02203	.997	-.0573	.0538
		kontrol	.26950*	.02203	.000	.2140	.3250
	kontrol	vaksin monovalen	-.27125*	.02203	.000	-.3268	-.2157
		vaksin polivalen	-.26950*	.02203	.000	-.3250	-.2140

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

Lampiran 3(Lanjutan). Hasil Perhitungan Nilai OD IB pada ayam *layer* menggunakan Analisis of Variance (Anova) dengan aplikasi SPSS.

Homogeneous Subsets

Nilai OD minggu 2

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05
		1
K	8	.2519
P2	8	.2488
P1	8	.2483
Sig.		.971

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000

Nilai OD minggu 4

Tukey HSD

kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
K	8	.2346	
P2	8		.3850
P1	8		.3976
Sig.		1.000	.879

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000

Nilai OD minggu 6

Tukey HSD

kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
K	8	.1941	
P2	8		.4416
P1	8		.4500
Sig.		1.000	.961

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000

Nilai OD minggu 8

kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
K	8	.1910	
P2	8		.4605
P1	8		.4623
Sig.		1.000	.997

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000

Lampiran 3(Lanjutan). Hasil Perhitungan Nilai OD IB pada ayam *layer* menggunakan Analisis of Variance (Anova) dengan aplikasi SPSS.

General Linear Model

Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE_1

Minggu	Dependent Variable
1	OD_1
2	OD_2
3	OD_3
4	OD_4

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Perlakuan	1.00 vaksin	8
	2.00 monovalen vaksin	8
	3.00 polivalen kontrol	8

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Minggu	Pillai's Trace	.847	34.990 ^a	3.000	19.000	.000
	Wilks' Lambda	.153	34.990 ^a	3.000	19.000	.000
	Hotelling's Trace	5.525	34.990 ^a	3.000	19.000	.000
	Roy's Largest Root	5.525	34.990 ^a	3.000	19.000	.000
Minggu * Perlakuan	Pillai's Trace	.880	5.240	6.000	40.000	.000
	Wilks' Lambda	.130	11.236 ^a	6.000	38.000	.000
	Hotelling's Trace	6.618	19.854	6.000	36.000	.000
	Roy's Largest Root	6.606	44.041 ^b	3.000	20.000	.000

a. Exact statistic

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

c. Design: Intercept + Perlakuan

Within Subjects Design: Minggu

Lampiran 3(Lanjutan). Hasil Perhitungan Nilai OD IB pada ayam *layer* menggunakan Analisis of Variance (Anova) dengan aplikasi SPSS.

Mauchly's Test of Sphericity^b

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
Minggu	.886	2.386	5	.794	.935	1.000	.333

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

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

b Design: Intercept + Perlakuan
Within Subjects Design: Minggu

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Minggu	Sphericity Assumed	.222	3	.074	41.531	.000
	Greenhouse-Geisser	.222	2.805	.079	41.531	.000
	Huynh-Feldt	.222	3.000	.074	41.531	.000
	Lower-bound	.222	1.000	.222	41.531	.000
Minggu * Perlakuan	Sphericity Assumed	.251	6	.042	23.447	.000
	Greenhouse-Geisser	.251	5.611	.045	23.447	.000
	Huynh-Feldt	.251	6.000	.042	23.447	.000
	Lower-bound	.251	2.000	.125	23.447	.000
Error(Minggu)	Sphericity Assumed	.112	63	.002		
	Greenhouse-Geisser	.112	58.912	.002		
	Huynh-Feldt	.112	63.000	.002		
	Lower-bound	.112	21.000	.005		

Lampiran 3(Lanjutan). Hasil Perhitungan Nilai OD IB pada ayam *layer* menggunakan Analisis of Variance (Anova) dengan aplikasi SPSS.

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	Minggu	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Minggu	Linear	.180	1	.180	111.661	.000
	Quadratic	.039	1	.039	22.241	.000
	Cubic	.003	1	.003	1.689	.208
Minggu * Perlakuan	Linear	.224	2	.112	69.291	.000
	Quadratic	.027	2	.014	7.806	.003
	Cubic	7.875E-5	2	3.937E-5	.020	.981
Error(Minggu)	Linear	.034	21	.002		
	Quadratic	.036	21	.002		
	Cubic	.042	21	.002		

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1
Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	10.484	1	10.484	2514.023	.000
Perlakuan	.609	2	.304	72.978	.000
Error	.088	21	.004		

Lampiran 3(Lanjutan). Hasil Perhitungan Nilai OD IB pada ayam *layer* menggunakan Analisis of Variance (Anova) dengan aplikasi SPSS.

Post Hoc Tests

Perlakuan

Multiple Comparisons

Measure: MEASURE_1
Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
vaksin monovalen	vaksin polivalen	.0056	.01614	.937	-.0351	.0463
	Kontrol	.1716*	.01614	.000	.1309	.2123
vaksin polivalen	vaksin monovalen	-.0056	.01614	.937	-.0463	.0351
	Kontrol	.1661*	.01614	.000	.1254	.2068
Kontrol	vaksin monovalen	-.1716*	.01614	.000	-.2123	-.1309
	vaksin polivalen	-.1661*	.01614	.000	-.2068	-.1254

Based on observed means.

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

Homogeneous Subsets

MEASURE_1

Tukey HSD^{a,b,c}

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
Kontrol	8	.2179	
vaksin polivalen	8		.3840
vaksin monovalen	8		.3895
Sig.		1.000	.937

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .001

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000.

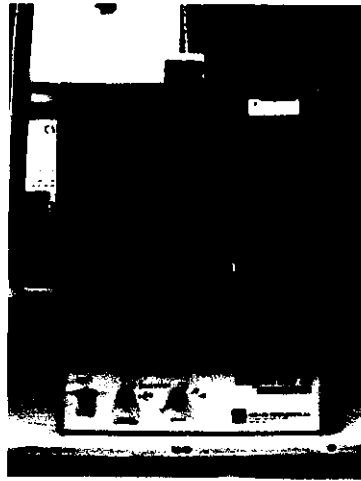
b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = .05.

Lampiran 4. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian

- Keterangan:
- | | |
|----------------|-----------------------|
| 1) Pipet | 6) Micro tube |
| 2) Gelas Ukur | 7) <i>Micro plate</i> |
| 3) Erlenmeyer | 8) Vortex |
| 4) Micropipet | 9) Yellow tip |
| 5) Becker Glss | |

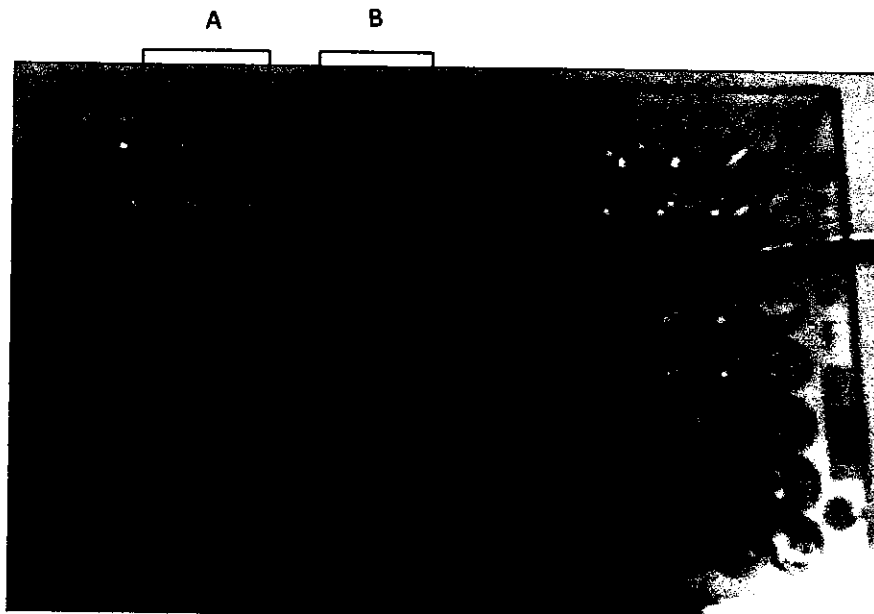
Lampiran 4 (lanjutan). Alat-alat yang digunakan dalam penelitian



Keterangan : Incubator



Keterangan : Spektrofotometer (Elisa Reader)

Lampiran 5. Interpretasi Hasil ELISA

Hasil *indirect* ELISA minggu ke-8 (2 minggu pasca *booster*)

Keterangan:

- A = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin IB monovalen inaktif
- B = Serum ayam hasil vaksinasi dengan vaksin IB polivalen inaktif (IB-ND-IBD)
- C = Kontrol