

# Peningkatan Titer Antibodi Terhadap *Avian Influenza* Dalam Serum Ayam Petelur yang Divaksin Dengan Vaksin Komersial

(Increasing of antibody titre against *avian influenza* in serum of vaccinated laying hens with commercial vaccine)

Ummu Balqis<sup>1</sup>, Muhammad Hambal<sup>2</sup>, Mulyadi<sup>3</sup>, Samadi<sup>4</sup>, Darmawi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Staf Pengajar Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

<sup>2</sup> Staf Pengajar Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

<sup>3</sup> Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala

<sup>4</sup> Staf Pengajar Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala

<sup>5</sup> Staf Pengajar Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

**ABSTRACT** The advantages of vaccination are that it reduces the risk of infection, and concurrently reduces morbidity, mortality and shedding of virus. The goal of the present study was to evaluate efficacy of *Avian Influenza* commercial vaccine based on humoral immunity responses of laying hens. Totally, 20 breakeel silver layer hens were used in this research. The laying hens were vaccinated using *Avian Influenza* commercial vaccine (H5N1). Blood samples were collected

from the axilaris vein (left or right) one time at prevaccination and repeated three times with an interval of one month at postvaccination. Antibody titres were examined using *Hemagglutination Inhibition* (HI). The result showed that *Avian Influenza* commercial vaccine (H5N1) was a good protection because the vaccine was able to trigger protective humoral immunity of laying hens indicated by increasing of antibody titre in serum of vaccinated laying hens during three months.

**Key words:** Avian influenza, vaccine, antibody, laying hens

2011 Agripet : Vol (11) No. 1: 5-9

## PENDAHULUAN

Virus *Avian Influenza* yang menyebabkan penyakit flu burung menyerang sistem pernafasan unggas dan hewan lainnya, serta manusia. Investigasi yang telah dilakukan melalui kajian seroepidemiologi pada berbagai jenis unggas membuktikan bahwa Propinsi Aceh telah termasuk provinsi *hot spot* (*contaminated area*) flu burung. Titer antibodi terhadap virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 dari yang tertinggi sampai yang terendah ditemukan pada layer (18,9%), diikuti broiler (6,4%), itik (5,2%), ayam buras (2,4%), dan entog (2,0%) (Erina, 2006). *Hot spot* di wilayah Indonesia lainnya dilaporkan oleh peneliti terdahulu bahwa titer antibodi unggas terhadap *Avian Influenza* subtipe H5N1 mencapai 90% di Kalimantan, dan berkisar antara 40 – 90% di Sumatra Utara dan

Lampung. Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh flu burung ditaksir mencapai miliaran rupiah setiap tahunnya (Soejoedono *et al.*, 2005).

Untuk menghindari kerugian ekonomi yang diakibatkan oleh morbiditas dan mortalitas unggas karena infeksi virus *Avian Influenza* maka diperlukan metode pengendalian secara imunoprofilaksis. Untuk menerapkan pengendalian flu burung secara imunoprofilaksis haruslah tersedia vaksin yang tepat, akurat, dan mujarab untuk mencapai tujuan vaksinasi. Selama ini, antigen yang sudah banyak diteliti untuk dijadikan sebagai kandidat vaksin terhadap flu burung diperoleh dari virus *low pathogenic avian influenza* (LPAI). Namun, beberapa strain LPAI dapat bermutasi di bawah kondisi lapang menjadi virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) sehingga bersifat sangat infeksius dan fatal (Rimmelzwaan *et al.*, 2001, 2006). Oleh

---

Corresponding author: u\_balqis@yahoo.com

karena itu, untuk mendapatkan hasil vaksinasi yang protektif terhadap flu burung haruslah diterapkan metode vaksinasi yang tepat. Indikasi vaksinasi yang baik dievaluasi berdasarkan kemampuan vaksin merangsang pembentukan antibodi. Antibodi protektif terhadap serangan flu burung apabila memiliki inhibisi pada serum yang diencerkan 1 : 16 ( $2^4$ ) atau log  $2^4$  yang menggunakan antigen 4 HAU (OIE, 2000).

Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi peningkatan titer antibodi terhadap *Avian Influenza* di dalam serum ayam petelur yang divaksin dengan vaksin komersial. Hipotesis yang ingin dibuktikan adalah ayam petelur yang diimunisasi dengan vaksin komersial (H5N1) akan terpicu respons humoralnya sehingga akan menghasilkan antibodi anti-*Avian Influenza* yang dapat memberi proteksi kepada ayam petelur. Ruang lingkup dan batas-batas riset ini diarahkan kepada kajian terhadap efikasi vaksin *Avian Influenza* berdasarkan terbentuknya antibodi di dalam serum sebelum vaksinasi (pravaksinasi) dan sesudah vaksinasi (pascavaksinasi).

## MATERI DAN METODE

### Rancangan Penelitian

Sebanyak 20 ekor ayam petelur jenis *Breakel Silver* yang tidak pernah divaksin dengan vaksin *Avian influenza* diperoleh dari pedagang ayam komersial. Ayam dipelihara secara individual dalam kandang batere, diberi pakan dan minum secara *et libitum*. Semua ayam tersebut divaksinasi dengan vaksin komersial *Avian Influenza* (H5N1). Sampel darah dari *vena axilaris* (kiri atau kanan) dari sayap ayam petelur tersebut dikoleksi satu kali pada pravaksinasi dan diulang tiga kali pada pascavaksinasi dalam interval waktu satu bulan. Sampel darah dari semua ayam petelur tersebut diuji titer antibodinya dengan teknik HI test. Titer antibodi dievaluasi berdasarkan protektivitasnya terhadap ancaman serangan *Avian Influenza*. Ayam yang memiliki titer antibodi  $< 2^4$  digolongkan sebagai ayam yang tidak protektif, sedangkan ayam yang memiliki titer antibodi  $> 2^4$  digolongkan sebagai ayam yang protektif terhadap *Avian Influenza*.

### Vaksinasi

Dua puluh ekor ayam petelur jenis *Breakel Silver* divaksinasi dengan vaksin komersial *Avian Influenza* (H5N1). Teknik vaksinasi yang digunakan mengikuti metode *booster*, yaitu suntikan pertama menggunakan 0,5 ml antigen vaksin komersial *Avian Influenza* (H5N1) dengan emulsi plus *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) dan setiap 2 minggu berikutnya diikuti suntikan *booster*. *Booster* dilakukan sebanyak 3 kali, setiap kali *booster* menggunakan suntikan 0,5 ml antigen vaksin komersial *Avian Influenza* (H5N1) dengan suntikan emulsi *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). Sampel darah dari *vena axilaris* ayam petelur tersebut dikoleksi satu kali pada pravaksinasi dan tiga kali pada pascavaksinasi dalam interval waktu satu bulan. Titer antibodi serum anti-*Avian Influenza* diuji dengan teknik *Hemagglutination Inhibition* (HI) (Li *et al.*, 2005).

### Uji *Hemagglutination Inhibition* (HI test)

Masing-masing sumur *microplate U bottom* nomor 1 – 12 diisi dengan 25  $\mu$ l suspensi virus standar (4 HAU). Sebanyak 25  $\mu$ l serum yang akan diuji ditambahkan dan dihomogenkan di dalam sumur nomor 1. Sebanyak 25  $\mu$ l campuran virus standar dan serum pada sumur nomor 1 dipindahkan dan dihomogenkan ke dalam sumur nomor 2. Hal yang sama dilakukan pada sumur nomor 3 sampai 12. *Microplate* dikocok dengan cara digoyang-goyangkan, dan diinkubasi pada temperatur ruangan selama 15 menit. Sebanyak 25  $\mu$ l suspensi sel darah merah 0,5% ditambahkan ke dalam seluruh sumur, *microplate* digoyang-goyangkan, dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Hasil dibaca jika eritrosit pada sumur kontrol telah mengendap (Karaca *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2005). Apabila titer antibodi menunjukkan positif meningkat mencapai  $2^4$ , maka ayam tersebut digolongkan sebagai ayam yang memiliki proteksi terhadap *Avian Influenza* (OIE, 2000).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Titer antibodi ayam arab pada 20 ekor (100 %) sampel termasuk kategori tidak

protektif ( $< 2^4$ ) sebelum divaksinasi. Antibodi ayam arab yang menunjukkan kategori titer protektif ( $> 2^4$ ) pada satu, dua, dan tiga bulan pascavaksinasi berturut-turut adalah 16 ekor (80 %), 19 ekor (95 %), dan 15 ekor (75%). Menurut Direktorat Jenderal Peternakan (2005) bahwa hasil interpretasi terhadap *Avian Influenza* dinyatakan protektif apabila 70 % atau lebih sampel serum yang diuji HI menunjukkan nilai titer HI  $> 1 : 16$  ( $2^4$ ) [9]. Hasil uji HI serum ayam dalam periode waktu tiga bulan pascavaksinasi dengan vaksin komersial (H5N1) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji *Hemagglutination Inhibition* (HI test) terhadap serum ayam dalam periode tiga bulan pascavaksinasi dengan vaksin *Avian Influenza*.

Titer Antibodi	Pravaksinasi		Pascavaksinasi					
	Frekuensi	%	Bulan 1		Bulan 2		Bulan 3	
$2^0$	16	80	2	10	0	0	1	5
$2^1$	2	10	0	0	1	5	1	5
$2^2$	1	5	1	5	0	0	1	5
$2^3$	1	5	1	5	0	0	2	10
$2^4$			1	5	1	5	4	20
$2^5$			2	10	6	30	4	20
$2^6$			7	35	6	30	0	0
$2^7$			6	30	6	30	7	35
$2^8$								
$2^9$								
Total	20	100	20	100	20	100	20	100

Pembentukan antibodi meningkat terhadap *Avian Influenza* di dalam serum ayam arab yang divaksinasi. Rataan titer antibodi pada pravaksinasi dan pada satu, dua, dan tiga bulan pascavaksinasi berturut-turut adalah  $2^{0,35}$ ,  $2^{5,15}$ ,  $2^{5,56}$ , dan  $2^{4,70}$ . Hal ini menunjukkan bahwa vaksinasi menyebabkan kenaikan titer antibodi yang melampaui standar minimum titer antibodi protektif terhadap AI yaitu  $2^4$ . Rataan kenaikan antibodi pada perlakuan pascavaksinasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan Kenaikan Titer Antibodi Pascavaksinasi.

Perlakuan	Jumlah	Rataan
Pravaksinasi	20	0,35
Pascavaksinasi Bulan ke-1	20	5,15
Pascavaksinasi Bulan ke-2	20	5,56
Pascavaksinasi Bulan ke-3	20	4,70

Persentase antibodi ayam arab yang protektif terhadap AI pascavaksinasi tergolong tinggi pada tiap bulan pemeriksaan. Ayam arab yang digunakan pada penelitian ini, sebelum vaksinasi tidak memiliki proteksi terhadap serangan AI (0 %). Capaian persentase antibodi protektif pada masing-masing bulan

ke-1, ke-2, dan ke-3 berturut-turut adalah 80 %, 95 %, dan 75%. Pengaruh vaksinasi terhadap peningkatan jumlah ayam arab yang memiliki titer antibodi protektif terhadap AI disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hubungan vaksinasi terhadap peningkatan titer antibodi di dalam serum ayam arab selama tiga bulan pascavaksinasi.

Titer Antibodi	Pravaksinasi		Pascavaksinasi					
	Jumlah	%	Bulan 1		Bulan 2		Bulan 3	
Tidak Protektif	20	100	4	20	1	5	5	25
Protektif	0	0	16	80	19	95	15	75
Total	20	100	20	100	20	100	20	100

Implikasi dari rangsangan respons imun ayam petelur adalah terbentuknya antibodi spesifik di dalam serum. Pembentukan antibodi spesifik terhadap antigen dapat diuji dengan HI test yang ditandai adanya peningkatan titer antibodi. Pada riset ini, ayam yang divaksinasi dengan vaksin komersial menunjukkan repons titer antibodi yang positif meningkat. Hal ini berarti bahwa vaksin komersial *Avian Influenza* (H5N1) yang digunakan pada penelitian ini merupakan antigen yang baik karena terbukti dapat menggerakkan sistem imunitas ayam petelur yang berimplikasi pada terbentuknya antibodi di dalam serum yang memiliki titer antibodi  $> 2^4$  pada bulan pertama, kedua, dan ketiga pascavaksinasi. Frekuensi titer antibodi serum  $> 2^4$  pada bulan pertama pascavaksinasi adalah 80 %, dan meningkat pada bulan kedua yang mencapai 95 %, tetapi titer antibodi protektif yang bertahan pada bulan ketiga pascavaksinasi hanya 75 %. Antibodi yang bersifat protektif belum terbentuk pada pravaksinasi seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Pada penelitian ini, antibodi yang dipicu oleh pemaparan antigen vaksin sudah terdeteksi protektif melalui uji HI mulai bulan pertama pascavaksinasi (Tabel 1). Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan peneliti terdahulu bahwa pemaparan antigen ke dalam tubuh induk ayam akan menghasilkan antibodi spesifik terhadap antigen yang disuntikkan. Ayam petelur yang diimunisasi dengan *Streptococcus mutans*, *Salmonella enteritidis*, dan *Escherichia coli* menunjukkan serum dan ekstraksi kuning telur positif mengandung IgY

terhadap bakteri tersebut dua minggu pascavaksinasi (Soejoedono *et al.*, 2005).

Sebagai pertimbangan bahwa produksi antibodi IgY pada bangsa unggas dan reptil unggas dapat dilakukan melalui teknik vaksinasi dengan cara menginjeksikan antigen dan *adjuvant* secara subkutan, intramuskular, atau secara oral dalam interval waktu tertentu (Carlander, 2002; Hammond, 2007). Teknik imunisasi pada ayam yang dilakukan Camenisch *et al.*, (1999) untuk memicu terbentuknya IgY *anti human hypoxia-inducible factor 1* (anti-HIF-1 $\alpha$ ) dalam kuning telur ayam adalah dengan menyuntikkan 80  $\mu$ g antigen fusi protein plasmid bakteri yang mengekspresikan HIF-1 $\alpha$  dengan glutathione S-transferase yang diresuspensi dengan 500  $\mu$ l PBS dan dicampur dengan 500  $\mu$ l CFA pada otot dada. *Booster* dilakukan dua kali dengan cara menyuntikkan 60  $\mu$ g antigen yang dicampur dengan IFA pada minggu ke-2 dan 4. Peneliti lainnya merekomendasikan bahwa untuk produksi IgY pada ayam petelur dosis antigen yang akan digunakan adalah 10 – 100  $\mu$ g dalam emulsi FCA untuk memicu reaksi lokal pada jaringan subkutan atau intramuskular. Frekuensi vaksinasi dilakukan dua sampai tiga kali *booster* dalam interval waktu 4 – 8 minggu sebelum masa ayam bertelur (Schade *et al.*, 1999).

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa vaksin komersial (H5N1) bersifat protektif karena dapat memicu pembentukan respons humoral ayam yang ditandai oleh:

1. Peningkatan titer antibodi serum ayam arab pada bulan ke-1, ke-2, dan ke-3 pascavaksinasi sebesar 80 %, 95 %, dan 75%.
2. Rataan titer antibodi pada pravaksinasi adalah  $2^{0,35}$  dan pada bulan ke-1, ke-2, dan ke-3 pascavaksinasi masing-masing adalah  $2^{5,15}$ ,  $2^{5,56}$ , dan  $2^{4,70}$ .

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah

membayai penelitian ini melalui Proyek Penelitian Strategis Nasional.

### DAFTAR PUSTAKA

- Camenisch G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R.H., Gassmann, M., 1999. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *J. FASEB.* 13: 81-88.
- Carlander, D., 2002. Avian IgY antibody *in vitro* and *in vivo*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, Universitatis Upsaliensis, Upsala.
- Direktorat Jenderal Peternakan, 2005. Manual Standar Kesehatan Hewan. Edisi Pedoman Surveilans dan Monitoring Avian Influenza di Indonesia, Departemen Pertanian, Jakarta.
- Erina, 2006. Kajian Epidemiologi Penyebaran Avian Influenza Pada Pasar Unggas Tradisional di Nanggroe Aceh Darussalam. Laporan Hasil Penelitian, Departemen Pertanian, Jakarta.
- Hammond, E., 2007. Some Intellectual Property Issues Related to H5N1 Influenza Viruses, Research and Vaccines. The Sunshine Project. Third World Network. [http://www.sunshine-project.org/flu/patent\\_report.pdf](http://www.sunshine-project.org/flu/patent_report.pdf) [20 Juli 2008]
- Hoffmann, E., Lipatov, A.S., Webby, R.J., Govorkova, E.A., Webster, R. G., 2005. Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS).* 102(36): 12915 – 12920. <http://www.pnas.org/cgi/reprint/0506416102v1.pdf> [26 Desember 2006]
- Karaca K., Swayne, D.E., Grosenbaugh, D., Bublott, M., Robles, A., Spackman, E., Nordgren, R., 2005. Immunogenicity of Fowlpox Virus Expressing the

- Avian Influenza Virus H5 Gene (TROVAC AIV-H5) in Cats. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12(11): 1340–1342.  
<http://cvi.asm.org/cgi/reprint/12/11/1340.pdf> [26 Desember 2006]
- Li, B., Peng, J., Niu, Z., Yin, X., Liu, F., 2005. Preparation of Anti-Idiotypic Antibody Against Avian Influenza Virus Subtype H9. *Cellular and Molecular Immunology.* 2(2): 155 – 157.  
<http://www.cmi.ustc.edu.cn/2/2/155.pdf> [26 Desember 2006]
- OIE, 2000. *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines.* 4<sup>th</sup> ed. Office International des Epizooties, Paris. pp:216.
- Rimmelzwaan, G.F., Kuiken, Van Amerongen, G., Bestebroer, T.M., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., 2001. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model . *J. of Viro.* 75(14):6687 - 6691.  
<http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/14/6687?ijkey=45ab9cd965265f9ad98a95fe8abd8442dcb2990b> [26 Desember 2006]
- Rimmelzwaan, G.F., Van Riel, D., Baars, M., Bestebroer, T.M., Van Amerongen, G., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., Kuiken, T., 2006. Influenza a virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *American J. of Pathology.* 168:176-183.  
<http://ajp.amjpathol.org/cgi/content/full/168/1/176> [26 Desember 2006]
- Schade, R., Henklein, P., Hlinak, A., 1999. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. The Report And Recommendations of ECVAM Workshop 21<sup>1,2</sup>. Reprinted with Minor Amendments from ATLA. 24: 925 - 934.
- Soejoedono, R.D., Wibawan, I.W.T., Hayati, Z., 2005. Pemanfaatan Telur Ayam Sebagai Pabrik Biologis: Produksi "Yolk Immunoglobulin" (IgY) Anti Plaque dan Diare dengan Titik Berat pada Anti *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* dan *Salmonella enteritidis*. Laporan Riset Unggulan Terpadu, Kementerian Negara Riset dan Teknologi, Jakarta.