

Perbandingan Respons Imun Humoral pada Ayam yang Divaksin IBD Aktif LV-13UA dan LV-14UA Berdasarkan Nilai *Optical Density Indirect* Elisa

Comparasion of Chicken Humoral Immune Response Vaccinated With Active IBD LV-13UA and LV-14UA Under Value Optical Density Indirect Elisa

¹Lazimatul Khuluqil Hasanah, ²Fedik Abdul Rantam, ²Yuni Priyandani, ²Suwarno,
²Adi Prijo Rahardjo, ²Nanik Sianita, ²Jola Rahmawati,

¹PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

²Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya – 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

Abstract

Infectious Bursal Disease (IBD) is a disease of chicken caused by *Birnavirus*. This disease was immunosuppressive and has a mortality rate up to 100%. This study was aimed to prove the existence of differences in humoral immune response in chicken vaccinated with active IBD vaccine LV-13UA and LV-14UA based on the value of Optical Density with Indirect ELISA method. The study was conducted on 21 chicks that were divided into 3 groups (P0, P1, and P2). Group P1 consist of 7 chicks was vaccinated with active IBD mild strain vaccine at the age of three weeks given 0,3 ml/chick then boosted with active IBD vaccine LV-13UA at the age of five weeks. Group P2 consist of 7 chicks was vaccinated with active IBD mild strain vaccine at the age of three weeks given 0,3 ml/chick virus then boosted with active IBD vaccine LV-14UA at the age of five weeks. Group P0 (control) consist of 7 chicks was given 0,3 ml normal saline/chick at the age three and five weeks. Blood sampling for value of Optical Density (OD) IBD antibody observations performed three times in all age groups for three weeks, five weeks, and seven weeks. Measurement of value of Optical Density (OD) IBD antibody was using indirect ELISA method. Data analysis used the General Linear Models (GLM) and ANOVA. The result showed that there are differences in humoral immune response in chicken vaccinated with active IBD vaccine LV-13UA and LV-14UA based on the value of *Optical Density*. The value of OD antibody of chicken vaccinated with active IBD vaccine LV-14UA is higher than IBD vaccine LV-13UA.

Keywords : IBD vaccine, humoral immune response, Optical Density, Indirect ELISA.

Pendahuluan

Perkembangan penyakit unggas mengalami kemajuan yang sangat pesat. Mutasi yang terjadi pada beberapa penyakit unggas membuat para peneliti berusaha mengembangkan jenis-jenis vaksin terbaru menggunakan strain yang cocok dengan strain di lapangan. Para peternak harus tanggap dalam menghadapi berbagai penyakit yang siap menjangkit ternak (Rantam dan Asmara, 2010).

Penyakit IBD merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh *Birnavirus*, mempunyai angka mortalitas hingga 100% dan bersifat immunosupresif (Murphy *et al.*,

1999). Penyakit IBD menimbulkan gangguan pada alat-alat pembentuk kekebalan terutama pada bursa Fabrisius sehingga mengalami penghambatan dalam membentuk zat kebal. Efek immunosupresif yang ditimbulkan oleh IBD dapat mengakibatkan ayam lebih peka terhadap berbagai penyakit.

Pada ayam, terdapat dua sistem kekebalan tubuh primer yaitu, bursa Fabrisius dan timus. Bursa Fabrisius sebagian besar berisi sel B yang berperan dalam memproduksi antibodi humoral, sedangkan timus sebagian besar berisi sel T dengan fungsi mengenal dan menghancurkan sel yang terinfeksi bakteri atau virus, mengaktifkan

makrofag dalam fagositosis serta membantu sel B dalam memproduksi antibodi (Van den Berg, 2000). Adanya infeksi virus IBD mengakibatkan terjadi pemblokiran diferensiasi *stem cell* dalam pembentukan sel B. Jumlah sel B mengalami penurunan yang hebat sehingga menyebabkan respons terhadap vaksinasi menjadi sangat buruk (Sivanan dan Maheswaren, 1998).

Sejak pertama kali mewabah di Indonesia sampai saat ini penyakit yang diidentifikasi dengan nama IBD tersebut belum berhasil dihilangkan dari daftar penyakit ayam yang ada di Indonesia. Upaya yang dilakukan untuk mengatasi dan menanggulangi IBD hanya dengan vaksinasi, karena sampai saat ini belum ditemukan pengobatan yang efektif (Wiryawan, 2003).

Usaha pencegahan penyakit IBD dengan vaksinasi banyak mengalami kegagalan dan kegagalan ini diduga karena perbedaan struktur antigen antara beberapa galur virus IBD dalam serotipe yang sama (Soejoedono, 1998). Faktor lain penyebab kegagalan vaksinasi adalah vaksin yang digunakan merupakan vaksin impor. Vaksin impor seringkali gagal digunakan di lapangan karena ketidakcocokan strain vaksin impor IBD dengan strain virus lapangan disebabkan oleh kurang protektifnya vaksin tersebut terhadap strain virus IBD yang ada di Indonesia (Rudd *et al.*, 2002). Keadaan demikian semakin memperkuat perlunya mengembangkan vaksin lokal di dalam negeri (Bahri dan Kusumaningsih, 2005).

Virus IBD dalam vaksin dikenal sebagai kelompok *mild*, *intermediate*, dan *intermediate plus* (Wiryawan, 2010). Beberapa tahun belakangan ini, vaksin gumboro aktif strain *intermediate* banyak digunakan di lapangan untuk mencegah penyakit gumboro karena penggunaan vaksin gumboro strain *mild* dinilai kurang memberi hasil yang memuaskan (Syahroni dkk., 2005).

Berdasarkan latar belakang inilah yang mendorong peneliti melakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan vaksin IBD aktif LV-13UA dan LV-14UA yang merupakan vaksin strain *intermediate* yang diambil dari daerah yang berbeda di Indonesia untuk memproduksi antibodi dalam memacu respons imun humoral ayam terhadap virus IBD berdasarkan nilai *Optical Density* (OD) yang diukur menggunakan uji *indirect ELISA*.

Materi dan Metode Penelitian

Sampel Penelitian

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah 21 ekor ayam *layer* pejantan. Percobaan dibagi secara acak menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok P1 (vaksin IBD aktif LV-13), kelompok P2 (vaksin IBD aktif LV-14) dan kelompok P0 atau kontrol (NaCl fisiologis).

Bahan Penelitian

Vaksin IBD aktif *strain mild*, vaksin IBD aktif LV-13UA (vaksin strain *intermediate*), vaksin IBD aktif LV-14UA (vaksin strain *intermediate*), sampel serum darah ayam, NaCl fisiologis, Alkohol 70%, antigen virus IBD, *coating buffer*, *washing buffer* (PBS Tween 20) yang terdiri dari *phosphate buffer* pH 7,4, sejumlah 140 ml NaCl dan 1 ml Tween-20, 1 liter *aquades*, *milk blocking* 4%, *blocking buffer*, konjugat (Anti-Chicken Ig G yang dilabel dengan enzim *alkaline phosphatase*), substrat p-NPP, larutan NaOH 3N (*stopper*).

Alat Penelitian

Kandang jenis *litter*, spuit *disposable* 3 ml, spuit *tuberculin*, spuit *disposable* 1 ml, kapas, tabung reaksi, ELISA *microplate*, *yellow tip*, mikropipet, tabung *ependorf*, *centrifuge*, *freezer*, *ice box*, *ice pack*, ELISA *reader*, vortex, cawan petri, *stirer*, gelas ukur, *becker glass*.

Persiapan Hewan Coba

Sejumlah 21 ekor anak ayam (DOC) secara acak dan diberi gelang plastik bernomor, kemudian ayam dibagi menjadi 3 kelompok yaitu, kelompok P1 terdiri dari 7 ekor ayam yang divaksin IBD aktif *strain mild* isolat lokal pada umur 3 minggu kemudian di *booster* dengan vaksin IBD aktif LV-13UA pada umur 5 minggu, kelompok P2 terdiri dari 7 ekor ayam yang divaksin IBD aktif *strain mild* isolat lokal pada umur 3 minggu, kemudian di *booster* dengan vaksin IBD aktif LV-13UA pada umur 5 minggu, kelompok P0 sebagai kelompok kontrol diberikan larutan NaCl fisiologis pada umur 3 minggu dan 5 minggu.

Pemberian vaksin dilakukan secara tetes *peroral* menggunakan spuit *disposable* 1 ml, sedangkan dosis vaksin IBD aktif *strain mild*, IBD LV-13UA (strain *intermediate*), IBD LV-

14UA (strain *intermediate*), maupun NaCl fisiologis yang digunakan adalah 0,3 ml/ekor.

Pengambilan darah untuk uji ELISA dilakukan sebanyak tiga kali pada semua kelompok yaitu pengamatan titer antibodi umur 3 minggu, 5 minggu dan 7 minggu. Pengukuran titer antibodi menggunakan uji *indirect* ELISA. Darah diambil melalui jantung ketika anak ayam umur 2 minggu, lalu pada anak ayam umur 5 minggu dan 7 minggu pengambilan darah melalui sayap (vena *brachialis*) menggunakan spuit 3 ml *disposable* dan dibiarkan pada suhu kamar hingga beku setelah serum keluar, dipisahkan, kemudian disimpan pada suhu 4°C atau -20°C. Sebelum serum digunakan dalam uji *Indirect* ELISA, terlebih dahulu dilakukan inaktivasi dengan pemanasan pada suhu 56°C selama 30 menit, untuk menghilangkan zat yang tidak spesifik.

Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah uji General Linear Model (GLM) dan *Analysis of Variant* (Anova). Data dari hasil

vaksinasi yang berupa nilai *Optical Density* (OD) dianalisis menggunakan uji *Analysis of Variant* (Anova) *multivariate*. dilanjutkan dengan uji jarak berganda *duncan* dengan taraf signifikansi 5% untuk membandingkan setiap perlakuan. Semua data dianalisis dengan program SPSS (*Statistical Program for Social Scientific*).

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil uji *Indirect* ELISA dari 21 ekor ayam yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok P1 (Ayam divaksin IBD aktif strain *mild* yang kemudian di *booster* IBD aktif LV-13UA), kelompok P2 (Ayam divaksin IBD aktif strain *mild* yang kemudian di *booster* IBD aktif LV-14UA, dan kelompok P0 (ayam di beri NaCl fisiologis) diperoleh nilai *Optical Density* (OD). Nilai OD semua kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji *Analysis of variance* (Anova) *multivariate* dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda *Duncan* dengan aplikasi SPSS.

Tabel 1. Nilai *Optical Density* antibodi ayam dengan uji *Indirect* ELISA.

Perlakuan	Umur ayam		
	3 minggu	5 minggu	7 minggu
P0	0,278 ^{bc} ± 0,017	0,247 ^{abc} ± 0,017	0,163 ^a ± 0,021
P1	0,196 ^{ab} ± 0,119	0,309 ^{cd} ± 0,056	0,349 ^d ± 0,025
P2	0,277 ^{bc} ± 0,151	0,327 ^{cd} ± 0,085	0,463 ^e ± 0,051

Superskrip (a, b, c,d,e) yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Keterangan:

P0 : Kelompok ayam yang disuntik NaCl fisiologis sebagai kelompok kontrol

P1 : Kelompok ayam yang divaksin strain *mild* dan di *booster* vaksin IBD LV-13UA

P2 : Kelompok ayam yang divaksin strain *mild* dan di *booster* vaksin IBD LV-14UA

Nilai OD antibodi yang dihasilkan pada minggu ke-3 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) antara kelompok P1, P2 dan P0. Pengukuran nilai OD antibodi pada minggu ke-3 (minggu sebelum divaksin) dilakukan untuk mengukur dan memastikan antibodi maternal ayam dalam keadaan rendah sehingga dapat menentukan waktu vaksinasi.

Nilai OD antibodi pada minggu ke-5 (2 minggu *post* vaksinasi) mulai mengalami peningkatan. Peningkatan nilai OD antibodi pada minggu ke-5 antara kelompok P1 dan P2 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Peningkatan tersebut menunjukkan bahwa vaksin IBD aktif strain *mild* dapat menimbulkan kekebalan pada ayam, namun

kekebalan yang dihasilkan tidak maksimal. Sehingga pemberian *booster* menjadi sangat diperlukan, supaya memiliki imunitas yang cukup (Rantam, 2005). Sedangkan nilai OD antibodi pada kelompok kontrol, mengalami penurunan yang tidak signifikan.

Perbedaan nilai OD antibodi IBD yang berbeda di setiap perlakuan terlihat pada ayam umur 7 minggu (2 minggu setelah vaksinasi *booster*) yang secara keseluruhan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Nilai OD antibodi ayam menunjukkan perbedaan yang signifikan antara vaksin IBD aktif LV-13UA (P1) dengan vaksin IBD aktif LV-14UA (P2). Perbedaan yang signifikan juga ditunjukkan

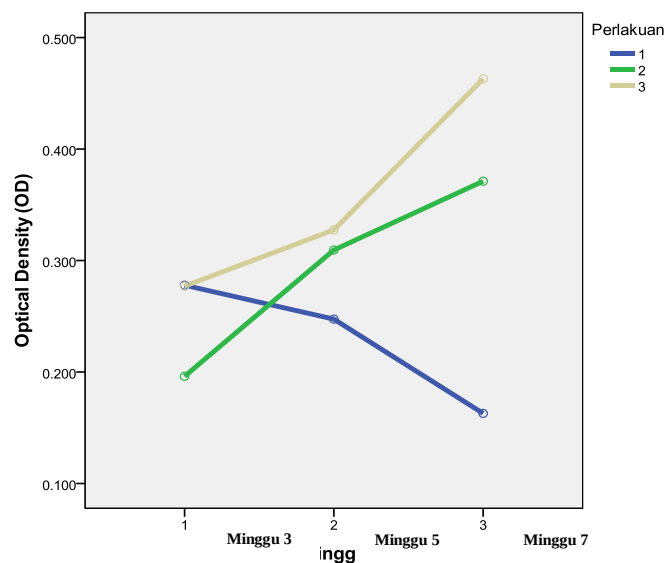
pada kelompok P0 (kontrol) dengan kedua kelompok perlakuan yang divaksin. Ayam yang divaksin IBD aktif LV-14UA (P2) menghasilkan OD yang lebih tinggi dibandingkan dengan ayam yang divaksin dengan IBD aktif LV-13UA (P1). Sedangkan pada ayam kelompok kontrol (P0) semakin mengalami penurunan namun tidak memberikan perbedaan yang signifikan ($p>0,05$).

Pengamatan dilakukan pada minggu ke-7 yang merupakan minggu *post booster* diperoleh nilai OD antibodi dari serum ayam yang divaksin IBD pada kelompok P1 (vaksin IBD aktif LV-13UA) dan P2 (vaksin aktif LV-14UA) terus mengalami peningkatan yang signifikan dan pada minggu ini merupakan puncak tertinggi nilai OD antibodi IBD terutama pada kelompok P2 yaitu pada serum ayam yang divaksin aktif LV-14UA. Peningkatan tersebut menunjukkan bahwa pemberian *booster* atau vaksinasi ulang dapat

menimbulkan respons antibodi lebih cepat sebab sel-sel memori dalam tubuh ayam yang bersangkutan telah mengenal antigen yang sama sehingga antibodi yang dihasilkan relatif lebih cepat dan lebih tinggi daripada vaksinasi pertama. (Tizard, 2000).

Penurunan nilai OD antibodi secara terus-menerus pada minggu ke minggu terjadi pada kelompok P0 (kontrol). Penurunan terjadi karena pada kelompok kontrol diberi NaCl fisiologis yang tidak bersifat sebagai imunogen sehingga tidak merangsang terbentuknya antibodi melalui mekanisme respons imun dalam tubuh (Cardoso *et al.*, 2005).

Grafik yang menunjukkan keseluruhan hasil diatas yaitu, nilai OD antibodi antara serum ayam yang divaksin IBD aktif LV-13UA (P1), vaksin IBD aktif LV-14UA (P2), dan kontrol (P0) yang dilakukan pada umur 3 minggu, 5 minggu dan 7 minggu disajikan pada Gambar 1 :



Gambar 1. Grafik statistik nilai OD antibodi ayam pada perlakuan dan kontrol
Keterangan: warna biru (kontrol); warna hijau (P1); warna kuning (P2)

Pada grafik diatas, secara keseluruhan menunjukkan nilai OD antibodi yang paling tinggi dan menunjukkan peningkatan yang signifikan dihasilkan kelompok P2 (vaksin IBD aktif LV-14UA) pada minggu ke-7 (2 minggu setelah *booster*/vaksinasi ulang). Pada ayam kelompok P1 (vaksin IBD aktif LV-13UA) juga terjadi peningkatan, namun peningkatan yang dihasilkan tidak signifikan.

Sedangkan nilai OD antibodi pada ayam kelompok kontrol (P0) selalu mengalami penurunan setiap minggunya.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vaksinasi menggunakan vaksin IBD aktif LV-13UA dan vaksin IBD aktif LV-14UA mengalami peningkatan nilai OD antibodi yang signifikan. Peningkatan nilai OD antibodi dari serum ayam yang divaksin IBD

LV-14UA lebih tinggi dibandingkan serum ayam yang divaksin IBD aktif LV-13UA. Hal ini dapat disebabkan beberapa faktor yaitu, karena vaksin IBD aktif LV-14UA lebih imunogen daripada vaksin IBD aktif LV-13UA dan karena perbedaan sekuens nukleotida pada genom penyandi protein VP2 pada vaksin yang digunakan. Ernawati (2004) mengatakan bahwa sekuens nukleotida gen penyandi VP₂ virus IBD isolat lokal pada tiap daerah berbeda-beda sehingga menyebabkan perbedaan imunogenitas yang dihasilkan. Selain itu, faktor lain penyebab perbedaan nilai OD antibodi vaksin IBD LV-14UA dengan vaksin IBD aktif LV-13UA adalah antigen yang digunakan dalam uji *indirect* ELISA kemungkinan lebih memiliki kesamaan (homolog) dengan vaksin IBD LV-14UA daripada vaksin IBD LV-13 sehingga menyebabkan vaksin IBD aktif LV-14 menghasilkan nilai OD antibodi lebih tinggi.

Perbedaan nilai OD antibodi tersebut mengindikasikan bahwa vaksin IBD LV-14UA menimbulkan respons imun humoral yang lebih tinggi sehingga vaksin ini lebih protektif melindungi ayam dibandingkan dengan vaksin IBD aktif LV-13UA. Hasil tersebut dapat menggambarkan keefektifan dari penggunaan vaksin IBD aktif LV-13UA dan IBD aktif LV-14UA sehingga dapat dijadikan acuan dalam pelaksanaan program vaksinasi terhadap penyakit IBD pada ayam. Virus IBD memiliki beberapa jenis strain yang berbeda. Satu strain vaksin IBD, hanya dapat melindungi ayam dari virus IBD dengan strain yang sama (Tan Do Yew, 2004). Maka dalam menentukan vaksin, tujuan akhirnya adalah bagaimana mendapatkan vaksin dengan tingkat kecocokan tinggi terhadap virus yang beredar di lapangan.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan respons imun humoral ayam yang divaksin IBD LV-13UA dan LV-14UA yaitu nilai *Optical Density* antibodi ayam yang divaksin IBD aktif LV-14UA lebih tinggi dibandingkan dengan nilai *Optical Density* antibodi ayam yang divaksin IBD aktif LV-13UA.

Daftar Pustaka

- Bahri, S dan A. Kusumaningsih. 2005. *Potensi, Peluang dan Strategi Pengembangan Vaksin Hewan di Indonesia*. Jurnal Litbang Pertanian. 24(3).
- Cardoso, W.M., J.L.C. Aguian 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*. Brazillian of Poultry Science. v.8/n.3/177-182.
- Ernawati, R. 2004. *Karakteristik Molekuler dan Imunogenitas Protein Kapsid Virus Infeksius Bursal* [Disertasi]. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga.
- Murphy, F.A., E.P.J. Gibbs., M.C. Horzinek and M.J. Studdert. 1999. *Veterinary Virology*. Third Edition. Academic Press. London.
- Rantam, F.A. 2005. *Virologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- 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.
- Sivanan and S.K Maheswaren. 1998. *Immune Profile of IBD II. Effect of IBD Virus on Poke Weed Mitogen Stimulated*. Avian Dis. 24:734-741.
- Soejoedono, R. D. 1998. *Uji Tantang Dengan Virus IBD Isolat Lapang Pada Ayam yang Mendapatkan Vaksin IBD Aktif dan Inaktif Komersil*. Media Veteriner. 5(4).
- Syahroni, B. T. Handharyani, Soejoedono, R. D. Jusa, E. R. 2005. *Kajian Morfopatologi dan Immunologi pada Ayam Specific Pathogen Free (SPF) Setelah Divaksinasi dengan Vaksin Gumboro Aktif Strain Intermediate*. Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan:11

- Tabbu, C.R. 2000. *Penyakit dan Penanggulangan, Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral*. Volume1. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Tizard, I.R. 2000. *Pengantar Imunologi Veteriner*. Penerjemah Soekardjo Hardjosworo. Airlangga University Press. Surabaya.
- Van den Berg, T, P., 2000. *Acute Infectious Bursal Disease in Poultry: A Review* avian pathology. 29: 175-194.
- Wiryan, W. 2003. *Gumboro dan Faktor Penyebab Kegagalan Vaksinasinya*. Infovet Januari: 38-40.
- Wiryan, W. 2010. *Pengebalan Terhadap Gumboro dengan Vaksin yang Tidak Menimbulkan Dampak Immunosupresi*. Infovet November: 34-65
- Yew, T. D. 2004. *Infectious Bursal Disease Virus: its Genomic Properties, Evolution, and Infection to the Head-Associated Lymphoid Tissues of Chicken* [Thesis]. Veterianry Medicine. Universiti Putra Malaysia