

**Respons Imun Seluler Ayam Petelur Pascavaksinasi
Avian Influenza Subtipe H5N1 Isolat dari Bali**

***Cellular Immune Response of Laying Chickens Post-Vaccination of
Avian Influenza Subtype H5N1 Isolate from Bali***

Gusti Ayu Yuniati Kencana^{1*}, Tri Komala Sari¹, I Nyoman Suartha²,
I Ketut Tomy Caesar Ramanda¹, Anak Agung Sagung Kendran³,

¹Laboratorium Virologi Veteriner,

²Laboratorium Penyakit Dalam Veteriner,

³Laboratorium Patologi Klinik Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,

Jl. PB Sudirman, Denpasar, Bali

*Email: yuniati_kencana@unud.ac.id

Naskah diterima: 25 Mei 2021, direvisi: 26 Juli 2021, disetujui: 29 November 2021

Abstract

Avian Influenza subtype H5N1 (AI-H5N1) is a virulent virus that is detrimental to laying chickens because it is highly contagious and mutates easily. Prevention of AI-H5N1 disease in laying chickens is carried out by vaccination, therefore to maintain the quality of the vaccine, continuous research is needed. This study aims to determine the potential of AI-H5N1 vaccine isolates from Bali based on cellular immune responses with total and differential leukocyte cell parameters. Antibody production is influenced by the nonspecific and specific immune system involving leukocytes, especially lymphocytes. Total of 40 layers of Novogen Brown strain were used for the research sample, kept since the age of one day on a commercial farm in Perean Village, Tabanan Regency, Bali. Laying chickens are vaccinated at 5 weeks of age by intramuscular injection at dose of 0.5 ml. Total of 20 laying chickens were taken randomly for samples from 40 treated chickens. Blood draws were performed once pre-vaccination and five times each week after vaccination with anticoagulants. Total leukocytes were examined by an auto hematology analyzer, while differential leucocytes with thin blood smear stained with Giemsa. Total and differential leukocyte data were analyzed by means of the variance test followed by the Duncan test. Results showed that AI-H5N1 vaccination from Bali isolates could increase total and differential leucocytes of laying chickens and had significant effect on the mean total leukocytes, the absolute values of heterophyll cells, eosinophils, lymphocytes, and monocytes, but had no significant effect on post-vaccination basophil cells. It was concluded that the AI-H5N1 vaccine isolated from Bali was proven to stimulate the cellular immune response of laying hens which was characterized by an increase in post-vaccination leukocytes, especially lymphocyte cells as precursors of antibody formation..

Keywords: avian influenza H5N1; differential leukocytes; isolate from Bali; total leukocytes; vaccinations

Abstrak

Avian Influenza subtipe H5N1 (AI-H5N1) adalah virus ganas yang merugikan peternakan ayam petelur karena sangat menular dan mudah bermutasi. Pencegahan penyakit AI-H5N1 pada ayam petelur dilakukan dengan vaksinasi, oleh karena itu untuk menjaga mutu vaksin maka diperlukan penelitian berkesinambungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali berdasarkan respons imun seluler dengan parameter total dan diferensial sel leukosit. Produksi antibodi dipengaruhi oleh sistem imun nonspesifik dan spesifik yang melibatkan leukosit, terutama sel limfosit. Sebanyak 40 ekor ayam petelur *strain* Novogen Brown digunakan untuk sampel penelitian yang dipelihara sejak berumur satu hari pada peternakan

komersial di Desa Perean, Kabupaten Tabanan, Bali. Ayam petelur divaksinasi pada umur 5 minggu melalui injeksi intramuskuler dengan dosis 0,5 ml. Sebanyak 20 ekor ayam petelur diambil secara acak untuk sampel penelitian dari 40 ekor ayam perlakuan yang divaksinasi. Pengambilan darah dilakukan satu kali pascavaksinasi dan lima kali setiap minggu pascavaksinasi dengan antikoagulan. Total leukosit diperiksa dengan *auto hematology analyzer* sedangkan diferensial leukosit dengan hapusan darah tipis yang diwarnai Giemsa. Data total dan diferensial leukosit dianalisis dengan uji sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan vaksinasi AI-H5N1 isolat dari Bali dapat meningkatkan total dan diferensial leukosit ayam petelur dan berpengaruh nyata terhadap rerata total leukosit, nilai absolut sel heterofil, eosinofil, limfosit, dan monosit, tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap sel basofil pascavaksinasi. Disimpulkan bahwa vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali terbukti dapat merangsang respons imun seluler ayam petelur yang ditandai dengan peningkatan leukosit pascavaksinasi, terutama sel limfosit sebagai prekursor terbentuknya antibodi.

Kata kunci: *avian influenza* H5N1; diferensial leukosit; isolat dari Bali; total leukosit; vaksinasi

Pendahuluan

Komoditas peternakan terbesar di Indonesia saat ini berasal dari sektor perunggasan, hampir 70% industri peternakan didominasi industri perunggasan (Yulistiya *et al.*, 2017). Perkembangan industri perunggasan khususnya peternakan ayam petelur di Provinsi Bali tersebar diseluruh kabupaten dan kota di Bali dengan populasi terbesar berada di Kabupaten Tabanan, sebesar 51,79% (Kurniawan *et al.*, 2013). Peternakan ayam petelur memiliki kendala berbagai penyakit salah satunya yaitu *Avian Influenza* (AI). Pertiwi *et al.*, (2020) menyatakan bahwa virus AI masih endemis di Bali. Keganasan virus AI dapat dibedakan menjadi dua, yaitu *low pathogenic avian influenza* (LPAI) yang menyebabkan penyakit ringan dan *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) yang menyebabkan penyakit ganas contohnya subtipe H5N1 (Kencana, 2012; Swayne and Swartz, 2000).

Penyakit HPAI disebabkan oleh virus dari famili Orthomyxoviridae, genus influenza tipe A, subtipe H5N1 (OIE, 2015). Virus AI subtipe H5N1 dapat menular secara cepat di antara kelompok ternak unggas dan menimbulkan morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi (Kencana, 2012). Ayam petelur sangat peka terhadap virus AI dengan gejala klinis gangguan pernapasan atas dan gangguan reproduksi serta dapat menimbulkan kematian hingga 100% (Sharif *et al.*, 2014). Masa inkubasi penyakit AI berkisar antara 2-3 hari atau lebih sejak unggas terinfeksi virus dan mulai munculnya tanda-tanda klinis (Kencana, 2012). Salah satu strategi utama dalam penanggulangan penyakit AI di

Indonesia yaitu dengan program vaksinasi (OIE, 2005).

Vaksinasi pada ayam petelur bertujuan untuk memproduksi kekebalan spesifik yang protektif guna menghadapi penyakit virus di lapangan (Kencana *et al.*, 2015). Namun, vaksinasi AI sering mengalami kegagalan karena virus AI mudah mengalami perubahan materi genetik sehingga diperlukan pemantauan dan riset berkesinambungan tentang virus AI dalam rangka efikasi vaksin (El-Zoghby *et al.*, 2012). Virus AI-H5N1 asal Indonesia telah berevolusi menjadi beberapa *sub-lineage* sebagai akibat dari pengaruh geografi Indonesia yang berupa kepulauan, sehingga masing-masing wilayah memiliki kekhasan genetik yang berbeda-beda (Smith *et al.*, 2006). Tingkat keberhasilan vaksinasi AI-H5N1 sangat tergantung pada tingkat kecocokan antara *strain* virus lapangan dan vaksin yang digunakan untuk dapat memberikan perlindungan (protektif) terhadap penyakit AI. Vaksin yang baik adalah vaksin yang memiliki homologi genetik dan antigenik yang mendekati sempurna dengan virus yang beredar di wilayah yang bersangkutan (Mahardika *et al.*, 2009). Kencana *et al.*, (2020) menyatakan bahwa *seed* vaksin isolat virus AI subtipe H5N1 asal Bali (A/Chicken/Bali9C/GAY/2019) termasuk *clade* 2.3.2, memiliki kekerabatan 96,72% dengan *seed* vaksin pemerintah Indonesia A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012. Kandungan virus vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali adalah sebesar 10^{6,9} ELD₅₀ dan telah lolos uji *seed* dari PT Sanbio Laboratories, Bogor (Kencana *et al.*, 2020). Uji laboratorium telah dilakukan di BSL-3 PT Sanbio Laboratories, dan saat ini sedang dilakukan uji lapang.

Penelitian ini merupakan uji lapang dari vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali. Uji lapang vaksin diperlukan untuk mengetahui potensi dan keamanan vaksin di lapangan. Monitoring terhadap potensi vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali juga perlu dilakukan dengan memeriksa titer antibodi ayam pascavaksinasi (Kencana *et al.*, 2016). Selain memeriksa titer antibodi, parameter lain yang dapat dijadikan sebagai acuan potensi vaksin juga dengan melihat variabel sel darah putih atau leukosit untuk mendeteksi kekebalan seluler terutama sel limfosit sebagai prekursor terbentuknya antibodi. Tingkat kekebalan seluler ayam pascavaksinasi dapat dilihat dari variabel total dan diferensial leukosit secara lengkap (Isroli *et al.*, 2009). Respons imun yang diperankan oleh leukosit bersifat nonspesifik dan spesifik, baik secara seluler maupun humoral. Walaupun kedua respons imun tersebut prosesnya berbeda, namun keduanya saling meningkatkan efektivitasnya. Respons imun nonspesifik yang bersifat seluler diperankan oleh sel heterofil, eosinofil, basofil, dan monosit. Pada respons imun spesifik, limfosit T bersifat seluler dan limfosit B bersifat humoral (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali berdasarkan respons imun seluler dengan parameter total dan diferensial leukosit ayam petelur pascavaksinasi.

Materi dan Metode

Pengambilan Sampel

Metode penelitian digunakan rancangan acak lengkap (RAL). Sebanyak 40 ekor ayam petelur *strain* Novogen Brown dipelihara sejak *day old chick* (DOC) digunakan untuk penelitian. Vaksinasi dilakukan secara intramuskuler pada ayam setelah berumur 5 minggu dengan vaksin inaktif AI-H5N1 isolat dari Bali dengan dosis 0,5 ml/ekor. Sebanyak 20 ekor ayam petelur diambil darahnya secara acak dari 40 ekor ayam yang divaksinasi AI-H5N1 isolat dari Bali. Koleksi sampel dilakukan enam kali, yakni satu kali pravaksinasi dan lima kali setiap minggu pascavaksinasi. Sampel darah ayam diambil dengan cara dilakukan *restrain* ayam pada posisi *dorsal recumbency*. Sebelum darah diambil,

kulit pada bagian pembuluh darah ayam terlebih dahulu didesinfeksi dengan menggunakan kapas yang berisi alkohol 70% (*alcohol swab*) untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Sebanyak 1 ml darah diambil dengan *disposable syringe* volume 3 ml melalui *vena brachialis*, kemudian ditampung pada tabung berisi antikoagulan *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA).

Total Leukosit

Total leukosit dihitung dengan alat *auto hematology analyzer* (Rayto RT-7600 for Vet). *Auto hematology analyzer* (Rayto RT-7600 for Vet) merupakan alat otomatis yang digunakan untuk menghitung nilai komponen darah atau hemogram hewan. Mesin *auto hematology analyzer* (Rayto RT-7600 for Vet) dihidupkan, kemudian dimasukkan data profil unggas yaitu jenis kelamin dan umur ayam. Sebanyak 9,8 μ L sampel darah yang berisi antikoagulan EDTA diambil secara otomatis dengan *sampling needle*. Hasil penghitungan total leukosit dapat dilihat secara otomatis pada layar monitor.

Diferensial Leukosit

Pemeriksaan diferensial leukosit dilakukan dengan metode hapusan darah tipis yang diwarnai Giemsa. Darah yang sudah tercampur dengan antikoagulan ditetaskan pada salah satu ujung dari gelas objek kemudian diambil gelas objek yang lain dan ditempatkan dekat tetesan darah tadi dengan membentuk sudut 45°. Selanjutnya gelas objek didorong ke arah depan dengan cepat hingga terbentuk ulasan darah tipis di atas gelas objek. Hapusan darah segera dikeringkan dengan cara dibiarkan di udara terbuka. Preparat hapusan darah selanjutnya difiksasi dengan *methanol* selama lima menit kemudian dikeringkan. Pewarnaan preparat dengan Giemsa selama 25-30 menit sesuai dengan prosedur Petithory *et al.*, (2005). Preparat kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan dengan posisi vertikal pada rak khusus. Setelah preparat hapusan darah kering kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 1.000 kali dan menggunakan minyak emersi (Utama *et al.*, 2013). Penghitungan diferensial leukosit dilakukan hingga sel-sel leukosit berjumlah 100 dan hasilnya dinyatakan dalam persentase (%).

Hasil penghitungan persentase masing-masing sel leukosit dikalikan dengan total leukosit maka diperoleh nilai absolut sel-sel leukosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

Analisis Data

Data hasil pemeriksaan total dan diferensial leukosit kemudian dianalisis menggunakan uji sidik ragam (*one-way analysis of variance*) dan dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan *statistical package for the social sciences* (SPSS).

Hasil dan Pembahasan

Hasil pemeriksaan total dan diferensial leukosit ayam petelur pascavaksinasi menunjukkan bahwa vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap respons imun seluler ayam petelur terutama terhadap rerata total leukosit dan nilai absolut sel heterofil, eosinofil, limfosit, dan monosit, tetapi tidak berpengaruh terhadap sel basofil. Rerata total leukosit terhadap waktu pengambilan sampel dimuat pada Tabel 1.

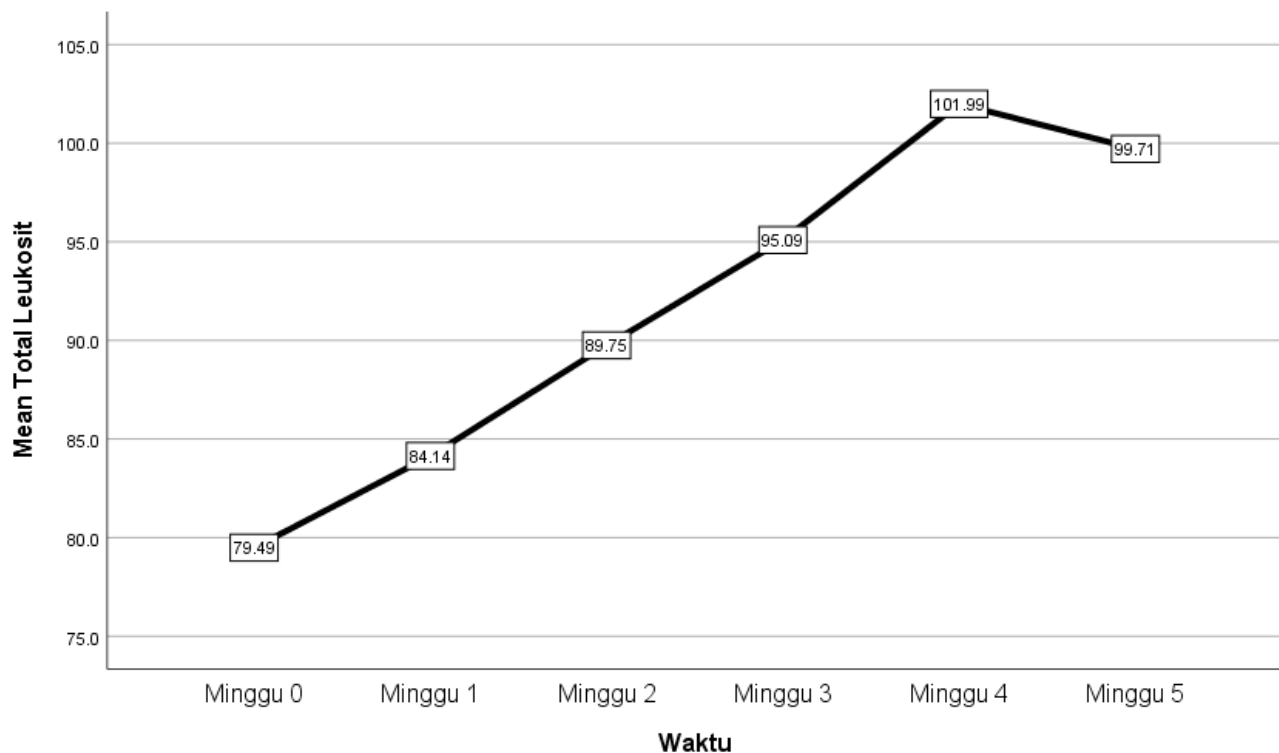
Tabel 1. Rerata Total Leukosit (\pm SD) Ayam Petelur Pascavaksinasi AI-H5N1 pada Peternakan Komersial di Desa Perean, Kabupaten Tabanan

Waktu Pengambilan Sampel (Minggu)	Total Leukosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Standar Normal ¹⁾ ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
0	79,49 \pm 6,97 ^a	12-30
1	84,14 \pm 9,40 ^{a,b}	
2	89,75 \pm 5,56 ^{b,c}	
3	95,09 \pm 14,20 ^{c,d}	
4	101,99 \pm 26,38 ^d	
5	99,71 \pm 10,54 ^d	

Keterangan: Huruf (superskrip) yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$). Sebaliknya, huruf (superskrip) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$)

¹⁾Schalm, (2010)

Hasil penelitian rerata total leukosit minggu ke-0 (pascavaksinasi) sebesar 79,49 \pm 6,97 ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Peningkatan rerata total leukosit tertinggi pascavaksinasi, sebesar 101,99 \pm 26,38 ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Sedangkan rerata total leukosit terendah pascavaksinasi, sebesar 84,14 \pm 9,40 ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Grafik rerata total leukosit ayam petelur terhadap waktu pengambilan sampel dimuat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Rerata Total Leukosit Ayam Petelur Pascavaksinasi AI-H5N1 pada Peternakan Komersial di Desa Perean, Kabupaten Tabanan

Tabel 2. Rerata Nilai Absolut Sel-Sel Leukosit (\pm SD) Ayam Petelur Pascavaksinasi AI-H5N1 pada Peternakan Komersial di Desa Perean, Kabupaten Tabanan

Waktu (Minggu)	Sel-Sel Leukosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				
	Heterofil	Eosinofil	Basofil	Limfosit	Monosit
	3-6 ¹⁾	0-1 ¹⁾	- ¹⁾	7-17,5 ¹⁾	0,15-2 ¹⁾
0	22,31 \pm 5,11 ^a	0,83 \pm 0,79 ^a	0 \pm 0,00	51,68 \pm 6,31 ^a	4,62 \pm 4,09 ^a
1	23,24 \pm 7,49 ^a	1,71 \pm 2,28 ^{a,b,c}	0 \pm 0,00	49,06 \pm 7,19 ^a	10,09 \pm 4,36 ^c
2	23,39 \pm 7,56 ^a	2,89 \pm 2,60 ^c	0 \pm 0,00	56,47 \pm 9,30 ^{a,b}	6,96 \pm 2,89 ^{a,b}
3	28,95 \pm 13,88 ^{a,b}	2,35 \pm 1,91 ^{b,c}	0 \pm 0,00	53,99 \pm 9,60 ^{a,b}	9,77 \pm 5,53 ^{b,c}
4	31,41 \pm 16,4 ^b	1,20 \pm 1,85 ^{a,b}	0 \pm 0,00	59,90 \pm 19,00 ^{b,c}	9,44 \pm 4,01 ^{b,c}
5	23,10 \pm 7,93 ^a	1,86 \pm 2,17 ^{a,b,c}	0 \pm 0,00	65,97 \pm 9,02 ^c	8,75 \pm 4,53 ^{b,c}

Keterangan: Huruf (superskrip) yang berbeda pada kolom sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$). Sebaliknya, huruf (superskrip) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$)

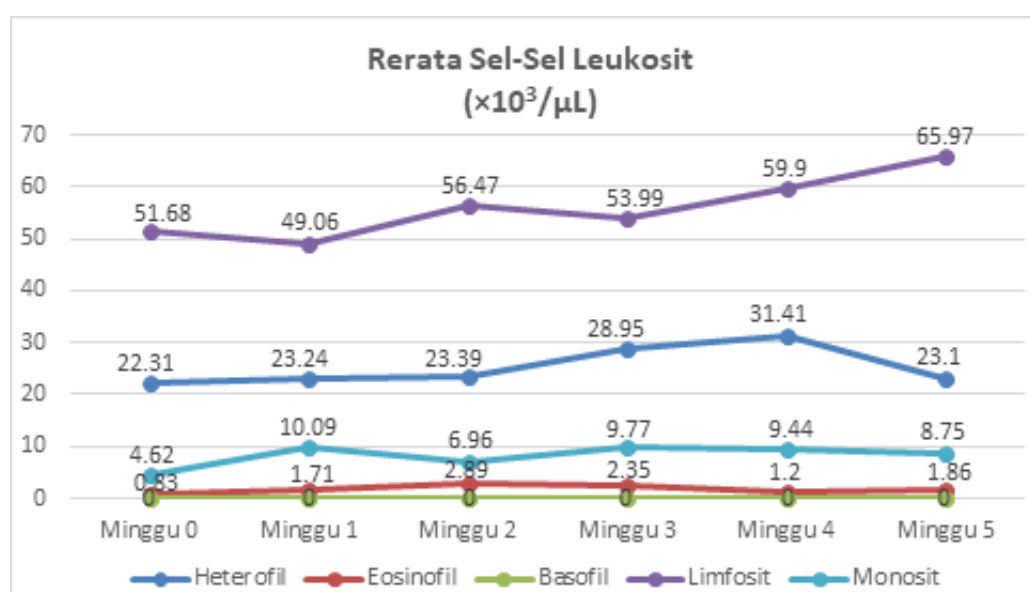
¹⁾($\times 10^3/\mu\text{L}$); Standar Normal Schalm, (2010)

Rerata nilai absolut sel-sel leukosit ayam petelur pascavaksinasi AI-H5N1 isolat dari Bali pada pengambilan sampel setiap minggu dimuat pada Tabel 2. Rerata absolut sel-sel leukosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$) minggu ke-0 (pascavaksinasi), yaitu heterofil 22,31 \pm 5,11; eosinofil 0,83 \pm 0,79; basofil 0 \pm 0,00; limfosit 51,68 \pm 6,31; dan monosit 4,62 \pm 4,09.

Rerata absolut sel-sel leukosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$) minggu ke-1 sampai ke-5 pascavaksinasi dari rerata tertinggi hingga terendah yaitu sebagai berikut: rerata sel heterofil tertinggi sebesar 31,41 \pm 16,44 ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dan rerata terendah, sebesar 23,10 \pm 7,93 ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Rerata sel eosinofil tertinggi, sebesar 2,89 \pm 2,60 ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dan rerata terendah, sebesar 1,20 \pm 1,85

($\times 10^3/\mu\text{L}$) sedangkan rerata sel basofil setiap minggunya adalah 0 \pm 0,00 ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Rerata sel limfosit tertinggi, sebesar 65,97 \pm 9,02 ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dan rerata terendah, sebesar 49,06 \pm 7,19 ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Rerata sel monosit tertinggi, sebesar 10,09 \pm 4,36 ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dan rerata terendah, sebesar 6,96 \pm 2,89 ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Grafik rerata nilai absolut sel-sel leukosit ayam petelur pada setiap minggu pengambilan sampel dimuat pada Gambar 2.

Avian Influenza adalah penyakit virus pada unggas, termasuk ayam dan unggas air liar yang disebabkan oleh virus influenza tipe A sub tipe H5N1 (Kencana, 2012). Vaksinasi bertujuan untuk memperoleh kekebalan spesifik yang protektif guna menghadapi kasus lapangan



Gambar 2. Grafik Rerata Nilai Absolut Sel-Sel Leukosit Ayam Petelur pada Setiap Minggu Pengambilan Sampel

(Kencana *et al.*, 2015). Patti *et al.*, (2013); Paul *et al.*, (2012) menyatakan bahwa dalam upaya tubuh membentuk zat kebal akibat vaksinasi, sel darah putih atau leukosit akan mengalami proliferasi, sehingga pada gilirannya akan terbentuk sel plasma yang akan memproduksi antibodi. Peneliti lain Sturkie, (2005) menyatakan bahwa vaksinasi mengakibatkan peningkatan jumlah leukosit.

Vaksinasi dengan vaksin inaktif AI-H5N1 isolat dari Bali memberikan pengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap terbentuknya rerata total leukosit dan nilai absolut sel heterofil, eosinofil, limfosit, dan monosit, tetapi tidak berpengaruh terhadap sel basofil ayam petelur pascavaksinasi. Pada penelitian ini sel basofil tidak ditemukan. Hal tersebut bukan berarti bahwa pada dalam darah ayam petelur tidak ada sel basofil. Schalm, (2010) menyatakan bahwa pada ayam normal jarang ditemukan sel basofil. Basofil adalah sel darah putih yang mempunyai peranan dalam reaksi alergi. Menurut Kayadoe *et al.*, (2008) menyatakan bahwa basofil umumnya baru ditemukan dalam penghitungan 1.000 sel leukosit.

Rerata total leukosit minggu ke-0 (pravaksinasi) adalah sebesar $79,49 \times 10^3/\mu\text{L}$, dimana ayam dalam kondisi sehat. Rataan tersebut relatif lebih tinggi jika dibandingkan total leukosit ayam normal, yaitu 12.000-30.000 sel/ μL (Kencana *et al.*, 2018; Schalm, 2010). Tingkat kesehatan hewan dapat diukur melalui total leukosit, dimana terjadinya peningkatan total leukosit dalam darah menandakan bahwa sistem pertahanan tubuh mengalami peningkatan (Soeharsono *et al.*, 2010). Total leukosit pada penelitian ini relatif lebih tinggi dari standar normal fisiologis ayam, hal ini karena ayam yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ayam ras petelur perlakuan yang ditempatkan pada kandang terbuka pada saat penelitian berlangsung. Kondisi ini memungkinkan terjadinya paparan dari berbagai agen penyakit yang berasal dari lingkungan pemeliharaan, dimana lokasi penelitian juga endemis dengan penyakit lainnya seperti *newcastle disease* (ND), *infectious bronchitis* (IB), *infectious bursal disease* (IBD). Pencegahan terhadap penyakit-penyakit tersebut dilakukan pada kelompok ayam lainnya dengan vaksinasi.

Walaupun vaksinasi penyakit tersebut tidak dilakukan pada ayam perlakuan, kemungkinan hal tersebut dapat mempengaruhi proses fisiologis pada ayam perlakuan. Adanya paparan tersebut dapat menginduksi terjadinya proliferasi sel limfosit (Ulupi dan Ihwantoro, 2014). Hal ini sejalan dengan tingginya jumlah limfosit pravaksinasi, dengan rerata $51,68 \times 10^3/\mu\text{L}$. Limfosit merupakan unsur penting dalam sistem kekebalan tubuh yang berfungsi merespons antigen dengan membentuk antibodi (Yalcinkaya *et al.*, 2008).

Total leukosit ayam petelur minggu ke-1 pascavaksinasi meningkat secara tidak signifikan dan meningkat secara signifikan pada minggu ke-2 pascavaksinasi ($P < 0,05$), dengan rerata sebesar $89,75 \times 10^3/\mu\text{L}$. Pada minggu ke-1 pascavaksinasi jumlah sel limfosit menurun secara tidak signifikan ($P > 0,05$). Limfosit berperan untuk merespons antigen dengan membentuk antibodi dan pengembangan imunitas (Bikrisirna, 2013). Mengingat vaksin AI-H5N1 pada penelitian ini merupakan vaksinasi primer menggunakan vaksin inaktif, respons tubuh pada minggu ke-1 pascavaksinasi cenderung baru mulai terbentuk karena dalam proses pengenalan terhadap antigen vaksin. Hal ini sejalan dengan pernyataan Kencana *et al.*, (2016) yang menyatakan bahwa pada minggu ke-1 pascavaksinasi pemberian vaksin inaktif umumnya menghasilkan respons imun yang lambat. Menurunnya jumlah sel limfosit disebabkan pula oleh meningkatnya jumlah sel monosit dalam darah secara signifikan pada minggu ke-1 pascavaksinasi, dengan rerata sebesar $10,09 \times 10^3/\mu\text{L}$. Peningkatan sel monosit menandakan bahwa tubuh ayam merespons adanya antigen vaksin dengan membentuk respons imun nonspesifik seluler. Peningkatan jumlah monosit disebabkan karena monosit berperan dalam mengatur tanggapan kebal dengan mengeluarkan glikoprotein pengatur monokin seperti interferon dan interleukin I (Saputro *et al.*, 2016). Monosit adalah prekursor makrofag dalam sirkulasi darah. Menurut Fenner dan Fransk, (1995) menyatakan bahwa monosit atau makrofag berfungsi sebagai *antigen presenting cells* (APC). Interaksi sel limfosit dengan APC akan berperan dalam kekebalan humoral dengan menginduksi keluarnya sitokin yang merupakan alat komunikasi antar

sel. Kemampuan interaksi ini akan menginduksi pematangan sel limfosit B menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi.

Total leukosit ayam petelur pada minggu ke-3 pascavaksinasi mengalami peningkatan secara signifikan ($P < 0,05$) serta puncaknya pada minggu ke-4 pascavaksinasi, dengan rerata sebesar $101,99 \times 10^3/\mu\text{L}$. Menurut Yulistiya *et al.*, (2017) menyatakan bahwa aktivitas fisiologis meliputi proses vaksinasi memberikan pengaruh terhadap jumlah leukosit. Peningkatan total leukosit pascavaksinasi ditandai dengan peningkatan jumlah limfosit akibat adanya efek imunostimulator dari vaksin yang digunakan (Amer *et al.*, 2013). Rerata jumlah sel limfosit hingga minggu ke-4 pascavaksinasi pada penelitian ini mengalami peningkatan walaupun meningkat secara perlahan atau tidak berbeda nyata dibandingkan minggu-minggu sebelumnya, dengan rerata sebesar $59,90 \times 10^3/\mu\text{L}$. Penelitian ini merupakan vaksinasi pertama atau primer menggunakan vaksin inaktif AI-H5N1. Suardana *et al.*, (2009) menyatakan bahwa respons imun primer dimulai pada saat hewan terpapar imunogen untuk pertama kalinya, umumnya titer antibodi yang terbentuk relatif sangat rendah. Sistem imun spesifik seluler yang bereaksi dengan antigen adalah limfosit T yang mengatur sintesis antibodi maupun sel T yang mempunyai fungsi efektor atau sitotoksik langsung, sementara limfosit B yang memproduksi antibodi spesifik humoral (Mazengia *et al.*, 2009).

Hewajuli dan Dharmayanti, (2015) menyatakan bahwa respons imun seluler mencapai puncak setelah tiga minggu atau lebih pascavaksinasi. Respons imun spesifik seluler adalah respons imun yang diperankan oleh sel limfosit T dalam membunuh mikroorganisme atau antigen melalui sistem efektor ekstraseluler oleh sel T sitotoksik dan sel T helper (Th) yang bersifat spesifik. Vaksinasi AI pada ayam terbukti meningkatkan jumlah limfosit T helper (Th) (Gioia *et al.*, 2008). Kaitan sel limfosit T dengan limfosit B adalah limfosit B memerlukan bantuan limfosit Th yang memberikan sinyal dari makrofag untuk sel B berdiferensiasi membentuk antibodi (Kresno, 2001). Pembentukan antibodi diawali oleh makrofag yang telah memfragmentasi antigen kemudian fragmen

antigen tersebut dipresentasikan kepada sel limfosit Th melalui MHC II yang terletak di permukaan makrofag. Sel Th berinteraksi dengan APC melalui CD4+ dan T cell receptor (TCR), kemudian sel Th teraktivasi dan berproliferasi serta mengeluarkan sitokin (IL-1) yang akan mengaktifkan sel B yang naif (sel matang yang belum terpapar antigen dan belum berdiferensiasi) menjadi sel plasma yang akan memproduksi antibodi spesifik (Hewajuli dan Dharmayanti, 2015).

Rerata total leukosit ayam petelur pada minggu ke-5 pascavaksinasi mengalami penurunan yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dibandingkan minggu sebelumnya. Penurunan total leukosit pada minggu ini kemungkinan disebabkan karena menurunnya jumlah sel heterofil dalam darah secara signifikan ($P < 0,05$), dengan rerata sebesar $23,10 \times 10^3/\mu\text{L}$. Menurut Kencana *et al.*, (2018) menyatakan bahwa penurunan jumlah heterofil dalam darah dapat menyebabkan penurunan total leukosit. Sementara rerata jumlah sel monosit mulai mengalami penurunan tetapi tidak berbeda nyata dibandingkan minggu sebelumnya. Penurunan sel monosit tersebut dapat mengindikasikan bahwa respons imun nonspesifik seluler sudah tidak memberikan respons terhadap antigen vaksin dan telah digantikan dengan respons imun spesifik. Hewajuli dan Dharmayanti, (2015) menyatakan bahwa pertahanan terhadap serangan virus akan digantikan oleh kekebalan spesifik apabila kekebalan nonspesifik tidak mampu melawan infeksi virus. Respons imun yang muncul pascavaksinasi AI adalah respons imun spesifik yang diperankan oleh limfosit (Amer *et al.*, 2013). Hal ini sejalan dengan rerata jumlah sel limfosit yang mengalami peningkatan secara signifikan, yaitu dengan rerata tertinggi sebesar $65,97 \times 10^3/\mu\text{L}$. Menurut Aiyer-Harini *et al.*, (2013) menyatakan bahwa dengan vaksin inaktif memerlukan waktu yang relatif lama untuk memicu pembentukan antibodi maksimal, namun respons kekebalan yang terbentuk dapat bertahan lebih lama di dalam tubuh ayam dibandingkan dengan penggunaan vaksin aktif.

Vaksinasi AI-H5N1 pada penelitian ini berpengaruh nyata terhadap terbentuknya sel heterofil, eosinofil, limfosit, dan monosit ayam petelur pascavaksinasi. Rerata sel eosinofil dan

heterofil yang meningkat secara signifikan pada minggu ke-2 dan ke-4 pascavaksinasi tidak memiliki kaitan secara langsung dengan respons imun tubuh ayam petelur terhadap vaksinasi AI-H5N1 karena fungsi utama heterofil adalah untuk membunuh bakteri melalui proses fagositosis (Redmond *et al.*, 2011). Selain itu faktor-faktor pendukung terhadap tinggi rendahnya heterofil diantaranya: kondisi lingkungan, tingkat stress, genetik, dan kecukupan nutrisi pakan (Puvadolpirod dan Thaxton, 2000). Eosinofil berperan untuk menghadapi infeksi parasitik dan alergi (Purnomo *et al.*, 2015). Pada pemeriksaan preparat hapusan darah tipis pada penelitian ini tidak ditemukan adanya parasit darah. Meningkatnya jumlah sel heterofil dan eosinofil dalam darah tidak selalu diasumsikan bahwa hewan sedang terinfeksi penyakit. Hal tersebut dapat menunjukkan bahwa meningkatnya respons imun nonspesifik seluler dari agen penyakit. Respons imun nonspesifik umumnya merupakan imunitas bawaan yakni respons terhadap bahan asing yang dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar oleh bahan tersebut (Kresno, 2000).

Sel monosit dan limfosit memiliki keterkaitan dengan vaksinasi, dimana fungsi monosit atau makrofag adalah sebagai *antigen presenting cells* (APC) yang menstimulasi pematangan sel limfosit yang berperan sebagai cikal bakal terbentuknya antibodi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel monosit meningkat secara signifikan pada minggu ke-1 pascavaksinasi sebagai indikasi terbentuknya respons imun nonspesifik yang bersifat seluler terhadap antigen vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali. Respons imun seluler spesifik ditandai dengan meningkatnya jumlah rerata sel limfosit sejak minggu ke-2 pascavaksinasi dan mencapai jumlah maksimal secara signifikan pada minggu ke-5 pascavaksinasi yakni sebesar $65,97 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Kesimpulan

Vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali terbukti dapat merangsang respons imun seluler ayam petelur yang ditandai dengan meningkatnya total dan diferensial leukosit pascavaksinasi, terutama sel limfosit sebagai prekursor terbentuknya antibodi.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan Hibah Inovasi Udayana tahun 2021 dengan nomor kontrak B/96-62/UN14.4.A/PT.01.05/2021. Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Udayana atas dana PNBP, kepada mitra industri Produsen Vaksin Unggas PT Sanbio Laboratories, peternakan ayam petelur komersial "Tubagus Oky Farm", Balai Besar Veteriner Wilayah VII Denpasar atas kerja sama dan fasilitas risetnya serta semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Aiyer-Harini, P., Ashok-Kumar, H. G., Kumar, G. P., and Shivakumar, N. 2013. An Overview of Immunologic Adjuvants - A Review. *J Vaccines Vaccin.* 4(1): 1-4.
- Amer, M. M., Sherein, S. A., and Abeer, A. A. E. 2013. Evaluation of Some Avian Influenza Vaccines on Commercial Layer Chicks., *Medicine.* 60-78.
- Baratawidjaja, K. G., dan Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar Edisi ke-9.* Balai Penerbit, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bikrisirna, S. H. L., Mahfudz, L. D., dan Suthama, N. 2013. Ketahanan tubuh ayam broiler pada kondisi tropis yang diberi jambu biji merah (*Psidium guajava*) sebagai sumber antioksidan. *Agromedia.* 31 (2):46-57.
- El-Zoghby, E. F., Arafa, A. S., Kilany, W. H., Aly, M. M., Abdelwhab, E. M., and Hafez, H. M. 2012. Isolation of avian influenza H5N1 virus from vaccinated commercial layer flock in Egypt. *Virology journal,* 9(1): 1-8.
- Gioia, C., Castilletti, C., Tempestilli, M., Piacentini, P., Bordi, L., Chiappini, R., Agrati, C., Squarcione, S., Ippolito, G., Puro, V., Capobianchi, M. R., and Poccia, F. 2008. Cross-subtype Immunity against Avian Influenza in Persons Recently Vaccinated for Influenza. *Emerg Infect Dis.* 14(1): 121-128.
- Hewajuli, D. A., dan Dharmayanti, N. L. P. I. 2015. The Role of Non-specific and

- Specific Immune Systems in Poultry against Newcastle Disease. *WARTAZOA. Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*. 25(3): 135-146.
- Isroli, S., Susanti, E., Widiastuti, T., Yudiarti., dan Sugiharto. 2009. Observasi beberapa variabel hematologis ayam Kedu pada pemeliharaan intensif. *Prosiding Seminar Nasional Kebangkitan Peternakan*. Hal: 548-557.
- Kayadoe, M., Sambodo, P., dan Aronggear, Y. 2008. Perbandingan gambaran darah burung maleo gunung (*Aepodius Arfakianus*) betina dan unggas yang telah didomestikasi. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Fakultas, Peternakan, Perikanan, Kelautan-Universitas Papua, Manokwari.
- Kencana, G. A. Y. 2012. *Penyakit Virus Unggas*. Penerbit Udayana University Press. Cetakan pertama. ISBN 978-602-7776-01-2.
- Kencana, G. A. Y., Suartha, I. N., Simbolon, M. P., Handayani, A. N., Ong, S., Syamsidar., dan Kusumastuti, A. 2015. Respon Antibodi Terhadap Penyakit Tetelo pada Ayam yang Divaksin Tetelo dan Tetelo-Flu Burung. *Jurnal Veteriner*. 16(2): 283-290.
- Kencana, G. A. Y, Suartha I. N., Paramitha, N. M. A. S, dan Handayani, A. N. 2016. Vaksin Kombinasi Newcastle Disease dengan Avian Influenza Memicu Imunitas Protektif pada Ayam Petelur terhadap Penyakit Tetelo dan Flu Burung. *J Veteriner*. 17(2): 257-264.
- Kencana, G. A. Y., Kendran, A. A. S., Helpina., dan Dewi, L. A. 2018. Total dan Diferensial Leukosit Ayam Petelur Pascavaksinasi Tetelo dan Flu Burung. *Jurnal Veteriner*. 19(2): 190-195.
- Kencana, G. A. Y., Suartha, I. N., Kardena, I. M., dan Nurhandayani, A. 2020. Karakterisasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Isolat Lapangan Asal Bali Untuk Kandidat Vaksin. *Jurnal Veteriner*: 530-538.
- Kresno, S. B. 2001. *Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi IV (Dengan Perbaikan). Jakarta: FKUI.
- Kurniawan, M. F. T., Darmawan, D. P., dan Astiti, N. S. 2013. Strategi Pengembangan Agribisnis Peternakan Ayam Petelur di Kabupaten Tabanan. *Jurnal Manajemen Agribisnis*.
- Mahardika, I. G. N. K., Suartha, I. N., Suardana, I. B. K., Kencana, G. A. Y., dan Wibawan, I. W. T. 2009. Perbandingan Sekuens Konsensus Gen Hemaglutinin Virus Avian Influenza. *Jurnal Veteriner*. 10(1): 12-16.
- Mazengia, H., Gelaye, E., and Nega, M. 2009. Evaluation of newcastle disease antibody level after different vaccination regimes in three districts of Amhara Region, Northwestern Ethiopia. *J Infect Dis Immun*. 1: 16-19.
- Office International des Epizooties (OIE). 2005. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004. Version Adopted May 2005, Chapter 2.7.12., Avian Influenza. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A-00037.htm>. Diakses tanggal 15 Juni 2020.
- Office International des Epizooties (OIE). 2015. OIE terrestrial manual. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). Chapter 2.3.4. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI. Diakses tanggal 15 Juni 2020.
- Patti, J., Miller P. J., Claudio, L. Afonso, C. L., John, J. E., and Dorsey, K. M. 2013. Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. *Developmental & Comparative Immunology*. 41(4): 505-513.
- Paul, A., Usman, M., Manuel, Jt., and Mu, M. 2012. Vaccination Of Chickens Against Newcastle Disease With La Sota and V4 Vaccines Using Brans, Ground Grains and Water as Vehicles. *Vom J. Vet. Sci*. 9(1): 1-10.

- Pertiwi, B. I., Kencana, G. A. Y., dan Suartha, I. N. 2020. Seroprevalensi Penyakit Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Ayam Buras di Pasar Beringkit dan Galiran, Bali. *Jurnal Sain Veteriner*. 38(3): 280-288.
- Petithory, J. C., Ardoin, F., and Ash, L. R. 2005. Rapid and Inexpensive Method of Diluting Giemsa Stain for Diagnosis of Malaria and Other Infestations by Blood Parasites. *J Clin Microbiol*. 43(1): 528.
- Purnomo, D., Sugiharto, S., dan Isroli, I. 2015. Total leukosit dan diferensial leukosit darah ayam broiler akibat penggunaan tepung onggok fermentasi rhizopus oryzae pada ransum. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 25(3): 59-68.
- Puvadolpirod and Thaxton. 2000. *Model of physiological stress in chicken*. Quantitative Evaluation. Departement of Poultry Science, Mississippi State University. 79: 391-395.
- Redmond, S. B. P., Chuammitri, C. B., Andreasen, D., Palic and Lamond, S. J. 2011. Genetic control of chicken heterophil function in advanced intercross lines: associations with novel and with known Salmonella resistance loci and a likely mechanism for cell death in extracellular trap production. *Immunogenetics*. 63: 449-458.
- Saputro, B. E., Sutrisna, R., Santosa, P. E., dan Fathul, F. 2016. Pengaruh Ransum yang Berbeda pada Itik Jantan Terhadap Jumlah Leukosit dan Diferensial Leukosit. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 4(3).
- Schalm, O. W. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology Sixth Edition*. Editor: Douglas J. Weiss, K. Jane Wardrop. New Jersey (US): Blackwell Pub.
- Sharif, A., Umer, M., and Ahmad, T. 2014. Prevention and Control of Avian Influenza in Poultry Production. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 2(6): 976-981.
- Smith, G. J. D., Naipospos, T. S. P., Nguyen, T. D., de Jong, M. D., Vijaykrishna, D., Usman, T. B., Hasan, S. S., Dao, T. V., Bui, N. A., Leung, Y. H. C., Cheung, C. L., Rayner, J. M., Zhang, J. X., Poon, L. L. M., Li, K. S., Nguyen, V. C., Hien, T. T., Farrar, J., Webster, R. G., Chen, H., Peiris, J. S. M., and Guan, Y. 2006. Evolution and Adaptation of H5N1 Influenza Virus in Avian and Human Host in Indonesia and Vietnam. *Virology*. 350(2): 258-268.
- Soeharsono, L., Adriani, E., Hernawan, K. A., Kamil, dan Mushawwir, A. 2010. *Fisiologi Ternak Fenomena dan Nomena Dasar, Fungsi dan Interaksi Organ pada Hewan*. Widya Padjajaran, Bandung.
- Sturkie, P. D. 2005. *Avian Physiology*. Ed. 2nd. Comstock Pub. Ass. Coenell Univ. Press. Ithaca, N.Y.
- Suardana, I. B. K., Dewi, I. M. R. K., dan Mahardika, I. G. N. K. 2009. Respons Imun Itik Bali terhadap Berbagai Dosis Vaksin Avian Influenza H5N1. *Jurnal Veteriner*. 10(3): 150-155.
- Swayne D. E, and Suarez, D. L. 2000. Highly Pathogenic Avian Influenza. *Rev. Sci. Tech*. 19: 463-482.
- Ulupi, N., dan Ihwantoro, T. T. 2014. Gambaran darah ayam kampung dan ayam petelur komersial pada kandang terbuka di daerah tropis. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 2(1): 219-223.
- Utama, I. H., Kendran, A. A. S., Widyastuti, S. K., Virgania, P., Sene, S. M., Kusuma, W. D., dan Arisandi, B. P. 2013. Hitung Diferensial dan Kelainan-Kelainan Sel Darah Sapi Bali. *Jurnal Veteriner*. 14(4): 462-466.
- Yalcinkaya, I., Gungor, T., Basalan, M., and Erdem, E. 2008. Mannan Oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae* in Broilers: Effects on Performance and Blood Chemistry. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*.
- Yulistiya, E., Santosa, P. E., dan Suharyati, S. 2017. Pengaruh Pemberian Dosis Vaksin Avian Influenza Inaktif Pada Itik Jantan Terhadap Jumlah Sel Darah Putih Dan Titer Antibodi Yang Dihasilkan. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 4(4).