

## Titer Hemaglutinasi dan Kematian Embrio pada Telur *Specific Antibody Negative (SAN)* dengan Usia yang Berbeda Saat Inokulasi Virus Avian Influenza

### *Hemagglutination Titers and Embryonic Death in Specific Antibody Negative (SAN) Eggs with Different Ages at The Time of Avian Influenza (AI) Virus Inoculation*

Fauzi Rahmat Kurniawan\*, I Nyoman Arsana, & I Gede Ketut Adiputra

Program Studi Biologi, Fakultas Teknologi Informasi dan Sains Universitas Hindu Indonesia,  
Jl. Sangalangit, Tembau, Penatih, Denpasar Timur

\*Email korespondensi: [fauzirahmatkurniawan@gmail.com](mailto:fauzirahmatkurniawan@gmail.com)

• Diterima: 08 Desember 2021 • Direvisi: 27 Februari 2022 • Disetujui: 27 Februari 2022

**ABSTRAK.** Penyakit Avian Influenza (AI) tidak hanya menginfeksi berbagai spesies unggas tetapi juga dapat menular ke manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji titer hemaglutinasi dan kematian embrio pada telur *Specific Antibody Negative (SAN)* dengan usia yang berbeda saat inokulasi virus *Avian Influenza (AI)*. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan yaitu telur SAN usia 7 hari, 9 hari, 11 hari dan 13 hari. Perlakuan diulang sebanyak 6 kali sehingga total sampel telur SAN yang digunakan adalah sebanyak 24 telur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa usia telur SAN berpengaruh secara signifikan terhadap titer hemaglutinasi dan waktu kematian embrio ayam. Rerata titer hemaglutinasi telur SAN usia 9; 11, dan 13 hari berturut-turut adalah  $597,33 \pm 85,33$  HAU/25 $\mu$ l;  $1.322,67 \pm 339,73$  HAU/25 $\mu$ l, dan  $256 \pm 85,86$  HAU/25 $\mu$ l. Pada telur SAN usia 7 hari tidak ada titer hemaglutinasi pascainokulasi virus. Waktu kematian embrio pada telur SAN usia 7 terjadi satu hari pascainokulasi virus AI, sedangkan usia 9; 11, dan 13 hari terjadi dua hari pascainokulasi virus AI. Kesimpulan, titer hemaglutinasi dan kematian embrio telur SAN berbeda tergantung pada usia telur SAN, dan usia telur SAN yang paling baik digunakan untuk inokulasi virus AI adalah usia 11 hari.

Kata kunci: Avian influenza, kematian embrio, titer hemaglutinasi, telur SAN.

**ABSTRACT.** Avian influenza (AI) not only infects various species of aves but also can be transmitted to humans. This study was aim to examine hemagglutination titers and embryonic death in *Specific Antibody Negative (SAN)* eggs with different ages at the time of Avian Influenza (AI) virus inoculation. The study used a completely randomized design with four treatment groups, namely SAN eggs 7 days old, 9 days, 11 days, and 13 days. The treatment was repeated 6 times so the total sample of SAN eggs used was 24 eggs. The results showed that the age of SAN eggs had a significant effect on the hemagglutination titer and the time of death of chicken embryos. Average hemagglutination titer SAN eggs age 9; 11, and 13 days respectively were  $597.33 \pm 85.33$  HAU/25 $\mu$ l;  $1,322.67 \pm 339.73$  HAU/25 $\mu$ l, and  $256 \pm 85.86$  HAU/25 $\mu$ l. There was no hemagglutination titer in SAN eggs aged 7 days post-inoculation AI virus. The time of embryonic death in SAN eggs aged 7 occurred one-day post-inoculation AI virus, while age 9; 11, and 13 days occurred two days post-inoculation AI virus. In conclusion, hemagglutination titers and embryonic mortality differed depending on the age of the SAN eggs, and the best age to be used for AI virus inoculation was 11 days.

Keywords: Avian influenza, embryo death, hemagglutination titer, SAN eggs.

## PENDAHULUAN

Avian Influenza (AI) atau yang sering dikenal dengan flu burung merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh virus dari famili *Orthomyxoviridae*. Penyakit ini bisa menginfeksi berbagai spesies unggas dan juga dapat menular

ke manusia (zoonosis). Kasus virus flu burung menginfeksi manusia pertama kali dilaporkan di Hongkong tahun 1997 (Mounts *et al.*, 1999), dan di Indonesia sudah menyebabkan 168 orang meninggal dunia (WHO, 2021).

Virus AI memberikan dampak yang cukup luas pada sektor peternakan karena tingkat mortalitas maupun morbiditas yang tinggi (Ilham dan Yusdja, 2010). Pola kasus virus AI biasanya meningkat pada musim hujan dan masih menjadi ancaman peternakan unggas di Indonesia sampai saat ini (Hewajuli *et al.*, 2017).

Keberadaan virus AI dapat dideteksi melalui isolasi sampel virus AI baik dari unggas hidup maupun mati. Sampel dari unggas hidup dapat berupa swab kloaka, trakea, dan feses unggas segar, sedangkan dari unggas mati dapat diambil berupa organ, swab kloaka, swab oronasal dan feses unggas. Virus yang telah diisolasi selanjutnya diinokulasikan pada telur ayam *Specific Pathogen Free* (SPF) atau dapat diinokulasikan pada SAN kemudian diamati setiap hari untuk mengetahui kematian embrio (OIE, 2021). Telur SAN merupakan telur yang berasal dari ayam yang tidak divaksin dan dijamin bebas dari penyakit pathogen (Kencana *et al.*, 2014). Virus AI mampu menyebabkan kematian embrio 44 jam sampai 72 jam setelah inokulasi (Wibowo *et al.*, 2006). Telur yang embrionya mati setelah inokulasi maka dilanjutkan dengan pemeriksaan uji hemaglutinasi (HA) untuk mengetahui konsentrasi antigen virus Avian influenza yang dinyatakan dengan titer hemaglutinasi utinasi (Hewajuli dan Dharmayanti, 2008).

Salah satu faktor yang diduga mempengaruhi kematian embrio dan titer hemaglutinasi adalah usia telur SAN yang digunakan pada saat inokulasi virus AI. Namun demikian, belum banyak penelitian yang mengungkap tentang usia telur SAN yang digunakan saat inokulasi virus AI terhadap kematian embrio ayam dan titer hemaglutinasi. Mengingat bahwa telur SAN memiliki harga yang cukup mahal maka diperlukan efisiensi dan efektifitas dalam menggunakan telur SAN di laboratorium, terutama berkaitan dengan usia telur SAN yang digunakan untuk inokulasi virus AI. Efisiensi dan efektifitas penggunaan telur SAN dapat dioptimalkan dengan mengetahui titer hemaglutinasi dan waktu kematian embrio

sehingga dapat diketahui usia telur SAN yang paling baik digunakan untuk inokulasi virus AI. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kematian embrio dan titer hemaglutinasi pada telur SAN dengan usia yang berbeda saat inokulasi virus AI.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya; isolat positif virus AI koleksi Laboratorium Virologi BBVet Denpasar, Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.0-7.4, eritrosit ayam, Telur SAN usia 7 hari, 9 hari, 11 hari, dan 13 hari; antibiotik penisilin, pewarna kuku, dan alkohol 70%. Peralatan yang digunakan adalah; mikropate V, centrifuge, vortex, mikropipet singlechannel, mikropipet multichannel, pinset, gunting, tray telur, autoclave, incubator 37°C, egg candler, mikrosentrifus hematokrit, Biosafety Cabinet (BSC).

### Metode

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap yang terdiri atas empat perlakuan. Perlakuan berupa perbedaan usia telur SAN yakni usia 7 hari, 9 hari, 11 hari dan 13 hari. Perlakuan diulang sebanyak 6 kali sehingga jumlah total sampel yang digunakan adalah 24 telur SAN. Variabel yang diamati adalah waktu kematian embrio ayam dan titer hemaglutinasi setelah inokulasi AI. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan analisis non parametrik Kruskal-Wallis pada selang kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) dan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

### Prosedur

Sebanyak 24 telur SAN digunakan dalam penelitian ini. Telur diambil dari kandang BBVet Denpasar dan dimasukkan ke dalam mesin inkubator dengan suhu 37°C kemudian telur diinkubasi sesuai perlakuan yakni; selama tujuh hari, sembilan, sebelas, dan 13 hari. Lama waktu

inkubasi tersebut dinyatakan sebagai usia telur SAN yang digunakan dalam penelitian ini.

Isolat positif virus AI diambil dari freezer -80°C Laboratorium Virologi Balai Besar Veteriner Denpasar selanjutnya dilakukan thawing, kemudian divortex selama 30 detik sampai homogen. Telur SAN selanjutnya diinokulasi dengan virus AI sebanyak 0,2 ml ke dalam membran korioalantois melalui ruang udara telur menggunakan spuit 1 ml kemudian ditutup menggunakan perwarna kuku. Telur selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati setiap hari. Pengamatan dilakukan dengan cara diteropong menggunakan *egg candler* dan dilihat denyut jantung dari embrio. Apabila tidak ditemukan denyut jantung embrio maka embrio tersebut dinyatakan sudah mati dan siap untuk dilakukan uji HA. Namun apabila embrio masih hidup, maka telur dimasukkan lagi ke dalam inkubator. Lama inkubasi telur adalah 3 hari, apabila pada hari ketiga embrio telur masih hidup maka telur dikeluarkan dari mesin inkubator dan dilakukan uji HA (Susanti *et al.*, 2007).

Uji HA dilakukan dengan menambahkan Phosphate-buffered Saline (PBS) ke dalam 12 sumuran mikroplate V sebanyak 25 µl menggunakan mikropipet singlechannel. Selanjutnya cairan alantois telur SAN diambil menggunakan mikropipet singlechannel sebanyak 25 µl dan dimasukkan ke dalam sumuran pertama mikroplate V. Cairan alantois pada sumuran pertama dihomogenkan kemudian diambil sebanyak 25 µl menggunakan pipet lalu dipindahkan ke sumuran kedua, dari sumuran kedua diambil sebanyak 25 µl lalu dipindahkan ke sumuran ketiga, begitu

seterusnya sampai sumuran nomor sebelas. Kemudian dari sumuran 11 diambil 25 µl dan dibuang. Sumuran nomor 12 merupakan kontrol. Selanjutnya sebanyak 25 µl PBS ditambahkan ke semua sumuran menggunakan mikropipet singlechannel. Kemudian ditambahkan eritrosit ayam 1% sebanyak 25 µl menggunakan mikropipet singlechannel ke semua sumuran. Mikroplate V kemudian digoyang-goyang secara perlahan agar homogen dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit. Hasil uji HA dinyatakan positif apabila pada dasar sumuran mikroplate tampak butir-butir halus seperti pasir yang menandakan antigen virus dapat mengaglutinasi sel darah merah. Titer hemaglutinasi dihitung dari hasil positif pada pengenceran tertinggi yaitu dua pangkat tingkat pengenceran (WHO, 2013). Seluruh penelitian dilaksanakan di Laboratorium virologi Balai Besar Veteriner Denpasar.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang dilanjutkan dengan analisis statistik menunjukkan bahwa usia telur SAN saat diinokulasi virus AI berpengaruh secara signifikan ( $p < 0,05$ ; kruskal wallis test) terhadap titer hemaglutinasi dan waktu kematian embrio ayam. Rerata titer hemaglutinasi menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ; Man whitney test) antar perlakuan, kecuali antara usia 9 hari dengan 11 hari tidak berbeda ( $p > 0,05$ ). Sementara itu, waktu kematian embrio menunjukkan perbedaan yang signifikan antara usia 7 hari dengan 9 hari, 11, dan 13 hari (Tabel 1).

Tabel 1. Rerata Titer Hemaglutinasi dan Waktu Kematian Embrio Setelah Inokulasi Virus AI.

Perlakuan	N	Rerata titer hemaglutinasi HU/25 µl), Mean±SE	Waktu kematian embrio (hari), Mean±SE
7 hari	6	0.0±0.0 <sup>a</sup>	1,0±0,0 <sup>a</sup>
9 hari	6	597,33 ±85,33 <sup>b</sup>	2,0±0,0 <sup>b</sup>
11 hari	6	1.322,67 ± 339,73 <sup>b</sup>	2,0±0,0 <sup>b</sup>
13 hari	6	256 ± 85,86 <sup>c</sup>	2,0±0,0 <sup>b</sup>

Catatan: Rerata dengan huruf berbeda menunjukkan berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ; Man Whitney test).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kematian embrio ayam tercepat terjadi pada telur SAN usia 7 hari yakni 1 hari pascainokulasi virus AI, namun tidak ditemukan adanya titer hemaglutinasi pada cairan allantois (Tabel 1). Telur SAN yang digunakan adalah telur yang berembrio. Embrio ditandai dengan terlihatnya pembuluh darah pada membran korioalantois dan adanya denyut jantung embrio pada saat proses pengamatan menggunakan egg candler. Telur SAN yang berusia 6 hari, pembuluh dari membran korioalantois sudah mulai terlihat transparan pada telur yang subur. Sedangkan embrio dinyatakan mati apabila pada saat inkubasi dan diteropong menggunakan egg candler jantung embrio sudah tidak berdenyut lagi.

Kematian embrio ayam dalam waktu 1 hari pascainokulasi virus AI terjadi pada telur SAN usia 7 hari, namun setelah dilakukan uji HA hasilnya negatif hemaglutinasi. Hal ini menunjukkan bahwa kematian embrio ayam tidak disebabkan oleh virus AI, namun diduga karena embrio yang belum siap untuk diinokulasi virus, walaupun sudah terlihat pembuluh darah dan denyut jantung embrio. Jantung embrio sudah mulai berdetak di hari ketiga dan pada hari ketujuh organ embrio ayam baru mulai berkembang (Fitriani *et al.*, 2021). Diduga embrio tersebut mati terlebih dahulu sebelum virus melakukan pembiakan pada alantois. Hal ini didukung oleh pernyataan dari Hewajuli & Dharmayanti (2008) yang menyatakan bahwa apabila kematian embrio terjadi kurang dari 24 jam paska inokulasi maka dianggap sebagai kematian karena faktor non spesifik.

Sementara itu, pada telur SAN usia 9 hari, 11 hari, dan 13 hari kematian embrio terjadi pada hari kedua paska inokulasi virus AI serta menunjukkan positif titer hemaglutinasi. Hal ini menunjukkan bahwa kematian embrio ayam disebabkan oleh virus AI. Hal ini sejalan dengan pernyataan dari Wibowo *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa virus AI mampu

menyebabkan kematian embrio ayam antara 44 jam sampai 72 jam paska inokulasi.

Hasil penelitian menunjukkan, rerata titer hemaglutinasi tertinggi adalah sebesar  $1.322,67 \pm 339,73$  HAU/25  $\mu$ l yang ditemukan pada telur SAN usia 11 hari. Pada telur SAN usia 9 hari mempunyai rata-rata titer hemaglutinasi  $597,33 \pm 85,33$  HAU/25 $\mu$ l, dan telur SAN usia 13 hari rata-rata titer hemaglutinasi  $256 \pm 85,86$  HAU/25 $\mu$ l, sementara telur SAN usia 7 hari tidak ada titer hemaglutinasi pascainokulasi virus (Tabel 1). Walaupun titer hemaglutinasi antara telur SAN usia 11 hari dengan 9 hari tidak berbeda secara statistik ( $p > 0.05$ ), namun angka titer hemaglutinasi pada telur SAN usia 11 hari menunjukkan angka tertinggi, sehingga dapat dinyatakan bahwa telur SAN usia 11 merupakan usia terbaik untuk diinokulasi virus AI. Angka titer pada uji HA menunjukkan konsentrasi virus yang dapat mengaglutinasi sel darah merah. Semakin tinggi titer hemaglutinasi maka semakin tinggi pula konsentrasi virus yang dapat mengaglutinasi sel darah merah (OIE, 2021). Perbedaan titer hemaglutinasi diduga karena kondisi alantois yang terdapat pada telur SAN. Alantois pada telur berfungsi sebagai organ pernapasan embrio dan menyerap kalsium dari cangkang untuk memberikan nutrisi berupa protein kepada embrio. Dalam proses pembiakan virus AI, kepekaan media yang digunakan sangat berperan terhadap tinggi rendahnya tingkat infeksi virus (Kencana *et al.*, 2014). Telur usia 9 sampai dengan 11 hari mempunyai ruang alantois yang lebih luas dan cairan alantois yang lebih banyak dibandingkan telur dengan usia 13 hari, sehingga memaksimalkan proses pembiakan virus AI.

Pada telur usia 9 hari, alantois mulai berkembang dan meningkatnya pembuluh darah pada vitellus, sementara alantois mencapai ukuran maksimal pada telur usia 11 hari. Pada telur usia 13 hari kondisi alantois sudah menyusut dan berkembang menjadi membran korioalantois (Affandi, 2007), sehingga cairan alantois yang terdapat pada telur usia 13 hari menjadi lebih sedikit dibandingkan telur

usia 9 hari sampai dengan 11 hari dan menyebabkan proses pembiakkan virus menjadi tidak maksimal.

Sementara itu, perbedaan waktu kematian embrio ayam diduga karena pada telur usia 7 hari belum memiliki embrio yang siap untuk dimasukkan virus dibandingkan usia 9 sampai dengan 13 hari. Organ embrio ayam usia 7 hari baru mulai berkembang sehingga embrio ayam mati sebelum virus melakukan pembiakkan pada allantois (Affandi, 2007). Walaupun waktu kematian embrio antara telur SAN usia 9 hari, 11 hari dan 13 tidak berbeda secara statistik ( $p > 0,05$ ) namun apabila dilihat dari angka titer hemaglutinasi tampak bahwa telur SAN usia 11 hari memiliki angka titer tertinggi, sehingga dapat dinyatakan bahwa telur SAN usia 11 hari merupakan usia terbaik untuk diinokulasi virus AI.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa titer hemaglutinasi dan kematian embrio telur SAN berbeda tergantung pada usia telur SAN dan telur SAN yang terbaik untuk inokulasi virus AI adalah usia 11 hari.

## KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan yang berhubungan dengan artikel ini.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Balai Besar Veteriner Denpasar yang telah memberikan vasilitas dalam melaksanakan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

Affandi, F. 2007. Perkembangan embrio dari hari ke hari. CP-Bulletin Service A Tradition of Quality, Nomor 87/ Tahun VIII.

Fitriani., D. Masyitha., & M. Akmal. 2021. Histologis perkembangan embrio ayam pada masa inkubasi satu sampai tujuh hari. Jurnal Agripet. 21(1):65-70.

Hewajuli, D. A., N. L. P. I Dharmayanti & I. W. T Wibawan. 2017. deteksi, isolasi, dan identifikasi Avian influenza sub tipe H5N1 pada unggas di Pulau Jawa, Indonesia tahun 2016. Jurnal Veteriner. 18(4):496. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.4.496>

Hewajuli, D.A., & N. L. P Dharmayanti,. 2008. Karakterisasi dan identifikasi virus Avian Influenza (AI). Wartazoa. 18(2):86-100.

Ilham, N., & Y. Yusdja. 2010. Dampak flu burung terhadap produksi unggas pendapatan peternak skala kecil di Indonesia. Jurnal Agro Ekonom. 28(1):39-68.

Kencana, G. A. Y., I. N Suartha., A. Nurhandayani & M. Ramadhan. 2014. Kepekaan telur *Spesific Pathogen Free* dan *Clean Egg* terhadap virus flu burung. Jurnal Veteriner. 15(1):87-93.

Mounts, A. W., H Kwong., H. S Izurieta., Y. Y Ho., T. K Au., M. Lee., C. B Bridges ., S. W Williams., K. H Mak., J. M Katz., W. M Thompson., N. J Cox & K. Fukuda. 1999. Case-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997. Journal of Infectious Diseases, 180(2), 505-508. <https://doi.org/10.1086/314903>

OIE. 2021. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). Chapter 3.3.4. OIE Terrestrial Manual, 1-25.

Susanti, R., R. Soejoedono., I. G. N. K Mahardika., I. W. T Wibawan & M. T Suhartono. 2007. Potensi unggas air sebagai reservoir virus High Pathogenic Avian Influenza Sub tipe H5N1. Ilmu Peternakan dan Veteriner. 12(2):160-166.

WHO. 2013. Serological detection of avian influenza A (H7N9) virus infections by modified horse red blood cells haemagglutination-inhibition assay. World Health Organization, December, 1-11.

WHO. 2021. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO, 2003-2015. World Health Organization., January, 5-6.

Wibowo, H. M., W. Asmara & C. R Tabbu. 2006. Isolasi dan identifikasi serologis virus avian influenza dari sampel unggas yang diperoleh di D.I. Yogyakarta dan Jawa Tengah. *Jurnal Sain Veteriner*. 24 (1): 77-83.