

## **OPTIMASI WAKTU INKUBASI VAKSIN H5N1 PADA TELUR AYAM BEREMBRIO DENGAN SUHU 37°C TERHADAP TITER HEMAGLUTINASI**

*Optimization of Incubation Time of H5N1 Vaccine in Embryonated Chicken  
Eggs at 37°C on Hemagglutination Titer*

**Rizka Fuji Lestary<sup>1\*</sup>, Iis Kurniati<sup>2</sup>, Asep Dermawan<sup>3</sup>, Ani Riyani<sup>4</sup>**

<sup>1,2,3,4\*</sup> Prodi Sarjana Terapan, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes  
Kemenkes Bandung

<sup>1\*</sup>Email: [rizkafuji26@gmail.com](mailto:rizkafuji26@gmail.com)

<sup>2</sup>Email: [kurniati20260@gmail.com](mailto:kurniati20260@gmail.com)

<sup>3</sup>Email: [dermawanasep33@yahoo.co.id](mailto:dermawanasep33@yahoo.co.id)

<sup>4</sup>Email: [ani\\_riyanianalis@yahoo.com](mailto:ani_riyanianalis@yahoo.com)

### **ABSTRACT**

*Avian Influenza virus subtype H5N1 can infect animals as well as humans due to its high pathogenicity. Avian Influenza virus contains hemagglutinin protein that can agglutinate red blood cells. The purpose of this study was to determine the optimal incubation time, namely 3 days, 4 days, and 5 days and whether there are differences in the different incubation times. The type of research used was descriptive. The samples used were Avian Influenza Vaccine subtype H5N1 inoculated into embryonated chicken eggs aged 9-11 days. The allantois fluid produced from vaccine inoculation in embryonated chicken eggs can be tested for hemagglutination to determine its titer. The results showed that the optimum incubation time was 3 days and the optimum hemagglutination titer at the 3rd day incubation time was  $\frac{1}{256}$ , at the 4th day incubation time was  $\frac{1}{256}$ , and at the 5th day incubation time was  $\frac{1}{512}$ . The data were analyzed using One-Way Anova test on SPSS. In conclusion, there was a significant difference in hemagglutination titer in the H5N1 vaccine inoculated in embryonated chicken eggs for 3 days and 4 days against the incubation time for 5 days.*

**Key words:** *Embryonated chicken eggs, H5N1 vaccine, hemagglutination test, incubation*

### **ABSTRAK**

Virus Avian Influenza sub tipe H5N1 dapat menginfeksi hewan serta manusia karena patogenitasnya yang tinggi. Pada virus Avian Influenza terdapat protein hemagglutinin yang dapat mengaglutinasi eritrosit. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan waktu inkubasi optimal, yaitu 3 hari, 4 hari, dan 5 hari dan apakah terdapat perbedaan pada waktu inkubasi yang berbeda tersebut. Jenis penelitian yang digunakan adalah deskriptif. Sampel yang digunakan berupa Vaksin Avian Influenza sub tipe H5N1 yang diinokulasikan pada telur ayam berembrio usia 9-11 hari. Cairan alantois yang dihasilkan dari inokulasi vaksin pada telur ayam berembrio dapat dilakukan uji hemagglutinasinya untuk mengetahui titernya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inkubasi optimum selama 3 hari dan titer hemagglutinasinya optimum pada waktu inkubasi

hari ke-3, yaitu  $\frac{1}{256}$ , pada waktu inkubasi hari ke-4, yaitu  $\frac{1}{256}$ , dan pada waktu inkubasi hari ke-5, yaitu  $\frac{1}{512}$ . Data hasil penelitian dianalisis menggunakan uji *One-Way Anova* pada SPSS. Kesimpulannya, terdapat perbedaan titer hemaglutinasi yang signifikan pada vaksin H5N1 yang diinokulasikan pada telur ayam berembrio selama 3 hari dan 4 hari terhadap waktu inkubasi selama 5 hari.

**Kata kunci:** Telur ayam berembrio, vaksin H5N1, uji hemaglutinasi, inkubasi

## PENDAHULUAN

Virus Avian Influenza, atau biasa dikenal virus flu burung (*bird flu*), telah menyebabkan wabah di berbagai belahan dunia. WHO menyebutkan pada tahun 2003 sampai 2017 tercatat ada 200 kasus. Di Indonesia, terdapat 168 kasus flu burung yang menginfeksi manusia dan menyebabkan kematian.<sup>1</sup> Berdasarkan patogenitasnya, virus *Avian Influenza* dibedakan menjadi 2 jenis, yaitu *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) serta *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI).<sup>2</sup>

Virus *Avian Influenza* (AI) memiliki keunikan, yaitu dapat dengan mudah bermutasi, tetapi akan mati jika dilakukan pemanasan 56°C selama 180 menit atau 60°C selama 60 menit. Adanya hasil variasi gen hemaglutinin disebabkan oleh kemampuan virus bermutasi sehingga terdapat beberapa jenis spesies yang terinfeksi. Adanya hemaglutinin menjadi faktor yang mempengaruhi tingkat patogenitas virus H5N1 dan berperan dalam proses infeksi virus pada sel.<sup>2</sup>

Vaksinasi menjadi solusi efektif untuk melawan pandemi. Vaksin dapat menipu sistem kekebalan agar bertahan melawan serangan virus serupa.<sup>3</sup> Vaksin berupa zat antigenik yang digunakan untuk menginduksi kekebalan aktif terhadap penyakit.<sup>4</sup> Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil vaksinasi meliputi jenis dan kualitas vaksin, jadwal vaksinasi, dosis, dan metode penyuntikan.<sup>5</sup>

Inokulasi vaksin H5N1 pada Telur Ayam Berembrio (TAB) menggunakan telur ayam yang berusia 9-11 hari

melalui ruang alantois.<sup>6</sup> Peneliti terdahulu menyebutkan bahwa isolasi dan deteksi virus AI dapat menggunakan TAB yang berusia 9-11 hari. Caranya dengan mengisolasi telur dalam inkubator bersuhu 37°C selama dua hari dan memeriksa dengan cara *candling* setiap hari. Dilanjutkan dengan metode serologis, yaitu Uji Hemaglutinasi (HA) yang digunakan untuk mengetahui titer antigen. Hasil dari uji tersebut mengakibatkan kematian embrio sebanyak 70%.<sup>3</sup>

Hemaglutinin merupakan protein yang berperan sangat penting dalam pengikatan virus pada reseptor sel inang. Salah satu penentu patogenitas virus avian influenza, yaitu hemaglutinin karena mempunyai peran penting dalam berikatan dengan reseptor sel inang. Pada tahap awal infeksi, virus HA berikatan dengan reseptor seluler dan melepaskan ribonukleoprotein.<sup>7</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan titer HA optimum, menentukan waktu inkubasi optimum, dan menentukan adanya perbedaan titer HA pada vaksin H5N1 yang diinokulasikan pada telur ayam berembrio dengan suhu 37°C selama 3 hari, 4 hari, dan 5 hari.

## METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif yang merupakan penelitian kuantitatif dan bertujuan mendeskripsikan variabel-variabel utama sesuai tujuan penelitian.

Pada penelitian ini, menggunakan virus H5N1 Medivac yang diinokulasikan pada Telur Ayam Berembrio (TAB) yang berusia 9 hingga 11 hari. Isolasi vaksin H5N1 dengan menyuntikkan inokulum menggunakan jarum suntik sekali pakai sebanyak 0,1-0,2 ml per butir telur. Pada penelitian ini menggunakan 3 sampel telur ayam berembrio. Telur ayam berembrio tersebut diberi perlakuan berupa variasi pada waktu inkubasi telur ayam berembrio, yaitu 3 hari, 4 hari, dan 5 hari yang diinkubasi menggunakan suhu 37°C. Setiap perlakuan dilakukan 11 kali pengulangan. Cairan alantois yang dihasilkan tersebut dipanen dan dikumpulkan, dilanjutkan dengan uji hemaglutinasi dan data dapat diperoleh dari titer HA.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis

Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung pada bulan Mei 2024. Data titer yang dihasilkan dari uji hemaglutinasi dapat dianalisis dengan Uji *Two-Way Anova* menggunakan aplikasi SPSS.

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik dengan No. 07/KEPK/EC/V/2024.

#### HASIL

Pada tabel 1, perlakuan sampel kontrol menggunakan cairan alantois yang tidak diinokulasikan dengan vaksin H5N1 sehingga menunjukkan hasil negatif uji HA. Semua sampel diinokulasikan di hari yang sama. Namun, waktu panen cairan alantois yang berbeda, yaitu setelah diinkubasi selama 3 hari, 4 hari, dan 5 hari. Kemudian, data titer hemaglutinasi dikelompokkan berdasarkan waktu inkubasinya.

**Tabel 1. Hasil Uji Hemaglutinasi**

Pengulangan	Kontrol Negatif	Inkubasi Hari ke-3	Inkubasi Hari ke-4	Inkubasi Hari ke-5
1	0	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{8}$
2	0	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$
3	0	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{64}$
4	0	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{512}$
5	0	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$
6	0	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{256}$
7	0	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{128}$
8	0	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{32}$
9	0	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$
10	0	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{256}$
11	0	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$

**Tabel 2. Uji Normalitas**

Waktu Inkubasi	Shapiro-Wilk
----------------	--------------

		Statistik	df	Sig.
Titer Hemaglutinasi	Hari ke-3	0,880	11	0,104
	Hari ke-4	0,856	11	0,051
	Hari ke-5	0,133	11	0,079

**Tabel 3. Uji One-Way Anova**

	Jumlah Kotak	df	Rata-Rata Kotak	F	Sig.
Antar Kelompok	148645,818	2	74322,909	4,474	0,020
Dalam Kelompok	498341,818	30	16611,394		
Total	646987,636	32			

**Tabel 4. Uji Post Hoc**

Waktu Inkubasi	Waktu Inkubasi	Perbedaan Rata-Rata	Std. Kesalahan	Sig.	95% Interval Kepercayaan	
					Batas Bawah	Batas Atas
Inkubasi Hari ke-3	Inkubasi Hari ke-4	-28,727	54,957	0,605	-140,96	83,51
	Inkubasi Hari ke-5	-154,545*	54,957	0,009	-266,78	-42,31
Inkubasi Hari ke-4	Inkubasi Hari ke-3	28,727	54,957	0,605	-83,51	140,96
	Inkubasi Hari ke-5	-125,818*	54,957	0,029	-238,06	-13,58
Inkubasi Hari ke-5	Inkubasi Hari ke-3	154,545*	54,957	0,009	42,31	266,79
	Inkubasi Hari ke-4	125,818*	54,957	0,029	13,58	238,06

Dari data titer hemaglutinasi yang didapatkan, dilakukan Uji Normalitas pada SPSS untuk mengetahui data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Jika data terdistribusi normal, dapat dilanjutkan dengan Uji *One-Way Anova* dan jika data tidak normal dilanjutkan dengan Uji Kruskal Wallis.

Pada Uji Normalitas, dapat dikatakan terdistribusi normal apabila nilai signifikansi  $>0,05$ . Jika dalam satu kelompok data terdapat  $>30$  sampel, maka untuk uji selanjutnya menggunakan data signifikansi dari Kolmogorov-Smirnov. Apabila terdapat  $<30$  sampel dalam satu kelompok,

maka untuk uji selanjutnya menggunakan signifikansi dari Shapiro-Wilk. Pada tabel 2, terdapat 11 sampel dalam satu kelompok, maka uji selanjutnya dapat menggunakan signifikansi dari Shapiro-Wilk. Pada Uji Normalitas tersebut terdapat signifikansi yang dihasilkan pada Shapiro-Wilk yang nilainya  $>0,05$ , yaitu pada inkubasi hari ke-3 sebesar 0,104, inkubasi hari ke-4 sebesar 0,051, dan inkubasi hari ke-5 sebesar 0,079. Maka, data tersebut dapat dilanjutkan dengan uji *One-Way Anova* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara kelompok inkubasi pada hari ke 3, hari ke 4, dan hari ke 5.

Terdapat ketentuan pada Uji *One-Way Anova*, yaitu jika nilai signifikansi  $>0,05$ , maka data tidak terdapat perbedaan yang signifikan dan apabila nilai signifikansi  $<0,05$ , maka terdapat data yang berbeda secara signifikan pada data tersebut. Pada tabel 3, telah dilakukan Uji *One-Way Anova* dan terdapat signifikansi  $<0,05$ , yaitu 0,020 yang berarti data dari kelompok tersebut terdapat perbedaan yang signifikan. Untuk mengetahui perbedaannya, dapat dilakukan dengan Uji *Post Hoc*.

Pada tabel 4, dapat dilihat signifikansi dari Uji *Post Hoc*. Apabila signifikansinya  $>0,05$ , maka tidak terdapat perbedaan secara signifikan dan jika signifikansinya  $<0,05$ , maka terdapat perbedaan secara signifikan. Pada kelompok inkubasi hari ke-3 tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok inkubasi hari ke-4 karena memiliki nilai signifikansi  $>0,05$ , yaitu 0,065. Terdapat nilai yang berbeda secara signifikan pada kelompok inkubasi hari ke-3 dengan kelompok inkubasi hari ke-5 karena memiliki nilai signifikansi  $<0,05$ , yaitu 0,009. Terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok inkubasi hari ke-4 dengan kelompok inkubasi hari

ke-5 karena memiliki nilai signifikansi  $<0,05$ , yaitu 0,029.

## PEMBAHASAN

Uji aktivitas vaksin H5N1 dilakukan terhadap Telur Ayam Berembrio (TAB) usia 9-11 hari yang diperoleh dari peternakan yang ada di Bandung. TAB yang digunakan pada penelitian ini berusia 9 hari. Digunakannya telur usia 9 hari karena embrio sudah berkembang, terdapat cairan alantois, dan pembuluh darah mulai bertumbuh.<sup>8</sup> TAB relatif bebas dari bakteri patogen yang menjadikan TAB sering dipilih sebagai media penelitian dan mudah ditemukan.<sup>9</sup>

Cairan alantois merupakan media yang sesuai untuk perkembangan vaksin H5N1. Terlebih lagi, inokulasi virus melalui jalur alantois dapat dikatakan aman karena tidak menimbulkan banyak embrio yang mati. Menyuntikkan vaksin secara intra alantois meminimalkan efek racun dari senyawa tersebut karena senyawa tersebut berdifusi ke dalam cairan alantois.<sup>8</sup>

Telur yang berusia 9 hingga 11 hari memiliki rongga alantois yang cukup besar dan cairan alantois yang cukup banyak, sehingga memaksimalkan proses pembiakan vaksin H5N1. Pada telur usia 9 hari, membran alantois mulai bertumbuh dan pembuluh darah pada kuning telur melebar, sedangkan pada telur usia 11 hari, membran alantois mencapai ukuran maksimal.<sup>10</sup>

Cairan alantois yang kuning dan keruh dapat terjadi karena kontaminasi bakteri. Melalui liang renik cangkang telur, bakteri akan masuk ke dalam telur jika cangkangnya kotor dan dapat menyebabkan kematian pada embrio.<sup>11</sup> Pada cairan alantois yang terkontaminasi bakteri akan menimbulkan kekeruhan dan dapat

menyebabkan titer hemaglutinasi turun karena protein yang dihasilkan telah dicerna oleh bakteri dan dapat menyebabkan perbedaan titer hemaglutinasi.

Virus H5N1 memiliki protein hemaglutinin-neuraminidase (HN) di dalam selubung virus.<sup>12</sup> Adanya protein hemaglutinin (H), pengikatan protein hemaglutinin ke reseptor permukaan sel darah merah menyebabkan aglutinasi sel darah merah.<sup>13</sup> Protein neuraminidase (N) merupakan enzim yang bertindak dalam pelepasan virus dari sel inang serta mempengaruhi waktu yang dibutuhkan virus untuk melepaskan sel darah merah.<sup>14</sup>

Proses difusi vaksin ke dalam telur dapat mempengaruhi titer hemaglutinasi. Pada inkubasi hari ketiga, masih banyak vaksin yang tersisa di ruang alantois. Namun, tersisanya vaksin di ruang alantois berkurang seiring bertambahnya waktu inkubasi. Pada hari keempat, vaksin yang masih tersisa di ruang alantois mulai berkurang dan terdifusi sempurna pada inkubasi hari kelima. Angka titer pada Uji Hemaglutinasi menunjukkan konsentrasi vaksin yang dapat mengaglutinasi sel darah merah.<sup>15</sup>

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa waktu inkubasi optimum pada vaksin H5N1 yang diinokulasikan pada telur ayam berembrio dengan suhu 37°C, yaitu 3 hari. Titer HA optimum pada vaksin H5N1 yang diinokulasikan pada telur ayam berembrio dengan suhu 37°C pada waktu inkubasi 3 hari dan 4 hari, yaitu  $\frac{1}{256}$ , dan pada waktu inkubasi 5 hari, yaitu  $\frac{1}{512}$ . Terdapat perbedaan

titer HA yang signifikan pada vaksin H5N1 yang diinokulasikan pada telur ayam berembrio selama 3 hari dan 4 hari terhadap waktu inkubasi selama 5 hari.

## DAFTAR RUJUKAN

1. WHO. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2021 2021
2. Setiarto, R. Mengenal Virus Flu Burung H5N1 Avian Influenza, Pencegahan dan Pengobatannya. Guepedia; 2020.
3. Kencana G, Suartha I. Kedena I. Isolation and Characterization of Avian Influenza Virus H5N1 Subtype Field Isolates from Bali for Vaccine Candidates. *Jurnal Veteriner*. 2020, 21(4): 530-538. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2020.21.4.530>
4. Esfandiari, A. Immune Response of Dry Holstein Vaccinated by Killed Avian Influenza H5N1 Vaccine: Department of Animal Disease and Veterinary Public Health 2018
5. Tarugan S, Wibowo M, Indriani R. Field Effectiveness of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Vaccination in Commercial Layer in Indonesia. *PLoS ONE*. 2018, 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190947>
6. Isnawati R, Wuryastuti H, Wasito R. Peneguhan Diagnosis Avian Influenza pada Ayam Petelur yang Mengalami Gejala Penurunan Produksi. *Jurnal Sain Veteriner*. 2019, 37(1): 1. <https://doi.org/10.22146/jsv.40602>
7. Idar I, Muhsinin S, Baroroh U. Pola Perubahan Urutan Asam Amino pada Hemaglutinin Virus H5N1 Indonesia. *Chimica et Natura Acta*. 2019, 7(3); 150. <https://doi.org/10.24198/cna.v7.n3.26314>
8. Muhayaroh M, Saifudin A. Antivirus Activity of Bantotan Leaves (*Ageratum conyzoides*) Ethanol Extract

- Agains Newcastle Disease Virus. *Journal of Pharmacy*. 2023, 2(2). <https://jsr.lib.ums.ac.id/index.php/ujp>
9. Kencana G. Cara Mengisolasi Virus dan Mengidentifikasi dengan Uji Serologi Hemaglutinasi. 2017
  10. Kurniawan F, Arsana N, Gede I. Titer Hemaglutinasi dan Kematian Embrio pada Telur Spesific Antibody Negatif (SAN) dengan Usia yang Berbeda saat Inokulasi Virus Avian Influenza. *Jurnal Peternakan*. 2022, 19(1); 49-54. <https://doi.org/10.24014/jupet.v19i1.15101>
  11. Setiadi P, Lasmini. Perbaikan Sanitasi untuk Meningkatkan Daya Tetas Telur Itik di Pedesaan: Seminar Nasional Sains dan Teknologi Peternakan 1994. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
  12. Ali A, Karim. A Mini-Review on Newcastle Disease Virus. 2022
  13. Fitrawati. Isolasi dan Identifikasi Egg Drop Syndrome Virus dengan Uji Hemaglutinasi dan Hemaglutinasi Inhibisi. *Jurnal Sain Veteriner*. 2015, 59-68.
  14. Pudjiatmoko. Manual Penyakit Unggas: Subdit Pengamatan Penyakit Hewan Direktorat Kesehatan Hewan 2014. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan
  15. OIE. Avian Influenza (Including Infection with High Patogenicity Avian Influenza Viruses): Chapter 3.3.4 2021. Terrestrial Manual