

Keberhasilan Hiperimunitisasi pada Sapi Bunting: Kajian Terhadap Ketepatan Waktu Vaksinasi

(*THE SUCCESS OF HYPERIMMUNIZATION IN PREGNANT COWS:
A STUDY OF VACCINATIONS REGIMEN*)

Safitria Wulandari¹, Anita Esfandiari^{2*},
Sri Murtini³, Retno Wulansari²

¹Program Studi Ilmu Biomedis Hewan, Sekolah Pascasarjana;

²Divisi Penyakit Dalam Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi;

³Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner;
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor,

Jawa Barat Indonesia 16680,

*Email: esfandiari1962@gmail.com

ABSTRACT

This study aims to determine the appropriate timing of vaccination in pregnant cow with an emphasis on effect of gestational age when the vaccine is first administrated on the success of hyperimmunization. A total of 12 Friesian Holstein pregnant cows were divided into control and vaccine groups, with each group consisting of six months of gestation (n=3) and seven months (n=3). Cows were injected with a commercial H5N1 Avian influenza (AI) vaccine (killed vaccine) sub-cutaneous, in 5 doses/head (10⁶ EID50/dose). Vaccinations are carried out twice with two weeks intervals between vaccinations. Prior to vaccination, cows were given immunomodulator 0.1 mg/kg bw orally for three consecutive days then priming was done by injecting inactive AI H5N1 antigen without adjuvant (intravenously) three consecutive days (10x2⁸ HAU/head). Blood samples were collected through the coccygeal vein before the first vaccination, two weeks post vaccination I and two weeks post vaccination II to be analyzed for the parameters of leukocytes (total leukocytes and lymphocytes), levels of total protein, globulin and albumin/globulin ratio (A/G) and IgG anti AI H5N1 titers in blood and colostrum. The results showed that there were no significant differences in the total number of leukocytes and lymphocytes, levels of total protein and globulin, A/G ratio, and antibody anti AI H5N1 titers in blood and colostrum, both between groups and between observation times (p>0.05). However, the cows in the six months gestation age vaccine group showed leukocyte parameters, total protein and globulin levels as well as antibodies anti AI H5N1 titers in blood and colostrum tended to be higher than in the seven months gestation age group. The regimen of vaccination of late trimester pregnant cows did not affect by age gestation to overcome of hyperimmunization success.

Keywords: *Avian influenza* H5N1; hyperimmunization; bovine colostrums; immunoglobulin G

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh umur kebuntingan induk sapi saat vaksin pertama kali diberikan terhadap keberhasilan hiperimunitisasi. Sebanyak 12 ekor induk sapi bunting jenis sapi *Friesian Holstein*, dibagi menjadi kelompok kontrol dan vaksin, dengan masing-masing kelompok terdiri dari umur kebuntingan enam bulan (n=3) dan tujuh bulan (n=3). Induk sapi diinjeksi vaksin *Avian influenza* (AI) H5N1 komersial (*killed vaccine*) sub-kutan, sebanyak 5 dosis/ekor (10⁶ EID50/dosis). Vaksinasi dilakukan dua kali dengan interval antar vaksinasi selama dua minggu. Sebelum vaksinasi, induk sapi diberi imunomodulator 0,1 mg/kg bb per oral selama tiga hari berturut-turut kemudian dilakukan *priming* dengan menyuntikkan antigen AI H5N1 inaktif tanpa *adjuvant* (intravena) tiga hari berturut-turut (10x2⁸ HAU/ekor). Sampel darah dikoleksi melalui vena *coccygea* sebelum vaksinasi pertama, dua minggu pascavaksinasi I dan dua minggu pascavaksinasi II untuk dianalisis terhadap parameter leukosit (jumlah total leukosit dan limfosit), kadar total protein, globulin dan rasio albumin/globulin (A/G), serta titer IgG anti AI H5N1 dalam darah dan kolostrum. Hasil pengamatan menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah total leukosit dan limfosit, kadar total protein dan globulin, rasio A/G, serta titer IgG anti AI H5N1 dalam darah dan kolostrum, baik antar kelompok

maupun antar waktu pengamatan ($p > 0.05$). Namun demikian, pada induk sapi kelompok vaksin umur kebuntingan enam bulan menunjukkan parameter leukosit, kadar total protein dan globulin serta titer IgG anti AI H5N1 dalam darah dan kolostrum lebih tinggi dibandingkan kelompok induk sapi umur kebuntingan tujuh bulan. Umur kebuntingan pada saat vaksinasi pertama kali dilakukan tidak memengaruhi keberhasilan hiperimunisasi pada induk sapi bunting trimester akhir.

Kata-kata kunci: *Avian influenza* H5N1, hiperimunisasi, kolostrum, Imunoglobulin G

PENDAHULUAN

Avian influenza/AI atau flu burung merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus *Avian influenza* tipe A (H5N1). *Avian influenza* menyebabkan terjadinya wabah endemik dan kerugian yang sangat besar karena kematian jutaan ternak unggas dan terjadinya penularan pada manusia di dunia termasuk Indonesia. Kasus penularan AI dari unggas ke manusia di Indonesia terjadi pada tahun 2003 hingga tahun 2017, dengan jumlah korban yang terinfeksi sebanyak 200 jiwa dan korban yang meninggal sebanyak 168 jiwa (WHO, 2019). Upaya pencegahan dan pengendalian penyebaran virus AI H5N1 pada unggas di Indonesia memberikan hasil jumlah kasus yang terus menurun hingga dua tahun terakhir (2018-2019), demikian juga dengan kasus infeksi dan kematian pada manusia akibat virus AI H5N1 di Indonesia sudah tidak ada laporan lagi (Kementerian Pertanian Republik Indonesia, 2019). Namun demikian, laporan kejadian flu burung akibat virus H5N1 pada unggas di Indonesia sampai sekarang masih ada. Oleh karena itu, flu burung H5N1 diyakini masih menjadi ancaman.

Penanganan terhadap kasus AI pada manusia dilakukan menggunakan obat antivirus seperti golongan adamantine (amantadine dan rimantadine) namun dikhawatirkan pemberian terus menerus obat ini dapat menimbulkan resistansi dan virus yang resistan ini bersifat menular dan patogenik (Wong dan Yuen, 2006). Pencegahan dengan pengebalan aktif terhadap flu burung pada manusia saat ini belum mungkin dilakukan karena vaksin untuk virus AI H5N1 belum tersedia. Oleh karena itu, pengebalan pasif dapat menjadi alternatif untuk pencegahan dan pengendalian terhadap kasus flu burung pada manusia.

Pengebalan pasif terhadap kasus AI H5N1 dapat dilakukan menggunakan antibodi yaitu Imunoglobulin G (IgG) yang berasal dari kolostrum sapi. Antibodi berbagai penyakit yang terdapat di dalam darah induk sapi mudah

ditransfer ke dalam kolostrum dengan kadar yang sangat tinggi (Esfandiari *et al.*, 2008). Imunoglobulin G atau IgG anti AI H5N1 asal kolostrum dapat diperoleh dengan cara melakukan vaksinasi pada induk sapi bunting trimester akhir beberapa kali (hiperimunisasi) menggunakan vaksin AI H5N1 inaktif sehingga induk sapi terinduksi untuk memproduksi antibodi spesifik (IgG anti AI H5N1). Melalui proses kolostrogenesis, IgG anti AI H5N1 kemudian dimobilisasi dari sirkulasi darah induk menuju kolostrum di dalam kelenjar ambing, sehingga didapatkan IgG anti AI H5N1 dalam kolostrum dengan kadar yang cukup tinggi (Esfandiari *et al.*, 2008; Esfandiari *et al.*, 2014).

Keberhasilan hiperimunisasi pada induk sapi bunting trimester akhir untuk meningkatkan produksi IgG anti AI H5N1 dalam darah maupun kolostrum di antaranya dipengaruhi oleh umur kebuntingan induk sapi pada saat vaksinasi dilakukan pertama kali (Hill, 2010). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh umur kebuntingan induk sapi saat vaksin pertama kali diberikan terhadap keberhasilan hiperimunisasi melalui pengamatan terhadap parameter leukosit (jumlah total leukosit dan limfosit), kadar total protein, globulin dan rasio A/G dalam darah, serta titer IgG anti AI H5N1 dalam darah dan kolostrum.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik hewan (*ethical clearance*) dari komisi etik hewan, Fakultas Kedokteran hewan, Institut Pertanian Bogor, SKEH Nomor: 064/KEH/SKE/VII/2017.

Hewan Coba dan Desain Penelitian

Sebanyak 12 ekor induk sapi bunting *Friesian Holstein*, yang sehat secara klinis, laktasi kedua-ketiga dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan vaksin. Masing-masing kelompok terdiri dari induk sapi

dengan umur kebuntingan 6 bulan (n=3) dan 7 bulan (n=3). Kelompok kontrol yaitu kelompok induk sapi bunting tanpa diberikan perlakuan dan kelompok vaksin yaitu kelompok induk sapi bunting yang diberikan perlakuan hiperimunisasi yang mengacu pada metode Esfandiari *et al.* (2008). Induk sapi diberi pakan hijauan dan konsentrat sebanyak dua kali sehari pada pagi dan sore hari dan diberi air minum secara *ad-libitum*. Induk sapi berasal dari peternakan rakyat di Kawasan Usaha Peternakan (KUNAK) Cibungbulang, Bogor

Induk sapi diberi imunomodulator (Folgen®) selama tiga hari berturut-turut dengan dosis 0,1 mg/kg bb per oral sebelum dilakukan vaksinasi. Pemberian antigen in-aktif AI H5N1 selama tiga hari berturut-turut melalui vena jugularis dengan dosis 10×2^8 HAU/ekor diberikan sebagai *priming* untuk memperkenalkan antigen pada sistem kekebalan, satu hari setelah pemberian *priming* ke-3 dilanjutkan dengan pemberian vaksin AI H5N1 in-aktif sebanyak lima dosis per ekor (konsentrasi 10^6 EID₅₀/dosis). Vaksinasi dilakukan dua kali dengan interval antar vaksinasi selama dua minggu (Esfandiari *et al.*, 2008).

Koleksi dan Analisis Sampel Darah

Koleksi darah dilakukan melalui vena *coccygea*, pada saat sebelum hiperimunisasi atau setelah pemberian imunomodulator (prevaksinasi), dua minggu setelah vaksinasi pertama (pascavaksinasi I) dan dua minggu setelah vaksinasi kedua (pascavaksinasi II). Sampel darah dianalisis terhadap parameter leukosit (jumlah total leukosit dan limfosit), kadar total protein, globulin dan rasio albumin terhadap globulin (rasio A/G) serta titer IgG anti AI H5N1.

Jumlah total leukosit dan limfosit dianalisis menggunakan *VetScan HM5 Abaxis*®. Kadar total protein dianalisis menggunakan Refraktometer, kadar globulin diperoleh dari pengurangan kadar total protein dengan kadar albumin, rasio A/G diperoleh dari pembagian kadar albumin dengan globulin, titer IgG anti AI H5N1 darah dan kolostrum dianalisis menggunakan uji *Hemagglutination inhibition* menurut OIE (2015).

Koleksi dan Analisis Kolostrum

Koleksi kolostrum dilakukan segera setelah induk sapi partus, baik pada kelompok kontrol maupun kelompok vaksin dan disimpan pada suhu -20°C sampai analisis dilakukan

(Esfandiari *et al.*, 2008). Sampel kolostrum selanjutnya dipreparasi melalui proses *defatting* menggunakan modifikasi metode Zarrilli *et al.* (2003) dan dilakukan purifikasi menggunakan metode presipitasi garam (presipitasi dengan 40% amonium sulfat jenuh) kemudian dianalisis terhadap titer antibodi anti AI H5N1 menggunakan uji *Hemagglutination inhibition* (OIE, 2015).

Analisis Data

Data jumlah total leukosit, limfosit, kadar total protein, globulin, dan rasio A/G yang diperoleh dianalisis menggunakan uji faktorial rancangan acak lengkap (RAL) dua faktor yaitu (kelompok perlakuan dan umur kebuntingan) dengan *in time* (prevaksin, pascavaksinasi I dan pascavaksinasi II). Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan (*Duncan multiple range test*/DMRT).

Hasil uji titrasi antibodi Anti AI H5N1 dalam darah dan kolostrum induk sapi bunting diambil rata-rata menggunakan rumus *geometric mean titre* (GMT) kemudian untuk membandingkan kelompok umur kebuntingan induk sapi pada kelompok vaksin dianalisis menggunakan uji-t saling bebas (*independent T test*) pada hasil GMT dua minggu pascavaksinasi I, dua minggu pascavaksinasi II dan kolostrum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Leukosit merupakan komponen sel darah yang mempunyai peranan dalam pertahanan seluler dan humoral tubuh. Sel ini memfagosit dan mencerna antigen melalui proses diapedesis, yaitu leukosit bergerak secara *amoeboid* meninggalkan pembuluh darah menuju ke lokasi peradangan atau infeksi melalui batas endotel (*transmigrasi paracellular*) atau melalui sel endotel (*migrasi transcellular*) (Muller, 2013). Perubahan jumlah total leukosit dalam pembuluh darah dapat menjadi indikator respons kekebalan (Dhabhar *et al.*, (2012) bahwa jumlah total leukosit dan proporsi masing-masing jenis leukosit (limfosit, neutrofil dan monosit) dalam darah mewakili kondisi distribusi leukosit dan dapat menggambarkan sistem imun dalam tubuh. Dengan demikian jumlah total leukosit dapat menjadi parameter perubahan fisiologis hewan saat mendapatkan paparan antigen.

Jumlah total leukosit dan limfosit sapi

bunting normal berturut-turut berkisar 6,5-12,0 x 10³/iL dan 2,73-7,32 x 10³/iL (Smith dan Mangkoewidjojo, 1987). Hasil pengamatan menunjukkan jumlah total leukosit dan limfosit sapi yang tidak divaksin maupun divaksinasi pada umur 6 dan 7 bulan kebuntingan masih berada pada kisaran nilai normal (Tabel 1). Hal ini sesuai pernyataan Nazifi *et al.* (2008) bahwa tahap kebuntingan tidak memiliki efek yang nyata pada jumlah total leukosit, jumlah eosinofil atau hematokrit. Limfopenia dan eosinopenia terjadi saat induk melahirkan (partus) dan akan kembali ke kondisi normal pada dua minggu setelah partus. Peningkatan jumlah total leukosit induk sapi sebelum partus terjadi secara bertahap, yang dimulai pada saat mendekati waktu kelahiran, mencapai puncak kira-kira sembilan jam setelah partus dan kembali ke nilai normal pada tiga hari

postpartum. Kondisi ini menunjukkan bahwa vaksinasi tidak menyebabkan gangguan fisiologis pada sapi bunting trimester terakhir. Efek vaksinasi terhadap jumlah limfosit pada ruminansia bunting berbeda-beda tergantung jenis vaksinnya. Penelitian Rahman *et al.* (2020) menyatakan pemberian vaksin inaktif *Rift Valley fever* satu dosis pada domba tidak meningkatkan jumlah limfosit. Hal yang sama ditemukan pada penelitian Mailybayeva *et al.* (2017) yang menggunakan vaksin vektor *Brucella abortus* dengan vektor *Avian influenza* menunjukkan bahwa domba dan kambing bunting yang divaksin dengan vaksin Flu-BA_Omp19-SOD_TV tiga kali hanya mengalami sedikit kenaikan jumlah limfosit.

Hasil pengamatan jumlah total leukosit dan limfosit serta kadar total protein dan globulin pada induk sapi yang divaksin dengan vaksin

Tabel 1. Rataan jumlah total leukosit dan limfosit, kadar total prorein dan globulin, dan rasio albumin/globulin (A/G0 pada induk sapi kelompok kontrol dan vaksin umur kebuntingan enam dan tujuh bulan sebelum dan sesudah vaksinasi

Parameter	Kelompok	Umur kebuntingan	Waktu Pengamatan		
			Prevaksinasi	dua minggu pascavaksinasi I	dua minggu pascavaksinasi II
Total leukosit (10 ³ /μ)	Kontrol	6 bulan	8,41±0,90 ^{aa}	8,44±0,35 ^{aa}	8,74 ± 0,23 ^{aa}
		7 bulan	6,08±0,00 ^{aa}	7,08±0,43 ^{aa}	6,47 ± 1,23 ^{aa}
	Vaksin	6 bulan	7,97±0,96 ^{aa}	7,78±2,42 ^{aa}	7,21 ± 3,70 ^{aa}
		7 bulan	8,11±2,03 ^{aa}	7,81±2,86 ^{aa}	8,35 ± 2,61 ^{aa}
Limfosit (10 ³ /μ)	Kontrol	6 bulan	4,63±0,62 ^{aa}	3,95±1,07 ^{aa}	5,10±0,12 ^{aa}
		7 bulan	3,96±0,29 ^{aa}	3,95±0,67 ^{aa}	3,59±0,64 ^{aa}
	Vaksin	6 bulan	3,94±0,41 ^{aa}	3,89±1,54 ^{aa}	5,05±2,02 ^{aa}
		7 bulan	4,71±1,48 ^{aa}	4,28±2,34 ^{aa}	4,74±1,12 ^{aa}
Total protein (g/dL)	Kontrol	6 bulan	9,47±0,58 ^{aa}	9,40±0,70 ^{aa}	9,13±0,70 ^{aa}
		7 bulan	7,67±0,61 ^{aa}	7,73±0,64 ^{aa}	7,67±0,42 ^{aa}
	Vaksin	6 bulan	9,00±0,72 ^{aa}	8,70±1,70 ^{aa}	8,67±0,81 ^{aa}
		7 bulan	8,30±1,08 ^{aa}	7,67±1,75 ^{aa}	8,13±0,81 ^{aa}
Globulin (g/dL)	Kontrol	6 bulan	6,53±0,61 ^{aa}	6,24±0,56 ^{aa}	5,99±0,69 ^{aa}
		7 bulan	4,09±0,74 ^{aa}	4,47±1,06 ^{aa}	4,07±0,61 ^{aa}
	Vaksin	6 bulan	5,85±1,00 ^{aa}	5,39±1,83 ^{aa}	5,46±1,03 ^{aa}
		7 bulan	4,71±1,48 ^{aa}	4,28±2,34 ^{aa}	4,74±1,12 ^{aa}
Rasio A/G	Kontrol	6 bulan	0,45±0,05 ^{aa}	0,51±0,03 ^{aa}	0,53±0,06 ^{aa}
		7 bulan	0,90±0,22 ^{aa}	0,77±0,28 ^{aa}	0,90±0,19 ^{aa}
	Vaksin	6 bulan	0,56±0,16 ^{aa}	0,69±0,33 ^{aa}	0,61±0,18 ^{aa}
		7 bulan	0,83±0,30 ^{aa}	1,01±0,62 ^{aa}	0,75±0,23 ^{aa}

Keterangan: Huruf *superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05) antar waktu pengamatan. Huruf *superscript* kapital yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05) antar kelompok dan antar umur kebuntingan.

AI H5N1 pada umur kebuntingan enam bulan secara umum cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan induk sapi yang divaksin pada umur kebuntingan tujuh bulan. Hasil tersebut sesuai dengan gambaran respons kekebalan induk sapi yang divaksinasi pada umur kebuntingan enam bulan yang cenderung lebih baik dibandingkan dengan induk sapi yang divaksinasi pada umur kebuntingan tujuh bulan (Tabel 2 dan 4). Sebanyak 66,6% induk sapi yang divaksinasi pertama kali pada umur kebuntingan enam bulan berhasil membentuk antibodi anti AI H5N1 dengan titer 2^5 dan 2^6 , sedangkan kelompok induk sapi yang divaksinasi pertama kali pada umur kebuntingan tujuh bulan berhasil membentuk antibodi anti AI H5N1 dengan titer 2^8 pada 33,3% induk sapi. Antigen vaksin untuk pertama kalinya masuk ke dalam tubuh sapi saat vaksinasi akan merangsang dan memberi sinyal pada sistem kekebalan tubuh non spesifik yang merupakan pertahanan pertama tubuh. Sel pertahanan pertama tubuh diawali dengan adanya proses fagositosis oleh neutrofil dan diikuti oleh makrofag dan sel dendritik. Bersama dengan makrofag, sel dendritik bermigrasi ke kelenjar getah bening/limfonodus untuk mempresentasikan antigen sehingga berinteraksi dengan sel T dan sel B untuk memulai respons imun dengan memproduksi antibodi spesifik yang berlangsung selama 14-21 hari (Hill, 2010; Kencana *et al.*, 2015). Sel T berperan dalam imunitas seluler yang berfungsi untuk menyerang antigen secara langsung dan dapat bekerjasama dengan sel B dalam membentuk antibodi spesifik sebagai sel T helper (Th). Limfosit $CD8^+$ T sitotoksik dapat membatasi penyebaran agen infeksi dengan mengenali dan membunuh sel yang terinfeksi atau mengeluarkan sitokin antivirus spesifik dan mengaktifkan limfosit $CD4^+$ Th. Sel-sel Th ini dapat berkontribusi untuk perlindungan melalui produksi sitokin dan memberikan dukungan untuk pembentukan dan pemeliharaan sel B dan $CD8^+$. Sel B berperan dalam imunitas humoral yaitu yang berfungsi memproduksi antibodi spesifik dan dapat berdiferensiasi menjadi sel plasma dan sel B memori yang mengingat jika dilakukan vaksinasi atau paparan antigen berulang (Siegrist, 2018; Sudiono, 2014).

Pengamatan pada dua minggu pascavaksinasi II menunjukkan semua induk sapi (100%) yang divaksinasi pertama kali pada umur kebuntingan enam dan tujuh bulan

mampu membentuk antibodi anti AI H5N1 dengan titer lebih dari 2^4 . Terdeteksinya antibodi anti AI H5N1 yang terbentuk pada dua minggu pascavaksinasi II diduga karena efek dari *booster* atau pemberian ulang vaksin yang merupakan respons imun sekunder. Menurut Bentebibel *et al.* (2013) dan Spensieri *et al.* (2013), pada respons imun sekunder, antigen mengaktifkan kembali memori imun (sel B memori) dan merespons dengan cepat (kurang dari tujuh hari) untuk pembentukan antibodi (IgG). *Short-lived plasma cells* mempertahankan tingkat antibodi puncak selama beberapa minggu dan menurun dengan cepat seperti vaksinasi primer, kemudian sel plasma berumur panjang *long-lived plasma cells* yang tersimpan di dalam sumsum tulang memproduksi antibodi spesifik yang menurun dengan kinetika yang lebih lambat akibat penggunaan vaksin inaktif (Mastelic *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2010).

Keberhasilan kolostrogenesis dipengaruhi oleh keberadaan aktivitas hormon selama masa kebuntingan (Chase, 2012). Kolostrogenesis pada sapi dimulai pada enam minggu prepartus ketika kadar 17α -estradiol meningkat dan kadar progesteron relatif konstan atau sedikit menurun yang mengarah pada proses diferensiasi berbagai sel epitel di kelenjar ambing sebagai awal kolostrogenesis (Baumrucker dan Bruckmaier, 2014). Selain itu, terdapat peningkatan ekspresi reseptor Fc, yang menginduksi pergeseran IgG dari serum (sirkulasi darah) induk ke kelenjar ambing dan kolostrum yang terbentuk. Sesaat sebelum induk partus, kadar serum progesteron turun, yang merupakan faktor pendukung dalam proses kolostrogenesis. Pada saat yang sama, kadar prolaktin dan glukokortikoid meningkat, kedua hormon tersebut berperan mendorong masuknya kelenjar susu ke dalam proses laktogenesis yang sebenarnya. Hal ini menandai berhentinya proses kolostrogenesis sebelum kelahiran anak (neonatus) (Baumrucker dan Bruckmaier, 2014; Stark *et al.*, 2015).

Pembentukan IgG dalam darah secara tidak langsung dapat juga diamati melalui kadar total protein dan globulin dalam darah. Kondisi fisiologis atau patologis dapat menyebabkan pergeseran kadar albumin dan globulin sehingga menyebabkan penurunan atau peningkatan pada kadar total protein serum (Alberghina *et al.*, 2010). Pada kelompok vaksin, induk sapi umur kebuntingan enam bulan cenderung memiliki kadar total protein yang lebih tinggi

dibandingkan dengan kadar total protein umur tujuh bulan. hal tersebut juga ditunjukkan pada hasil analisis kadar globulin dalam darah induk sapi kelompok vaksin umur kebuntingan enam bulan yang memiliki kadar yang globulin yang lebih tinggi dibandingkan umur kebuntingan tujuh bulan.

Globulin merupakan salah satu fraksi protein yang terbentuk sekitar 35% dari total protein plasma (Chamber *et al.*, 2015). Gamma globulin merupakan sub kelompok globulin yang berperan sebagai antibodi sehingga komponen

utamanya adalah imunoglobulin (Capitelli dan Crosta, 2013). Kadar globulin pada induk sapi kelompok vaksin umur kebuntingan enam dan tujuh bulan memiliki pola yang sama pada dua minggu pascavaksinasi I (terjadi penurunan) dan dua minggu pascavaksinasi II (terjadi peningkatan). Penurunan kadar globulin dalam sirkulasi darah karena vaksinasi yang dilakukan pertama kali membutuhkan waktu yang lebih lama untuk membentuk antibodi dibandingkan dengan vaksinasi *booster*. Menurut Nicholson (2016), ketika tubuh

Tabel 2. Persentase jumlah induk sapi yang menunjukkan adanya IgG anti AI H5N1 dan titernya dalam darah dan kolostrum melalui uji HI

Kelompok	Umur kebuntingan	Darah			Kolostrum
		Prevaksinasi	dua minggu pascavaksinasi I	dua minggu pascavaksinasi II	
Kontrol	6 bulan	0%	0%	0%	0%
	7 bulan	0%	0%	0%	0%
Vaksin	6 bulan	0%	66,6% (2 ⁵ dan 2 ⁶)	100%	66,6%
	7 bulan	0%	33,3% (2 ⁸)	100%	33,3%

Keterangan: IgG= immunoglobulin G; AI= avian influenza; HI= hemagglutination inhibition

Tabel 3. Geometry mean titre/GMT hasil uji nemagglutination inhibition (HI) darah dan kolostrum kelompok kontrol

Kelompok	Umur kebuntingan	Darah (log 2)			Kolostrum (log 2)
		Prevaksinasi	dua minggu pascavaksinasi I	dua minggu pascavaksinasi II	
Kontrol	6 bulan	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	7 bulan	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Tabel 4. Geometry mean titre (GMT) hasil uji hemagglutination inhibition (HI) darah dan kolostrum kelompok vaksin

Kelompok	Umur kebuntingan	Darah (log 2)			Kolostrum (log 2)
		Prevaksinasi	dua minggu pascavaksinasi I	dua minggu pascavaksinasi II	
Vaksin	6 bulan	0,00 ± 0,00	3,67 ± 3,22 ^A	7,00 ± 2,65 ^A	7,00 ± 6,25 ^A
	7 bulan	0,00 ± 0,00	2,67 ± 4,62 ^A	6,00 ± 2,65 ^A	4,33 ± 7,51 ^A

Keterangan: Huruf *superscript* kapital yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05) antar umur kebuntingan.

terpapar oleh antigen pertama kali, sel T akan terangsang melalui respons imun adaptif yang dilakukan oleh sel dendritik yang kemudian terjadi proses fagositosis. Beberapa sel T kemudian bermigrasi ke tempat infeksi untuk membantu sel fagositik lainnya terutama makrofag untuk menghancurkan mikroba, kemudian sel T aktif lainnya tetap berada di organ limfoid dan membantu sel B merespons antigen mikroba. Sel B yang diaktifkan mengeluarkan antibodi atau imunoglobulin untuk memfagosit antigen. Selain itu, pada penelitian ini, lamanya respons imun diduga karena adanya *adjuvant* dalam vaksin inaktif yang diberikan. Adjuvan akan melepaskan "antigen" secara perlahan (Aiyer *et al.*, 2013). Kadar globulin meningkat pada dua minggu pascavaksinasi II disebabkan sel memori yang mempunyai kemampuan mengingat antigen spesifik yang pernah menyerang telah terbentuk dan tersebar dalam sirkulasi darah dan jaringan mukosa (Nicholson, 2016). Kadar globulin pada induk sapi kelompok vaksin yang terlihat cenderung lebih tinggi pada umur kebuntingan enam bulan dibandingkan umur kebuntingan tujuh bulan sesuai dengan hasil uji HI pada darah induk sapi yang menunjukkan terjadinya pembentukan antibodi anti AI H5N1 yang lebih tinggi pada induk sapi umur kebuntingan enam bulan dibandingkan umur kebuntingan tujuh bulan.

Ratio A/G digunakan untuk melihat keseimbangan nilai albumin dan globulin. Perubahan nilai albumin atau globulin dalam sirkulasi darah memengaruhi ratio A/G dan memberikan informasi yang sangat penting tentang perubahan pola elektroforesis dan klasifikasi serta identifikasi disproteinemia (Tothova *et al.*, 2016). Fluktuasi yang terjadi sepanjang waktu pengamatan pada kelompok kontrol dan vaksin berkaitan dengan kadar globulin dalam darah. Menurut Alberghina *et al.* (2011), nilai rasio A/G yang menurun disebabkan oleh kelebihan produksi globulin, penurunan sintesis albumin, atau karena hilangnya albumin dari sirkulasi. Di sisi lain, nilai rasio A/G yang lebih tinggi mencerminkan kurangnya produksi globulin, berdasarkan pengamatan ratio A/G pada induk sapi kelompok vaksin umur kebuntingan enam bulan terlihat cenderung lebih rendah dibandingkan umur kebuntingan tujuh bulan yang mengindikasikan kadar globulin induk sapi kelompok vaksin umur kebuntingan enam bulan lebih tinggi dibandingkan umur kebuntingan tujuh bulan.

Hasil analisis keberadaan antibodi anti AI H5N1 menggunakan uji *hemagglutination inhibition* (HI) (Tabel 2 dan Tabel 4) menunjukkan bahwa pemberian vaksin unggas inaktif AI H5N1 pada induk sapi bunting mampu menginduksi pembentukan antibodi anti AI H5N1 yang kemudian dapat dimobilisasi ke dalam kelenjar ambing (kolostrum) melalui proses kolostrogenesis. Namun demikian, setiap individu sapi memiliki kemampuan yang tidak sama dalam merespons stimulasi antibodi (hiperimunisasi). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Esfandiari *et al.* (2008), yang melakukan vaksinasi AI H5N1 pada induk sapi bunting trimester akhir yang menunjukkan hasil titer IgG anti AI H5N1 yang beragam dalam uji HI karena setiap induk sapi memiliki respons imun yang berbeda-beda.

Tabel 2, 3 dan 4 memperlihatkan hasil uji HI untuk evaluasi adanya IgG anti AI H5N1 dalam darah induk sapi semua kelompok dan semua umur kebuntingan. Pada induk sapi kelompok kontrol umur kebuntingan enam dan tujuh bulan tidak ditemukan IgG anti AI H5N1 dalam darahnya, yang ditunjukkan dengan nilai GMT 2^0 pada 100% jumlah induk sapi (Tabel 3). Hal tersebut karena kelompok kontrol tidak diberikan vaksin sehingga tidak ada antigen AI H5N1 yang masuk ke dalam tubuh, sehingga tidak ada induksi untuk pembentukan IgG anti AI H5N1.

Pada kelompok vaksin umur kebuntingan enam bulan menunjukkan IgG anti AI H5N1 mulai diproduksi pada dua minggu pascavaksinasi I pada dua ekor sapi atau sebanyak 66,6% sedangkan umur kebuntingan tujuh bulan pada satu ekor sapi atau sebanyak 33,3% (Tabel 2 dan Tabel 4). Hal tersebut menunjukkan induk sapi yang divaksin berespons baik terhadap antigen dari vaksin AI H5N1 yang diinjeksikan. Menurut OIE (2018), titer HI dapat dianggap positif jika terdapat penghambatan pada pengenceran serum 1/16 (2^4) atau lebih terhadap 4 HAU antigen sedangkan serum dianggap negatif jika tidak terjadi hambatan aglutinasi sel darah merah terhadap 4 HAU antigen atau tidak menunjukkan titer lebih dari $0,25(2^2)$.

Pengamatan hasil uji HI dalam serum darah induk sapi kelompok vaksin pada dua minggu pascavaksinasi II menunjukkan terjadi peningkatan nilai GMT sebesar 2^7 pada 100% induk sapi umur kebuntingan enam bulan dan GMT sebesar 2^6 pada 100% induk sapi umur kebuntingan tujuh bulan (Tabel 2 dan Tabel 4).

Meskipun terjadi peningkatan nilai GMT kedua kelompok umur kebuntingan, nilai GMT pada induk sapi umur kebuntingan tujuh bulan terlihat cenderung lebih rendah dibandingkan nilai GMT pada induk sapi umur kebuntingan enam bulan. Hal tersebut diduga disebabkan pada dua minggu pascavaksinasi II induk sapi kelompok umur kebuntingan tujuh bulan sudah memasuki fase enam minggu prepartus sehingga proses kolostrogenesis sudah dimulai. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Esfandiari (2008), bahwasanya IgG anti AI H5N1 sudah tidak terdeteksi pada dua minggu pascavaksinasi II. Menurut Barington *et al.* (2001), perubahan kadar hormon estrogen dan progesteron terjadi pada empat minggu hingga enam minggu terakhir kebuntingan sehingga terjadi transpor selektif IgG ke kelenjar mamari. Kadar hormon kortikosteroid, *growth hormon* dan prolaktin ikut mengalami perubahan yaitu terjadi peningkatan bersamaan dengan waktu proses kolostrogenesis dimulai.

Kolostrogenesis adalah transfer imunoglobulin dari sirkulasi darah induk sapi menuju kelenjar ambing (kolostrum) yang dimulai pada enam minggu sebelum induk sapi partus (Barington *et al.*, 2001). Selama masa kolostrogenesis berlangsung, jumlah IgG yang ditransfer sebesar 500 g/minggu ke dalam ambing. Imunoglobulin G1 (IgG1) merupakan subtipe imunoglobulin terbesar yang terdapat dalam kolostrum yaitu sekitar 85% dari total IgG (Barington *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2011). Reseptor pada sel epitel alveoler *mammae* menangkap IgG1 dari cairan ekstraseluler dan mengalami endositosis dan akhirnya dilepaskan ke sekresi luminal. Sel epitel alveoler berhenti mengekspresikan reseptor ini diduga sebagai respons terhadap peningkatan kadar prolaktin, pada permulaan laktasi (Godden *et al.*, 2019).

Hasil uji HI terhadap sampel kolostrum pada kelompok kontrol kelompok induk sapi umur kebuntingan enam dan tujuh bulan menunjukkan hasil yang sama yaitu tidak terdeteksi adanya IgG anti AI H5N1 dalam kolostrum karena induk sapi tidak terpapar oleh antigen AI H5N1 (tidak diberikan vaksinasi). Hasil uji HI sampel kolostrum induk sapi kelompok vaksin pada kedua kelompok umur kebuntingan menunjukkan pola yang sama yaitu terjadi peningkatan titer IgG anti AI H5N1. Pada induk sapi kelompok umur kebuntingan enam bulan memiliki persentase jumlah induk sapi yang menunjukkan titer IgG anti AI H5N1 lebih tinggi (66%) dibandingkan dengan induk sapi

kelompok umur kebuntingan tujuh bulan (33%).

Menurut Godden *et al.* (2019), Morrill *et al.* (2012) dan Morin *et al.* (2010), banyak faktor yang memengaruhi kualitas kolostrum, yaitu ras, umur, nutrisi selama periode prepartus, musim atau suhu dan kelembapan lingkungan sekitar kandang, periode kering kandang (<21 hari), volume kolostrum yang dihasilkan pada pemerahan pertama, koleksi kolostrum yang tertunda. Induk sapi yang lebih tua umurnya memiliki kolostrum dengan kandungan antibodi lebih tinggi karena memiliki periode paparan terhadap agen patogen yang lebih lama. Hasil penelitian Shivley *et al.* (2018) menunjukkan, kolostrum dari induk sapi laktasi kedua dan ketiga atau induk sapi dengan umur lebih tua masing-masing mengandung IgG sebesar 71,7 g/L dan 83,3 g/L. Nutrisi seperti suplemen memengaruhi kualitas kolostrum, seperti yang dilaporkan Aragona *et al.* (2016) bahwa suplementasi dengan asam nikotinat selama empat minggu prepartus meningkatkan kadar IgG dalam kolostrum dari 73,8 menjadi 86,8 g/L. Shivley *et al.* (2018) melaporkan bahwa efek negatif stress akibat lingkungan yang panas terhadap kualitas kolostrum diduga karena berkurangnya asupan bahan kering atau berkurangnya aliran darah ke ambing yang mengakibatkan gangguan transfer IgG dan nutrisi ke ambing. Morin *et al.* (2010) melaporkan bahwa kadar IgG kolostrum menurun 3,7% setiap jam berikutnya jika pemerahan kolostrum tidak segera dilakukan setelah induk sapi partus akibat terjadi pengenceran.

Hasil penelitian ini memperlihatkan, jumlah total leukosit dan limfosit pada kelompok vaksin pada induk sapi umur kebuntingan enam bulan cenderung lebih rendah dibandingkan dengan umur kebuntingan tujuh bulan. Hasil pengamatan pada rasio A/G menunjukkan nilai yang lebih rendah pada induk sapi kelompok vaksin umur kebuntingan enam bulan dibandingkan dengan umur kebuntingan tujuh bulan sepanjang pengamatan berlangsung. Namun demikian, hasil pengamatan total protein dan globulin menunjukkan nilai yang lebih tinggi pada induk sapi umur kebuntingan enam bulan dibandingkan dengan umur kebuntingan tujuh bulan. Hal tersebut menandakan adanya pembentukan antibodi. Respons imun induk sapi bunting terhadap uji hematologi dan kimia darah kemudian dibuktikan dengan jumlah persentase sapi yang menunjukkan IgG anti AI H5N1 dan hasil uji HI pada serum darah dari

prevaksin hingga dua minggu pascavaksinasi II dan pada kolostrum (Tabel 2 dan Tabel 4) yang menunjukkan respons IgG anti AI H5N1 pada individual sapi terlihat lebih tinggi pada kelompok induk sapi umur kebuntingan enam bulan. Meskipun secara statistika tidak berbeda nyata, hasil pengamatan menunjukkan bahwa titer IgG anti AI H5N1 dalam darah dan kolostrum lebih tinggi pada induk sapi kelompok vaksin umur kebuntingan enam bulan dibandingkan dengan umur kebuntingan tujuh bulan (Tabel 2 dan 4).

Hasil analisis statistika secara keseluruhan memperlihatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah total leukosit dan limfosit, kadar total protein dan globulin, rasio A/G, serta titer IgG anti AI H5N1, dalam darah dan kolostrum, baik antar kelompok induk sapi (kelompok umur kebuntingan enam dan tujuh bulan) maupun antar waktu pengamatan ($P > 0.05$), hal ini diduga karena jumlah hewan uji yang hanya tiga ekor. Namun demikian, pada induk sapi kelompok vaksin umur kebuntingan enam bulan menunjukkan nilai parameter leukosit (jumlah total leukosit dan limfosit), kadar total protein dan globulin, titer IgG anti AI H5N1 dalam darah dan kolostrum, serta nilai GMT yang lebih tinggi dan rasio A/G yang lebih rendah, dibandingkan pada induk sapi kelompok umur kebuntingan tujuh bulan. Hal ini menunjukkan bahwa umur kebuntingan pada saat vaksinasi pertama kali dilakukan tidak memengaruhi keberhasilan hiperimunitisasi pada induk sapi bunting trimester akhir.

SIMPULAN

Umur kebuntingan pada saat vaksinasi pertama kali dilakukan tidak memengaruhi keberhasilan hiperimunitisasi pada induk sapi bunting trimester akhir.

SARAN

Diperlukan penelitian lanjutan mengenai penentuan waktu vaksinasi yang ideal pada hiperimunitisasi induk sapi bunting trimester akhir untuk meningkatkan kandungan IgG anti AI H5N1 dengan populasi kelompok lebih besar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Dikti) Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi dengan Skim Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT) atas nama Dr. drh Anita Esfandiari, MSi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer HP, Ashok KHG, Gupta PK, Shivakumar N. 2013. An Overview of Immunologic Adjuvants - A Review. *J Vaccines Vaccin* 4: 1.
- Alberghina D, Casella S, Vazzana I, Ferrantelli V, Giannetto C, Piccione G. 2010. Analysis of Serum Proteins in Clinically Healthy Goats (*Capra hircus*) Using Agarose Gel Electrophoresis. *Vet Clin Pathol* 39: 317–321.
- Alberghina D, Giannetto C, Vazzana I, Ferrantelli V, Piccione G. 2011. Reference Intervals For Total Protein Concentration, Serum Protein Fractions, and Albumin/Globulin Ratios in Clinically Healthy Dairy Cows. *J Vet Diagn Invest* 23: 111–114.
- Aragona KM, Chapman CE, Pereira ABD. 2016. Prepartum Supplementation of Nicotinic Acid: Effects on Health of The Dam, Colostrum Quality and Acquisition of Immunity in The Calf. *J Dairy Sci* 99: 3529–3538.
- Barrington GM, McFadden TB, Huyler MT, Besser TE. 2001. Regulation of Colostrogenesis in Cattle. *Livestock Production Science* 70: 95-104.
- Baumruker CR, Bruckmaier RM. 2014. Colostrogenesis: IgG1 transcytosis mechanisms. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 19(1): 103–117.
- Bentebibel SE, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, Flano E, Mejias A, Albrecht RA, Blankenship D, Xu H, Pascual V, Banchereau J, Garcia-Sastre A, Palucka AK, Ramilo O and Ueno H. 2013. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH Cells Correlates With Antibody Responses to Influenza Vaccination. *Sci Transl Med* 5(176): 132.

- Capitelli L, Crosta R. 2013. Overview of Psittacine Blood Analysis and Comparative Retrospective Study of Clinical Diagnosis, Hematology and Blood Chemistry in Selected Psittacine Species. *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice* 16(1): 71-120.
- Castro N, Capote J, Bruckmaier RM and Argüello A. 2011. Management Effects on Colostrogenesis in Small Ruminants: A Review. *Journal of Applied Animal Research* 39(2): 85-93.
- Chambers D, Huang C, Matthews G. Blood and Immune System: Plasma Constituents. In: Chambers D, Huang C, Matthews G. 2015. *Basic Physiology for Anaesthetists*. Cambridge. Cambridge University Press. Hlm. 366.
- Chase C. 2012. How to Get the Most Out of your Vaccination Program. Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Sioux Falls (US), SD. 301. Hlm. 1-8.
- Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E and McEwen BS. 2012. Stress-Induced Redistribution Of Immune Cells-From Barracks To Boulevards To Battlefields: A Tale Of Three Hormones-Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*. 37(9): 1345–1368.
- Esfandiari A, Wibawan IWT, Murtini S, Widhyari SD. 2008. Produksi Kolostrum Anti Virus Avian Influenza dalam Rangka Pengendalian Infeksi Virus Flu Burung. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 13(2): 69–79.
- Esfandiari A, Kawitan F, Murtini S, Widhyari SD. 2014. Effect of pH on the stability of IgG anti H5N1 from colostrum of cows vaccinated by H5N1. Di dalam: Sripa B *et al.* editor. Proceeding of South East Asia Veterinary School Association. The 3 Joint' International Meetings; 2014 Okt 13-15; Bogor, Indonesia. Bogor (ID): FKH IPB.
- Godden SM, Lombard JE, Woolums AR. 2019. Colostrum Management for Dairy Calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 35(3): 535–556.
- Hill K. 2010. Colostrogenesis: Timing is everything. <https://www.progressivedairy.com/topics/calves-heifers/colostrogenesis-timing-is-everything> [25 Agustus 2020].
- Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2019. FAO Apresiasi Kinerja Kementan dalam Usaha Pengendalian Flu Burung. <https://www.pertanian.go.id/home/?show=news&act=view&id=3771> [10 September 2019].
- Kencana GAY, Suartha N, Simbolon MP, Handayani AN, Ong S, Syamsidar, Kusumastuti A. 2015. Respon Antibodi terhadap Penyakit Tetelo pada Ayam yang Divaksin Tetelo dan Tetelo flu burung. *Jurnal Veteriner* 16(2): 283-290.
- Lin Y, Slight SR, Khader SA. 2010. Th17 Cytokines and Vaccine-induced Immunity. *Semin Immunopathol* 32: 79-90.
- Mailybayeva A, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Sansyzybay A, Renukaradhya GJ, Petrovsky N, Kaissar T. 2017. Improved Influenza Viral Vector Based Brucella Abortus Vaccine Induces Robust B and T-cell Responses and Protection Against *Brucella melitensis* Infection in Pregnant Sheep and Goats. *Plos One* 12(10): 1-17.
- Mastelic GB, Eberhardt CS, Auderset F. 2015. MF59 Mediates its B Cell Adjuvanticity by Promoting T Follicular Helper Cells and Thus Germinal Center Responses in Adult and Early Life. *J Immunol* 194(10): 4836-4845.
- Morin DE, Nelson SV, Reid ED. 2010. Effect of Colostral Volume, Interval Between Calving and First Milking, and Photoperiod on Colostral Igg Concentrations in Dairy Cows. *J Am Vet Med Assoc* 237: 420–428.
- Morrill KM, Conrad E, Lago A, Campbell J, Quigley J, Tyler H. 2012. Nationwide Evaluation of Quality and Composition of Colostrum on Dairy Farms in The United States. *J Dairy Sci* 95: 3997–4005.
- Muller WA. 2013. Getting Leukocytes to The Site of Inflammation. *Sage Journal* 50(1): 7-22.
- Nazifi S, Gheisari HR, Ahmadi MR. 2008. Haematological Changes of Dairy Cows in Postpartum Period and Early Pregnancy. *Comp Clin Pathol* 17:157-163
- Nicholson LB. 2016. The Immune System. *Essays Biochem* 60(3): 275-301.
- [OIE] Office International des Epizooties. 2015. Manual Of Diagnostic Test and Vaccine For Terrestrial Animal. World Organization For Animal Health. Hlm. 1-3

- [OIE] Office International des Epizooties. 2018. *Avian Influenza (Infection of Avian Influenza Virus)*. OIE Terrestrial Manual. World Organization For Animal Health. Hlm. 830-831.
- Rahman AE, Magd A, Atwa, Soliman. 2020. Evaluation Of The Cellular And Humoral Immune Response Of Sheep Vaccinated With Inactivated Rift Valley Fever Vaccine Adjuvanted With Montanide Gel 01tm. *Journal of Applied Veterinary Sciences* 5(1): 22-34.
- Shivley CB, Lombard JE, Urie NJ. 2018. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part II. Factors associated with colostrum quality and passive transfer status of dairy heifer calves. *J Dairy Sci* 101: 9168–9184.
- Siegrist CA. 2018. Vaccine Immunology. In: *Plotkin's Vaccines*. Elsevier. Hlm. 16-34. DOI: 10.1016/B978-0-323-35761-6.00002-X
- Smith JB, Mangkoewidjojo S. 1987. *The Care, Breeding, and Management of Experimental Animals for Research in the Tropics*. Canberra. International Development Program of Australian Universities and Colleges Limited (IDP). Hlm. 36-42.
- Spensieri F, Borgogni E, Zedda L, Bardelli M, Buricchi F, Volpini G, Fragapane E, Tavarini S, Finco O, Rappuoli R, Del Giudice G, Galli G, Castellino F. 2013. Human Circulating Influenza-CD4+ ICOS1+IL-21+ T Cells Expand After Vaccination, Exert Helper Function, and Predict Antibody Responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(35): 14330–14335.
- Stark A, Wellnitz O, Dechow C, Bruckmaier R, Baumrucker C. 2015. Colostrumgenesis during an Induced Lactation in Dairy Cattle. *J Anim Physiol Anim Nutr* 99(2): 356–366.
- Sudiono J. 2014. *Sistem Kekebalan Tubuh*. Jakarta. EGC. Hlm. 16-22.
- Tothova C, Nagy O, Kovac G. 2016. Serum Proteins and Their Diagnostic Utility in Veterinary Medicine: A review. *Veterinarni Medicina* 61(9): 475–496.
- [WHO] World Health Organization. 2019. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A (H5N1) reported to WHO. https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/5N1cumulativetab learchives/en/ [15 April 2020].
- Wong SSY, Yuen KY. 2006. Avian influenza virus Infections in Humans. *Chest* 129(1): 156-168.
- Zarrilli A, Micera E, Lacarpia N, Lombardi P, Pero ME, Pelagalli A, Angelo D, Mattia M, Avallone L. 2003. Evaluation of ewe colostrum quality by estimation of enzyme activity level. *Revue Med Vet* 154(8): 521-523.