

PRODUKSI KOLOSTRUM ANTIVIRUS AVIAN INFLUENZA DALAM RANGKA PENGENDALIAN INFEKSI VIRUS FLU BURUNG

A. Esfandiari¹⁾, I WT. Wibawan²⁾, S. Murtini²⁾, SD. Widhyari¹⁾, B. Febram¹⁾

ABSTRACT

PRODUCTION OF COLOSTRUM AGAINST AVIAN INFLUENZA VIRUS TO CONTROL BIRD FLU INFECTION

This experiment was conducted to study the prospect of bovine colostrum utilization to produce specific antibody as passive immunotherapy against avian influenza. Pregnant Frisian Holstein cows were injected with commercial killed *Avian Influenza* (AI) vaccine given double doses subcutaneously three times every two weeks. Prior to vaccination, the cows were given immunomodulator 0.1 mg.kg⁻¹ BW administered orally for three days. The animals then were injected by inactive H5N1 antigen without adjuvant intravenously to meet the dose of 10⁴ HAU. Blood samples were collected to detect anti AI antibody using *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* technique. Colostral samples were analysed to detect antibody against AI using *Haemagglutination Inhibition* technique. IgG stabilities were tested against enzyme, pH, and spray dried processing with inlet dan outlet temperature of 140°C and 52°C, respectively. The colostral IgG efficacy on neutralizing H5N1 virus activity was determined in vitro (by using Serum Neutralization Test and protective titer measurement) and in ovo (challenge test by using Embryonic Chicken Egg). The result indicated that serum antibody against H5N1 was detected one week after the second vaccination. Titer of colostral antibody against H5N1 was high (2⁸). Biological activity of colostral IgG remain stable at pH 5-7 and after spraying-drying processing, but decreased after treatment by trypsin and pepsin enzymes. The neutralization test showed that the fresh and spray dried colostral IgG against H5N1 were able to neutralize 10⁷ EID₅₀ AI virus H5N1 with neutralization index of 1.1 and 1.0, respectively. In conclusion, pregnant Frisian Holstein cows injected with commercial killed *Avian Influenza* (AI) vaccine were able to produce colostral IgG against AI H5N1.

Keywords: avian influenza, bovine colostrum, IgG, passive immunotherapy

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari prospek penggunaan kolostrum sapi sebagai pabrik bahan biologis untuk memproduksi antibodi spesifik terhadap *Avian Influenza* untuk kepentingan imunoterapi pasif kasus flu burung. Induk sapi Frisian Holstein bunting diinjeksi subkutan dengan vaksin *Avian Influenza* (AI) (*killed vaccine*) H5N1 komersial, 2 dosis per ekor sebanyak 3 kali, dengan jarak antarvaksinasi 2 minggu. Sebelum vaksinasi, induk sapi diberi imunomodulator 0,1 mg.kg⁻¹bb melalui oral selama 3 hari berturut-turut. Induk sapi kemudian diinjeksi intra-vena dengan antigen H5N1 inaktif tanpa adjuvan selama 3 hari berturut-turut dengan dosis 10⁴ HAU. Contoh darah dianalisis terhadap adanya antibodi anti-AI dengan teknik *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. Contoh kolostrum dianalisis terhadap adanya antibodi anti-AI dengan menggunakan

Haemagglutination Inhibition. Stabilitas IgG diuji terhadap pH, enzim, dan proses *spray dried* pada suhu inlet dan outlet 140–52°C. Uji efikasi IgG kolostrum dalam menetralkan aktivitas virus H5N1 dilakukan secara *in vitro* (menggunakan *Serum Neutralization Test* dan pengukuran titer protektif) dan *in-ovo* (dengan uji tantangan menggunakan embrio ayam dalam telur tertunas). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa antibodi anti AI mulai terdeteksi di dalam darah 1 minggu setelah vaksinasi kedua. Titer antibodi anti-AI di dalam kolostrum cukup tinggi, yaitu 2⁸. Aktivitas biologis IgG anti AI tetap stabil pada pH 5–7 dan setelah prosesing *spray dried*, namun demikian menurun setelah perlakuan dengan pepsin dan tripsin. IgG anti AI di dalam kolostrum segar dan *spray dried* memiliki indeks netralisasi (IN) terhadap virus H5N1 masing-masing sebesar 1,1 dan 1,0. IgG anti AI H5N1 di dalam kolostrum mampu menetralkan virus H5N1 dengan sempurna (100%) pada titer 2⁷. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa induk sapi bunting mampu memproduksi IgG anti AI H5N1 di dalam kolostrum.

Kata kunci: flu burung, IgG, kolostrum sapi

¹⁾ Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, FKH IPB. Kampus IPB Darmaga Bogor

²⁾ Departemen Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH IPB. Kampus IPB Darmaga Bogor

E-mail: esfandiari_anita@gmail.com

PENDAHULUAN

Penyakit flu burung sangat merugikan dunia peternakan, khususnya peternakan unggas, yang menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar berupa kematian ayam yang tinggi. Di samping itu, flu burung juga merupakan penyakit zoonosis yang sangat ditakuti karena bisa ditularkan dari unggas ke manusia, dan menyebabkan terjadinya kematian pada manusia. Penyakit ini telah menyebar di dunia, termasuk Indonesia.

Selain menimbulkan korban manusia, flu burung berpotensi menyebabkan kematian manusia dalam jumlah besar atau pandemi. Sejak muncul pertama kali penyakit flu burung pada manusia di Indonesia pada bulan Juli 2005 (Departemen Kesehatan RI 2007) sampai dengan Agu 2008, data WHO menunjukkan bahwa kasus *Avian Influenza* (AI) pada manusia di Indonesia telah mencapai 137 orang dengan 113 orang di antaranya meninggal dunia (WHO 2008). Hal ini menempatkan Indonesia sebagai negara dengan jumlah korban meninggal akibat flu burung terbanyak di dunia.

Hingga saat ini pengebalan secara aktif terhadap penyakit flu burung belum mungkin dilakukan karena vaksin AI untuk manusia masih belum tersedia. Di samping itu, penggunaan obat-obatan (seperti Tamiflu) memiliki banyak kelemahan, karena menimbulkan resistensi dan juga hanya bekerja pada awal infeksi saja (hingga 48 jam pasca infeksi). Oleh karena itu, pendekatan melalui imunisasi pasif bisa dijadikan alternatif jalan keluar yang cukup menjanjikan dalam penanggulangan penyakit flu burung.

Kolostrum merupakan hasil sekresi kelenjar ambing induk yang terkumpul selama beberapa minggu terakhir masa kebuntingan hingga beberapa saat setelah melahirkan, dan disekresikan segera sesudah melahirkan (Mellor 1990; Waterman 1998). Kolostrum mulai diproduksi pada sekitar 3–6 minggu sebelum melahirkan Lazzaro *et al.* (2000), disimpan oleh kelenjar ambing selama sekitar 2–7 hari terakhir masa kebuntingan, dan disekresikan sekitar 2–3 hari pertama setelah melahirkan (Ruckebusch 1991).

Selain kaya nutrisi, kolostrum mengandung komponen bioaktif dalam jumlah besar, di antaranya imunoglobulin (Lona, Romero 2001; Xu 1996 diacu dalam Elfstrand *et al.* 2002). Imunoglobulin utama yang terkandung di dalam kolostrum sapi adalah imunoglobulin gamma (IgG) (Larson *et al.* 1980; Waterman, 1998). Oleh karena itu, kolostrum merupakan sumber IgG yang sangat bermanfaat (Ruckebusch 1991).

Esfandiari dkk (2004) melaporkan bahwa selain untuk pengebalan pasif anak yang dilahirkan, kolostrum sapi dapat juga digunakan untuk kepentingan pengebalan pasif neonatus lintas spesies, yaitu dari sapi ke anak kambing tanpa mempengaruhi kinerja kesehatan anak kambing tersebut. Laporan Esfandiari dkk (2003) menunjukkan pula bahwa terdapat sejumlah kolostrum yang dihasilkan induk sapi setelah partus yang belum dimanfaatkan. Apabila rata-rata setiap ekor induk sapi perah menghasilkan sekitar 6-8l kolostrum pada hari pertama setelah melahirkan, dan hanya

sekitar 4–5l per hari yang dikonsumsi anak neonatus, maka terdapat sekurang-kurangnya 2–3l kolostrum per ekor sapi induk pada hari pertama yang terbuang.

Namun, terdapat sisi lain potensi kolostrum sapi perah yang belum banyak diungkap kepada masyarakat, yakni tentang peluang penggunaan kolostrum sapi sebagai pabrik bahan biologis yang dapat digunakan untuk memproduksi zat kebal (antibodi) terhadap berbagai macam penyakit untuk kepentingan hewan maupun manusia. Keterpaparan induk sapi terhadap antigen akan menyebabkan di-produksinya antibodi spesifik oleh induk yang akan di-transfer dari darah induk menuju kolostrum di dalam kelenjar ambing.

Pemanfaatan kolostrum sebagai pabrik biologis antibodi (IgG) sangat mungkin dilakukan karena zat kebal terhadap berbagai penyakit yang terdapat di dalam darah induk mudah ditransfer secara efektif ke dalam kolostrum dengan konsentrasi yang sangat tinggi. Di samping itu, proses pengebalan induk sapi bunting mudah dilakukan. Imunoglobulin G (IgG) dapat diperoleh dari kolostrum tanpa harus menyakiti hewannya dengan jumlah antibodi yang dihasilkan cukup tinggi, terutama kolostrum hasil pemerahan pertama. Hasil penelitian Esfandiari *et al.* (2003) menunjukkan bahwa konsentrasi IgG total hasil pemerahan pertama cukup tinggi, dengan konsentrasi sebesar $25,75 \pm 3,13 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Induksi pengebalan secara pasif melalui pemberian kolostrum yang mengandung IgG terhadap AI diharapkan akan membentuk antibodi spesifik terhadap AI. Antibodi ini diharapkan mampu menghambat terjadinya perlekatan virus AI pada permukaan sel inang. Adanya antibodi ini dapat pula berfungsi sebagai opsonin sehingga virus AI mudah ditelan dan dihancurkan. Selanjutnya, antibodi spesifik terhadap AI dapat mengikat virus yang beredar di dalam darah dan mengendapkannya (netralisasi).

Zat kebal terhadap berbagai penyakit, yang ada di dalam darah induk sapi bunting dapat ditransfer secara efektif ke dalam kolostrum. Induksi pengebalan secara pasif melalui pemberian kolostrum yang mengandung IgG terhadap flu burung diharapkan akan membentuk antibodi spesifik terhadap flu burung. Tujuan dari penelitian ini adalah memproduksi kolostrum dengan kandungan IgG yang berkhasiat terhadap Flu Burung.

BAHAN DAN METODE

Induk Sapi FH Bunting dan Vaksinasi

Beberapa ekor Induk sapi bunting digunakan sebagai sumber kolostrum hiperimun pada penelitian ini. Induk sapi bunting dipilih yang sehat secara klinis, berada pada laktasi ke-2 sampai 3, dan berada dalam masa kering kandang. Induk sapi berasal dari peternakan rakyat di Kawasan Usaha Peternakan Sapi Perah/KUNAK, Cibungbulang Bogor (Gambar 1).



Gambar 1 Induk Sapi Bunting Contoh

Vaksin yang digunakan untuk memproduksi antibodi anti-AI di dalam kolostrum adalah vaksin Avian Influenza (AI) mati (*killed vaccine*) H5N1 komersial. Tiga hari sebelum vaksinasi pertama, induk sapi diberi imunomodulator selama 3 (tiga) hari berturut-turut melalui oral dengan dosis $0,1 \text{ ml.kgbb}^{-1}$. Setelah itu, induk sapi disuntik intra-vena dengan antigen (Ag) H5N1 in-aktif tanpa adjuvant selama 3 (tiga) hari berturut-turut dengan dosis 10^4 HAU. Kemudian induk sapi divaksin menggunakan vaksin AI H5N1 komersial sebanyak 2 dosis per ekor secara subkutan. Vaksinasi diberikan sebanyak 3 (tiga) kali, masing-masing dengan interval waktu 2 (dua) minggu.

Koleksi Contoh Darah Induk Sapi

Contoh darah induk sapi diambil melalui vena jugularis menggunakan *venoject* tanpa antikoagulan untuk memperoleh serum. Pengambilan contoh darah dilakukan setiap minggu, dimulai pada saat sebelum vaksinasi pertama, dan selanjutnya setiap minggu sampai induk sapi melahirkan.

Koleksi dan Preparasi Kolostrum

Kolostrum dikoleksi segera setelah induk sapi melahirkan sampai 3 hari post-partus. Koleksi kolostrum selanjutnya dilakukan pada 7, 14, dan 21 hari sesudah induk sapi melahirkan. Contoh dimasukkan ke dalam beberapa kemasan kantung plastik, diberi label, dan selanjutnya disimpan di dalam *freezer* pada suhu -20°C sampai analisis dilakukan. Contoh kolostrum selanjutnya dipreparasi menggunakan metode Zarrilli *et al.* (2003), untuk dianalisis terhadap konsentrasi IgG anti AI H5N1 dan analisis yang lainnya.

Penentuan Titer Antibodi di dalam Darah Induk dan Kolostrum

Adanya antibodi anti AI H5N1 di dalam serum ditentukan menggunakan teknik *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) metode tidak langsung,

Sedangkan antibodi anti AI H5N1 di dalam kolostrum dideteksi menggunakan teknik *haemagglutination inhibition* (HI).

Pengujian Aktivitas Biologis IgG

Pengujian terhadap aktivitas biologis IgG meliputi pengaruh pH, dan stabilitas terhadap enzim pencernaan (pepsin dan tripsin). Uji terhadap pengaruh pH menggunakan metode Quigley *et al.* (2000). Uji stabilitas IgG terhadap enzim tripsin dan pepsin menggunakan metode Wibawan (1993). Uji stabilitas IgG terhadap pengaruh proses pengeringan menggunakan mini *Spray Dryer* merek Buchi tipe B-190, dengan kombinasi suhu inlet dan outlet $140-52^\circ\text{C}$.

Uji Efikasi IgG anti AI H5N1

Pengujian dilakukan secara *in vitro* dan *in ovo*. Pengujian secara *in vitro* dilakukan menggunakan metode *Serum Neutralization Test* (SNT) dan pengukuran titer protektif, sedangkan pengujian secara *in ovo* dilakukan menggunakan telur embrio tertunas (TET). Telur tertunas diinokulasi dengan IgG anti AI H5N1 dengan berbagai tingkat titer antibodi, kemudian masing-masing ditantang dengan virus AI H5N1 dengan dosis EID_{50} . Efikasi IgG ditentukan dengan pengamatan terhadap jumlah embrio yang bertahan hidup setelah penantangan (*challenge*). Sebagai kontrol, digunakan TET tanpa IgG. Nilai EID_{50} dihitung menggunakan metode Reed dan Muench (Mohd *et al.* 2008). Endpoint 50% dari netralisasi dihitung dengan metode Reed dan Muench (2008). Indeks netralisasi merupakan perhitungan dari nilai endpoint (Swayne *et al.* 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi Antibodi Anti Avian Influenza di dalam Serum Darah Induk Menggunakan Teknik ELISA

Penentuan batas nilai negatif dan positif adanya antibodi didasarkan pada *cut off value*. Contoh serum yang memiliki nilai absorbansi/kepadatan optik (*optical density*=OD) yang lebih dari penambahan rata-rata nilai OD kontrol negatif dengan $3 \times \text{SD}$ (standar deviasi), menandakan adanya antibodi terhadap H5N1 di dalam contoh (nilai positif). Nilai $\text{OD} \times 3\text{SD}$ dari induk sapi yang digunakan sebagai standar *cut off value* adalah 0,897. Oleh karena itu, contoh darah induk sapi yang memiliki nilai kepadatan optik/*optical density* (OD) yang lebih dari 0,897, dinyatakan positif mengandung antibodi terhadap H5N1.

Tabel 1 memperlihatkan bahwa antibodi anti AI H5N1 dapat dideteksi pada 1 minggu setelah vaksinasi ke-2. Pada minggu kedua setelah vaksinasi ke-2 dan setelah vaksinasi ke-3, antibodi anti AI tidak terdeteksi lagi. Tabel 1 menunjukkan pula bahwa induk sapi kontrol tidak memiliki

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan ELISA Terhadap Serum Induk Sapi

Minggu ke-	Kontrol		Perlakuan	
	OD	Hasil	OD	Hasil
0	0,880	Negatif	0,880	Negatif ^{*)}
1	0,806	Negatif	0,708	Negatif
2	-	-	0,786	Negatif ^{**)}
3	0,859	Negatif	0,935	Positif
4	0,758	Negatif	0,638	Negatif ^{***)}
5	0,803	Negatif	0,694	Negatif
6	-	-	0,627	Negatif
7	0,584	Negatif	0,780	Negatif
8	0,705	Negatif	0,550	Negatif
9	0,696	Negatif	0,796	Negatif
10	-	-	0,702	Negatif

Keterangan: ^{*)} Vaksinasi pertama

^{**)} Vaksinasi kedua

antibodi spesifik terhadap H5N1, sedangkan pada induk sapi perlakuan terbentuk respon humoral yang berasal dari vaksinasi. Fenner *et al.* (1995), Tizard (2005) melaporkan bahwa pada saat hewan terpapar oleh suatu protein asing, tubuh hewan akan merespons melalui respons kekebalan seluler dan humoral. Sel sistem kekebalan yang diperantarai oleh sel (limfosit T) memberikan respon dengan mengaktifkan berbagai macam limfosit T dan menghasilkan serta melepaskan berbagai macam limfokin. Selain itu, sel sistem kekebalan humoral (limfosit B) memberikan respon terhadap rangsangan antigenik dengan jalan menghasilkan imunoglobulin khusus yang dikenal dengan antibodi. Antibodi tersebut akan dilepas ke dalam darah dan cairan tubuh lainnya.

Antigen pada vaksin inaktif bersifat eksogenus. Antigen jenis ini akan berikatan dengan molekul MHC kelas II sehingga dikenali oleh sel *T-helper*. Respons ini bukanlah respons yang paling tepat terhadap organisme, akan tetapi respons ini lebih aman bagi hewan jika dibandingkan dengan respons yang ditimbulkan oleh vaksin aktif. Selain itu, adanya respons yang didominasi oleh sel *T-helper* ini akan menginduksi pengeluaran sitokin atau interleukin yang merupakan alat komunikasi antarsel sehingga akan menginduksi pematangan sel limfosit B menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi (Wibawan *et al.* 2003; Tizard 2005). Oleh karena itu, antibodi spesifik terhadap H5N1 dapat terbentuk karena sifat antigen yang terdapat di dalam vaksin tersebut.

Antibodi yang secara umum akan meningkat setelah terjadinya paparan oleh antigen adalah IgM dan IgG. IgM akan terbentuk sebagai respons paling awal, dan selanjutnya akan turun dengan cepat. Sementara itu, IgG akan terus-menerus meningkat hingga level maksimum dalam periode yang relatif lebih lama (Roitt 1972). Teori ini didukung pula oleh Butler (1970) dan Harlow, Lane (1988) bahwa serum dari injeksi primer mengandung banyak sekali IgM, sedangkan serum dari hiperimunisasi paling banyak

mengandung IgG. IgG pada sapi ditemukan di dalam serum, kolostrum, dan susu (Butler 1970). Konjugat yang digunakan pada uji ELISA bersifat antigenik terhadap IgG sapi sehingga konjugat ini hanya akan berikatan dengan IgG sapi. Pada masing-masing sumur hanya terdapat IgG yang spesifik terhadap H5N1 sehingga pada uji ELISA ini yang terdeteksi hanyalah IgG yang spesifik terhadap H5N1.

Kekurangan dari vaksinasi menggunakan vaksin inaktif adalah tidak munculnya respon kekebalan seketika (memerlukan waktu lebih lama), namun respons kekebalan yang timbul bersifat lebih lama dan mampu distimulasi ulang. Hewan yang terpapar agen yang sama ataupun mengalami imunisasi ulang akan membentuk respons kekebalan sekunder. Pada respons ini, konsentrasi antibodi yang terbentuk lebih tinggi dibandingkan dengan sebelumnya. Hal ini disebabkan karena kemampuan sistem pembentukan antibodi dalam tubuh untuk "mengingat" paparan antigen sebelumnya (Tizard 2005).

Antibodi mulai terdeteksi di dalam darah satu minggu setelah pemberian vaksinasi kedua. Hal ini menunjukkan bahwa vaksinasi kedua mampu meningkatkan konsentrasi antibodi di dalam darah sehingga dapat dideteksi melalui pemeriksaan dengan ELISA.

Antibodi anti-AI sudah tidak terdeteksi lagi pada minggu kedua setelah vaksinasi kedua dan ketiga. Pada minggu kedua setelah vaksinasi kedua, induk sapi perlakuan memasuki minggu ke-6 pre-partus. Menurut Smith *et al.* (1971), pada minggu ke-4 hingga ke-6 pre-partus, terjadi transpor selektif IgG1 dari serum ke dalam sekresi lakteal sapi, sehingga konsentrasi antibodi anti H5N1 pada serum menurun dan tidak terdeteksi dengan uji ELISA.

Adanya mobilisasi IgG dari serum menuju kolostrum telah dibuktikan oleh beberapa penelitian. Hasil deteksi antibodi menunjukkan keberadaan antibodi pada serum yang mulai menurun beberapa saat menjelang induk sapi partus. Penelitian tersebut juga melaporkan bahwa antibodi

Tabel 2 Titer Antibodi Kolostrum Sapi yang Divaksin dengan Vaksin AI (*killed vaccine*) H5N1

Contoh		Titer Antibodi (x log 2)	
Hari ke-	Kolostrum ke-	Sapi kontrol	Sapi vaksinasi
1	1	0	8
	2	0	8
2	3	0	7
	4	*	7
3	5	0	6
	6	0	6
4	7	0	5
	8	0	6
5	9	0	6
	10	0	7
6	11	*	5
	12	0	6
7 (minggu ke-1)	13	0	6
14 (minggu ke-2)	27	*	0
21 (minggu ke-3)	41	*	0

yang sama berada di dalam sekresi lakteal induk sapi sesaat sebelum partus, dan di dalam kolostrum induk sapi setelah partus hingga beberapa minggu setelah partus (Snodgrass *et al.* 1982; Brüssow 1987; Hogan *et al.* 1992).

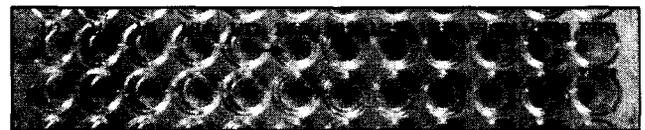
Imunoglobulin dengan konsentrasi terbanyak di dalam kolostrum adalah IgG1 (Butler 1970). Mobilisasi IgG1 dari serum induk ke dalam kelenjar mamaria berkaitan dengan meningkatnya konsentrasi estrogen pre-partus. Perubahan aktivitas hormon, yaitu peningkatan estrogen, kortikosteroid, *growth hormone*, prolaktin, dan progesteron pada akhir kebuntingan terjadi pada waktu yang bersamaan dengan transfer IgG1 ke dalam kelenjar mamaria (Barrington *et al.* 2001). Menurut Smith *et al.* (1971), peningkatan konsentrasi estrogen yang terjadi pada akhir kebuntingan berpengaruh dalam menginduksi mobilisasi IgG1 ke dalam kelenjar mamaria.

Barrington *et al.* (2001) melaporkan bahwa, IgG1 dalam serum banyak dimobilisasi ke dalam kolostrum pada akhir kebuntingan (46 minggu pre-partus). Diduga hal ini yang menyebabkan antibodi terhadap H5N1 sudah tidak terdeteksi lagi di dalam darah, baik pada 2 minggu setelah vaksinasi kedua maupun ketiga.

Deteksi Antibodi (IgG) Anti Avian Influenza di dalam Kolostrum Menggunakan Teknik HI

Hasil uji HI dengan virus standar 4 HAU terhadap contoh kolostrum sapi bisa dilihat pada Tabel 2. Tampak bahwa titer antibodi anti-AI di dalam kolostrum mengalami penurunan seiring dengan makin bertambahnya waktu pemerahan. Interpretasi hasil titer HI ditunjukkan pada pengenceran tertinggi yang masih memberikan hambatan (inhibisi) pada antigen 4 HAU yang dinyatakan sebagai *end point*. Inhibisi ditetapkan dengan melakukan pengamatan terhadap sel darah merah yang membentuk tetapan air mata serupa dengan sel darah merah kontrol.

Hasil dinyatakan positif memiliki antibodi terhadap AI apabila terjadi hambatan aglutinasi RBC dengan virus standar (4 HAU) pada pengenceran lebih dari atau sama dengan 1/16 atau titer HI sebesar 4 log 2 atau 2⁴. Sementara itu, hasil dinyatakan negatif apabila tidak terjadi hambatan aglutinasi RBC oleh virus standar atau terjadi hambatan aglutinasi RBC, namun hanya sampai pengenceran 1/8 atau kurang dari 1/16 (OIE 2004). Contoh uji HI contoh kolostrum yang menunjukkan hasil positif dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Positif Uji HI dengan Titer Antibodi 6 log 2 (2⁶) pada Baris A dan 7 Log 2 (2⁷) pada Baris B.

Uji HI merupakan uji yang mampu mendeteksi adanya antibodi terhadap hemagglutinin pada virus influenza karena bagian antigen virus ini mampu mengaglutinasi sel darah merah. Uji HI yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan virus standar H5N1 (4 HAU) sehingga uji tersebut spesifik untuk mendeteksi keberadaan antibodi terhadap antigen H5. Berdasarkan hal tersebut, keberadaan antibodi terhadap antigen H5 dari virus avian influenza (AI) sub tipe H5N1 terdeteksi pada contoh kolostrum sapi yang divaksinasi dengan vaksin AI inaktif H5N1. Hasil uji HI dengan virus standar 4 HAU terhadap contoh kolostrum sapi perlakuan ditunjukkan pada Tabel 3.

Saat virus menginfeksi tubuh hewan, protein pada virion yang berperan sebagai antigen akan memicu munculnya respons kekebalan (Tizard 2005). Induksi kekebalan baik oleh vaksin homolog maupun heterolog akan membentuk antibodi spesifik terhadap H5. Antibodi

Tabel 3. Titer Antibodi dari Contoh Kolostrum Sapi yang Divaksinasi dengan H5N1

Hari ke-	Contoh Kolostrum ke-	Titer Antibodi (x log 2)	
		Sapi kontrol	Sapi vaksinasi
1	1	0	8
	2	0	8
2	3	0	7
	4	*	7
3	5	0	6
	6	0	6
4	7	0	5
	8	0	6
5	9	0	6
	10	0	7
6	11	*	5
	12	0	6
7 (minggu ke-1)	13	0	6
14 (minggu ke-2)	27	*	0
21 (minggu ke-3)	41	*	0

ini diharapkan mampu menghambat terjadinya perlekatan virus AI pada permukaan sel inang. Selain itu, adanya antibodi ini dapat berfungsi pula sebagai opsonin sehingga virus AI mudah ditelan, dihancurkan, dan dipresentasikan oleh sel makrofag dan mikrofas (*Antigen Presenting Cell* [APC]). Selanjutnya, antibodi spesifik terhadap H5 dapat mengikat virus yang beredar di dalam darah dan mengendapkannya (netralisasi) (Wibawan *et al.* 2005).

Secara imunologis dan kimiawi, IgG1 di dalam serum identik dengan IgG1 yang terdapat di dalam kolostrum dan susu (Butler 1970). Pada penelitian ini, keberadaan antibodi anti H5N1 yang terdeteksi, baik di dalam kolostrum maupun serum, menunjukkan asal antibodi yang sama. Antibodi yang terdapat dalam kolostrum berasal dari sirkulasi darah induk melalui proses transfer imunoglobulin sebelum kelahiran. Menurut Barrington *et al.* (2001), proses transfer imunoglobulin sebelum kelahiran dari sirkulasi darah induk ke dalam sekresi mamaria disebut dengan kolostrogenesis. Brandon *et al.* (1971) melaporkan bahwa lebih dari 500 gram per minggu IgG ditransfer selama proses kolostrogenesis. Menurut Larson *et al.* (1980), proses ini dimanifestasikan melalui konsentrasi IgG1 serum yang menurun drastis beberapa minggu menjelang kelahiran dan mencapai angka minimum pada saat kelahiran.

Kolostrogenesis merupakan tahap perkembangan kelenjar mamaria yang sangat penting. Salah satu pengatur terjadinya proses kolostrogenesis adalah hormon. Pada umur kebuntingan trimester akhir, bertepatan dengan transfer IgG1 ke dalam kelenjar mamaria, terjadi beberapa perubahan aktivitas hormonal. Perubahan hormonal tersebut mencakup peningkatan level estrogen satu bulan sebelum kelahiran; peningkatan kortikosteroid, *growth hormone* (GH), dan prolaktin dalam serum satu minggu sebelum kelahiran; serta penurunan tajam progesteron dalam serum 1-2 hari menjelang kelahiran (Barrington *et al.* 2001). Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa secara

langsung maupun tidak langsung perubahan level estrogen dan progesteron 4-6 minggu sebelum kelahiran mempengaruhi transpor selektif IgG1 ke dalam sekresi kelenjar mamaria (Smith *et al.* 1971).

Menurut Larson *et al.* (1980), transfer spesifik IgG1 ke dalam kolostrum dipengaruhi oleh dua faktor. Pertama, keberadaan dan posisi reseptor spesifik terhadap IgG1 di membran basal plasma pada sel-sel sekretori kelenjar mamaria untuk menangkap IgG1 dari cairan ekstraselular. Kedua, kemampuan sel epitelial untuk melakukan endositosis IgG1 dan mengirimkannya ke dalam sekresi luminal.

Titer antibodi anti-H5N1 tertinggi diperoleh dari kolostrum hasil pemerahan pertama dan kedua (Tabel 3), yaitu sebesar 8 log 2 (2^8). Hal ini sesuai dengan laporan Stott *et al.* (1983); Esfandiari (2005) bahwa konsentrasi IgG tertinggi terdapat di dalam kolostrum hasil pemerahan pertama. Esfandiari (2005) melaporkan bahwa cadangan kolostrum yang terkumpul dari proses kolostrogenesis sebelum kelahiran akan dikeluarkan melalui mekanisme laktasi sebesar-besarnya pada pemerahan pertama (Esfandiari 2005).

Titer antibodi terus mengalami penurunan dengan titer terendah sebesar 5 log 2 pada kolostrum hasil pemerahan ke-7 dan ke-11. Ditinjau dari aspek produksi susu induk, penurunan konsentrasi IgG diduga disebabkan oleh adanya peningkatan produksi kolostrum setelah pemerahan pertama. Peningkatan volume tersebut akan mempengaruhi konsentrasi IgG yang terkandung dalam kolostrum karena adanya 'pengenceran' (Esfandiari 2005).

Keberadaan antibodi tidak terdeteksi lagi pada kolostrum hasil pemerahan minggu ke-2 dan ke-3. Hal ini disebabkan karena proses transfer imunoglobulin dari serum induk telah terhenti. Menurut Larson *et al.* (1980), beberapa minggu setelah kelahiran, jumlah IgG1 di dalam serum kembali normal karena proses pentransferan IgG1 ke dalam kolostrum menjadi terhenti. Terhentinya proses

kolostrogenesis terjadi sebelum atau tepat saat mulai onset laktasi. Oleh karena itu, kemungkinan besar pengaturan terhadap berhentinya proses kolostrogenesis dilakukan oleh hormon yang juga mempengaruhi terjadinya laktogenesis (Barrington 2001).

Laporan Winger *et al.* (1995) menunjukkan bahwa pemberian glukokortikoid mengakibatkan penurunan tajam konsentrasi IgG1 dalam sekresi kelenjar mamaria. Hal ini sejalan dengan fakta bahwa glukokortikoid memegang peranan penting dalam memacu terjadinya laktogenesis. Hasil ini dapat dihubungkan dengan kemungkinan peranan peningkatan konsentrasi glukokortikoid setelah kelahiran dalam proses penghentian kolostrogenesis.

Penelitian lebih lanjut melaporkan bahwa sebagai hormon yang berperan positif dalam laktogenesis, prolaktin secara nyata menurunkan jumlah reseptor IgG1 pada kelenjar mamaria. Reseptor spesifik (*Fc-specific receptor*) IgG1 yang berada di permukaan basolateral sel epitel alveolar selama masa kolostrogenesis akan menghilang pada saat laktogenesis dimulai (Barrington *et al.* 2001). Keberadaan reseptor IgG1 tersebut penting dalam proses transfer antibodi ke dalam kelenjar mamaria.

Vaksinasi pada sapi pada masa kering kandang (umur kebuntingan lebih dari 6 bulan) menggunakan vaksin AI inaktif H5N1 dalam rangkaian penelitian ini terbukti mampu menginduksi respons kekebalan humoral. Hal ini memperlihatkan kolostrum sapi berpotensi sebagai sumber penghasil antibodi spesifik terhadap H5N1 yang dapat digunakan sebagai alternatif untuk keperluan imunisasi pasif pada manusia.

Pada penelitian ini, antibodi spesifik terhadap virus AI H5N1 sudah tidak terdeteksi lagi di dalam "kolostrum"/susu yang diperah 2 dan 3 (tiga) minggu setelah induk sapi melahirkan. Hal ini ditunjukkan dengan titer antibodi anti AI di dalam kolostrum yang sudah nol pada pemerahan 2 dan 3 minggu setelah induk sapi melahirkan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa induk sapi

bunting yang divaksinasi dengan vaksin in-aktif H5N1 mampu menghasilkan antibodi spesifik terhadap AI baik di dalam serum darah induk maupun di dalam kolostrumnya. Keberadaan antibodi spesifik terhadap AI di dalam kolostrum menunjukkan bahwa sapi mampu mentransfer antibodi dari sirkulasi darah menuju ke dalam kolostrum di kelenjar ambing. Keberadaan antibodi spesifik terhadap virus AI di dalam kolostrum menunjukkan bahwa kolostrum mempunyai potensi atau prospek sebagai pabrik biologis untuk memproduksi antibodi AI sebagai bahan biologis untuk kepentingan imunoterapi pasif dalam rangka pengendalian penyakit flu burung. Kolostrum sapi berpeluang untuk dimanfaatkan sebagai pabrik biologis untuk memproduksi bahan biologis penting yang bersifat massal, baik untuk kepentingan manusia maupun hewan.

Stabilitas IgG anti-AI H5N1 terhadap Pengaruh pH, Enzim, dan Proses Pengeringan Menggunakan *Spray Dryer*

Stabilitas IgG anti-AI terhadap pengaruh fisik, kimia, dan lingkungan diamati melalui aktivitas biologis IgG anti-AI setelah perlakuan pH, enzim pencernaan (tripsin dan pepsin), dan proses pengeringan. Hasil pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas biologis IgG anti-AI dapat dilihat pada Tabel 4. Semua contoh kolostrum (kolostrum *crude* dan kolostrum *spray-dried*), memperlihatkan titer antibodi yang sama pada perlakuan pH netral (pH 7), yaitu sebesar 2^{11} . Titer antibodi anti-AI masih memperlihatkan titer yang tetap tinggi ketika diberi perlakuan pada pH 5, yaitu sebesar 2^{11} .

Nilai IgG kolostrum stabil pada pH 5–7, namun demikian titer antibodi kolostrum mengalami penurunan (dari 2^{11} menjadi 2^1 - 2^2) ketika kolostrum (kolostrum *crude* dan kolostrum *spray-dried*) dipaparkan dengan enzim pencernaan tripsin dan pepsin. Whitaker (1994) melaporkan bahwa setelah inkubasi pada pH 2 dan suhu 37°C , enzim pepsin akan memulai aktivitasnya menghidrolisis ikatan

Tabel 4. Titer Antibodi Anti AI di dalam Kolostrum Sapi Setelah Diinkubasi pada pH 5, pH 7, dan Perlakuan dengan Enzim Tripsin dan Pepsin.

Contoh Kolostrum	Perlakuan			
	pH 7	pH 5	Tripsin	Pepsin
Col 1 Sp 4 (1)	2^{11}	2^{11}	2^3	2^2
Col 1 Sp 4 (2)	2^{11}	2^{11}	2^2	2^2
Col 1 KdKi2 (1)	2^{11}	2^{11}	2^1	2^1
Col 1 KdKi2 (2)	2^{11}	2^{11}	2^1	2^2
Sp4 AI Col 1 (1)	2^{11}	2^{11}	2^2	2^2
Sp4 AI Col 1 (2)	2^{11}	2^{11}	2^2	2^2
<i>Spray dried</i> (1)	2^{11}	2^{11}	2^2	2^1
<i>Spray dried</i> (2)	2^{11}	2^{11}	2^1	2^1

peptida menjadi asam amino. Enzim pepsin merupakan endopeptidase yang bersifat ekstensif, tetapi di dalam lambung tidak menghidrolisis protein secara keseluruhan. Sehubungan dengan hal tersebut, hasil ini dapat digunakan sebagai acuan untuk keperluan enkapsulasi pada saat proses pemurnian. Menurut Hatta *et al.* (1993), penurunan aktivitas imunoglobulin diduga karena pengaruh ganda dari pH yang sangat rendah (pH 2) dan enzim pepsin

Hasil perlakuan dengan enzim tripsin ini berbeda dari laporan Carlender (2002), yaitu IgG tidak mengalami perubahan aktivitas setelah perlakuan dengan enzim tripsin. IgG memiliki struktur molekul yang lebih stabil dibandingkan dengan IgY, demikian juga fleksibilitas regio hinganya lebih baik sehingga mampu mempertahankan stabilitas molekulnya akibat pengaruh enzim tripsin. Enzim tripsin merupakan endopeptidase yang memecah ikatan peptida protein dengan cara menghidrolisis daerah karboksil dari lisin dan arginin.

Perlu dipikirkan proteksi IgG terhadap pencernaan lambung apabila pemberian diberikan secara oral. Menurut Chang *et al.* (1999), pemakaian gum arabik sangat baik untuk proteksi IgG terhadap enzim protease.

Contoh kolostrum *spray dried* yang mengalami proses pengeringan menjadi bentuk bubuk menggunakan mini *spray dryer* merek Buchi tipe B-190 dengan kombinasi suhu *inlet* dan *outlet* 140–52°C, tetap memperlihatkan titer antibodi yang tinggi, yaitu 2^{11} . Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas biologis IgG anti-AI tetap stabil setelah pemrosesan *spray-dried* pada suhu tersebut. Esfandiari (2003) melaporkan bahwa proses pengeringan kolostrum menggunakan *spray dryer* dengan kombinasi suhu *inlet* dan *outlet* 140–52°C tidak mempengaruhi konsentrasi IgG total di dalam kolostrum.

Perubahan komponen susu yang terjadi akibat keterpaparan dengan panas selama proses pengeringan sangat bervariasi, bergantung pada desain pengering, kondisi pada saat mengoperasikan alat, dan lamanya waktu proses pengeringan. Selama proses *spray drying*, meningkatnya proses denaturasi dan agregasi protein di antaranya bergantung pada suhu udara masuk (*inlet air temperature*) dan suhu keluar (*outlet air temperature*). Suhu keluar (*outlet air temperature*) merupakan parameter yang sangat menentukan untuk mengontrol panas yang bisa merusakkan produk akhir bahan akibat panas. Selain itu, proses pengeringan biasanya berlangsung sangat cepat dan suhu bahan tidak lebih dari 70°C (Singh 1991). Pada kondisi *spray drying* yang normal, denaturasi *whey* protein relative dapat diabaikan, dan sebagian besar enzim tetap aktif (Walstra dan Jenness 1984).

Aktivitas biologis antibodi anti-AI H5N1 di dalam kolostrum *spray-dried* mengalami penurunan setelah diberi

perlakuan dengan enzim tripsin dan pepsin, dengan titer antibodi berkisar antara 2^1 – 2^2 . Menurut Mathews *et al.* (2000), denaturasi protein adalah keadaan di mana protein kehilangan konformasi alamiahnya. Denaturasi terjadi apabila nilai pH terlalu ekstrim atau pada temperatur yang tinggi. Hatta *et al.* (1993) melaporkan bahwa temperatur maksimum untuk denaturasi IgG kelinci adalah 77°C.

Stabilitas molekul IgG dapat dipengaruhi oleh berbagai perubahan fisik maupun kimia seperti suhu, asam, dan enzim pencernaan. Stabilitas IgG menjadi sangat penting apabila akan digunakan untuk terapi imunisasi pasif yang diberikan secara oral. Stabilitas IgG anti AI perlu dipertahankan selama proses penyimpanan, prosesing (*spray-dried* atau *freeze-dried*). Terapi imunisasi pasif yang aplikasi pemberiannya secara oral memerlukan banyak pertimbangan.

Uji Netralisasi Virus

Uji netralisasi virus merupakan uji untuk identifikasi antigen/antibodi dan merupakan uji untuk melihat kemampuan netralisasi antibodi (Ab) terhadap antigen (Ag). Antibodi, meskipun memiliki titer antibodi yang tinggi menjadi tidak bermanfaat apabila tidak mampu menetralkan antigen (virus). Kemampuan netralisasi IgG anti-AI kolostrum diamati dari TAB yang bertahan hidup sebanyak 100% pada setiap kelompok perlakuan. Perhitungan titer endpoint 50% dari virus AI H5N1 hasil propagasi pada Telur Ayam Berembrio (TAB) (n=5 butir) disajikan pada Tabel 5.

Hasil uji netralisasi pada Tabel 5 dan Tabel 6 menunjukkan Indeks Netralisasi Antibodi anti AI H5N1 dalam kolostrum *crude* dan kolostrum *spray dried* terhadap virus H5N1, masing-masing adalah 1.1 dan 1.0. Berdasarkan hasil uji netralisasi terlihat bahwa antibodi anti-H5 yang diproduksi memiliki kemampuan menetralkan virus uji. Antibodi anti-H5 mampu menetralkan 50% virus dengan titer 10^4 EID₅₀ pada pengenceran 1:20. Antibodi anti-H5 (antisera) yang diproduksi dapat menetralkan virus dengan sempurna (100%) pada titer 2^7 . Kemampuan antibodi anti-H5 asal kolostrum sapi ini lebih rendah dibandingkan dengan kemampuan netralisasi antibodi asal unggas (IgY).

Tabel 5 dan 6 memperlihatkan bahwa kolostrum yang sudah dikeringkan (*spray dried*) dan kolostrum *crude*, dengan titer antibodi 2^7 mampu menetralkan virus H5N1 100%, sedangkan pada pengenceran 20X hanya mampu menetralkan virus 50% populasi TAB. Wibawan dkk (2008) melaporkan bahwa IgY asal kuning telur ayam yang bertiter 2^4 mampu menetralkan 100% virus H5N1 isolat 2005. Perbedaan tingkat efikasi ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, di antaranya adalah adanya perbedaan

Tabel 5. Hasil Uji Netralisasi Antibodi Anti H5N1 di dalam Kolostrum *Crude* Terhadap Virus H5N1

Pengenceran Serum		Rasio ^a Tingkat Infeksi	Respon		Nilai Akumulasi			% Infeksi	% Protektif
Kuantitatif	Log ₁₀		Terinfeksi	Tidak Terinfeksi	Terinfeksi	Tidak Terinfeksi	Rasio		
(1:2) 2 ⁷	10 ^{-0.3}	0/5	0	5	0	12	0/12	0	100
(1:4) 2 ⁶	10 ^{-0.6}	2/5	2	3	2	7	2/9	22	78
(1:8) 2 ⁵	10 ^{-0.9}	2/5	2	3	4	5	4/9	44	56
(1:16) 2 ⁴	10 ^{-1.2}	3/5	3	2	7	3	7/10	70	30

Keterangan : "a" adalah jumlah terinfeksi di atas jumlah yang diinokulasi (jumlah TAB percobaan)

$$\text{Jarak Perbandingan (PD)} = \frac{50-44}{70-44} = 0,23$$

$$\text{Penguraian dari 50\% endpoint netralisasi} = 0,23 \times (-1,5 - (-1,2)) - (-(-1,2)) = -1,1$$

$$\text{Jarak Perbandingan (PD)} = \frac{50-33}{62,5-33} = 0,58$$

$$\text{Penguraian dari 50\% endpoint netralisasi} = 0,58 \times (-1,5 - (-1,2)) - (-(-1,2)) = -1,0$$

Tabel 6. Hasil Uji Netralisasi Antibodi Anti H5N1 di dalam Kolostrum *Spray Dried* Terhadap Virus H5N1

Pengenceran		Rasio ^a Tingkat infeksi	Respon		Nilai Akumulasi			% Infeksi	% Protektif
Kuantitatif	Log ₁₀		Terinfeksi	Tidak terinfeksi	terinfeksi	Tidak terinfeksi	Rasio		
(1:2) 2 ⁷	10 ^{-0.3}	0/5	0	5	0	15	0/15	0	100
(1:4) 2 ⁶	10 ^{-0.6}	1/5	1	5	1	10	1/11	9	91
(1:8) 2 ⁵	10 ^{-0.9}	2/5	2	5	3	6	3/9	33	67
(1:16) 2 ⁴	10 ^{-1.2}	2/5	2	5	5	3	5/8	62.5	37.5

Keterangan : "a" adalah jumlah terinfeksi di atas jumlah yang diinokulasi (jumlah TAB percobaan)

$$\text{Jarak Perbandingan (PD)} = \frac{50-44}{70-44} = 0,23$$

$$\text{Penguraian dari 50\% endpoint netralisasi} = 0,23 \times (-1,5 - (-1,2)) - (-1,2) = -1,131 = -1,1$$

Endpoint 50% netralisasi adalah 10^{-1.1}, Indeks netralisasi adalah 1,1

konformasi dan konsentrasi antibodi kolostrum (IgG) dengan antibodi unggas (IgY). Kolostrum memiliki konsentrasi IgG berkisar antara 32–212 mg/ml darah, sedangkan telur memiliki konsentrasi IgY berkisar antara 50–100 mg/telur. Perbedaan lainnya, IgG memiliki jumlah antibodi spesifik 5%, sedangkan IgY hanya 2–10%.

Menurut Dimmock (1984), terjadinya netralisasi pada virus merupakan indikasi gagalnya infeksi virus secara *in-vitro* akibat adanya antibodi yang mengikat antigen sehingga antigen target tidak mampu menempel pada reseptor sel inang. Antibodi menghambat terjadinya interaksi antara virus dengan inang. Antibodi menghalangi proses infeksi virus pada saat virus menempel pada permukaan inang, virus melakukan penetrasi di dalam sel inang, dan pada saat virus melepaskan selubung pembungkus di dalam sel inang.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa induk sapi bunting yang divaksin dengan vaksin in-aktif AI H5N1 mampu menghasilkan antibodi spesifik terhadap AI di dalam kolostrum dengan titer antibodi anti-AI di dalam kolostrum yang cukup tinggi (2⁸). Keberadaan antibodi spesifik terhadap AI di dalam kolostrum menunjukkan bahwa sapi mampu mentransfer antibodi dari sirkulasi darah menuju ke dalam kolostrum di kelenjar ambing. Aktivitas biologis IgG anti AI tetap stabil pada pH 5-7 dan setelah mengalami proses pengeringan (*spray dried*), namun menurun setelah perlakuan dengan enzim tripsin dan pepsin. Antibodi anti-AI H5N1 yang diproduksi mampu menetralkan virus dengan sempurna (100%) pada titer 2⁷. Hal ini menunjukkan bahwa kolostrum mempunyai potensi atau prospek sebagai pabrik biologis untuk memproduksi

antibodi AI sebagai bahan biologis untuk kepentingan imunoterapi pasif dalam rangka pengendalian penyakit flu burung. Kolostrum sapi berpeluang untuk dimanfaatkan sebagai pabrik biologis untuk memproduksi bahan biologis penting yang bersifat massal, baik untuk kepentingan manusia maupun hewan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Kementerian Negara Riset dan Teknologi (KNRT) sebagai penyandang dana melalui Program Insentif Tahun Anggaran 2007 dan 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Barrington GM *et al.* 2001. Regulation of Colostrogenesis in Cattle. *Livest Prod Sci* 70: 95–104.
- Brüssow H *et al.* 1987. Bovine Milk Immunoglobulins for Passive Immunity to Infantile Rotavirus Gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 25: 982–986.
- Butler JE. 1970. Bovine Immunoglobulin: A Review. *J Dairy Sci* 52: 1895–1909.
- Carlander D. 2002. Avian IgY Antibody. In *Vitro and in Vivo. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from Faculty of Medicine* 119. ACTA Universitatis Uppsala, Center Texas A & M University Kingsville.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan RI. 2007. *Laporan Hasil Pemeriksaan atas Pengendalian Flu Burung dan Kesiapsiagaan Menghadapi Pandemi Influenza*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Elfstrand L, Mansson HL, Paulsson M, Nyberg L, Akesson B. 2002. Immunoglobulins, growth factors, and growth hormone in bovine colostrums and the effects of processing. *International Dairy Journal* 12:879–887.
- Esfandiari, A., Widhyari, S. D., Wibawan, I. W. T., Sajuthi, D., Utama, I. K. 2003. Pemanfaatan Keterlimpahan Kolostrum Sapi sebagai Sumber Imunoglobulin Pengganti dalam Rangka Transfer Kekebalan Pasif pada Anak Kambing Neonatus. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XI/1. Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat, Institut Pertanian Bogor.
- Esfandiari, A., Widhyari, S. D., Wibawan, I. W. T., Sajuthi, D., Utama, I. K. 2004. Pemanfaatan Keterlimpahan Kolostrum Sapi sebagai Sumber Imunoglobulin Pengganti dalam Rangka Transfer Kekebalan Pasif pada Anak Kambing Neonatus. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XI/2. Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat, Institut Pertanian Bogor.
- Esfandiari A. 2005. Kinerja Kesehatan Kambing Peranakan Etawa (PE) Neonatal setelah Pemberian Berbagai Sediaan Kolostrum [disertasi]. Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Fenner FJ *et al.* 1995. *Virologi Veteriner*. Putra, Harya, dan Suryana KG, penerjemah. Semarang: IKIP Semarang Press. Terjemahan dari: *Veterinary Virology*.
- Hatta, H., K. Tsuda, S. Akachi, M. Kim, and T. Yamamoto. 1993. Productivity and Some Properties of Egg Yolk Antibody (IgY) Against Human Rotavirus Compared with Rabbit IgG. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 450–454.
- Hogan JS, Todhunter DA, Tomita OM, Smith KL, Schoenberger PS. 1992. Opsonic Activity of Bovine Serum And Mammary Secretion after *Escherichia coli* J5 vaccination. *J Dairy Sci* 75:72–77.
- Kuby J. 1997. Immunology. Ed ke-3. WH Freeman and Co. New York.
- Larson BL, Heary HL, Devery JE. 1980. Immunoglobulin Production and Transport by the Mammary Gland. *J Dairy Sci* 63:665–671.
- Lazzaro J. 2000. Colostrum/Supplementing Colostrum. Wichway@saanendoah.com. Februari, 7.
- Lona DV, Romero RC. 2001. Short Communication : Low levels of Colostral Immunoglobulins in Some Dairy Cows with Placental Retention. *J Dairy Sci* 84:389–391.
- [OIE] World Organization for Animal Health. 2004. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Ed ke-5. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm [9 Feb 2008].
- Olson DP, Woodard LF, Bull RC, Everson DO. 1981. Immunoglobulin Levels in Serum and Colostral Whey of Protein Metabolisable Energy Restricted Beef Cows. *Res Vet Sci* 30:49–52.
- Poland GA. 2006. Vaccines Against Avian Anfluenza- a Race Against Time. *N Engl J Med* 354: 1411–1413.
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK. 1998. *Immunology*. Ed ke-5. London: Mosby International Ltd. hlm 72–76.
- Ruckebusch Y, Phaneuf LP, Dunlop R. 1991. Lactation. *Di dalam: Physiology of Small and Large Animals*. Philadelphia-Hamilton: B. C. Decker, Inc. hlm 617–618.
- Smith NE *et al.* 1971. Selective Transport of IgG1 into Mammary Gland: Role of Estrogen and Progesterone. *J Dairy Sci* 54:1886.

- Snodgrass DR, Nagy LK, Sherwood D, Campbell I. 1982. Passive Immunity in Calf Diarrhea: Vaccination with K99 Antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Rotavirus. *J Infect Immun* 37: 586–591.
- Tizard IR. 2005. *An Introduction to Veterinary Immunology*. Ed ke-6. USA: W.B. Saunders Company.
- [WHO] World Health Organization. 2008. *Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO*. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_06_19/en/index.html [30 Jun 2008].
- Waterman D. 1998. Colostrum: The Beginning of a Successful Calf Raising Program. <http://www.moormans.com/dairy/dairyff/dairymar98/colostrum> [21 Agu 2008].
- Wibawan IWT, Soejoedono RD, Zarkasie K. 2005. Avian Influenza: Kemungkinan Penularannya pada Manusia dan Peranan Vaksinasi pada Unggas untuk Mengurangi Kontaminasi Lingkungan oleh Virus Avian Influenza. Di dalam: *Kupas Tuntas Avian Influenza pada Manusia. Prosiding Pertemuan Diskusi Panel*; Jakarta, 6 Agu 2005.
- Winger K, Gay CC, Besser TE. 1995. Immunoglobulin G1 Transfer into Induced Mammary Secretion: The Effect of Dexamethasone. *J Dairy Sci* 78: 1306.
- Whitaker JR. 1994. Principles of Enzimology for the Food Sciences. 2nd ed. P. 499–503. Food Science and Technology. New York. Mercel Dekker.
- Wong SSY, Yuen KY. 2006. Avian Influenza Virus Infections in Humans. *Chest* 129:156–168.