

**GIZI DAN PENYAKIT TROPIS**

**LAPORAN**

**HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL**

**BATCH - I**

**(KLASTER GIZI DAN KESEHATAN)**

**TAHUN ANGGARAN 2009**

KKC  
KK  
LP. 118/10  
Rah  
a



**Analisa Profil Antigenitas dan Molekuler**

**Isolat Lapangan Virus Avian Influenza A/H5N1**

**Sebagai Praseleksi *Seed Virus* Strain Indonesia untuk Vaksin Unggas**

**OLEH:**

**Adi Prijo Rahardjo, M Si., drh.**

**Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh.**

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi  
Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan  
Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch I**

**(Klaster Gizi & Kesehatan)**

**Nomor : 171/SP211/PP/DP2M/V/2009, Tanggal 30 Mei 2009**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**Desember 2009**

## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1. Judul Penelitian : Analisa Profil Antigenitas dan Molekuler Isolat Lapangan Virus Avian Influenza A/H5N1 Sebagai Praseleksi *Seed Virus Strain* Indonesia untuk Vaksin Unggas
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap : Adi Prijo Rahardjo, MSi., drh.
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NIP : 130 808 957
- d. Jabatan Struktural : ---
- e. Jabatan Fungsional : Staf Pengajar
- f. Bidang Keahlian : Virologi & Imunologi
- g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan / Mikrobiologi Veteriner
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- i. Tim Peneliti

No	Nama Gelar Akademik	Ridang Keahlian	Fak/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Dr. A.T. Soelih Estoepangestie, drh.	Mikrobiologi & Imunologi	FKH Unair / Kesmavet	Universitas Airlangga

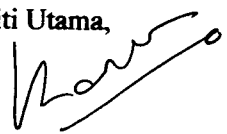
3. Pendanaan dan Jangka waktu penelitian
- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp.100.000.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun I : Rp. 94.000.000,-

Mengetahui  
Dekan FKH Unair.

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh  
NIP. 130 687 305

Surabaya, 5 Desember 2009

Peneliti Utama,

  
Adi Prijo Rahardjo, Msi., drh.  
NIP. 130 808 957

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga

  
Prof. Dr. Bambang Sektiari L., drh.  
NIP. 131 837 004

## A. LAPORAN HASIL PENELITIAN

### RINGKASAN DAN SUMMARY

Hingga saat ini, di Indonesia terdapat tidak kurang dari 15 jenis vaksin AI A/H5N1 komersial untuk unggas dipasarkan sejak tahun 2004 yang diharapkan dapat mengatasi kejadian penyakit pada unggas, nyatanya hingga saat ini belum memberikan hasil memuaskan. Pola perubahan penyakit AI A/H5N1 baik pada unggas air maupaun pada unggas domestik, menyebabkan seolah-olah sifat patogenitas virusnya berubah dari *highly pathogenic* AI (HPAI) menjadi *low pathogenic* AI (LPAI). Hal tersebut semakin meluasnya hewan karier AI A/H5N1, yang dulunya adalah unggas air sekarang juga ayam ras dan ayam buras, akibatnya semakin sulit memberantas tuntas virus AI A/H5N1 di Indonesia

Faktor terpenting dalam pembuatan vaksin AI A/H5N1 adalah penentuan *seed virus* yang mempunyai antigen protektif dengan spektrum luas terhadap virus AI yang bersirkulasi dilapangan. Penelitian dengan judul “Analisa Profil Antigenitas dan Molekuler Isolat Lapangan Virus Avian Influenza A/H5N1 Sebagai Praseleksi *Seed Virus* Strain Indonesia untuk Vaksin Unggas” dapat menemukan beberapa kandidat *seed virus* AI A/H5N1 strain Indonesia yang bersifat protektif dalam mencegah wabah AI pada unggas, sehingga dapat mencegah sumber infeksi bagi manusia. Isolat *seed virus* diperoleh dari isolat lapangan yang diisolasi pada tahun 2003 hingga 2008. Metoda penelitian dilakukan beberapa tahap, mulai dengan pendekatan konvensional melakukan isolasi virus pada telur ayam bertunas dan identifikasi uji *Hemagglutination Inhibition* dan konfirmasi dengan *one step RT-PCR*, kemudian dilanjutkan dengan karakterisasi sifat reaktivitas heamagglutinin. Hasil penelitian menemukan tiga isolat lokal Indonesia yang dapat dijadikan *seed virus* pembuatan vaksin AI A/H5N1 yang protektif terhadap virus yang bersirkulasi hingga saat ini.

**Kata Kunci : *seed virus* vaksin AI A/H5N1; protein antigenik virus Influenza A/H5N1 strain Indonesia**

# The Analysis of Antigenicity and Molecular Profile of Avian Influenza Virus A/H5N1 Field Isolates as a Preselection for Poultry Vaccine Seed Virus of Indonesian Strain

**A.P. Rahardjo<sup>1\*</sup> and AT. Soelih Estoepangestie<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> The Departement of Veterinary Microbiology of Veterinary Medicine Faculty of Airlangga University. C - Campus Unair – Mulyorejo. Surabaya – 60115. Indonesia.

<sup>2</sup> The Departement of Veterinary Public Health of Veterinary Medicine Faculty of Airlangga University. C - Campus Unair – Mulyorejo. Surabaya – 60115. Indonesia.

E-mail [soelih.estoepangestie@yahoo.com](mailto:soelih.estoepangestie@yahoo.com).

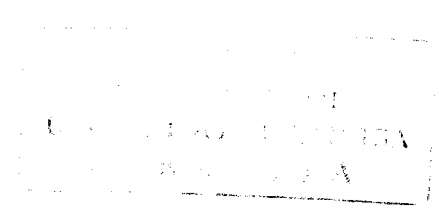
\* Corresponding Author

Keywords: H5N1 Isolates; AI commercial vaccines; hemagglutinin reactivity; HI-titer

## Abstract

Since the outbreak of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 in 2003, almost all of the 33 provinces of Indonesia are now becoming as endemic areas. Many kinds of AI H5-vaccines are used, not only the homologous but also the heterologous vaccines. Up to now there is still difficulty to eradicate the H5N1 virus in Indonesia.

The aim of this study was to investigate the hemagglutinin cross-reactivity of several Avian Influenza H5 field-isolates and to characterize selected H5 field-isolates suitable for vaccine seed virus. To show the diversity of the hemagglutinin structure in the same H5 subtype, H5 field isolates were tested using hemagglutination inhibition against vaccinated chicken sera. The five commercial vaccines used in this study were three kinds of H5N2, and each one of H5N1 and H5N9. There were 39 H5 field-isolates used in this study, which were 12 H5N1-virus isolates from 2003-2006 and 27 H5N1-isolates from 2008. The hemagglutinin reactivity of the H5N1 virus isolates was shown by the HI-titer of each vaccinated chicken sera of five AI commercial vaccines. Some variations of HI-titer sera of all five commercial vaccines could be observed. Twelve H5N1-isolates from 2003-2006 gave relative higher titer than the other isolates from 2008. Three H5 field-isolates, B/03, M01/05 and M02/06, were selected for further hemagglutinin cross-reactivity investigation between themselves, and were also characterized for virulence and protective value using neutralization test. All three isolates have good opportunity to be used for AI H5 vaccine seed virus.



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>Halaman Pengesahan</b>	i
<b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	ii
<b>RINGKASAN DAN SUMMARY</b>	iii
<b>PRAKATA</b>	iv
<b>DAFTAR ISI</b>	v
<b>DAFTAR TABEL</b>	vi
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	vii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	viii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	1
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	5
<b>BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN</b>	15
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN</b>	16
<b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	19
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	28
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	29
<b>B. DRAF ARTIKEL ILMIAH</b>	33

## DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1.	Isolat virus influenza A/H5 dari berbagai daerah Jawa Timur dari tahun 2003, 2005, 2007 dan 2008 yang dijadikan obyek penelitian	16
Tabel 2.	Identifikasi isolat virus sebagai virus AI-H5 dengan uji HA, Rapid test dan Uji HI.	20
Tabel 3.	Hasil uji HI silang antar lima macam serum hasil imunisasi vaksin komersial yang berbeda dengan berbagai isolat AI-H5	22
Tabel 4.	Titer HI dari antisera hasil imunisasi lima macam enam isolat dengan berbagai isolat AI-H5.	25
Tabel 5.	<i>Mean Death Time</i> (MDT) dari isolat AI A/H5N1 B/03, M01/05 dan M02/06	26
Tabel 6.	Uji netralisasi antiserum Anti-B/03, Anti-M01/05 dan Anti-M02/06 terhadap beberapa Isolat A-H5	27
Tabel 7.	Rata-rata kematian embrio (Mean death Time = MDT) Isolat Virus AI A - H5 B3/03	31
Tabel 8.	Rata-rata kematian embrio (Mean death Time = MDT) Isolat virus AI A- H5 B3/03	31
Tabel 9.	Rata-rata kematian embrio (Mean death Time = MDT) Isolat virus AI A- H5 B3/03	31

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1.	Rapid Test Influenza	19
Gambar 2.	Uji Hemagglutinasasi Inhibisi	19
Gambar 3.	Hasil uji One Step RT-PCR isolat AI-H5 isolat 2003 pada lubang 1 dan 2 (B/03) dan lubang 3 (P/03), isolat tahun 2004 pada lubang 4 dan 5 (W/04), isolat tahun 2005 pada lubang 6 dan 7 (M01), serta isolat tahun 2006 pada lubang 7 (S6/06 ) dan 8 (M02/06).	23
Gambar 4.	Ayam yang digunakan untuk imunisasi	24
Gambar 5.	Pelaksanaan Penelitian di Laboratorium Virologi, Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga	32

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Masalah

Wabah AI yang disebabkan virus HPAI A/H5N1 pada unggas di Asia termasuk Indonesia bermula sejak pertengahan tahun 2003, namun kasus kejadian AI A/H5N1 pada manusia dilaporkan pertama kali di Hong Kong pada tahun 1997 dengan 6 kematian dari 18 kasus. Mengacu pada data dari WHO, kasus AI A/H5N1 pada manusia di dunia sampai September 2008 tercatat 387 kasus diantaranya 245 meninggal. Di Indonesia pertama kali dilaporkan pada bulan Juni 2005, hingga Juli 2008 jumlah kasusnya mencapai **112 kematian dari 137 kasus**, Penderita AI A/H5N1 pada manusia mayoritas adalah anak-anak dan orang dewasa muda yang sehat, walaupun telah diketahui adanya *barrier species* yang signifikan, penularan virus A/H5N1 dari unggas kepada manusia nyatanya masih tetap berlanjut.

Upaya pencegahan merebaknya kasus AI pada manusia, selain mencegah kontak antara manusia dengan unggas atau bangkai unggas yang sakit AI, dan yang juga tidak kalah pentingnya adalah kontrol penyakit AI secara kontinyu pada populasi hewan sumber penyakit flu burung H5N1. Pencegahan dengan cara vaksinasi yang sudah dilakukan hingga saat ini belum memberikan jaminan yang memuaskan, terbukti dengan timbulnya kasus AI yang cenderung menjadi *low pathogenic* (LPAI) yang justru berbahaya karena unggas penderita mensekresi virus AI dengan jumlah yang cukup untuk menimbulkan wabah penyakit, bahkan tanpa disadari dapat menjadi sumber penyakit bagi manusia. Selain dari feses hewan terinfeksi, virus AI A/H5N1 dapat diisolasi dari bahan pangan asal unggas (EFSA, 2006; WHO, 2006; Rahardjo dan Estoepangestie, 2008).

Vaksin dikatakan berpotensi baik apabila mempunyai daya proteksi yang tinggi. Hal tersebut sangat bergantung pada protein antigenik virus vaksin. *seed virus*. Penelusuran karakteristik protein antigenik dan imunogenik dari isolat virus AI A/H5 asal unggas perlu dilakukan, agar dapat diperoleh *seed virus* yang dapat dipakai sebagai kandidat dalam pembuatan vaksin AI A/H5 yang berpotensi memberikan proteksi yang tinggi terhadap adanya wabah AI. Langkah ini juga merupakan salah satu tahap



profilaksis terhadap kemungkinan terjadinya *genetic shift* virus AI, yang dapat menjadi ancaman timbulnya wabah AI tidak hanya pada unggas tetapi juga pada manusia.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, maka dapat dirumuskan permasalahan yang adalah sbb. :

1. Wabah endemik AI A/H5N1 di Indonesia sudah mencapai 33 Propinsi, pemberantasan secara total penyakit tersebut sangat semakin sulit dicapai.
2. Vaksin AI, khususnya untuk melindungi terhadap serotype A/H5N1, yang berpotensi memberikan daya proteksi yang baik untuk jangka waktu yang lama, hingga saat ini belum ada.
3. Perlu dilakukan isolasi, identifikasi dan karakterisasi biologik virus AI A/H5N1 yang dapat dipakai sebagai *seed virus* dalam pembuatan vaksin AI A/H5N1 untuk unggas, yang dapat memberikan proteksi yang baik dalam waktu cukup lama.

## 1.3. Keutamaan Penelitian

Adanya wabah endemik penyakit AI pada unggas sejak tahun 2005 di 33 Propinsi di Indonesia, serta perubahan sifat patogenitas virus AI A/H5N1 dari HPAI menjadi LPAI, menyebabkan pemberantasan secara total wabah AI A/H5N1 menjadi semakin sulit. Ketakutan masyarakat konsumen untuk mengkonsumsi bahan pangan asal unggas dan produk asal unggas menyebabkan kerugian bagi peternak dan penjual unggas dan produk asal unggas, yang dapat berdampak guncangan sosial dan ekonomi secara nasional.

Evolusi virus influenza merupakan proses kontinyu yang melibatkan faktor virus penyebabnya dan faktor hostnya. Meningkatnya kejadian penyakit HPAI yang disebabkan virus influenza A/H5N1, A/H7N3, A/H7N7 dan penyebaran panzootik virus influenza A/H9N2, yang kesemuanya sudah terbukti dapat menular pada manusia, merupakan masalah besar yang harus dihadapi baik oleh praktisi Veteriner maupun Kesehatan Masyarakat Manusia. Pertanyaannya adalah, berapa lama lagi pandemi akan terjadi. Banyaknya faktor, termasuk kepadatan populasi unggas domestik, babi dan manusia, merupakan hal penting yang mempengaruhi terjadinya evolusi dari virus

penyebab influenza. Padatnya peternakan babi dan unggas, dalam hubungannya dengan pasar hewan hidup tradisional atau "*wet market*", merupakan kondisi optimal terhadap tingginya kemungkinan terjadinya mutasi, reassortment dan rekombansi dari virus influenza. Strategi yang dapat dilakukan untuk menghambat atau menurunkan kemungkinan terjadinya pandemi influenza, antara lain dengan jalan pemisahan species/kenis hewan dalam satu peternakan, peningkatan *biosecurity*, pengembangan jenis vaksin baru, serta pengetahuan mendasar tentang virus penyebab influenza.

Pandemi influenza yang sudah terjadi dan selanjutnya menjadi epidemi influenza, disebabkan oleh tiga subtipe yaitu H1, H2 dan H3. Dewasa ini manusia juga dapat tertular oleh subtipe H5, H7 dan H9, dimana kematian cukup tinggi disebabkan oleh subtipe H5 dan satu kematian oleh subtipe H7. Subtipe lainnya virus influenza A pada prinsipnya juga dapat berubah menjadi patogen, namun saat ini, subtipe tersebut belum menunjukkan potensi sebagai penyebab pandemi influenza. Walaupun demikian, perlu diingat bahwa, semua subtipe virus influenza A mempunyai potensi menjadi penyebab pandemi influenza melalui proses reassortment. Hal tersebut merupakan proses alam yang terjadi secara kontinyu, yaitu dengan adanya pertukaran segmen gen antar virus influenza tipe A (Li et al., 2004; Liu et al., 2003; Smolinski, 2004).

Virus influenza A akan mengalami evolusi yang cepat setelah ditularkan dari unggas air liar ke jenis unggas lain / domestik atau mamalia (Ludwig et al., 1995; Zhou et al., 1999). Virus AI subtipe H5, dari unggas air liar menulari ternak unggas rakyat (*backyard poultry*) atau unggas hidup di pasar, dimana terdapat bebek, angsa, burung puyuh, *pheasant*, ayam dan lain-lain, yang dipelihara atau dikandangan bersama-sama (Webster, 2004). Penularan virus AI antara unggas hidup di pasar dan di industri peternakan unggas, dapat menyebabkan rantai penularan yang semakin panjang melalui peralatan, kendaraan dan pekerjanya. Bila virus AI sudah menulari suatu peternakan unggas, maka sudah tercapai jumlah optimum populasi unggas yang memungkinkan terjadinya evolusi virus AI secara cepat.

Adanya peternakan unggas dengan populasi tinggi merupakan kondisi optimum untuk terjadinya evolusi virus influenza. Pengambilalihan dari *multiple amino acids* terutama terjadi pada unggas bangsa *gallinaceous*, sedangkan mutasi dari PB2 dan NS dapat terdeteksi setelah terjadi penularan pada manusia. Tidak diketahui, apakah seleksi

pertamanya terjadi pada unggas domestik atau pada manusia (Webster and Hulse, 2004).

Khususnya di Indonesia, tidak kurang dari 15 jenis vaksin AI A/H5 komersial untuk unggas secara legal dipasarkan sejak tahun 2004 diharapkan dapat mengatasi kejadian penyakit pada unggas, nyatanya hingga saat ini belum memberikan hasil memuaskan. Walaupun kelihatannya kasus AI pada unggas sudah menurun, nyatanya ekskresi virus AI A/H5N1 tetap terdeteksi pada unggas yang secara klinis sehat. Hal tersebut menunjukkan pola perubahan penyakit AI A/H5N1 baik pada unggas air maupun pada unggas domestik, sehingga seolah-olah sifat patogenitas virusnya berubah dari *highly pathogenic AI (HPAI)* menjadi *low pathogenic AI (LPAI)*. Berdasarkan kenyataan tersebut, maka hewan karier AI A/H5N1 semakin meluas, yang dulunya adalah unggas air sekarang juga ayam ras dan ayam buras, akibatnya akan semakin sulit memberantas sampai tuntas adanya virus AI A/H5N1 di Indonesia (Rahardjo, 2007).

Upaya untuk meredam perluasan penyakit telah dilakukan, mulai dari pembatasan lalulintas ternak unggas, peningkatan *Biosecurity* serta pengebalan dengan cara pemberian vaksin AI. Proteksi dengan cara vaksinasi hingga saat ini memberikan hasil yang kurang memuaskan. Hal tersebut terlihat dengan makin besarnya jumlah hewan *carrier virus AI A/H5*. Vaksin yang paling baik tentunya adalah vaksin yang mengandung virus AI strain lokal yang memiliki sifat imunogenik yang sama dengan virus lapangan sebagai penyebab penyakit. Pemilihan *seed virus* vaksin Influenza perlu segera ditindaklanjuti untuk mengatasi semakin banyaknya unggas carier yang menjadi sumber penularan bagi unggas lain maupun lingkungannya, termasuk dalam hal ini manusia.

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian “**Analisa Profil Antigenitas dan Molekuler Isolat Lapangan Virus Avian Influenza A/H5N1 Sebagai Praseleksi Seed Virus Strain Indonesia untuk Vaksin Unggas**” untuk memenuhi kebutuhan akan vaksin yang poten dalam memberi perlindungan terhadap penyakit AI pada unggas. Hal tersebut secara langsung dapat mencegah adanya sumber infeksi AI A/H5N1 bagi manusia.

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Penyakit Avian Influenza

Avian Influenza adalah penyakit pada bangsa burung yang disebabkan oleh virus influenza A. Penyakit ini sudah dikenal sejak abad ke 19 dengan keganasanya pada unggas di benua Eropa sebagai *Fowl plaque*, dan oleh karena penyebabnya kemudian diketahui virus influenza, sejak tahun 1981 istilah *Fowl plaque* tidak digunakan lagi. Avian Influenza dapat disebabkan oleh berbagai virus, antara lain virus AI-H5N1, virus AI-H5N2 dan virus AI-H7N7. Penyakit Avian Influenza yang sedang mewabah di Asia disebabkan virus influenza A sub tipe H5N1 atau lebih dikenal dengan virus AI-H5N1 (OIE, 2008).

Penyakit ini bersifat sangat kontagius dengan angka morbiditas dan mortalitas dapat mencapai 100%. Pada hewan yang tidak sampai mati akan terjadi penurunan produksi telur. Masa inkubasi berlangsung amat pendek, antara 3-7 hari (Alexander, 2003)

Hewan yang terserang penyakit ini adalah bangsa unggas, terutama ayam dan kalkun. Tergantung keganasan virus, kadang-kadang juga menyerang itik, burung puyuh, merpati, burung laut dan unggas air lainnya. Unggas air dan burung liar dapat menjadi *carrier* dan penyebar virus (Matrosovich *et al.*, 2004)

### 2.2. Virus Avian Influenza

#### 2.2.1. Klasifikasi dan Morfologi virus

Berdasarkan struktur dan sifatnya, virus Avian Influenza diklasifikasikan dalam genus influenzavirus A, yang bersama-sama dengan influenzavirus B dan influenzavirus C dikelompokkan dalam famili Orthomyxoviridae. Influenzavirus A memiliki spektrum host yang luas, termasuk manusia, hewan mamalia darat maupun laut, dan bangsa burung, sedangkan influenzavirus B, hanya pada manusia walaupun pernah ditemukan pada babi. Influenzavirus C sampai kini hanya ditemukan pada manusia (OIE, 2008).

Influenza virus A dapat digolongkan lagi menjadi beberapa subtipe atas dasar dua macam protein yang terdapat pada bagian selubungnya, yaitu protein hemagglutinin (HA) dan protein neuraminidase (NA). Sampai kini dikenal 16 macam protein HA yang berbeda dan diberi notasi H1 sampai H16, sedangkan untuk protein NA, sampai kini dikenal 9 macam yang berbeda dan diberi notasi N1 sampai N9. Kombinasi dari berbagai protein HA dan NA dapat diperoleh berbagai macam subtipe influenzavirus A. Penyakit Avian Influenza atau Flu burung pada umumnya disebabkan oleh influenzavirus A subtipe H5, H7 dan H9. Penyakit Avian Influenza yang sedang mewabah di Asia disebabkan oleh influenzavirus A-(subtipe) H5N1 (Cox *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 1998; Webster and Hulse, 2004).

Bentuk virus influenza adalah *pleomorphic*, dapat *spheric* atau *filamentous*, berukuran antara 80 sampai 120 nm. Virus memiliki selubung (envelope) yang terdiri dari lipoprotein asal sel host dan memiliki jonjot-jonjot (spike) yang terdiri dari Hemagglutinin dan Neuraminidase (Webster, 2004).

### 2.2.2. Struktur Antigen

Komponen utama virus influenza adalah genom RNA berantai tunggal, serta komponen lainnya seperti selubung (envelope), protein Hemagglutinin (HA), protein Neuraminidase (NA), protein matriks (M1 dan M2), protein nonstruktural (NS1 dan NS2), nucleoprotein (NP) dan beberapa komponen lain-lainnya seperti RNA polymerase. Semua protein ini selain selubung, disandi oleh 10 gen yang tersusun atas 8 segmen RNA, yaitu gen HA, NA, M, NP, NS, PA, PB1 dan PB2 (Webster *et al.*, 2004).

Virus influenza mudah mengalami mutasi (*antigenic drift*) dan sifat *progeny* (keturunan) virus tersebut juga akan berubah tergantung pada gen yang mengalami mutasi. Hemagglutinin bersifat spesifik terhadap sel yang dapat diinfeksi oleh virus tersebut dan jika gen yang menyandi protein HA mengalami mutasi akan diperoleh virus dengan spektrum host yang baru. Mutasi pada gen penyandi protein NS akan menentukan sifat virulensi. Virus yang semula bersifat tidak ganas (*Low Pathogenic Avian Influenza* = LPAI) bisa berubah menjadi ganas atau bahkan sangat ganas (*Highly Pathogenic Avian Influenza* = HPAI) (Webster, 2004).

Keunikan lain dari virus influenza ini adalah pada genom RNA-nya yang memiliki struktur bersegmen. Secara teoritis bila satu sel terinfeksi oleh dua virus influenza dari jenis yang berbeda (misalnya virus influenza unggas dan virus influenza manusia), maka dimungkinkan progeny yang dihasilkan memiliki campuran atau pertukaran sifat dari kedua virus aslinya. Pencampuran/pertukaran satu atau lebih segmen pada genom ini (reassortment) akan menghasilkan progeny /keturunan virus yang sangat berbeda sifatnya, ini disebut sebagai *antigenic shift*. Ini merupakan salah satu penyebab, mengapa dapat terjadi lompatan barrier spesies (*Species barrier jump*), misalnya virus AI yang semula tidak patogen bagi manusia, berubah sifat dan dapat menginfeksi manusia (Swayne and Suarez, 2003; Li *et al.* , 2004).

Individu dimana terjadi pencampuran genom disebut sebagai "*mixing vessel*" (tempat pencampuran). Pandemi Influenza (Asian Flu) tahun 1957 dan Pandemi tahun 1968 (Hongkong Flu) telah dapat dibuktikan adanya *genetic reassortment* pada hewan Babi. Hewan lain yang sudah terbukti yang dapat menjadi "*mixing vessel*" adalah unggas. Virus Avian influenza H5N1 yang melanda Hongkong pada 1997 dan menimbulkan banyak kematian pada unggas telah membuktikan kemampuan virus menginfeksi manusia bahkan sampai mengakibatkan kematian. Penelitian lebih lanjut membuktikan bahwa , virus influenza H5N1 ini dapat menular pada manusia tanpa mengalami *genetic reassortment*. Hal yang sama juga terjadi pada Avian influenza H5N1 yang mewabah di Asia sejak 2003, dimana telah terbukti virus penyebabnya masih asli dari unggas (Webster, 2004)

Atas dasar sekwensing gen dari virus AI-H5N1 dapat dibedakan menjadi beberapa *genetic caldes*. *Clade 1* virus AI- H5N1 adalah strain manusia yang diisolasi dari Vietnam, Thailand dan Kamboja, serta strain unggas yang diisolasi dari Laos, dan Malaysia. *Clade 2* virus AI-H5N1 adalah strain unggas yang diisolasi dari Cina, Indonesia, Jepang dan Korea Selatan (WHO, 2004)

### 2.2.3. Antigen Hemagglutinin

Hemagglutinin adalah glycoprotein yang terdapat pada permukaan virus Influenza A yang bertanggung jawab untuk pengikatan pada *N-AcetylNeuraminic Acid* (NeuNAc) atau umumnya disebut *Sialic acid* pada reseptor permukaan sel host.

Hemagglutinin (HA trimer) yang sering disebut sebagai HA<sub>0</sub> ini tersusun dari dua subunit, yaitu HA<sub>1</sub> and HA<sub>2</sub>. Struktur ini tersusun dari 550 asam amino pada 220 kDa, dan panjangnya 135 Å<sup>0</sup>. Sebutan Hemagglutinin (HA) diperoleh sejak eksperimen awal dengan Influenza A, karena jika ditambahkan pada eritrosit akan mengakibatkan aglutinasi atau menggumpal. Rantai HA<sub>1</sub> merupakan sisi pengikatan untuk penempelan virus pada reseptor (*receptor binding sites*) permukaan sel. Rantai HA<sub>2</sub> memiliki peran utama pada aktifitas fusi. Virus influenza memasuki sel host sebagai partikel yang utuh oleh endositosis yang dimediasi oleh reseptor (*receptor-mediated endocytosis*). Fusi kemudian dipicu oleh suasana asam (pH 5) yang terjadi didalam endosom. Perubahan pH ini menyebabkan HA<sub>0</sub> yang semula melipat segera mengembang sempurna. Dengan SDS-PAGE dapat diketahui berat molekul dari HA<sub>0</sub> adalah 77 kD, HA<sub>1</sub> adalah 50 kD dan HA<sub>2</sub> adalah 26 kD. Sifat pembelahan HA ini memberi arti pada sifat virulensi virus AI. Karena sifat HA ini, maka antibodi anti-HA merupakan antibodi yang protektif karena dapat menetralkan daya infeksi virus (Vines *et al.*, 1998; Suzuki and Nei, 2002; Swayne, 2003; Sandbulte *et al.*, 2007).

### 2.3. Sumber dan Cara Penularan Avian Influenza

Hewan tertular AI akan mengeluarkan virus bersama feses atau melalui saluran pernafasan bersama leleran hidung atau air liur selama terjadi fase penyakit aktif, dengan demikian bahan-bahan tersebut mengandung banyak virus dan merupakan sumber penularan pada hewan/individu lain. Walaupun demikian, penularan utama pada bangsa burung adalah "*fecal-oral*". Bahan terkontaminasi dapat secara langsung bersinggungan dengan hewan atau manusia yang masih sehat. Kontak tidak langsung terjadi bila bahan tercemar virus tersebut dapat menempel pada benda atau alat-alat peternakan, alat transportasi ataupun telur, yang selanjutnya bersinggungan dengan korban baru. Cara penularan ini perlu diperhatikan dalam usaha pencegahan penularan dan penyebaran virus AI (Webster, 2004).

Cara penularan pada manusia tidak jauh berbeda dengan penularan pada unggas atau burung lain. Penularan pada manusia terutama karena kontak langsung dengan unggas penderita, atau penularan tak langsung melalui permukaan dan benda yang

terkontaminasi kotoran dan cairan unggas penderita atau produk unggas penderita. Menurut Rahardjo dan Estoepangestie (2008), virus AI A/H5 juga dapat diisolasi dari kulit dan daging ayam yang berasal dari daerah wabah. Oleh karena tempat virus masuk ke tubuh (*port of entry*) pada manusia adalah mulut, hidung dan selaput lendir mata, maka tempat ini harus dijaga agar tidak terinfeksi oleh virus (WHO-FAO-INFOSAN,2005).

## **2.4. Pencegahan Avian Influenza**

### **2.4.1. Pencegahan Penularan**

Tindakan higiene yang ketat, terutama setelah kontak dengan burung atau unggas dan produknya. Segala sesuatu yang kemungkinan telah tercemar, perlu mendapat perhatian khusus. Pembersihan kandang dengan deterjen atau desinfektan perlu dilakukan secara teratur, dan kotoran dari unggas tertular harus ditanam sedalam mungkin atau dibakar (Horimoto and Kawaoka,2001; Webster, 2004).

### **2.4.2. Pengebalan Hewan**

Tindakan pengebalan dalam upaya pencegahan penyakit sering dilakukan, terutama pada peternakan sektor menengah keatas. Kini pemerintahpun juga menggunakan vaksinasi untuk ayam buras dalam rangka program pembrantasan AI. Berbagai macam Vaksin AI dengan kandungan strain virus yang berbeda dapat diperoleh secara komersial. Vaksin AI yang telah mendapatkan izin penggunaan, mengandung virus AI-H5N1, AI-H5N2 dan H5N9, sedangkan vaksin ilegal dengan kandungan virus yang tidak diketahui, sudah jarang digunakan. Vaksin akan efektif apabila dapat menimbulkan kekebalan yang protektif, dan ini dapat tercapai apabila antigen pada virus vaksin homolog dengan virus lapangan. Mengingat protein HA dari virus adalah penentu dalam proses infeksi sel host, maka antibodi anti-HA merupakan antibodi yang protektif karena dapat menetralkan daya infeksi virus (Swayne, 2003; Rahardjo, 2007).

Daya netralisasi antibodi-anti HA memberikan hasil yang berbeda, walaupun dalam serotipe yang sama dan dengan demikian vaksin yang baik adalah vaksin yang



memiliki daya netralisasi yang optimal dalam suatu serotipe homolog (Matrosovich, 1999; Anwar *et al.*, 2006; Rahardjo, 2007).

## 2.5. Epidemiologi Avian Influenza

Virus AI-H5N1 yang semula hanya didapatkan di kawasan Asia Timur dan Asia Tenggara, kini sudah merambah kearah barat mulai dari Mongolia, kemudian Khasakstan sampai di Eropa, yakni Turki, Rumania, Jerman dan Austria. Kini Nigeria merupakan negara Afrika pertama dimana virus AI-H5N1 dapat ditemukan. Burung migran memiliki peran penting dalam penyebaran virus AI secara alami. Burung liar ini akan bermigrasi sesuai musim dari satu tempat ketempat lain, sehingga bila burung migran tsb terinfeksi secara subklinis akan bertindak sebagai hewan pembawa dan penyebar virus (*carrier*) (CIDRAP, 2006). Sesampainya di lokasi baru, burung migran ini dapat menulari burung liar lokal dan selanjutnya burung liar akan menulari unggas atau burung peliharaan disekitarnya.. Walaupun sudah dilakukan pencegahan, apakah dengan cara pengebalan (vaksinasi) ataupun tindakan *Biosecurity* yang ketat, virus akan tetap terpelihara dalam populasi burung liar tersebut, dengan atau tanpa menimbulkan sakit. Dengan demikian burung liar akan bertindak sebagai *reservoir* (sumber) dari penyakit AI. Kejadian penyakit akan bersifat sporadis pada daerah tersebut yang kemudian menjadi daerah wabah endemik, seperti halnya yang terjadi di negara Asia Tenggara kini termasuk Indonesia. Pola penularan antar burung liar dan unggas peliharaan ini mengakibatkan kesulitan dalam pemberantasan penyakit AI. *Surveillance* yang lebih spesifik terhadap burung liar perlu dilakukan agar dapat diketahui sejauh mana dan burung apa saja yang dapat bertindak sebagai *carrier* (Webster , 1995; Swayne,2003; Fouchier,2003)

## 2.6. Kejadian AI A/H5N1 pada Manusia

Wabah AI yang disebabkan virus HPAI A/H5N1 pada unggas di Asia bermula sejak pertengahan tahun 2003, namun kasus kejadian AI A/H5N1 pada manusia dilaporkan pertama kali pada tahun 1997 dengan 6 kematian dari 18 kasus. Selanjutnya diketahui adanya kasus AI A/H5N1 pada manusia biasanya berhubungan dengan kasus AI pada unggas. *Case Fatality Rate (CFR)* infeksi AI A/H5N1 pada manusia rata-rata 63 %, CFR terendah sebesar 44 % di Mesir dan tertinggi di Indonesia sebesar 81,8 %

(Briand, 2008). Kasus AI A/H5N1 hingga tahun 2008 sebanyak 387 kasus yang dikonfirmasi dari laboratorium rujukan WHO, penularan primer dari unggas, kasus terjadi secara sporadis dan beberapa kejadian *family cluster*, kasus penularan antar manusia masih terbatas (Briand, 2008). Kasus AI A/H5N1 pada manusia di Indonesia terjadi pertama kali pada bulan Juni tahun 2005, dan pada tahun-tahun selanjutnya menjadi kasus terbanyak di dunia. Menurut Briand (2008) kasus AI A/H5N1 di Indonesia terjadi sepanjang tahun dengan sedikit peningkatan pada awal tahun, pola kejadiannya sesuai dengan wabah musiman influenza (*seasonal influenza*) mirip dengan kejadian di Mesir (Briand, 2008).

Berdasarkan *update* dari WHO tanggal 26 Januari 2009, kasus AI A/H5N1 pada manusia mencapai 252 kematian dari 400 kasus, termasuk jumlah kasus kejadian pada manusia di Indonesia sebesar 115 kematian dari 141 kasus (WHO, 2009).

Manusia penderita AI A/H5N1 mayoritas adalah anak-anak dan orang dewasa muda yang sehat. Saat ini telah diketahui adanya *barrier species* yang signifikan, penularan virus A/H5N1 dari unggas kepada manusia tidak mudah. Kebanyakan, tidak semuanya, dari kasus kejadian tersebut berhubungan dengan adanya kontak yang sangat dekat dengan unggas sakit baik yang masih hidup atau yang sudah mati, atau adanya kontak dengan sekresi/cairan dari unggas penderita flu burung. Penyakit AI pada manusia yang disebabkan oleh virus A/H5N1 diikuti dengan perkembangan penyakit yang luar biasa yaitu dengan menurunnya kondisi pasien secara cepat dan tingkat kematian tinggi. Kelainan utama penyakit AI pada manusia yang sering ditemui adalah radang paru-paru dan kerusakan/gangguan organ dalam (WHO, FAO, INFOSAN, 2005).

Dampak selanjutnya penyakit AI bagi kesehatan manusia yang bahkan sangat besar kemungkinannya akan terjadi adalah, terjadinya mutasi virus A/H5N1 menjadi sangat ganas bagi manusia dan terjadinya penularan dari manusia ke manusia. Bila perubahan tersebut terjadi, maka itu merupakan tanda dimulainya pandemi influenza. Hal tsb bisa terjadi setiap saat seiring dengan adanya kontak antara manusia dengan unggas penderita flu burung oleh virus H5N1. Oleh karena itu, yang perlu diusahakan adalah adanya perubahan cara hidup manusia, utamanya mereka yang berhubungan dengan penyediaan rantai makanan asal unggas, sehingga dapat menurunkan

kesempatan terjadinya pandemi influenza. Tindakan yang juga tidak kalah pentingnya adalah kontrol penyakit AI secara kontinyu pada populasi hewan sumber penyakit flu burung H5N1. (WHO-FAO-INFOSAN, 2005).

## **2.7. Diagnosa Avian Influenza**

### **2.7.1. Diagnosa Klinis**

Diagnose atas dasar gambaran klinis tidak selalu mudah dilakukan. Hal ini sangat tergantung pada faktor virus dan hostnya. Pada umumnya, ayam yang terinfeksi selain gejala umum seperti lesu, kelemahan dan anoreksia juga akan menunjukkan gejala yang lebih khas, yaitu gangguan pada sistim respirasi berupa bersin, ngorok dan sesak nafas. Kebengkakan dapat terjadi pada daerah kepala, sianotik pada muka, jengger dan pial. Perdarahan subkutan, terutama pada kaki sering dapat diamati. (OIE, 2008).

### **2.7.2. Diagnosa Laboratoris**

#### **2.7.2.1. Rapid Test**

Rapid Test mulai banyak digunakan untuk diagnosa penyakit AI secara cepat. Semula Rapid Test hanya digunakan secara terbatas untuk manusia, namun karena keperluan yang mendesak, kini digunakan juga untuk unggas. Uji ini praktis, dijual secara komersial sebagai kit dan dapat dilakukan dilapangan serta cukup akurat. Hasil yang didapat bisa diperoleh setelah 30 menit, sehingga dapat dilakukan tindakan veteriner lebih lanjut. Uji ini didasarkan atas prinsip *immunoblot*. Spesifitas terbatas hanya pada tipe dari virus Inflenza, sedangkan suptipe tidak dapat dibedakan, karena prinsip uji ini adalah pada deteksi nukleoprotein virus. Sampel yang digunakan bisa usapan atau kerokan rongga hidung dan trachea atau usapan kloaka atau feses. (OIE, 2008)

#### **2.7.2.2. Uji Imunofluorosensi**

Uji Imunofluorosensi atau *Immunofluorescence assay* dapat digunakan baik untuk deteksi virus dalam spesimen klinis maupun hasil biakan virus asal kultur sel atau telur ayam bertunas. Spesimen klinis harus diperoleh secepatnya setelah munculnya simtoma, karena jumlah sel yang terinfeksi akan menurun selama perjalanan penyakit.

Hasil pemeriksaan akan lebih baik apabila bahan pemeriksaan sudah dikultur lebih dahulu untuk memperbanyak virus (OIE,2008).

#### **2.7.2.3. Isolasi virus**

Dasarnya metode ini adalah dignosa kausal, yaitu mendapatkan virus dari suspect penderita. Pada hewan yang sakit, sampel dapat berupa usapan hidung dan trachea atau sekreta dari hidung serta usapan kloaka atau feses. Pada hewan yang telah mati, dapat sampel diambil dari berbagai organ, misalnya paru, trachea, limpa, pankreas dan otak. Setelah organ/sampel dibuat suspensi, ditanam pada telur ayam berembrio (TAB) umur 10 hari atau pada sel MDCK. Virus yang diperoleh untuk selanjutnya dapat diidentifikasi dengan Uji HA/HI, Uji Imunofluorosensi, atau RT-PCR. Cara ini memiliki nilai diagnostik yang tinggi tetapi hasil yang didapat berkisar antara 7-10 hari. Kegagalan isolasi virus sering sebagai akibat hambatan dalam pengiriman sampel (OIE, 2008; WHO, 2005).

#### **2.7.2.4. RT-PCR**

Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik yang baik untuk identifikasi genom virus. Karena genom virus AI ini adalah single-stranded RNA, kopi dari DNA (cDNA) harus disintese lebih dahulu menggunakan *reverse transcriptase (RT) polymerase*. Dalam melakukan amplifikasi genom diperlukan sepasang primer oligonucleotide yang didesain atas dasar sekwen HA dan NA dari virus AI subtipe H5N1 dan selanjutnya akan memperbanyak RNA spesifik untuk satu subtipe. DNA yang diperoleh untuk selanjutnya dengan elektroforesis dapat diketahui besaran basepair berupa *band* atau pita setelah dilakukan pewarnaan. Bila diperlukan, DNA ini dapat dianalisa menggunakan metode teknik genetika molekuler, misalnya *sequencing*. Metode ini sangat spesifik dan hasil dapat diperoleh setelah 2-3 hari (WHO, 2005).

#### **2.7.2.5. Serologis**

##### **2.7.2.5.1. Uji Hemagglutinin Inhibition (Uji HI)**

Dasar dari uji ini adalah sifat Hemagglutinin (HA) virus influenza yang mampu mengaglutinasi eritrosit dari unggas atau manusia. Sifat uji HI spesifik terhadap antibodi anti-H5, sehingga daya hemagglutinasi dari virus AI-H5 dapat dihambat oleh antibodi.

Titer diekspresikan sebagai pengenceran tertinggi dari serum yang masih mampu menghambat hemaglutinasi oleh virus AI-H5. Hewan yang memiliki titer  $\geq 4$  (log<sub>2</sub>) dinyatakan sebagai positif, apabila hewan tidak divaksin. Kriteria lain adalah apabila terjadi kenaikan titer 4x dari dua kali pengambilan serum dengan selisih dua minggu, maka hewan dinyatakan sedang menderita penyakit aktif. Uji ini oleh WHO dan OIE direkomendasikan sebagai uji standart. (OIE,2008;WHO, 2005).

#### **2.7.2.5.2. Uji Agar Gel Immunodiffusion (Uji AGID)**

Dasar dari uji AGID adalah terjadinya presipitasi antara antigen dan antibodi yang homolog. Kemampuan yang terbatas hanya pada pengenalan nucleoprotein, merupakan suatu kelemahan dari uji ini, sehingga hanya berguna sebagai uji skrining. Uji ini ideal apabila jumlah sampel serum yang akan diperiksa banyak. Sifat uji ini hanya sebagai uji kualitatif, sehingga titer antibodi tidak dapat diketahui (OIE, 2008; WHO, 2005).

## **BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

### **3.1 Tujuan Penelitian**

#### **3.1.1 Tujuan Umum**

Tujuan Umum dari penelitian ini adalah :

1. Mencari *seed virus* vaksin yang tepat dalam rangka pembuatan vaksin AI A/H5N1 untuk unggas yang protektif sehingga dapat mengatasi wabah endemik AI pada unggas, sehingga menghilangkan sumber infeksi bagi manusia.
2. Membantu program pengamatan, pengendalian dan pencegahan wabah endemik AI A/H5N1 yang berpotensi mengganggu stabilitas sosial-ekonomi di masyarakat perunggasan pada khususnya dan pada masyarakat konsumen bahan pangan asal hewan pada umumnya.

#### **3.1.2 Tujuan Khusus**

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

1. Melakukan analisa profil antigenitas dan molekuler virus AI A/H5N1 strain Indonesia untuk mencari *seed virus* AI strain Indonesia
2. Menentukan kandidat virus AI A/H5N1 dengan sifat yang protektif dan aman terhadap virus AI A/H5N1 yang bersirkulasi di lapangan.

### **3.2 Manfaat penelitian**

Manfaat penelitian ini adalah :

1. Mengetahui reaktivitas heamagglutinin berbagai isoalt virus AI/H5N1 yang diisolasi di Indonasi pada tahun 2003 hingga 2008
2. Dapat menentukan *seed virus* yang mempunyai reaktivitas heamagglutinin terbaik terhadap virus AI/H5N1 yang diisolasi dari tahun 2003 – 2009, yang dapat dijadikan kandidat dalam pembuatan vaksin AI-H5.
3. Diharapkan *seed virus* AI-H5 yang terpilih untuk dijadikan kandidat dalam pembuatan vaksin AI-H5, dapat memberikan protektivitas terhadap visus AI/H5N1 yang saat ini bersirkulasdi di Indonesia.

## BAB IV. METODE PENELITIAN

### 4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik, yaitu untuk mendiskripsikan tentang protein antigenik HA dan kemungkinan adanya perbedaan reaktivitas Hemaglutinin virus Avian Influenza antar isolat lapangan, sehingga penelitian ini termasuk penelitian diskriptif.

### 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Departemen Mikrobiologi (Laboratorium Virologi dan Imunologi) serta Laboratorium Biomolekuler pada Fakultas Kedokteran Hewan - Universitas Airlangga. Pemeliharaan Ayam untuk pembuatan antiserum dilakukan di kandang serba guna milik Fakultas Kedokteran Hewan- Universitas Airlangga. Koleksi virus AI isolat lapangan yang akan digunakan dalam penelitian ini diisolasi sejak Oktober 2003 sampai Desember 2008 (lihat Tabel 1) Penelitian dilakukan mulai awal Mei sampai akhir Oktober 2009 .

**Tabel 1. Isolat virus influenza A/H5 dari berbagai daerah Jawa Timur dari tahun 2003, 2005, 2007 dan 2008 yang dijadikan obyek penelitian**

Tahun Isolasi	Jumlah Isolat
2003	2
2004	5
2005	3
2006	2
2008	27

### 4.3 Tahap Pelaksanaan Penelitian

Sebanyak 39 isolat virus AI A/H5N1 yang telah diisolasi sejak tahun 2003 hingga 2008 digunakan sebagai obyek penelitian. Perbanyakkan virus dilakukan pada Telur Ayam berembrio (TAB) umur 10 hari. Setelah embrio mati atau dimatikan 72 jam *post inokulasi*, cairan alantois dipanen dan dilakukan uji Hemaglutinasi. Selanjutnya penelitian dilakukan dalam tujuh tahap yaitu 1) identifikasi dan peneguhan terhadap virus influenza A/H5; 2) uji HI silang antar lima macam serum hasil imunisasi vaksin

komersial yang berbeda dengan berbagai isolat AI-H5; 3) uji One Step RT-PCR untuk penentuan Subtipe Hemagglutinin (H5) dari masing-masing isolat; 4) penentuan *Mean Death Time* (MDT) dari masing-masing isolat; 5) inaktivasi dan pembuatan antiserum spesifik terhadap masing-masing isolat (immunogenicity); 6) uji reaktivitas silang Hemagglutinin isolat virus dan masing-masing antiserum (*HA cross-reactivity*); dan 7) uji Mikronetralisasi silang isolat virus dan masing-masing antiserum. Secara rinci, pelaksanaan tahapan penelitian diuraikan berikut ini.

**Tahap I.** Identifikasi dan peneguhan terhadap virus influenza A/H5 dilakukan dengan Uji Cepat dan uji Hemagglutinasasi inhibisi (HI). Uji Cepat dilakukan dengan menggunakan Rapid Test Kit *Directigen Flu A+B* buatan Becton and Dickinson bertujuan untuk mengetahui apakah dalam sampel terdapat antigen virus influenza A. Semua isolat yang sudah diuji dengan metode ini dan menunjukkan adanya virus influenza tipe A dilanjutkan dengan uji HI untuk penentuan subtipe H5. (WHO, 2005).

**Tahap II.** Uji HI silang antar lima macam serum hasil imunisasi vaksin komersial yang berbeda dengan berbagai isolat AI-H5. Tujuan uji ini untuk mengetahui adanya isolat AI-H5 yang kurang reaktif dengan serum hasil vaksinasi.

**Tahap III.** Isolat AI-H5 tahun 2003, 2004, 2005 dan 2006 yang terpilih atas dasar tahun dan reaktifitas hemagglutinin diteliti lebih lanjut. Uji *one step RT-PCR* selanjutnya dilakukan untuk memastikan subtipe H5 sesuai Gavin *et al.* dengan bahan-bahan QIAamp Viral RNA Mkini Kit, QIAGEN One Step RT-PCR Kit, Rnase inhibitor (ABI) 20U/ $\mu$ l, dan sepasang primer HA gene H5-1: GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC dan H5-3: CTC CCC TGC TCA TTG CTA TG. Program PCR yang digunakan adalah satu siklus 50<sup>0</sup> C (30') dan 95<sup>0</sup> C (15'), 45 siklus masing-masing 30'' pada suhu 94<sup>0</sup>C, 55<sup>0</sup> C dan 72<sup>0</sup> C, satu siklus pada suhu 72<sup>0</sup> C (7'), dan terakhir pendinginan pada suhu 10<sup>0</sup> C. HA gene yang teramplifikasi mempunyai ukuran sebesar 219 bp.

**Tahap IV.** Isolat terpilih diinaktifkan dengan formalin 0,1 % pada suhu 4<sup>0</sup> C selama semalam kemudian ditambah adjuvan Montanide® 70 buatan Seppic. Pembuatan antiserum spesifik pada ayam umur 4 minggu menggunakan antigen



tersebut. Antiserum dipanen 2 minggu kemudian dan digunakan untuk tahap selanjutnya.

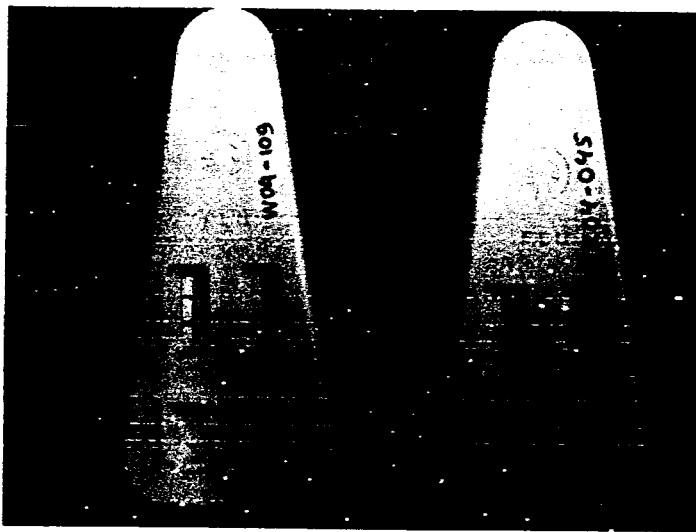
**Tahap V** Dilakukan uji HI untuk mengetahui titer dan reaksi silang antara antiserum spesifik (dari tahap IV) dengan semua isolat virus AI A/H5N1 yang telah dikoleksi. Tujuan tahap ini untuk mengetahui isolat mana yang antiserumnya dapat berreaksi paling baik dengan kebanyakan isolat.

**Tahap VI** Penentuan *Mean Death Time* (MDT) dilakukan untuk mengetahui keganasan virus (*pathogenicity*) dari masing-masing isolat. Uji ini dilakukan secara *in vivo* pada telur ayam bertunas (TAB) umur 9 – 10 hari dengan pengenceran kelipatan sepuluh secara berseri, mulai dari  $10^{-1}$  sampai  $10^{-9}$ . MDT adalah waktu rata-rata kematian embrio dari pengenceran tertinggi dimana semua TAB mati pada pengenceran tersebut. Isolat dengan virulensi rendah lebih diutamakan untuk dijadikan *seed virus*.

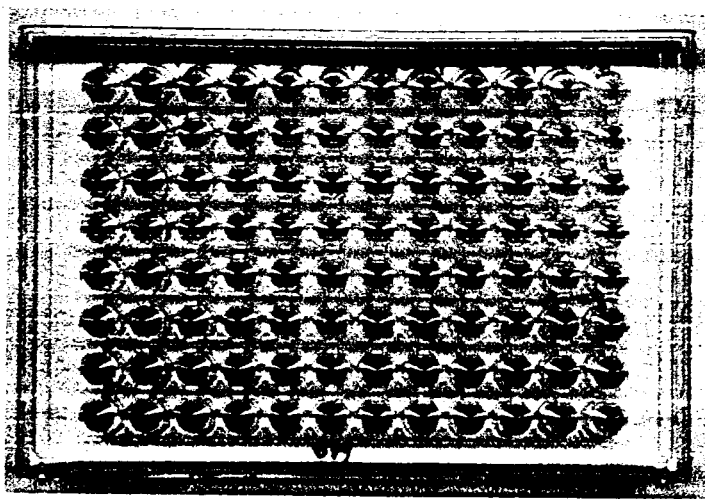
**Tahap VII** Uji netralisasi untuk mengetahui daya netralisasi antiserum spesifik (tahap IV) terhadap isolat virus AI A/H5N1 yang telah dikoleksi. Semua isolat dititer kandungan virusnya kemudian dibuat suspensi virus dengan titer 100 EID<sub>50</sub>/ml. Selanjutnya dibuat pengenceran dari masing-masing antiserum kelipatan dua secara berseri, kemudian ditambahkan virus dengan titer 100 EID<sub>50</sub> selanjutnya dinokulasikan pada TAB. Titer netralisasi adalah pengenceran tertinggi dari serum yang dapat menghambat pertumbuhan virus. Hasil tahap dapat diketahui isolat yang paling besar memiliki sifat netralisasi silang antar isolat.

## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

**Tahap I.** Deteksi adanya orthomyxovirus dalam sampel cairan alantois dilakukan dengan uji HA. Hasil identifikasi isolat virus sebagai Virus AI-H5 dengan uji Rapid test yang bersifat spesifik untuk virus Influenza tipe A (Gambar 1) dan dilanjutkan dengan uji HI yang merupakan uji standart untuk spesifik subtype H5 (Gambar 2) dapat terlihat pada Tabel 2. Semua 39 isolat virus yang di teliti teridentifikasi sebagai virus influenza A/H5.



**Gambar 1. Rapid Test**



**Gambar 2. Uji Hemaglutinasi Inhibisi**

**Tabel 2. Identifikasi isolat virus sebagai virus AI-H5 dengan uji HA, Rapid test dan Uji HI.**

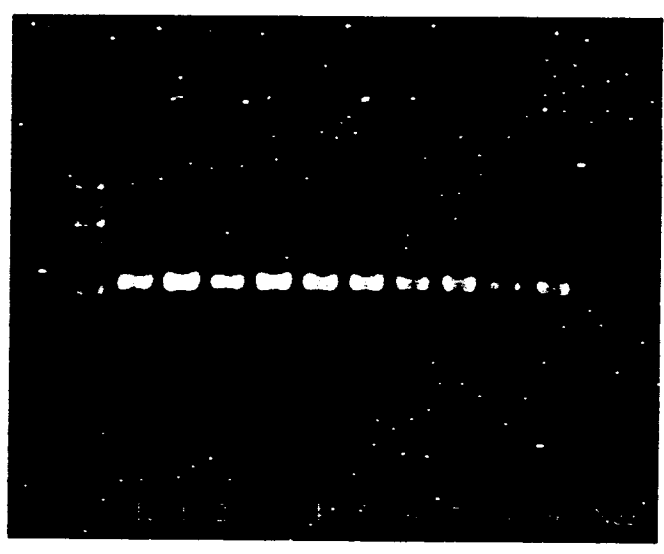
No.	Isolat virus	HA	Rapid test	HI-H5
1	B/03	+	+	+
2	P/03	+	+	+
3	BR1/04	+	+	+
4	BR2/04	+	+	+
5	BR3/04	+	+	+
6	BR4/04	+	+	+
7	W/04	+	+	+
8	J01/05	+	+	+
9	PU/05	+	+	+
10	M01/05	+	+	+
11	S6/06	+	+	+
12	M02/06	+	+	+
13	01W/08	+	+	+
14	02W/08	+	+	+
15	03W/08	+	+	+
16	04W/08	+	+	+
17	05W/08	+	+	+
18	06W/08	+	+	+
19	07W/08	+	+	+
20	08W/08	+	+	+
21	09W/08	+	+	+
22	10W/08	+	+	+
23	11W/08	+	+	+
24	12W/08	+	+	+
25	13W/08	+	+	+
26	01K/08	+	+	+
27	02K/08	+	+	+
28	03K/08	+	+	+
29	04K/08	+	+	+
30	05K/08	+	+	+
31	06K/08	+	+	+
32	07K/08	+	+	+
33	08K/08	+	+	+
34	09K/08	+	+	+
35	10K/08	+	+	+
36	11K/08	+	+	+
37	12K/08	+	+	+
38	13K/08	+	+	+
39	14K/08	+	+	+

**Tahap II** Hasil uji HI silang antar lima macam serum hasil imunisasi vaksin komersial yang berbeda dengan berbagai isolat AI-H5 dapat dilihat pada tabel 3. Tujuan dari tahap ini adalah untuk mengetahui adanya isolat AI-H5 yang kurang reaktif dengan serum hasil imunisasi dengan vaksin komersial yang banyak digunakan. Sampai dengan hari ini 12 macam vaksin AI dari berbagai produsen telah mendapatkan izin edar dari Departemen Pertanian. Adapun dalam penelitian ini, serum yang diperiksa adalah hasil vaksin dengan virus vaksin H5N1 isolat Legok, satu vaksin dengan kandungan H5N9 dan tiga vaksin yang mengandung virus H5N2. Titer HI menunjukkan reaktivitas dari Hemaglutinin virus AI dengan antibodi anti H5. Adanya perbedaan titer antar isolat menandakan bahwa walaupun semua isolat yang digunakan pada penelitian ini adalah virus dengan hemaglutinin dari subtipe 5, tetapi terdapat sedikit perbedaan dalam hal reaktifitasnya. Pada umumnya isolat dari tahun 2008 kurang reaktif bila dibanding isolat sebelum 2008. Selain itu juga dapat ditemukan tiga isolat, yaitu 02W/08, 04W/08 dan 11W/08 yang sangat kurang reaktif, dengan kata lain dapat diartikan bahwa kelima vaksin tidak atau kurang protektif terhadap tiga isolat tersebut.

**Tabel 3. Hasil uji HI silang antar lima macam serum hasil imunisasi vaksin komersial yang berbeda dengan berbagai isolat AI-H5**

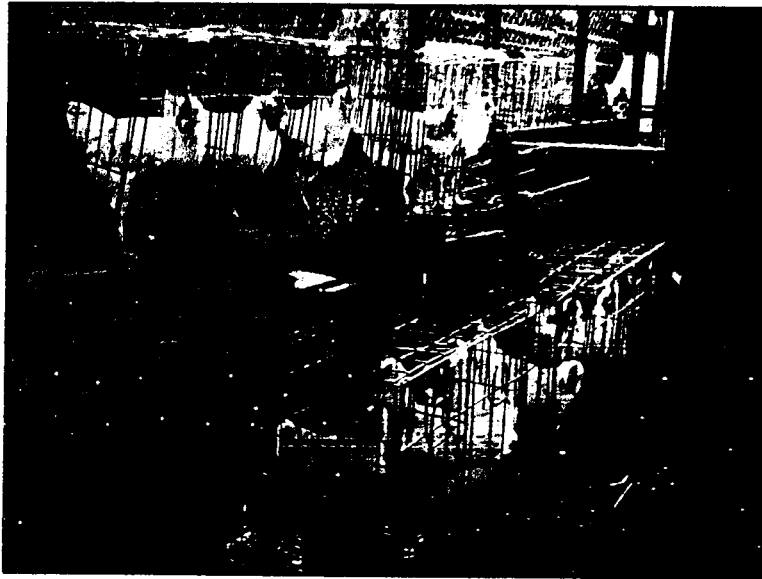
No.	Virus AI-H5	HI-Titer (log <sub>2</sub> )				
		Vaksin A (H5N1)	Vaksin B (H5N2)	Vaksin C (H5N9)	Vaksin D (H5N2)	Vaksin E (H5N2)
1	B/03	7	8	6	8	8
2	P/03	8	9	5	8	8
3	BR1/04	7	7	5	7	7
4	BR2/04	7	7	5	7	7
5	BR3/04	7	7	6	6	7
6	BR4/04	7	7	5	6	7
7	W/04	7	6	6	6	6
8	J01/05	7	7	6	6	6
9	PU/05	6	6	4	6	6
10	M01/05	6	6	5	5	6
11	S6/06	6	6	5	6	6
12	M02/06	6	8	5	6	6
13	01W/08	5	5	3	5	6
14	<b>02W/08</b>	2	2	2	2	2
15	03W/08	7	7	4	7	7
16	<b>04W/08</b>	2	2	3	3	3
17	05W/08	7	7	6	6	6
18	06W/08	8	8	6	6	6
19	07W/08	5	5	5	5	6
20	08W/08	7	8	5	6	6
21	09W/08	7	5	3	5	6
22	10W/08	8	7	5	7	7
23	<b>11W/08</b>	4	4	3	2	2
24	12W/08	7	5	3	5	5
25	13W/08	7	5	4	5	5
26	01K/08	7	7	4	8	7
27	02K/08	8	8	5	7	7
28	03K/08	7	7	4	5	5
29	04K/08	7	6	3	5	6
30	05K/08	8	7	4	6	6
31	06K/08	7	6	5	6	5
32	07K/08	7	6	4	5	6
33	08K/08	7	6	3	4	5
34	09K/08	7	7	4	6	6
35	10K/08	7	5	3	4	5
36	11K/08	7	5	2	4	5
37	12K/08	6	5	2	4	5
38	13K/08	8	8	5	7	8
39	14K/08	7	6	3	5	5

**Tahap III** Isolat AI-H5 tahun 2003 (B/03 dan P/03), tahun 2004 (W/04), tahun 2005 (M01) dan tahun 2006 (S6/06 dan M02/06) yang terpilih atas dasar tahun dan reaktifitas hemaglutinin dijadikan objek penelitian lebih lanjut. Isolat ini dilakukan PCR untuk memastikan sub tipe H5 secara biomolekuler. Hasil PCR dapat dilihat pada Gambar 3. Dari hasil elektroforesis nampak gen HA sebaris dengan kontrol positif. Keenam isolat adalah benar sub tipe H5.



**Gambar 3.** Hasil uji One Step RT-PCR isolat AI-H5 isolat 2003 pada lubang 1 dan 2 (B/03) dan lubang 3 (P/03), isolat tahun 2004 pada lubang 4 dan 5 (W/04), isolat tahun 2005 pada lubang 6 dan 7 (M01), serta isolat tahun 2006 pada lubang 7 (S6/06 ) dan 8 (M02/06). K: Kontrol positif, Neg : Kontrol negatif

**Tahap IV** Enam isolat terpilih diinaktifkan dengan formalin untuk selanjutnya digunakan untuk imunisasi pada ayam (gambar 4). Sampel serum diambil minimal 2 minggu setelah pemberian booster dan dilakukan *bleeding out* untuk mendapatkan serum sebanyak-banyaknya..Untuk mengetahui titer HI antibodi, dilakukan uji HI dan ternyata semua serum memiliki titer lebih dari 7 (log2).



**Gambar 4. Ayam yang digunakan untuk imunisasi**

**Tahap V** Uji HI untuk mengetahui titer dan reaksi silang antara antiserum spesifik (dari tahap IV) dengan semua isolat virus AI A/H5N1 tahun 2003 sampai 2008 yang telah dikoleksi dilakukan uji HI. Berdasarkan hasil yang diperoleh, diketahui antiserum yang bereaksi paling baik dengan kebanyakan isolat (Tabel 4). Tiga isolat dari enam isolat virus AI A/H5 yang diuji ( B/03, M01/06, M02/06) menunjukkan titer serum tertinggi untuk hampir semua isolate AI-H5. Sampai tahap ini tiga isolat ini diharapkan dapat menjadi kandidat seed virus untuk vaksin.

**Tabel 4. Titer HI dari antisera hasil imunisasi lima macam enam isolat dengan berbagai isolat AI-H5.**

No.	Virus AI-H5	HI-Titer Antiserum (log <sub>2</sub> )					
		Anti-B/03	Anti-P/03	Anti-W/05	Anti-M01/06	Anti-S6/06	Anti-M02/06
1	B/03	8	6	7	7	5	6
2	P/03	9	7	8	8	7	8
3	W/04	8	5	7	7	5	7
4	M01/05	8	5	6	7	5	7
5	S6/06	8	6	7	8	6	8
6	M02/06	8	5	6	8	5	8
7	01W/08	7	5	6	7	5	7
8	02W/08	4	3	3	4	4	4
9	03W/08	6	4	4	6	5	6
10	04W/08	3	2	3	3	3	3
11	05W/08	7	6	5	6	6	7
12	06W/08	6	6	6	7	7	8
13	07W/08	6	7	7	8	7	8
14	08W/08	7	6	5	6	6	7
15	09W/08	6	4	5	6	4	6
16	10W/08	7	6	6	7	6	8
17	11W/08	3	1	2	3	2	5
18	12W/08	6	4	4	6	5	7
19	13W/08	5	4	4	6	4	6
20	01K/08	7	6	6	7	5	6
21	02K/08	6	6	6	7	6	7
22	03K/08	6	4	4	6	4	6
23	04K/08	7	6	5	6	6	7
24	05K/08	6	6	5	7	6	7
25	06K/08	6	6	6	7	6	7
26	07K/08	6	4	5	6	4	6
27	08K/08	7	6	6	7	5	7
28	09K/08	7	7	7	9	7	8
29	10K/08	6	4	5	6	4	6
30	11K/08	6	4	4	6	4	6
31	12K/08	6	6	6	7	6	7
32	13K/08	6	4	5	6	4	6
33	14K/08	6	4	4	6	4	6



**Tahap VI** Untuk mengetahui keganasan virus (*pathogenicity*) dilakukan uji *Mean Death Time* (MDT) untuk masing-masing isolat. Mengacu pada virus ND (Newcastle Disease), dikatakan virus termasuk ganas apabila MDT kurang dari 60 jam. Dalam hal ini karena ketiga virus dapat menyebabkan kematian 48 jam post inokulasi (Tabel 5), dapat dikatakan kalau ketiga isolat B/03, M01/05 dan M02/06 adalah virus HPAI (Highly Pathogenic Avian Influenza)

**Tabel 5. Mean Death Time (MDT) dari isolat AI A/H5N1 B/03, M01/05 dan M02/06**

No.	Virus Isolat	MDT (jam)	Keganasan
1	B/03	48	HPAI
2	M01/05	48	HPAI
3	M02/06	48	HPAI

**Tahap VII** Uji netralisasi berguna untuk mengetahui daya netralisasi antiserum spesifik hasil ketiga isolat yang diharapkan menjadi seed virus terhadap beberapa isolat virus AI A/H5N1 yang telah dikoleksi. Dalam uji ini digunakan 3 isolat yang homolog dengan antiserumnya serta 3 isolat AI-H5 lainnya yang memiliki titer rendah dengan antiserum tersebut pada uji HI. Hasil uji netralisasi dapat dilihat pada tabel 6. Virus AI memiliki dua antigen penting pada permukaannya, yakni HA (hemagglutinin) yang penting untuk proses awal dari infeksi virus pada sel, dan NA (neuraminidase) yang memegang peran penting untuk proses pelepasan virus dari sel. Pada uji netralisasi, proses netralisasi oleh antibodi terhadap virus berlangsung *invitro* dan dilanjutkan pemeriksaan secara *inovo*. baik terhadap hemagglutinin maupun terhadap neuraminidase prinsip jika uji reaktifitas hemagglutinin dengan metode HI dapat menunjukkan kemampuan daya netralisasi antibodi terhadap hemagglutinin saja, maka pada uji netralisasi virus yang akan dinetralkan oleh antibodi bukan hemagglutinin tetapi juga neuraminidase. Oleh karena titer netralisasi virus sebanding dengan titer HI, maka hal ini sesuai dengan para ahli yang mengatakan bahwa untuk imunisasi yang penting adalah kecocokan Hemagglutinannya, dan bukan Neuraminidase.

Dari 33 isolat yang diteliti, terdapat tiga isolat, yaitu B/03, M01/05 dan M02/06 yang memberikan reaktifitas redah dengan semua antiserum hasil imunisasi dengan

kelima isolat. Hasil yang serupa juga ditunjukkan oleh ketiga isolat tersebut dengan antiserum hasil imunisasi dengan 5 macam vaksin komersial. Apabila terjadi penularan dengan virus tersebut, maka baik vaksin komersial yang sudah ada maupun vaksin dengan kandungan kandidat seed virus dalam penelitian ini, sama-sama tidak dapat melindungi ayam dari penyakit AI. Dengan ditemukannya isolat-isolat yang memiliki hemagglutinin kurang reaktif terhadap antibodi hasil stimulasi vaksin komersial, perlu dipertimbangkan kebutuhan vaksin AI yang mengandung minimal dua strain H5 yang berbeda agar mendapatkan spektrum proteksi yang lebih luas terhadap penyakit AI.

**Tabel 6 . Uji netralisasi antiserum Anti-B/03, Anti-M01/05 dan Anti-M02/06 terhadap beberapa Isolat A-H5**

No.	Virus AI-H5	Titer Netralisasi Antiserum (log <sub>2</sub> )		
		Anti-B/03	Anti-M01/05	Anti-M02/06
1	B/03	9	7	7
2	M01/05	8	8	7
3	M02/06	8	8	9
4	13W/08	6	6	6
5	11W/08	5	4	6
6	04W/08	5	4	4

## BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 4.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Salah satu kandidat *seed virus* vaksin yang saat ini memiliki potensi untuk dijadikan vaksin AI A/H5N1 untuk unggas yang protektif adalah isolat B/03, M01/05 dan M02/06, sehingga diharapkan dapat mengatasi wabah endemik AI pada unggas, sehingga menghilangkan sumber infeksi bagi manusia.
2. Berdasarkan analisa profil antigenitas dan molekuler pada antigen HA dan antigen NA, diketahui bahwa yang berperan dalam penentuan kandidat *seed virus* untuk pembuatan vaksin AI A/H5N1 adalah antigen HA yang lebih dominan dari pada antigen NA

### 4.2. Saran

1. Perlu dilakukan uji coba isolat *seed virus* A/H5N1 B/03, M01/05 dan M02/06 secara *in vivo* pada unggas dengan ujiantang di laboratorium guna mengetahui tingkat protektivitas sesungguhnya.
2. Selanjutnya, perlu dilakukan uji coba isolat *seed virus* A/H5N1 B/03, M01/05 dan M02/06 di lapangan, pada berbagai kelompok jenis unggas.
3. Perlu difikirkan kemungkinan penggunaan vaksin AI A/H5N1 polivalen berisi 2 macam strain H5 yang berbeda, mengingat ada beberapa isolat lapangan yang tidak bereaksi baik dengan hanya satu jenis *seed virus*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J. 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74 : 3-17.
- Anwar, T., S.K. Lal, and A.V. Khan. 2006. In silico analysis of genes nucleoprotein, neuraminidase and haemagglutinin : A comparative study on different strains of influenza (A) (Bird Flu) virus subtype H5N1. *In Silico Biology* 6 (0015).
- Beard, C.W. 2003. Avian Influenza (Fowl Plaque). Shoutheast Poultry Research Laboratory, Athens, GA.
- Briand, S. 2008. Overview of Human Cases of AI H5N1 since 1997. WHO Global Influenza Programe. FAO-OIE-WHO Joint Technical Consultation on AI at the Human-Animal Interface, 7 October 2008.
- Cox NJ, Fuller F, Kaverin N, Klenk HD, Lamb RA, Mahy BWJ, McCauley J, Nakamura K, Palese P, and Webster R. 2000. Orthomyxoviridae, p. 585-597. *In* M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (ed.), *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, Calif.
- FKH Unair. 2006. Model Vaksinasi Virus Avian Influenza pada Ayam, Unggas Air dan Burung Merpati. Laporan Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Fouchier, R.A.M., V. Munster, A. Wallenstems, T.M. Bestebroer, S. Hersfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A.D.M.E. Osterhaus. 2005. Characterization of novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained black-headed gulls. *J Virol* 79 (5) : 2814-2822.
- Horimoto, T, and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev.* 14 : 129-149.
- Li, K.S., Y. Guan, J. Wang, G.J.D. Smith, K.M. Xu, L. Duan, A.P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T.D. Nguyen, A.T. S. Estoepongestic, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H.T. Long, N.T.H. Hanh, R.J. Webby, L.L.M. Poon, H. Chen, K.F. Shortridge, K.Y. Yuen, R.G. Webster and J.S.M. Peiris. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 430 : 209 – 213.
- Matrosovich, M.N., T.Y. Matrosovich, t. Gray, N.A. Roberts, and H.D. Klenk. 2004. Neuraminidase is important for initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J. Virol.* 78 : 12665-12667.
- OIE. 2008. Highly pathogenic avian influenza. World Organization for Animal Health. <http://www.oie.int/>

- Rahardjo, A.P. 2007. Karakterisasi Protein Virus AI (H5N1) dan uji Reaktifitas Imunologik terhadap Antibodi H5 dari beberapa vaksin yang beredar di Indonesia. Tesis. Program Studi Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Rahardjo, A.P. and A. T. S. Estoepongastie. 2008. Isolation of Avian Influenza Virus A/H5 form Chicken Meat and Chicken Skin during a Natural Outbreak. Proceeding of the 15<sup>th</sup> of the Federation of Asian Veterinary Association (FAVA) and OIE Symposium on 27<sup>th</sup> – 29<sup>th</sup> October 2008 in Bangkok-Thailand.
- Sandbulte, M., G.S. Jimenez, A.C.M. Boon, L.R. Smith, J.J. Treanor, and R.J. Webby. 2007. Cross-reactive neuraminidase antibodies afford partial protection against H5N1 in mice and are present in unexposed human. PLoS Med. 4(2) : February.
- Suzuki, Y., and M. Nei. 2002. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. Mol Biol Evol 19 : 501-509.
- Swayne, D.E. and D.L. Suarez. 2003. Biology of avian influenza specially the change of low pathogenicity virus to high pathogenecity. Proc Latin American Poultry Congress, Oct.7.
- Vines, A., K. Wells, M. Matrosovich, M.R. Castrucci, T. Ito, and Y. Kawaoka. 1998. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. J Virol 72 ; 7626-7631.
- Webster RG. 2004. Wet markets – A continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? Lancet 363 (9404): 234 – 236.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM and Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev. 56:152-179.
- Webster RG and Hulse DJ. 2004. Microbial adaptation and change : avian influenza. Rev. sci.tech.Off. int. Epiz.23 (2) : 453 – 465.
- WHO. 2009. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. Januari 2009.
- World Health Organization (WHO), FAO and INFOSAN. 2005. highly pathogenic H5N1 avian influenza outbreaks in poultry and in humans: Food safety implications. Update of INFOSAN Information Note No. 7/2005 – Avian Influenza, 4 November 2005.
- Zhou, N.N., K.F. Shortridge, E.C.J. lass, S.L. Krauss, , and R.G. Webster. 1999. Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong. J Virol 73 : 3366-3374.

**LAMPIRAN**

**Tabel 7. Rata-rata kematian embrio (Mean death Time = MDT) Isolat virus AI A-H5 B3/03**

Isolat B3/03	Kematian embrio dalam jam					
	No. TAB	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
1	24	24	36	36	48	48
2	24	24	36	48	48	48
3	24	36	36	48	48	60
4	24	36	36	48	48	tm*
5	36	36	36	48	48	tm
6	36	36	36	48	48	tm

\*) tm: tidak mati dalam waktu 120 jam

MDT= (6 x 48) / 6 = 48 jam (rata-rata waktu kematian dalam jam yang disebabkan oleh pengenceran virus tertinggi dimana semua embrio pada pengenceran tersebut mati)

**Tabel 8. Rata-rata kematian embrio (Mean death Time = MDT) Isolat virus AI A-H5 M01/05**

Isolat M01/05	Kematian embrio dalam jam					
	No. TAB	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
1	24	24	36	36	36	48
2	24	24	36	36	48	60
3	24	36	36	48	48	60
4	24	36	36	48	48	60
5	36	36	48	48	48	tm*
6	36	48	48	48	60	tm

\*) tm: tidak mati dalam waktu 120 jam

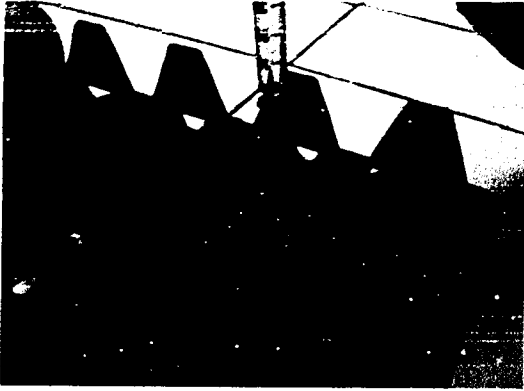
MDT= (1 x 36) + (4 x 48) + (1 x 60) / 6 = 48 jam

**Tabel 9. Rata-rata kematian embrio (Mean death Time = MDT) Isolat virus AI A-H5 M02/06**

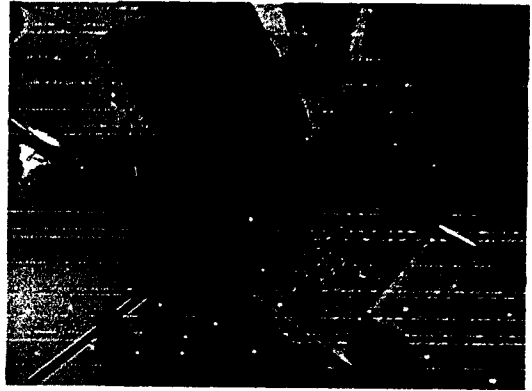
Isolat M02/06	Kematian embrio dalam jam					
	No. TAB	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
1	24	24	24	48	48	48
2	24	24	24	48	48	tm*
3	24	24	36	48	48	tm
4	24	24	36	48	tm*	tm
5	24	36	48	48	tm	tm
6	36	48	48	48	tm	tm

\*) tm: tidak mati dalam waktu 120 jam

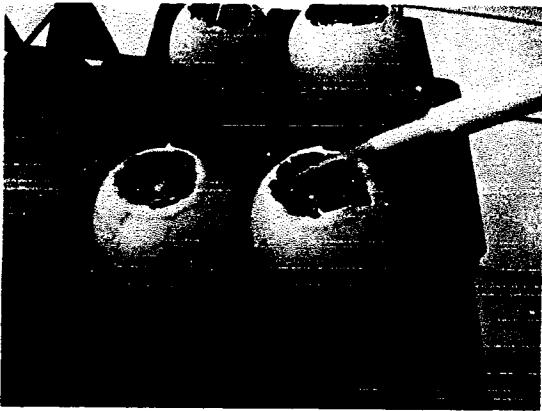
MDT= (6 x 48) / 6 = 48 jam



1



2



3



4

**Gambar 5. Pelaksanaan Penelitian di Laboratorium Virologi, Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga**

**Keterangan : (1). Inokulasi virus AI A/H5N1 pada Telur Ayam Berembryo (TAB) umur 9 – 10 hari; (2). Uji Serologis Hemagglutinasasi Inhibisi (Uji HI); (3). Panen cairan allantois ; (4). Lima jenis vaksin H5 komersial, Antigen A-H5 dan Antiserum A-H5 yang digunakan untuk uji serologis**



## **B. DRAFT ARTIKEL ILMIAH**

# Hemagglutinin Reactivity of Several Avian Influenza H5-Isolates to Vaccinated Chicken Sera

**A.P. Rahardjo<sup>1\*</sup> and AT. Soelih Estoepangestie<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> The Departement of Veterinary Microbiology of Veterinary Medicine Faculty of Airlangga University. C - Campus Unair – Mulyorejo. Surabaya – 60115. Indonesia.

<sup>2</sup> The Departement of Veterinary Public Health of Veterinary Medicine Faculty of Airlangga University. C - Campus Unair – Mulyorejo. Surabaya – 60115. Indonesia.

E-mail: rahardjo\_adi@yahoo.com

\* Corresponding Author

**Keywords:** H5N1 Isolates; AI commercial vaccines; hemagglutinin reactivity; HI-titer

## INTRODUCTION

Since the outbreak of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 in 2003, almost all of the 33 provinces of Indonesia are now becoming as an endemic areas. Vaccination against AI H5 has been used in Indonesia since the first outbreak with the purpose of controlling and eradicating the disease. Potent AI vaccination can increase resistance to infection, prevent disease and less death. Several kind of commercial vaccines against AI has been used, not only the homologous but also the heterologous vaccines. Up to now there is still difficult to eradicate the H5N1 virus in Indonesia. Ongoing antigenic drift especially on the HA-gene of the AI field virus requires changing vaccine strains.

A study about the hemagglutinin reactivity of several Avian Influenza H5 Field-isolates to chicken sera vaccinated using various commercial vaccines used in Indonesia had been done successfully. The aim of the study is to know whether there is still useful to vaccinate poultry with the present AI-H5 vaccines in Indonesia.

## MATERIAL AND METHODS

Five commercial vaccines used in this study were three kinds of H5N2, and each one of H5N1 and H5N9 (Table 1). The H5N1-Field-isolates used in this study were 30 isolates which consists of 12 H5N1-virus isolates from year 2003-2006 and 18 H5N1-isolates from year 2008. Each AI isolate was propagating in 10 days old chicken embryo. Allantoic fluids were harvests and used as HA antigen. After titration, the antigen was standardized to meet 4 HA Unit/25 µl. Antiserum are made from Specific Antibody Negative Chicken. Sera were taken three weeks after the first booster, and collected if the HI titer was 8 log<sub>2</sub> or higher. The hemagglutinin reactivity of the AI-H5 Field Isolates was tested by Cross Hemagglutination Inhibition assay to each antiserum of AI commercial vaccines, and was given as the HI-Titer.

## RESULT AND DISCUSSION

Some variations of HI-titer sera of all five commercial vaccines could be observed as shown in Table 2. The HI-titer of 12 H5N1-isolates from 2003-2006 gave relative higher titer than the other isolates from 2008. The AI-H5 virus 106-M02/08, 070-M10/08 and 028-M06/08 isolated from 2008 have definite lower HI-titer than the others. This result showed that each Avian

Influenza H5 Field-isolates, especially isolated before 2008 have distinct hemagglutinin reactivity. All commercial vaccines used in this study have in general a good protective value against most H5N1 viruses circulating in Indonesia at present. Against the three isolates from 2008, all five commercial vaccine have poor protection. Depending on the ecology of the AI virus, antigenic drift could occurred. The greater the occurrence of the antigenic drift of the field virus, the greater the need of changing vaccine strains every few years. The need of a potential AI vaccine with updated seed virus is necessary.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank The National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Department of Health and Human Services (Contract Number HHSN266200700005C, "NIAID Center of Excellence for Influenza Research and Surveillance") under the Collaborative Project between St. Jude Children's Hospital, University of Hong Kong and Veterinary Medicine Faculty of Airlangga University, and Competitive Research of National Priority (HIBAH Batch I-Nutrition & Health Cluster) The Department of National Education of Republic Indonesia (Contract No. 616/H3.13/PPd/2009), for their financial support. We also wish to thank Dr. Robert G. Webster and Dr. J. S. M. Peiris for fascilitating this interdisciplinary collaboration, and the helpful anonymous reviewers.

## REFERENCES

1. Li, K.S., Y. Guan, J. Wang, G.J.D. Smith, K.M. Xu, L. Duan, A.P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T.D. Nguyen, A.T. S. Estoe pangestie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H.T. Long, N.T.H. Hanh, R.J. Webby, L.L.M. Poon, H. Chen, K.F. Shortridge, K.Y. Yuen, R.G. Webster and J.S.M. Peiris. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 430 : 209 – 213
2. Liu M, S He, D Walker, N Zhou, DR Perez, B Mo, et al. The influenza virus gene pool in a poultry market in south central China. *Virology*. 2003;305:267–75.
3. Office International de Epizootic, 2005. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Version Adopted May 2005. Chapter 2.7.12
4. Peiris et al., 2007. Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health, *Clin Microb Rev* 20(2): 243-267.
5. Rahardjo, A.P., 2007. Protein Characterization of Avian Influenza H5N1 virus and immunological assay to Antibody raised from several commercial AI-vaccine. Thesis, Post Graduate Program, Airlangga University, Surabaya, Indonesia
6. Webster RG. 2004. Wet markets—a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? *Lancet*, 363:234–6. PubMed DOI: 10.1016/S0140-6736(03)15329-9

Table 1. Five commercial avian influenza H5 vaccines used in the study

	Vaccine used				
	Vaccine A	Vaccine B	Vaccine C	Vaccine D	Vaccine E
Virus content	H5N1	H5N2	H5N9	H5N2	H5N2

Table 2. The Hemagglutinin Inhibition Titer (HI-Titer) of the AI-H5 Field Isolates against five antisera of commercial vaccines

No.	AI-H5 Virus	HI-Titer (log <sub>2</sub> )				
		Vaccine A	Vaccine B	Vaccine C	Vaccine D	Vaccine E
1	A/Ck/Ind/BL/03	7	8	9	8	8
2	A/Ck/Ind/PA/03	8	9	6	8	8
3	BR1/04	7	7	5	7	7
4	BR2/04	7	7	5	7	7
5	BR3/04	7	7	7	6	7
6	BR4/04	7	7	6	6	7
7	W/05	7	6	6	6	6
8	J01/05	7	7	6	6	6
9	PU/05	6	6	4	6	6
10	M01/06	6	6	5	5	6
11	S6/06	6	6	5	6	6
12	M02/06	6	8	5	6	6
13	095-M02/08	5	5	3	5	6
14	106-M02/08	2	2	2	2	2
15	014-M09/08	7	5	3	5	6
16	051-M09/08	8	7	5	7	7
17	070-M10/08	4	4	3	2	2
18	112-M10/08	7	5	3	5	5
19	076-K11/08	7	5	3	4	5
20	078-K11/08	7	5	2	4	5
21	090-K11/08	8	8	5	7	8
22	014-K12/08	7	6	3	5	5
23	144-M12/08	7	5	4	5	5
24	002-K01/08	7	7	4	8	7
25	028-M06/08	2	2	3	3	3
26	059-M06/08	7	7	6	6	6
27	008-M07/08	8	8	6	6	6
28	084-M07/08	5	5	5	5	6
29	073-K08/08	7	7	4	6	6
30	079-K11/08	6	5	2	4	5

## B. DRAFT ARTIKEL ILMIAH

1. Rahardjo, AP and ATS Estoepongastie. Hemagglutinin Reactivity of Several Avian Influenza H5-Isolates to Vaccinated Chicken Sera. Will be held at "International Conference on Animal Health and Human Safety", Putra Jaya Selangor – Malaysia, on 6<sup>th</sup> – 8<sup>th</sup> December 2009.
2. Keterlibatan Mahasiswa S1 Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

No.	Nama dan NIM	Judul Skripsi	Keterangan
1.	Arif Syauqur Rahman  NIM 060513471	Reaktivitas Hambatan Hemagglutinasasi Berbagai Serum post Vaksinasi Menggunakan Vaksin Komersial Terhadap Berbagai Isolat Virus AI H5 dari Ayam	Sedang berlangsung
2.	Ferry Teguh I. N.  NIM 060610164	Aktivitas Hemagglutinin Beberapa Isolat Virus Avian Influenza A H5 dari Unggas Air terhadap serum Hasil Vaksinasi dengan Vaksin Avian Influenza Komersial	Sedang berlangsung
3.	Aditya Chorry Setiawan  NIM 060513466	Analisis Hemagglutinin Isolat Virus Avian Influenza H5 sebagai Langkah Awal Seleksi Kandidat Virus untuk Vaksin Unggas	Sedang berlangsung