

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**



**PENGEMBANGAN VAKSIN FLU BURUNG H5N1 UNTUK
MANUSIA DENGAN MENGGUNAKAN TEKNOLOGI *REVERSE
GENETIC* PADA KULTUR SEL IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)
SEBAGAI BASIS PENGEMBANGAN VAKSIN HALAL
TAHUN KE-1 DARI RENCANA 3 TAHUN**

Prof. Dr. CHAIRUL ANWAR NIDOM, drh., MS (NIDN: 0008035803)

Dr. KADEK RACHMAWATI, drh., M.Kes (NIDN: 0025076801)

MUHAMMAD KHALIIM JATI KUSALA, drh (NIM: 061714453005)

DIBIYAI OLEH :

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

UNIVERSITAS AIRLANGGA

NOVEMBER 2018

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**



**PENGEMBANGAN VAKSIN FLU BURUNG H5N1 UNTUK
MANUSIA DENGAN MENGGUNAKAN TEKNOLOGI *REVERSE
GENETIC* PADA KULTUR SEL IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)
SEBAGAI BASIS PENGEMBANGAN VAKSIN HALAL
TAHUN KE-1 DARI RENCANA 3 TAHUN**

Prof. Dr. CHAIRUL ANWAR NIDOM, drh., MS (NIDN: 0008035803)
Dr. KADEK RACHMAWATI, drh., M.Kes (NIDN: 0025076801)
MUHAMMAD KHALIIM JATI KUSALA, drh (NIM: 061714453005)

DIBIYAI OLEH :

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

UNIVERSITAS AIRLANGGA

NOVEMBER 2018



HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pengembangan Vaksin Flu Burung H5N1 untuk Manusia
Dengan Menggunakan Teknologi Reverse Genetic Pada
Kultur Sel Ikan Zebra (Danio rerio) Sebagai Basis
Pengembangan Vaksin Halal

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. Dr. drh. CHAIRUL ANWAR NIDOM, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0008035803
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Sains Veteriner
Nomor HP : 0811372683
Alamat surel (e-mail) : nidomca@unair.ac.id

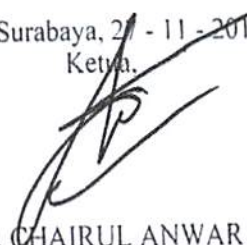
Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr KADEK RACHMAWATI M.Kes
NIDN : 0025076801
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : Drh. Muhammad Khaliim Jati Kusala
NIDN :
Perguruan Tinggi :
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 59,905,000
Biaya Keseluruhan : Rp 180,000,000

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

(Prof. Dr. Puji Srianto, drh., M.Kes)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 21 - 11 - 2018
Ketua.


(Dr. Dr. drh. CHAIRUL ANWAR NIDOM,
M.Si)
NIP/NIK 195803081984031003

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi

(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., PhD.)
NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

**PENGEMBANGAN VAKSIN FLU BURUNG H5N1 UNTUK MANUSIA
DENGAN MENGGUNAKAN TEKNOLOGI *REVERSE GENETIC* PADA
KULTUR SEL IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) SEBAGAI BASIS
PENGEMBANGAN VAKSIN HALAL**

Avian Influenza H5N1 telah menyebar di Indonesia sejak 2003. Virus Avian influenza H5N1 sebenarnya menginfeksi berbagai hewan, termasuk burung, mamalia dan lainnya. Sejak 2005, virus flu burung telah menginfeksi manusia. Menurut data, ada 132 orang yang diduga tertular virus ini, dan ini adalah salah satu kasus tertinggi wabah flu burung H5N1 di dunia. Salah satu sarana perlindungan terhadap infeksi adalah vaksinasi. Hingga saat ini belum ada vaksin influenza H5N1 yang masih ada, karena virus memiliki tingkat patogenisitas yang tinggi, yang membuatnya sulit memperoleh hasil tinggi dari *seed* vaksin (Reviany dkk, 2017).

Avian influenza (AI) merupakan penyakit unggas menular yang disebabkan oleh virus AI tipe A dari famili Orthomyxoviridae. Berdasarkan patogenisitas virus AI dibedakan menjadi *highly pathogenic avian influenza (HPAI)* dan *low pathogenic avian influenza (LPAI)* (Eko Agus Srihanto dkk, 2015). Virus *avian influenza (AI)* terbagi atas tiga tipe, yaitu tipe A, B, dan C, berdasarkan atas perbedaan antigen pada protein inti (nucleoprotein) dan protein matriks. Virus influenza-A adalah virus yang paling virulen dari tiga tipe influenza tersebut. Virus influenza A dikelompokkan berdasarkan pada dua antigen permukaan virus, yaitu protein hemagglutinin (HA) dan protein neuraminidase (NA), yang sampai saat ini telah ditemukan 18 HA (H1-H18) dan 11 NA (N1-N11) (Teuku Zahrial Helmi dkk, 2016)

Tataran ke halal-an telah menjadi perhatian tersendiri, mengingat pengguna vaksin sepertiga penduduk dunia beragama Islam Virus Flu Burung H5N1 dengan tingkat patogen yang rendah tidak dapat dikembangkan dengan menggunakan teknik konvensional. Penemuan dan penerapan teknologi reverse genetic virus influenza telah merevolusi praktik pengembangan vaksin Flu Burung H5N1 (Horimoto T & Kawaoka Y, 2006).

Hal ini menyebabkan peningkatan produksi Virus Flu Burung H5N1, merupakan generasi virus rekombinan untuk vaksin terbatas pada sejumlah sel mamalia terpilih seperti sel African green monkey kidney epithelial cells (sel Vero)

atau sel Madin Darby Canine Kidney (MDCK)(Murakami S et al, 2008). Saat ini beberapa pendekatan inovatif yang prospektif untuk pengembangan vaksin pandemik, antara lain vaksin yang berbasis sel kultur sehingga pengembangan vaksin Flu Burung H5 berbasis sel kultur khususnya yang berbasis kehalalan sangat diperlukan. Salah satu sel kultur yang bisa diharapkan sebagai basis kehalalan adalah Ikan Zebra.

Tujuan Penelitian ini adalah untuk melakukan pengembangan Produksi vaksin Flu burung H5N1 *reverse genetic* dengan menggunakan sel ikan zebra (*Danio rerio*). Virus Flu Burung yang digunakan dalam penelitian ini adalah virus Flu Burung H5N1 reverse genetic yang diperoleh dari stok virus Laboratorium Professor Nidom Foundation (PNF), kemudian virus dikembangkan dalam kultur sel. Sel yang digunakan adalah sel kultur yang berasal dari ikan zebra (*Danio rerio*). Setelah itu dilakukan pengujian Hemaglutinin (HA) mikroteknik. Sampel yang menunjukkan hasil positif pada uji HA yang telah dikonfirmasi dengan uji HI selanjutnya dilakukan ekstraksi RNA Setelah dilakukan ekstraksi RNA tahap berikutnya adalah amplifikasi PCR. Produk PCR yang dihasilkan harus dipurifikasi terlebih dahulu untuk persiapan sekuensing. Sekuensing nukleotida ini dilakukan tiga tahap, tahap pertama adalah melakukan tahap labeling yaitu DNA yang sudah murni dilabel dengan *Big Dye Terminator* kit versi 3.1 Penambahan reagen ini bertujuan untuk memberikan fluoresensi yang digunakan untuk membedakan urutan nukleotida. Tahap kedua yaitu melakukan hasil purifikasi cycle sequencing menggunakan *Big Dye X Terminator* yang bertujuan untuk memurnikan nukleotida dan menghilangkan *Big Dye Label* yang tersisa. Setelah itu, tahap terakhir yaitu melakukan sekuensing dengan menggunakan mesin sequenser ABI 310 xL *GENETIC ANALYSER* (Applied Biosystems, Inc).

Target luaran yang di capai adalah Mendapatkan virus *Reverse genetic* yang telah beradaptasi pada sel ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai seed vaksin yang halal untuk manusia.

Kata Kunci : H5N1, Sel Kultur, Ikan Zebra, *Reverse Genetic*, Vaksin

PRAKATA

Laporan ini merupakan Laporan Akhir Tahun Penelitian Pendidikan Magister Menuju Doktor Sarjana Unggul (PMDSU) yang berjudul :

PENGEMBANGAN VAKSIN FLU BURUNG H5N1 UNTUK MANUSIA DENGAN MENGGUNAKAN TEKNOLOGI *REVERSE GENETIC* PADA KULTUR SEL IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) SEBAGAI BASIS PENGEMBANGAN VAKSIN HALAL

Kegiatan penelitian ini bertujuan untuk meneguhkan salah satu kekuatan Universitas Airlangga melalui Program Pendidikan Magister Menuju Doktor Sarjana Unggul (PMDSU) Universitas Airlangga dalam bidang pengkajian dan penelitian vaksin untuk kesehatan manusia, dalam arti pencegahan suatu penyakit jauh lebih strategis.

Segala usaha dalam penelitian diharapkan dapat memberikan kontribusi pada proses pembangunan manusia Indonesia dan dunia yang sehat dari ancaman penyakit infeksi Flu Burung. Atas bantuan semua pihak diucapkan terima kasih

Surabaya, 28 November 2018

Penyusun

DAFTAR ISI

Halaman Sampul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Ringkasan.....	iii
Prakata.....	v
Daftar Isi.....	vi
Daftar Tabel.....	viii
Daftar Gambar.....	ix
Daftar Lampiran.....	x
Bab I Pendahuluan.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
Bab II Tinjauan Pustaka.....	6
2.1. Vaksin Influenza.....	6
2.1.1. Pengertian Vaksin.....	6
2.1.2 Produksi Vaksin Influenza.....	6
2.1.3. Penggunaan Metode <i>Reverse Genetic</i> pada Pengembangan Vaksin Influenza.....	7
2.2. Virus Avian Influenza.....	9
2.2.1 Etiologi Virus Avian Influenza.....	9
2.2.2. Sifat Virus Avian Influenza.....	10
2.2.3 Patogenitas Virus Avian Influenza.....	12
2.2.4 Gen Hemagglutinin (HA).....	15
2.3 Ikan Zebra.....	16
2.3.1 Taksonomi dan Klasifikasi Ikan Zebra.....	16
2.3.2 Morfologi Ikan Zebra.....	17
2.3.3 Reproduksi Ikan Zebra.....	19
2.3.4 Habitat dan Kebiasaan Makan Ikan Zebra.....	19
Bab III Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	20
3.1. Tujuan Penelitian.....	20
3.1.1. Tujuan Umum.....	20
3.1.2. Tujuan Khusus.....	20
3.2 Manfaat Penelitian.....	20



3.2.1. Manfaat Teoritis.....	20
3.2.2. Manfaat Praktis.....	20
Bab IV Metode Penelitian.....	21
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
4.2. Metode Penelitian.....	21
4.2.1. Kultur Sel.....	21
4.2.2. Preparasi Stok Virus Flu Burung.....	22
4.2.3. Kultur Virus pada Sel.....	22
4.2.4. Uji Hemaglutinasi (HA) Mikroteknik.....	22
4.2.5. Ekstraksi RNA.....	23
4.2.6. Amplifikasi PCR.....	24
4.2.7. Gel Elektroforesis.....	24
4.2.7. Purifikasi Hasil PCR.....	24
4.2.8. Sekuensing cDNA.....	25
4.3. Kerangka Alur Penelitian.....	26
Bab V Hasil dan Luaran Yang Akan Dicapai.....	28
5.1. Persiapan Akuarium dan Sampel Ikan Zebra.....	27
5.2. Optimasi Inkubator CO ₂	27
5.3. Pembuatan Kultur Sel Primer Ikan Zebra.....	28
5.4. Hasil Pertumbuhan Kultur Sel Primer Ikan Zebra.....	29
5.5. Hasil Pasase Sel Kultur Primer Ikan Zebra.....	30
5.6. Inokulasi Virus pada Kultur Sel.....	31
5.7. Pewarnaan Kultur Sel Pasca Panen.....	32
5.8. Uji Hemaglutinin (HA).....	33
Bab VI Rencana Tahapan Berikutnya.....	34
Bab VII Kesimpulan dan Saran.....	35
7.1. Kesimpulan.....	35
7.2. Saran.....	35
Daftar Pustaka.....	36
Lampiran.....	41

DAFTAR TABEL

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Representasi diagram dari proses reverse genetic.....	8
Gambar 2.2 Struktur Virus Influenza.....	10
Gambar 2.3 Skema Replikasi virus Influenza.....	14
Gambar 2.4 Siklus Penyebaran Virus Influenza Ke Wilayah Perairan.....	15
Gambar 2.5 Morfologi Ikan Zebra.....	18
Gambar 4.1. Kerangka Alur Penelitian.....	26
Gambar 5.1. Akuarium dan Ikan Zebra.....	27
Gambar 5.2. Proses Optimasi Inkubator CO ₂	28
Gambar 5.3. Proses Pembuatan Sel Kultur Primer Ikan Zebra.....	29
Gambar 5.4. Kultur sel Badan Ikan Zebra.....	29
Gambar 5.5. Kultur Sel Primer Kepala.....	30
Gambar 5.6 Kultur Sel Primer Badan Ikan Zebra konfluen.....	30
Gambar 5.7. Kultur Sel Primer Kepala Ikan Zebra yang telah konflen.....	31
Gambar 5.8. Kultur Sel Primer Ikan Zebra Inokulasi Virus.....	31
Gambar 5.9. Pewarnaan Kultur Sel Primer Kepala Ikan Zebra.....	32
Gambar 5.10. Pewarnaan Kultur Sel Primer Badan Ikan Zebra.....	32
Gambar 5.11. Hasil Uji Hemaglutinin (HA).....	33

DAFTAR LAMPIRAN

Draft Journal..... 41

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Avian Influenza H5N1 telah menyebar di Indonesia sejak 2003. Virus Avian influenza H5N1 sebenarnya menginfeksi berbagai hewan, termasuk burung, mamalia dan lainnya. Sejak 2005, virus flu burung telah menginfeksi manusia. Menurut data, ada 132 orang yang diduga tertular virus ini, dan ini adalah salah satu kasus tertinggi wabah flu burung H5N1 di dunia. Salah satu sarana perlindungan terhadap infeksi adalah vaksinasi. Hingga saat ini belum ada vaksin influenza H5N1 yang masih ada, karena virus memiliki tingkat patogenisitas yang tinggi, yang membuatnya sulit memperoleh hasil tinggi dari seed vaksin (Reviany dkk, 2017).

Avian influenza (AI) merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh virus AI tipe A dari famili *Orthomyxoviridae*. Berdasarkan patogenisitas virus AI dibedakan menjadi *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) dan *low pathogenic avian influenza* (LPAI). Virus AI tipe A dapat menginfeksi unggas, manusia, babi, kuda, dan mamalia tingkat rendah seperti anjing laut dan paus. Sejak pertama dilaporkan di Hongkong tahun 1997, wabah dilaporkan menyebar di negara kawasan Asia Timur dan Asia Tenggara seperti Thailand, Vietnam, Kamboja, dan Indonesia (Eko Agus Srihanto dkk, 2015).

Virus *avian influenza* (AI) terbagi atas tiga tipe, yaitu tipe A, B, dan C, berdasarkan atas perbedaan antigen pada protein inti (*nucleoprotein*) dan protein matriks. Virus influenza-A adalah virus yang paling virulen dari tiga tipe influenza tersebut dan dapat menyebabkan penyakit saluran pernapasan dengan rentang gejala ringan sampai parah dan kadang bersifat fatal (NLPI Dharmayanti dkk, 2016). Virus influenza A dapat menginfeksi berbagai spesies unggas, mamalia, dan manusia, dan merupakan patogen utama yang berperan dalam pandemi influenza di seluruh dunia. Virus influenza A dikelompokkan berdasarkan pada dua antigen permukaan virus, yaitu protein hemagglutinin (HA) dan protein neuraminidase (NA), yang sampai saat ini telah ditemukan 18 HA (H1-H1) dan 11 NA (N1-N11) (Teuku Zahrial Helmi dkk, 2016).

Awalnya virus influenza di manusia hanya H1N1, H2N2, H3N2. Sejauh ini juga disebabkan oleh virus H5N1, H9N2 dan H7N7. Subtipe yang sangat virulen ialah H5N1, virus tersebut dapat hidup di air sampai 4 hari pada suhu 22° C dan lebih dari

30 hari pada 0° C di dalam kotoran dan tubuh unggas yang sakit virus dapat bertahan lebih lama, virus akan mati dengan pemanasan 60° C selama 30 menit atau 56° C selama 3 jam, detergen, desinfektan misalnya formalin atau iodine (Horimoto et al, 2001).

Penularan AI (H5N1) terjadi karena droplet infection (infeksi akibat percikan cairan hidung/ mulut) baik akibat kontak langsung maupun tidak langsung. Transmisi langsung dapat melalui sentuhan unggas/manusia yang terinfeksi, melalui aerosol. Tempat masuk virus (*port de entry*) ialah mulut, hidung, dan selaput lendir mata. Infeksi dan replikasi primer virus terjadi di sel epitel kolumnar saluran pernapasan menyebabkan kerusakan silia, inflamasi, nekrosis dan deskuamasi epitel saluran pernapasan (WHO, 2005).

Menurut WHO, infeksi AI (H5N1) lebih mudah menular dari unggas ke manusia dibandingkan dengan dari manusia ke manusia. Sampai saat ini diduga dan dikhawatirkan terjadi penularan antar manusia dan bersifat pandemik. Satu-satunya cara virus influenza A (H5N1) dapat menyebar dengan mudah dari manusia ke manusia ialah jika virus influenza A (H5N1) tersebut bermutasi dan bercampur dengan virus influenza manusia.

Indonesia merupakan salah satu Negara yang dinyatakan endemis terhadap virus AI sub tipe H5 pada unggas dan menyebabkan kematian pada unggas setiap tahunnya. Kasus AI sub tipe H5 pada manusia di Indonesia mencapai 199 kasus dengan jumlah kematian 167 orang dari tahun 2003 – 2016 dan infeksiya bersifat fatal atau dapat menyebabkan kematian (CDC, 2016). Upaya awal untuk mengendalikan HPAI / H5N1 di Indonesia didasarkan pada stamping out dan pada tahun 2004, Pemerintah Indonesia mengadopsi program vaksinasi untuk mengontrol penyebaran HPAI / H5N1 di antara sistem produksi dengan *biosecurity* terbatas, termasuk sebagian besar sistem *free-range*, *backyard*, dan sistem semikomersial (Honhold N et al, 2008).

Virus influenza H5N1 dengan tingkat patogen yang rendah tidak dapat dikembangkan dengan menggunakan teknik konvensional. Penemuan dan penerapan teknologi *reverse genetic* virus influenza telah merevolusi praktik pengembangan vaksin influenza H5N1 (Horimoto T & Kawaoka Y, 2006). Kunci ciri evolusi *orthomyxovirus* adalah *reassortment* dari genom virus melalui koinfeksi sebuah sel. Untuk menjadi *transcriptional* aktif, virus influenza memerlukan virus aktif secara fungsional *ribonucleoprotein complex* (RNP) yang terdiri dari RNA genomik viral, *nukleoprotein* (NP), dan RdRp Virus (terdiri dari protein PB1, PB2, dan PA)

(Engelhardt O.G, 2013). Di Indonesia telah berhasil dikembangkan Virus H5N1 yang menginfeksi manusia pada tahun 2007 telah dilakukan upaya pengendalian patogenesis virus Flu Burung dengan metoda Reverse Genetic (Reviany 2015)

Selain itu, tataran ke halal-an telah menjadi perhatian tersendiri, mengingat pengguna vaksin sepertiga penduduk dunia beragama Islam. Beberapa vaksin menggunakan enzim berbasis-*porcine* dalam produksinya, menciptakan kekhawatiran akan "halal" dari vaksin-vaksin tersebut. Namun, terlepas dari fakta bahwa enzim ini digunakan dalam beberapa proses pembuatan vaksin, komite fatwa Islam telah mengizinkan penggunaan vaksin ini (AB Abdullah, 2014).

Ini didasarkan pada beberapa prinsip Islam dalam membedah isu tersebut. Pada "halal" dari produk vaksin itu sendiri, konsep "jumlah kecil" enzim ditambahkan ke kuantitas besar solusi vaksin yang dihasilkan, sejalan dengan konsep "suci" atau "unsur murni" dalam Islam. Kedua, penghapusan enzim yang digunakan dalam produksi akhir juga sejajar dengan konsep "kebersihan dan elemen murni" dalam Islam, sehingga membuat produk akhir sebagai "tidak mengandung" unsur-unsur "non-halal" melalui prinsip dari tampilan, bau dan rasa. Akhirnya, berdasarkan kebutuhan penting menggunakan vaksin dalam pencegahan penyakit dalam situasi di mana kita tidak memiliki alternatif "murni halal" lainnya, ulama Islam telah memutuskan bahwa penggunaan vaksin ini dapat diizinkan sesuai dengan keputusan berdasarkan konsep "dharurah" atau situasi darurat. Namun ada beberapa perbedaan pendapat mengenai hal ini, dimana para ulama yang lebih ketat tidak dapat menerima "hukum" baru ini berdasarkan "ijma" atau "perjanjian" para sarjana, khususnya dalam kaitannya dengan konsep "halal" (AB Abdullah, 2014).

Selain itu proses perbanyakkan seed vaksin bisa melalui metoda *Cell based vaccine* atau *Egg based vaccine*. Vaksin influenza berbasis sel dibuat oleh virus yang tumbuh di sel-sel hewan, yang merupakan proses manufaktur yang berbeda dari proses manufaktur berbasis telur tradisional yang digunakan untuk memproduksi sebagian besar vaksin flu. Teknologi kultur sel berpotensi lebih fleksibel daripada teknologi tradisional, yang bergantung pada pasokan telur yang cukup. Selain itu, vaksin flu berbasis sel yang menggunakan virus vaksin kandidat berbasis sel (*Candidate Vaccine Viruses / CVVs*) memiliki potensi untuk menawarkan perlindungan yang lebih baik daripada vaksin flu berbasis telur tradisional karena lebih mirip dengan virus flu yang beredar (CDC, 2016).

Keuntungan utama teknologi kultur sel termasuk potensi untuk memulai lebih cepat proses pembuatan vaksin jika terjadi pandemi. Sel-sel yang digunakan untuk memproduksi Vaksin Influenza dapat disimpan beku. Perbankan sel menjamin pasokan sel yang cukup sudah tersedia untuk produksi vaksin. Vaksin Influenza berbasis sel yang diproduksi menggunakan virus vaksin kandidat berbasis sel memiliki potensi untuk meningkatkan efektivitas vaksin flu berbasis sel (dibandingkan dengan vaksin flu berbasis telur) dengan menghilangkan jenis-jenis adaptasi telur. yang terjadi pada vaksin flu buatan telur (CDC, 2016).

Banyak jenis sel yang digunakan untuk pengembangan virus influenza antara lain sel MDCK, sel Vero.. Namun telah dilakukan penelitian pendaluan terhadap kemungkinan menggunakan sel ikan dalam pengembangan virus *Avian Influenza H5*. Tetapi pertanyaan utama sejauh mana ikan dan sel ikan bisa terinfeksi oleh virus H5

Penelitian Eissa and Zaki (2012) mengungkapkan terdeteksi adanya virus flu burung subtype H5N1 pada hemolimfa ikan *Red Swamp Cryfish* (*Procamburus clarkia*) pada tiga wilayah perairan yang berbeda di Mesir dan juga ditemukan pada kerang *Cone Shell* (*Conus meditteraneus*).

Hasil penelitian Gabor et.al., 2014 menyatakan bahwa percobaan infeksi ikan zebra (*Danio rerio*) dengan virus influenza musiman didapatkan hasil bahwa ikan zebra positif terkena virus influenza musiman dengan peningkatan titer virus hingga menyebabkan kematian dari waktu ke waktu. Ekspresi replikasi DNA dan RNA virus pathogenesis pada manusia telah ditunjukkan pula pada uji coba di ikan zebra, Beberapa tahun terakhir ikan zebra banyak digunakan sebagai model percobaan biologi terutama dalam bidang imunologi dan onkologi serta sebagai hewan coba untuk penyakit menular baik penyakit ikan maupun penyakit menular pada manusia karena ikan zebra memiliki tubuh yang ideal untuk memvisualisasikan fluorescent virus yang diinfeksi atau sub replicons virus dalam secara in vivo (Goody, 2014). Ikan zebra banyak digunakan sebagai hewan coba karena ukurannya yang kecil, memiliki fekunditas yang tinggi (Brugman, 2012), mudah dilakukan manipulasi genetik dan transgenesis (Gabor et., al, 2014).

Infeksi ikan Zebra dengan virus H5N1 *reverse genetic* telah dilakukan dan menunjukkan bahwa Virus H5N1 bisa menginfeksi ikan Zebra pada hampir semua organ (Reviany et al. 2018)

Kultur sel memiliki peranan yang sangat penting dalam bioteknologi, penerapan kultur sel hewan terutama dimanfaatkan untuk penelitian kanker, pembuatan vaksin,

produksi protein rekombinan, Seleksi dan perbaikan obat, terapi gen, biologi stem sel dan teknologi fertilisasi secara *in vitro*. Menumbuhkan jaringan organisme hidup di luar tubuh dapat dimungkinkan dalam media kultur yang tepat, yang mengandung campuran nutrisi yang diperlukan baik dalam bentuk padat maupun bentuk cair (Oyeleye O, et al. 2016).

Berdasarkan uraian fakta di atas, peneliti akan mengembangkan pengembangan virus Flu Burung H5N1 *reverse genetic* dengan menggunakan sel ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai pengganti sel yang masih diragukan kehalalannya sebagai seed vaksin Flu burung yang halal digunakan untuk manusia di Indonesia dan dunia.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana perkembangan pertumbuhan kultur sel ikan zebra (*Danio rerio*) ?
2. Bagaimana gambaran infeksi virus flu burung H5N1 *reverse genetic* pada kultur sel ikan zebra (*Danio rerio*) ?
3. Bagaimana tingkat pertumbuhan virus flu burung H5N1 *reverse genetic* pada sel ikan zebra (*Danio rerio*) ?

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Vaksin Influenza

2.1.1. Pengertian Vaksin

Vaksin dapat berupa galur virus atau bakteri yang telah dilemahkan, sehingga tidak menimbulkan penyakit. Vaksin dapat juga berupa organisme mati atau hasil-hasil pemurniannya (protein, peptida, partikel serupa virus). Vaksin akan mempersiapkan sistem imun manusia atau hewan untuk bertahan terhadap serangan patogen tertentu, terutama bakteri, virus, atau toksin. Vaksin juga bisa membantu sistem imun untuk melawan sel-sel (kanker) (Stem A.M & Markel H, 2005).

Vaksin adalah bahan antigenik yang digunakan untuk menghasilkan kekebalan aktif pada tubuh. Hal ini dimaksudkan agar tubuh dapat mencegah atau mengurangi infeksi dari suatu penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan virus. Pengertian Vaksin menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 42 tahun 2013 adalah suatu antigen yang berwujud mikroorganisme yang tidak hidup atau sudah mati atau juga yang masih hidup namun dilemahkan, yang beberapa bagiannya masih utuh dan telah di olah. Dapat juga berupa mikroorganisme yang sudah diubah menjadi toksoid ataupun protein rekombinan yang bisa menimbulkan efek kekebalan spesifik terhadap suatu penyakit infeksi tertentu (Sumber Pengertian, 2018).

2.1.2 Produksi Vaksin Influenza

Produksi vaksin cepat dalam menanggapi pandemi baru strain virus influenza sangat penting untuk mengurangi morbiditas dan mortalitas secara global. Beberapa teknologi baru yang meningkatkan proses produksi vaksin telah dijelaskan dalam beberapa tahun terakhir. Penggunaan substrat seluler bisa membuat produksi vaksin virus influenza tidak bergantung pada suplai telur ayam berembrio dan memudahkan proses. Beberapa jalur sel, termasuk *Madin Darbey Canine Kidney* (MDCK), sel Vero (*African Green Monkey*) dan sel Per.C6 (manusia), telah diuji dan dinyatakan untuk produksi vaksin virus influenza. Selain itu, teknologi sintesis gen baru digabungkan dengan *reverse genetic* virus influenza sekarang memungkinkan generasi *seed* vaksin buatan dalam waktu yang sangat singkat (Dormitzer P.R, 2015).

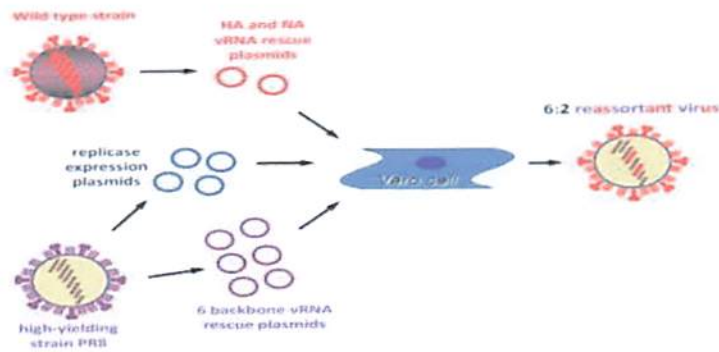
Ekspresi protein rekombinan memiliki beberapa keuntungan untuk produksi vaksin virus influenza pandemi. Ini termasuk produksi vaksin cepat, tidak adanya virus yang menular selama produksi, kemandirian dari persediaan telur, kemudahan

peningkatan, kemampuan menggunakan urutan yang diturunkan langsung dari spesimen klinis tanpa riwayat perkembangan dari telur ayam berembrio atau kultur sel dan untuk banyak sistem ekspresi rekombinan biaya produksi rendah. Kerugian dari pendekatan ini adalah ketergantungan pada satu antigen virus influenza, biasanya haemagglutinin. Oleh karena itu vaksin ini tidak memiliki respon kekebalan multifaset terhadap virus influenza lainnya. Banyak vaksin protein rekombinan, sebagian besar berbasis haemagglutinin, saat ini dalam praklinis dan pengembangan klinis. Selain itu, vaksin musiman trivalen haemagglutinin rekombinan FluBlok, yang diproduksi dalam sel serangga, telah dilisensi oleh *US Food and Drug Administration* dan membuka jalan bagi vaksin pandemi diproduksi dengan cara yang sama (FDA, 2013).

Platform lain yang dikembangkan untuk produksi vaksin virus influenza adalah penggunaan partikel mirip virus (*Virus Like Particles / VLPs*). VLPs dapat diproduksi oleh co-ekspresi protein struktural virus influenza dalam sel mamalia, sel serangga atau tumbuhan (Margine et al, 2012). VLP pandemi influenza vaksin telah teruji secara klinis dan telah menunjukkan keamanan yang baik dan profil kemanjuran (Fries et al, 2013). Selain itu, beberapa vaksin virus influenza pandemi vektor DNA dan virus saat ini dalam praklinis dan pengembangan klinis (Tripp, R. A. & Tompkins, S. M, 2014). Banyak vaksin virus-vektor didasarkan pada virus vaccinia modifikasi Ankara (*Modified Vaccinia Virus Ankara / MVA*) karena profil keamanannya yang sangat baik. Beberapa H5N1 dan konstruksi MVA H7N9 telah diuji pada hewan model dan dapat menginduksi respon imun yang kuat secara seluler dan humoral. Kemanjuran vaksin ini di manusia saat ini sedang diuji dalam uji klinis (Kreitz J.H et al, 2014)

2.1.3. Penggunaan Metode *Reverse Genetic* pada Pengembangan Vaksin Influenza.

Reverse genetic merupakan suatu kreasi dari sebuah virus yang berasal dari *copy cDNA full length* genom viral menjadi suatu klon infeksius dan merupakan alat genetik yang paling kuat pada virologi modern. Berdampingan dengan mutagenesis invitro, *reverse genetic* dapat diaplikasikan secara luas untuk mempercepat perkembangan dalam memahami siklus hidup virus influenza, generasi dari vaksin *live-attenuated* dan penggunaan virus influenza sebagai vaksin dan vektor pengantar gen (Revianny, 2016).



Gambar 2.1 Representasi diagram dari proses reverse genetic dalam menghasilkan suatu 06:02 reassortant virus yang berisi enam segmen genom internal dari PR8 dan dua genom segmen (HA dan NA pengkodean segmen) dari virus lapangan (Neumann et.al, 1999).

Cara di mana teknologi ini dapat digunakan untuk menghasilkan suatu virus reassortants yang memiliki potensi pertumbuhan tinggi didapat dengan cara mencampur secara khusus enam segmen genom internal PR8 (A/Puerto Rico/08/1994), dan dua segmen genom antigen permukaan HA dan NA dari virus lapangan, untuk membuat 06:02 reassortant tertentu. Studi menunjukkan bahwa reverse genetic yang berasal dari virus reassortant 06:02 memiliki karakteristik pertumbuhan sebanding dengan reassortants klasik. Dari sudut pandang praktis, enam segmen gen internal PR8 dapat dipersiapkan sebelumnya dan digunakan sebagai stok dan bila diperlukan dapat segera digunakan; sama untuk empat plasmid mengekspresikan fungsi replikasi. Hanya dua segmen antigen permukaan dari virus lapangan yang harus disiapkan secara kloning ketika strain vaksin baru diperlukan (Reviany, 2016).

Metode lainnya, para peneliti telah merancang sistem regenerasi virus berdasarkan delapan plasmid dan beberapa bahkan lebih sedikit pada plasmid atau vektor lainnya, tetapi pada dasarnya mereka semua beroperasi pada prinsip yang sama untuk mengekspresikan intra-seluler salinan panjang penuh dari delapan segmen genom virus dan helper yang diperlukan fungsi replikasi. Jadi reverse genetic dapat digunakan untuk desain rasional dari vaksin virus influenza reassortant (Ozawa et.al., 2007).

Ada dua keuntungan tambahan dari pendekatan metode *reverse genetic* ini. Pertama, pada pendekatan klasik sampel klinis dari pasien terinfeksi influenza

mungkin berisi virus yang lain sehingga terjadi koinfeksi yang mungkin bereplikasi bersama virus influenza tipe lapangan dan bersifat menetap karena tidak dapat dipisahkan. Ekstraksi dan kloning segmen RNA virus influenza selama pendekatan genetika ini menghilangkan resiko tersebut karena proses yang terlibat dan spesifisitas PCR digunakan selama kloning. Selanjutnya, untuk virus vaksin berasal dari *reverse genetic*, segmen HA dan NA bisa berasal dari virus tipe lapangan diisolasi pada kultur sel yang belum divalidasi untuk bebas dari kontaminasi virus endogen, proses *reverse genetic* akan menghilangkan segala jenis virus endogen seperti materi menular. Keuntungan kedua adalah bahwa ketika genom virus melakukan kloning, urutan genetik dapat dimodifikasi secara rasional untuk memperkenalkan fitur menguntungkan ke dalam virus yang sedang dibuat. Hal ini muncul ke permukaan ketika ancaman pandemi karena flu burung H5N1 muncul pada awal 2004 (Reviany, 2016).

2.2. Virus Avian Influenza

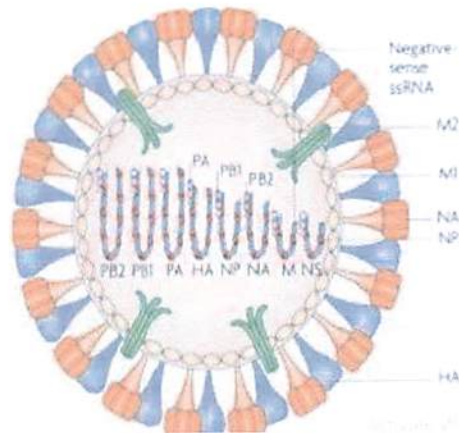
2.2.1 Etiologi Virus Avian Influenza

Penyebab avian influenza (AI) merupakan virus ss-RNA yang tergolong family Orthomyxoviridae, dengan diameter 80-120 nm dan panjang 200-300 nm. Virus ini memiliki amplop dengan lipid bilayer dan dikelilingi sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktivitas hemaglutinasi (HA) dan enzim neuraminidase (NA). Virus influenza dibedakan atas 3 tipe antigenik berbeda, yakni tipe A, B dan C. Tipe A ditemukan pada unggas, manusia, babi, kuda dan mamalia lain, seperti cerpelai, anjing laut dan paus. Tipe B dan C hanya ditemukan pada manusia (Isikhnas, 2015).

Semua virus flu burung diklasifikasikan menjadi influenza tipe A, untuk subtipe selanjutnya dilakukan berdasarkan antigenitas dua glikoprotein permukaan yaitu, hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) (Loeffelholz, 2010). Saat ini telah teridentifikasi 15 HA dan 9 NA dari virus AI. Semua virus dengan semua subtipe HA dan NA telah ditemukan pada semua spesies burung, sedangkan pada mamalia hanya subtipe tertentu saja yang ditemukan dan terbatas (Horimoto and Kawaoka, 2001).

Virus AI tipe A tersusun atas 8 segmen gen yang memberikan 10 sandi protein, yaitu *polymerase basic-2 (PB2)*, *polymerase basic-1 (PB1)*, *polymerase acidic (PA)*, *hemaglutinin (HA)*, *nukleoprotein (NP)*, *neuraminidase (NA)*, *matrix (M)* dan *non-struktural (NS)*. Masing-masing segmen memberikan satu macam sandi protein,

kecuali segmen M memberikan sandi protein M1 dan M2, serta segmen NS memberikan sandi protein NS1 dan NS2. Berat molekul protein berturut-turut adalah: 87, 96, 85, 77, 50-60, 48-63, 24, 15, 26, dan 12 kDa. Protein HA dan NA merupakan protein terpenting di dalam menimbulkan respons imun dan sebagai penentu subtype virus AI. Berdasarkan perbedaan genetik antar virus AI, sehingga sekarang telah diketahui adanya 16 subtype hemagglutinin (H1-16) dan 9 subtype neuraminidase (N1-9) (Isikhnas, 2015).



Gambar 2.2 Struktur Virus Influenza, Sumber : (Horimoto and Kawaoka, 2005)

2.2.2. Sifat Virus Avian Influenza

Virus Influenza pada awalnya bersifat host specific atau virus tertentu hanya spesifik menginfeksi spesies tertentu saja. Spesifik hospes ini ditentukan oleh struktur reseptor yang ada pada sel hospes yaitu asam sialat $\alpha 2,3$ galaktosa yang ditemukan pada unggas dan asam sialat $\alpha 2,6$ galaktosa terdapat pada manusia. Virus Avian Influenza subtype H5 biasanya hanya menginfeksi unggas, sedangkan virus flu H3 menginfeksi manusia. Tahun 2003 ditemukan kasus manusia terinfeksi oleh virus H5N1. Hal ini terjadi karena adanya mutasi pada virus Avian Influenza melalui Antigenic drift dan Antigenic Shift. Babi merupakan mamalia yang bersifat mixing vessel dari virus Avian Influenza dan virus Influenza yang berasal dari manusia (Nidom et al., 2010)

Kemampuan virus Influenza bertahan di lingkungan tergantung pada suhu, pH, salinitas dan keberadaan bahan – bahan organik. Virus ini ditularkan antar burung melalui feses dan mungkin bertahan dalam waktu yang lama dalam lingkungan air. Virus influenza dapat bertahan pada air distilasi lebih dari 100 hari

pada suhu 28°C (82°F) dan 200 hari pada suhu 17°C (63°F). Virus ini juga mampu bertahan pada pepton water pada suhu 4°C (39°C), 30°C (86°C) atau 37°C (98,6°C). Penelitian membuktikan bahwa HPAI H5 dan H7 waktu bertahannya lebih kecil dibandingkan dengan virus LPAI dalam air, walaupun virus tersebut masih mampu bertahan dalam air tawar selama 100 hari atau lebih pada suhu 17°C (63°F) dan bertahan 26 – 30 hari pada suhu 28°C (82°F). Virus Influenza dapat dimusnahkan dengan berbagai jenis desinfektan seperti sodium hypochlorite, etanol 70%, agen oksidan, komponen ammonium, aldehyd (formalin, glutaraldehyd, formaldehyd), fenol, asam, povidone – iodine dan pelarut lipid. Pemanasan juga bisa dilakukan untuk menginaktivasi pada suhu 56°C (133°F) selama minimal 60 menit, radiasi, pH rendah (pH 2) (Apritasari U, 2017).

Antigen permukaan yang dimiliki virus AI dapat berubah secara periodik, dikenal dengan istilah *antigenic drift* dan *antigenic shift*. *Antigenic drift* merupakan perubahan minor antigenik yang terjadi pada satu titik dari gen HA atau NA yang dapat menyebabkan perubahan struktur permukaan virus sehingga antibodi yang telah terbentuk oleh tubuh sel induk semang akibat proses vaksinasi tidak mampu mengenali keberadaan virus tersebut, sedangkan *antigenic shift* merupakan perubahan genetik virus yang lebih besar, meliputi minimal 1 segmen dari 8 segmen genom virus yang memungkinkan munculnya strain atau varian virus baru (Kurniasih, 2015).

Antigenic shift dapat timbul akibat reassortasi genetik (pertukaran atau pencampuran gen) yang terjadi pada 2 atau lebih virus influenza tipe A sehingga terjadi penyusunan kembali suatu galur virus baru yang bermanifestasi sebagai subtipe virus AI baru. *Antigenic shift* terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat dominan pada antigen permukaan HA dan/atau NA, maupun gen-gen internal yang berakibat meningkatnya diversitas virus baik dalam sifat antigenik maupun virulensinya. Selain reassortasi gen, di dalam induk semang baru virus AI juga dapat melakukan adaptasi dan evolusi untuk menghasilkan strain baru yang berbeda dengan virus-virus AI sebelumnya dan lebih virulen. Mutasi pada materi genetik dapat menimbulkan perubahan polipeptida virus, yaitu sekitar 2–3 kali substitusi asam amino per tahun (Kurniasih 2015).

Perubahan antigenik pada virus AI kebanyakan ditemukan pada 2 gen glikoprotein permukaan yaitu gen HA dan NA. Pada glikoprotein HA dikenal 5 epitop daerah antigenik sebagai target netralisasi antibodi. Penentuan 5 epitop tersebut (A sampai E) daerah antigenik tersebut didasarkan pada struktur HA virus AI subtipe

H5N1 (A/goose/Guangdong/1996) yang dipetakan oleh Duvvuri et al. (2009). Pemetaan gen HA pada virus AI subtipe H5N1 yang dilakukan oleh Duvvuri et al. (2009) menyebutkan posisi Antigenic site terletak pada T36, K48, R53, Q115, N124, D126, S128, P136, H138, R140, S141, K152, N182, A185, K189, dan K412 (nomenklatur untuk H5). Perubahan epitop terjadi terus menerus dan pada jangka waktu 2-5 tahun biasanya hanya didominasi oleh satu epitop (Eko A.S dkk, 2015).

2.2.3 Patogenitas Virus Avian Influenza

Virus *Avian Influenza* tetap infeksi dalam feses selama 30 – 35 hari pada temperatur 4°C dan selama 7 hari pada temperatur 20°C. Hal ini menunjukkan bahwa virus *Avian Influenza* dapat bertahan di lingkungan dalam kurun waktu dan suhu tertentu. Sifat tersebut memungkinkan terjadinya penyebaran virus *Avian Influenza* di alam ini. Penularan virus *Avian Influenza* dapat terjadi melalui kontak langsung antara ayam sakit dengan ayam yang peka. Unggas yang terinfeksi virus *Avian Influenza* mengeluarkan virus dari saluran pernafasan, konjungtiva dan feses. Penularan dapat juga terjadi secara tidak langsung misalnya melalui udara yang tercemar material atau debu yang mengandung virus *Avian Influenza* (aerosol), makanan atau minuman, alat atau perlengkapan peternakan, kandang, pakaian, kendaraan, peti telur, *egg tray*, burung, mamalia, dan insekta yang mengandung virus *Avian Influenza* (Hewajuli DA & Dharmayanti NLPI, 2008).

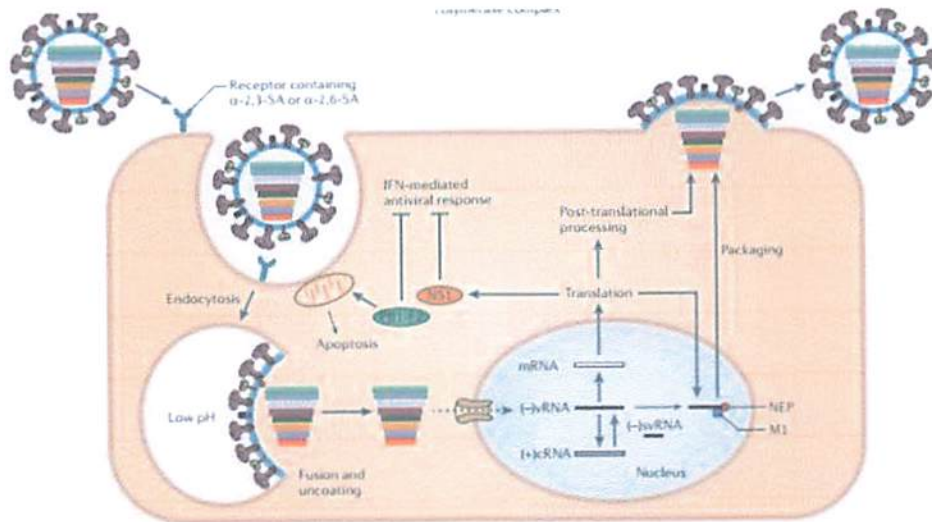
Hospes alami dari virus influenza A adalah burung liar dan unggas air. Pada hospes tersebut, virus ini berada dalam keadaan seimbang dan tidak menimbulkan penyakit. Berdasarkan tingkat infeksi virus AI, maka virus tersebut dapat dikelompokkan atas dua tingkatan infeksi yaitu *highly pathogenic avian influenza (HPAI)* dan *low pathogenic avian influenza (LPAI)*. Tingkatan infeksi HPAI merupakan infeksi yang sangat patogen yang dapat menyebabkan angka kematian sampai 100% (Teuku Z.H dkk, 2016).

Bentuk HPAI ditandai dengan angka kematian hampir 100% pada unggas terutama ayam buras dan ras dengan atau tanpa menunjukkan gejala klinis sebelum terjadi kematian. Di Asia, virus Avian Influenza subtipe H5N1 termasuk virus strain HPAI. Unggas air dan burung liar merupakan reservoir alami HPAI, tanpa menunjukkan gejala klinis, sehingga kedua unggas ini merupakan salah satu media perantara yang dapat menyebarkan virus strain HPAI menjadi semakin luas. Sedangkan bentuk LPAI ditunjukkan dengan gejala klinis yang lebih ringan,

diantaranya gangguan saluran pernafasan, depresi dan penurunan produksi telur. Namun demikian, virus strain LPAI dapat bermutasi menjadi strain HPAI. Proses mutasi ini kemungkinan terjadi setelah virus strain LPAI yang terdapat di unggas liar ditularkan pada unggas peliharaan. Kemudian strain virus ini bersirkulasi selama beberapa bulan dalam unggas peliharaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus strain LPAI mengalami mutasi antigenic drift selama bersirkulasi dalam tubuh unggas peliharaan. Berdasarkan alasan ini maka *World Organization for Animal Health (OIE)* sekarang menetapkan sistem penamaan HPAI dan LPAI menjadi hanya Avian Influenza. Avian Influenza termasuk dalam daftar A di OIE, karena Avian Influenza merupakan suatu penyakit yang sangat berbahaya bagi kesehatan hewan dan manusia (Hewajuli DA & Dharmayanti NLPI, 2008).

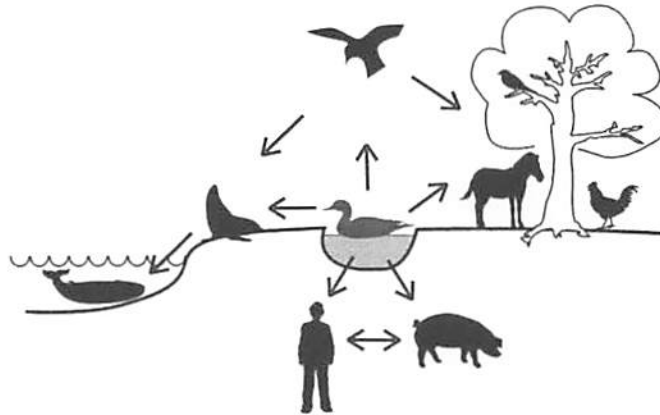
Virus Avian Influenza masuk ke dalam tubuh hospes melalui beberapa tahapan. Virus pertama kali masuk ke dalam sel hospes melekat dengan permukaan sel yang mempunyai reseptor virus asam sialat $\alpha 2,3$ pada unggas atau $\alpha 2,6$ pada manusia dengan protein HA dari virus. Virion masuk ke dalam sel hospes setelah terjadi perlekatan (*attachment*) ke dalam ruang endosome sel hospes yang disebut dengan endositosis. Virus yang sudah masuk mengalami degradasi dengan menyatukan membran virus dan membrane endosom. Proses ini dimediasi oleh pemindahan proton melalui protein Matriks 2 (M2) virus dengan nilai pH endosome sekitar 5,0 (Werner and Harder., 2006).

Kedelapan segmen RNA genomik virus dilepaskan ke dalam sitoplasma kemudian disalurkan ke dalam nukleus untuk melakukan transkripsi mRNA virus dan replikasi RNA. Proses selanjutnya yaitu transkripsi dan translasi. Pada tahap infeksi, hasilnya adalah translasi produk dari protein M1, HA dan NA. HA dan NA merupakan hasil dari *Rough endoplasmic reticulum (RER)*, kemudian akan diproses dalam aparatus golgi dan ditransportasikan ke permukaan sel. RNP-M1 akan berinteraksi dengan protein M1 yang telah terhubung dengan membran plasma dan kemudian terjadi *budding* dan keluar dari sel hospes (Nidom, 2010).



Gambar 2.3 Skema Replikasi virus Influenza. Sumber : (Medina and GraciaSatre, 2011)

Wilayah perairan telah lama dianggap sebagai mekanisme penularan virus flu burung pada burung liar dan biota akuatik. Virus flu burung dapat bertahan pada waktu yang lama tergantung pada kondisi lingkungan seperti suhu, pH dan salinitas. Burung liar menularkan virus flu burung melalui kotoran yang mencemari perairan yang dapat terakumulasi dan menginfeksi biota dalam perairan dan burung di lingkungan wilayah perairan tersebut. Virus flu burung yang terakumulasi dapat ditemukan pada sedimen di perairan dan beberapa invertebrata yang juga bisa dikonsumsi oleh mamalia di lingkungan perairan dan manusia. Mamalia, hewan domestik dan manusia yang memanfaatkan air dalam wilayah perairan yang terinfeksi virus juga dapat tertular virus. Infeksi virus flu burung dapat ditularkan oleh hewan domestik yang berinteraksi dengan mamalia pada wilayah akuatik dan wilayah agrikultur, sehingga dapat menginfeksi manusia di wilayah tersebut (Lahay, 2017).



Gambar 2.4 Siklus Penyebaran Virus Influenza Ke Wilayah Perairan
(Horimoto dan Kawaoka, 2001)

2.2.4 Gen Hemagglutinin (HA)

Hemagglutinin dan neuraminidase memiliki peran penting dalam penetrasi dan replikasi di media pengembangan vaksin dan mengintimidasi munculnya respon imun yang diharapkan. Seperti penelitian sebelumnya telah menunjukkan, peran Hemagglutinin dan neuraminidase selalu sinergis. Protein Hemagglutinin akan mengikat reseptor permukaan dan menyelubungi virus itu menghidrolisis protein hemagglutinin menjadi protein subunit HA1 dan HA2, kemudian berinteraksi dengan membran host dan penyebab fusi membran (Revianny dkk, 2017).

Hemagglutinin (HA) merupakan salah satu protein pada virus Influenza, berperan dalam pengenalan sel hospes dan penting dalam penentuan *host range*. Struktur protein HA yaitu kepala membran distalnya berbentuk bulat, daerah eksternal berbentuk seperti tombol dan mempunyai kemampuan berikatan dengan reseptor sel serta terdiri dari oligosakarida yang menyalurkan derivat asam neuroaminat (Harder and Werner, 2006). Virus musiman pada manusia lebih cenderung mengenali reseptor NeuAca_{2,6}Gal, sedangkan virus pada unggas lebih cenderung mengenali reseptor NeuAca_{2,3}. Sel epitel saluran pernafasan utamanya mempunyai reseptor NeuAca_{2,6}Gal. Golongan unggas mempunyai reseptor NeuAca_{2,3}Gal yang terdapat pada saluran pencernaan dan trakea, sedangkan pada saluran pernafasan babi mempunyai kedua jenis reseptor ini, sehingga menyebabkan babi peka terhadap infeksi baik virus influenza manusia maupun unggas (Horimoto and Kawaoka, 2005).

Pada gen HA terdapat regio yang disebut *cleavage site* yaitu suatu regio dimana pada bagian tersebut terjadi pembelahan gen HA saat infeksi virus AI ke sel inang. Secara struktur berdasarkan jumlah asam amino yang menyusun tempat pembelahan

gen HA maka hal ini akan membedakan virus influenza yang avirulen dan yang virulen. Virus AI yang avirulen biasanya memiliki satu asam amino dasar yaitu arginin (R) yang terdapat pada tempat pembelahan, sedangkan untuk virus yang virulen mempunyai beberapa asam amino dasar yang terletak dekat tempat pembelahan. Pada umumnya virus influenza mempunyai asam amino arginin (R) pada ujung karboksil protein HA1 dan glisin pada ujung amino protein HA2 yang diikuti oleh asam amino lisin (L) (Horimoto dan Kawaoka, 2001).

Hemagglutinin virus akan berikatan dengan reseptor sel dan melepaskan ribonukleoprotein. HA sebagai glikoprotein permukaan yang utama virus Influenza ditranslasi sebagai protein tunggal, HA₀. HA₀ kemudian dibagi menjadi HA1 dan HA2 sehingga virus dapat teraktivasi. Pengaktifan hemagglutinin dilakukan oleh enzim proteolitik endoprotease serine dari hospes di tempat spesifik yang secara normal dikode oleh asam amino dasar tunggal (biasanya arginin). Protein HA1 akan berikatan dengan reseptor pada sel hospes dan merupakan target utama untuk respon imun. Protein HA2 dengan bagian fusigenik di ujung HA2 akan memfasilitasi fusi antara amplop virus dengan membran endosomal hospes. Aktivasi proteolitik protein hemagglutinin merupakan faktor penting untuk infektivitas dan penyebaran virus ke seluruh tubuh. perbedaan kepekaan protein HA virus AI terhadap protease hospes akan berhubungan dengan tingkat virulensi (Apritasari U, 2017).

Pemecahan molekul prekursor HA dengan massa molekul 75 kDa (HA₀) oleh protease sel hospes menjadi sub unit HA1 (massa molekul 55 kDa) dan HA2 mengaktifkan infektivitas virus dan berperan penting pada patogenitas virus Influenza pada manusia dan hospes unggas. Tempat pemecahan HA₀ berada pada tempat yang spesifik dan secara normal dikode untuk asam amino dasar tunggal, biasanya arginin dan terletak antara domain HA1 dan HA2. Ujung N dari subunit HA2 yang baru saja terbentuk membawa peptida fusogenik, yang terdiri dari domain yang sangat lipofilik. Domain ini sangat vital diperlukan selama proses fusi antara membran virus dan membran lisosomal karena akan mengawali proses penetrasi segmen genomik virus ke dalam sitoplasma sel hospes (Harder and Werner, 2006).

2.3 Ikan Zebra

2.3.1 Taksonomi dan Klasifikasi Ikan Zebra

Klasifikasi ikan Zebra menurut Eschmeyer (1997) adalah sebagai berikut ;

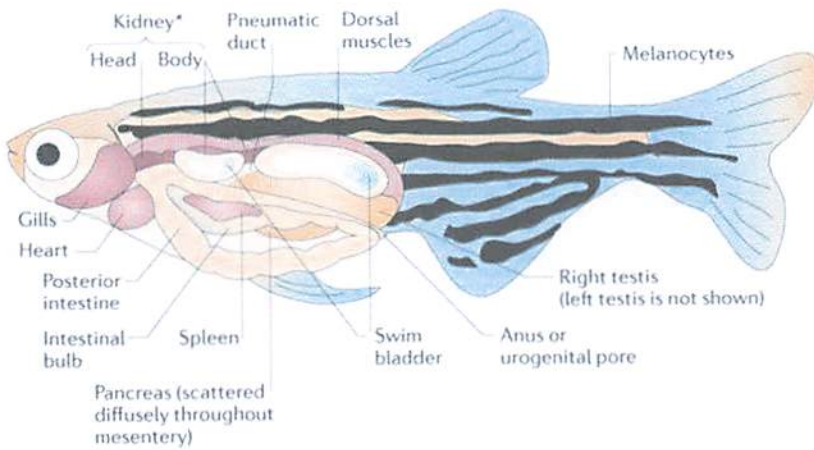
Kingdom : Animalia

Filum	: Chordata
Class	: Actynopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Family	: Cyprinidae
Genus	: Brachydanio
Spesies	: <i>Danio rerio</i>

2.3.2 Morfologi Ikan Zebra

Ikan Zebra merupakan ikan teleostei yang termasuk dalam keluarga cyprinid dan class actynopterygii. Nama ikan zebra digunakan berdasarkan ciri tubuhnya yang memiliki lima garis seragam pada tubuh yang meluas hingga ke sirip anal dan sirip ekor. Ikan zebra memiliki bentuk tubuh fusiform dan lateral dengan mulut pada bagian atas tubuh dengan dua pasang sungut yang berfungsi untuk mencari makanan pada dasar perairan. Garis-garis pada tubuh ikan zebra biasa berwarna hitam biru yang mengandung dua jenis sel pigmen berupa melanophores dan iridiophore sedangkan garis berwarna kuning keperakan mengandung sel pigmen xanthophores dan iridophore. Ikan zebra betina umumnya memiliki ukuran tubuh yang lebih besar dibandingkan ikan zebra jantan dan warna yang lebih pudar. Ikan zebra termasuk ikan yang sangat gesit serta lincah dan tidak memiliki sifat predator (Axelrod, 1982).

Ikan zebra memiliki sirip dorsal atau sirip punggung 8-9, sirip anal atau sirip dubur 15-16, sirip pectoral atau sirip perut 12-13 (Shen, 1993), memiliki 10 hingga 13 buah *gill rakers* pada *gill arch*, terdapat dua *barbles* yaitu *rostral barbles* dan *maxillary barbells*. Barbells ini dimiliki baik oleh ikan zebra jantan maupun betina dengan garis-garis yang sama.



Nature Reviews | Cancer

Gambar 2.5 Morfologi Ikan Zebra (White *et al*, 2013).

Ikan zebra memiliki sirip dorsal (sirip punggung) 8 – 9, sirip anal 15 – 16, sirip pectoral 12 – 13, memiliki 10 – 13 buah *gill rakers* pada *gill arch*. Sistem hemopoietik pada ikan zebra berbeda dengan sebagian besar mamalia, tulang ikan zebra tidak memiliki *medullary cavity*. Jaringan hematopoetik berlokasi di stroma dari limpa dan interstitium ginjal. Sistem respirasi ikan zebra terdiri dari jaringan insang dan gas bladder. Organ penyusun sistem digesti antara lain mulut, faring, gigi, intestine. Insang mempunyai peran yang sangat penting yaitu sebagai alat pertukaran O_2 pada darah. Air yang masuk melalui mulut, melewati insang dan keluar melalui operculum. Air dapat mengalir dikarenakan kontraksi dari rongga mulut dan ruang operkular. Darah yang masuk melalui arteri filament afferent dari lamella primer menuju ke lamella sekunder, dimana CO_2 rilis ke air dan O_2 diambil. Darah yang mengandung oksigen keluar dari lamella sekunder melalui arteri lamella efferent kemudian masuk ke aorta dorsal dan diedarkan ke seluruh jaringan tubuh (Menke et al., 2011).

Jantung dari ikan zebra terletak pada anterior rongga tubuh dan berada di ventral dari esophagus. Darah yang mengandung CO_2 masuk ke dalam atrium melalui katub sino-atrial. Atrium mempunyai dinding yang tebal, berotot, trabekula tebal. Kontraksi dari atrium dan dilatasi ventrikel menyebabkan darah masuk ke dalam ventrikel melalui *atrioventricular valve*. Darah dipompa dari ventrikel dengan tekanan yang tinggi (Apritasari U, 2017).

Mulut dan rongga mulut merupakan gabungan dari system digestif maupun respirasi (Robert and Ellis, 2001). Fungsi digestif dari mulut dan rongga mulut adalah

untuk seleksi, melembutkan dan jalur masuk ke dalam intestine. Mulut dari ikan zebra mempunyai taste bud dan rongga mulutnya terdiri dari epitel mukoid yang tebal dan terdapat sel goblet. *Intestine* dari ikan zebra terdiri dari saluran yang panjang dan terlipat dua kali pada rongga perut. Intestine dibagian anterior berlumen lebar dan semakin mengecil pada rostral-caudal. Tidak ada pembagian lambung, usus kecil dan usus besar dalam hal ini. Hepar dari ikan zebra terdiri dari tiga lobus dan terletak di sepanjang saluran digestif. Hepar ikan mempunyai fungsi yang sama dengan mamalia, yaitu sebagai homeostatis metabolisme tubuh, antara lain memproses karbohidrat, protein, lipid (Arpitasari U, 2017).

2.3.3 Reproduksi Ikan Zebra

Betina dewasa akan menunjukkan papilla genital kecil di depan sirip dubur, reproduksi ikan zebra diawali dengan proses ikan betina melepaskan telurnya pada perairan terbuka yang kemudian akan dibuahi oleh ikan jantan, dan setelah terbuahi telur akan berada di dasar perairan di luar jangkauan induk jantan maupun betina. Pemijahan bisa berlangsung lima hari hingga beberapa minggu, telur ikan zebra memiliki diameter 0,05 hingga 1,37 mm dengan jumlah 300 hingga 500 butir dalam sekali siklus reproduksi (Axelrod, 1982).

Ikan zebra dapat tumbuh dengan panjang sampai 6,4 cm meskipun jarang tumbuh lebih besar dari 4 cm untuk pemeliharaan di dalam akuarium. Pada penangkaran usia ikan zebra dapat mencapai usia dua hingga tiga tahun dan dalam kondisi ideal bisa mencapai lima tahun (Lahay, 2017).

2.3.4 Habitat dan Kebiasaan Makan Ikan Zebra

Ikan Zebra berasal dari Myanmar, India, Srilangka dan sudah tersebar ke seluruh wilayah Asia Tenggara hingga Indonesia, ikan zebra menyukai daerah yang bersuhu dingin (Axelord, 1977) dan dapat dipelihara pada suhu 25 C - 28 C dengan pH 6,5- 7 ppt (alamikan, 2014). Ikan zebra membutuhkan adanya sinar matahari yang cukup dan adanya tanaman air (Widiastuti, 2011).

Ikan Zebra merupakan ikan omnivora yang memakan zooplankton, fitoplankton, serangga, larva serangga hingga cacing dan krustasea kecil yang menjadi sumber makanan bila sumber makanan utama tidak tersedia. Pakan alami larva pertama ikan zebra dapat berupa artemia, rotifer, untuk stadia dewasa dapat berupa cacing sutera dan cacing darah (Lahay, 2017).

BAB III**TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN****3.1. Tujuan Penelitian****3.1.1. Tujuan Umum**

Untuk melakukan upaya pengembangan penelitian sebagai basis produksi vaksin Flu burung H5N1 *Reverse genetic* dengan menggunakan sel ikan zebra (*Danio rerio*).

3.1.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis perkembangan pertumbuhan kultur sel ikan zebra (*Danio rerio*).
2. Menganalisis gambaran infeksi virus flu burung H5N1 reverse genetic pada kultur sel ikan zebra (*Danio rerio*).
3. Menganalisis tingkat pertumbuhan virus flu burung H5N1 reverse genetic pada sel ikan zebra (*Danio rerio*).

3.2 Manfaat Penelitian**3.2.1. Manfaat Teoritis**

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah mengenai perkembangan virus flu burung H5N1 pada sel ikan zebra (*Danio rerio*) sehingga dapat digunakan sebagai acuan basis pengembangan produksi vaksin halal flu burung H5N1 dengan menggunakan sel ikan zebra (*Danio rerio*).

3.2.2. Manfaat Praktis

Kultur Sel Ikan Zebra (*Danio rerio*) dapat digunakan sebagai alternatif media kultur untuk virus Flu Burung H5N1 *Reverse Genetic* yang diharapkan mampu memberikan solusi terhadap upaya pengembangan vaksin dengan menggunakan media kultur sel halal yang selama ini masih menggunakan kultur sel yang berasal dari non halal.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan rancangan penelitian eksperimental eksploratif laboratorium. Penelitian ini dilakukan dua tahapan, tahap pertama menyiapkan kultur sel ikan zebra dan tahap kedua menginokulasikan dan mengembangkan virus H5N1 reverse genetic pada sel ikan zebra (*Danio rerio*). Proses penelitian dimulai pada bulan Mei 2018 hingga Desember 2021. Pembuatan kultur sel ikan zebra (*Danio rerio*) dimulai pada bulan Agustus 2018 dan Pengembangan inokulasi virus H5N1 reverse genetic dilakukan di Laboratorium Professor Nidom Foundation (PNF).

4.2. Metode Penelitian

4.2.1 Kultur Sel

Menimbang Ikan yang akan digunakan $\pm 5,1$ gram sama dengan 20 ekor ikan. Kemudian melakukan *euthanasia* terhadap Ikan zebra dewasa dengan memasukkan ke dalam air es. Setelah ikan pingsan, kemudian ikan di potong menjadi dua bagian yaitu bagian kepala(mata dihilangkan) dan bagian badan, kemudian masukkan ke dalam petridisk dan dibilas dengan phosphate-buffered saline (PBS) sterile (13mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, 135mM NaCl, 2.5mM KCl; pH 7,0) sebanyak 3 kali. Kemudian pisahkan kedua bagian tersebut dan masing-masing bagian masukkan ke dalam *syringe* dan tekan kuat-kuat masukkan ke dalam *bekker glass* yang terdapat stirer di dalamnya. Tambahkan larutan Trypsin EDTA 0,25% sebanyak 10 ml. Tripsinasi dengan stirer medium di dalam *bekker glass* yang berisi *aquadest* dengan suhu 37°C selama 50 menit. Tambahkan 1 ml FBS (*Foetal Bovine Serum*) dan stirer kembali selama 10 menit. Tuang hasil tripsinasi ke dalam konikal dengan menggunakan penyaring. Tuang hasil penyaringan suspensi sel ke dalam tabung sentrifus dan lakukan sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Kemudian buang supernatan, resuspensi sel dengan medium penumbuh *Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)* sehingga sel terpisah satu per satu. Masukkan sel ke dalam wadah penumbuh (*flask*). kemudian inkubasi CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Amati perkembangan dan pertumbuhan kultur sel primer ikan zebra setiap hari.

4.2.2. Preparasi Stok Virus Flu Burung

Virus Flu Burung yang digunakan dalam penelitian ini adalah virus Flu Burung H5N1 *reverse genetic* yang diperoleh dari stok virus Laboratorium Professor Nidom Foundation (PNF).

4.2.3. Kultur Virus pada Sel

Sel yang digunakan adalah sel kultur primer yang berasal dari bagian kepala dan badan ikan zebra (*Danio rerio*). Sel kultur yang sudah konfluen di dicuci sebanyak tiga 3 kali dengan 5 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline*), setelah dicuci dengan PBS, tambahkan virus yang telah diencerkan sebanyak 2 ml pada setiap *flask* (*flask 25 ml*) kemudian diinkubasi CO₂ 5% dengan suhu 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi sel didalam media *flask 25 ml* ditambahkan 5 ml *Maintenance Medium* (*DMEM + BSA 1% + Penstrep 0,1%*) kemudian di kultur pada *flask kultur* untuk diinkubasi selama 3 hari di dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Kemudian amati perkembangannya setiap hari.

Pemanenan sel dilakukan 3 hari setelah diinokulasikan sampel virus pada sel. Pemanenan sel dilakukan dengan mengambil setiap cairan yang terdapat pada setiap *flask* kemudian diletakkan dalam *eppendorf* 1,5 µl untuk di sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Hasil supernatan dari proses sentrifus diambil kemudian disimpan pada suhu 4°C sebelum dilakukan uji selanjutnya.

4.2.4. Uji Hemaglutinasi (HA) Mikroteknik

Uji HA pada penelitian ini menggunakan *microplate* "V". Pertama mengisi lubang *microplate* dengan PBS sebanyak 50 µL dimulai dari nomor 1-12 pada baris A sampai C. Lubang *microplate* pada baris C digunakan sebagai kontrol eritrosit (tanpa antigen). Lubang *microplate* nomor 1 baris A-B diisi dengan cairan supernatan kultur sel sebanyak 50 µL, diberikan cairan supernatan kultur sel pada baris A1 (sel kepala) dan B1 (sel badan) kemudian dilakukan pengenceran.

Pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 50 µL pada lubang A1 dan dimasukkan dan dicampur sampai rata pada lubang A2, pada lubang A2 diambil 50 µL dan dimasukkan ke lubang A3 seperti langkah sebelumnya sampai lubang A12, kemudian dibuang sebanyak 50 µl. Pengenceran juga dilakukan pada lubang pada

baris B. Langkah selanjutnya yaitu mengisi semua lubang baris A-C pada *microplate* dengan RBC ayam 0,5% sebanyak 50 μ L, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Baris C digunakan sebagai kontrol berisi RBC 0,5% dan PBS. Terakhir dilakukan pembacaan titer HA dari sampel yang diperiksa (WHO, 2002; OIE, 2009).

4.2.5. Ekstraksi RNA

Sampel yang menunjukkan hasil positif pada uji HA selanjutnya dilakukan ekstraksi RNA. Ekstraksi RNA dilakukan dengan cara mengambil 560 μ L *Buffer AVL* (*lysis buffer*) yang telah disiapkan sebelumnya mengandung *carrier RNA*, masukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL. Tambahkan 140 μ L sampel cairan supernatan sel lalu diletakkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL. Vortex selama 15 detik dan kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Tambahkan 560 μ L *ethanol* (96-100%) pada *tube* sampel. Vortex selama 15 detik. Ambil 630 μ L sampel masukan ke dalam *QIAamp mini spin column* kemudian sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. Buka *QIAamp mini spin column* dengan hati-hati, buang cairan pada tabung penampung. Ulangi langkah memasukkan 630 μ L sampel masukkan ke dalam *QIAamp mini spin column* sampai semua larutan dalam *tube* sampel terambil semua dan sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. Buang tabung penampung, ganti dengan yang baru. Tambahkan 500 μ L *Buffer AW 1* (*Wash buffer 1*), lalu sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. Buang tabung penampung, ganti dengan yang baru dan tambahkan 500 μ L *AW 2* (*Wash buffer 2*), lalu sentrifus dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit suhu 20°C. Buang cairan pada tabung penampung, dan sentrifus kembali 14000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. Buang tabung penampung, ganti letakkan *QIAamp mini spin column* pada tabung *ependorf* 1,5 mL. Tambahkan 30 μ L *Buffer AVE* kemudian sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit suhu 20°C. Cek jika sudah ada cairan pada tabung *ependorf* penampung menunjukkan bahwa ekstrak RNA sudah tertampung. Label sesuai dengan nama sampel untuk kemudian dapat dilanjutkan dengan uji PCR (Qiagen, 2011).

4.2.6. Amplifikasi dengan One Step RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Setelah dilakukan ekstraksi RNA tahap berikutnya adalah amplifikasi PCR menggunakan primer F. Amplifikasi PCR dilakukan dengan membuat *master mix* pada *microcentrifuge tube* 0.5 ml steril dengan komponen 12.5 μL 2x RT Mix, 2,5 μL 5 mM MgSO_4 , 1 μL *primer forward*, 1 μL *primer reverse*, 0,5 μL *enzyme RT Taq Polymerase*, 2,5 μL DDW (*Distilated water*) dan 5 μL RNA sehingga total didapatkan 25 μL . *Tube* yang sudah berisi campuran cDNA dan *master mix* diinkubasi dalam *thermal cycler* dengan setting *lid on* 105°C, *predenaturasi* 94°C, selama 4 menit; *denaturasi* 94 °C, selama 20 detik; *annealing* 58°C, selama 1 menit (30 siklus); *extention* 68°C, selama 10 menit; dan *keep* pada suhu 4°C.

4.2.7 Gel Elektroforesis

Untuk mendeteksi potongan-potongan DNA berupa bands-DNA pada gel agarose digunakan pewarna yang mengandung fluoresen dengan konsentrasi rendah, seperti *intercalating agent ethidium bromide (EtBr)*. Setelah gel siap, buat campuran sampel (*Loading dye* 1 μL ditambah dengan 3 μL sampel) dan untuk campuran marker (*Loading dye* 1 μL ditambah dengan 3 μL *DNA Ladder*) sebagai standar referensi fragmen DNA yang sudah diketahui panjang bp nya. Masukkan cetakkan dan gel kedalam alat Elektroforesis. Masukkan sampel ke dalam lubang pada gel. Lalu *running* nyalakan alat 100 V selama 30 menit. Setelah itu letakkan gel pada media *UV-transilluminator* untuk melihat hasil nya.

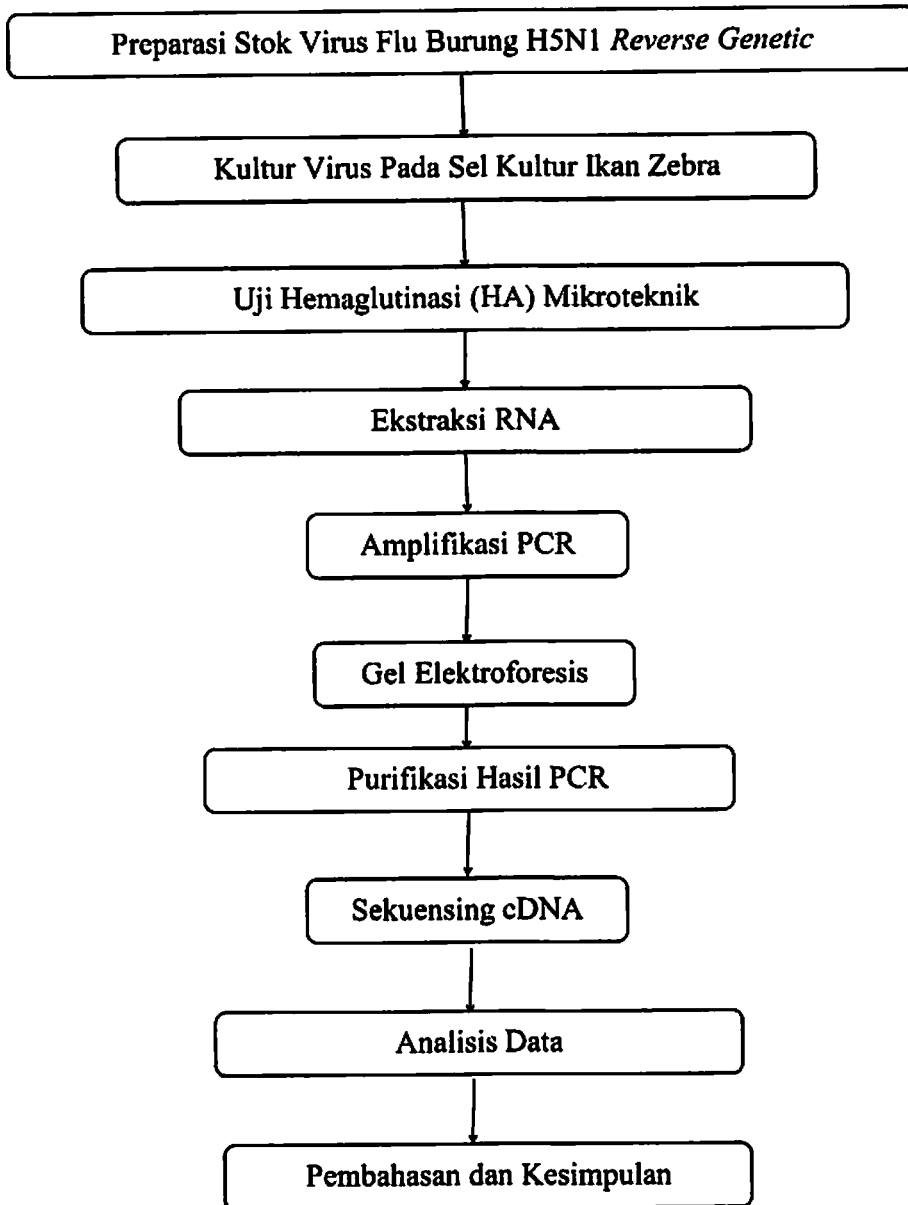
4.2.8. Purifikasi Hasil PCR

Produk PCR yang dihasilkan harus dipurifikasi terlebih dahulu untuk persiapan sekuensing. Fragmen DNA hasil PCR dipurifikasi dengan menggunakan *Low melting Agarose* yang mengandung ethidium bromide dilihat pada UV *short wave*. *Band* yang diinginkan diambil dengan pemotongan menggunakan cutter. Setelah dipotong, DNA tersebut diproses sesuai petunjuk pada *QIAquick Gel extraction Kit* (Qiagen). DNA yang sudah murni selanjutnya digunakan untuk bahan sequensing DNA (Qiagen, 2011).

4.2.9. Sekuensing cDNA

Sekuensing nukleotida ini dilakukan tiga tahap, tahap pertama adalah melakukan tahap labeling yaitu DNA yang sudah murni dilabel dengan *Big Dye Terminator* kit versi 3.1 Penambahan reagen ini bertujuan untuk memberikan fluoresensi yang digunakan untuk membedakan urutan nukleotida. Pada tahap ini mesin *thermocycler* diprogram dalam keadaan suhu *initial denaturation* 96 °C selama 1 menit, kemudian sebanyak 5 siklus pada suhu 96 °C selama 10 detik, 50 °C selama 5 detik dan 60 °C selama 4 menit. Tahap kedua yaitu melakukan hasil purifikasi cycle sequencing menggunakan Big Dye X Terminator yang bertujuan untuk memurnikan nukleotida dan menghilangkan *Big Dye Label* yang tersisa. Setelah itu, tahap terakhir yaitu melakukan sekuensing dengan menggunakan mesin sequenser ABI 310 xL GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems, Inc).

4.3. Kerangka Alur Penelitian



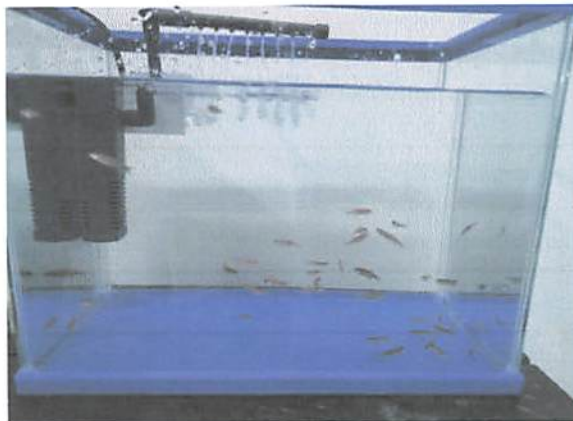
Gambar 4.1 Kerangka Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Persiapan Akuarium dan Sampel Ikan Zebra

Akuarium yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dengan dicuci menggunakan sabun sampai bersih kemudian, diautoclave dan dikeringkan di dalam inkubator. Setelah kering akuarium selanjutnya akuarium diisi dengan air steril dan diberi selang serta batu aerasi yang telah dicuci dan diautoclave. Ikan zebra yang digunakan rata-rata berukuran 3-5 cm stadia juvenile. Ikan yang diperoleh adalah ikan yang terbebas dari segala penyakit baik parasit bakteri jamur maupun virus dengan ciri morfologi yang sehat ikan kemudian dikemas dan dibawa ke labotarium Poultry Disease Professor Nidom Foundation. Setelah itu ikan diaklimatisasi ke akuarium selama 7 hari



Gambar 5.1. Akuarium dan Ikan Zebra

5.2. Optimasi Inkubator CO₂

Sebelum memulai penelitian, perlu dilakukan optimasi terhadap inkubator CO₂ yang akan digunakan. Inkubator terlebih dahulu dilakukan dekontaminasi termasuk melalui system Contracont dan Proses Autostart serta dilakukan proses Kalibrasi dan di *setting* suhu 37°C dengan kadar CO₂ sebesar 5%. Satu kali Proses optimasi Inkubator dilakukan selama 7 Hari dan jika dalam penggunaan nya terdapat kontaminasi pada sel yang ditumbuhkan dan yang dirasa terkait dengan Inkubator, maka perlu dilakukan proses Optimasi Ulang terhadap inkubator mulai dari dekontaminasi kembali

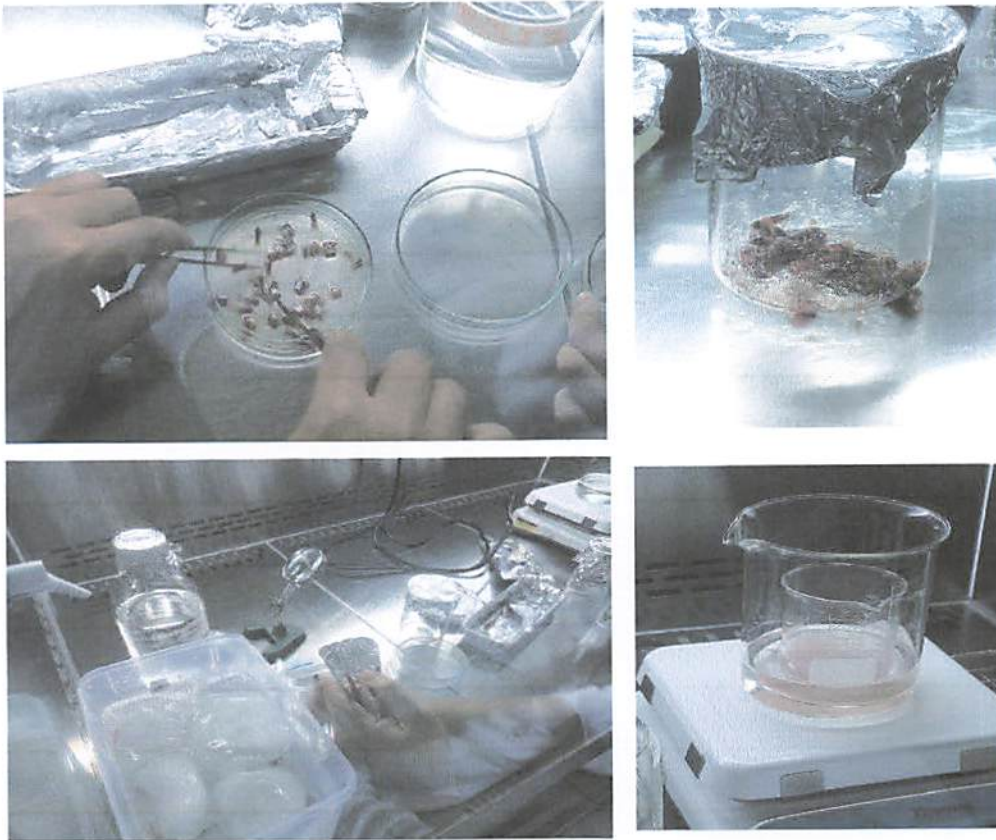


Gambar 5.2. Proses Optimasi Inkubator CO₂

5.3. Pembuatan Kultur Sel Primer Ikan Zebra

Pembuatan vaksin berbasis sel kultur digunakan apabila telur ayam berembrio, yang saat ini digunakan untuk produksi vaksin inaktif, akan berkurang pasokannya selama masa pandemik sehingga pengembangan vaksin Flu Burung H5 berbasis sel kultur khususnya yang berbasis kehalalan sangat diperlukan. Salah satu sel kultur yang bisa diharapkan sebagai basis kehalalan adalah Ikan Zebra.

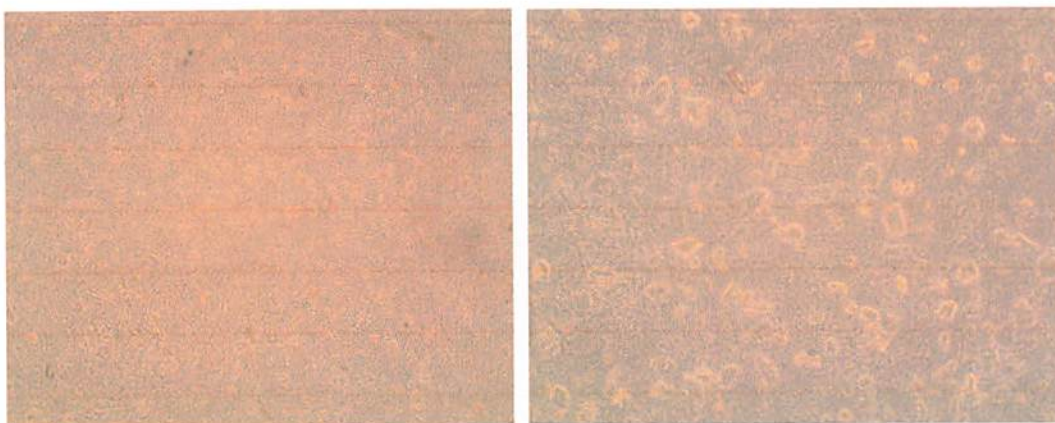
Pembuatan Sel Kultur Primer dari ikan zebra diawali dengan melakukan penimbangan ikan yang akan digunakan dengan berat sekitar 5,1 gram (20 ekor). Kemudian proses euthanasia dilakukan dengan menggunakan metode *rapid cooling / hypothermal shock*. Ikan dimasukkan ke dalam wadah yang berisi air dan es batu. Setelah ikan pingsan maka dapat dilanjutkan proses pembuatan sel kultur Primer. Ikan dipotong menjadi 2 bagian, yaitu bagian kepala (Mata dihilangkan) dan bagian badan. Kemudian organ dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* sebanyak 3 kali. Proses selanjutnya dilakukan Trypsinasi dengan menggunakan Larutan *Trypsin* 0,25% dan dilakukan dengan alat stirer dengan suhu 37°C selama 50 menit. Lalu tambahkan *Foetal Bovine Serum (FBS)* sebanyak 1 ml dan stirer kembali selama 10 menit. Proses selanjutnya melakukan sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Setelah itu supernatan dibuang dan resuspensi sel dengan menggunakan medium penumbuh. Kemudian pindahkan ke dalam *flask* dan masukkan ke dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37°C dan kadar CO₂ 5%.



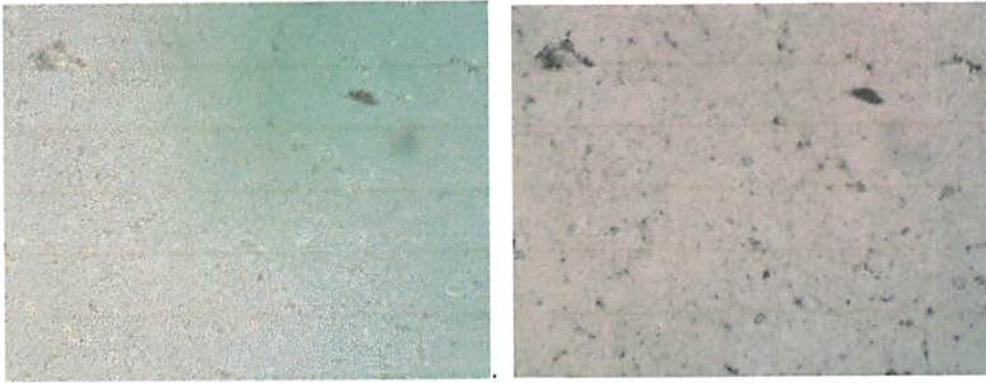
Gambar 5.3. Proses Pembuatan Sel Kultur Primer Ikan Zebra

5.4. Hasil Pertumbuhan Kultur Sel Primer Ikan Zebra

Pengamatan terhadap pertumbuhan sel kultur primer ikan zebra dilakukan setiap hari untuk melihat perkembangan pertumbuhan sel.



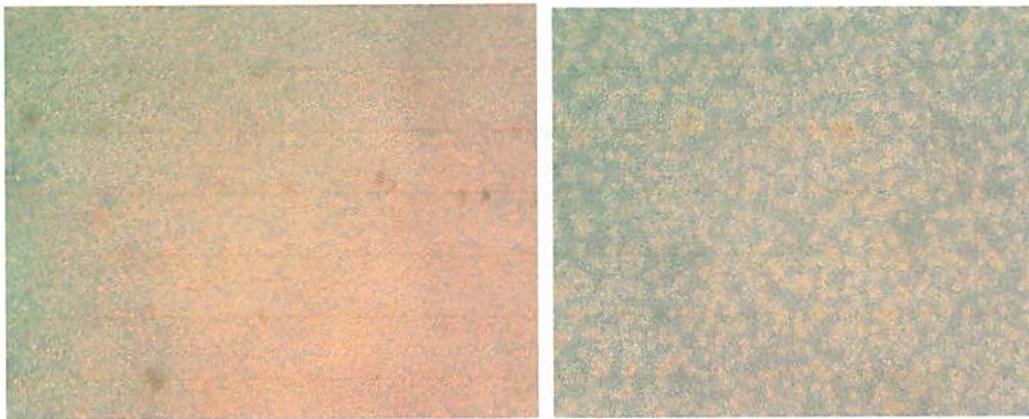
Gambar 5.4. Kultur sel Badan Ikan Zebra diamati dengan menggunakan Mikroskop perbesaran 4 kali (Kiri) dan Perbesaran 10 kali (Kanan)



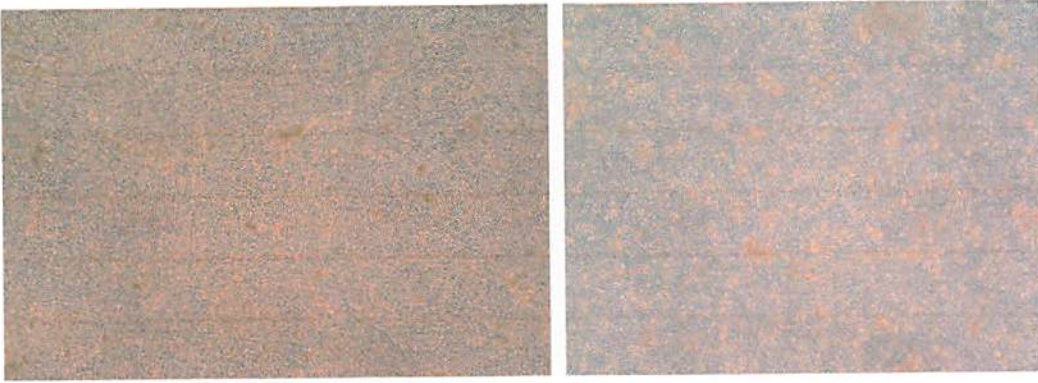
Gambar 5.5. Kultur Sel Primer Kepala Ikan Zebra diamati dengan menggunakan Mikroskop perbesaran 4 kali (Kiri) dan perbesaran 10 kali (Kanan).

5.5. Hasil Pasase Sel Kultur Primer Ikan Zebra

Setelah proses inkubasi dengan Inkubator CO₂ dan pengamatan perkembangan pertumbuhan sel kultur primer, akan tampak sel semakin padat dan menempel memenuhi dasar flask (*konfluen*). Untuk itu perlu dilakukan pasase sel ke tempat pertumbuhan yang baru (*Flask*) agar memberikan kesempatan bagi sel untuk dapat terus berkembang dengan menyediakan ruang kosong untuk tempat penempelan sel (*attachment*) dan tumbuh berkembang.



Gambar 5.6 Kultur Sel Primer Badan Ikan Zebra yang telah konfluen dan akan dilakukan pasase. Diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 4 kali (Kiri) dan perbesaran 10 kali (Kanan).



Gambar 5.7. Kultur Sel Primer Kepala Ikan Zebra yang telah konflen dan akan dilakukan pasase. Diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 4 kali (Kiri) dan perbesaran 10 kali (Kanan).

5.6. Inokulasi Virus pada Kultur Sel

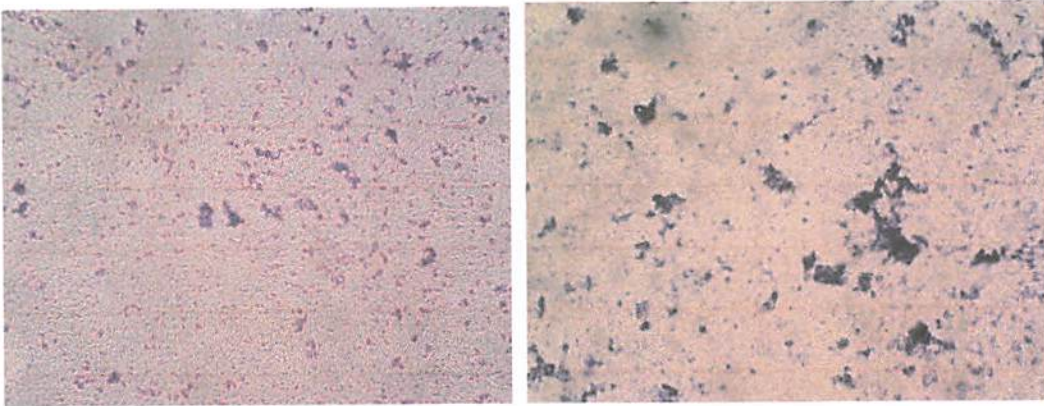
Virus yang digunakan untuk inokulasi pada Kultur Sel Primer Ikan Zebra adalah virus *Avian Influenza H5N1* yang telah dibuat dengan teknologi *Reverse Genetic* dari stok Laboratorium Professor Nidom Foundation. Virus *Reverse Genetic* dengan titer 2^{10} diinokulasikan ke dalam *flask 25 cm²* sebanyak 2 ml / *flask* dan kemudian ditambahkan *Maintenance Medium* dan diinkubasi di Inkubator CO₂ dengan suhu 37°C dan kadar CO₂ sebesar 5%. Pengamatan dilakukan selama 3 hari



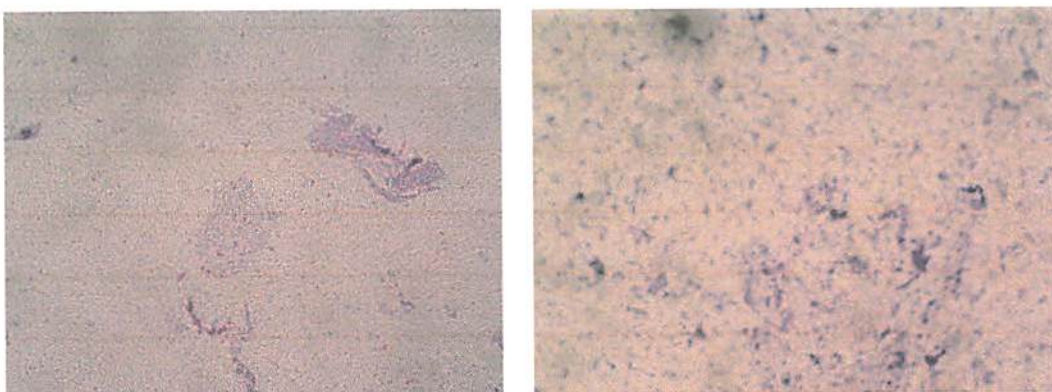
Gambar 5.8. Kultur Sel Primer Ikan Zebra yang telah diinokulasi Virus *Avian Influenza H5N1* dengan teknologi *Reverse Genetic* bagian Kepala (Kiri) dan Badan (Kanan). Diamati dengan menggunakan Mikroskop perbesaran 4 kali.

5.7. Pewarnaan Kultur Sel Pasca Panen

Setelah dilakukan Inokulasi Virus pada Kultur Sel dan pengamatan selama 3 hari. Maka langkah selanjutnya adalah dilakukan pemanenan hasil inokulasi Virus. Pemanenan virus dilakukan dengan mengambil seluruh cairan di dalam *flask* penumbuh sel untuk kemudian di masukkan ke dalam wadah dan lakukan sentrifugasi 3000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Sel yang masih menempel di permukaan dasar *flask* dilakukan pewarnaan diawali dengan memberikan larutan formalin 10% ke dalam *flask* sebanyak 2 ml (menutup semua permukaan dasar *flask*). lalu inkubasi selama 30 menit untuk proses fiksasi sel. Setelah itu buang formalin dan tambahkan larutan pewarna krystal violet ke dalam *flask* hingga menutupi keseluruhan permukaan dasar *flask* . kemudian inkubasi selama 5 menit dan bilas dengan menggunakan aquadest.



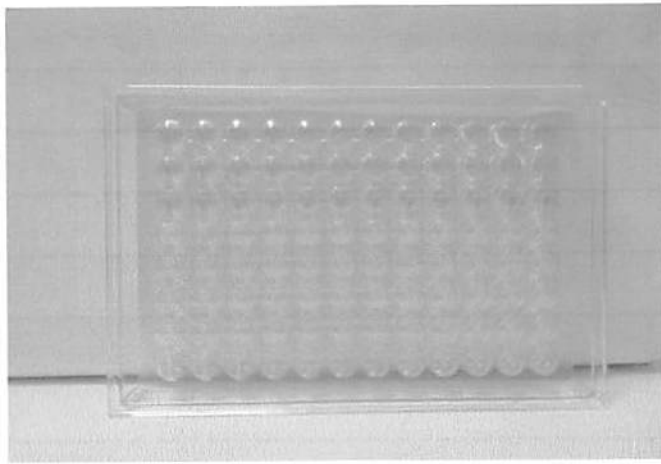
Gambar 5.9. Pewarnaan Kultur Sel Primer Kepala Ikan Zebra. Diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 4 kali (Kiri) dan perbesaran 10 kali (Kanan).



Gambar 5.10. Pewarnaan Kultur Sel Primer Badan Ikan Zebra. Diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 4 kali (Kiri) dan perbesaran 10 kali (Kanan).

5.8. Uji Hemaglutinin (HA)

Hasil panen virus yang telah di inokulasi pada sel ikan zebra kemudian dilakukan pengujian Hemaglutinin (HA). Hasil uji HA dapat dilihat pada gambar 5.11, pada uji HA di dapatkan hasil titer HA untuk virus pada sel kepala 2^8 dan pada sel badan juga menunjukkan titer 2^8 .



Gambar 5.11 Hasil Uji HA. Baris A (sel kepala) , Baris B (Sel Badan), dan Baris C adalah kontrol.



BAB VI
RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana tahapan penelitian yang akan dilakukan selanjutnya adalah

- 1) Melakukan Ekstraksi RNA
- 2) Melakukan Amplifikasi PCR
- 3) Melakukan Purifikasi Hasil PCR
- 4) Melakukan Sekuensing Fragmen HA
- 5) Analisis Bioinformatika
- 6) Kestabilan virus hasil isolasi dari sel ikan zebra.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah :

1. Telah dilakukan pembuatan Sel Kultur Primer dari Ikan Zebra dengan membagi menjadi 2 bagian yaitu bagian kepala dan badan.
2. Telah dilakukan pengembangan dan pengamatan terhadap pertumbuhan Sel Kultur Primer Ikan Zebra
3. Telah dilakukan Pasase Sel Kultur Primer Ikan Zebra
4. Telah dilakukan inokulasi virus pada Sel Kultur Primer Ikan Zebra dengan menggunakan virus *Avian Influenza* H5N1 yang telah dibuat dengan teknologi *Reverse Genetic*.
5. Telah dilakukan panen virus dari sel dan pewarnaan pada Sel pasca panen serta pengujian adanya aktivitas virus yang dipanen melalui uji HA.

7.2 Saran

Mengingat penggunaan sel ikan zebra sebagai media pengembangan vaksin Flu relatif baru, hendaknya segala upaya bisa dimaksimalkan agar hasil akhir penelitian bisa terwujud untuk kepentingan Bangsa Indonesia dan dunia.

DAFTAR PUSTAKA

- Apritasari Ulvie. 2017. Deteksi Protein Hemagglutinin Virus Influenza H5 dan H3 Pada Ikan Zebra (*Danio rerio*) Menggunakan Teknik Immunohistokimia. Tesis. Universitas Airlangga.
- Axelrod, H.R. 1982. Tropical Fish (TFH publication Inc., 1982). Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Brugman. S. 2012. The Zebrafish As A Model To Study Intestinal Inflammation. *Developmental and Comparative Immunology*. Vol. 64. P ; 82-92
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2016. Seasonal Influenza, more Information. <http://www.cdc.gov/flu/about/qa/disease.htm>. Diakses pada 15 April 2018.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2016. Cell-Based Flu Vaccines. <https://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/cell-based.htm>. Diakses tanggal 15 April 2018
- Chengjun Li, Zhigao Bu, and Hualan Chen. 2014. Avian influenza vaccines against H5N1 'bird flu'. Elsevier.
- Domenech J, Dauphin G, Rushton J, McGrane J, Lubroth J, Tripodi A, et al. Experiences with vaccination in countries endemically infected with highly pathogenic avian influenza: the food and agriculture organization perspective. *Rev Sci Tech* 2009;28:293–305
- Dormitzer, P. R. Rapid production of synthetic influenza vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 386, 237–273 (2015)
- Eissa, A.E and Zaki, M.M. 2012. Detection Of Avian Influenza (H5N1) In Some Fish and Shellfish From Different Aquatic Habitats Across Some Egyptian Provinces. *Life Science Journal*. Vol : 9(3). P; 2702-2712.
- Eko Agus Srihanto, Widya Asmara, dan Michael Haryadi Wibowo. 2015. Phylogenetic Molecular and Antigenic Structure Analysis of Avian Influenza Virus of Subtype H5N1 Lampung Isolate Collected in 2008-2013. *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 9 No. 1, Maret 2015.
- Eko Agus Srihanto, Widya Asmara, dan Michael Haryadi Wibowo. 2015. Phylogenetic Molecular and Antigenic Structure Analysis of Avian Influenza Virus of Subtype H5N1 Lampung Isolate Collected in 2008-2013. *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 9 No. 1, Maret 2015.
- Engelhardt, O.G. Many ways to make an influenza virus—Review of influenza virus reverse genetics methods. *Influenza Other Respir. Viruses* 2013, 7, 249–256

- Fries, L. F., Smith, G. E. & Glenn, G. M. A recombinant viruslike particle influenza A (H7N9) vaccine. *N. Engl. J. Med.* 369, 2564–2566 (2013).
- Gabor, K.A., Goody, M.F., Mowel, W.K., Breitbach, M.E., Gratacap, R.L., Witten, P.E., and Kim, C.H. 2014. Influenza A Virus Infection In Zebrafish Recapitulates Mammalian Infection and Sensitivity To Anti-Influenza Drug Treatment. *Disease Models & Mechanisms* 7: 1227-1237.
- Goody.M.F, Sullivan.C, Kim.C.H. 2014. Studying The Immune Response To Human Viral Infection Using Zebrafish.National Institute Health. Vol 46(1). P : 84-95.
- Hewajuli D.A & Dharmayanti NLPI. 2008. Karakterisasi dan Identifikasi Virus Avian Influenza (AI). *Wartazoa* Vol. 18 No. 2
- Hoffmann, E.; Webster, R.G. Unidirectional rna polymerase i-polymerase ii transcription system for the generation of influenza a virus from eight plasmids. *J. Gen. Virol.* 2000, 81, 2843–2847.
- Honhold N, McLeod A, Satyajit S. Biosecurity for highly pathogenic avian influenza: issues and options. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2008
- Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2006) Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends Mol. Med.* 12, 506–514
- Horimoto, T. and Kawaoka, Y. 2001. Pandemic Threat Posed By Avian Influenza Viruses. *Clinical Microbiology Reviews.* American Society for Microbiology. Vol 14 No 1: 129-149.
- Horimoto, Taisuke and Yoshihiro Kawaoka. 2005. Influenza : Lessons from Past Pandemics, Warning from Current Incidents. *Nature Publishing Group.* 3 : 591 – 600
- Isikhnas. 2015. Avian Influenza (AI). http://wiki.isikhnas.com/w/Penyakit_Avian_Influenza_HPAI. Diakses tanggal 15 April 2018.
- Kurniasih Sussi Widi. 2015. Identifikasi Subtipe, Patogenitas, dan Filogenetik Virus Avian Influenza Isolat 2012-2013. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Kreijtz, J. H.et al. Safety and immunogenicity of a modified-vaccinia-virus-Ankara-based influenza A H5N1 vaccine: a randomised, double-blind phase 1/2a clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* 14, 1196–1207 (2014)
- Lahay Almira Fardani. 2017. Infeksi Virus Flu Burung Pada Ikan Zebra (Danio rerio) Sebagai Model Studi Infeksi Biota Perairan. Tesis. Universitas Airlangga.

- Loeffelholz, M.J. 2010. Avian Influenza A H5N1 Virus. Clin Lab Med 30. Elsevier : 1-20.
- Margine, I., Martinez-Gil, L., Chou, Y. Y. & Krammer, F. Residual baculovirus in insect cell-derived influenza virus-like particle preparations enhances immunogenicity. PLoS ONE 7, e51559 (2012)
- Medina, Refael A and Adolfo Garcia-Sastre. 2011. Influenza A viruses : New Research Development. Nature Reviews. 9 : 590 - 603
- Menke, Aswin. L., Jan M. Spitsbergen, Andre P. M. Wolterbeek and Ruud A. Woutersen. 2011. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish Toxicologic Pathology, 39: 759-775
- Murakami, S.; Horimoto, T.; Yamada, S.; Kakugawa, S.; Goto, H.; Kawaoka, Y. Establishment of canine rna polymerase i-driven reverse genetics for influenza a virus: Its application for h5n1 vaccine production. J. Virol. 2008, 82, 1605–1609.
- Muraki, Y.; Murata, T.; Takashita, E.; Matsuzaki, Y.; Sugawara, K.; Hongo, S. A mutation on influenza c virus m1 protein affects virion morphology by altering the membrane affinity of the protein. J. Virol. 2007, 81, 8766–8773.
- Neumann Gabriele, Tokiko Watanabe, Hisroshi Ito, Shinji Watanabe, Hideo Goto, Peng Gao. Mark Hughes, Daniel R Perez, Ruben Donis, Erich Hoffmanns, Gerd Hoboms and Yoshihiro Kawaoka. 1999.Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 9345–9350, Microbiology.
- Nidom, C. A., Ryo Takano, Shinya Yamada, Yuko Sakai-Tagawa, Syafril Daulay, Didi Aswadi, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kyoko Shinya, Kiyoko Iwatsuki-Horimoto, Yukiko Muramoto dan Yishihiro Kawaoka. 2010. Influenza A (H5N1) Viruses from Pigs, Indonesia. Emerging Infectious Disease · www.cdc.gov/eid· Vol. 16, No. 10
- OIE. 2009. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal. <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-test-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>.
- OIE Terrestrial Manual. 2016. Chapter 2.3.12. Infeksius Bursal Disease (Gumboro disease)
- Ozawa, M, Hideo Goto, Taisuke Horimoto, and Yoshihiro Kawaoka, 2007. An Adenovirus Vector-Mediated Reverse Genetics System for Influenza A Virus Generation. Journal Of Virology. p9556-9559.
- Qiagen. 2011. QIAquick Gel Extraction Kit Protokol. www.qiagen.com
- Reviany Vibriaanita Nidom. 2016. Kontruksi Seed-Vaksin Virus Flu Burung Strain Indonesia Dengan Gen Hemagglutinin Low Pathogenic dan Gen

Neuraminidase PR8 Melalui Teknologi Reverse Genetic. Disertasi Thesis. Universitas Airlangga.

- Reviany Vibriaanita Nidom, Muh Y Alamudi, Sahrir Sillehu, Setyarina Indrasari, Rahmalia D Suindarti, Ema Qurnianingsih, Yoes P Dachlan, Aryati, Ahmad Syahrani, Kadek Rachmawati, Kuncoro P Santoso and Chairul A Nidom. 2017. Construction of Indonesian-Strain Avian Flu Virus Seed Vaccine Using Low Pathogenic Hemagglutinin Gene and Neuraminidase Pr8 Gene through Reverse Genetics. *Journal of Vaccines and Immunology*.
- Reviany.V.Nidom, Setyarina Indrasari, Almira.F.Lahay, Ulvie Apritasari, K.Puguh Santoso, Chairul.A.Nidom. 2018. H5N1 Avian Influenza Virus Infection In Zebra Fish (*Danio rerio*) as an Alternative Media For Seed Vaccine Virus Propagation. AIRC Laboratory-Profesor Nidom Foundation, Faculty of Veterinary Medicine, Faculty of Fisheries & Marine Universitas Airlangga, Surabaya Indonesia.
- RM Abdul Adjid, Dharmayanti NLPI, Indriani R, Hewajuli DA. 2013. Characteristic of Avian Influenza H5N1 Virus Infection in Backyard Poultry. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2013.
- Robert, R. J and Ellis, A. E. 2001. The Anatomy and Phsycology of Teleost, In *Fish Pathology* (R. J Roberts, ed) 3rd ed, pp. 12-54. Philadelphia, USA: W. B Saunders
- Shen, S.-C. (ed.)1993 *Fishes of Taiwan*.Department of Zoology, National Taiwan University, Taipei. 960 p. (in Chinese).
- Stern AM, Markel H (2005). "The history of vaccines and immunization: familiar patterns, new challenges". *Health Aff.* 24 (3): 611–21. doi:10.1377/hlthaff.24.3.611. PMID 15886151
- Sumber Pengertian. 2018. Pengertian Vaksin, Sejarah dan Jenis-jenisnya. <http://www.sumberpengertian.co/pengertian-vaksin-sejarah-dan-jenis-jenisnya>, Diakses tanggal 2 Mei 2018
- Swayne DE, Suarez DL, Spackman E, Jadhao S, Dauphin G, Kim-Torchetti M et al. Antibody titer has positive predictive value for vaccine protection against challenge with natural antigenic-drift variants of H5N1 high-pathogenicity avian influenza viruses from Indonesia. *J Virol* 2015;89:3746–62
- Teuku Zahrial Helmi, Charles Rangga Tabbu, Wayan Tunas Artama, Aris Haryanto, dan Muhammad Isa. 2016. Isolation and Identification of Avian Influenza in Different Species of Poultry by Means of Serological and Molecular Methods. *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 10 No. 1, Maret 2016 P-ISSN : 1978-225X; E-ISSN : 2502-5600.
- Tripp, R. A. & Tompkins, S. M. Virus-vectored influenza virus vaccines. *Viruses* 6, 3055–3079 (2014).

- US Food and Drug Administration. FDA approves new seasonal influenza vaccine made using novel technology. US Food and Drug Administration [online], <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm335891.htm> (2013).
- Werner, O., T.C. Harder. 2006. Avian Influenza 43. in Kamps, B.S., Hoffmann, C., Preiser, W. (eds.) Influenza Report 2006, Flying Publishers, Paris accessed at www.influenzareport.com
- White. R, Rose.K, and Zon.L. 2013. Zebrafish Cancer : The State Of Arth and The Path Forward. www.nature.com/nrc/journal/V13/ng/full/nrc3589.html
- WHO, Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans, 2005 p. 1–7 [http:// www.who.int/csr/disease /avian_influenza /guidelines /referencelabs/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/index.html)
- Widiastuti,E. 2011. Teknik Pembenihan Ikan Zebra Pink (Branchydanio rerio) Di Peternak Ikan Hias “Usaha Mandiri” Nglegok, Kabupaten Blitar, Jawa Timur. Praktek Kerja Lapang.



LAMPIRAN

(Draft Journal)

Development Primary Cell Culture From Adult Zebra Fish and Inoculation with Avian Influenza H5N1 Viruses Reverse Genetic

Introduction

For many years, zebrafish have been the prototypical model for studies in developmental biology. In recent years, zebrafish has emerged as a powerful model system to study infectious diseases, including viral infections(1). Zebrafish is an oviparous vertebrate organism used for various experiments. The generation and a model time of zebrafish is ~3 months, and females can spawn hundreds of eggs every 2–3 days. Its embryonic development is completed 72 h after fertilization. Embryos are large and transparent, allowing experimental manipulation and observations of organ formation. Although the physical size of the zebrafish genome is $\sim 1.7 \cdot 10^9$ bp, which is nearly half of the human genome, the genetic structure of zebrafish is close to that of humans(2). There are many research using cell culture from zebra fish. Development cell culture of Zebra Fish has been known from embryonic cell line and also primary cell culture (3-8). Primary cell cultures are derived directly from the intact tissue or organ, usually by dispersion with proteolytic enzymes (9).

Since then zebrafish embryonic cell culture has found, its make research more developed, research for in vivo studies, with diverse applications including chemical biology, disease modeling, and studies of cellular differentiation. One of the research development using Zebrafish for enhance study in Avian Influenza Viruses. H5N1 Avian Influenza has spread in Indonesia since 2003. The H5N1 Avian influenza virus actually infects various animals, including birds, mammals and others. Since 2005, the Avian Influenza viruses has infected humans. According to data, there are 132 people suspected of contracting this virus, and this is one of the highest cases of the Avian Influenza H5N1 outbreak in the world. Way of protection against infection is vaccination. Until now there is still no H5N1 influenza vaccine, because the virus has a high level of pathogenicity, which makes it difficult to obtain high yields from vaccine seeds (10).

Prevention and treatment of Avian Influenza in humans in Indonesia has been facing several obstacles ranging from disease sources such as poultry and other

animals have not been fully controlled, until the understanding of the people recognize the early symptoms of Avian Influenza disease, which is difficult to distinguish from other influenza, as well as antiviral Avian Influenza not yet available in the community. Generally fatal victims were caused late in handling this Avian Influenza disease(11).

The H5N1 influenza virus with a low pathogen level cannot be developed using conventional techniques. The discovery and application of the reverse genetic influenza virus technology has revolutionized the practice of developing the H5N1 influenza vaccine (12). In Indonesia, the H5N1 virus which infected humans in 2007 has been developed has been made an effort to control the pathogenicity of the Avian Flu virus with the Reverse Genetic method. Previous study found that the low pathogenic H5N1 virus reverse genetic was successfully created. Neuraminidase from PR8 played important role in reducing pathogens in chickens and mice. From molecular data we note that no amino acids were changed, the pathogenicity of H5N1 virus reverse genetic was low, with an Intravenous Pathogenicity Index of 0 and the highest titer was 256 GMT and the highest survival rate was 85.71% (13).

This causes an increase in the production of Avian Influenza H5N1 viruses, a generation of recombinant viruses for vaccines limited to selected mammalian cells such as cells of African green kidney kidney cells (cells Vero) or Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell (14). Now Halal concept has become a concern, considering that many of the world's population are Muslim. some innovative approaches that are prospective for the development of pandemic vaccines, including cultured cell-based vaccines so that the development of cell-based H5 Avian Influenza vaccines, especially halal-based cultures is needed. One culture cell that can be expected as a base of halalness is Zebrafish.

Zebrafish infection with the H5N1 virus reverse genetic has been carried out and shows that the H5N1 virus can infect zebrafish in almost all organs(15). In this research will develop of reverse genetic Avian Influenza H5N1 viruses by using zebrafish cells (Danio rerio) as a substitute for cells which are still doubtful as halal seeds for Avian Influenza vaccines that are used for humans in Indonesia and the world.

Materials

The materials used in this study were the Avian Influenza Virus H5N1 Reverse genetic, zebrafish cells, Phosphate Buffer Saline (PBS), EDTA trypsin, DMEM culture media (Dulbecco's Modified Eagle's medium), penicillin, streptomycin, Fetal Bovine Serum FBS), 70% Ethanol, Maintenance media (MM), BSA (Bovine Serum Albumin)

Methods

Aquarium Preparation

The aquarium to be used is cleaned first by washing using soap until it is clean then, autoclaved and dried in an incubator. After drying the aquarium then the aquarium is filled with sterile water and given a hose and aerated stone that has been washed and autoclaved

Fish Sample Preparation

Zebrafish are used on average 3-5 cm in size in the juvenile stage. Fish obtained are fish that are free from all diseases, both fungal bacterial parasites and viruses with healthy fish morphological features and then packaged and taken to the lab of the Poultry Disease Professor Nidom Foundation. After that the fish is acclimatized to the aquarium for 5 days.

Manufacture of Zebrafish Primary Cell Culture

- 1. Weight fish to be used amount 5.1 grams (20 fish).*
- 2. Do fish euthanasia by putting it in a container of water and ice.*
- 3. Take the fainted fish, place it on the petri disk. Cut into 2 parts (head and body), while fish eyes are removed / not used*
- 4. Wash the organ with Phosphate Buffer Saline (PBS) 3 times*
- 5. Put in the syringe and press firmly, then put in the glas container which has a stirrer inside*
- 6. Add a 10 ml solution of Trypsin EDTA 0,25%*
- 7. Perform Trypsination with a medium stirrer in a becker glass containing an aquadest at 37 ° C for 50 minutes*
- 8. Add 1 ml of Foetal Bovine Serum (FBS) and then stirrer again for 10 minutes*
- 9. Pour the trypsination results into conical using a filter*

10. *Pour the results of filtering the cell suspension into the centrifuge tube*
11. *Centrifuge 3000 rpm for 10 minutes*
12. *Remove the supernatant, resuspend the cell with a DMEM culture medium (Dulbecco's Modified Eagle's medium) so that the cells separate one by one*
13. *Put the cell into a flask container*
14. *Incubate with CO₂ 5% at 37 ° C*
15. *Then observe the development of culture cell growth everyday*

Development cell culture

1. *If the cell is already attached and meets the base of the flask container (Confluence), then continue to developed the cell culture*
2. *Remove all mediums from inside the flask.*
3. *Wash using Phosphate Buffer Saline (PBS) 2 times @ 5ml / flask (Flask 25 cm²)*
4. *Add as much as 1 ml of Trypsin EDTA 0.25%*
5. *Incubate with CO₂ 5% at 37 ° C in 60 minutes.*
6. *If the cell has been released (not attached to the base of the flask), add DMEM culture media (Dulbecco's Modified Eagle's medium) to an adequate amount*
7. *Transfer to 15 ml conical and then centrifuge 1500 rpm for 5 minutes*
8. *Remove the supernatant. Add DMEM culture media (Dulbecco's Modified Eagle's medium) as much as 5 ml.*
9. *Do pipetting until cells are evenly mixed and separated one by one*
10. *Put in a flask separated into 2 flasks (as needed)*
11. *Incubate with CO₂ 5% at 37 ° C*
12. *Then observe the development of culture cell growth everyday*

Virus Inoculation in cell culture

1. *If the cell is already attached and meets the base of the container (Confluence), then continue to inoculated with viruses*
2. *Remove all mediums from inside the flask.*
3. *Wash using Phosphate Buffer Saline (PBS) 3 times @ 5ml / flask (Flask 25 cm²)*
4. *Enter the 2 ml diluted virus / flask (25 cm² flask)*
5. *Incubate with 5% CO₂ at 37 ° C for 1 hour*
6. *After one hour add 5 ml Maintenance media (MM) / flask (25 cm² flask)*
7. *Incubate with 5% CO₂ at 37 ° C for 3 days by observing every day*

Staining of Post Harvest Cell Culture

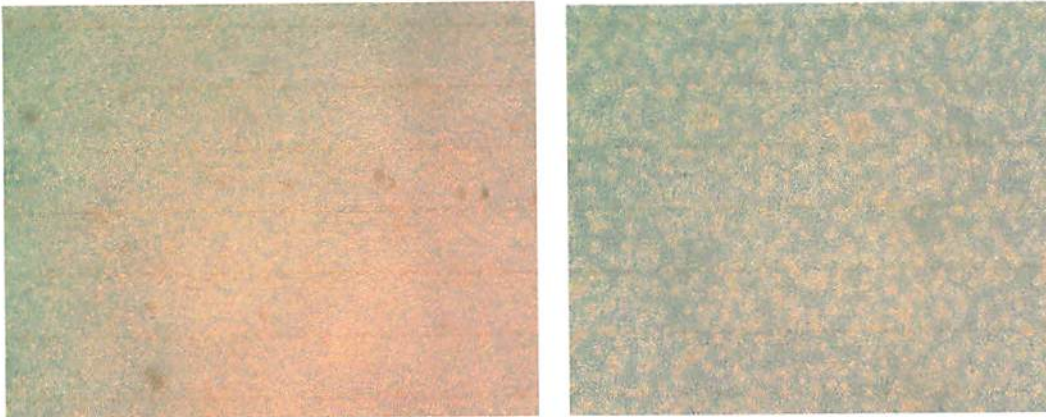
After carrying out viral inoculation on cell cultures and observations for 3 days. Then the next step is to harvest the results of Virus inoculation. Harvesting of the virus is done by taking all the liquid in the cell grower flask to then put it in a container and do 3000 rpm centrifugation at 4 ° C for 10 minutes. The cells that are still attached to the surface of the base of the flask are stained starting with giving a 10% formalin solution as much as 2 ml / flask (covering all the base surfaces of the flask). then incubate for 30 minutes for cell fixation. After that, remove formalin and add the crystal violet dye solution to the flask to cover the entire base of the flask. then incubate for 5 minutes and rinse with distilled water.

Hemagglutination test (HA Test)

The HA test in this study used a "V" microplate. First filling 50 µL of microplate holes with PBS starting from numbers 1-12 on lines A to C. Microplate holes on line C are used as erythrocyte control (without antigen). The number 1 line A-B microplate hole is filled with 50 µL cell culture supernatant liquid, given cell culture supernatant liquid on row A1 (head cell) to B1 (body cell) then dilution. Dilution is done by taking 50 µL at the A1 hole and inserting and mixing it until it flattens the A2 hole, 50 µL is taken in A2 hole and inserted into A3 hole as in the previous step until hole A12, then 50 µl in the last hole is removed. Dilution was also carried out on holes in row B. The next step was to fill all microplate holes with 0.5% chicken RBC as much as 50µl, then incubate at room temperature for 30 minutes. Line C as a negative control contains RBC 0.5% and PBS. Finally, HA titers were read from the samples examined.

Result

Zebrafish Primary Cell (Body)



Picture 1. Zebrafish Body Primary Cell Culture that has been confluence and will be developed. Observed using a microscope magnification 4 times (Left) and magnification 10 times (Right).

Zebrafish Primary Cell (Head)



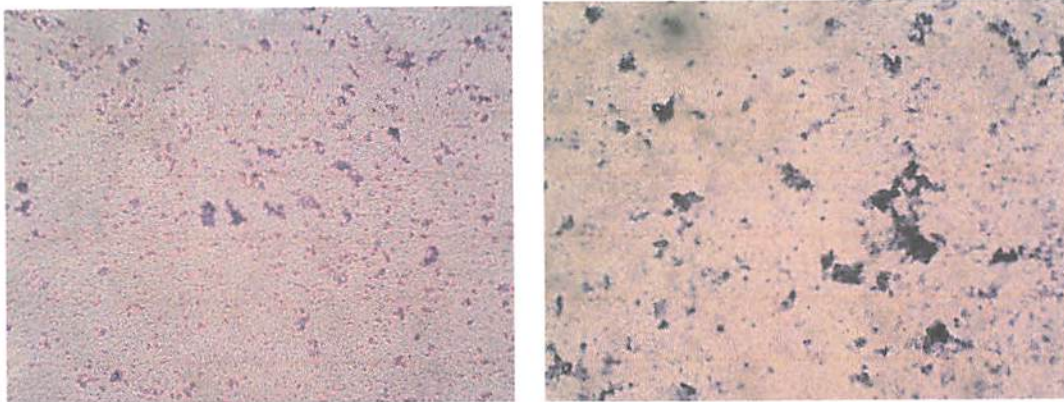
Picture 2. Zebrafish Head Primary Cell Culture that has been confluence and will be developed. Observed using a microscope magnification 4 times (Left) and magnification 10 times (Right).

Inoculation Virus on Zebrafish Primary Cell Culture

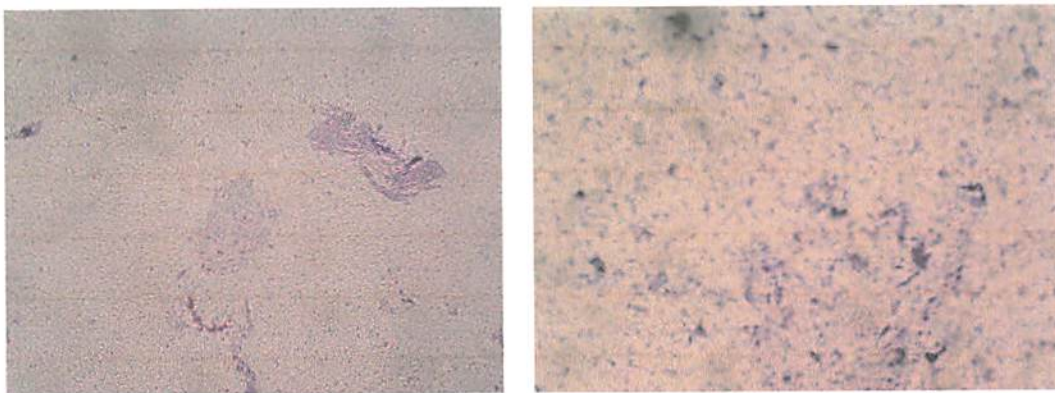


Picture 3. Zebra Primary Cell Culture that has been inoculated with Avian Influenza H5N1 Virus Reverse Genetic Head (Left) and Body (Right). Observed using a microscope magnification 4 times.

Staining of Post Harvest Cell Culture



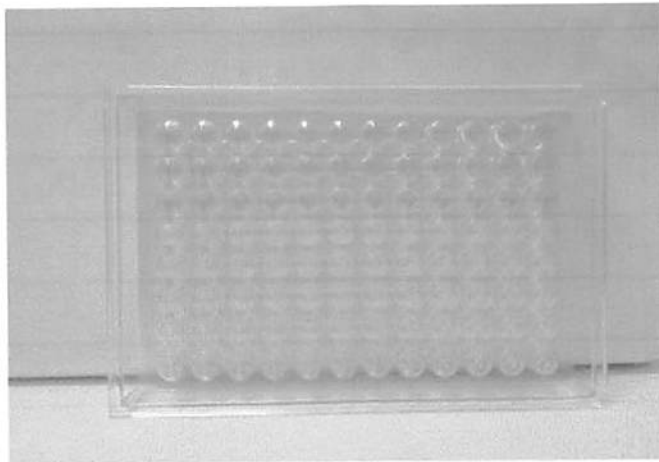
Picture 4. Staining of Zebrafish Head Primary Cell Culture. Observed using a microscope 4 times magnification (Left) and 10 times magnification (Right)



Picture 5. Staining of Zebrafish Body Primary Cell Culture. Observed using a microscope 4 times magnification (Left) and 10 times magnification (Right)

Hemagglutinin Test (HA)

Harvested Viruses that have been inoculated on zebrafish cells are then tested for Hemagglutinin (HA). The results of HA titers for viruses in head cells 2⁸ and on body cells also showed titers 2⁸.



Picture 6. *HA Test Results. Line A (head cell), Line B (Body Cell), and Line C is control.*

References

1. Thessicar Evadney Antoine, Kevin S. Jones, Rodney M. Dale, Deepak Shukla, and Vaibhav Tiwari. Zebrafish: Modeling for Herpes Simplex Virus Infections. Zebrafish Volume 11, Number 1, 2014 " Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/zeb.2013.0920.
2. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature 2013;496: 498–503.
3. Chunguang Ma, Lianchun Fan, Rosemarie Ganassin, Niels Bols, and Paul Collodi. Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. PNAS February 27, 2001 vol. 98 no. 5 2461–2466.
4. Paul Collodi, Yuto Kamei, Ted Ernst, Cristobal Miranda, Donald R. Buhler, and David W. Barnes. Culture Of Cells From Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryo and Adult Tissues. Cell Biology and Toxicology, Vol 8, No.1, 1992.
5. Wolfgang Driever and Zehava Rangini. Characterization Of Cell Line Derived From Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol. 29A: 749-754, September 1993.
6. Lucy C. Stott, Sabine Schnell, Christer Hogstrand, Stewart F. Owen, Nic R. Bury. A primary fish gill cell culture model to assess pharmaceutical uptake and efflux: Evidence for passive and facilitated transport. Elsevier Aquatic Toxicology 159 (2015) 127–137.
7. Wiebke A. Sassen, Franziska Lehne, Giulio Russo, Sven Wargenau, Stefan Dübel, Reinhard W. Köster. Embryonic zebrafish primary cell culture for transfection and live cellular and subcellular imaging. Elsevier Developmental Biology 2017.

8. Giulio Russo, Franziska Lehne, Sol M. Pose Méndez, Stefan Dübel, Reinhard W. Köster, Wiebke A. Sassen Culture and Transfection of Zebrafish Primary Cells *Journal of Visualized Experiments*. 2018.
9. Lawrence E. Hightower and J. Larry Renfro. Recent Applications of Fish Cell Culture to Biomedical Research. *The Journal Of Experimental Zoology* 248:290-302 (1988).
10. WHO (2017) Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO 2003-2017
11. Nidom CA, Yamada S, Nidom RV, Rahmawati K., Alamudi MY, et al. (2012) Genetic Characterization of H5N1 Influenza Viruses Isolated From Chickens in Indonesia in 2010. *Virus Gene* 44: 459-465.
12. Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2006) Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends Mol. Med.* 12, 506–514
13. Reviany Vibriaanita Nidom, Muh Y Alamudi, Sahrir Sillehu, Setyarina Indrasari, Rahmalia D Suindarti, Ema Qurnianingsih, Yoes P Dachlan, Aryati, Ahmad Syahrani, Kadek Rachmawati, Kuncoro P Santoso and Chairul A Nidom. 2017. Construction of Indonesian-Strain Avian Flu Virus Seed Vaccine Using Low Pathogenic Hemagglutinin Gene and Neuraminidase Pr8 Gene through Reverse Genetics. *Journal of Vaccines and Immunology*.
14. Murakami, S.; Horimoto, T.; Yamada, S.; Kakugawa, S.; Goto, H.; Kawaoka, Y. Establishment of canine rna polymerase i-driven reverse genetics for influenza a virus: Its application for h5n1 vaccine production. *J. Virol.* 2008, 82, 1605–1609
15. Reviany.V.Nidom, Setyarina Indrasari, Almira.F.Lahay, Ulvie Apritasari, K.Puguh Santoso, Chairul.A.Nidom. 2018. H5N1 Avian Influenza Virus Infection In Zebra Fish (*Danio rerio*) as an Alternative Media For Seed Vaccine Virus Propagation. AIRC Laboratory-Profesor Nidom Foundation, Faculty of Veterinary Medicine, Faculty of Fisheries & Marine Universitas Airlangga, Surabaya Indonesia.