

LAPORAN KEMAJUAN AKHIR

INSENTIF RISET SINAS

MARKER IMUNOLOGIS DAN PROTEIN VAKSIN FLU BURUNG YANG

BERSIRKULASI DI INDONESIA

BIDANG PRIORITAS IPTEK :

TEKNOLOGI KESEHATAN DAN OBAT

RD-2012-490

OLEH

M YUSUF ALAMUDI,S.Si,M.Kes

RUMAH SAKIT PUSAT TROPIS DAN INFEKSI

DIVISI INFLUENZA DAN ZONOSIS

Jalan Mulyorejo Kampus C Universitas Airlangga Surabaya 60115

Telp. 031-5961389/081803210936/ucupalam@hotmail.co.id

LAPORAN KEMAJUAN AKHIR

INSENTIF RISET SINAS

MARKER IMUNOLOGIS DAN PROTEIN VAKSIN FLU BURUNG YANG

BERSIRKULASI DI INDONESIA

BIDANG PRIORITAS IPTEK :

TEKNOLOGI KESEHATAN DAN OBAT

RD-2012-490

OLEH

M YUSUF ALAMUDI,S.Si,M.Kes

RUMAH SAKIT PUSAT TROPIS DAN INFEKSI

DIVISI INFLUENZA DAN ZONOSIS

Jalan Mulyorejo Kampus C Universitas Airlangga Surabaya 60115

Telp. 031-5961389/081803210936/ucupalam@hotmail.co.id

b. Lembar Identitas dan Pengesahaan

1. Judul Topik Penelitian Insentif Riset Sinas Tahun 2012:

Marker Immunologis Dan Protein Vaksin Flu Burung Yang Bersirkulasi Di Indonesia

2. Bidang Prioritas Iptek (pengusul wajib memilih yang sesuai) :

- a. Teknologi Pangan
- b) Teknologi Kesehatan dan Obat
- c. Teknologi Energi
- d. Teknologi Transportasi
- e. Teknologi Informasi dan Komunikasi
- f. Teknologi Pertahanan dan Keamanan
- g. Teknologi Material

Keterangan Lembaga Pelaksana/Pengelola Penelitian**A. Lembaga Pelaksana Penelitian**

Nama Peneliti Utama	M. Yusuf Alamudi,S.Si,M.Kes
Nama Lembaga/Institusi	RSPTI-Universitas Airlangga
Unit Organisasi	Divisi Influenza Dan Zoonosis
Alamat	Jl. Mulyorejo Kampus C Universitas Airlangga Surabaya 60115
Telp/Hp/Faks/email	031-5961389/081803210936/ucupalam@hotmail.co.id

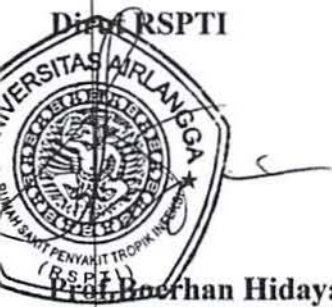
B. Anggota Konsorsium

Nama	Pimpinan	Prof Boerhan Hidayat,SpA (K)
Lembaga/Mitra Industri		

Nama Lembaga/Mitra	RSPTI-Universitas Airlangga
Industri	
Alamat	Jl. Mulyorejo Kampus C Universitas Airlangga Surabaya 60115
Telp/Hp/Faks/email	031-5961389/0818/ucupalam@hotmail.co.id

Surabaya, 3 November 2012

Mengetahui



Dirjen RSPTI

Prof. Boerhan Hidayat, dr, SpA

NIP.194409121970101001

Ketua Peneliti

M. Yusuf Alamudi, S.Si, M.Kes

NIP. 139080880



Ketua LPPM-Unair

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si

NIP.195908051987011001

Ringkasan

Sejak tahun 1997, virus avian influenza sub tipe H5N1 dengan tingkat patogenisitas yang tinggi (Highly pathogenic) menginfeksi pada manusia di Hongkong dan sebelumnya hanya menginfeksi pada unggas. Selain itu, potensi virus flu burung sub tipe H5N1 yang menjadi kandidat penyebab terjadinya pandemik menjadi perhatian dan fokus dunia saat ini. Vaksinasi secara massal merupakan pencegahan secara efektif untuk mengurangi angka kesakitan dan kematian dari potensi terjadinya pandemik influenza.

Jenis vaksin yang digunakan untuk mencegah penyebaran virus flu burung adalah vaksin influenza konvensional dan vaksin influenza dengan menggunakan teknologi reverse genetik. Vaksin influenza konvensional terdiri dari vaksin inaktif (homolog dan heterolog) dan vaksin dengan menggunakan virus influenza yang dilemahkan atau yang dikenal dengan live attenuated vaccine. Kedua jenis vaksin memiliki keunggulan dan kelemahan. Vaksin inaktif homolog merupakan vaksin yang dibuat dengan menggunakan seed vaksin yang sama dengan virus H5N1 di lapangan. Selain itu, vaksin inaktif homolog memiliki kelemahan antibodi yang dihasilkan pada unggas tidak dapat dibedakan dari hasil vaksinasi atau infeksi H5N1 dari lapangan. Vaksin inaktif heterolog merupakan vaksin H5N1 yang menggunakan isolat yang berbeda dengan H5N1 lapangan yaitu memiliki perbedaan pada gen neuraminidase. Vaksin ini memiliki keunggulan yaitu dapat digunakan sebagai marker pembeda antara antibodi yang dihasilkan berasal dari vaksin H5N1 heterolog dengan antibodi yang dihasilkan dari infeksi H5N1 yang berasal dari lapangan. Permasalahan pada vaksin flu burung sampai dengan saat ini adalah belum adanya metode yang sesuai untuk mendeteksi adanya respon imun secara heterotipik dan heterosubtipik.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh tim peneliti Laboratorium Avian Influenza Universitas Airlangga (Vienasyah 2010, Mutti dan Rizkyawan 2011) menunjukkan bahwa titer antibodi pada ayam baik broiler dan layer dengan hasil uji Haemagglutinasasi Inhibisi lebih dari 2^7 mampu menetralsasi virus berdasarkan hasil pengujian dengan menggunakan uji netralisasi baik dengan menggunakan kultur sel maupun dengan menggunakan TAB (telur ayam bertunas). Selain itu juga ditemukan bahwa tidak adanya kesesuaian antara antibodi protektif terhadap vaksin H5N1 2^3 berdasarkan hasil uji Haemagglutinasasi Inhibisi). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nakaya et al 2011 menyebutkan bahwa respon imun humoral dan adaptif dapat digunakan sebagai marker biologi pada vaksin influenza baik inaktif maupun vaksin influenza yang dilemahkan. Selain itu, dengan adanya marker biologis dapat digunakan untuk memprediksi imunogenisitas dan mekanisme timbulnya respon imun.

Tujuan dari penelitian ini adalah menghasilkan marker biologis berupa imunologis dan protein yang dapat digunakan untuk menentukan efikasi dan keamanan vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia dan menghasilkan prototipe vaksin sub unit yang berasal dari protein yang terekspresi. Hasil penelitian pada tahap ini adalah Didapatkan titer antibody, nilai uji netralisasi, respon imunologis, ekspresi proteinterhadap vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia.

Kata Kunci : marker, imunologis, protein, vaksin, H5N1

KATA PENGANTAR

Fuji syukur kami ucapkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulisan Laporan Akhir Program Riset Sinas dapat terselesaikan.

Maksud dan tujuan penulisan laporan ini untuk menghasilkan marker biologis berupa imunologis dan protein yang dapat digunakan untuk menentukan efikasi dan keamanan vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia dan menghasilkan prototipe vaksin sub unit yang berasal dari protein terekspresi.

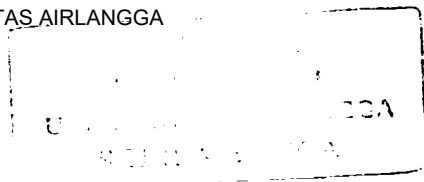
Kami mengucapkan terima kasih kepada Kementrian Riset dan Teknologi yang telah mendanai kegiatan riset kami, juga kepada Ketua LPPM Universitas Airlangga serta reviewer internal dari Universitas Airlangga yang telah banyak memberi masukan dalam penulisan laporan ini.

Demikian semoga penulisan laporan ini juga dapat bermanfaat bagi yang membaca.

Surabaya, November 2012

Peneliti

DAFTAR ISI



HALAMAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang.....	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Struktur Virus Avian Influenza.....	6
2.2 Antigenik drift dan antigenik shift.....	8
2.3 Spesifisitas reseptor virus flu burung.....	9
2.4 Epidemiologi virus flu burung di dunia.....	10
2.4.1 Kasus Flu Burung Yang Menyerang Peternakan Di Dunia.....	11
2.4.2 Kasus Flu Burung Yang Menyerang Peternakan Di Indonesia.....	12
2.5 Gejala Klinis Pada Hewan.....	13
2.6 Vaksinasi H5N1.....	14
2.6.1 Sejarah Vaksinasi.....	14
2.6.2 Vaksin H5N1 di Indonesia.....	17
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT.....	20
3.1 Tujuan Penelitian.....	20
3.2 Manfaat Penelitian.....	20
3.2.1 Manfaat Teoritis.....	20
3.2.2 Manfaat Praktis.....	20
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	21
4.1 Propagasi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada TAB (Telur Ayam Bertunas)..	21
4.2 1 Propagasi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada MDCK.....	21
4.3 Vaksinasi Pada Hewan Coba.....	21
4.4 Metode Uji HA.....	21
4.5 Retitrasi HA 4 Unit.....	22
4.6 Uji Haemagglutininasi Inhibisi (HI).....	22

4.7 Uji Mikronetralisasi Teknik.....	23
4.8.1 SDS-PAGE dan Western Blotting.....	24
4.8.2 2 D Western Blotting.....	25
BAB 5 RENCANA CAPAIAN,HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
5.1 Rencana Capaian.....	27
5.2 Hasil dan Pembahasan.....	27
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
6.1 Kesimpulan.....	43
6.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kejadian Luar Biasa Atau outbreak akibat Infeksi Virus Flu Burung pada Peternakan Domestik di Dunia.....	12
Tabel 1.	Hasil Pengamatan A/Ck/114/2008 (H5N1) pada Embrio Telur Ayam.....	29
Tabel 2.	Hasil rerata Uji Titer Antibodi pada Hewan Coba	29
Tabel 3	Data hasil pengujian EID ₅₀	31
Tabel 4	Data hasil pengujian SNT Terhadap Berbagai Vaksin Flu Burung	31
Tabel 5	Data hasil pengujian ELISA IgG Terhadap Berbagai Vaksin Flu Burung Yang Bersirkulasi Di Indonesia.....	33

DAFTAR GAMBAR

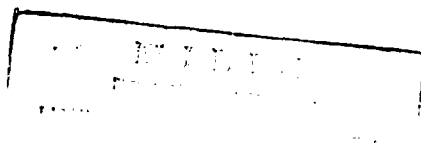
Gambar 2.1 Morfologi virus flu burung subtype H5N1 terdiri dari 8 segmen.....	7
Gambar 2.2 Gambaran spesifisitas reseptor pada saluran pernafasan bagian bawah dan atas pada manusia.....	9
Gambar 1.Sel MDCK tanpa infeksi H5N1.....	28
Gambar 2. Sel MDCK dengan infeksi A/Ck/114/2008/H5N1.....	28
Gambar 3. Hasil uji ELISA terhadap stat-1 berbagai vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia.....	32
Gambar 4. Hasil SDS-PAGE vaksin A dan B.....	36
Gambar 5. Hasil SDS-PAGE vaksin C dan D.....	37
Gambar 6. Hasil SDS-PAGE vaksin E dan F.....	38
Gambar 7. Hasil Western Blotting Vaksin A,B dan C.....	39
Gambar 8. Hasil Western Blotting Vaksin D,E dan F.....	40
Gambar 9. Hasil SDS-PAGE 2 D virus A/ck/114/2008/H5N1.....	41
Gambar 10. Hasil 2 D Western Blotting vaksin H5N1.....	41
Gambar 11. Hasil 2 D Western Blotting vaksin non H5N1.....	42

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Virus Influenza merupakan famili dari Orthomyxoviridae. Perbedaan antigenik protein Matriks (M1) dan Nuklucoprotein (NP) menyebabkan virus influenza terbagi menjadi virus influenza A,B dan C. Untuk virus influenza A sub tipe dibagi berdasarkan antigenisitas pada Gen HA (Haemagglutinin) dan NA (Neuraminidase) pada permukaan glikoprotein. Pada saat ini, terdapat 16 sub tipe HA (H1-H16) dan 9 sub tipe NA (N1-N9). Selain itu, virus influenza A dapat diisolasi pada berbagai hewan antara lain babi,kuda, ikan paus, unggas dan manusia (Horimoto dan Kawaoka, 2005).

Sejak akhir tahun 2003, virus flu burung sub tipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika dan menyebabkan kematian unggas dengan tingkat mortalitas 100 % (Steven *et al* 2006). Di Indonesia, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Banten, Daerah Istimewa Yogyakarta (Raharjo dan Nidom, 2004). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Rachmawati,dkk (2009) bahwa virus flu burung sub tipe H5N1 masih bersirkulasi di wilayah Jawa Timur, Sulawesi Selatan, Jawa Barat dan Irian Jaya dengan menggunakan metode surveillance pasif. Selain itu, berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Nidom (2008) ditemukan 2 virus flu burung sub tipe H5N1 pada ayam sehat di pasar



tradisional kota Surabaya dengan karakteristik di dalam subclade 2.1.3 yaitu virus flu burung yang memiliki kemampuan untuk menginfeksi pada manusia dan unggas.

Pada manusia, berdasarkan laporan dari WHO (*World Health Organization*) tahun 2009, telah dilaporkan lebih dari 400 orang terinfeksi dengan virus flu burung subtype H5N1 dan 262 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 141 orang sampai dengan 11 Agustus 2009 dan 115 orang diantaranya meninggal (WHO, 2009; Depkes 2009).

Vaksinasi secara massal merupakan pencegahan secara efektif untuk mengurangi angka kesakitan dan kematian dari potensi terjadinya pandemik influenza. (Vajo *et al*, 2010). Selain itu, vaksinasi di dalam proses pencegahan terhadap terjadinya pandemik dipertimbangkan sebagai salah satu opsi yang digunakan untuk menghambat penyebaran virus influenza. (Ehrlich, *et al* 2008). Berdasarkan Ellebedy dan Webby (2009) terdapat vaksin influenza konvensional dan vaksin influenza dengan menggunakan teknologi reverse genetik. Vaksin influenza konvensional terdiri dari vaksin inaktif (homolog dan heterolog) dan vaksin dengan menggunakan virus influenza yang dilemahkan atau yang dikenal dengan *live attenuated vaccine*. Kedua jenis vaksin memiliki keunggulan dan kelemahan. Vaksin inaktif homolog merupakan vaksin yang dibuat dengan menggunakan seed vaksin yang sama dengan virus H5N1 di lapangan. Vaksin inaktif homolog memiliki kelemahan antibodi yang dihasilkan pada unggas tidak dapat dibedakan dari hasil vaksinasi atau infeksi H5N1 dari lapangan. Vaksin inaktif heterolog merupakan vaksin H5N1 yang menggunakan isolat yang berbeda dengan H5N1 lapangan namun memiliki perbedaan pada gen neuraminidase. Vaksin ini memiliki keunggulan yaitu dapat digunakan sebagai marker

pembeda antara antibodi yang dihasilkan berasal dari vaksin H5N1 heterolog dengan antibodi yang dihasilkan dari infeksi H5N1 yang berasal dari lapangan (Capua dan Marangon 2005). Jenis vaksin yang lain adalah *live attenuated vaccine*. Vaksin *live attenuated vaccine* dapat dikembangkan secara cepat dari virus influenza yang telah tersedia, dapat digunakan melalui jalur intranasal yang dapat memicu timbulnya antibodi dengan satu kali vaksinasi, respon imun yang ditimbulkan memiliki peranan yang penting untuk daya proteksi. Kelemahaan dari vaksin *live attenuated vaccine* adalah masih sedikit industri yang memproduksi *live attenuated vaccine*, respon daya proteksi tidak spesifik termasuk respon imun seluler, mudah terjadi reassortment dengan virus influenza dari lapangan. Selain itu, virus influenza yang dikeluarkan dari *live attenuated vaccine* dapat bereplikasi di saluran pernafasan atas (Wressnigg,dkk 2009;Weir P, 2007). Reverse genetik merupakan salah satu teknologi untuk memproduksi vaksin flu burung dengan menggunakan cDNA yang diklon. Berdasarkan Neuman,dkk (2005) bahwa 8 plasmid yang telah diubah menjadi cDNA dihubungkan dengan promotor RNA polimerase 1 dan promotor RNA polimerase 2 sehingga vRNA dan mRNA berada pada satu tempat dan terdapat 6 bagian dari virus influenza dan 2 bagian reassortant tanpa membutuhkan prosedur penggabungan dan skrining terhadap hasil penggabungan antara virus flu burung isolat lapangan dengan virus influenza yang memiliki tingkat patogenisitas yang rendah. Teknologi reverse genetik memiliki beberapa keuntungan apabila digunakan di dalam memproduksi vaksin. Keuntungan tersebut adalah seed vaksin yang dihasilkan dari teknologi reverse genetik mampu menghasilkan titer virus yang memadai untuk produksi vaksin secara cepat,mampu mengeliminasi kontaminasi dari berbagai agen patogen yang lain

seperti virus-virus pada saluran pernafasan dan komponen yang tidak diketahui dari sel yang digunakan untuk mengisolasi virus H5N1 (Ohyama, dkk 2010).

Jenis vaksin yang digunakan untuk mencegah terjadinya pandemik yang disebabkan oleh virus H5N1 memiliki beberapa kesulitan baik pada hewan maupun pada manusia. Ini disebabkan virus influenza A terutama H5N1 terbagi dalam beberapa *clade* dan *subclade*. Selain itu, virus flu burung yang menginfeksi pada setiap negara juga berbeda (sebagai contoh Indonesia memiliki *clade 2* dan *subclade 1*, sedangkan kamboja, vietnam dan thailand *clade 1*). Berdasarkan laporan dari CDC dan badan kesehatan dari Amerika bahwa antibodi yang dihasilkan dari virus flu burung *clade 1* memiliki reaksi yang lemah terhadap virus flu burung *clade 2*, sehingga terjadi kesulitan di dalam memprediksi seed vaksin yang akan digunakan sebagai vaksin pre-pandemik dan stok vaksin. Vaksin flu burung yang dapat memicu timbulnya antibodi yang signifikan adalah menggunakan virion utuh virus flu burung yang diinaktivasi atau dengan menggunakan adjuvan yang digabungkan dengan sebagian virion dari virus flu burung, sehingga akan terjadi penurunan jumlah vaksin yang digunakan dan membutuhkan waktu untuk meningkatkan produksi vaksin. Permasalahan yang lebih kompleks pada vaksin flu burung sampai dengan saat ini adalah belum adanya metode yang sesuai untuk mendeteksi adanya respon imun secara heterotipik dan heterosubtipik. Uji Haemagglutinin Inhibisi yang digunakan untuk mendeteksi antibodi terhadap anti influenza memiliki korelasi dengan daya proteksi yang dihasilkan dari hospes. Meskipun uji haemagglutinin inhibisi kurang sensitif ketika digunakan untuk mendeteksi antibodi yang dihasilkan oleh virus flu burung. Pengujian dengan menggunakan mikroneutralisasi merupakan salah satu metode pengujian yang lebih sensitif meskipun terdapat perbedaan

variabilitas endpoint yang cukup signifikan antar laboratorium yang melakukan pengujian dengan menggunakan uji mikroneutralisasi. Selain itu, juga terdapat korelasi yang rendah antara hasil pengujian dengan imunitas yang dihasilkan sehingga dibutuhkan standar internasional untuk pengukuran secara serologis terhadap berbagai jenis vaksin flu burung (Li dan Huang, 2007). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh tim peneliti Laboratorium Avian Influenza Universitas Airlangga (Vienansyah 2010, Mutti dan Rizkyawan 2011) menunjukkan bahwa titer antibodi pada ayam baik broiler dan layer dengan hasil uji Hemagglutinas Inhibisi lebih dari 2^7 mampu menetralkan virus berdasarkan hasil pengujian dengan menggunakan uji netralisasi baik dengan menggunakan kultur sel maupun dengan menggunakan TAB (telur ayam bertunas). Selain itu juga ditemukan bahwa tidak adanya kesesuaian antara antibodi protektif dari vaksin H5N1 terhadap infeksi virus flu burung pada unggas (OIE menetapkan antibodi protektif terhadap vaksin H5N1 2^3 berdasarkan hasil uji Haemagglutinas Inhibisi). Program pencegahan terhadap sebuah agen infeksi agar efektif tergantung dari instrumen yang digunakan. Ini disebabkan pengujian yang digunakan harus memiliki kemampuan untuk membedakan antibodi yang dihasilkan berasal dari hasil vaksinasi atau infeksi dari agen infeksi secara alam. Selain itu, pengujian yang dilakukan dapat menekan biaya dan waktu (Henderson, 2005). Oleh sebab itu, marker imunologis dan protein sangat diperlukan untuk menganalisis efikasi dan keamanan vaksin H5N1 yang bersirkulasi di Indonesia. Selain itu, marker biologis yang akurat di dalam mendiagnostik diharapkan terjadinya mutasi virus flu burung akibat kebocoran vaksin bisa dicegah.

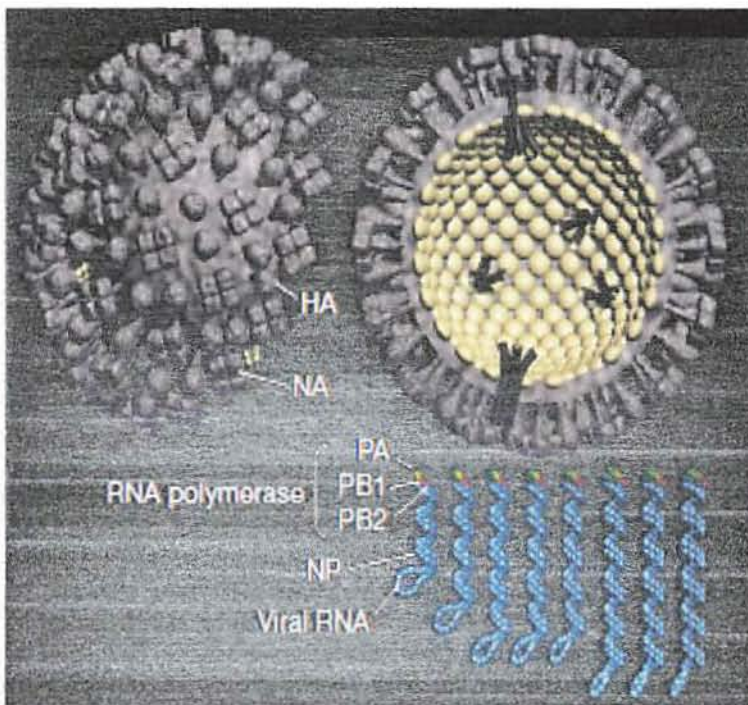
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Virus Flu Burung

Virus influenza adalah salah satu virus yang termasuk dalam golongan Orthomyxoviridae. Virus influenza terbagi menjadi virus influenza A, B dan C dan penggolongan ini didasarkan pada gen Matriks (M1) dan gen Nukleoprotein (Adwan, 2009). Virus Influenza A dapat dibagi menjadi sub tipe berdasarkan pada 2 protein permukaan yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) dan sampai dengan saat ini telah terdapat 16 sub tipe protein HA (Hemagglutinin) dan 9 NA (Neuraminidase) yang dapat ditemukan pada populasi burung liar (Smart dan Connely, 2008). Virus influenza A yang memiliki virulensi yang tinggi atau yang disebut dengan *Highly Pathogenic* terdapat pada virus influenza A sub tipe H5 dan H7 yang dapat menyebabkan kematian dengan angka 100% pada peternakan unggas dan juga pada manusia tetapi hanya bersifat asimtomatis atau tanpa gejala pada burung liar (Capua dan Marangon, 2006).

Berdasarkan bentuknya virus flu burung atau virus influenza A sub tipe H5N1 memiliki bentuk *spherical* dengan diameter 100-200 nm dan terdiri atas 8 segmen atau gen dengan untai tunggal RNA negatif. Virus flu burung memiliki mRNA yang bersifat *monocistronic* yang mengkode 10 protein. Genome RNA dari virus flu burung terdiri atas dari gen nukleoprotein (NP) dan 3 subunit RNA *polymerase complex* (PA, PB1, dan PB2) yang memiliki peranan penting di dalam proses replikasi dan bergabung bersama dengan kompleks ribonucleoprotein (RNP). Bagian dalam kapsul terdiri atas protein Matriks (M1) dan chanel ion protein M2 dalam jumlah yang tidak terlalu banyak. Selain itu, juga terdapat protein non-struktural yaitu protein NS2 dan NS1. Protein NS2

memiliki peranan yang penting dalam mengambil RNP (*Ribonucleoprotein complex*) dari nukleus dan berinteraksi dengan protein M1. Protein NS1 memiliki berbagai peranan antara lain mengatur pemisahan dan pengambilan bahan-bahan yang dibutuhkan dari nukleus menuju mRNA seluler dan memiliki peranan yang penting dalam menstimulasi terjadinya translasi untuk umpan balik terhadap aktifitas interferon pada hospes. Untuk protein HA dan NA yang terletak pada permukaan virus memiliki peranan dalam proses perlekatan, penggabungan dan masuk ke dalam sel hospes, perkembangbiakan virus dari sel hospes yang terinfeksi oleh viru flu burung. Selain itu, protein HA dan NA merupakan dua protein yang bertanggungjawab secara langsung dengan terjadinya netralisasi antibodi dengan respon imun yang dihasilkan oleh hospes yang terinfeksi oleh (Adwan, 2009; Smart dan Connely,2008)



Gambar 2.1 Morfologi virus flu burung subtype H5N1 terdiri dari 8 segmen (Neumann *et al*, 2009)

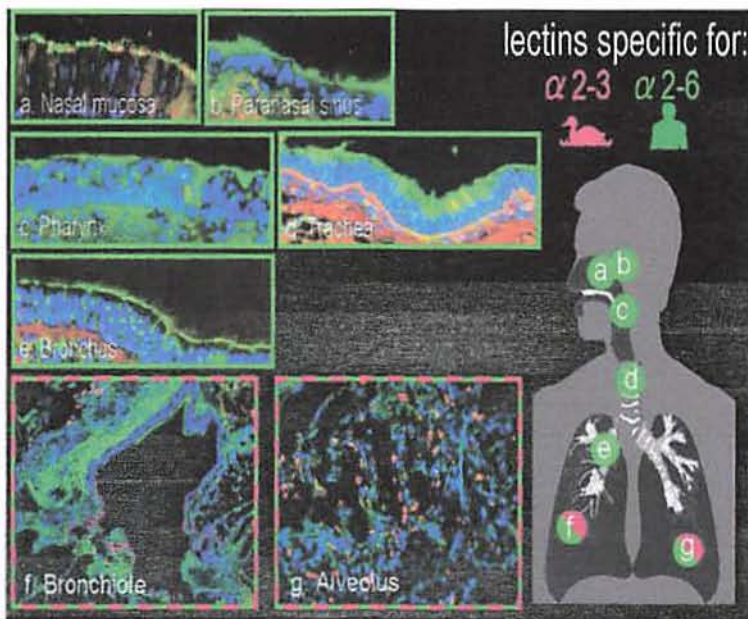
2.2 Antigenik Drift dan Antigenik Shift

Antigenik drift disebabkan adanya mutasi titik, sebagian kecil pada asam amino dan terjadi secara gradual pada gen HA dan NA. Pada mamalia, antigenik drift disebabkan adanya seleksi positif dari mutasi yang terjadi secara spontan oleh netralisasi antibodi. Antigenik drift biasanya dapat diobservasi pada peternakan dan jarang terjadi pada populasi manusia. Tingkat terjadinya mutasi asam amino terhadap gen HA dan NA secara frekuensi kurang dari 1 % per tahun dan menyebabkan terjadinya epidemik.

Antigenik shift merupakan perubahan pada sebagian besar pada asam amino pada gen HA atau NA sehingga menghasilkan urutan asam amino baru pada HA atau NA. Apabila gen HA atau NA yang sudah mengalami perubahan dan menginfeksi pada populasi manusia maka respon imun tidak mengenali virus influenza A akan menyebabkan terjadinya pandemi. Selama 1 abad telah terjadi 4 pandemi yaitu 1918 yang disebabkan oleh H1N1 dan dikenal dengan *Spanish Influenza*, 1957 yang dikenal dengan *Asian Influenza* dan disebabkan oleh H2N2, 1968 yang disebabkan oleh H3N2 dan dikenal dengan *Hongkong Influenza* dan yang terakhir 1977, disebabkan oleh H1N1 dan dikenal dengan *Russian Influenza*. Antigenik shift juga dapat disebabkan adanya *reassortment* antara virus influenza dari manusia dan unggas, sebagai contoh pandemik yang terjadi pada tahun 1957 dan 1968 disebabkan terjadinya reassortment dari virus influenza dari manusia dan unggas. Mekanisme yang kedua dan menyebabkan terjadinya antigenik shift adalah terjadinya transmisi secara langsung dari virus unggas atau virus dari babi ke manusia dan menyebar antar manusia. Berdasarkan hasil analisis filogenetik didapatkan hasil bahwa terjadinya *spanish influenza* disebabkan virus influenza dari unggas yang menular pada populasi manusia (Wright, 2007)

2.3 Spesifisitas Reseptor Virus Flu Burung

Virus avian influenza memiliki afinitas yang tinggi terhadap asam sialid $\alpha 2-3$ dan memiliki jumlah yang banyak di jaringan epitel daerah endodermik (usus dan paru-paru) pada unggas yang merupakan target dari virus avian influenza. Hal ini berbeda dengan virus Influenza yang berasal dari manusia yaitu lebih banyak memiliki residu $\alpha 2-6$ yang lebih dominan pada sel epitel pada saluran pernafasan manusia. Perbedaan reseptor menyebabkan terhambatnya penularan virus flu burung dari unggas ke manusia. Namun berdasarkan beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa sel epitel bersilia pada trakea manusia memiliki reseptor virus avian influenza dari unggas dalam jumlah yang sedikit. Hal sebaliknya juga terdapat pada ayam, memiliki reseptor yang berasal dari virus influenza dari manusia ($\alpha 2-6$) (Beare dan Webster 1991; Werner dan Harder,2006).



Gambar 2.2 Gambaran spesifisitas reseptor pada saluran pernafasan bagian bawah dan atas pada manusia (Sinya *et al*,2006)

Pada babi dan unggas air kedua reseptor yaitu α 2-3 dan α 2-6 memiliki densitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan hewan lain sehingga memberikan kesempatan pada kedua hewan tersebut untuk terjadinya mixing vessel antara virus flu burung dengan virus influenza yang menginfeksi pada manusia (H1N1,H3N2).

2.4 Epidemiologi Virus Flu Burung di Dunia

Avian Influenza atau yang lebih dikenal dengan flu Burung adalah virus Influenza A yang menginfeksi burung dan beberapa sub tipe memiliki kemampuan menginfeksi binatang dan manusia. Terdapat dua jenis virus flu burung yaitu :

1. *Low Pathogenic* (LPAI) yaitu virus flu burung menyebabkan timbulnya gejala klinis yang ringan.
2. *Highly Pathogenic* yaitu virus flu burung yang menyebabkan tingkat kematian yang tinggi, cepat menyebar dan menyebabkan timbulnya gejala klinis yang berat.

Sebuah sub tipe yang *low pathogenic* memiliki kemampuan untuk bermutasi sehingga menjadi sub tipe yang *highly pathogenic* dan menyebar dengan cepat. Sebagai contoh: di Italia pada tahun 1999, sub tipe H7 LPAI dapat bermutasi menjadi HPAI hanya dalam kurun waktu 9 bulan (Wallesten, 2006).

Burung liar merupakan reservoir alami yang utama untuk virus flu burung dan seringkali tahan terhadap infeksi virus flu burung. Sekelompok hewan peliharaan dapat terinfeksi oleh virus flu burung melalui kontak dengan burung liar. Selain itu, burung migran juga memiliki peranan yang penting dalam meningkatkan kasus terjadinya infeksi virus flu burung dan penyebaran virus flu burung sejak tahun 2006. Virus flu burung merupakan virus yang memiliki penyebaran yang sangat cepat pada peternakan. Ini disebabkan virus ini dapat menyebar melalui kontak dengan feses atau kotoran unggas

yang mengandung virus, bagian nasal atau eksresi yang dikeluarkan oleh mata dan melalui perantara manusia yaitu baju, kendaraan dan bahan yang membawa virus pada daerah di sekitar peternakan (Sogaolu, 2005; Werner dan Harder,2006).

2.4.1 Kasus Flu Burung Yang Menyerang Peternakan di Dunia

Sejak bulan Desember tahun 2003, lebih dari 10 negara Asia telah melaporkan terjadinya kejadian luar biasa atau *outbreak* H5N1 di Peternakan. Negara-negara tersebut adalah Vietnam, Thailand, Indonesia, Kamboja, Cina, Hongkong, Korea Selatan, Malaysia, Laos dan Jepang. Pada tahun 2005, penyebaran virus flu burung menuju ke negara-negara di wilayah barat antara lain : Rusia, Ukraina, Kazakhtan, Turki, Romania dan Kroasia. Pada tahun 2006, virus Flu Burung menyerang negara-negara di Eropa, Timur Tengah, Afrika dan 33 negara lainnya telah memberikan laporan terjadinya infeksi virus flu burung di negaranya masing-masing. Negara-negara tersebut yaitu 17 negara yang diserang oleh virus flu burung pada peternakan lokal (Afghanistan, Pakistan, India, Myanmar, Azerbaijan, Albania, Perancis, Jerman, Isracl, Daerah Otoritas Palestina, Yordania, Mesir, Nigeria, Burkina Faso, Kamerun dan Cote d'Ivoire) dan 16 negara yang terserang virus flu burung pada burung liar (Bulgaria, Yunani, Slovenia, Bosnia-Herzegovina, Serbia-Montenegro, Hungaria, Slovakia, Republik Cheko, Austria, Italia, Selandia Baru, Polandia, Denmark, Inggris, Georgia dan Iran. Irak, Sudan dan Swedia) (Melidou *et al*, 2009)

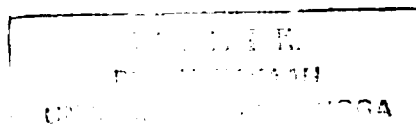
Tabel. 2.1 Kejadian Luar Biasa Atau outbreak akibat Infeksi Virus Flu Burung pada Peternakan Domestik di Dunia

Tahun	Subtipe	Negara	Dampak
1983	H5	Pennsylvania	Menyebabkan beberapa gejala klinis dan tingkat kematian yang tinggi pada ayam, turkeys, dan guinea fowl. 17 juta unggas dimusnahkan.
1994-2003	H5N2	Mexico	Hampir 1 juta burung terinfeksi oleh virus Flu Burung
1995-2003	H7N3	Pakistan	3,2 juta unggas mati disebabkan infeksi virus flu Burung selama kejadian luar biasa tahun 1995.
1997	H5N1	HongKong	Virus Flu Burung dapat diisolasi dari ayam; tingkat kematian ayam sangat tinggi dan menyebabkan 1,5 juta unggas dimusnahkan dalam waktu 3 hari.
2003	H7N7	Belanda	30 juta unggas dimusnahkan dan 255 peternakan terinfeksi oleh virus Flu Burung. Virus Flu Burung menyebar ke Belgia tetapi dapat teratasi dengan cepat.
2003-2007	H5N1	Asia, Eropa, Afrika	Beberapa kasus kejadian luar biasa infeksi virus Flu Burung dapat dikenali dan sekitar 220 juta dimusnahkan akibat terinfeksi virus Flu Burung.
2004	H7N3	Columbia	Lebih dari 19 juta unggas dimusnahkan.
2005	H7	North Korea	Hampir 200.000 unggas dimusnahkan pada bulan April 2005.

Sumber : WHO,2006

2.4.2 Kasus Flu Burung Yang Menyerang Peternakan di Indonesia

Kasus Flu Burung pada ayam diyakini muncul pertama kali pada bulan Agustus tahun 2003 di beberapa peternakan ayam ras komersial di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Kasus tersebut cepat meluas ke berbagai daerah di Jawa Tengah, Jawa Barat, Jawa Timur,



Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY), Lampung, Bali, dan beberapa daerah di Sumatera dan Kalimantan. Pada tahun 2003, wilayah yang terjangkit penyakit tersebut mencakup 9 propinsi, yang terdiri dari 51 kabupaten/kota dan jumlah ayam/unggas yang mati mencapai 4,13 juta ekor. Jenis unggas yang terserang meliputi ayam ras petelur, pedaging, ayam bibit, ayam buras, ayam arab, itik, entog, burung puyuh, burung merpati, burung perkutut, dan burung merak. Sampai dengan bulan Desember 2004, jumlah kumulatif kasus kematian ternak unggas akibat virus flu burung mencapai 6,27 juta ekor yang berasal dari 16 propinsi yang mencakup 100 kabupaten/kota. Angka kematian akibat virus flu burung pada ternak unggas terutama ditemukan di Jawa Tengah, Jawa Barat, Jawa Timur, dan Lampung dengan jumlah kematian masing-masing lebih dari satu juta ekor. Sekitar bulan Februari 2005 terjadi perluasan kasus flu burung ke daerah baru, yaitu Sulawesi Selatan dan selanjutnya menyebar ke Sulawesi Tenggara dan Sulawesi Barat, dan terakhir telah di laporkan juga di Nangroe Aceh Darussalam. Jumlah kematian unggas akibat serangan virus flu burung sejak bulan Agustus 2003 sampai dengan November 2005 diperkirakan telah mencapai 10,45 juta ekor. Jumlah kematian unggas pada tahun 2005 cenderung menurun drastis dibandingkan dengan tahun 2003 maupun tahun 2004, walaupun daerah yang terserang cenderung lebih luas (Rahardjo dan Nidom,2004)

2.5 Gejala Klinis Pada Hewan

Infeksi virus flu burung menyebabkan beberapa gejala klinis mulai dari ringan sampai dengan gejala klinis yang fatal. Strain atau jenis virus flu burung yang ganas dapat menyebabkan tingkat kematian yang tinggi dan sebagian besar menyerang ayam yang usianya masih muda tanpa timbul gejala klinis (asimtomatis). Gejala klinis yang

timbul sangat bervariasi dan bergantung pada usia dan spesies hewan yang berada di peternakan, tingkat keamanan biologis (*biosecurity*) yang diterapkan di peternakan dan jenis atau strain virus flu burung yang menginfeksi pada peternakan (Phuong,2005). Gejala klinis yang mungkin timbul adalah bulu rontok, cangkang telur yang tidak keras, depresi dan kondisi tubuh yang menurun, produksi telur yang menurun drastis, kehilangan nafsu makan, *cyanosis* (warna ungu-kebiruan) pada jengger dan pial (*wattles*), Oedem dan pembengkakan pada kepala, kelopak mata, jengger, *wattles*, dan daerah di sekitar kaki. Selain itu juga didapatkan gejala seperti diare, terjadi sedikit perdarahan dari daerah nostril, kehilangan koordinasi termasuk kehilangan kemampuan berjalan dan berdiri, terdapat/perdarahan (mudah terlihat pada daerah di sekitar kaki dan tulang kering), gangguan pada saluran pernafasan, timbul kematian pada sebuah peternakan. Gejala klinis yang disebabkan oleh virus flu burung memiliki kemiripan dengan penyakit unggas lainnya. Infeksi virus flu burung mungkin menyebabkan gejala bronchitis, ilaryngotracheitis, kolera pada unggas dan berbagai variasi gejala klinis akibat infeksi Newcastle disease (ND). Konfirmasi sebuah diagnostik berdasarkan uji serologis, isolasi virus dan identifikasi jenis virus yang menginfeksi mutlak diperlukan dalam menentukan apakah infeksi pada unggas di peternakan disebabkan oleh virus flu burung atau oleh mikroorganisme lain (Jacob *et al*,2003;CFSPH,2009).

2.6 Vaksinasi H5N1

2.6.1 Sejarah Vaksinasi

Pertama kali vaksin ditemukan pada tahun 1796, ketika Edward Jenner menemukan vaksin untuk penyakit cacar. Pada tahun 1880 dan 1890 dikembangkan teknik kultur bakteri sehingga menimbulkan gelombang baru di dalam pembuatan vaksin.

Vaksin dari bakteri yang dilemahkan seperti anthrax, BCG untuk tuberculosis sukses dalam menekan perkembangan penyakit. Kultur bakteri juga dapat digunakan untuk mengembangkan vaksin bakteri yang diinaktif seperti demam tifoid, kolera, plaque dan pertussis. Penemuan propagasi virus pada telur ayam bertunas pada tahun 1931 mengawali pembuatan vaksin untuk yellow fever dan influenza (Wilson,2007)

Pada tahun 1949, ditemukan propagasi virus pada kultur sel dan vaksin polio ditemukan. Dengan adanya kultur sel, proapagasi virus dan pengembangan vaksin dari virus yang dilemahkan semakin cepat dan mudah (polio, measles, mumps dan rubella). Pada tahun 1970, pengembangan vaksin memasuki periode yang sangat cepat kecuali vaksin pneumococcal dan meningococcal yang menggunakan komponen polisakarida dari kapsul bakteri berdasarkan teknologi yang dikembangkan pada tahun 1940. Pada tahun 1980 dan 1990 biologi molekuler memberikan sumbangan untuk perkembangan vaksin generasi baru. Vaksin polisakarida kapsular yang dikonjugat dengan protein digunakan untuk membuat vaksin *Haemophilus influenzae* type b (Hib). Teknik genetik engineering dihasilkan dari dua rekombinan vaksin subunit (cth. Vaksin untuk HBV dan lyme). Selain itu, pada tahun 1990-an dikembangkan "virus-like particle" (VLP) untuk human papillomavirus dan mampu menghasilkan respon imunitas yang signifikan (Wilson,2007).

Virus influenza telah dapat dikembangbiakan di dalam cairan allantois telur ayam bertunas untuk menyiapkan vaksin inaktif selama lebih dari 60 tahun. Perkembangan awal vaksin influenza menggunakan virus influenza secara utuh (*crude*), preparasi vaksin yang tidak murni dengan menggunakan metode seperti adsorpsi dan elusi dari sel darah merah ayam dan sentrifuge dengan kecepatan tinggi atau melalui metode freeze-thawing

virus influenza dari cairan allantois. Untuk penggunaan secara rutin, purifikasi dikembangkan untuk penyiapan vaksin dengan menggunakan metode splitting dan Tween-80. Selain itu juga digunakan sodium deoxycholate untuk mengurangi terjadinya pirogenisitas pada hewan coba ketika dilakukan pengujian dan reaktogenisitas pada orang dewasa dan anak-anak ketika vaksin influenza diinjeksikan (Hampson,2008).

Penyiapan vaksin influenza dengan menggunakan propagasi pada telur membutuhkan waktu yang cukup panjang yaitu enam bulan. Ini disebabkan karakteristik antigenik yang akan digunakan untuk vaksin harus berdasarkan referensi dari *World Health Organization* (WHO) melalui program surveillance. Selain itu, strain yang memiliki potensi sebagai seed vaksin harus di seleksi dan diadaptasikan sehingga mampu menghasilkan vaksin dalam skala produksi. Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk pengujian vaksin antara lain antigen yang telah terstandar dan telah dikalibrasi, serum yang memiliki imunogenisitas atau hyper immune yang akan digunakan untuk menguji haemagglutinin yang telah dipurifikasi dari vaksin yang diproduksi. Pengujian vaksin yang telah terstandar dengan menggunakan pengujian secara imunologi dan antigen yang telah terkarakterisasi dan disetujui oleh badan internasional sehingga menyebabkan keterlambatan terhadap produksi vaksin. Selain itu dibutuhkan telur ayam bertunas dengan karakteristik yang telah ditetapkan dan dibutuhkan kapasitas yang cukup besar untuk menangani telur ayam bertunas di dalam memproduksi vaksin dan isolasi dan pasase di dalam telur secara berulang dapat menurunkan daya imunogenisitas seed virus yang akan digunakan sebagai vaksin (Hampson,2008).

2.6.2 Vaksin H5N1 di Indonesia

Kebutuhan vaksin flu burung untuk peternakan domestik mengalami peningkatan. Ini disebabkan adanya kebijakan penggunaan vaksin untuk peternakan dan merupakan keputusan yang penting yang dikeluarkan oleh dinas peternakan seperti thailand dan vietnam yang merupakan negara pengeskor untuk unggas. Vaksin yang baik adalah vaksin yang mampu melindungi dari infeksi, memiliki kesamaan antara antigen yang digunakan pada vaksin dengan strain yang sedang bersirkulasi dan mampu mengurangi jumlah virus dibawah tingkat yang memiliki kemampuan untuk menular pada organisme lain. Sebaliknya vaksin yang tidak baik adalah vaksin yang memiliki kemampuan untuk mencegah infeksi dan gejala klinis yang muncul namun tidak mampu mencegah terjadinya ekskresi virus pada tingkat yang mampu menularkan virus pada organisme lain. Selain itu, vaksin yang tidak baik memicu penyebaran virus pada peternakan yang tidak terdeteksi atau *silent virus*, pada pasar yang menjual unggas hidup dan memicu terjadinya China dan Indonesia mengadopsi vaksinasi pada peternakan untuk mengendalikan virus flu burung dan vietnam telah lebih dulu mencoba vaksin pada peternakan namun yang menjadi permasalahan adalah di Indonesia, virus flu burung menyerang pada unggas dan babi. Sedangkan di China, virus flu burung terdeteksi pada unggas yang sehat di pasar unggas hidup. Ini memberikan gambaran bahwa beberapa vaksin memiliki kualitas yang kurang optimal dan kemungkinan terjadi ko-infeksi dengan agen penyakit lainnya. Strategi vaksin juga digunakan di Meksiko tahun 1980 dan vaksin yang digunakan adalah vaksin H5N2. Vaksin H5N2 mampu mereduksi timbulnya infeksi namun tidak mampu mengeliminasi virus H5N2 dan memberikan kontribusi terhadap penyebaran virus secara luas di amerika tengah dan menyebabkan terjadinya antigenik drift (Webster,*et al.*, 2006).

Sejak 24 Januari 2004, Dirjen Produksi Peternakan menetapkan penyakit flu burung atau *Avian Influenza (AI)* pada hewan dan unggas berstatus wabah. Pada awal terjadinya wabah tahun 2003, banyak vaksin ilegal asal China yang beredar. Vaksin ini mengandung virus AI dengan yang berbagai macam tipe dan terkadang tidak jelas tipe virus AI yang terkandung di dalamnya. Efektifitas vaksin ini di lapangan juga bermacam-macam. OIE meragukan kualitas dari beberapa vaksin produksi China. Tetapi laporan FAO dari Vietnam menunjukkan bahwa vaksin China sudah memberikan dampak pada pengendalian wabah AI pada unggas (FAO, 2006). Untuk saat ini vaksin flu burung yang digunakan di lapangan dan diuji coba di laboratorium meliputi vaksin inaktif, vaksin konvensional dengan menggunakan virus utuh, vaksin inaktif dengan menggunakan teknologi reverse genetik, vaksin sub unit dengan menggunakan baculovirus dan mengekspresikan antigen H5 secara *in vitro*, vaksin rekombinan dengan menggunakan fowl poxvirus secara *in vivo*, virus ND, vektor virus infectious laryngotracheitis dan DNA vaksin. Vaksin-vaksin tersebut memiliki kemampuan untuk melindungi dan mengeliminasi virus flu burung. Selain itu juga, memiliki kemampuan untuk mereduksi virus yang dikeluarkan setelah diuji tantang (Chua, *et al.*,2010). Di Indonesia terdapat 2 jenis vaksin AI untuk menangani virus flu burung yaitu vaksin homolog dan vaksin heterolog. Vaksin homolog inaktif pada umumnya digunakan untuk mengendalikan wabah AI di Indonesia pada tahun awal ditemukannya wabah penyakit ini. Vaksin semacam ini juga sudah diproduksi di Indonesia dan peternak unggas di lapangan umumnya menyatakan bahwa efektifitas vaksin ini cukup baik, ditinjau dari pemeriksaan serologis sebelum dan sesudah vaksinasi dan juga daya proteksinya terhadap serangan penyakit AI. Vaksin homolog ini mengandung virus mati dengan tipe H5N1, yaitu tipe

yang sama dengan penyebab wabah AI di Indonesia. Bibit virus untuk pembuatan vaksin ini juga berasal dari isolat lokal virus penyebab wabah AI di Indonesia. Vaksin heterolog adalah vaksin inaktif dengan kandungan virus AI dari tipe yang berbeda dari virus penyebab wabah AI di Indonesia. Vaksin heterolog yang telah beredar adalah vaksin yang mengandung tipe virus H5N2, vaksin inaktif yang mengandung tipe virus H5N9 dan sebagainya (Sudarisman,2006;Indriyani,*et al.*,2005).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh tim peneliti Laboratorium Avian Influenza Universitas Airlangga menunjukkan bahwa titer antibodi pada ayam baik broiler dan layer dengan hasil uji Hemagglutinas Inhibisi lebih dari 2^7 mampu menetralsasi virus berdasarkan hasil pengujian dengan menggunakan uji netralisasi baik dengan menggunakan kultur sel maupun dengan menggunakan TAB (telur ayam bertunas) (Vienansyah 2010, Mutti dan Rizkyawan 2011). Selain itu juga ditemukan bahwa tidak adanya kesesuaian antara antibodi protektif dari vaksin H5N1 terhadap infeksi virus flu burung pada unggas (OIE menetapkan antibodi protektif terhadap vaksin H5N1 2^3 berdasarkan hasil uji Haemagglutinas Inhibisi). Terjadinya kesenjangan antara pengujian secara serologis maupun dengan pengujian secara netralisasi terhadap virus H5N1 membutuhkan kajian yang lebih mendalam dari sudut pandang yang berbeda misalnya proteomik sehingga memberikan solusi terhadap vaksin H5N1 dan memotong penyebaran virus flu burung di Indonesia.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Menghasilkan marker biologis berupa imunologis dan protein yang dapat digunakan untuk menentukan efikasi dan keamanan vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia.
2. Menghasilkan prototipe vaksin sub unit yang berasal dari protein yang terekspresi.

3.2 Manfaat Penelitian

3.2.1 Manfaat Teoritis

Manfaat teoritis dari penelitian ini adalah

1. Memberikan sumbangan ilmu pengetahuan tentang marker biologis berupa imunologis dan protein yang dapat digunakan untuk menentukan efikasi dan keamanan vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia.
2. Memberikan sumbangan ilmu pengetahuan tentang prototipe vaksin sub unit yang berasal dari ekspresi protein vaksin flu burung

3.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah

1. Memberikan informasi kepada pihak industri vaksin maupun Kementerian Republik Indonesia tentang vaksin efikasi dan keamanan vaksin flu burung yang bersirkulasi di indonesia
2. Memberikan informasi tentang prototipe vaksin sub unit yang berasal dari ekspresi protein vaksin flu burung sehingga dapat digunakan untuk pencegahan infeksi virus flu burung di Indonesia.

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian ini di laboratorium Avian Influenza-Zoonosis Research Center Universitas Airlangga. Metode Penelitian ini adalah

4.1 Propagasi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada TAB (Telur Ayam Bertunas)

Tempatkan telur pada sisi tumpul bagian atas dan diberi kode. Usap bagian atas telur dengan menggunakan 70 % ethanol dan buat lubang pada batas ruang udara dan ruang alantois. Ambil 1 ml spesimen dari medium transport dengan menggunakan syringe. Pegang telur, tentukan lokasi embrio dengan menggunakan "egg candler" , masukkan jarum ke lubang pada telur, menembus membran amnion, dan inokulasikan 100 µl spesimen ke ruang amnion. Tarik jarum 0,5 cm dan inokulasikan 100 µl spesimen ke dalam ruang alantois. Tutup lubang telur dengan parafin cair dan inkubasi telur tersebut pada suhu 33-37^oC selama 2-3 hari.

4.2 Propagasi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada Sel MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*)

Sel MDCK sebelumnya ditumbuhkan pada 6 well plate dan digunakan untuk inokulasi setelah 90% konfluen. Growth medium yang telah digunakan dibuang dan specimen yang telah dipersiapkan diinokulasikan pada sel MDCK dan diinkubasi selama 1 jam dengan suhu 37^oC, 5% CO₂. Setelah 1 jam, ditambahkan maintenance medium untuk pertumbuhan virus yang didalamnya telah ditambahkan 1% TPCK. Perbanyakan virus dilakukan selama 3 hari. Pada hari ketiga virus siap untuk dipanen.

4.3 Vaksinasi Pada Hewan Coba

Ayam (*Gallus gallus*) dengan usia 6-8 minggu dan berat badan antara 500-750 gram sebanyak 50 ekor diadaptasikan di dalam fasilitas laboratorium Animal BSL3

selama 1 minggu. Diberi makan dan minum ad libitum. 5 jenis vaksin H5N1 disuntikan ke tiap kelompok perlakuan sebanyak 0,3 ml untuk tiap ayam. Darah diambil sebanyak 1 ml pada hari ke-21, disentrifuge dengan kecepatan 3000 RPM-5000 RPM selama 10 menit. Serum dan plasma disimpan di -20 derajat celsius sampai digunakan.

4.4 Metode Uji HA

Masukkan 50 ml PBS pada lubang A2-H12 kemudian masukkan 100 ul hasil panen dari TAB dan sel MDCK dari A1-H1. Pindahkan 50 ml dari lubang pertama s/d terakhir kemudian tambahkan sel darah merah dari ayam 0,6 %, shake dg mekanikal vibrator dan Inkubasi pada suhu 4 derajat.

4.5 Retitrasi HA 4 Unit

Tambahkan 50 ul PBS pada lubang A-F no 2 sampai dengan 12 pada mikroplate V. Masukkan 100 ul isolat virus pada lubang A1 sampai dengan F1. Ambil 50 ul isolat virus dari A1-F1 dan masukkan ke dalam A2 sampai dengan F12, buang 50 ul sisa isolat virus. Isi lubang G dan H dengan PBS dan sel darah merah ayam 50 ul sebagai kontrol negatif. Tambahkan 50 ul sel darah merah ayam dan inkubasi untuk semua lubang yang berisi isolat virus dan PBS sebanyak 50 ul, digoyang selama 15-30 detik dengan menggunakan vibrasi mekanik, inkubasi pada suhu ruang (22-25 derajat celsius) dan baca hasil berdasarkan kontrol negatif.

4.6 Uji Haemagglutinasasi Inhibisi (HI)

a. Perlakuan serum dan plasma untuk menghilangkan inhibitor non spesifik

Tambahkan 3 bagian RDE dan 1 bagian serum atau plasma (mis.75 ul RDE dan 25 ul serum), inkubasi pada suhu 37 derajat celsius selama satu malam dan panaskan pada

suhu 56 derajat celsius selama 30 menit. Tambahkan 6 bagian PBS sehingga konsentrasi akhir menjadi 1:10.

- b. Tambahkan PBS 25 ul pada lubang B sampai dengan H (B1-H12) pada masing-masing lubang. Tambahkan serum sebanyak 50 ul yang sudah diberi perlakuan dengan menggunakan RDE (A1-A12), ambil 25 ul dan letakkan pada lubang berikutnya, buang pada lubang H. Tambahkan 25 ul antigen H5N1 pada semua lubang dan tambahkan PBS 25 ul pada lubang A1-H12 sebagai kontrol negatif. Goyang mikroplate dengan menggunakan vibrasi mekanik selama 10-15 detik. Inkubasi pada suhu ruang selama 15 menit pada suhu 22-25 derajat celsius. Tambahkan sel darah merah ayam pada semua lubang dan inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit.

4.7 Uji Mikroneutralisasi Teknik

Serum diinaktivasi pada suhu 56 derajat celsius dan direplikasi menjadi 4 kali. Tambahkan 60 ul PBS pada masing-masing lubang plate mikrotiter. Tambahkan 48 ul PBS pada kolom A (lubang A1-A11). Tambahkan 12 ul serum pada kolom A dan direplikasi sebanyak 4 kali. Buat pengenceran serum dan pindahkan 60 ul dari satu ke kolom lainnya (A,B,C,-H). buang 60 ul pada kolom terakhir (kolom H). Encerkan virus hasil TCID50 per 50 ul (220 TCID50/100 ul) di dalam PBS. Tambahkan 60 ul yang telah diencerkan dan dimasukkan ke dalam semua lubang kecuali kontrol, ditambahkan 60 ul PBS. Membuat back-titrasi: tambahkan 438 ul dari virus yang telah diencerkan (100 TCID50 per 50 ul) untuk pengenceran pertama. Tambahkan 300 ul PBS pada tiap pengenceran dan ambil 138 ul dari virus dari virus yang telah diencerkan secara serial pada ependorf. Tambahkan PBS 60 ul pada masing-masing

lubang untuk back titrasi dan ambil 60 ul dan diduplikasi sebanyak 4 kali pada plate mikrotiter. Inkubasi selama 2 jam pada suhu 37 derajat celsius dan CO₂ sebanyak 5 %. Siapkan plate mikrotiter dengan sel MDCK yang konfluen dan buang medium sel, tambahkan tiap lubang 350 ul D-MEM tanpa serum dan TPCK tripsin sebanyak 2 ug/ml. Buang dan ambil 350 ul D-MEM tanpa serum dan TPCK tripsin sebanyak 2 ug/ml untuk menghilangkan FBS. Ambil 100 ul dari campuran antibodi dan virus yang telah diinkubasi selama 2 jam ke masing-masing lubang. Inkubasi selama 2 jam pada suhu 37 derajat celsius dan CO₂ 5 %. Buang campuran antibodi-virus dan tambahkan 250 ul D-MEM dan buang. Tambahkan 200 ul D-MEM (+/- 2 ug/ml TPCK tripsin) dan diinkubasi selama 3-4 hari pada suhu 37 derajat celsius dan CO₂ sebanyak 5 %. Amati dibawah mikroskop inverted untuk mengamati CPE dan catat. Membaca plate ketika virus back titrasi menunjukkan 50 % atau lebih CPE (*cythopathogenic effect*)

4.3.1 SDS-PAGE dan Western Blotting

Buat running gel dengan konsentrasi 10-12 persen, masukkan running gel lewat dinding sampai ± 1 cm dari atas, tambahkan butanol, biarkan sampai beku (± 25 menit). Siapkan sample yang sudah dicampur dengan Laemmly buffer dan panaskan pada suhu 100^o C selama 5 menit. Buang Butanol jika gel sudah beku dan bersihkan dengan kertas saring. Tuangkan stacking gel dan masukkan comb, biarkan beku. Ambil comb dan bersihkan dari sisa gel pada cetakan dengan menggunakan E-Buffer. Ambil cetakan gel dan masukkan Whole lysate H5N1 didenaturasi dalam alat elektroforesis jalankan dengan 125 Volt dan 40mA selama 3 jam. Matikan alat dan gel ditransfer ke membran PVDF, diblocking dengan 5 % skim milk di dalam PBS selama 1,5 jam. Immublotting dengan

menggunakan serum dari hewan coba yang telah divaksin dan direaksikan dengan second antibody conjugate HRP dan substrat DAB (Hui,2009)

4.8.2 D Western Blotting

A) IEF

Tempatkan tube kapiler ke dalam Tube Gel Running module, masukkan secara hati-hati dari atas. Tutup bagian bawah tube kapiler dengan menggunakan NescoFilm. Buat gel dengan bahan-bahan sebagai berikut :16 ml air yang telah didestilasi , 2.4 ml Glycerol ,0.9 ml cairan ampholite dengan pH 4-8 ,3.8ml cairan Acrylamide/Bis 15 μ l TEMED dan 120 μ l 10% cairan ammonium persulphate. Masukkan ke dalam tube kapiler dengan menggunakan mikropipet dan tips 200 ul secara hati-hati dan beri jarak 1 cm dari atas. Biarkan membeku selama 1-2 jam. Masukkan anoda buffer dan katoda buffer dan masukkan sampel yang telah dilarutkan di dalam 1% cairan ampolite dan 20% glycerol. Hidupkan aliran listrik dengan voltase 400V selama 3 jam. Keluarkan gel dari tube kapiler secara hati-hati dan dimasukkan ke dalam running buffer selama 30 menit.

B) 2 D Western Blotting

Buat running gel dengan konsentrasi 10-12 persen, masukkan running gel lewat dinding sampai \pm 1 cm dari atas, tambahkan butanol, biarkan sampai beku (\pm 25 menit). Siapkan sample yang sudah dicampur dengan Laemmly buffer dan panaskan pada suhu 100^o C selama 5 menit. Buang Butanol jika gel sudah beku dan bersihkan dengan kertas saring. Tuangkan stacking gel dan masukkan comb, biarkan beku. Ambil comb dan bersihkan dari sisa gel pada cetakan dengan menggunakan E-Buffer. Ambil cetakan gel dan masukkan gel hasil IEF ke dalam alat elektroforesis jalankan dengan 125 Volt dan 40mA selama 3 jam. Matikan alat dan gel ditransfer ke membran PVDF, diblocking

dengan 5 % skim milk di dalam PBS selama 1,5 jam. Immublotting dengan menggunakan serum dari hewan coba yang telah divaksin dan direaksikan dengan second antibodi conjugate HRP dan substrat DAB

BAB 5. RENCANA CAPAIAN, HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Rencana Capaian

Penelitian ini dilakukan dalam waktu dua tahun, terdiri dari menganalisis marker biologis berupa imunologis dan protein yang dapat digunakan untuk menentukan efikasi dan keamanan vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia yang dilakukan pada tahun pertama. Tahun kedua bertujuan untuk menghasilkan prototipe vaksin sub unit yang berasal dari protein yang terekspresi.

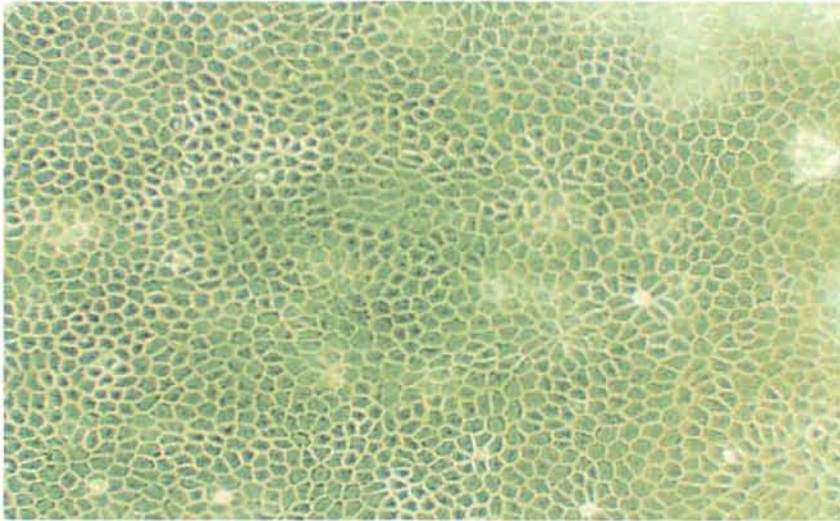
Tahapan penelitian ini meliputi propagasi virus, uji serologis terdiri dari uji HI (Haemagglutinas Inhibisi), Uji Netralisasi, Uji ELISA, Uji SDS-PAGE dan Western Blotting, Uji IEF dan 2 D Western Blotting. Dari hasil penelitian didapatkan marker atau petanda biologis untuk vaksin yang bersirkulasi di Indonesia.

5.2 Hasil Dan Pembahasan

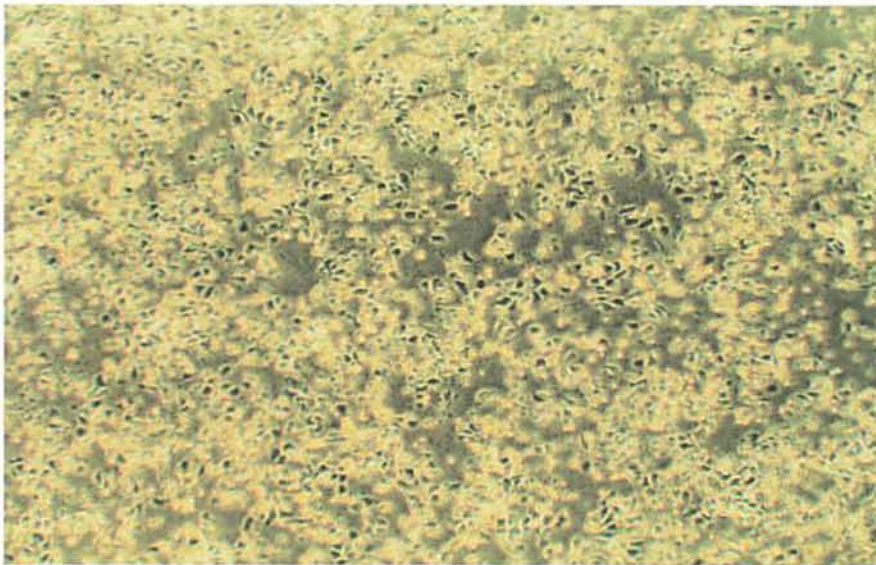
Pada penelitian ini dilakukan pada hewan coba yaitu ayam (*Gallus,sp*) yang SPF atau *spesific pathogenik free*. Vaksin yang digunakan pada penelitian ini adalah lima vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia antara lain H5N1,H5N2,H5N9, bivalen dan trivalen masing-masing diinjeksikan secara intramuskular pada hewan coba sebanyak 0,5 ml. Pengamatan dilakukan tiap hari dan pengambilan serum dilakukan pada hari ke-7, 14, 21 dan 28 hari. Pengujian yang dilakukan adalah Haemagglutinin Inhibisi yang merupakan pengujian gold standart terhadap antibodi yang dihasilkan paska vaksinasi.

Pada pengujian antibodi yang digunakan pada penelitian ini adalah virus A/Ck/114/2008 (H5N1). Virus ini ditemukan pada pasar tradisional di Surabaya pada tahun 2008 oleh peneliti Avian Influenza Research Center Universitas Airlangga.

Selain itu, virus A/Ck/114/2008 (H5N1) telah terkarakterisasi dan memiliki subclade 2.1.3. Propagasi virus dilakukan pada sel MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) dan TAB (telur ayam bertunas). Gambaran sel MDCK sebelum dan sesudah terinfeksi oleh virus A/ck/114/2008 (H5N1) pada gambar 1 dan hasil propagasi virus A/ck/114/2008 (H5N1) pada telur ayam bertunas tabel 1.



Gambar 1. Sel MDCK tanpa infeksi H5N1



Gambar 2. Sel MDCK dengan infeksi A/Ck/114/2008/H5N1

Tabel 1. Hasil Pengamatan A/Ck/114/2008 (H5N1) pada Embrio Telur Ayam

Pengenceran	Embrio Mati pada Jam ke				
	Telur-1	Telur-2	Telur-3	Telur-4	Telur-5
PBS (-)	>72	>72	>72	>72	>72
10-1	24	24	24	24	24
10-2	24	24	24	24	24
10-3	48	48	48	48	48

Penelitian vaksin flu burung pada hewan coba dilakukan di dalam fasilitas animal BSL-3 Universitas Airlangga. Ini disebabkan pada hewan coba akan dilakukan ujiantang dengan virus flu burung hari ke-30 paska vaksinasi. Uji tantang akan dilakukan setelah didapatkan titer antibodi yang cukup signifikan pada hewan coba paska vaksinasi. Gambaran titer antibodi pada vaksin flu burung yang bersirkulasi di indonesia adalah sebagai berikut :

Tabel 2. Hasil rerata Uji Titer Antibodi pada Hewan Coba

Pengamatan	Jenis Vaksin					
	H5N1	H5N2	H5N9	Bivalen	Trivalen	kontrol
Hari ke 7	8	8	16	32	16	0
Hari ke 14	32	16	64	64	32	0
Hari ke 21	64	32	128	256	64	0
Hari ke 28	512	128	512	512	256	0

Berdasarkan pengujian antibodi dengan menggunakan haemagglutinin inhibisi didapatkan titer antibodi yang bervariasi pada hewan coba. Untuk vaksin H5N1 dan H5N2 memiliki pola yang sama dibandingkan dengan vaksin H5N9, bivalen maupun trivalen. Kenaikan titer antibodi dimulai pada hari ke-7 dan mencapai puncaknya pada hari ke-28. Ini memberikan indikasi bahwa vaksin flu burung di lapangan memiliki antibodi yang cukup untuk menghadapi infeksi flu burung dari alam, namun harus dilakukan uji tantang untuk mengetahui hasil lebih lanjut.

Tes netralisasi virus adalah tes yang sangat sensitif dan spesifik untuk mengidentifikasi antibodi spesifik terhadap virus avian influenza atau H5N1 pada manusia dan hewan. Tes netralisasi dapat mendeteksi antibodi spesifik anti H5N1 pada serum manusia dengan titer rendah yang tidak dapat dideteksi oleh tes hambatan hemagglutinasi (HI). Namun untuk melakukan tes netralisasi ini terdapat kendala yaitu harus dilakukan di laboratorium yang memiliki fasilitas BSL3, tidak dapat dilakukan di laboratorium biasa. Pada penelitian ini menggunakan fasilitas ABSL3 Avian Influenza Research Center Universitas Airlangga. Hasil pengujian dengan menggunakan uji netralisasi terhadap berbagai vaksin yang bersirkulasi di Indonesia didapatkan hasil yang bervariasi antara satu vaksin dengan vaksin lainnya. Ini disebabkan seed virus yang digunakan pada tiap vaksin bervariasi. Hasil pengujian dengan menggunakan uji netralisasi dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 3 Data hasil pengujian EID₅₀

Pengenceran Virus	Respon		Jumlah		Ratio (+)	% (+)
	+	-	+	-		
10 ⁻¹	3	0	21	0	21/21	100
10 ⁻²	3	0	18	0	18/18	100
10 ⁻³	3	0	15	0	15/15	100
10 ⁻⁴	3	0	12	0	12/12	100
10 ⁻⁵	3	0	9	0	9/9	100
10 ⁻⁶	2	1	6	1	6/7	86
10 ⁻⁷	2	1	4	2	4/6	67
10 ⁻⁸	2	1	2	3	2/5	40

Dari hasil perhitungan Reed and Mueech, dapat diketahui bahwa titer virus H5N1

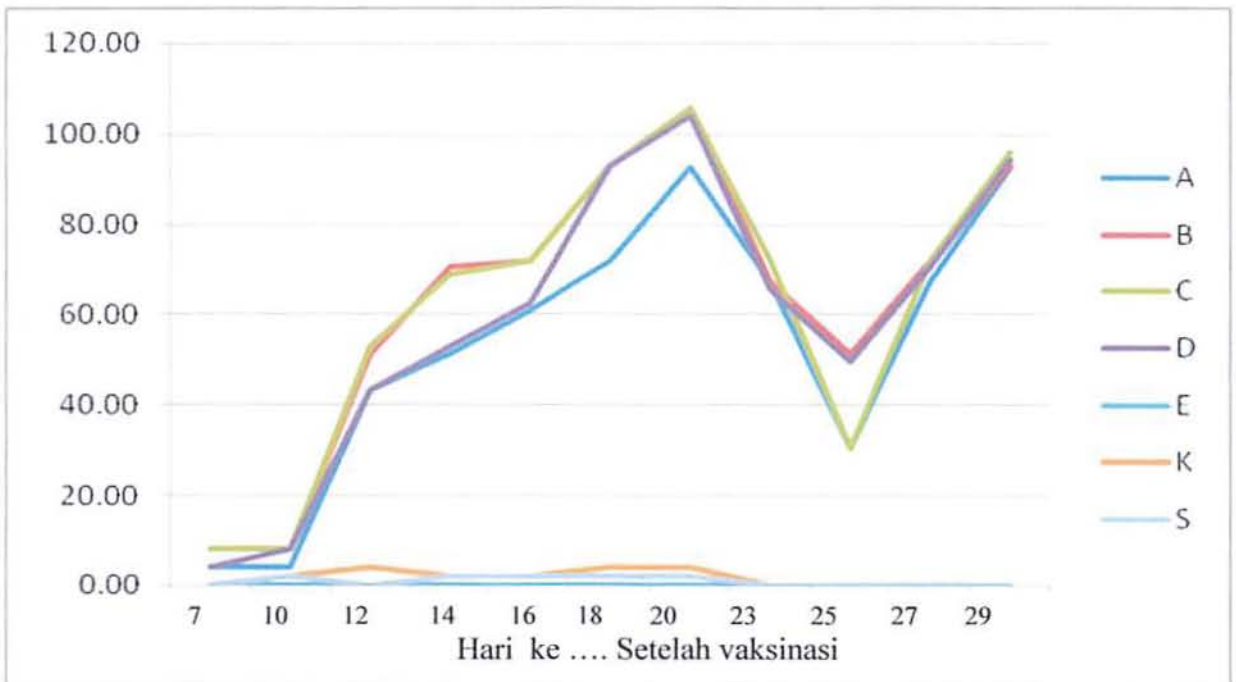
(A/Ck/Ind/114/08) adalah $2 \times 10^{8,6}$ EID₅₀/ml.

Tabel 4 Data hasil pengujian SNT Terhadap Berbagai Vaksin Flu Burung

Jenis Vaksin	Respon		Jumlah		Ratio (+)	% (+)	% Protektif
	+	-	+	-			
A	1	2	1	6	1/7	14	86
B	1	2	2	5	2/7	28,5	71,5
C	2	1	2	5	2/7	28,5	71,5
D	2	1	1	6	1/7	14	86
E	1	2	3	4	3/7	42,8	57,2
Kontrol serum	0	3	-	-	-	-	
Kontrol virus	3	0	-	-	-	-	

Berdasarkan hasil uji netralisasi didapatkan hasil yang cukup bervariasi terhadap berbagai vaksin yang bersirkulasi di Indonesia. Ini disebabkan seed vaksin yang digunakan berbeda. Selain itu, kombinasi vaksin H5N1 yang digunakan juga berbeda.

Sitokin memiliki peranan yang penting di dalam mengendalikan respon imun. fungsi sitokin yang utama bergantung kepada aktivasi gen. Jalur Janus kinase yang lebih dikenal dengan JAK dan STAT atau *signal transducer and activator of transcription* merupakan transduksi sinyal yang sering digunakan oleh berbagai jenis sitokin. Transduksi sinyal atau cell signaling memiliki fungsi yang penting terhadap sistem pertahanan tubuh dan merupakan target terhadap pembuatan obat baru maupun vaksin. Berdasarkan hasil uji ELISA terhadap stat-1 didapatkan hasil terjadinya peningkatan terhadap ekspresi stat-1 terhadap berbagai vaksin flu burung yang bersirkulasi di indonesia. Hasil dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 3. Hasil uji ELISA terhadap stat-1 berbagai vaksin flu burung yang bersirkulasi di indonesia

Imunoglobulin (Ig) merupakan suatu fraksi globulin serum yang berhubungan dengan aktivitas pertahanan tubuh. Imunoglobulin berperan utama dalam mekanisme kekebalan yang diperantai oleh antibodi. IgG) adalah antibodi monomeris yang terbentuk

dari dua rantai berat dan rantai ringan γ , yang saling mengikat dengan ikatan disulfida, dan mempunyai dua fragmen antigen-binding. Populasi IgG paling tinggi dalam tubuh dan terdistribusi cukup merata di dalam darah dan cairan tubuh dengan rasio serum sekitar 75% pada manusia dan waktu paruh 7 hingga 23 hari bergantung pada sub-tipe. Molekul IgG dibentuk dan diedarkankan oleh sel plasma dalam 4 sub-tipe IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. IgG adalah antibodi pertama yang terlibat dalam respon imunitas lanjutan. Keberadaan IgG tertentu pada umumnya diartikan sebagai puncak respon antibodi terhadap antigen. IgG dapat mengikat beragam patogen, seperti virus, bakteri, fungi dengan dua rantai epitop dan melindungi tubuh dengan cara aglutinasi dan immobilization, dan aktivasi sistem kekebalan tubuh dengan lintasan klasik, menggunakan fragmen konstan mengikat patogen dalam opsonisasi untuk ditelan makrofag dan neutrofil dengan proses fagositosis, dan netralisasi toksin. IgG juga memainkan peran penting dalam mengikat sel NK pada ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). IgG juga dihubungkan dengan hipersensitivitas tipe II dan tipe III.

Tabel 5 Data hasil pengujian ELISA IgG Terhadap Berbagai Vaksin Flu Burung Yang Bersirkulasi Di Indonesia

Jenis Vaksin	RATA-RATA TITER ANTIBODI BERDASARKAN ELISA IgG (HARI KE .. SETELAH VAKSINASI)										
	7	10	12	14	16	18	20	23	25	27	29
A	4.0	4.0	43.2	51.2	60.8	72.0	92.8	67.2	30.4	67.2	92.8
B	8.0	4.0	51.2	70.4	72.0	92.8	105.6	67.2	51.2	72.0	92.8
C	8.0	8.0	52.8	68.8	72.0	92.8	105.6	72.0	30.4	72.0	96.0
D	4.0	8.0	43.2	52.8	62.4	92.8	104.0	65.6	49.6	70.4	94.4
E	4.0	8.0	43.2	51.8	61.3	92.8	103.0	66.6	40.6	71.4	93.4
K	0.0	2.0	4.0	2.0	2.0	4.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Protein (akar kata protos dari bahasa Yunani yang berarti "yang paling utama") adalah senyawa organik kompleks berbobot molekul tinggi yang merupakan polimer dari monomer-monomer asam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida. Molekul protein mengandung karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen dan kadang kala sulfur serta fosfor. Protein berperan penting dalam struktur dan fungsi semua sel makhluk hidup dan virus. Protein merupakan salah satu dari biomolekul raksasa, selain polisakarida, lipid, dan polinukleotida, yang merupakan penyusun utama makhluk hidup. Selain itu, protein merupakan salah satu molekul yang paling banyak diteliti dalam biokimia. Protein ditemukan oleh Jöns Jakob Berzelius pada tahun 1838.

Protein memegang peranan penting dalam berbagai proses biologi. Salah satu fungsi protein adalah proteksi imun yaitu protein antibodi merupakan protein yang sangat spesifik dan dapat mengenal serta berkombinasi dengan benda asing seperti virus, bakteri dan sel dari organisma lain.

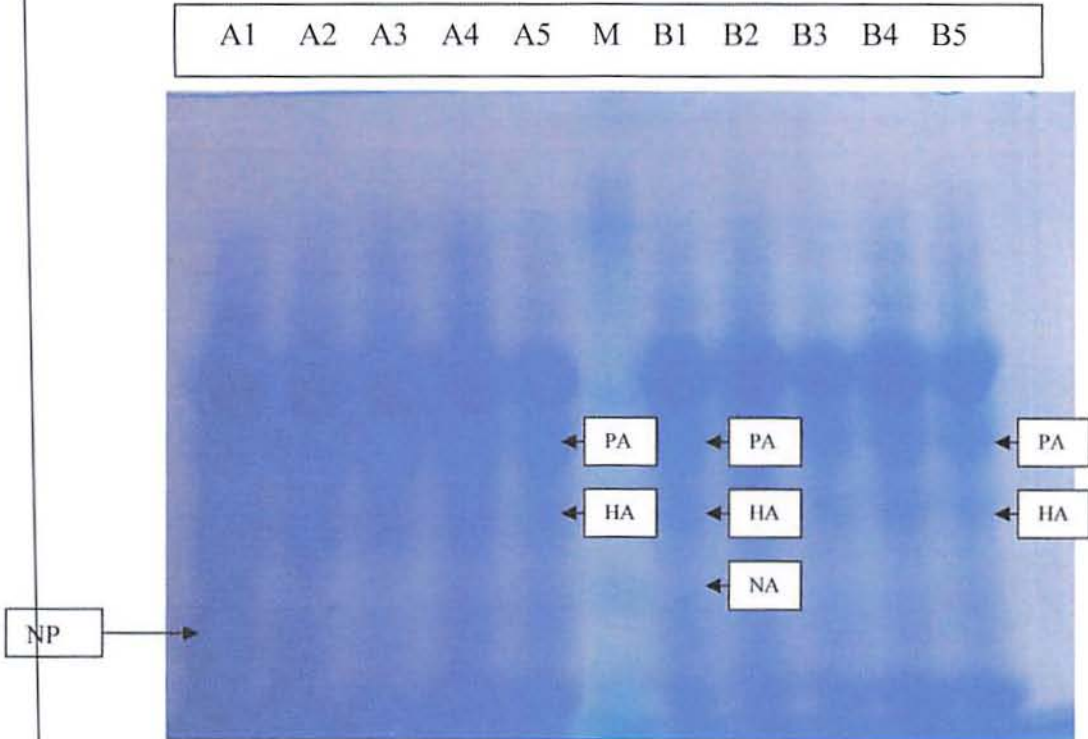
Vaksin secara arti berasal dari bahasa latin 'vacca = melemahkan'. Definisi lengkapnya kurang lebih adalah suatu kuman (bakteri/virus) yang sudah dilemahkan yang kemudian dimasukkan ke dalam tubuh seseorang untuk membentuk kekebalan tubuh (imunitas) secara aktif. Cara memasukkannya bisa dengan disuntik ataupun dengan oral. Fungsi utama dari vaksin adalah untuk pencegahan terhadap suatu penyakit yang diakibatkan oleh kuman.

Flu burung merupakan penyakit yang sangat kontagius dan bersifat zoonosis yang disebabkan oleh virus Avian Influenza (AIV) dari genus Influenza A, famili Orthomyxoviridae (Fauquet et al., 2005). Morfologi virus bervariasi dari bentuk pleomorfic, spherical (< 150 nm) hingga bentuk filament memanjang (Suarez, 2008).

Genom virus bersifat negative sense RNA yang terbagi menjadi 8 segmen yaitu polymerase base 2 (PB2), polymerase base 1 (PB1), polymerase acidic (PA), hemagglutinin (HA), nucleoprotein (NP), neuraminidase (NA), matrix (M1& M2) dan non-structural (NS1 & NS2). Serotipe Influenza A dibagi berdasarkan pada kombinasi glikoprotein HA (1 – 16) dan NA (1 – 9). Untuk saat sekarang ini, AIV subtype H5N1 merupakan strain yang sedang mewabah dan menjadi pusat perhatian. Subtype H5N1 sendiri mempunyai genotipe yang beragam dan terbagi menjadi 10 clade yang mempunyai karakter yang berbeda-beda (Sims dan Brown, 2008; WHO, 2009). Induk semang yang rentan terhadap virus H5N1 adalah unggas, namun tidak menutup kemungkinan spesies lain seperti mamalia dapat tertular. Penyebaran penyakit terjadi melalui kontak langsung maupun tidak langsung. Gejala klinis yang dihasilkan sangat bervariasi tergantung pada strain virus, status induk semang (spesies, umur, jenis kelamin dan status kekebalan) dan kondisi lingkungan. Kerugian akibat penyakit flu burung bukan hanya pada aspek ekonomi semata tetapi juga berdampak pada aspek zoonosis yang ditimbulkan.

Vaksinasi merupakan pendukung dari program pengendalian penyakit AI yang meliputi program lainnya seperti edukasi, biosekuriti, monitoring dan surveillance dan depopulasi. Implementasi program vaksinasi sangat dipengaruhi oleh agenda masing-masing negara sesuai dengan kebutuhan dan budget yang dimiliki. Karakteristik alami dari virus H5N1 yang sangat mudah bermutasi sangat mempengaruhi performa vaksin dalam menghadapi infeksi lapangan (Suarez, 2008). Tiga macam vaksin AI yang umumnya beredar di lapangan adalah vaksin inaktif klasik, vaksin rekombinan dan

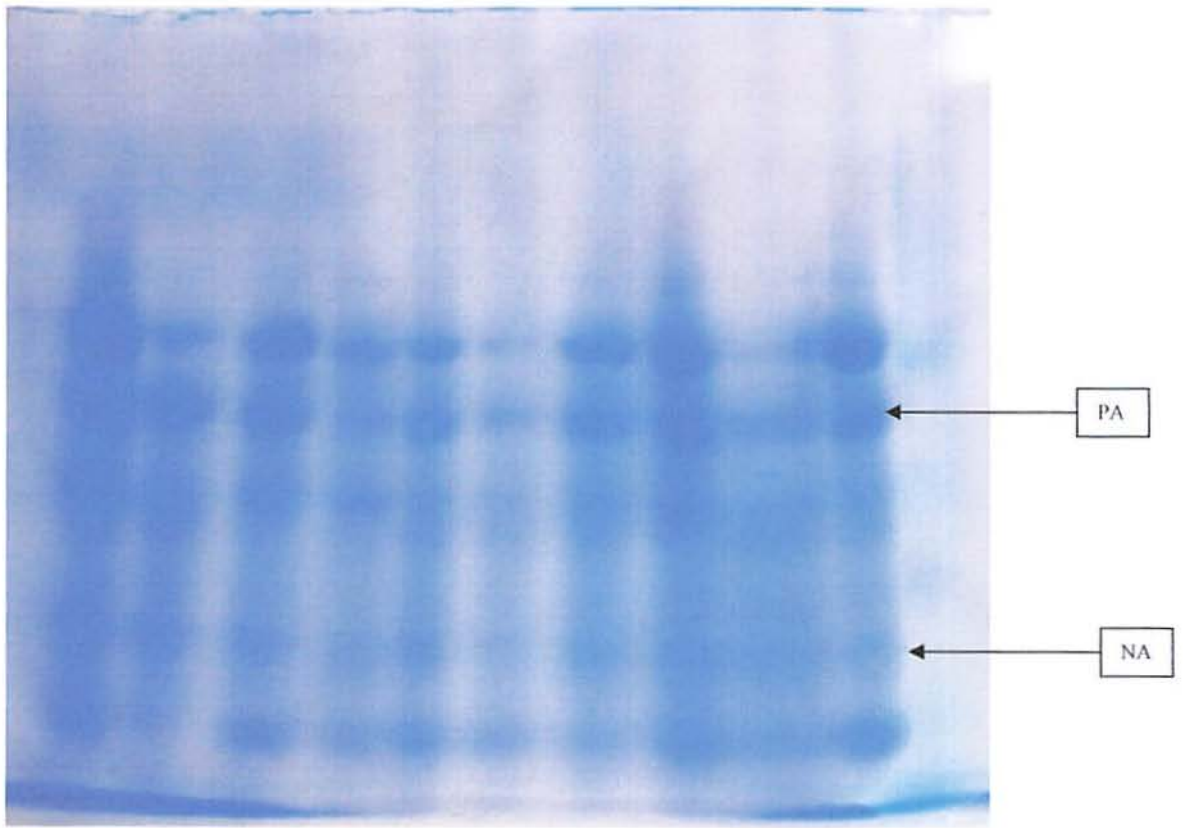
vaksin reverse genetics. Diantara ketiga vaksin tersebut, vaksin inaktif merupakan yang dominan di lapangan.



Gambar 4. Hasil SDS-PAGE vaksin A dan B

Ket: A1 = pengambilan hari ke-7
 A2 = pengambilan hari ke-14
 A3 = pengambilan hari ke-21
 A4 = pengambilan hari ke 28
 A5 = pengambilan hari ke 35
 B1= pengambilan hari ke-7
 B2= pengambilan hari ke-14
 B3= pengambilan hari ke-21
 B4= pengambilan hari ke 28
 B5= pengambilan hari ke 35

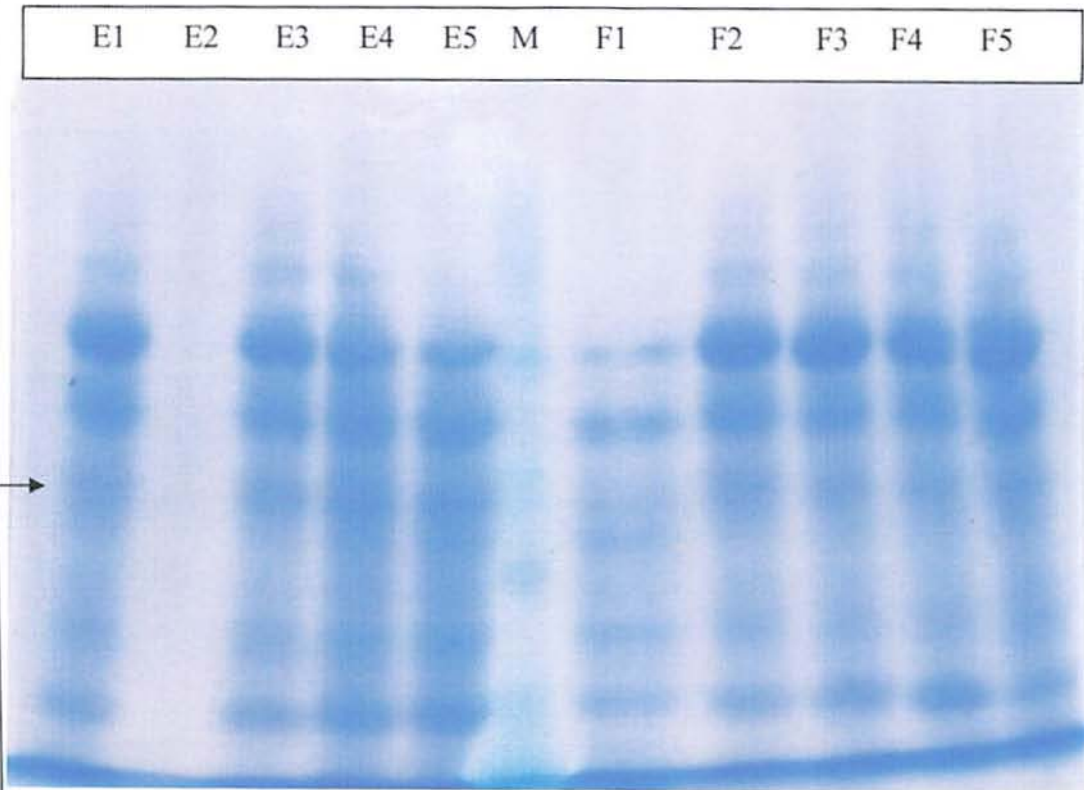
C1	C2	C3	C4	C5	D1	D2	D3	D4	D5	M
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---



Gambar 5. Hasil SDS-PAGE vaksin C dan D

Ket:

C1 = pengambilan hari ke-7	D1= pengambilan hari ke-7
C2 = pengambilan hari ke-14	D2= pengambilan hari ke-14
C3 = pengambilan hari ke-21	D3= pengambilan hari ke-21
C4 = pengambilan hari ke 28	D4= pengambilan hari ke 28
C5 = pengambilan hari ke 35	D5= pengambilan hari ke 35

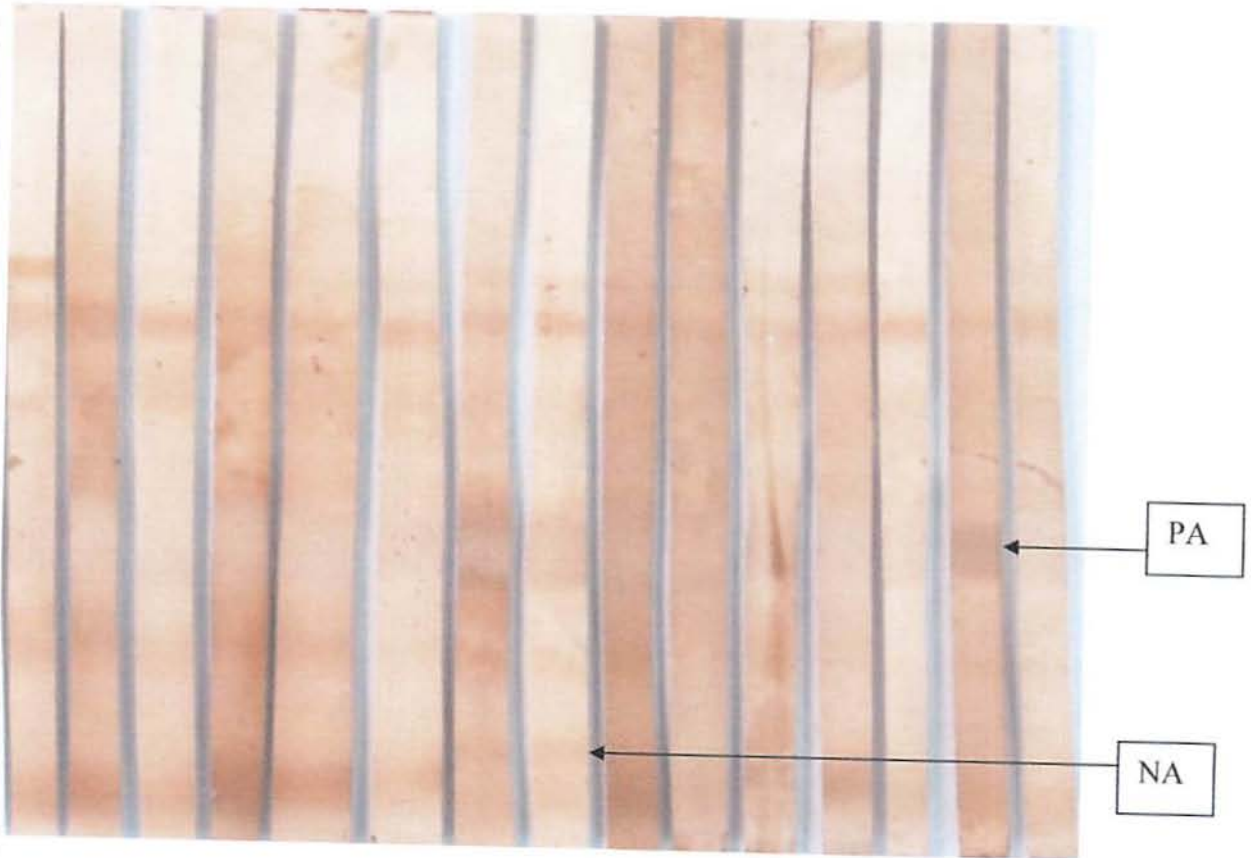


Gambar 6. Hasil SDS-PAGE vaksin E dan F

Ket:

E1 = pengambilan hari ke-7	F1= pengambilan hari ke-7
E2 = pengambilan hari ke-14	F2= pengambilan hari ke-14
E3 = pengambilan hari ke-21	F3= pengambilan hari ke-21
E4 = pengambilan hari ke 28	F4= pengambilan hari ke 28
E5 = pengambilan hari ke 35	F5= pengambilan hari ke 35

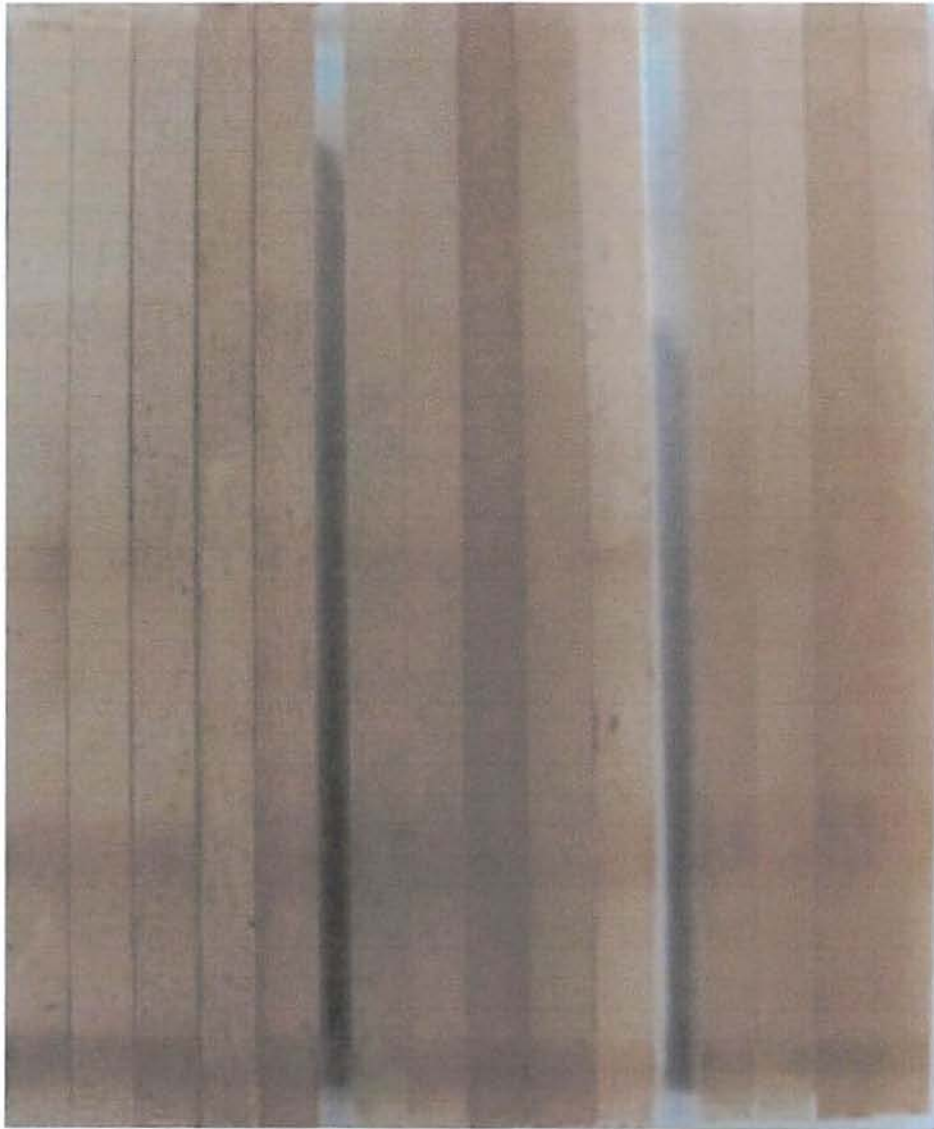
A1 A2 A3 A4 A5 B1 B2 B3 B4 B5 C1 C2 C3 C4 C5



Gambar 7. Hasil Western Blotting Vaksin A,B dan C

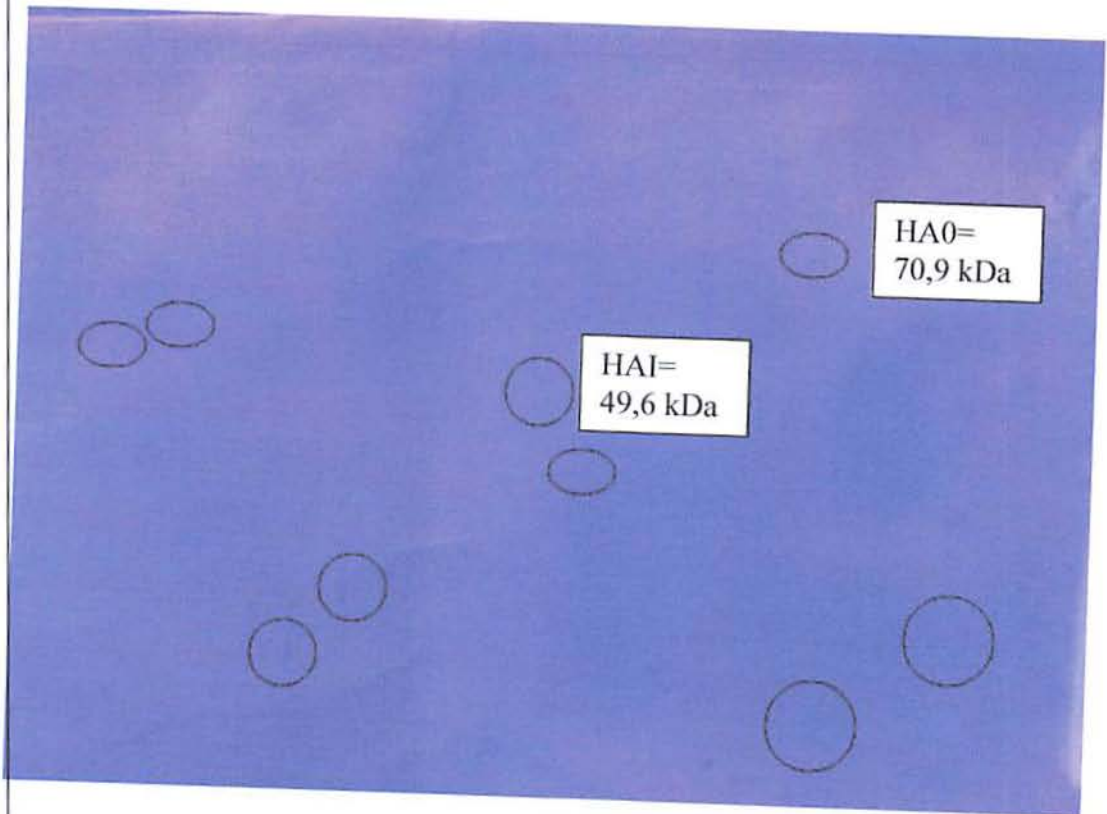
Ket: A1,B1 dan C1 = pengambilan hari ke-7
A2,B2 dan C2 = pengambilan hari ke-14
A3,B3 dan C3 = pengambilan hari ke-21
A4,B4 dan C4 = pengambilan hari ke 28
A5,B5 dan C5 = pengambilan hari ke 35

D1 D2 D3 D4 D5 E1 E3 E4 E5 F1 F2 F3 F4 F5



Gambar 8. Hasil Western Blotting Vaksin D,E dan F

Ket: D1,E1 dan F1 = pengambilan hari ke-7
 D2,E2 dan F2 = pengambilan hari ke-14
 D3,E3 dan F3 = pengambilan hari ke-21
 D4,E4 dan F4 = pengambilan hari ke 28
 D5,E5 dan F5 = pengambilan hari ke 35



Gambar 9. Hasil SDS-PAGE 2 D virus A/ck/114/2008/H5N1



Gambar 10. Hasil 2 D Western Blotting vaksin H5N1



Gambar 10. Hasil 2 D Western Blotting vaksin non H5N1

Pada penelitian ini ditemukan protein HA (Haemagglutinin), NA (Neuraminidase), PA (Polimerase Acid) dan NP (Nukleoprotein) pada masing-masing vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia. Selain itu, juga ditemukan protein PA (Polimerase Acid) dan NA (Neuraminidase) pada hasil blotting yang merupakan hasil reaksi antara antigen dan antibodi hasil vaksinasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein internal memberikan ekspresi yang dominan pada hospes yang telah divaksinasi dengan menggunakan vaksin flu burung. Dari hasil 2 D SDS-PAGE didapatkan berbagai protein dengan berat molekul tertentu dan ditemukan protein dari Haemagglutinin atau HA yaitu HA0 dan HA1 yang berperan pada proses pembelahaan virus flu burung pada hospes.

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah

1. Didapatkan titer antibody vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia
2. Didapatkan nilai uji netralisasi terhadap berbagai vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia
3. Didapatkan respon imunologis terhadap vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia
4. Didapatkan ekspresi protein terhadap vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia

6.2 Saran

1. Desain vaksin flu burung di Indonesia sebaiknya menggunakan protein-protein internal dari virus flu burung. Ini disebabkan protein internal lebih mendominasi ekspresi protein pada berbagai vaksin flu burung yang bersirkulasi di Indonesia.
2. Penelitian dilanjutkan dengan analisis protein yang lebih mendalam yaitu dengan menggunakan analisis protein 3 Dimensi dan pembuatan vaksin sub unit flu burung.

Daftar Pustaka.

- Neumann G., *et al.* 2007. Molecular Pathogenesis of H5N1 Influenza Virus Infection. *Antiviral Therapy*. 12:617-626
- Neumann G *et al.* 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459, 931-939
- Nidom CA, Takano R, Yamada S, Sakai-Tagawa Y, Daulay S, Aswadi, D, et al. 2010. Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg Infect Dis*.
- Nidom CA, *et al.* 2012. Genetic characterization of H5N1 influenza viruses isolated from chickens in Indonesia in 2010. volume 42 number 1
- Ohyama *et al.*, 2010 Current Advances in Developments of New Influenza Vaccines. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, 2, 58-70
- Pappaioanou M. 2009. Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus: Cause of the next pandemic? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* Vol.32 287–300
- Peiris JSM *et al.*, 2009. Innate immune responses to influenza A H5N1: friend or foe?. *review.elsevier*
- Quan Fu-shi *et al.* 2007. Virus-Like Particle Vaccine Induces Protective Immunity Against Homologous And Heterologous Strains of Influenza Virus. *J. Virol.* 81(7):3514. DOI: 10.1128/JVI.02052-06.
- Rao 2006. Vaccine. www.microrao.com
- Rao *et al.*, 2009. A gene-based avian influenza vaccine in poultry. *Poultry Science* 88 :860–866 doi: 10.3382/ps.2008-00360
- Rowe *et al.* 2005. Detection of Antibody to Avian Influenza A (H5N1) Virus in Human Serum by Using a Combination of Serologic Assays. *Journal Of Clinical Microbiology* p. 937–943
- Schneider A., 2007. Emerging Technologies for Influenza Vaccination. *MURJ*. Vol.16
- Shinya, K. *et al.* Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440, 435-436 (2006).
- Sudarisman. 2006. Pengaruh Penggunaan Vaksin H5N1 Dan H5N2 Virus Avian Influenza Pada Peternakan Unggas Di Daerah Jawa Barat. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*

- Sundaresh S.*et al.*2007. From protein microarrays to diagnostic antigen discovery: a study of the pathogen *Francisella tularensis*. Vol. 23 ISMB/ECCB, pages i508–i518
- Takano *et al.*2009. A comparison of the pathogenicity of avian and swine H5N1 influenza viruses in Indonesia. *Arch Virol* (2009) 154:677–681
- Takano *et al.*2009. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003–2007. *Virology* vol. 390,p13–21
- Vajo Z. *et al.* 2010. A Single-Dose Influenza A (H5N1) Vaccine Safe and Immunogenic in Adult and Elderly Patients: an Approach to Pandemic Vaccine Development. *Journal Of Virology*, p. 1237–1242
- Vitzthum.F. *et al.*2005. Proteomics: From Basic Research to Diagnostic Application. A Review of Requirements & Needs. *Journal of Proteome Research* , 1086-1097
- Webster *et al.*2006. H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza. *Emerging Infectious Diseases*.Vol. 12, No. 1
- Webster RG.*et.al* 2006. H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 12, No. 1
- Weir JP.2007. Clinical Trial Challenges for Approval of Pandemic Live Attenuated Influenza Vaccines : Endpoint & Biosafety. Initiative for Vaccine Research/WHO 12-13 June 2007
- WHO.2007.Guidelines on Laboratory Diagnosis of Avian Influenza.Geneva
- Wressnigg *et al.* 2010. Development of a live-attenuated influenza B NS1 intranasal vaccine candidate. *Vaccine* 27 2851–2857
- Wood *et al.*2004. Influenza pandemic vaccines:the imminent challenges from a technical and regulatory perspective. Elsevier,International Congress Series 1263 51–54
- Wood J. 2007. Limitations of current serologic assays to detect antibody responses to HA and NA.FDA/NIH/WHO workshop: Immune Correlates of Protection, December 10-11
- Wu H,*et al.*,2011. Yeast-Derived Avian Influenza Virus Hemagglutinin Protein Induced Immune response in SPF Chicken. *Journal Of Animal and veterinary Advances* 10 (8):999-1002
- Xu K *et al.*,2011. Broad Humoral and Cellular Immunity Elicited by a Bivalent DNA Vaccine Encoding HA and NP Genes from an H5N1 Virus. *Viral Immunology* Volume 24 number 1