

**Laporan
Hibah Strategis Nasional
Tahun Anggaran 2010**



**Kajian Imunogenisitas dan Protektifitas Isolat Lapangan
Virus Avian Influenza A/H5N1 sebagai Kandidat *Seed*
Virus Strain Indonesia untuk Vaksin Unggas**

**Adi Prijo Rahardjo, drh., MSi.
Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh.**

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian
Nomor: 509/SP2H/PP/DP2M/III/2010, Tanggal 24 Juli 2010**

**Universitas Airlangga
2010**

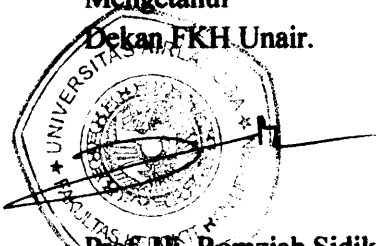
HALAMAN PENGESAHAN

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

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

3. **Pendanaan dan Jangka waktu penelitian**
- a. **Jangka waktu penelitian yang disusulkan** : **1 tahun**
 - b. **Biaya yang diusulkan** : **Rp.100.000.000,-**
 - c. **Biaya yang disetujui tahun I** : **Rp. 82.500.000,-**

Mengetahui
Dekan FKH Unair.



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

Surabaya, 15 Nopember 2010
Peneliti Utama,

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

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.
NIP. 195908051987011001

Kajian Immunogenisitas dan Protektifitas Isolat Lapangan Virus Avian Influenza A/H5N1 sebagai Kandidat *Seed Virus* Strain Indonesia untuk Vaksin Unggas

AP Rahardjo^{1)*} dan ATS Estoepangestie²⁾

RINGKASAN DAN SUMMARY

Wabah AI yang disebabkan virus HPAI A/H5N1 pada unggas di Asia termasuk Indonesia bermula sejak pertengahan tahun 2003. Mengacu pada data dari WHO, kasus AI A/H5N1 pada manusia di dunia hingga tanggal 19 November 2010 tercatat 49,45 % kasus fatal, dari 508 kasus 302 diantaranya meninggal. Di Indonesia kasus AI A/H5N1 pada manusia pertama kali dilaporkan pada bulan Juni 2005, hingga tanggal 19 November 2010 diketahui menyebabkan kasus fatal sebesar 82,94 %, yaitu 141 kematian dari 170 kasus. Penderita AI A/H5N1 pada manusia mayoritas adalah anak-anak dan orang dewasa muda yang sehat, walaupun telah diketahui adanya *barrier species* yang signifikan, penularan virus A/H5N1 dari unggas kepada manusia nyatanya masih tetap berlanjut.

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

Vaksin yang baik adalah yang mempunyai daya proteksi tinggi. Hal tersebut sangat bergantung pada protein antigenik virus vaksin. *seed virus*. Penelurusan karakteristik protein antigenik dan imunogenik dari isolat virus AI A/H5 asal unggas perlu dilakukan, agar dapat diperoleh *seed virus* yang dapat dipakai sebagai kandidat dalam pembuatan vaksin AI A/H5 yang berpotensi memberikan proteksi yang tinggi terhadap adanya wabah AI.

1) Penelitian dibiayai Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementrian Pendidikan Nasional sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Nomor: 509/SP2H/PP/DP2M/III/2010, Tanggal 24 Juli 2010

2) Dosen Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

3) Dosen Departemen Kesehatan Masyarakat veteriner Universitas Airlangga
Kampus C Unair – Mulyorejo. Surabaya – 60115. Indonesia.

E-mail: rahardjo_adi@yahoo.com

* Corresponding Author

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

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mencari *seed virus* vaksin AI-H5 yang dapat memproteksi unggas menghadapi wabah endemik AI pada unggas, sehingga menghilangkan sumber infeksi bagi manusia. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan membantu program pengamatan, pengendalian dan pencegahan wabah endemik AI -H5 yang berpotensi mengganggu stabilitas sosial-ekonomi di masyarakat perunggasan pada khususnya dan pada masyarakat konsumen bahan pangan asal hewan pada umumnya. Adapun tujuan khusus penelitian ini adalah melakukan karakterisasi biologis dan molekuler virus AI-H5 strain Indonesia sebagai kandidat *seed virus* AI strain Indonesia, serta menentukan kandidat virus AI A/H5 dengan sifat imunogenisitas tinggi dan protektif serta aman terhadap virus AI A/H5N1 yang bersirkulasi di lapangan.

Manfaat penelitian ini adalah dapat menentukan *seed virus* yang mempunyai reaktivitas hemagglutinin terbaik terhadap virus AI/H5N1 yang diisolasi dari tahun 2003 – 2008, yang dapat dijadikan kandidat dalam pembuatan vaksin AI-H5. Diharapkan virus AI-H5 yang terpilih dapat dijadikan *seed virus* vaksin dalam pembuatan vaksin AI-H5, yang dapat memberikan protektivitas tinggi terhadap virus AI/H5N1 yang saat ini bersirkulasi di Indonesia.

Pelaksanaan penelitian dilakukan di Departemen Mikrobiologi (Laboratorium Virologi dan Imunologi) dan Laboratorium Biomolekuler serta Teaching Farm pada Fakultas Kedokteran Hewan - Universitas Airlangga. Penelitian ini dimulai bulan Juli sampai akhir bulan Nopember 2010. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif eksperimental, yaitu untuk mendiskripsikan tentang sifat biologis serta sifat imunogenisitas serta protektifitas berbagai kandidat *seed virus* strain Indonesia untuk vaksin unggas, sehingga penelitian ini termasuk penelitian diskriptif. Obyek penelitian ini adalah lima isolat virus AI A/H5N1, masing-masing adalah 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08 yang telah di karakterisasi secara virologis, antara lain adalah identifikasi virus isolat sebagai virus Influenza A/H5. Pengujian dan karakterisasi lima isolat virus AI A/H5N1 1/03, 1, 04, 14/08, 79/08 dan 85/08 meliputi analisa filogenetik, analisa pathogenisitas dengan penentuan *mean death time* (MDT) serta uji patologi-anatomis pada TAB, analisa imunogenisitas pada hewan coba unggas serta pemeriksaan ekskresi virus.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat virus AI 1/03, 1, 04, 14/08, 79/08 dan 85/08 adalah benar virus Influenza A/H5, dan tergolong dalam virus Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI). Semua virus AI yang digunakan dalam penelitian ini bersifat protektif, terutama virus AI 1/04, 79/08 dan 85/08 memiliki sifat imunogenisitas terbaik terbukti dengan respons titer

antibodi yang terbentuk. Semua ayam yang telah diimunisasi dengan kelima jenis virus AI dapat menekan/meniadakan ekskresi virus apabila terjadi infeksi oleh virus AI.

Perlu diteliti lebih lanjut pembuatan vaksin AI A/H5 untuk unggas menggunakan isolat virus AI A/H5 1/04, 79/08 dan 85/08, antara lain dengan memakai berbagai adjuvansia. Perlu dilakukan uji lapangan dalam skala yang lebih besar dan dibawah berbagai kondisi lapangan yang berbeda.

Kajian Immunogenisitas dan Protektifitas Isolat Lapangan Virus Avian Influenza A/H5N1 sebagai Kandidat *Seed Virus* Strain Indonesia untuk Vaksin Unggas

AP Rahardjo^{2)*} dan ATS Estoepangestie³⁾

¹ Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus-C Unair – Mulyorejo. Surabaya – 60115. Indonesia.

² Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus-C Unair – Mulyorejo. Surabaya – 60115. Indonesia.

E-mail rahardjo_adi@yahoo.com

* Corresponding Author

Kata kunci: Virus AI A/H5N1; seed virus ; vaksin AI; immunogenisitas; protektifitas

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian terhadap lima isolat virus AI A/H5N1 dari Indonesia yang diisolasi dari tahun 2003 – 2008, yaitu isolat virus 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08, untuk mencari *seed virus* vaksin AI-H5 yang dapat memproteksi unggas menghadapi wabah endemik AI pada unggas, sehingga menghilangkan sumber infeksi bagi manusia.

Penelitian eksploratif eksperimental ini dilakukan pada bulan Juli sampai akhir Nopember 2010 di Departemen Mikrobiologi Veteriner (Laboratorium Virologi dan Imunologi) dan Laboratorium Biomolekuler serta Teaching Farm pada Fakultas Kedokteran Hewan - Universitas Airlangga. Metoda pengujian yang dilakukan adalah karakterisasi virologis dengan uji hambatan aglutinasi, analisa filogenetik, analisa pathogenisitas dengan penentuan *mean death time* (MDT) serta uji patologi-anatomis pada TAB, analisa immunogenisitas pada hewan coba unggas, serta pemeriksaan ekskresi virus.

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa isolat virus AI 1/03, 1, 04, 14/08, 79/08 dan 85/08 adalah benar virus Influenza A/H5, dan tergolong dalam virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI). Semua virus AI yang digunakan dalam penelitian ini bersifat protektif, terutama virus AI 1/04, 79/08 dan 85/08 memiliki sifat immunogenisitas terbaik terbukti dengan respons titer antibodi yang terbentuk. Ekskresi virus pada semua ayam yang telah diimunisasi dengan kelima jenis isolat virus AI tersebut dapat ditekan atau dieliminasi apabila terjadi infeksi oleh virus AI.

Perlu diteliti lebih lanjut pembuatan vaksin AI A/H5 untuk unggas menggunakan isolat virus AI A/H5 1/04, 79/08 dan 85/08, antara lain dengan memakai berbagai adjuvansia. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk uji lapangan dalam skala populasi unggas yang lebih besar dengan berbagai kondisi lapangan yang berbeda.

Study on The Immunogenicity and Protectivity of Avian Influenza Virus A/H5N Field Isolates as The Candidates of Indonesia's Strain Seed Virus Vaccine for Poultry

A.P. Rahardjo^{1*} and AT. Soelih Estoepangestie²

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

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

E-mail rahardjo_adi@yahoo.com

* Corresponding Author

Keywords: *AI A/H5N1 Virus; seed virus ; AI vaccine; immunogenicity; protectivity*

ABSTRACT

A study has been done that include five virus isolates Avian Influenza (AI) A/H5N1 isolated in Indonesia between year 2003 – 2008, which are virus isolates 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08. The aim of the study was to found *seed virus* for vaccine AI-H5 that could protect Indonesian poultry during the AI endemic outbreak, which will also eliminate the source infection for human.

This explorative experimental study was done on July to November 2010 at the Department of Veterinary Microbiology, in the Virology and Immunology Laboratory, in the Biomolecular Laboratory, and Teaching Farm of Veterinary Medicine Faculty of Ailangga University. Method used in the study were virological characterization using Hemagglutination-Inhibition test, phylogenetic analysis of the virus candidate, pathogenicity analysis by *mean death time* (MDT), pathology-anatomy characterization using embryonated chicken eggs, immunogenicity analysis in chicken laboratory animals, and virus shedding identification.

Result of the study showed that all offive virus isolates AI 1/03, 1, 04, 14/08, 79/08 and 85/08 were Influenza virus A/H5 belong to *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) virus. All of five virus isolates used in this study could give 100 % protection post vaccinated, especially the virus isolates AI 1/04, 79/08 and 85/08 had the best imunogenicity characteristic, which proven by the good level of antibody titer response. Virus shedding by all of chicken laboratory animals immunized by five virus isolates used in this study could be pushed down or eliminated.

It is needed a further study to investigate the vaccine production of AI A/H5 using virus candidates AI A/H5 1/04, 79/08 and 85/08, among others by using many kinds of adjuvans. Field investigation is also needed to be done according to a large scale of poultry population in different field conditions.

PRAKATA

Sejak terinfeksi virus avian influenza H5N1 (AI/H5N1) pada tahun 2003, 32 dari 33 Provinsi di Indonesia menjadi daerah endemis. Berbagai masalah timbul menyangkut terjadinya wabah AI/H5N1 yang sulit dikendalikan, tak hanya di bidang ekonomi dan sosial, masalah politik dan kesehatan menjadi berita utama di berbagai media cetak dan elektronik. Tak hanya merupakan wahana baru bagi peneliti karbitan, bahkan ada peneliti yang memanfaatkan untuk mendapatkan citra “selebritis” di kalangan kuli tinta. Tak peduli, apakah narasumber adalah ahli dibidangnya, yang penting omset penjualan media cetak / elektronik laku karena yang dipasang adalah peneliti selebritis yang sedang “in”. Tak jarang, berita yang disajikan justru malah memperkeruh suasana, bahkan materinya tidak dapat dipertanggung jawabkan secara ilmiah. Siapakah yang menanggung beban terberat dengan pemberitaan itu, tentu saja para pelaku pasar dan peternak unggas, yang sering justru menjadi obyek sasaran. Sebagai contoh, sejak akhir 2003 beredar vaksin AI/H5N1 dipasaran, yang sering disebut dengan “vaksin cocktail” karena berisi isolat virus lokal yang “katanya” mampu mengatasi wabah AI/H5N1 pada saat itu. Nyatanya, daya protektivitasnya nihil karena yang beredar adalah vaksin “kosong” atau dosisnya jauh dibawah standard, alias pembohongan terhadap peternak unggas.

Kesepakatan pada tahun 2004 di Blitar antara Departemen Pertanian yang diwakili Dirjen Peternakan pada waktu itu dengan para pelaku perunggas, mulai dari peternak unggas hingga produsen makanan ternak dan obat hewan untuk unggas, melahirkan semboyan “Indonesia Bebas Flu Burung pada tahun 2005” merupakan puncak kulminasi pembohongan public. Sadarkah kita apa konsekwensi penancangan kesepakatan itu ? Nyatanya, hingga tahun 2009 ini, Indonesia bukannya bebas dari flu burung tetapi justru menjadi daerah endemis, yang menurut literatur ilmiah sulit diberantas tanpa tindakan pencegahan, pengendalian dan pemberantasan wabah yang ketat.

Penelitian ini dilakukan untuk mencari solusi, melalui eksplorasi laboeratoris tentang reaktivitas heamaglutinin berbagai isoalt local virus AI/H5N1, guna menemukan isolate virus untuk seed virus vaksin AI/H5N1 yang sesuai dengan virus AI/H5N1 yang saat ini bersirkulasi di Indonesia. Hal tersebut perlu dilakukan, karena sembilan jenis vaksin AI-H5 yang saat ini beredar di Indonesia, ternyata sebagian besar tidak lagi sesuai untuk menangkal wabah AI/H5n1 di lapangan. Diduga, virus AI/H5N1 yang bersirkulasi di Indobnesia, sebagaimana sifat virus influenza pada umumnya, telah mengalami *antigenic drift* untuk beradaptasi.

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	14
BAB IV. METODE PENELITIAN	15
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	33

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1. Lima Isolat virus influenza A/H5 dari berbagai daerah di Jawa Timur dari tahun 2003, dan 2008 yang dijadikan obyek penelitian	18
Tabel 5.2. <i>Mean Death Time</i> isolat virus AI yang digunakan dalam penelitian ini	20
Tabel 5.3. Titer Isolat Virus AI A/H5 dari Cairan Alantois	22
Tabel 5.4. Hasil Uji Infektifitas Cairan Alantois Pasca Inaktifasi	23
Tabel 5.5. Tabel Pengelompokan Ayam Percobaan, Jumlah Ayam Perconaan dan Dosis Vaksin	25
Tabel 5.6. Tabel Hasil Titer HI pada Ayam Kontrol umur 4 Minggu	26
Tabel 5.7. Rekapitulasi Hasil Sementara Penelitian hingga Bulan	26
Tabel 5.8. Tabel Jadwal Lanjutan Pelaksanaan Penelitian.	27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman	
Gambar 4.1.	Bagan Alir Penelitian	17
Gambar 5.1.	Rapid Test penentuan tipe A virus Influenza menggunakan <i>Rapid Test Kit Directigen Flu A+B</i>	18
Gambar 5.2.	Uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI) untuk penentuan sub tipe virus AI A/H5	19
Gambar 5.3.	Hasil Uji PCR isolat virus AI A/H5N1.	20
Gambar 5.4.	Proses Inaktivasi Isolat Virus AI A/H5N1 dengan Formalin	23
Gambar 5.5.	Pembuatan Vaksin Inaktif Emulsi W/O.	24
Gambar 5.6.	Vaksin yang digunakan dalam percobaan	24
Gambar 5.7.	Imunisasi pada Ayam dengan Vaksin Inaktif	25
Gambar 5.8.	Pengambilan Darah Ayam dari Vena Brachialis	25

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
LAMPIRAN 1.	Hasil Sequencing Gen HA dari Isolat virus AI	31
LAMPIRAN 2.	Hasil Penghitungan <i>Mean Death Time</i> (MDT)	32
LAMPIRAN 3.	Tahap Perbanyakan Virus	35
LAMPIRAN 4.	Perubahan pada Embrio yang terinfeksi Virus	36

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Wabah AI yang disebabkan virus HPAI A/H5N1 pada unggas di Asia termasuk Indonesia bermula sejak pertengahan tahun 2003, namun kasus kejadian AI A/H5N1 pada manusia dilaporkan pertama kali di Hong Kong pada tahun 1997 dengan 6 kematian dari 18 kasus. Mengacu pada data dari WHO, kasus AI A/H5N1 pada manusia di dunia sampai April 2010 tercatat 493 kasus diantaranya 292 meninggal. Di Indonesia pertama kali dilaporkan pada bulan Juni 2005, hingga April 2010 jumlah kasusnya mencapai 135 kematian dari 163 kasus, Penderita AI A/H5N1 pada manusia mayoritas adalah anak-anak dan orang dewasa muda yang sehat, walaupun telah diketahui adanya *barrier species* yang signifikan, penularan virus A/H5N1 dari unggas kepada manusia nyatanya masih tetap berlanjut.

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

Vaksin dikatakan berpotensi baik apabila mempunyai daya proteksi yang tinggi. Hal tersebut sangat bergantung pada protein antigenik virus vaksin. *seed virus*. Penelurusan karakteristik protein antigenik dan imunogenik dari isolat virus AI A/H5 asal unggas perlu dilakukan, agar dapat diperoleh *seed virus* yang dapat dipakai sebagai kandidat dalam pembuatan vaksin AI A/H5 yang berpotensi memberikan proteksi yang tinggi terhadap adanya wabah AI. Langkah ini juga merupakan salah satu tahap profilaksis terhadap kemungkinan terjadinya *genetic shift* virus AI, yang dapat menjadi ancaman timbulnya wabah AI tidak hanya pada unggas tetapi juga pada manusia.

1.2 Tujuan Khusus Penelitian

1. Mencari *seed virus* vaksin yang tepat dalam rangka pembuatan vaksin AI A/H5N1 untuk unggas yang protektif sehingga dapat mengatasi wabah endemik AI pada unggas, sehingga menghilangkan sumber infeksi bagi manusia.
1. Membantu program pengamatan, pengendalian dan pencegahan wabah endemik AI A/H5N1 yang berpotensi mengganggu stabilitas sosial-ekonomi di masyarakat perunggasan pada khususnya dan pada masyarakat konsumen bahan pangan asal hewan pada umumnya.
2. Melakukan analisa imunogenisitas virus AI A/H5N1 strain Indonesia untuk mencari kandidat *seed virus* AI strain Indonesia.
3. Menentukan kandidat virus AI A/H5N1 dengan sifat yang protektif dan aman terhadap virus AI A/H5N1 yang bersirkulasi di lapangan.

1.3. Keutamaan Penelitian

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

Evolusi virus influenza merupakan proses kontinyu yang melibatkan faktor virus penyebabnya dan faktor hostnya. Meningkatnya kejadian penyakit HPAI yang disebabkan virus influenza A/H5N1, A/H7N3, A/H7N7 dan penyebaran panzootik virus influenza A/H9N2, yang kesemuanya sudah terbukti dapat menular pada manusia, merupakan masalah besar yang harus dihadapi baik oleh praktisi Veteriner maupun Kesehatan Masyarakat Manusia. Pertanyaannya adalah, berapa lama lagi pandemi akan terjadi. Banyaknya faktor, termasuk kepadatan populasi unggas domestik, babi dan manusia, merupakan hal penting yang mempengaruhi terjadinya evolusi dari virus penyebab influenza. Padatnya peternakan babi dan unggas, dalam hubungannya dengan pasar hewan hidup tradisional atau "*wet market*", merupakan kondisi optimal terhadap

tingginya kemungkinan terjadinya mutasi, reassortment dan rekombansi dari virus influenza. Strategi yang dapat dilakukan untuk menghambat atau menurunkan kemungkinan terjadinya pandemi influenza, antara lain dengan jalan pemisahan species/kenis hewan dalam satu peternakan, peningkatan *biosecurity*, pengembangan jenis vaksin baru, serta pengetahuan mendasar tentang virus penyebab influenza.

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

Virus influenza A akan mengalami evolusi yang cepat setelah ditularkan dari unggas air liar ke jenis unggas lain / domestik atau mamalia (Ludwig et al., 1995; Zhou et al., 1999). Virus AI subtipe H5, dari unggas air liar menulari ternak unggas rakyat (*backyard poultry*) atau unggas hidup di pasar, dimana terdapat bebek, angsa, burung puyuh, *pheasant*, ayam dan lain-lain, yang dipelihara atau dikandangan bersama-sama (Webster, 2004). Penularan virus AI antara unggas hidup di pasar dan di industri peternakan unggas, dapat menyebabkan rantai penularan yang semakin panjang melalui peralatan, kendaraan dan pekerjanya. Bila virus AI sudah menulari suatu peternakan unggas, maka sudah tercapai jumlah optimum populasi unggas yang memungkinkan terjadinya evolusi virus AI secara cepat. Adanya peternakan unggas dengan populasi tinggi merupakan kondisi optimum untuk terjadinya evolusi virus influenza. Pengambilalihan dari *multiple amino acids* terutama terjadi pada unggas bangsa *gallinaceous*, sedangkan mutasi dari PB2 dan NS dapat terdeteksi setelah terjadi penularan pada manusia. Tidak diketahui, apakah seleksi pertamanya terjadi pada unggas domestik atau pada manusia (Webster and Hulse, 2004).

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

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

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

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Avian Influenza

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

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

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

2.2 Virus Avian Influenza

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi virus

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

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

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

2.2.2. Struktur Antigen

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

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

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

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

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

2.2.3. Antigen Hemagglutinin

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

Hemagglutinin (HA trimer) yang sering disebut sebagai HA₀ ini tersusun dari dua subunit, yaitu HA₁ and HA₂. Struktur ini tersusun dari 550 asam amino pada 220 KDa, dan panjangnya 135 Å⁰. Sebutan Hemagglutinin (HA) diperoleh sejak eksperimen awal dengan Influenza A, karena jika ditambahkan pada eritrosit akan mengakibatkan aglutinasi atau mengumpal. Rantai HA₁ merupakan sisi pengikatan untuk penempelan virus pada reseptor (*receptor binding sites*) permukaan sel. Rantai HA₂ memiliki peran utama pada aktifitas fusi. Virus influenza memasuki sel host sebagai partikel yang utuh oleh endositosis yang dimediasi oleh reseptor (*receptor-mediated endocytosis*). Fusi kemudian dipicu oleh suasana asam (pH 5) yang terjadi didalam endosom. Perubahan pH ini menyebabkan HA₀ yang semula melipat segera mengembang sempurna. Dengan SDS-PAGE dapat diketahui berat molekul dari HA₀ adalah 77 kD, HA₁ adalah 50 kD dan HA₂ adalah 26 kD. Sifat pembelahan HA ini memberi arti pada sifat virulensi virus AI. Karena sifat HA ini, maka antibodi anti-HA merupakan antibodi yang protektif karena dapat menetralkan daya infeksi virus (Vines *et al.*, 1998; Suzuki and Nei, 2002; Swayne, 2003; Sandbulte *et al.*, 2007).

2.3 Sumber dan Cara Penularan Avian Influenza

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

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

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

2.4 Pencegahan Avian Influenza

2.4.1 Pencegahan Penularan

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

2.4.2 Pengebalan Hewan

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

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

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

2.5 Epidemiologi Avian Influenza

Virus AI-H5N1 yang semula hanya didapatkan di kawasan Asia Timur dan Asia Tenggara, kini sudah merambah ke arah barat sampai Eropa dan Afrika. Burung migran memiliki peran penting dalam penyebaran virus AI secara alami. Sesampainya di lokasi baru, burung migran ini dapat menulari burung liar lokal dan selanjutnya burung liar akan menulari unggas atau burung peliharaan disekitarnya. Dengan demikian burung liar akan bertindak sebagai *reservoir* (sumber) dari penyakit AI. Kejadian penyakit akan bersifat sporadis pada daerah tersebut yang kemudian menjadi daerah wabah endemik, seperti halnya yang terjadi di negara Asia Tenggara kini termasuk Indonesia. Pola penularan antar burung liar dan unggas peliharaan ini mengakibatkan kesulitan dalam pemberantasan penyakit AI. *Surveillance* yang lebih spesifik terhadap burung liar perlu dilakukan agar dapat diketahui sejauh mana dan burung apa saja yang dapat bertindak sebagai *carrier* (Webster, 1995; Swayne, 2003; Fouchier, 2003)

2.6 Kejadian AI A/H5N1 pada Manusia

Wabah AI yang disebabkan virus HPAI A/H5N1 pada unggas di Asia bermula sejak pertengahan tahun 2003, namun kasus kejadian AI A/H5N1 pada manusia dilaporkan pertama kali pada tahun 1997 dengan 6 kematian dari 18 kasus. Selanjutnya diketahui adanya kasus AI A/H5N1 pada manusia biasanya berhubungan dengan kasus AI pada unggas. *Case Fatality Rate (CFR)* infeksi AI A/H5N1 pada manusia rata-rata 63 % (Briand, 2008). Kasus AI A/H5N1 hingga tahun 2008 sebanyak 387 kasus yang dikonfirmasi dari laboratorium rujukan WHO, penularan primer dari unggas, kasus terjadi secara sporadis dan beberapa kejadian *family cluster*, kasus penularan antar manusia masih terbatas (Briand, 2008). Kasus AI A/H5N1 pada manusia di Indonesia terjadi pertama kali pada bulan Juni tahun 2005, dan pada tahun-tahun selanjutnya menjadi kasus terbanyak di dunia. Menurut Briand (2008) kasus AI A/H5N1 di Indonesia terjadi sepanjang tahun dengan sedikit peningkatan pada awal tahun, pola

kejadiannya sesuai dengan wabah musiman influenza (*seasonal influenza*) mirip dengan kejadian di Mesir (Briand, 2008).

Dampak selanjutnya penyakit AI b yang sangat besar kemungkinannya adalah terjadinya mutasi virus A/H5N1 menjadi sangat ganas bagi manusia dan terjadinya penularan dari manusia ke manusia. Hal tersebut telah terjadi pada isolat A/H1N1/Mexico yang saat ini menjadi penyebab pandemi flu. Demikian halnya dengan A/H5N1, mutasi virusnya bisa terjadi setiap saat seiring dengan adanya kontak antara manusia dengan unggas penderita flu burung oleh virus H5N1. Oleh karena itu, perubahan cara hidup manusia lebih dicermati, utamanya mereka yang berhubungan dengan penyediaan rantai makanan asal unggas, sehingga dapat dihindari terbentuknya strain baru penyebab pandemi influenza A/H5N1. Tindakan yang juga tidak kalah pentingnya adalah kontrol penyakit AI secara kontinyu pada populasi hewan sumber penyakit flu burung H5N1. (WHO-FAO-INFOSAN, 2005).

2.7 Diagnosa Avian Influenza

2.7.1 Diagnosa Klinis

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

2.7.2 Diagnosa Laboratoris

2.7.2.1 Rapid Test

Rapid Test mulai banyak digunakan untuk diagnosa penyakit AI secara cepat. Semula Rapid Test hanya digunakan secara terbatas untuk manusia, namun karena keperluan yang mendesak, kini digunakan juga untuk unggas. Uji ini praktis, dijual secara komersial sebagai kit dan dapat dilakukan dilapangan serta cukup akurat. Hasil yang didapat bisa diperoleh setelah 30 menit, sehingga dapat dilakukan tindakan

veteriner lebih lanjut. Uji ini didasarkan atas prinsip *immunoblot*. Spesifitas terbatas hanya pada tipe dari virus Inflenza, sedangkan subtipe tidak dapat dibedakan, karena prinsip uji ini adalah pada deteksi nukleoprotein virus. Sampel yang digunakan bisa usapan atau kerokan rongga hidung dan trachea atau usapan kloaka atau feses. (OIE, 2008)

2.7.2.2 Uji Imunofluorosensi

Uji Imunofluorosensi atau *Immunofluorescence assay* dapat digunakan baik untuk deteksi virus dalam spesimen klinis maupun hasil biakan virus asal kultur sel atau telur ayam bertunas. Spesimen klinis harus diperoleh secepatnya setelah munculnya simtoma, karena jumlah sel yang terinfeksi akan menurun selama perjalanan penyakit. Hasil pemeriksaan akan lebih baik apabila bahan pemeriksaan sudah dikultur lebih dahulu untuk memperbanyak virus (OIE,2008).

2.7.2.3 Isolasi virus

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

2.7.2.4 RT-PCR

Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik yang baik untuk identifikasi genom virus. Karena genom virus AI ini adalah single-stranded RNA, kopi dari DNA (cDNA) harus disintese lebih dahulu menggunakan *reverse transcriptase (RT) polymerase*. Dalam melakukan amplifikasi genom diperlukan sepasang primer oligonucleotide yang didesain atas dasar sekwen HA dan NA dari virus AI subtipe H5N1 dan selanjutnya akan memperbanyak RNA spesifik untuk satu subtipe. DNA

yang diperoleh untuk selanjutnya dengan elektroforesis dapat diketahui besaran basepair berupa *band* atau pita setelah dilakukan pewarnaan. Bila diperlukan, DNA ini dapat dianalisa menggunakan metode teknik genetika molekuler, misalnya *sequencing*. Metode ini sangat spesifik dan hasil dapat diperoleh setelah 2-3 hari (WHO, 2005).

2.7.2.5 Serologis

2.7.2.5.1 Uji Hemagglutinin Inhibition (Uji HI)

Dasar dari uji ini adalah sifat Hemagglutinin (HA) virus influenza yang mampu mengaglutinasi eritrosit dari unggas atau manusia. Sifat uji HI spesifik terhadap antibodi anti-H5, sehingga daya hemagglutinasi dari virus AI-H5 dapat dihambat oleh antibodi. Titer diekspresikan sebagai pengenceran tertinggi dari serum yang masih mampu menghambat hemagglutinasi oleh virus AI-H5. Hewan yang memiliki titer ≥ 4 (\log_2) dinyatakan sebagai positif, apabila hewan tidak divaksin. Kriteria lain adalah apabila terjadi kenaikan titer 4x dari dua kali pengambilan serum dengan selisih dua minggu, maka hewan dinyatakan sedang menderita penyakit aktif. Uji ini oleh WHO dan OIE direkomendasikan sebagai uji standart. (OIE,2008;WHO, 2005).

2.7.2.5.2 Uji Agar Gel Immunodiffusion (Uji AGID)

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

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan Umum

Tujuan Umum dari penelitian ini adalah :

1. Mencari *seed virus* vaksin yang tepat dalam rangka pembuatan vaksin AI-H5 untuk unggas yang protektif sehingga dapat mengatasi wabah endemik AI pada unggas, sehingga menghilangkan sumber infeksi bagi manusia.
2. Membantu program pengamatan, pengendalian dan pencegahan wabah endemik AI - H5 yang berpotensi mengganggu stabilitas sosial-ekonomi di masyarakat perunggasan pada khususnya dan pada masyarakat konsumen bahan pangan asal hewan pada umumnya.

3.1.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

1. Melakukan karakterisasi biologis dan molekuler virus AI-H5 strain Indonesia sebagai kandidat *seed virus* AI strain Indonesia
2. Menentukan kandidat virus AI A/H5 dengan sifat imunogenisitas tinggi dan protektif serta aman terhadap virus AI A/H5N1 yang bersirkulasi di lapangan.

3.2 Manfaat penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

1. Dapat menentukan *seed virus* yang mempunyai reaktivitas heamagglutinin terbaik terhadap virus AI/H5N1 yang diisolasi dari tahun 2003 – 2008, yang dapat dijadikan kandidat dalam pembuatan vaksin AI-H5.
2. Diharapkan virus AI-H5 yang terpilih dapat dijadikan *seed virus* vaksin dalam pembuatan vaksin AI-H5, yang dapat memberikan protektivitas tinggi terhadap virus AI/H5N1 yang saat ini bersirkulasdi di Indonesia.

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif eksperimental, yaitu untuk mendeskripsikan tentang sifat biologis serta sifat imunogenisitas serta protektifitas berbagai kandidat seed virus strain Indonesia untuk vaksin unggas, sehingga penelitian ini termasuk penelitian diskriptif.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Departemen Mikrobiologi (Laboratorium Virologi dan Imunologi) dan Laboratorium Biomolekuler serta Teaching Farm pada Fakultas Kedokteran Hewan - Universitas Airlangga. Penelitian ini dimulai bulan Juli sampai akhir bulan Nopember 2010.

4.3. Tahap Pelaksanaan Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah lima isolat virus AI/H5N1 yang akan di karakterisasi secara virologis dan imunologis.

Penelitian ini tersusun atas empat tahapan :

1. Analisa pathogenisitas (*Pathogenicity assay*)

Untuk mengetahui keganasan virus AI dilakukan uji MDT (*Mean Death Time*) pada Embrio Ayam Kandidat yang baik adalah virus yang memiliki angka MDT yang besar. Sampai kini belum pernah didapatkan isolat virus AI dengan virulensi rendah yang tergolong dalam Low Pathogenic Avian Influenza virus (LPAI). Apabila *Seed virus* yang digunakan adalah Highly Pathogenic Avian Influenza virus (HPAI), diupayakan kandidat yang paling ideal adalah virus dengan virulensi serendah mungkin, walaupun nantinya dijadikan vaksin whole virus inaktif (*Inactivated whole virus vaccine*)

2. Analisa imunogenisitas (*Immunogenicity assay*) dan Daya protektifitas (*Challenge test*)

Kandidat seed virus yang telah diinaktifasi dan ditambahkan adjuvans akan diberikan pada ayam coba. Tantangan dengan virus AI dilakukan 2 minggu

setelah vaksinasi kedua. Vaksin yang baik diharapkan akan memberi angka proteksi terhadap mortalitas lebih dari 95 %,

Tujuan lain dari analisa juga untuk mengetahui dosis efektif minimal dari masing2 kandidat seed virus. Kandidat yang baik diupayakan isolate yang memiliki sifat imunogenisitas yang tinggi, dengan cara mengetahui jumlah titer virus yang minimal untuk dapat menstimulasi titer antibody yang maksimal.

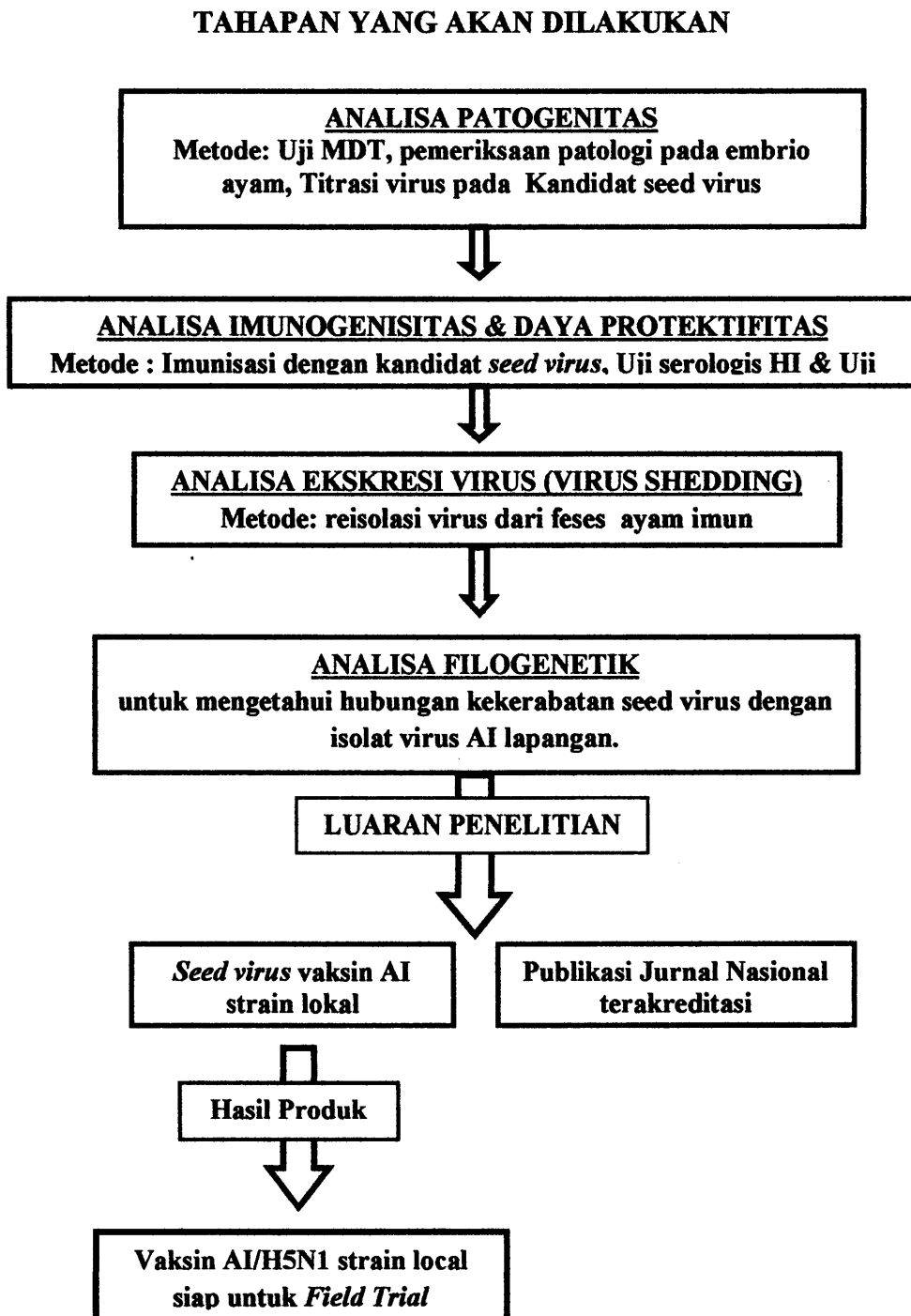
3. Analisa ekskresi virus pada Ayam kebal pasca tantang (*Virus shedding assay*)

Isolasi virus dilakukan untuk mengetahui kapan dan berapa jumlah virus yang akan diekskresikan bersama feses. Walaupun vaksin tidak dapat menjamin melindungi ayam dari infeksi , kekebalan yang terbentuk diharapkan dapat menekan angka mortalitas dalam kelompok serta dapat mengurangi ekskresi virus pada ayam penderita.

4. Analisa filogenetik (*Phylogenetic Analysis*)

Untuk mengetahui hubungan dan kedekatan kekrabatan dari *seed virus* terpilih dengan virus AI isolat lapangan lain di Indonesia dilakukan sekvens gen penyandi protein HA sebagai protein imunogenik.

4.4. Bagan alir Penelitian



Gambar 4.1. Bagan Alir Penelitian

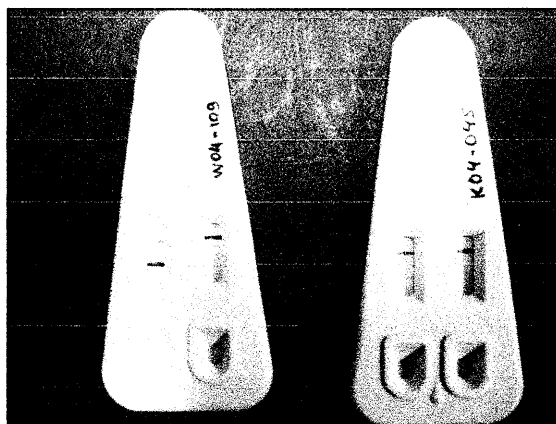
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Obyek penelitian ini adalah lima isolat virus AI A/H5N1, masing-masing adalah 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08 yang telah di karakterisasi secara virologis, antara lain adalah identifikasi virus isolat sebagai virus Influenza A/H5. Dalam penelitian pendahuluan juga telah diketahui sifat antigenisitas dari masing-masing isolat virus AI, sehingga terseleksi lima isolat virus AI yang digunakan dalam penelitian ini seperti tertera dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Lima Isolat virus influenza A/H5 dari berbagai daerah di Jawa Timur dari tahun 2003, dan 2008 yang dijadikan obyek penelitian

No.	Kode Isolat	Tahun Isolasi
1	1/03	2003
2	1/04	2004
3	14/08	2008
4	79/08	2008
5	85/08	2008

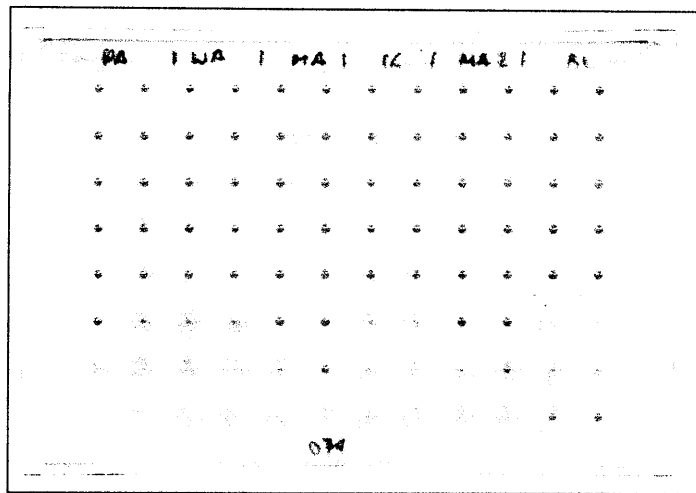
Identifikasi virus sebagai virus Influenza tipe A dapat dilihat pada Gambar 5.1., dilakukan menggunakan *Rapid Test Kit Directigen Flu A+B* (Becton and Dickinson).



Gambar 5.1. Rapid Test penentuan tipe A virus Influenza menggunakan *Rapid Test Kit Directigen Flu A+B* (Becton and Dickinson). Adanya dua garis pada gambar kiri menunjukkan hasil positif tipe A.

Peneguhan sebagai subtype H5 dilakukan dengan uji serologis Hemaglutinasi Inhibisi (*Haemagglutination Inhibition Test / HI*) menggunakan antiserum anti-H5

seperti nampak pada Gambar 5.2., sesuai dengan metode pengujian diagnostik virus influenza dari Webster (2004).



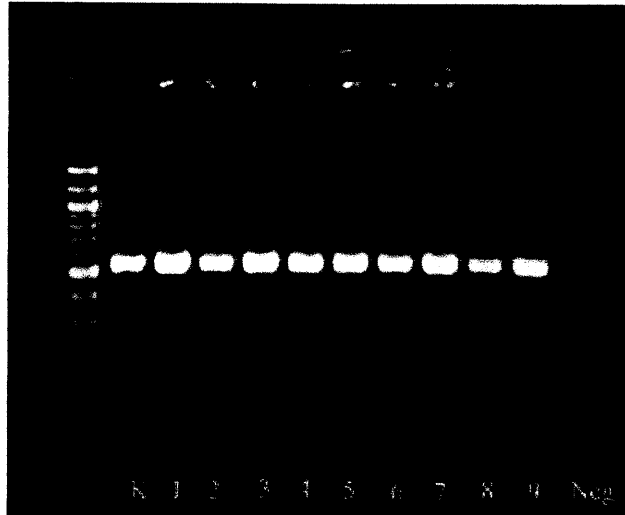
Gambar 5.2. Uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI) untuk penentuan subtype virus AI A/H5.

Keterangan: Terbentuknya endapan pada dasar sumuran dari microplate mengindikasikan adanya hambatan hemaglutinasi (virus influenza A/H5)

Pengujian dan karakterisasi lima isolat virus AI A/H5N1 1/03, 1, 04, 14/08, 79/08 dan 85/08 meliputi analisa filogenetik, analisa pathogenesis dengan penentuan *mean death time* (MDT) serta uji patologi-anatomis pada TAB, analisa imunogenesis pada hewan coba unggas serta pemeriksaan ekskresi virus

5.1. Identifikasi virus dengan PCR

Identifikasi gen penyandi protein HA (Hemagglutinin) dilakukan dengan PCR spesifik terhadap gen HA-subtype H5. Terlihat pada Gambar 5.3., hasil uji PCR menunjukkan bahwa kelima isolat teridentifikasi sebagai virus Influenza A/H5.



Gambar 5.3. Hasil Uji PCR isolat virus AI A/H5N1.

K= Kontrol Positif, Neg = Kontrol negatif 1= isolat 01/03, 2 dan 3 = isolat 1/04, 4 dan 5 = isolat 14/08, 6 dan 7= isolat 79/08, 8 dan 9 = isolat 85/08.

5.2. Analisa pathogenisitas (*Pathogenicity assay*)

5.2.1. Uji Mean Death Time (MDT)

Uji MDT dilakukan untuk mengetahui keganasan virus AI pada TAB umur 9-10 hari. MDT adalah waktu antara inokulasi dan kematian embrio dalam jam yang disebabkan oleh suspensi virus dengan pengenceran tertinggi dimana semua TAB mati. MDT terlama adalah 46,7 jam dari isolat virus AI A/H5 – 14/08, dan yang tercepat adalah 41,03 dari isolat AI/H5-79/08. Hasil MDT selengkapnya dari masing-masing isolat virus dapat dilihat pada Tabel 5.2. dibawah ini.

Tabel 5.2. Mean Death Time isolat virus AI yang digunakan dalam penelitian ini

No.	Kode Isolat	MDT (jam)
1	1/03	42,7
2	1/04	44,0
3	14/08	46,7
4	79/08	41,0
5	85/08	44,0

5.2.2 Perubahan Patologi-anatomis pada embrio

Hasil pemeriksaan patologi-anatomis dari embrio ayam yang telah mati menunjukkan perubahan yang hampir sama pada lima isolat virus AI A/H5 1/03, 1, 04, 14/08, 79/08 dan 85/08. Perubahan patologi-anatomis tersebut meliputi:

- Embrio berwarna merah gelap akibat perdarahan dan kongesti subkutan
- Hati membesar dan kongesti
- Limpa membesar
- Ginjal membesar
- Kongesti dan sedikit perdarahan pada selaput chorioalantois

Berdasarkan pemeriksaan terhadap MDT dan uji patologi-anatomis, semua isolat virus AI yang diteliti tergolong dalam virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI). Isolat virus 14/08 memiliki MDT yang terbesar, sedangkan isolat virus 79/08 memiliki MDT yang terkecil.

5.3. Analisa imunogenisitas (*Immunogenicity assay*)

Penelitian imunogenisitas dilakukan di Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang terletak di Kecamatan Kedamaian, Kabupaten Gresik. Kandang Hewan Coba untuk Ayam yang digunakan sebanyak 4 petak (Kandang 1 sampai dengan Kandang 4). Persiapan kandang meliputi: desinfeksi kandang, pengisian sekam serta pemasangan peralatan untuk ayam umur sehari atau Day Old Chick (DOC).

Ada dua tahapan penelitian dalam pengujian imunogenisitas lima isolat virus AI yang diteliti, yaitu meliputi :

1. Proses persiapan dan pembuatan sediaan vaksin dari lima isolat virus AI A/H5 1/03, 1, 04, 14/08, 79/08 dan 85/08 di laboratorium Virologi Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
2. Proses imunisasi pada kelompok ayam coba dengan lima macam sediaan vaksin dari lima isolat virus AI A/H5 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08

5.3.1 Pembuatan Sediaan Vaksin

Sebelum analisa sifat imunogenisitas dari lima isolat virus AI A/H5 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08, terlebih dahulu dilakukan perbanyakan virus, titrasi virus, inaktivasi virus, uji infektifitas pasca inaktivasi, pengaturan dosis dan yang terakhir adalah proses pembuatan vaksin inaktif.

5.3.1.1 Perbanyakan virus

Suspensi Virus dari masing-masing isolat virus AI A/H5 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08 di encerkan menjadi 1:100 dan diinokulasikan pada kantong alantois dari 12 TAB umur 10 hari. Setiap embrio yang mati, dipanen cairan alantoisnya untuk diperiksa tingginya titer hemaglutinasi (titer HA). Selanjutnya, cairan alantois yang memiliki titer minimal 2^7 HA-Unit dikumpulkan menjadi satu (pooling).

5.3.1.2 Titrasi virus

Cairan alantois yang mengandung virus dititrasi untuk mengetahui kandungan virus yang infeksius dalam satuan volume tertentu. Titer virus dari cairan alantois dinyatakan dalam *Embryo infectious dose 50%* (EID50/ml). Hasil titrasi cairan alantois masing-masing isolat virus AI A/H5 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08 disajikan pada Tabel 5.3.

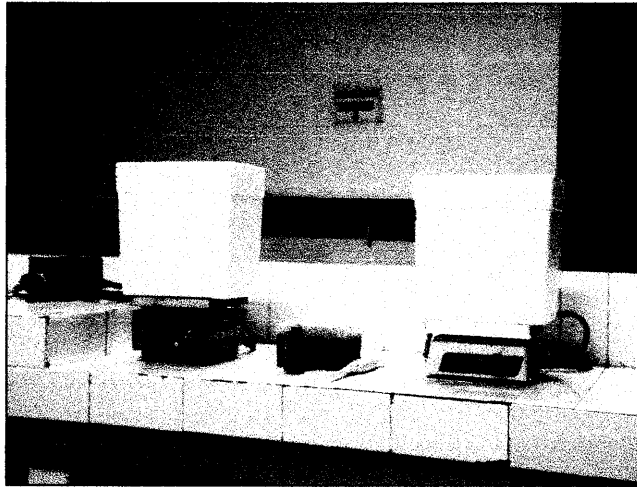
Tabel 5.3. Titer Isolat Virus AI A/H5 dari Cairan Alantois

No.	Isolat virus	Titer virus (EID50/ml)
1	1/03	$10^{9,5}$
2	1/04	10^8
3	14/08	$10^{8,4}$
4	79/08	$10^{7,15}$
5	85/08	10^8

5.3.1.3 Inaktivasi virus

Cairan alantois yang infeksius, mengandung masing-masing isolat virus AI A/H5 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08, yang akan digunakan sebagai bahan untuk vaksin harus diinaktifkan terlebih dahulu. Bahan inaktivasi adalah formalin dengan konsentrasi

0,1%. Proses inaktivasi dilakukan pada suhu dingin (8-10° Celsius) selama 12 – 14 jam sambil diaduk pelan-pelan dengan *magnetic stirrer*, seperti nampak pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Proses Inaktivasi Isolat Virus AI A/H5N1 dengan Formalin

5.3.1.4. Uji infektifitas pasca inaktivasi

Masing-masing isolat virus AIA/H5 1/03, 1, 04, 14/08, 79/08 dan 85/08 yang telah diinaktivasi harus diuji keamanannya sebelum vaksinasi ayam coba, karena semuanya merupakan virus HPAI. Metode untuk memastikan bahwa virus telah mengalami inaktivasi dengan sempurna adalah dengan melakukan reisolasi virus dari cairan alantois yang telah diinaktivkan. Cairan alantois dari masing-masing isolat diinokulasikan pada 10 butir TAB umur 10 hari dan selanjutnya diinkubasi pada 35 °C selama 5 hari. Hasil reisolasi virus dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Hasil Uji Infektifitas Cairan Alantois Pasca Inaktivasi

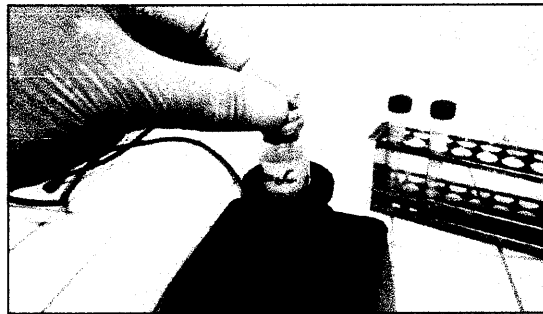
No.	Kode Isolat virus	Kematian Embrio	Reisolasi virus
1	1/03	Tidak ada*	Negatif **
2	1/04	Tidak ada	Negatif
3	14/08	Tidak ada	Negatif
4	79/08	Tidak ada	Negatif
5	85/08	Tidak ada	Negatif

*) Waktu inkubasi 5 hari, dimatikan dengan cara didinginkan

***) Virus tidak dapat diisolasi kembali

5.3.1.5. Pengaturan dosis dan pembuatan Vaksin

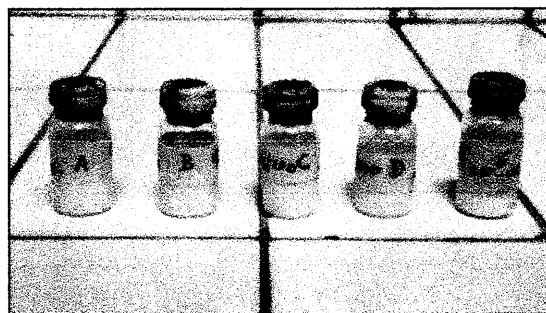
Tergantung dari hasil titer masing-masing isolat, cairan alantois di encerkan sedemikian hingga jumlah virus yang terkandung dalam cairan alantois harus 10^7 EID₅₀/0,1 ml. Selanjutnya suspensi virus inaktif dijadikan emulsi dengan penambahan adjuvansia (Montanide V70) kemudian dilakukan pengocokan dengan Vortex selama 30 menit, seperti tampak pada Gambar 5.5 .



Gambar 5.5. Pembuatan Vaksin Inaktif Emulsi W/O.

5.4. Pelaksanaan Imunisasi pada Ayam

DOC yang digunakan adalah ayam layer pejantan berasal dari perusahaan Charoen Pokphan sebanyak 87 ekor . Imunisasi pertama (V1) dilakukan pada saat ayam umur 4 minggu, pada Kelompok A (vaksin 1/03), B (1/04), C (14/08), D(79/08), E (85/08) dan F (Vaksin Komersial) (Gambar 5.6.). Pengelompokan ayam untuk masing-masing sediaan vaksin termuat dalam Tabel 5.5., serta pelaksanaan Imunisasi pada ayam umur 4 minggu, dengan dosis masing-masing vaksin 0, 1 ml sub kutan, pada Gambar 5.7.



Gambar 5.6. Vaksin yang digunakan dalam percobaan

Tabel 5.5. Tabel Pengelompokan Ayam Percobaan, Jumlah Ayam Perconaan dan Dosis Vaksin.

Kelompok	Kode Sediaan Vaksin	Jumlah ayam	Dosis/ekor
A	1/03	12	0,5 ml SC
B	1/04	12	0,5ml SC
C	14/08	12	0,5 ml SC
D	79/08	12	0,5 ml SC
E	85/08	12	0,5 ml SC
F	Vaksin komersial	12	0,3 ml SC
Kontrol	Tidak di vaksin	15	-----



Gambar 5.7. Imunisasi pada Ayam dengan Vaksin Inaktif

Kelompok kontrol dilakukan pengambilan darah untuk mengetahui titer Antibodi HI pada ayam saat vaksinasi seperti nampak pada Gambar 5.8. Hasil uji HI menunjukkan bahwa titer HI ayam coba kelompok kontrol negatif semua sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 5.6.



Gambar 5.8. Pengambilan Darah Ayam dari vena Brachialis

Tabel 5.6. Tabel Hasil Titer HI pada Ayam Kontrol umur 4 Minggu

No. Ayam	Titer HI-H5	No. Ayam	Titer HI-H5
1	Negatif	9	Negatif
2	Negatif	10	Negatif
3	Negatif	11	Negatif
4	Negatif	12	Negatif
5	Negatif	13	Negatif
6	Negatif	14	Negatif
7	Negatif	15	Negatif
8	Negatif	--	---

Vaksinasi ulang (V_2) sebagai *booster* dilakukan 3 minggu setelah vaksinasi pertama (V_1). Vaksin diberikan secara i.m. dengan dosis yang sama seperti pada V_1 . Pengambilan darah untuk pemeriksaan serologis HI dilakukan 2 minggu (S1), 4 minggu (S2) dan 7 minggu (S3) setelah vaksinasi pertama.

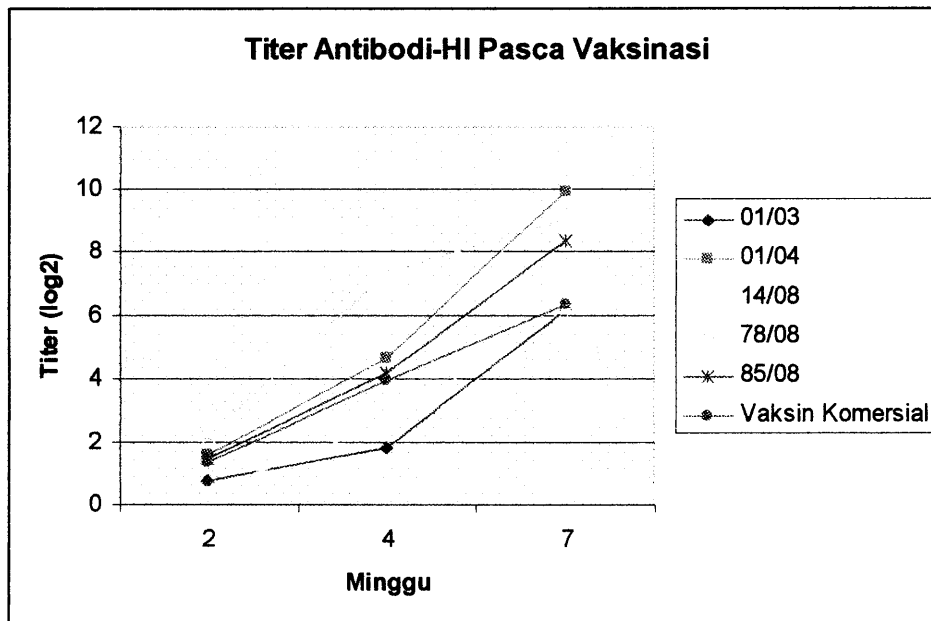
5.4. Pembentukan Antibodi hasil Vaksinasi

Pembentukan antibodi dievaluasi 2 minggu, 4 minggu serta 7 minggu pasca vaksinasi. Dari serum yang terkumpul dari 6 kelompok telah dilakukan uji HI dengan hasil seperti pada tabel 5.7. Dari semua jenis vaksin memberikan respons yang lambat terutama oleh kelompok A (vaksin 01/3) dan Kelompok C (14/08). Titer antibodi-HI baru nyata meningkat 4 minggu pasca vaksinasi dan itupun sesudah diberi vaksinasi ulang. Titer naik dengan drastis terutama pada kelompok D (vaksin 78/08) hingga mencapai titer 7,33 (\log_2). Batas dimana ayam dapat terhindar dari penularan penyakit apabila Titer HI diatas 5 (\log_2). Dengan demikian pada saat 4 minggu pasca vaksinasi, hanya vaksin 78/08 (Kelompok D) yang dapat memberikan perlindungan dengan cukup. Titer antibodi 7 minggu pasca vaksinasi pada semua kelompok akan naik lagi, hingga tak satupun dari kelima vaksin coba maupun vaksin import yang dibawah standart. Hasil yang sangat baik adalah hasil respons pada kelompok B (1/04), D (78/08), serta E (85/08) berturut-turut 9,92 dan 9,08 serta 8,33.

Untuk memperoleh gambaran yang lebih jelas antara titer antibodi, jenis vaksin dan waktu, dapat dilihat pada grafik 5.1.

Tabel 5.7. Titer Antibodi-HI pasca vaksinasi dengan berbagai *seed virus* vaksin

Kelompok	<i>Seed virus Vaksin</i>	Titer rata-an Antibodi-HI (log ₂)		
		Pasca vaksinasi ke I		
		2 minggu	4 minggu	7 minggu
A	01/03	0,75	1,83	6,17
B	01/04	1,58	4,67	9,92
C	14/08	0,42	2,67	6,25
D	78/08	2,17	7,33	9,08
E	85/08	1,50	4,17	8,33
F	Vaksin Komersial	1,33	3,92	6,33

Grafik 5.1. Peningkatan Titer Antibodi-HI Pasca Vaksinasi dengan berbagai vaksin

5.5 Hasil Uji Tantang dengan virus AI

Dari tiap kelompok di ambil 6 ekor ayam untuk digunakan dalam uji tantang. Sebagai virus tantang digunakan Virus AI A/Ck/Indonesia/BL/03. Inokulasi dilakukan dengan

tetesannya sebanyak 0,1 ml yang mengandung 10^8 EID₅₀ secara oral dan nasal per ekor. Pada kelompok K (kontrol tanpa vaksinasi) gejala umum lesu dan lemah mulai terlihat sekitar 2 sampai 4 hari, sedangkan kematian pertama terjadi 3 hari pasca infeksi. Kematian terakhir terjadi 5 hari pasca infeksi. Dari kematian pada semua ayam kontrol dapat dipastikan bahwa masa inkubasi berlangsung antara 2-5 hari dan pada ayam kelompok tersebut terjadi mortalitas 100% yang tercapai hanya dalam 5 hari. Pada kelompok ayam yang telah mendapatkan vaksinasi, gejala ringan berupa lesu, gangguan respirasi, feses hijau dapat muncul selama 2-3 hari, sedangkan kematian samasekali tidak ada pada keenam kelompok ayam coba. Ini membuktikan bahwa semua vaksin coba maupun satu vaksin import yang digunakan dalam penelitian ini semuanya memberikan angka proteksi 100%. Gambaran yang lebih jelas dapat terlihat dalam tabel 5.8.

Tabel 5.8. Gejala klinis dan Kematian pada Ayam coba setelah uji Tantang

Kelompok	Vaksin/ <i>Seed virus</i> vaksin	Jumlah ayam (ekor)	Gejala klinis (jika ada)	Rasio kematian
A	01/03	6	Lesu, feses hijau	0/6
B	01/04	6	feses hijau	0/6
C	14/08	6	Lesu, feses hijau	0/6
D	78/08	6	feses hijau	0/6
E	85/08	6	feses hijau	0/6
F	Vaksin Import	6	feses hijau	0/6
K	Tanpa vaksin	6	Lesu, gangguan respirasi, feses hijau, kematian	6/6

5.5 Ekskresi virus pasca infeksi dengan virus AI dari ayam yang telah divaksin

Ekskresi virus dari ayam coba dilakukan dengan reisolasi virus dari swab kloaka. Pada semua ayam yang telah divaksin tidak berhasil dilakukan reisolasi virus. Ini menandakan bahwa tidak satupun ayam coba yang telah divaksin mengekskresikan virus bersama feses. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa semua ayam yang telah divaksin tidak hanya dapat proteksi, namun juga dapat mencegah ekskresi virus. Hambatan ekskresi virus ini merupakan faktor penting dalam pencegahan penularan, sehingga kemungkinan terbentuknya hewan *carrier* dapat dicegah. Dari tabel 5.9. dapat terlihat ekskresi virus pada ayam kontrol yang tidak mendapatkan vaksinasi, virus dapat direisolasi kembali dari swab kloaka mulai saat hewan menunjukkan gejala klinis sampai saat kematiannya. Hal ini juga sesuai dengan pengertian bahwa titer antibodi yang tinggi dapat menghambat ekskresi virus.

Tabel 5.9. Proteksi dan Ekskresi virus dari ayam pasca tantang dengan virus AI

Kelompok	Vaksin/ <i>Seed</i>	Jumlah	Rataan	Rasio	Ekskresi virus
A	01/03	6	6,8	0/6	0/6
B	01/04	6	9,1	0/6	0/6
C	14/08	6	6,8	0/6	0/6
D	78/08	6	9,0	0/6	0/6
E	85/08	6	8,0	0/6	0/6
F	Vaksin Import	6	6,2	0/6	0/6
K	Tanpa vaksin	6	0 (negatif)	6/6	6/6

5.6. Analisa filogenetik (*Phylogenetic Analysis*)

Analisa filogenetik dilakukan pada virus 01/04, karena diantara kandidat seed virus yang digunakan sebagai vaksin disini, isolat 01/04 merupakan seed virus yang terbaik untuk dijadikan vaksin komersial. Tujuan dari analisis sekwens gen HA ini merupakan peneguhan dari hubungan kekerabatan antar virus 1/04 dengan virus AI yang bersirkulasi di Indonesia. Hasil dari *sequencing* genetik terhadap gen HA-subtype H5 virus 1/04 dapat dilihat pada lampiran 1.

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, kesimpulan yang dapat adalah sebagai berikut :

1. Virus AI 1/03, 1/04, 14/08, 79/08 dan 85/08 adalah benar virus Influenza A/H5 dan tergolong dalam virus Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI).
2. Virus AI 1/03 dan 14/08 merupakan isolat yang memenuhi syarat untuk dipakai sebagai *seed virus* dalam hal mudah untuk dibiakkan.
3. Semua virus AI yang digunakan dalam penelitian ini bersifat protektif, terutama virus AI 1/04, 79/08 dan 85/08 memiliki sifat imunogenisitas terbaik terbukti dengan respons titer antibodi yang terbentuk.
4. Semua ayam yang telah diimunisasi dengan kelima jenis virus AI dapat menekan/meniadakan ekskresi virus apabila terjadi infeksi oleh virus AI.

6.2. Saran

Saran yang dapat diberikan adalah :

1. Pembuatan vaksin AI A/H5 untuk unggas menggunakan isolat virus AI A/H5 1/04, 79/08 dan 85/08 perlu diteliti lebih lanjut, antara lain dengan memakai berbagai adjuvansia.
2. Perlu dilakukan uji lapangan dalam skala yang lebih besar dan dibawah berbagai kondisi lapangan yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

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

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

LAMPIRAN 1. Hasil Sequencing Gen HA dari Isolat virus AI A/H5 1/04

Dari Hasil sequencing dapat diketahui isolat virus AI termasuk dalam Clade 2.1 spesifik untuk Indonesia

Virus Influenza A/H5 1/04**Susunan nukleotide**

```

1 atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
61 attggttacc atgcaaaaca ttcaacagag caggttgaca caataatgga aaagaacggt
121 actggttacac atgccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcatcta
181 gatggagtga agcctotaat ttaagagat tgtagttag ctggatggct cctcgggaac
241 ccaatgtgtg acgaattcat caatgtaccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat
301 ccagccaatg acctctgtta cccagggaaat ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta
361 ttgagcaqaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccgat
421 catgaagcct catcaggggg gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctctttttt
481 agaaatgtgg tatggottat caaaaagaac agtgcatacc caacaataaa gagaagctac
541 aataatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttcaccatcc taatgatgcg
601 gcagagcaga caaggctata tcaaaaaccca accacctata tttcgttgg gacatcaaca
661 ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga
721 aggatggaat tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
781 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcagcaatt
841 atgaaaagtg aattggaata tgtaactgc aacaccaagt gtcaaacctc aatggggggc
901 ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccacggggga atgccccaaa
961 tatgtgaaat caaacagatt agtcttggcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag
1021 agaagaagaa aaaagagagg actatttgga gctatagcag gttttataga gggaggtgg
1081 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac
1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
1201 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa taacttagaa
1261 aggagaatag agaatttaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat
1321 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagacttcca tgactcaaat
1381 gttaagaacc tctacgaaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt
1441 aacggttgtt tcgagttcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tataagaaac
1501 ggaacgtata actaccgca gtattcagaa gaagcaagat taaaagaga ggaataagt
1561 ggagtaaat tggaatcaat aggaacttac caaatactgt caatttatc aacagtggcg
1621 agttccotag cactggcaat catgatggct ggtctatct

```

Susunan asamamino

```

1 mekiVlllIai vslvksdqic igyhannste qvdtimeknv tvthaqdile kthngklcdl
61 dgvkplilrd csvagwllgn pmcdefinvp ewsyivekan pandlcypgn fndyeelkhl
121 lsrinhfeki qiipksswsd heassgvssa cpyqgkssff rnvvlikkn sayptikrsy
181 nntngedllv lwigihhpnda aeqtrlyqnp ttyisvgtst lnqrlvpkia trskvngqsg
241 rmeffwtilk pndainfesn gnfiapeyay kivkkgsai mkseleygnc ntckqtpmga
301 inssmpfhni hpltigecpk yvksnrllva tglrnspqre rrrkkrglfg aiagfieggw
361 qgmvdgwygy hhsneqsgsy aadkestqka idgvtnkvns iidkmtqfe avgrefnle
421 rrieninkkm edgflvwtv naellvimen ertldfhdsn vknlydkvrl qlrdnakelg
481 ngcfefyhkc dnecmesirn gtnypqyse earlkreeis gvklesigtv qilsiystva
541 sslalaimma gls

```

LAMPIRAN 2. Hasil Penghitungan Mean Death Time (MDT)**Hasil Penghitungan MDT Isolat Virus AI A/H5N1 1/03**

No. TAB	Pengenceran (- log10)						
	4	5	6	7	8	9	10
1	*24	32	32	40	40	72	x
2	24	32	32	40	40	x	x
3	32	32	32	40	40	x	x
4	32	32	40	40	40	x	x
5	32	32	40	40	40	x	x
6	32	32	40	40	56	x	x

* Kematian embrio dalam jam; x = embrio dibunuh setelah 120 jam masa inkubasi

$$\text{MDT} = [(5 \times 40) + 56] / 6 = 42,7 \text{ jam}$$

Hasil Penghitungan MDT Isolat Virus AI A/H5N1 - 1/04

No. TAB	Pengenceran (- log10)						
	4	5	6	7	8	9	10
1	*32	32	40	40	56	64	X
2	32	32	40	40	56	X	X
3	32	32	40	40	56	X	X
4	32	32	40	48	56	X	X
5	32	40	40	48	64	X	X
6	40	40	48	48	X	X	X

*) Keterangan: kematian embrio dalam jam

$$\text{MDT} = [(3 \times 40) + (3 \times 48)] / 6 = 44 \text{ jam}$$

Hasil Penghitungan MDT Isolat Virus AI A/H5N1-14/08

No. TAB	Pengenceran (- log10)						
	5	6	7	8	9	10	11
1	*40	40	40	64	X	X	X
2	40	48	64	X	X	X	X
3	40	48	64	X	X	X	X
4	40	48	64	X	X	X	X
5	48	48	X	X	X	X	X
6	48	48	X	X	X	X	X

*) Keterangan: kematian embrio dalam jam

$$\text{MDT} = [40 + (5 \times 48)] / 6 = 46,7 \text{ jam}$$

Hasil Penghitungan MDT Isolat Virus AI A/H5N1 - 79/08

No. TAB	Pengenceran (- log10)						
	5	6	7	8	9	10	11
1	*40	40	40	X	X	X	X
2	40	40	X	X	X	X	X
3	40	56	X	X	X	X	X
4	40	X	X	X	X	X	X
5	40	X	X	X	X	X	X
6	48	X	X	X	X	X	X

*) Keterangan: kematian embrio dalam jam

$$\text{MDT} = [(5 \times 40) + 48] / 6 = 41,3 \text{ jam}$$

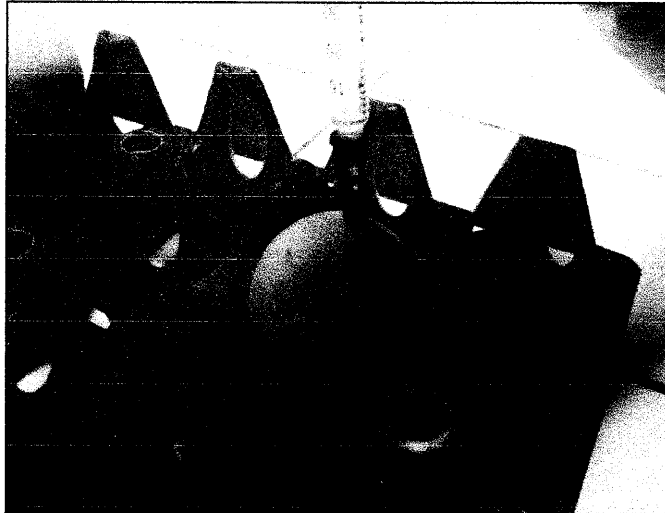
Hasil Penghitungan MDT Isolat Virus AI A/H5N1 - 85/08

No. TAB	Pengenceran (- log10)						
	5	6	7	8	9	10	11
1	*40	40	40	X	X	X	X
2	40	40	40	X	X	X	X
3	40	40	40	X	X	X	X
4	40	48	X	X	X	X	X
5	40	48	X	X	X	X	X
6	40	48	X	X	X	X	X

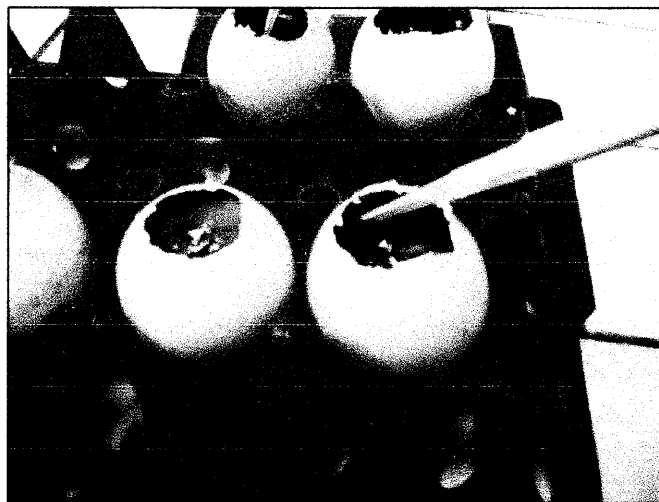
*) Keterangan: kematian embrio dalam jam

$$\text{MDT} = [(3 \times 40) + (3 \times 48)] / 6 = 44 \text{ jam}$$

LAMPIRAN 3. Tahap Perbanyak Virus



Inokulasi virus pada Telur ayam berembrio route kantong alantois



Panen Cairan Alantois yang mengandung virus

LAMPIRAN 4. Perubahan pada Embrio yang terinfeksi Virus



Embrio berwarna merah gelap akibat perdarahan dan kongesti subkutan dan kongesti dan sedikit perdarahan pada selaput chorioalantois



Hati, Limpa dan Ginjal membesar dan kongesti



Ayam kontrol yang mati 5 hari pasca infeksi virus AI. Terlihat perdarahan pada selaput serosa.



Cloacal Swab dan Gerusan Jaringan ayam tertular siap untuk diinokulasikan pada Embrio Ayam