

## **Seed Vaksin Avian Influenza H5N1 Isolat Bali Siap Untuk Dihilirisasi**

\***Gusti Ayu Yuniati Kencana, I Nyoman Suartha**

*Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana*  
Denpasar, Bali,

\* Penulis koresponden: [yuniati\\_kencana@unud.ac.id](mailto:yuniati_kencana@unud.ac.id)

**Abstrak.** Penyakit Avian Influenza (AI) H5N1 dikenal dengan sebutan Flu Burung, pernah menyebabkan Kejadian Luar Biasa di Indonesia sekitar tahun 2007 dengan angka kematian tertinggi di dunia baik pada unggas maupun pada manusia. Etiologinya adalah virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* H5N1, termasuk virus RNA zoonosis dan mudah bermutasi. Pencegahan terhadap penyakit AI dilakukan dengan vaksinasi. Penelitian ini bertujuan untuk menyiapkan *seed* vaksin AI-H5N1 dari isolat lokal asal Bali. Metode yang digunakan dengan koleksi sampel lapang dari ayam sakit dengan gejala penyakit Avian Influenza. Isolasi virus dari organ paru-paru, usus dan proventrikulus yang mengalami perubahan anatomi. Satu gram organ digerus, dibuat inokulum 5-10 persen lalu diinokulasikan pada telur ayam bertunas SPF umur 10 hari melalui ruang allantois. Telur diinkubasi pada inkubator 37°C selama dua hari. Telur SPF dikeluarkan dari inkubator, cairan allantoisnya dipanen lalu diuji *Haemagglutination Assay* (HA) dan dikonfirmasi uji *Haemagglutination Inhibition* (HI), PCR dan sekuensing. Setelah teridentifikasi AI-H5N1, isolat Bali dipasase pada telur ayam SPF di laboratorium BSL-3 sampai kandungan virus stabil dan diuji potensi pada ayam SPF. Hasil uji *virus contain 2<sup>7.9</sup>* HA unit, stabil sampai 7 kali pasase, potensial meningkatkan imunitas dengan titer 128 HI Unit minggu ke-3 pascavaksinasi. Simpulannya isolat Bali memenuhi syarat *seed* vaksin AI-H5N1. *Seed* vaksin kemudian dileofilisasi untuk digunakan jangka panjang. Implementasi hasil penelitian *seed* vaksin AI-H5N1 isolat Bali siap jika hilirisasi dengan produsen vaksin unggas.

**Kata Kunci:** Avian Influenza-H5N1, hilirisasi, isolat Bali, *seed* vaksin

### **I. PENDAHULUAN**

Avian Infuenza H5N1 dikenal pula dengan sebutan flu burung adalah penyakit menular strategis dan bersifat zoonosis [3]. Penyebabnya adalah virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) subtype H5N1. Virus Avian Infuenza subtype H5N1 dapat ditularkan melalui kontak langsung dengan ayam sakit maupun kontak tidak langsung melalui cecaran atau kontaminan. Unggas adalah sumber utama penular penyakit Avian Influenza H5N1. Oleh karena itu vaksinasi AI-H5N1 pada unggas terutama pada ayam wajib dilakukan sebagai upaya mencegah penyakit AI. Hasil vaksinasi selalu dimonitoring serta dilakukan dengan pendekatan *one health*.

Kegagalan vaksinasi pada unggas dapat berpengaruh terhadap berkembangnya penyakit AI ganas yang dapat menulari manusia. Diagnosis laboratorium sangat penting dilakukan dalam penanggulangan dan pemberantasan penyakit AI meliputi isolasi dan identifikasi virus. Kondisi tersebut memerlukan monitoring sirkulasi virus Avian influenza untuk mengetahui situasi terkini di Indonesia [1].

Virus AI-H5N1 ditemukan tersebar di Bali, termasuk juga di Kabupaten Tabanan baik pada ayam ras maupun ayam buras [6], [9]. Virus Ai ditemukan di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Galiran dan dikhawatirkan agar menjadi sumber penyebaran virus AI-H5N1 di Bali [2]. Untuk melacak keberadaan virus AI-H5N1 di suatu daerah dapat dilakukan dengan *survey* lapang. Sampel yang diambil swab, maupun koleksi antigen dari ayam sakit dengan gejala klinis AI didukung dengan morbiditas ayam 60-80%, mortalitas 70-90%, ada gejala ngorok, diare, dehidrasi, lama sakit antara 3 sampai 5 hari. Perubahan patologi penyakit AI diantaranya perdarahan ptekie usus dan proventrikulus, paru, otak yang merupakan organ predileksi virus AI yang ditandai dengan peradarahan sampai nekrose sebagai sampel antigen [10].

Karakterisasi virus vaksin AI-H5N1 diawali dengan isolasi dan idetifikasi virus secara serologi, PCR dan sekuensing [7]. Stabilitas antigen virus diuji dengan pasase berulang pada telur ayam SPF. Media isolasi virus dapat digunakan telur ayam bertunas diantaranya telur ayam yang tidak divaksin (*clean egg*), telur *Spesific Pathogen Free* (SPF). Untuk menyiapkan *seed* vaksin dipilih telur ayam SPF [11], meskipun untuk propagasi virus pada *clean egg* tidak berbeda nyata dengan SPF [5].

### **II. METODE DAN PROSEDUR**

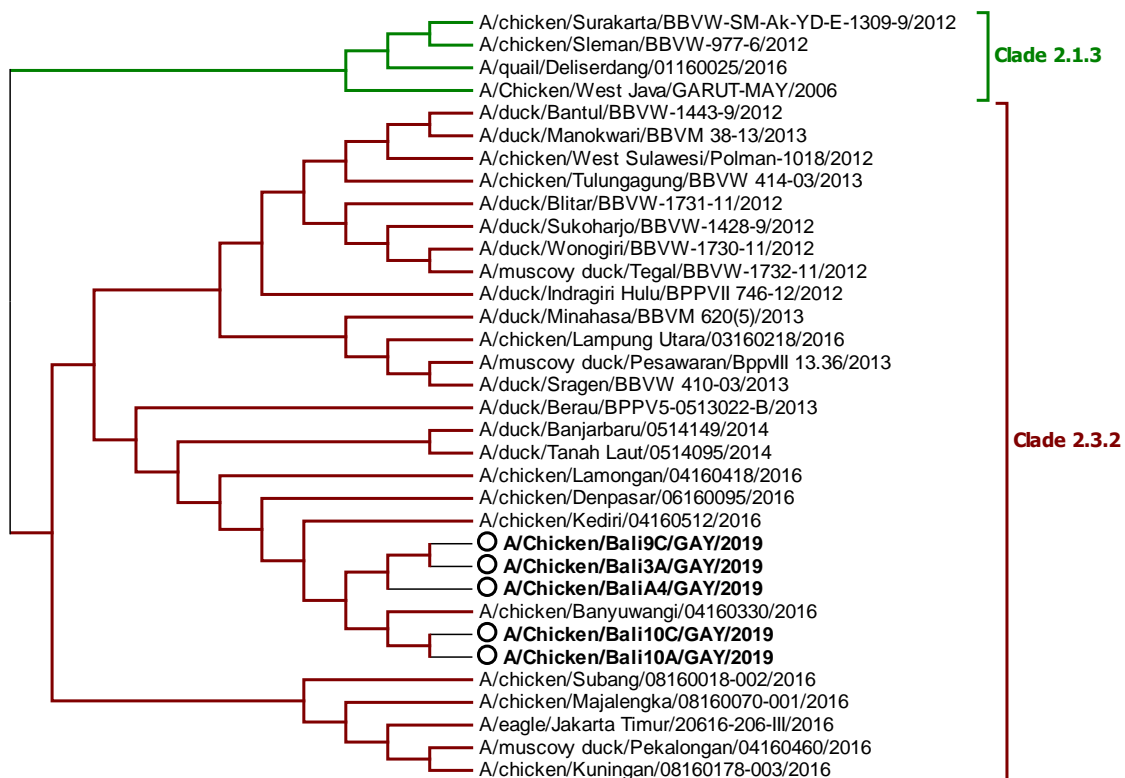
Koleksi sampel lapang dari ayam sakit dengan gejala klinis penyakit Avian Influenza. Isolasi virus diambil dari organ paru-paru, usus dan proventrikulus yang mengalami perubahan anatomi, lalu dibuat inokulum 10 persen

kemudian diinokulasikan pada telur ayam bertunas umur 10 hari melalui ruang allantois. Inkubasi dilakukan selama 2-3 hari pada inkubator suhu 37°C. Cairan alantois dipanen lalu diuji *Haemagglutination Assay* (HA) dan dikonfirmasi uji *Haemagglutination Inhibition* (HI), PCR dan sekuensing. Analisis hasil sekuensing dengan program Mega [8]. Setelah teridentifikasi AI-H5N1 isolat diberi kode. Isolat Bali dipasase sebanyak 7 kali pada telur ayam SPF di laboratorium BSL-3 sampai kandungan virus stabil lalu dilakukan uji potensi pada ayam SPF. Untuk menjaga stabilitas dan sterilitas *seed* selanjutnya disimpan dalam fial dan di-leofilisasi.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ada 4 sampel isolat Bali yang positif AI berasal dari kasus lapang dari hasil isolasi virus pada telur ayam berembrio ditandai dengan kematian embrio terjadi 3 hari post infeksi. Embrio mengalami perdarahan, kerdil dan terjadi kematian. Uji HA positif terjadi hemaglutinasi. Konfirmasi uji dengan PCR menunjukkan keempat isolat yang diidentifikasi adalah virus AI-H5N1, selanjutnya dipilih satu isolat dengan kode A/Chicken/Bali/GAY/2019 untuk dipasase lebih lanjut pada telur SPF untuk dibuat *seed* vaksin.

Analisis sekuensing menunjukkan isolat Bali termasuk AI-H5N1 clade 2.3.2 yang memiliki perbedaan 3,28 % dengan *seed* vaksin pemerintah (A/duck/ Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012). Isolat Bali telah mengalami mutasi sebesar 3,28% dengan *seed* vaksin pemerintah (A/duck/ Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012) meskipun masih berada satu cluster clade 2.3.2. Hasil analisis filogenetik AI-H5N1 isolat Bali dimuat pada Gambar 1



Gambar 1. Filogenetik virus AI-H5N1 isolat Bali dengan isolat AI-H5N1 di Genbank

Mudahnya virus AI-H5N1 bermutasi (*antigenic drift*) diakibatkan oleh struktur gen HA yang terdapat pada permukaan dari virus AI. Hal ini yang mengakibatkan kekebalan yang telah dimiliki oleh ayam ras hasil vaksinasi menjadi tidak dapat berfungsi dengan baik. Akibat dari mutasi antigenik virus AI-H5N1 menyebabkan antibodi yang sudah dimiliki ayam pasca vaksinasi meskipun sudah seroprotektif (titer antibodi diatas  $2^4$  HI unit) itu menjadi tidak protektif lagi. Guna memantau terjadinya perubahan genetik virus AI di lapangan maka para peneliti, begitu pula produsen vaksin unggas terus melakukan riset yang berkelanjutan. Riset berguna untuk memastikan bahwa vaksin AI-H5N1 yang diproduksi masih mampu melindungi ayam terhadap virus AI lapang.

Hasil pasase pada telur ayam SPF di laboratorium BSL-3 menunjukkan isolat Bali tetap stabil sampai 7 kali pasase dengan *virus contain*  $2^{7.9}$  HA unit/ml. Hasil uji potensi menunjukkan *seed* vaksin mampu meningkatkan imunitas ayam SPF dengan titer  $2^7$  (128 HI Unit) minggu ke-3 pascavaksinasi.

#### IV. KESIMPULAN

Simpulan penelitian adalah isolat Bali A/Chicken/Bali/GAY/2019 memenuhi syarat untuk *seed* vaksin AI-H5N1, karena terbukti aman, dan potensial meningkatkan titer antibodi seroprotektif 128 HI Unit minggu ke-3 pascavaksinasi

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari riset Hibah Terapan Dikti tahun 2019. Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Rektor Universitas Udayana, Ketua LPPM atas diterimanya proposal ini dan mitra PT Sanbio Laboratories atas dana *in kind* dan fasilitas penelitiannya.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI, Wibawan IWT 2017. Deteksi, Isolasi, dan Identifikasi Avian influenza Subtipe H5N1 pada Unggas di Pulau Jawa, Indonesia Tahun 2016. *Jurnal Veteriner* 18 (4): 496-509
- [2] Intan M, Kencana GAY, Dibia IN. 2021. Deteksi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Itik di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Galiran, Bali. *Jurnal Veteriner* 22(3): 442-449
- [3] Kementerian Pertanian 2013. Keputusan Menteri Pertanian No. 4026/Kpts/ OT.140/4/2013. Tentang Penetapan jenis Penyakit Hewan Menular Strategis, Jakarta.
- [4] Kencana GAY, Mahardika IGnk, Suardana IBK, Mantik Astawa IN, Krisna Dewi NM, Narendra Putra GN. 2012. Pelacakan kasus flu burung pada ayam dengan *reverse transcriptase polymerase chain*. *Jurnal Veteriner* 13(3): 303-308. ISSN: 1411-8327. Terakreditasi Dirjen Dikti SK No.81/DIKTI/Kep/2011.
- [5] Kencana GAY, Suartha IN, Handayani AN, Ramadhan M. 2014. Kepekaan Telur *Specific Pathogen Free* Dan *Clean Egg* Terhadap Virus Avian Influenza Subtipe H5N1. *Jurnal Veteriner* 15(1): 87-93. ISSN: 1411-8327. Diakreditasi Dirjen Dikti
- [6] Kencana GAY, Suartha IN, Kardena IM. 2018. Avian Influenza Virus-H5N1 Is Circulating Among Backyard Chicken in Marga District, Tabanan Regency, Bali . Proc. of the 20th FAVA Congress & The 15th KIVNAS PDHI, Bali Nov 1-3, 2018
- [7] Kencana GAY, Suartha IN, Kardena IM, Nurhandayani A. 2020. Karakterisasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Isolat Lapang Asal Bali Untuk Kandidat Vaksin. *Jurnal Veteriner* 21 (4): : 530-538
- [8] Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- [9] Mahardika IGnk, Adi AAAM, Besung NK, Dharmawan NS, Kencana GAY, Rompis ALT, Sampurna P, Setiasih LE, Suardana W, Suardana IBK, Suarjana GK, Suartha IN, Suartini GAA, Suwiti NK and Utama IH. 2018. Surveillance of Avian Influenza Virus of H5N1 Subtype in Backyard Animals and Its Introduction in Bali, Indonesia. *Pak Vet J*, 38(1): 7-12
- [10] OIE. 2009. Office International des Epizooties (OIE). Terrestrial Manual: Chapter 2.3.4 Avian Influenza. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf)
- [11] Woolcock PR. 2008. Avian influenza virus isolation and propagation in chicken eggs. *Methods in Molecular Biology* 436: 35-46