

JURNAL BIOLOGI INDONESIA

Akreditasi: 460/AU2/P2MI-LIPI/08/2012

Vol. 11, No.2 Desember 2015

- Efikasi Vaksin Inaktif Bivalen Avian Influenza Virus Subtipe H5N1 (Clade 2.1.3. dan Clade 2.3.2) di Indonesia 169
NLP. Indi Dharmayanti & Risa Indriani
- Klon-klon Kentang Transgenik Hasil Persilangan Terseleksi Tahan terhadap Penyakit Hawar Daun *Phytophthora infestans* Tanpa Penyemprotan Fungisida 177
Alberta Dinar Ambarwati, Kusmana, & Edy Listanto
- Penambahan Inokulan Mikroba Selulolitik pada Pengomposan Jerami Padi untuk Media Tanam Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) 187
Iwan Saskiawan
- Identifikasi Molekular dan Karakterisasi Morfo-Fisiologi Actinomycetes Penghasil Senyawa Antimikroba 195
Arif Nurkanto & Andria Agusta
- Populasi dan Kesesuaian Habitat Langkap (*Arenga obtusifolia* Mart.) di Cagar Alam Leuweung Sancang, Jawa Barat 205
Didi Us madi, Agus Hikmat, Joko Ridho Witono, & Lilik Budi Prasetyo
- Optimasi Produksi Enzim Amilase dari Bakteri Laut Jakarta (*Arthrobacter arilaitensis*) 215
Awan Purnawan, Y. Capriyanti, PA.Kurniatin, N. Rahmani, & Yopi
- Pengaruh Antioksidan Eksopolisakarida dari Tiga Galur Bakteri Asam Laktat pada Sel Darah Domba Terinduksi tert-Butil Hidroperoksida (t-BHP) 225
Fifi Afiati, Nina Ainul Widad & Kusmiati
- Ekosistem Lamun sebagai Bioindikator Lingkungan di P. Lembeh, Bitung, Sulawesi Utara 235
Agustin Rustam, Terry L. Kepel, Mariska A. Kusumaningtyas, Restu Nur Afi Ati, August Daulat, Devi D. Suryono, Nasir Sudirman, Yusmiana P. Rahayu, Peter Mangindaan, Aida Heriati & Andreas A. Hutahae an

Diterbitkan oleh:

PERHIMPUNAN BIOLOGI INDONESIA

Bekerjasama dengan

PUSLIT BIOLOGI - LIPI

Jurnal Biologi Indonesia diterbitkan oleh **Perhimpunan Biologi Indonesia**. Jurnal ini memuat hasil penelitian ataupun kajian yang berkaitan dengan masalah biologi yang diterbitkan secara berkala dua kali setahun (Juni dan Desember).

Editor

Ketua

Prof. Dr. Ibnu Maryanto

Anggota

Prof. Dr. I Made Sudiana

Dr. Deby Arifiani

Dr. Izu Andry Fijridiyanto

Dewan Editor Ilmiah

Dr. Abinawanto, F MIPA UI

Dr. Achmad Farajalah, FMIPA IPB

Prof. Dr. Ambariyanto, F. Perikanan dan Kelautan UNDIP

Dr. Didik Widiyatmoko, Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya-LIPI

Dr. Dwi Nugroho Wibowo, F. Biologi UNSOED

Dr. Gatot Ciptadi F. Peternakan Universitas Brawijaya

Dr. Parikesit, F. MIPA UNPAD

Dr. Faisal Anwari Khan, Universiti Malaysia Sarawak Malaysia

Assoc. Prof. Monica Suleiman, Universiti Malaysia Sabah, Malaysia

Dr. Srihadi Agungpriyono, PAVet(K), F. Kedokteran Hewan IPB

Y. Surjadi MSc, Pusat Penelitian ICABIOGRAD

Drs. Suharjono, Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Dr. Tri Widiyanto, Pusat Penelitian Limnologi-LIPI

Dr. Witjaksono Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Sekretariat

Eko Sulistyadi M.Si, Dewi Citra Murniati M.Si, Hetty Irawati PU, S.Kom

Alamat

d/a Pusat Penelitian Biologi - LIPI

Jl. Ir. H. Juanda No. 18, Bogor 16002, Telp. (021) 8765056

Fax. (021) 8765068

Email : jbi@bogor.net; ibnu_mar@yahoo.com; eko_bio33@yahoo.co.id; hetttyipu@yahoo.com

Website : <http://biologi.or.id>

Jurnal Biologi Indonesia telah diakreditasi ulang berdasarkan SK Kepala LIPI 742/E/2012 tanggal 7 Agustus 2012, Akreditasi:No. 460/AU2/P2MI-LIPI/08/2012.

JURNAL BIOLOGI INDONESIA

Diterbitkan Oleh:

Perhimpunan Biologi Indonesia

Bekerja sama dengan

PUSLIT BIOLOGI-LIPI

DAFTAR ISI

	Halaman
Efikasi Vaksin Inaktif Bivalen Avian Influenza Virus Subtipe H5N1 (Clade 2.1.3. dan Clade 2.3.2) di Indonesia NLP. Indi Dharmayanti & Risa Indriani	169
Klon-klon Kentang Transgenik Hasil Persilangan Terseleksi Tahan terhadap Penyakit Hawar Daun <i>Phytophthora infestans</i> Tanpa Penyemprotan Fungisida Alberta Dinar Ambarwati, Kusmana, & Edy Listanto	177
Penambahan Inokulan Mikroba Selulolitik pada Pengomposan Jerami Padi untuk Media Tanam Jamur Tiram Putih (<i>Pleurotus ostreatus</i>) Iwan Saskiawan	187
Identifikasi Molekular dan Karakterisasi Morfo-Fisiologi Actinomycetes Penghasil Senyawa Antimikroba Arif Nurkanto & Andria Agusta	195
Populasi dan Kesesuaian Habitat Langkap (<i>Arenga obtusifolia</i> Mart.) di Cagar Alam Leuweung Sancang, Jawa Barat Didi Usmadi, Agus Hikmat, Joko Ridho Witono, & Lilik Budi Prasetyo	205
Optimasi Produksi Enzim Amilase dari Bakteri Laut Jakarta (<i>Arthrobacter arilaitensis</i>) Awan Purnawan, Y. Capriyanti, PA.Kurniatin, N. Rahmani, & Yopi	215
Pengaruh Antioksidan Eksopolisakarida dari Tiga Galur Bakteri Asam Laktat pada Sel Darah Domba Terinduksi tert-Butil Hidroperoksida (t-BHP) Fifi Afiati, Nina Ainul Widad & Kusmiati	225
Ekosistem Lamun sebagai Bioindikator Lingkungan di P. Lembeh, Bitung, Sulawesi Utara Agustin Rustam, Terry L. Kepel, Mariska A. Kusumaningtyas, Restu Nur Afi Ati, August Daulat, Devi D. Suryono, Nasir Sudirman, Yusmiana P. Rahayu, Peter Mangindaan, Aida Heriati & Andreas A. Hutahaean	235
Identification of Bioactive Compound from Microalga BTM 11 as Hepatitis C Virus RNA Helicase Inhibitor Apon Zaenal Mustopa, Rifqiyah Nur Umami, Prabawati Hyunita Putri, Dwi susilaningsih, & Hilda Farida	245
Kemampuan Cerna Protein dan Energi Metabolisme Perkici Pelangi (<i>Trichoglossus haematodus</i>) Rini Rachmatika & Andri Permata Sari	255
Optimasi Enzim α -Amilase dari <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> O1 yang Diinduksi Substrat Dedak Padi dan Karboksimetilselulosa Yati Sudaryati Soeka, Maman Rahmansyah & Sulistiani	261
Kajian Aspek Ekologis dan Daya Dukung Perairan Situ Cilala Niken T.M. Pratiwi, Sigid Hariyadi, Inna Puspa Ayu, Aliati Iswantari, Novita MZ, & Tri Apriadi	269

	Halaman
Penanda Genetik Tarsius (<i>Tarsius</i> spp.) dengan Menggunakan Gen Cytochrome Oxidase I (COI) DNA Mitokondria (mtDNA) Melalui Metode Sekuensing Wirdatei, Sri Wijayanti Wulandari, & Paramita Cahyaningrum Kuswandi	277
Carboxymethyl Cellulose Hydrolyzing Yeast Isolated from South East Sulawesi, Indonesia Atit Kanti	287
Uji Bakteri Simbiotik dan Nonsimbiotik Pelarutan Ca vs. P dan Efek Inokulasi Bakteri pada Anakan Turi (<i>Sesbania grandiflora</i> L. Pers.) Sri Widawati	297
TULISAN PENDEK	311
Mating behavior of Slow Loris (<i>Nycticebus coucang</i>) at Captivity Wartika Rosa Farida & Andri Permata Sari	

**Efikasi Vaksin Inaktif Bivalen Avian Influenza Virus Subtipe H5N1
(Clade 2.1.3. dan Clade 2.3.2) di Indonesia
(Efficacy of Bivalent Inactive Vaccine of Avian Influenza H5N1 Subtype (Clade 2.1.3.
and Clade 2.3.2) in Indonesia)**

NLP. Indi Dharmayanti¹ & Risa Indriani¹

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, JL RE Martadianata 30, Bogor 16114

Email : nlpdharmayanti@yahoo.com

Memasukkan: November 2014, **Diterima:** Februari 2015

ABSTRACT

Status of avian influenza virus subtype H5N1 in Indonesia until 2014 is still endemic in poultry and recorded, there were two types clade of circulating H5N1 namely clade 2.1.3 and the new introduction of clade 2.3.2 since the end of 2012. Both of the clade of avian influenza viruses subtype H5N1 (clade 2.1.3 and 2.3.2) caused the AI vaccination program to control of AI in poultry needs to be evaluated. In this study, we developed a bivalent AI vaccine (which contains clade 2.1.3 and 2.3.2 viruses as a seed vaccine) that adapted with the circulation of AI viruses in the field. Result of the study showed that the bivalent vaccine which developed in this study has good efficacy that was challenged with both of AI clade AI and proven to reduce shedding / viral contamination to the environment. It is expected that the development of bivalent H5N1 vaccine will increase the effectiveness and efficacy of vaccination programs to control highly pathogenic avian influenza disease in Indonesia.

Keywords : avian influenza virus, clade, vaccine, bivalent

ABSTRAK

Status virus avian influenza subtipe H5N1 sampai tahun 2014 di Indonesia masih endemik pada unggas dan tercatat terdapat dua jenis clade H5N1 yang bersirkulasi yaitu clade 2.1.3 dan adanya introduksi baru clade baru 2.3.2 sejak akhir tahun 2012. Bersirkulasinya kedua clade virus AI subtipe H5N1 (clade 2.1.3 dan 2.3.2) di Indonesia ini menyebabkan penggunaan vaksinasi AI dalam mengendalikan penyakit AI pada unggas perlu dievaluasi, sehingga dalam penelitian ini dikembangkan vaksin bivalen AI (yang mengandung *seed* virus AI clade 2.1.3 dan 2.3.2) dalam mengendalikan penyakit AI disesuaikan dengan sirkulasi virus AI yang beredar di Indonesia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksin bivalen dalam studi ini secara uji laboratoris merupakan vaksin yang berpotensi dan mempunyai efikasi yang baik dalam mengatasi penyakit AI dari kedua clade yang beredar dan terbukti mengurangi *shedding* cemaran virus ke lingkungan. Diharapkan dengan pengembangan vaksin bivalen H5N1 akan menambah keefektifan dan efikasi program vaksinasi dalam mengendalikan penyakit avian influenza di Indonesia.

Kata Kunci : virus avian influenza, clade, vaksin, bivalen

PENDAHULUAN

Penyakit avian influenza yang disebabkan virus AI subtipe H5N1 telah bersirkulasi lebih dari sepuluh tahun sejak diidentifikasi pada tahun 2003 (Dharmayanti *et al.* 2004; Wiyono *et al.* 2004). Virus AI/H5N1 di Indonesia telah menjadi endemik di Indonesia (Sedyaningsih *et al.* 2007) dan berkembang menjadi penyakit zoonosis yang menyebabkan transmisi zoonotik ke manusia sejak Juli tahun 2005 (Sedyaningsih *et al.* 2007). Menurut klasifikasi WHO/OIE/FAO, semua virus H5N1 yang diisolasi dari unggas dan manusia di Indonesia termasuk dalam clade 2.1, dimana virus H5N1 yang dominan ditemukan sejak tahun 2005 sampai

saat ini berasal dari clade 2.1.3 (2.1.3.1, 2.1.3.2, dan 2.1.3.3). Sebagian besar virus H5N1 termasuk kelompok clade 1 dan 2. Secara genetik berbeda kelompok merefleksikan distribusi geografi dari spesies unggas (WHO 2008; WHO 2012).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa infeksi virus-virus H5N1 clade 2.1 pada golongan ayam (*gallinaceous*) seperti ayam layer, ayam broiler, ayam kampung bersifat sangat patogen, menyebabkan sakit perakut dan kematian dalam jumlah tinggi, sedangkan itik dan unggas air lainnya relatif lebih tahan terhadap infeksi virus-virus ini. Namun sejak September 2012, perkembangan virus avian influenza subtipe H5N1 menimbulkan banyak kematian pada itik yang disebabkan oleh adanya introduksi virus

AI clade 2.3.2. Virus AI H5N1 di Indonesia sebelumnya dan sampai saat ini masih bersirkulasi adalah virus AI clade 2.1 (2.1.1; 2.1.2. dan 2.1.3) yang telah menginfeksi unggas dan manusia. Berdasarkan hasil penelitian Dharmayanti *et al.* (2013, 2014) kedelapan gen virus AI clade 2.3.2 ini berasal dari sumber luar negeri sehingga kemungkinan besar virus ini bukan merupakan hasil mutasi clade sebelumnya yaitu 2.1, namun merupakan introduksi virus dari luar Indonesia.

Bersirkulasinya kedua clade virus AI subtipe H5N1 (clade 2.1.3 dan 2.3.2) di Indonesia ini menyebabkan penggunaan vaksinasi AI dalam mengendalikan penyakit AI pada unggas perlu dievaluasi, sehingga dalam penelitian ini dikembangkan vaksin bivalen AI (yang mengandung *seed* virus AI clade 2.1.3 dan 2.3.2) dalam mengendalikan penyakit AI disesuaikan dengan sirkulasi virus AI yang beredar di Indonesia. Vaksin bivalen ini mengandung virus AI clade 2.1.3 (A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006) yang merupakan virus yang diidentifikasi oleh BBLitvet yang merupakan virus AI yang mengalami *antigenic drift* yang diisolasi pada tahun 2006 (Dharmayanti *et al.* 2011). Virus ini merupakan salah satu virus AI H5N1 yang ditetapkan oleh Pemerintah Indonesia sebagai salah satu *seed* vaksin yang direkomendasikan untuk digunakan sebagai vaksin H5N1 pada unggas yang didistribusikan di Indonesia. Setidaknya ada dua perusahaan vaksin nasional yang menggunakan virus ini sebagai *master seed* vaksin dan telah didistribusikan di seluruh Indonesia dan terbukti mampu mengendalikan penyakit AI di peternakan ayam. Dalam vaksin bivalen yang sekarang dikembangkan ini selain mengandung antigen dari virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 juga mengandung virus AI clade 2.3.2 (A/Muscovy Duck/Banten/Br7/2013). Pada penelitian ini akan dilakukan uji laboratorium pengembangan vaksin bivalen ini pada ayam petelur. Hasil penelitian diharapkan dapat diperoleh vaksin bivalen yang mempunyai efikasi yang tinggi dalam mengendalikan virus AI yang bersirkulasi di Indonesia.

BAHAN DAN CARA KERJA

Virus yang digunakan pada penelitian ini

adalah virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 (clade 2.1.3) yang telah dikarakterisasi pada penelitian sebelumnya (Dharmayanti *et al.* 2011) dan telah digunakan sebagai *seed* vaksin oleh beberapa produsen vaksin lokal dan virus clade 2.3.2 yang diisolasi dari wabah AI pada unggas air yaitu A/Muscovy/Banten/BR7/2013. Metode RT-PCR digunakan untuk mengidentifikasi virus avian influenza subtipe H5 ini sesuai dengan Lee *et al.* (2001) dan dilanjutkan dengan DNA sekuensing untuk menentukan homologi virus dengan virus tantangan dengan metode yang telah dipublikasi sebelumnya (Hoffman *et al.* 2001; Dharmayanti *et al.* 2014).

Virus tantangan yang digunakan untuk menguji efikasi vaksin bivalen adalah virus HPAI H5N1 clade 2.3.2 yaitu A/Duck/Sukoharjo/Bbvww-1428-9/2012 clade 2.3.2 (Dharmayanti *et al.* 2014; Wibawa *et al.* 2012), sedangkan virus HPAI H5N1 clade 2.1.3 adalah A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006.

Vaksin inaktif bivalen AI H5N1 dipersiapkan dari virus HPAI A/Muscovy/Banten/BR7/2013 clade 2.3.2 (diisolasi dan dikarakterisasi pada penelitian ini) dan A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 clade 2.1.3 (Dharmayanti *et al.* 2011) menggunakan telur ayam *specific pathogen free* (SPF) tertunas umur 11 hari (PT. Vaksindo). Kedua virus diinaktifasi dengan β -propiolacton (1:3000) dan diformulasi dengan *ratio water to oil* 30:70 yaitu, 30% virus vaksin dalam *phosphate buffer saline* (PBS) dan 70% adjuvant ISA 71VG Montanide™. Massa antigen di dalam vaksin AI bivalen mengandung 256 HAU (128 HAU antigen A/Muscovy Duck/Banten/BR7/2013 clade 2.3.2 dan 128 HAU A/Chicken/West Java/2006 clade 2.1.3) per dosis.

Ayam layer *specific pathogen free* (SPF) dipelihara dari DOC (*day old chicken*) dikandang BSL 3 (Biosafety level 3) (BBLitvet), diberi makan dan minum secara adlibitum. Empat puluh ekor ayam SPF umur 3 minggu dikelompokkan menjadi 2, yaitu kelompok 1 terdiri dari ayam layer SPF divaksinasi dengan 1 dosis vaksin inaktif bivalen AI H5N1 dan kelompok 2 yaitu ayam layer SPF tidak divaksinasi (sebagai kontrol), setiap kelompok terdiri dari 20 ekor ayam SPF. Kelompok ayam layer SPF coba diambil sampel darah sebelum divaksinasi dan setelah 3 minggu pascavaksinasi untuk diuji hemaglutinasi inhibisi (HI) dengan menggunakan antigen AI H5N1

clade 2.3.2 dan antigen AI H5N1 clade 2.1.3. Selanjutnya ayam layer SPF divaksinasi dan ayam layer SPF kontrol (tidak divaksin) dibagi ke dalam 2 kelompok, yaitu kelompok ditantang dengan virus HPAI A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012 clade 2.3.2 dan kelompok ditantang dengan virus HPAI A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 clade 2.1.3., setiap kelompok terdiri dari 10 ekor dan ditantang dengan titer virus 10^5 – 10^6 EID₅₀ per 0,1 ml/ekor secara intra nasal di dalam kandang isolator BSL-3 Moduler (BBLitvet). Pengamatan gejala klinis dari morbiditas dan mortalitas setiap pagi dan sore hari selama 14 hari. Pengamatan *shedding* virus tantang dilakukan pada hari ke 2, 5, 8, 11 dan 14 pascatantang, dengan mengkoliksi swab *Oropharyngeal* dan kloaka. Selanjutnya dilakukan uji reisolasi virus tantang.

Serum darah ayam layer SPF coba di Uji HI untuk mengukur kandungan titer antibodi terhadap antigen AI dalam serum ayam coba. Pada penelitian ini setiap serum diuji terhadap antigen AI HPAI A/Muscovy Duck/Banten/BR7/2013 clade 2.3.2 dan A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 clade 2.1.3. Prosedur uji HI mengikuti OIE (2012) dan Indriani *et al.* (2004).

Untuk mengetahui adanya *shedding* dari virus tantang pada ayam coba, virus diisolasi pada telur ayam *specific pathogenic free* (SPF) tertunas umur 10 hari. Setiap sampel ulas/swab diinfeksi ke dalam 3 butir telur secara intra alantoik. Sampel ulas/swab *Oropharyngeal* maupun kloaka dalam media transpor DMEM yang mengandung 500 IU Penicillin-Streptomycin, Gentamycin, Fungizone dan 2% *Foetal calf serum* di sentrifugasi pada kecepatan 1000 g selama 10 menit, setiap sampel swab di inokulasikan ke dalam cairan alantois telur ayam tertunas SPF umur 10 hari. Telur yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada suhu antara 37°C selama 72 jam. Selanjutnya cairan alantois dari telur yang telah terinfeksi diuji terhadap aktivitas haemaglutinasi (HA), dan apabila hasilnya memberikan reaksi negatif maka dilakukan lintasan/pasase selanjutnya ke telur tertunas lainnya sampai maksimum 3 lintasan untuk menyatakan bahwa isolasi virus negatif (Swayne & Jackwood 2006).

Data hasil uji serum (serologi) yang berupa kandungan antibodi (titer HI) dari sampel serum

pre dan pasca vaksinasi serta pascatantang di analisa dengan *Geometrik mean*.

HASIL

Analisis filogenetika virus vaksin bivalen dibandingkan dengan virus tantang

Analisis homologi virus menunjukkan bahwa virus A/Muscovy Duck/Banten/BR7/2013 pada tingkat nukleotida mempunyai homologi sekitar 90% dan 89% pada tingkat asam amino dengan virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006, dan 98% (nukleotida), 98% (asam amino) dengan virus A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012. Sedangkan antara virus A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012 dengan virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 mempunyai homologi sekitar 92% (nukleotida) dan 90% (asam amino). Hasil analisis ini memperlihatkan bahwa virus BR7 dan virus Sukoharjo mempunyai kemiripan genetik yang sangat tinggi dan mempunyai perbedaan cukup besar dengan virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 yaitu sekitar 10% pada asam aminonya. Perbedaan yang cukup besar ini diduga akan menurunkan efektivitas vaksin clade 2.1.3 terhadap virus clade 2.3.2 dan akan memperpanjang *shedding* virus yang terjadi. Hal yang serupa juga diperlihatkan pada analisis filogenetika (Gambar 1) yang memperlihatkan jarak genetik cukup jauh antara virus A/Muscovy Duck/Banten/BR7/2013 sebagai *seed* vaksin dan virus A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012 yang merupakan clade 2.3.2 dengan virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 (clade 2.1.3). Namun 2 jenis virus H5N1 ini adalah virus yang sekarang sedang bersirkulasi di Indonesia, sehingga pada penelitian ini dilakukan formulasi vaksin bivalen yang mengandung kedua jenis clade yang bertujuan untuk memperoleh kekebalan yang lebih baik pada unggas.

Respon pascavaksinasi vaksin inaktif bivalen AI H5N1

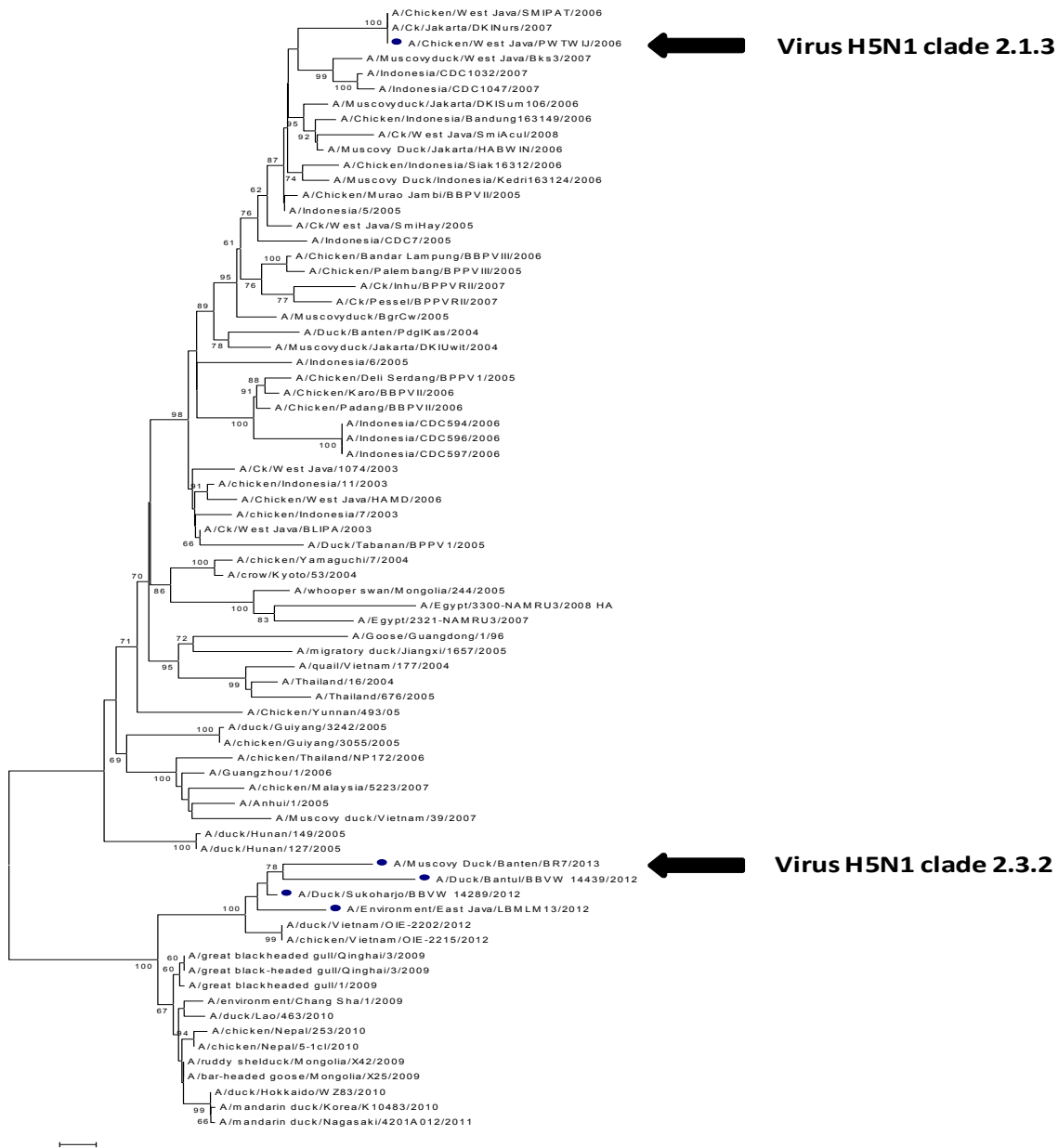
Respon vaksin bivalen AI H5N1 pada ayam layer SPF disampaikan di dalam Gambar 1. Ayam layer SPF umur 1 hari (DOC) tidak memperlihatkan adanya antibodi AI H5N1. Ayam layer SPF umur 3 minggu tidak memperlihatkan adanya titer antibodi AI,

kemudian divaksinasi dengan vaksin bivalen AI H5N1. Respon pascavaksinasi vaksin bivalen AI H5N1 pada ayam layer SPF setelah 3 minggu pascavaksinasi (umur 6 minggu) titer antibodi meningkat tajam secara individu dengan *mean* titer 6,5 log₂ dan *confidence interval* (CI) 5,99 – 7,03 terhadap antigen AI H5 BR7 dan *mean* titer 6,7 log₂

dan *confidence interval* (CI) 6,29 – 7,13 terhadap antigen AI H5 PWT.

Morbiditas dan mortalitas ayam SPF coba pascatantang

Ayam layer SPF divaksinasi vaksin bivalen AI H5N1 pada umur 6 minggu, setelah 3 minggu pascavaksinasi diinfeksi virus tantang H5N1 A/ck/wj/Pwt-Wij/2006 clade 2.1.3 dan A/Duck/Sukoharjo/



Gambar 1. Filogenetika gen HA virus avian influenza sub tipe H5N1. Gambar panah menggambarkan posisi virus H5N1 clade 2.1.3 dan clade 2.3.2 yang digunakan dalam penelitian ini

Bbv-1428-9/2012 clade 2.3.2. dengan dosis 10^6 EID₅₀ per 0,1 ml/ekor disampaikan dalam Tabel 1.

Kelompok virusantang H5N1 clade 2.3.2

Ayam layer SPF divaksinasi vaksin bivalen AI H5N1 dan diinfeksi virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 subtipe H5N1 clade 2.3.2 tidak memperlihatkan klinis AI dan tidak terjadi morbiditas dan mortalitas hingga akhir pengamatan (14 hari pascainfeksi), sedangkan kelompok ayam layer SPF kontrol (tidak divaksinasi) dan diinfeksi virusantang A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 subtipe H5N1 clade 2.3.2 memperlihatkan klinis dan kematian dengan *mean dead time* (MDT) 3,5 hari pascainfeksi.

Kelompok virusantang H5N1 clade 2.1.3

Ayam layer SPF divaksinasi vaksin bivalen AI H5N1 dan diinfeksi virus A/ck/wj/Pwt-Wij/2006 clade 2.1.3 tidak memperlihatkan morbiditas dan mortalitas hingga hari ke 14 pascainfeksi, sementara pada kelompok ayam layer SPF kontrol (tidak divaksinasi) dan diinfeksi virusantang A/ck/wj/Pwt-Wij/2006 clade 2.1.3 memperlihatkan klinis dan kematian dengan *mean dead time* (MDT) 3,3 hari pascainfeksi.

Shedding virusantang

Pola pelepasan (*shedding*) virusantang yaitu; *route* dan *duration* ditentukan dengan mendeteksi virus hidup melalui *oropharyngeal* dan kloaka (Tabel 1).

Ayam layer SPF divaksinasi vaksin bivalen AI H5N1 dan diinfeksi virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 subtipe H5N1 clade 2.3.2 terdeteksi adanya *shedding* virus pada hari ke 2 pascainfeksi melalui *oropharyngeal* 2 dari 10 ekor ayam layer SPF coba, dan tidak terdeteksi pada hari ke 5, 8, 11 dan 14 pascainfeksi, sedangkan pada ayam layer SPF kontrol (tidak divaksinasi) terdeteksi *shedding* virusantang pada hari ke 2 pascainfeksi 10 dari 10 ekor ayam layer SPF coba, baik melalui *oropharyngeal* maupun kloaka.

Ayam layer SPF divaksinasi vaksin bivalen AI H5N1 dan diinfeksi virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 clade 2.1.3 tidak terdeteksi adanya *shedding* virusantang baik melalui *oropharyngeal* maupun kloaka pada hari ke 2, 5, 8, 11, dan 14 pascainfeksi, sementara pada ayam layer

SPF kontrol (tidak divaksinasi) terdeteksi *shedding* virusantang pada hari ke 2 pascainfeksi 10 dari 10 ekor ayam layer SPF coba, baik melalui *oropharyngeal* maupun kloaka.

Respon antibodi AI pascainfeksi

Kandungan antibodi AI pada ayam layer SPF divaksinasi vaksin bivalen AI H5N1 setelah 14 hari pascainfeksi virusantang memperlihatkan kenaikan titer antibodi yang sangat tajam bila dibandingkan dengan kontrol, seperti disampaikan dalam gambar 2. Ayam layer SPF divaksinasi vaksin bivalen AI H5N1 dan diinfeksi virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 subtipe H5N1 clade 2.3.2 memiliki titer antibodi AI 10,55 log₂ dengan CI 10,5-10,96 terhadap antigen AI H5 BR7, Sedangkan Ayam layer SPF divaksinasi vaksin bivalen AI H5N1 dan diinfeksi virus A/Chicken/West Java/2006 clade 2.1.3 memiliki titer antibodi 11 log₂ dengan CI 11-11 terhadap antigen AI H5 PWT. Hal ini menunjukkan virusantang bekerja dengan baik.

Hasil uji Efikasi Vaksin bivalen AI H5N1 yang dipersiapkan dari 2 *seed* virus AI H5N1 termasuk ke dalam clade 2.3.2 (A/Muscovy Duck/Banten/BR7/2013) dan clade 2.1.3 (A/Chicken/West Java/2006) memperlihatkan kemampuannya dalam memberi perlindungan pada ayam SPF coba umur 3 minggu dari infeksi virus AI H5N1 A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 clade 2.3.2 dan A/Chicken/West Java/2006 clade 2.1.3, dengan tingkat proteksi 100% dan *shedding* virus tidak terdeteksi pada ayam SPF coba terinfeksi virus AI H5N1 clade 2.1.3 (homolog), sementara ayam SPF coba terinfeksi virus AI H5N1 clade 2.3.2 terdeteksi pada hari ke 2 PI. Sesuai FOHI (2013) vaksin AI H5N1 yang baik sekurang-kurangnya memberikan perlindungan 90% dan *shedding* virus > 8 hari PI. Dengan demikian diharapkan vaksin AI bivalen H5N1 dapat diaplikasikan pada ayam layer untuk mencegah adanya paparan infeksi virus AI H5N1 clade 2.3.2 dan clade 2.1.3 serupa dilapang.

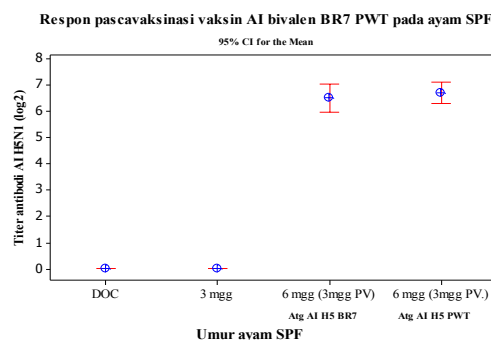
PEMBAHASAN

Evolusi virus AI terus menerus terjadi

secara dominan di glikoprotein permukaan virus, namun hal ini dapat juga terjadi pada segmen gen lainnya. Variabilitas virus adalah sebagai hasil dari akumulasi perubahan molekul pada delapan segmen RNA yang dapat terjadi melalui mekanisme mutasi titik (*antigenic drift*), *gene reassortment* (*antigenic shift*), *defective-interfering particles* dan rekombinasi RNA. Setiap mekanisme ini berkontribusi terhadap evolusi virus avian influenza (Webster *et al.* 1992). Mutasi termasuk substitusi, delesi dan insersi adalah salah satu mekanisme paling penting dalam menghasilkan variasi virus influenza. Kurangnya aktifitas *proofreading* polimerase RNA berkontribusi terhadap kesalahan replikasi 1 basa setiap 10⁴basa (Holland *et al.* 1982). Setiap siklus replikasi RNA menghasilkan campuran populasi dengan beberapa varian, sebagian besar dari mereka seringkali tidak tampak, namun mempunyai potensi untuk mutasi sehingga dapat menjadi dominan dibawah seleksi positif (Webster *et al.* 1992). Mutasi inilah yang mengakibatkan perubahan karakter virus harus terus dimonitoring, karena perubahan pada virus mungkin akan menyebabkan harus dievaluasinya *seed* virus vaksin secara periodik, untuk meningkatkan efektifitas vaksin dalam menghadapi virus yang bersirkulasi di lapang.

Program pengendalian penyakit AI terutama bertujuan untuk pencegahan, manajemen dan eradikasi penyakit (Swayne 2009). Program-program tersebut dalam pengendalian AI diantaranya

adalah penerapan biosekuriti, diagnosa penyakit, surveilans, eliminasi hewan terinfeksi, meningkatkan kekebalan inang dan pendidikan personil (Swayne 2009). Di Indonesia, dalam rangka mengeradikasi dan menurunkan penyebaran virus AI, pemerintah melalui Direktorat Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian menetapkan sembilan langkah strategis pengendalian penyakit AI yaitu 1) biosekuriti; 2) vaksinasi; 3) depopulasi selektif; 4) pengendalian lalu lintas unggas, produk serta limbahnya; 5) surveilans dan penelusuran; 6) pengisian kandang kembali; 7) *stamping out* di daerah tertular baru; 8) peningkatan kesadaran masyarakat serta 9) monitoring dan evaluasi. Vaksinasi sebagai salah satu alat untuk mengendalikan penyakit AI telah dilakukan pemerintah sejak bulan Agustus 2004 yaitu dengan melakukan vaksinasi masal terhadap beberapa jenis unggas seperti ayam ras, buras, puyuh, itik dan lain-lain dengan



Gambar 1. Titer antibodi AI pada ayam layer SPF pascavaksinasi vaksin bivalen AI H5N1

Tabel 1. Tingkat Perlindungan vaksin bivalen AI H5N1 terhadap virus HPAI A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 clade 2.1.3 dan A/Duck/Sukoharjo/Bbv-428-9/2012 clade 2.3.2 pada ayam layer SPF

Virus Tantang	Mortalitas/Total (MDT)	Mortalitas Sampel	Virus AI H5 terdeteksi				
			2 hari PT	5 hari PT	8 hari PT	11 hari PT	14 hari PT
			Positif/total				
H5N1 clade 2.3.2							
Vaksinasi	0/10	oropharyngeal	2-Oct	0/10	0/10	0/10	0/10
		kloaka	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Kontrol	10/10 (3.5)*	oropharyngeal	10	TD	TD	TD	TD
		kloaka	10	TD	TD	TD	TD
H5N1 clade 2.1.3							
Vaksinasi	0/10	oropharyngeal	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		kloaka	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Kontrol	10/10 (3.3)*	oropharyngeal	10	TD	TD	TD	TD
		kloaka	10	TD	TD	TD	TD

menggunakan autogenus vaksin. Pemilihan vaksin yang digunakan Indonesia pada saat ini adalah menggunakan virus clade 2.1.3.1 yang merupakan virus dominan di Indonesia (Dharmayanti *et al.* 2012).

Bersirkulasinya virus clade 2.3.2 di Indonesia yang berdampingan dengan virus clade 2.1.3 yang merupakan virus dominan membuat kebijakan vaksinasi dalam pengendalian penyakit AI pada unggas harus dievaluasi. Indriani *et al.* (2014) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa vaksin AI subtipe H5N1 clade 2.1.3 komersial yang beredar di Indonesia mempunyai tingkat protektivitas yang beragam mulai 60-100% terhadap virus AI subtipe H5N1 clade 2.3.2 yang bersirkulasi di Indonesia. Hal menarik diungkapkan juga dalam penelitian Indriani *et al.* (2014) bahwa meskipun mempunyai protektivitas 100% vaksin yang mengandung *seed* vaksin clade 2.1.3 mempunyai masa *shedding* virus yang lama yaitu lebih dari 8 hari. Hal ini tidak sesuai dengan standar produksi vaksin Indonesia (FOHI) yaitu *shedding* virus vaksin harus kurang dari 8 hari. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vaksin AI subtipe H5N1 clade 2.1.3 yang beredar di Indonesia meskipun protektivitasnya tergantung pada strain dan formulasi vaksin yang digunakan, dalam tidak dapat menurunkan *shedding* virus. Hal ini menjadi penting karena unggas sehat yang masih mampu mengeluarkan virus meskipun sudah divaksin dan akan menjadi faktor risiko terjadinya transmisi virus dari unggas ke unggas lainnya sehingga terjadi wabah atau penularan dari unggas ke manusia.

Unggas yang divaksinasi dengan vaksin bivalen pada penelitian ini mampu memberikan proteksi yang baik pada ayam SPF dan *shedding* tidak terjadi ketika ditantang dengan virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006. *Shedding* virus terjadi sampai hari kedua ketika unggas ditantang dengan virus dari clade 2.3.2. Hasil ini memperlihatkan bahwa virus clade 2.3.2 mempunyai kecenderungan masih belum dapat dinetralisir oleh antibodi yang terbentuk setelah vaksinasi dengan vaksin bivalen. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi bagi pemerintah Indonesia, dalam menentukan dan mengevaluasi jenis vaksin dan program vaksinasi pada unggas dalam mengendalikan

virus avian influenza yang sekarang bersirkulasi di Indonesia yaitu clade 2.1.3 dan clade 2.3.2.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa unggas yang divaksin dengan vaksin bivalen yang mengandung jenis virus H5N1 yang berbeda clade yaitu 2.1.3 dan 2.3.2 mempunyai protektivitas yang optimal terhadap kedua clade dan mampu menurunkan *shedding* virus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dinas Pertanian Kabupaten Tangerang atas kontribusinya pada penelitian ini. Ucapan terima kasih kepada Nana Suryana dan Teguh Suyatno atas bantuan teknisnya serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Dharmayanti, NLPI., K. Diwyanto & S. Bahri. 2012. Mewaspadai perkembangan Avian influenza (AI) dan Keragaman Genetik Virus AI/H5N1 di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian*. 5(2): 124-141.
- Dharmayanti, NLPI., G. Samaan, F. Ibrahim, R. Indriani, Darminto & A. Soebandrio. 2011. The genetic drift of avian influenza A H5N1 viruses in Indonesia during 2003-2008. *Microbiology Indonesia*. 5(2): 69-80.
- Dharmayanti, NLPI., R. Hartawan, Pudjiatmoko, H. Wibawa, Hardiman, A. Balish, R. Donis, C. T. Davis & G. Samaan. 2014. Genetic Characterization of Clade 2.3.2.1 Avian Influenza A(H5N1) Viruses, Indonesia, 2012. *Emerging Infectious Diseases*. 20(4): 671-674.
- Dharmayanti, NLPI., R. Damayanti, A. Wiyono, R. Indriani & Darminto. 2004. Identifikasi virus avian influenza virus isolat Indonesia dengan metode reverse transcriptase polymerase chain reaction RT-PCR. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 9(2): 136-143.
- Dharmayanti, NLPI., R. Hartawan, DA. Hewajuli, Hardiman, H. Wibawa & Pudjiatmoko. 2013. Karakteristik molekuler dan patogenesis virus H5N1 clade 2.3.2 asal Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 18.2 : 99-113.

- Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI). 2013. Vaksin Influenza Inaktif. Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. Edisi 4. pp 69-70.
- Hoffman, E., J. Stech, Y. Guan, RG. Webster & DR. Perez. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*. 146. 2275-2289.
- Holland, J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol & S. VandePol. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. 215: 1577-1585.
- Indriani, R., NLPI Dharmayanti, L. Parede, A. Wiyono & Darminto. 2004. Deteksi Respon Antibodi dengan Uji Hemagglutinasi Inhibisi dan titer proteksi terhadap virus Avian Influenza subtipe H5N1. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 9: 204-209.
- Indriani, R., NLPI. Dharmayanti & RMA. Adjid. 2014. Efikasi Vaksin AI H5N1 clade 2.1.3 yang beredar di Indonesia pada itik Mojosari terhadap virus tantang AI H5N1 clade 2.3.2. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 19(13): 59-66.
- Lee, MS., PC. Chang, JH. Shien, MC. Cheng & HP. Shieh. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virology. Methods*. 97: 13-22.
- Sedyaningsih, ER., S. Isfandari, V. Setyawati, L. Rifati, S. Harun, W. Purba, S. Imari, S. Giriputra, PJ. Blair, SD. Putnam, TM. Uyeki & T. Soendoro. 2007. Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005-June 2006. *Journal of Infectious Diseases*. 196: 522-527.
- Swayne, DE & M. Patin-Jackwood. 2006. Pathogenicity of avian influenza viruses in poultry. *Developmental Biology*. (Basel). 124: 61-67.
- Swayne, DE. 2009. Avian influenza vaccines and therapies for poultry. *Comparative Immunology, Microbiology Infectious Diseases*. 32(4): 351-63.
- [OIE] Office International Des Epizooties. 2012. Manual of Standards for Diagnostik Tests and Vaccines. Edisi 7. pp 436-452.
- Webster, RG., WJ. Bean, OT. Gorman, TM. Chambers & Y. Kawaoka. 1992. Evolution and Ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. 56: 152-179.
- Wibawa, H., WB. Prijono, NLPI. Dharmayanti, SH. Irianingsih, Y. Miswati, A. Rohmah, E. Andesyha, Romlah, RSD. Daulay & K. Safitria. 2012. Investigasi wabah penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta, dan Jawa Timur : Identifikasi sebuah clade baru virus avian influenza subtipe H5N1 di Indonesia. *Buletin Laboratorium Veteriner*. 12(2): 2-9.
- Wiyono, A., R. Indriani, NLPI. Dharmayanti, R. Damayanti & Darminto. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Virus Highly Pathogenic Avian Influenza subtipe H5 dari ayam asal Wabah di Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 9(1) : 61-71.
- WHO (World Health Organization). 2008. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases*. 14.7. e1
- WHO. 2012. Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. WHO/OIE/FAO H5N1 Working Group. *Influenza Other Respiratory Viruses*. 6(1): 1-5.