

Karakterisasi Virus Avian Influenza H5N1 Asal Peternakan Ayam Petelur Kecamatan Legok, Kabupaten Serang, Banten

(CHARACTERISTIC OF INFLUENZA VIRUS H5N1 FROM LAYER POULTRY FARM LEGOK DEMARCATION, SERANG DISTRICT, BANTEN)

Nurfildza Wafeta Abharina^{1*}, Gusti Ayu Yuniati Kencana², I Nengah Wandia³

¹Mahasiswa Program Studi Magister, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia;

²Laboratorium Virologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia;

³Laboratorium Anatomi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia.

*Corresponding author email: Wafetaabharina@gmail.com

Abstrak

Infeksi virus *Avian Influenza* masih menjadi perhatian serius di sektor peternakan unggas di Indonesia. Karakter molekuler virus AI yang mudah bermutasi diduga menjadi faktor virus AI terus menyebar dan berstatus endemik. Penelitian ini bertujuan untuk karakterisasi virus *Avian Influenza* dari peternakan ayam petelur yang berada di Kecamatan Legok, Kabupaten Serang, Banten sebagai bentuk persiapan vaksin AI H5N1. Sampel uji yang digunakan merupakan isolat koleksi milik PT. Sanbio Laboratories, Bogor dengan nama isolat Legok. Penelitian ini digunakan dua isolat pembanding yakni isolat Sukoharjo (A/Duck/Sukoharjo/BBVW-1428/2012) dan isolat Garut (A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007) yang merupakan *master seed* vaksin lokal AI H5N1. Isolasi virus dilakukan pada telur ayam berembrio (TAB) umur 9 hari dan selanjutnya hasil isolasi virus diuji menggunakan uji hemaglutinasi (HA), Hasil uji HA dikonfirmasi dengan *Reverse Transcritase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) digunakan untuk melihat sub tipe virus AI dan selanjutnya dikonfirmasi dengan uji sekuensing untuk melihat jarak genetik dan hubungan kekerabatan antar isolat yang di uji. Hasilnya adalah isolat Legok berada satu *clade* dengan isolat Sukoharjo yaitu berada pada *clade* 2.3.2 namun isolat Legok membentuk *subclade* baru 2.3.2 varian, sedangkan isolat Garut berada pada *Clade* 2.1.3. Jarak genetik masing-masing isolat adalah isolat Legok terhadap isolat Sukoharjo memiliki perbedaan genetik sebesar 3%, homologi 97%, Isolat Legok terhadap isolat Garut memiliki perbedaan genetik sebesar 11,5%, homologi 88,5% sedangkan isolat Sukoharjo terhadap isolat Garut perbedaan genetiknya sebesar 9% dan homologinya 91%. Kesimpulannya adalah bahwa isolat Legok memiliki perbedaan karakteristik dengan isolat Sukoharjo dan isolat Garut. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat Legok mengalami mutasi, sehingga perlu dilakukan monitoring dan penelitian lanjutan untuk *seed* vaksin dari isolat Legok.

Kata kunci: *Avian Influenza* H5N1; ayam; isolat Legok; karakterisasi

Abstract

Avian Influenza virus infection is still a serious concern in the poultry sector in Indonesia. The molecular character of the AI virus that easily mutates is thought to be a factor in the AI virus continuing to spread and having endemic status. This study aims to characterize the Avian Influenza virus from laying poultry in Legok District, Serang District, Banten as a form of preparation for the AI H5N1 vaccine. The test sample used is a collection of isolates owned by PT. Sanbio Laboratories, Bogor with the name Legok isolate. This study used two comparator isolates, namely Sukoharjo isolate (A/Duck/Sukoharjo/BBVW-1428/2012) and Garut isolate (A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007) which are the master seeds of the local AI H5N1 vaccine. Virus isolation was carried out on embryonated chicken eggs (TAB) aged 9 days and then the virus isolation results were tested using the fast and slow hemagglutination (HA) test to detect the presence of the virus, the Reverse Transcritase Polymerase

Chain Reaction (RT-PCR) test was used to see AI virus subtypes and then confirmed by sequencing tests to see the genetic distance and kinship between the isolates tested. The result is that Legok isolate is in the same clade as Sukoharjo isolate, which is in clade 2.3.2, but Legok isolate forms a new subclade 2.3.2 variant, while Garut isolate is in clade 2.1.3. The genetic distance for each isolate obtained was that Legok isolate to Sukoharjo isolate had a genetic difference of 3%, homology 97%, Legok isolate to Garut isolate had a genetic difference of 11.5%, 88.5% homology while Sukoharjo isolate to Garut isolate the genetic difference is 9% and the homology is 91%. The conclusion is that the Legok isolate has different characteristics from the Sukoharjo isolate and the Garut isolate. This indicates that the Legok isolate has a mutation, so it is necessary to carry out monitoring and further research for vaccine seeds from Legok isolate.

Keywords: Avian Influenza H5N1; genetic characteristic; Legok isolates; poultry farm

PENDAHULUAN

Virus *Avian Influenza* dikenal dengan flu burung dan dilaporkan dapat menginfeksi berbagai jenis unggas, seperti ayam, kalkun, itik, bebek dan burung. Infeksi *Avian Influenza* di sebabkan oleh virus influenza tipe A yang berasal dari keluarga *Orthomyxoviridae*. Virus AI yang menginfeksi saat ini merupakan subtype H5N1 yang memiliki masa inkubasi antara tiga sampai lima hari (WHO, 2006; Setiarto, 2020). Virus AI H5N1 dilaporkan dapat menginfeksi hewan maupun manusia (zoonosis) dan menyebabkan kematian 6 dari 18 orang yang terinfeksi (Guan *et al.*, 2009). Berdasarkan patogenesisnya virus AI digolongkan menjadi dua tipe, yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Virus AI H5N1 di kategorikan sebagai virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan di Indonesia dilaporkan pertama kali sekitar tahun 2003 hingga 2004. Infeksi tersebut mengakibatkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Kencana *et al.*, 2012; Hewajuli dan Dharmayanti, 2008; OIE, 2004).

Hasil identifikasi *outbreak* tahun 2003 menunjukkan bahwa infeksi virus AI H5N1 berasal dari *clade* 2.1.3, kemudian pada tahun 2012 virus AI di Indonesia kembali dilaporkan dan disebabkan oleh virus AI yang berasal dari *clade* 2.3.2 yang bersifat ganas sehingga pada saat itu menyebabkan kematian pada itik di Kabupaten Brebes dalam jumlah yang banyak (Wibawa *et al.*, 2018). Berbagai upaya di lakukan pemerintah untuk menekan serta mencegah

kasus AI H5N1, salah satunya melalui program vaksinasi secara rutin baik pada peternakan unggas berskala industri maupun rakyat. Namun, terdapat laporan bahwa di salah satu peternakan ayam petelur yang berada di kecamatan Legok kabupaten Serang, Banten mengalami penurunan produksi telur secara signifikan dan diikuti dengan kematian mendadak yang tinggi. Kejadian tersebut di duga bahwa terdapat kegagalan program vaksinasi. Faktor terjadinya kegagalan vaksinasi virus AI H5N1 di sebabkan karena virus AI memiliki sifat genetik yang mudah mengalami perubahan. Perubahan yang dapat terjadi berupa perubahan *antigenic drift* atau *antigenic shift*. Sehingga penelitian dilakukan untuk mengetahui dan mengidentifikasi agen penyebab dari penurunan produksi yang terjadi di peternakan ayam petelur tersebut (Kencana *et al.*, 2015; Suarez, 2008).

Penelitian dilakukan dengan mengidentifikasi isolat lapang yang berasal dari peternakan ayam petelur di kecamatan Legok, Banten yang menunjukkan gejala klinis *Avian Influenza*. Isolat penelitian yang digunakan telah di koleksi oleh PT Sanbio *Laboratories* yang kemudian dibandingkan dengan dua isolat standar-pemerintah yang merupakan *master seed* vaksin lokal H5N1, yaitu isolat Garut dengan kode A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007 dan isolat Sukoharjo A/Duck/Sukoharjo/BBVW-1428/2012.

Karakterisasi dilakukan menggunakan uji serologi dan molekuler. Uji Hemaglutinasi (HA) merupakan uji

serologi yang digunakan dengan untuk mengidentifikasi virus dan kemudian di konfirmasi menggunakan uji RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) untuk melihat subtipe virus AI H5N1. Selanjutnya produk hasil RT-PCR di karakterisasi dan di sekuensing untuk mengetahui karakteristik, perubahan dan homologi virus AI H5N1 isolat Legok, Banten dengan dua isolat pembanding lainnya, yaitu isolat Garut dengan kode A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007 dan isolat Sukoharjo A/Duck/Sukoharjo/BBVW-1428/2012. Tujuan penelitian untuk mengetahui karakter virus AI H5N1 isolat Legok, jarak genetik serta mengetahui hubungan kekerabatan dengan isolat *master seed* vaksin lokal H5N1 yakni isolat Sukoharjo (A/Duck/Sukoharjo/BBVW-1428/2012) dan Garut A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007 sehingga hasil penelitian dapat digunakan sebagai informasi ilmiah virus AI H5N1 dan menyediakan *master seed* virus *Avian Influenza* dalam rangka penyiapan vaksin.

METODE PENELITIAN

Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi isolasi virus AI pada telur ayam SPF, identifikasi virus dengan uji hemaglutinasi (HA), uji *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan uji sekuensing. Sampel penelitian yang digunakan meliputi antigen dari isolat Legok yang digunakan sebagai isolat uji berasal dari peternakan komersil yang merupakan mitra dari PT Sanbio *Laboratories*, dan antigen isolat Sukoharjo dan Garut yang merupakan *master seed* vaksin AI H5N1

Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode eksploratif secara langsung di laboratorium dan hasilnya dipaparkan secara deskriptif. Penelitian ini dilakukan untuk melihat karakteristik, jarak genetik dan hubungan kekerabatan virus AI H5N1 yang diidentifikasi.

Isolasi Virus AI

Telur yang digunakan diberi kode untuk diinokulasi virus *Avian Influenza* H5N1, inokulasi dilakukan pada telur ayam bertunas (TAB) SPF yang berembrio umur 9 hari melalui ruang alantois sebanyak 0,2 mL/butir telur. Setelah di inokulasi, telur selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C. Telur diamati selama 2 hari dengan di *candling* setiap hari. Telur ayam SPF yang embrionya mati ataupun hidup dimasukan kedalam *cool room* (*chilling*). Telur yang telah *dichilling* dipanen seluruh cairan alantoisnya didalam BSC (dilakukan secara aseptis). Pemanenan cairan alantois diambil dengan menggunakan *syringe* 10 mL, kemudian masukan dalam tube 50 mL. Cairan alantois disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm, supernatannya diambil menggunakan *syringe* kemudian difilter, dimasukan kedalam tube 2 mL dan beri label pada tube tersebut. Hasil pemanenan cairan alantois dimasukan ke *freeze* 4°C (Mahardika *et al.*, 2016).

Uji Hemaglutinasi

Uji Hemaglutinasi dilakukan dengan teknik HA cepat dan lambat (mikrotiter). Uji HA cepat dilakukan dengan menambahkan satu tetes suspensi antigen diatas gelas objek kemudian ditambahkan dengan satu tetes suspensi sel darah merah 1%. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya butiran berpasir warna merah pada gelas objek (Mahardika *et al.*, 2016).

Uji HA teknik mikrotiter dilakukan menggunakan alat *microplate V buttom* (*Nunc*) sesuai dengan standar yang berlaku. Perlakuan awal diberikan masing-masing 0,025 mL PBS pH 7,2 pada sumur ke- 1-12. Cairan alantois diambil dari telur sebanyak 0,025 mL, dimasukkan ke dalam sumur sesuai nomor sampel uji. Cairan alantois diencerkan bertingkat kelipatan dua dengan PBS dari sumur ke- 1-11, kemudian ditambahkan 0,025 mL suspensi sel darah merah ayam 1 % ke dalam seluruh sumur. Tahap terakhir dilakukan pengocokan *microplate* dengan menggoyang-goyangkannya selama 15 detik, dan

diinkubasi pada suhu ruang sekitar 30 menit. Pembacaan sampel uji dapat dilakukan jika sel darah merah sumur kontrol telah teraglutinasi di dasar sumur. Sampel dinyatakan positif apabila sel darah merah pada sumur sampel mengalami aglutinasi. Titer HA dihitung berdasarkan pengenceran tertinggi alantois yang dapat mengaglutinasi sel darah merah. (OIE, 2009).

Isolasi RNA Virus

Isolasi RNA virus diambil dari cairan alantois yang selanjutnya dilarutkan dengan menggunakan *Trizol*[®] *LS Reagent* yang tersedia secara komersial (*Life Technology*) dengan menggunakan metode sesuai instruksi pembuatan dengan modifikasi. Sebanyak 125 µL sampel cairan alantois yang diinfeksi dengan virus *avian influenza* dicampur dengan 375 µL *Trizol reagent* dalam tabung *microfuge* 1,5 mL dan dicampur hingga homogen sebelum diinkubasi selama 5 menit pada temperatur ruang. Kemudian larutan ditambah dengan kloroform sebanyak 200 µL, dan dicampur hingga homogen lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah itu larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan dipisahkan serta ditempatkan pada tabung baru. Setelah itu ditambahkan isopropanol sebanyak 250 µL, dan dicampur hingga homogen dan diinkubasi selama 10 menit. Setelah campuran diinkubasi, selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Pelet yang terbentuk dicuci dengan etanol-DEPC-dH₂O 70% dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 7.500 rpm. Setelah campuran disentrifugasi, etanol-DEPC-dH₂O 70% dibuang. Produk RNA dikeringkan pada suhu ruang selama 15-20 menit sebelum diresuspensi dengan 10 µL *RNase-free water*. Suspensi RNA ini dapat langsung digunakan untuk sampel pada pengujian PCR atau dapat disimpan pada -20°C sampai digunakan (OIE, 2009).

Uji RT-PCR

Uji RT-PCR digunakan untuk menentukan subtipe virus AI H5N1. Uji RT-PCR menggunakan primer rujukan yang dihasilkan dari produk PT Sanbio *Laboratories* dengan primer depan FPH5232_13 (ATTGGTTAYCATGCAAAYA AACTCG) dan primer belakang BPH5232_597 (GGAAYATAGGTRGTTGGRTTYTGA TAG), panjang produk yang diharapkan adalah sekitar 585-600 *basepair* (bp). Amplifikasi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan enzim *SuperScript TM III onestep PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Satu siklus RT-PCR dilakukan dengan pengaturan suhu 50°C selama 1 jam, 95°C selama 7 menit, 94°C selama 45 detik, 52°C selama 45 detik, 72°C selama 1 menit. Siklus ke 3-5 diulang kembali sebanyak 39 kali. Tahap penyempurnaan kerja enzim dilakukan pada suhu 72° C selama 5 menit dan 22° C selama 48 detik. Proses uji RT-PCR dengan menggunakan mesin *My Genie 32 Thermal Blok*. Produk RT-PCR yang telah selesai proses dalam mesin kemudian disimpan ke dalam *freezer* sebelum dielektroforesis.

Elektroforesis Produk RT-PCR

Hasil dari amplifikasi DNA virus *Avian Influenza* (AI) diidentifikasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%. Prosedur ini dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 gram serbuk agarose dalam 50 mL TAE 1x kemudian dipanaskan selama 60 detik dengan *microwave*. Setelah itu ke dalam *gel* cair ditambahkan *gel red* sebagai pewarna DNA sebanyak 4 µL untuk volume gel 50 mL. Larutan agarose dituang ke dalam *tray* yang telah dipasang sisir sebelumnya. Setelah *gel* mengeras sisir diangkat dan *tray* yang berisi *gel* dimasukkan dalam tangki elektroforesis yang berisi TAE 1x. Komponen yang digunakan dalam tahap ini adalah 1 µL sampel produk amplifikasi PCR. Komponen tersebut dimasukkan dalam sumuran *gel agarose*. DNA *ladder* 100 bp sebanyak 1 µL dimasukkan pada salah satu sumuran. Elektroforesis berjalan selama

20-30 menit dengan tegangan 100 Volt. Hasil elektroforesis dapat divisualisasikan dengan bantuan UV *Transilluminator* ($\lambda=260$ nm). Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA sesuai ukuran panjang primer yang digunakan yang dapat diinterpretasikan sebagai gen penyandi virus *Avian Influenza* (OIE,2009).

Uji Sekuensing

Uji sekuensing menggunakan hasil dari produk RT-PCR dengan mengadaptasi metode Sanger atau melalui metode terminasi enzimatik. Uji sekuensing dilakukan pada gen HA yang bertujuan untuk melihat perubahan gen HA dari ketiga isolat yang di uji. Sekuensing selanjutnya dilakukan dengan mesin Genetyx Analyzer 3130, hasil sekuen di verifikasi dan di analisis dengan software BioEdit, version 7.

Analisis Bioinformatika

Analisis data menggunakan software *Molecular Evolution Genetics Analysis* (MEGA) versi 11. Analisis sekuens menggunakan fragmen HA sebagai target analisis. Gen HA digunakan sebagai dasar penentuan hubungan kekerabatan (*Clade*) dan menentukan ukuran jarak genetik (*distance*). Hasil data yang diperoleh adalah nilai jarak genetik dan gambaran pohon kekerabatan atau pohon filogenetik. Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *neighbor joining bootstrap* dengan parameter model Kimura-2 sedangkan presentase replikasi pohon filogenetik yang membentuk *clade* di uji menggunakan tes bootstrap 1000 kali replikasi (Dharmayanti, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil uji HA cepat dan uji HA teknik mikrotiter bertujuan untuk melihat titer virus ditampilkan pada Gambar 1.

Uji HA cepat merupakan uji serologi yang dilakukan dengan menambahkan sel darah merah (SDM) 1%. Ketiga isolat yang di uji HA cepat menunjukkan hasil positif

(Gambar 1) yang menandakan bahwa isolat yang digunakan mengandung virus target. Hal ini sesuai dengan pendapat Stevens *et al* (2006) bahwa protein HA virus *influenza* dapat melekat pada reseptor eritrosit berbagai jenis unggas.

Uji HA lambat atau teknik mikrotiter digunakan untuk mengetahui titer virus. Titer masing-masing isolat yang diperoleh adalah, isolat Legok 2^6 HAU, isolat Sukoharjo 2^6 HAU unit dan isolat Garut sebesar 2^{10} HAU. Titer virus yang tinggi menandakan bahwa semakin cepat dan kuat terjadi reaksi aglutinasi.

Menurut (Boose dan August, 2013) uji hemaglutinasi merupakan metode klasik untuk mendeteksi keberadaan virus dan hingga saat ini masih digunakan untuk diagnosis virus influenza. Prinsip dari uji HA adalah terjadinya reaksi antara antigen dan antibodi yang homolog membentuk ikatan antibodi dan antigen yang kompleks (Mahardika *et al.*, 2016). Hasil titer yang diperoleh terdapat pada Tabel 1

Konfirmasi dari hasil uji HA selanjutnya dilakukan Uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* RT-PCR untuk melihat gen spesifik dari virus AI. Hasil uji RT-PCR diketahui ketiga isolat mengamplifikasi primer H5 dengan dihasilkan produk amplifikasi sepanjang 585-600 bp. Menurut, OIE (2004) uji RT-PCR banyak digunakan untuk mendeteksi virus Influenza karena uji molekuler ini memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi dan mampu menghasilkan produk yang spesifik. Selanjutnya hasil amplifikasi DNA oleh RT-PCR dilanjutkan dengan uji sekuensing dan diperoleh data berupa nilai jarak genetik dan hubungan kekerabatan. Gambaran pita DNA yang dihasilkan dari proses elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 2.

Nilai jarak genetik dan homologi antar isolat uji setelah dikonversi dari nilai desimal (Tabel 2) menjadi persen diperoleh nilai tertinggi terlihat pada hubungan isolat Legok dan isolat Garut dengan perbedaan genetik 11,5% dan homologi 88,5%, isolat Sukoharjo dengan isolat Garut perbedaan

genetik 9% dengan homologi 91%. Sedangkan jarak genetik terendah terdapat pada isolat Legok dan Sukoharjo dengan perbedaan genetiknya 3% serta nilai homologinya 97%. Hasil analisis jarak genetik antar isolat di tampilkan pada Tabel 2.

Pembahasan

Jarak genetik yang rendah menunjukkan bahwa semakin dekat hubungan kekerabatan antar kedua isolat, sedangkan semakin tingginya jarak genetik menunjukkan semakin jauh hubungan kekerabatan antar isolat. Sehingga dapat dikatakan bahwa hubungan kekerabatan antara isolat Legok dan isolat Sukoharjo memiliki hubungan kekerabatan yang dekat sebesar 97%. Kedekatan jarak genetik antar isolat dapat disebabkan oleh adanya asal-usul keturunan yang sama (*common ancestor*) (Campbell dan Reece, 2008; Dharmayanti, 2011).

Hasil sekuen fragmen gen H5 dari ketiga isolat uji kemudian disejajarkan dan dianalisis dengan *BLAST* di (www.ncbi.nlm.nih.gov) dengan isolat AI H5N1 yang ada di Indonesia yang sebelumnya telah terdaftar di *GenBank*. Hasil kontruksi pohon filogenetik dapat dilihat pada Gambar 3.

Hasil dari kontruksi pohon filogenetik diketahui bahwa isolat Legok berada dalam satu *clade* dengan isolat Sukoharjo A/Duck/Sukoharjo/BBVW-1428/2012 yaitu pada *clade* 2.3.2. Meskipun berada dalam satu *clade*, isolat Legok membentuk *subclade* 2.3.2 *variant*. Menurut Wibawa *et al* (2018) terbentuknya *sub clade baru/variant* di duga mengalami perubahan genetik *reassortment*, yaitu terjadi pertukaran genetik pada segmen-segmen gen virus AI dan kondisi ini dapat terjadi antar *clade* virus H5N1 (*inter-lineage reassortment*) atau virus-virus yang memiliki subtipe yang berbeda, yaitu HPAI dan LPAI (*inter-subtype reassortment*). *Reassortant* virus yang dihasilkan dapat menghasilkan antigen baru yang berfungsi untuk menghindari pengenalan dari sistem imun inang sehingga memungkinkan

hospes mengalami resisten terhadap virus AI H5N1 yang belum memiliki imunitas terhadap virus tersebut (Dharmayanti *et al.*, 2018).

Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat Legok membentuk *sub clade* atau *clade variant* dari 2.3.2 bersama dengan dua isolat yang berasal dari satu provinsi, yaitu Jawa Barat. Kencana *et al* (2014) mengungkapkan bahwa keberhasilan vaksinasi *Avian Influenza* bergantung pada tingkat kecocokan antara strain virus AI lapangan dengan vaksin yang digunakan. Sehingga sebaiknya penggunaan *seed* vaksin memiliki homologi genetik dan antigenik yang homolog dengan virus yang beredar di wilayah tersebut, karena penggunaan *seed* vaksin yang tidak homolog dapat menurunkan protektivitas vaksin, serta dapat mengakibatkan tingginya beban virus (*virus burden*) (Mahardika *et al.*, 2009). Meskipun nilai homologi yang tidak terlalu jauh antar isolat Legok dan Sukoharjo, karakterisasi perlu dilakukan secara berkala sebagai cara dalam mendeteksi dini adanya potensi virus bermutasi.

Upaya pencegahan terhadap virus AI H5N1 terus dilakukan dengan survei dan karakterisasi virus lapang untuk mengetahui jika terjadi perubahan gen virus. Penelitian dilakukan secara berkala diperlukan karena, mengingat virus AI H5N1 mudah bermutasi. Vaksin yang baik jika kandungan virus vaksin memiliki kesamaan dengan virus penyebab wabah di wilayah tersebut. Virus AI H5N1 telah bersifat endemis dan telah tersebar di Bali baik pada ayam buras maupun ayam ras (Kencana *et al.*, 2018; Musdalifa *et al.*, 2020).

Pada penelitian yang dilakukan Kencana *et al* (2020) hasil karakterisasi virus AI-H5N1 isolat Bali menunjukkan bahwa virus AI-H5N1 isolat Bali berada pada *clade* 2.3.2 dan memiliki perbedaan jarak genetik sebesar 3.28% dengan standar *seed* vaksin pemerintah A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012. Potensi vaksin dapat diukur secara seluler maupun

humoral berdasarkan kemampuan meningkatkan imunitas. Perkembangan teknologi vaksin diarahkan dengan memanfaatkan antigen dari virus kasus lapang penyebab wabah disuatu daerah (Kencana *et al.*, 2021).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Nilai jarak genetik isolat Legok dan Sukoharjo (A/Duck/Sukoharjo/BBVW-1428/2012) memiliki perbedaan genetik sebesar 3%, dan homologi 97%. Isolat Legok dengan Garut (A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007) perbedaan genetiknya 11,5% dan homologinya 88,5%. Hasil analisa pohon kekerabatan diperoleh isolat garut berada pada *clade* 2.1.3 sedangkan isolat Legok dan isolat Sukoharjo berada pada *clade* 2.3.2, namun isolat Legok berada dalam *subclade* 2.3.2 varian yang mengindikasikan bahwa isolat tersebut mengalami mutasi.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk seed vaksin dan uji potensi vaksin yang digunakan di peternakan ayam petelur di Kabupaten Legok yang mengalami kasus.

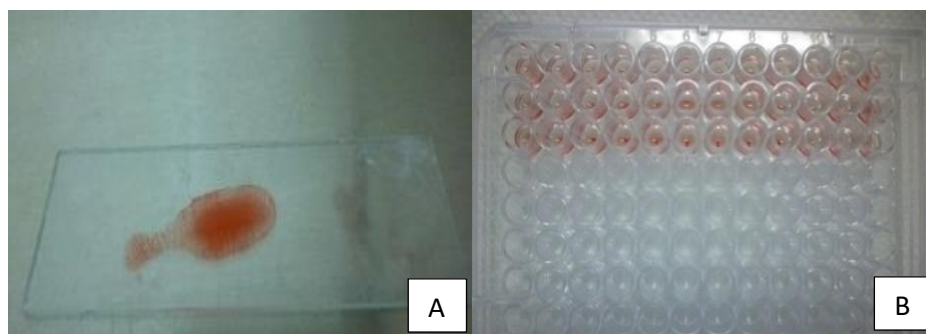
UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Dani Ong selaku Direktur Utama PT Sanbio *Laboratories*, Wanaherang, Gunung Putri, Bogor, yang telah memberikan ijin, sarana, dan prasarana sehingga penelitian ini dapat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Campbell NA, Reece RB. 2008. Biologi, Edisi Kedelapan Jilid 3. Terjemahan: Damaring Tyas Wulandari. Jakarta: Erlangga.
- Guan Y, Smith GJ, Webby R, Webser RG. 2009. Molecular epidemiology of H5N1. *Rev. Sci. Tech.* 28(1): 29-47.
- Dharmayanti NLPI. 2011. Metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. filogenetika molekula: metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa.* 21(1): 1-10.
- Dharmayanti NLPI, Thor SW, Zanders N, Hartawan R, Ratnawati A, Jang Y, Rodriguez M, Suarez DL, Samaan G, Pudjiatmoko, Davis C.T. 2018. Attenuation of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses in Indonesia following the reassortment and acquisition of genes from low pathogenicity avian influenza A virus progenitors. *Emerg. Microb. Infect.* 7(1): 1-14.
- Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI. 2008. Karakterisasi Dan Identifikasi Virus Avian Influenza (AI). *Wartazoa.* 18(2): 86-100.
- Kencana GAY, Mahardika IGNK, Suardana IBK, Asnawan MIN, Krisna DNM, Narendra PGN. 2012. Pelacakan kasus flu burung pada ayam dengan reverse transcriptase polymerase chain. *J. Vet.* 13(3): 303-308.
- Kencana GAY, Suartha IN, Nurhandayani A, Ramadhan M. 2014. Kepekaan telur specific pathogen free dan clean egg terhadap virus flu burung. *J. Vet.* 15(1): 87-93.
- Kencana GAY, Suartha N, Simbolon MP, Handayani AN, Ong S, Syamsidar, Kusumastuti A. 2015. Respon antibodi terhadap penyakit tetelo pada ayam yang divaksin tetelo dan tetelo-flu burung. *J. Vet.* 16(2): 283-290.
- Kencana GAY, Suartha IN, Kardena IM, Nurhandayani A. 2020. Karakterisasi virus avian influenza subtipe H5N1 isolat lapang asal Bali untuk kandidat vaksin. *J. Vet.* 21 (4): 530-538
- Kencana GAY, Suartha IN, Kardena IM, Agustina KK. 2021. Seroprevalence and Detection of H5N1 avian influenza virus in local chickens in Tabanan regency, Bali, Indonesia. *Acta Vet. Indon.* 9(3): 223-229.

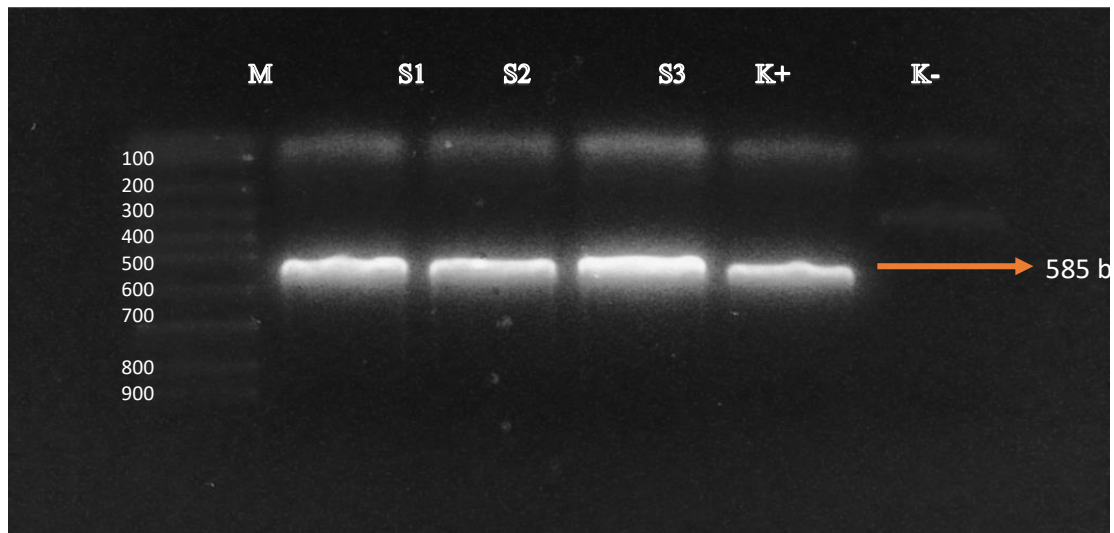
- Mahardika IGNK, Suartha IN, Suardana IB, Kencana IGAY, Wibawan IWT. 2009. Perbandingan sekuens consensus gen hemagglutinin virus avian influenza subtipe H5N1 asal unggas Indonesia dengan subtipe H5N2 dan H5N9. *J. Vet.* 10(1): 12-16.
- Mahardika IGNK, Astawa INM, Kencana GAY, Suardana IBK, Sari, TK. 2016. Teknik Lab Virus. Udayana University Press. Denpasar.
- Musdalifa A, Kencana GAY, Suartha IN. 2020. Deteksi antigen virus avian influenza pada ayam kampung di pasar hewan Beringkit dan pasar umum Galiran, Bali. *Indon. Med. Vet.* 9(5): 757-772.
- Setiarto RHB. 2020. Mengenal virus flu burung H5N1 (Avian Influenza), pencegahan dan pengobatannya. Guepedia. Bogor
- Stevenes J, Blixt O, Tumpey TM, Taunberger JK, Paulson JC, Wilson IA. 2006. Structure and receptore specificity of hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Sci.* 312: 4-10.
- Suarez DL. 2008. Avian Influenza dalam Avian Influenza, Blackwell Publishing Blackwell Publishing Professional 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. Pp. 3-22.
- OIE. 2004. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal. World Organisation for Animals Health 4: 258-269.
- OIE. 2009. Office International des Epizooties (OIE). Terrestrial Manual: Chapter 2.3.4. Avoian Influenza. http://www.oie.int/Health_Standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- Wibawa H, Dharmawan R, Mulyawan H, Mahawan T. 2018. Deteksi dan identifikasi virus-virus reassortant highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 2.3.2.1c dengan teknik next generation sequencing. *Bul. Lab. Vet.* 18(1): 1-13.
- WHO. 2006. H5N1 Avian Influenza: Timeline, 1547. February 2006. www.who.int.



Gambar 1 Hasil uji positif uji HA lambat (A) dan Hasil uji HA mikrotiter (B).

Tabel 1. Hasil uji HA cepat dan HA mikrotiter

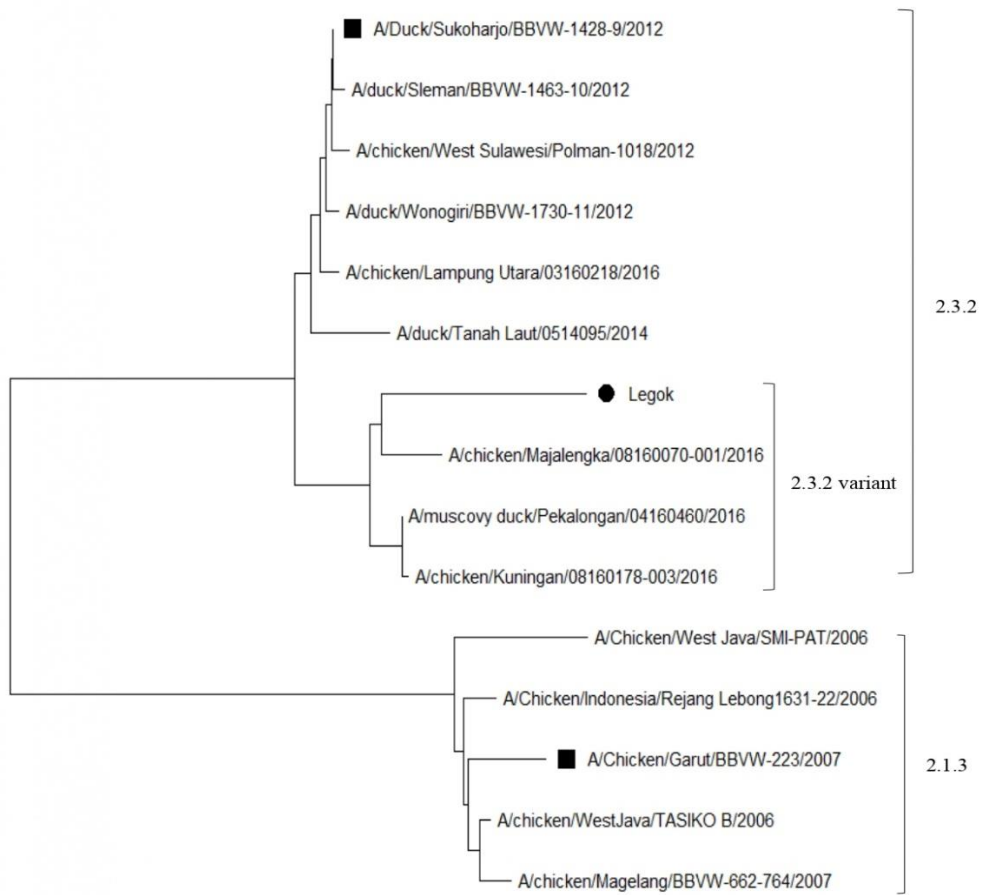
Sampel Isolat	Titer HA cepat (+/-)	Titer HA mikrotiter
Isolat Legok	+	2 ⁶
Isolat Sukoharjo	+	2 ⁶
Isolat Garut	+	2 ¹⁰



Gambar 2 Elektroforesis produk PCR dengan menggunakan gen H5. Elektroforesis Gel Agarose 1% yang divisualisasi dengan UV dan telah diwarnai *ethidium bromide* dengan Marker 585-600 bp. Keterangan: M (marker), S1 (Isolat Legok), S2 (Isolat Tegal), S3 (Isolat Sukoharjo), K+ (Kontrol positif) dan K- (Kontrol negatif).

Tabel 2. Hasil nilai jarak genetika antar isolat

Isolat	Legok	Sukoharjo	Garut
Legok	-	-	-
Sukoharjo	0,035	-	-
Garut	0,115	0,090	-



Gambar 3. Analisa Filogenetik *Avian Influenza* H5N1 isolat Legok dengan virus AI H5N1 di *Genbank*. Isolat yang di uji dalam penelitian ini ditampilkan dengan simbol bulat dan kotak.