

## ***Shedding* Virus Vaksin Flu Burung Subtipe (H5N1) Isolat Dari Bali**

### **Tidak Ditemukan Pascavaksinasi Ayam Petelur**

(*SHEDDING DETECTION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS VACCINE SUBTYPE (H5N1) BALI ISOLATE POST VACCINATION NOT FOUND IN LAYER CHICKEN*)

**Gusti Ayu Yuniati Kencana<sup>1</sup>, Tri Komala Sari<sup>1</sup>,  
Dhyana Ayu Manggala Wijaya<sup>2</sup>, I Nyoman Suartha<sup>3</sup>,  
Anak Agung Sagung Kendran<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium Virologi Veteriner,

<sup>2</sup>Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan,

<sup>3</sup>Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Veteriner,

<sup>4</sup>Laboratorium Diagnosis Klinik, Patologi Klinik dan Radiologi Veteriner.

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,

Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234,

Telp/Fax: (0361) 223791,

E-mail: [yuniati\\_kencana@unud.ac.id](mailto:yuniati_kencana@unud.ac.id)

#### **ABSTRAK**

Flu burung atau *Avian influenza* (AI) merupakan penyakit viral akut yang sudah tersebar luas di seluruh dunia, dan saat ini bersifat endemik di Indonesia. *Avian Influenza* digolongkan penyakit menular strategis prioritas karena bersifat zoonosis berbahaya yang dapat menyerang unggas dan mamalia maupun manusia. Unggas yang diternakkan secara massal lebih rentan terserang *avian influenza*, seperti ayam petelur, sehingga perlu dilakukan upaya pencegahan dengan vaksinasi. Virus *avian influenza* mudah mengalami mutasi sehingga tidak dapat dikenali oleh antibodi yang sudah ada di dalam tubuh unggas, oleh karena itu perlu untuk selalu dilakukan pengembangan vaksin, contohnya adalah vaksin *avian influenza* subtipe H5N1. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali dapat digunakan pada peternakan ayam komersial dengan melihat kemampuannya menekan *shedding* virus. Penelitian ini dilakukan dengan mengambil 20 sampel *swab* kloaka secara acak dari 40 ekor ayam petelur yang sudah divaksin *Avian Influenza* subtipe H5N1 isolat dari Bali. Sampel *swab* selanjutnya diinokulasikan pada telur ayam berembrio melalui ruang alantois, diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C. Setelah 2-3 hari pascainokulasi, cairan alantois dipanen dan dilakukan uji HA/HI. Hasil penelitian menunjukkan tidak ditemukannya *shedding* virus vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali, ditandai dari semua sampel *swab* yang diambil pada periode 1-4 minggu pascavaksinasi menunjukkan hasil negatif pada uji HA.

Kata-kata kunci: *Avian influenza*; ayam petelur; *shedding* virus; vaksin *avian influenza* subtipe H5N1 isolat Bali

#### **ABSTRACT**

*Avian influenza* is an acute viral disease that has spread widely throughout the world. The disease is endemic in Indonesia, because it is classified as a priority strategic infectious disease because it is a dangerous zoonosis that can attack poultry and mammals also human. Poultry that are raised on a mass scale are more susceptible to *avian influenza*, such as layer chickens. It is necessary to make preventive measures that can be done by vaccination. The *avian influenza* virus mutates easily so it is often cannot be recognized by antibodies that are already circulating in the body of poultry. Therefore,

it is necessary to develop vaccines, an example is the avian influenza vaccine subtype H5N1. The aim of this study is to determine whether the *avian influenza* H5N1 Bali isolated vaccine can be used on poultry farms by looking at its ability to suppress virus shedding. This research was conducted by taking 20 cloacal swab samples randomly from 40 layer chickens that had been vaccinated with *avian influenza* subtype H5N1 Bali isolated. Then the cloacal swab were inoculated in the specific pathogen free egg through the allantoic cavity, incubated in an incubator at 37°C. After 2 to 3 days post inoculation, the allantoic fluid is harvested and serological tests are carried out using the HA / HI test. In this study the results showed that virus shedding avian influenza H5N1 Bali isolated was not found in all swab samples taken from the period of 1 to 4 weeks postvaccination showed negative results on the HA test.

Keywords: *Avian influenza*; *avian influenza* H5N1 Bali isolated vaccine; layer chickens; virus shedding

## PENDAHULUAN

Virus influenza terdiri dari beberapa tipe, antara lain tipe A yang menyerang hewan, tetapi dapat menyebabkan epidemik pada manusia, serta tipe B, dan tipe C yang hanya dapat menginfeksi manusia (Soedjono dan Ekowati, 2005). Flu burung disebabkan oleh virus influenza tipe A yang diketahui menyebabkan penyakit viral akut pada unggas. Virus flu burung atau dikenal dengan *avian influenza* (AI) adalah kelompok virus yang sangat heterogen subtipenya dengan berbagai patogenesis pada spesies yang berbeda. Virus ini mempunyai antigen permukaan berupa glikoprotein yang tersusun oleh antigen haemagglutinin (H) dan neuraminidase (N). Terdapat 16 antigen haemagglutinin (H1 sampai H16) dan sembilan antigen neuraminidase (N1 sampai N9). Virus ini terbagi menjadi dua patotipe berdasarkan karakteristik molekuler serta kemampuan virus dalam menimbulkan penyakit dan tingkat mortalitasnya, yaitu *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) yang menyebabkan infeksi parah dan fatal pada unggas dan *low pathogenic avian influenza* (LPAI) (Spickler *et al.*, 2008).

Kebanyakan virus flu burung hanya menginfeksi ternak unggas seperti ayam, kalkun, dan itik, namun disebutkan bahwa virus AI juga dapat menginfeksi ternak ruminansia, terutama babi. Walaupun hampir semua jenis unggas dapat terinfeksi, tetapi unggas yang dternakkan secara masal seperti ayam, puyuh, dan itik lebih rentan terserang oleh virus flu burung (Soejoedono dan Ekowati, 2005). Virus AI dikenal juga sebagai salah satu penyakit zoonosis, dan dikelompokkan dalam kelompok penyakit menular strategis prioritas, karena bersifat zoonosis berbahaya, hal ini karena virus AI dapat membunuh penderitanya baik itu hewan atau manusia yang terinfeksi (Kementan, 2013). Virus flu burung ini pernah mewabah. Sejak 2002, *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) subtype H5N1 telah menyebar dari daerah yang terinfeksi secara endemik di Asia Tenggara ke Eropa dan Afrika (Kalthoff *et al.*, 2008). Wabah flu burung pertama kali terjadi di Indonesia pada tahun 2003 dan awal 2004, karena

penyebarannya terjadi sangat cepat, sehingga virus *avian influenza* menulari hampir seluruh wilayah Indonesia (Dharmayanti dan Indriani, 2004).

Virus *avian influenza* mudah mengalami perubahan, karena virus ini lemah dalam *proof reading mechanism* sehingga mudah mengalami mutasi. Berupa *antigenic drift* dimana strain yang ada tergantikan oleh varian antigenik baru, akibat akumulasi perubahan asam amino dalam genom virus (Webster dan Hulse, 2004). Serta *antigenic shift*, strain virus *avian influenza* memperoleh segmen HA, dan mungkin juga segmen NA, dari virus influenza dengan sub-tipe yang berbeda (Bouvier dan Palese, 2008). Keunikan lain virus influenza ini yaitu dapat melakukan *genetic reassortment* (penyatuan materi genetik) sehingga mampu menembus *species barrier* dan terjadilah penularan antar spesies sehingga sulit untuk diproduksi vaksin yang ideal (Suardana, 2015).

Vaksinasi merupakan salah satu cara pencegahan dan pengendalian penting infeksi flu burung/*avian influenza* pada unggas di samping tindakan pemusnahan unggas yang tertular dalam radius tertentu (*stamping out/preventive culling*) dan biosekuriti (Suartha *et al.*, 2012). Karena sifat uniknya yang mudah mengalami mutasi, hambatan keragaman antigen tersebut secara historis mendorong pengembangan sistem pelacakan virus global dan formulasi vaksin tahunan untuk memastikan pencocokan vaksin/virus (Kim *et al.*, 2018). Salah satu syarat untuk memastikan bahwa vaksin tersebut aman digunakan secara komersial dan dapat melindungi unggas dari infeksi flu burung yaitu dengan melihat apakah vaksin tersebut tidak menimbulkan *shedding* virus, yaitu pelepasan virus hasil replikasi dalam sel inang, yang dapat diketahui salah satunya dengan melakukan *swab* kloaka lalu isolasi virus pada media. Untuk memperbanyak virus AI dibutuhkan media yang peka terhadap pertumbuhan virus tersebut, salah satu media yang cocok dan paling sering digunakan untuk memperbanyak virus AI adalah telur ayam berembrio berumur 9-10 hari (Kencana *et al.*, 2014). Identifikasi virus AI-H5N1 dapat diuji hemaglutinasi, uji hambatan hemaglutinasi, dan RT-PCR.

Penelitian ini merupakan uji lapang dari vaksin AI-H5N1 isolat asal Bali yang merupakan clade 2.3.2 dan memiliki kekerabatan 96,72% dengan *seed* vaksin Pemerintah Indonesia A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 dengan kandungan virus  $10^{6,9}$  ELD50 (Kencana *et al.*, 2020). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui keamanan vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali berdasarkan atas ada atau tidaknya *shedding* virus vaksin dari sampel *swab* kloaka ayam petelur pascavaksinasi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini digunakan 100 sampel *swab* kloaka dari 20 ekor ayam petelur Novogen Brown produksi PT. Wonokoyo Jaya Corporindo, Surabaya yang diambil acak dari 40 ekor ayam petelur yang diberikan vaksin inaktif AI subtype H5N1 isolat Bali pada saat berumur lima minggu. Aplikasi vaksin secara intra muskuler melalui otot dada sebanyak 0,5 mL per ekor. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) pola berjenjang yang diambil secara periodik sebanyak lima kali yakni satu kali pravaksinasi dan empat kali setiap minggu pascavaksinasi. Sampel *swab* kloaka diambil dengan menggunakan kapas steril bertangkai dan dicelupkan kedalam tabung *ependorf* yang berisi *transport medium* M199, streptomycin, dan penisilin. tabung *ependorf* kemudian dimasukkan ke dalam *cool box* yang berisi *ice pack*. Sebelum diinokulasikan, sampel *swab* kloaka kemudian digabungkan menjadi empat *pooling*, kemudian sampel tersebut diencerkan dengan PBS yang mengandung antibiotik penisilin dan streptomisin dengan dosis masing-masing 1000-5000 IU/mL dan 1000-5000 µg/mL. Suspensi tersebut selanjutnya dieramkan pada suhu 37°C selama kurang lebih 30 menit.

Sampel 20 *swab* kloaka yang diambil setiap minggu di-*pooling* menjadi empat *pool*, setiap *pool* diinokulasikan kedalam dua butir telur ayam berembrio berumur 9-10 hari. Sebelum digunakan telur ayam berembrio dilakukan *candling* untuk melihat infertilitas embrio apakah dalam keadaan mati atau sehat. Jalur inokulasi yang digunakan adalah melalui ruang alantois.

Cara inokulasi suspensi *swab* kloaka melalui ruang alantois yaitu dengan cara dibuat lubang pada cangkang telur yang posisinya di atas garis batas antara kantong udara dengan daerah embrionya. Inokulasi suspensi *swab* kloaka dengan menyuntikkan inokulum menggunakan *disposable syringe* 1 mL langsung ke ruang alantois sebanyak 0,1-0,2 mL/butir telur. Lubang pada cangkang telur ditutup dengan menggunakan kuteks. Telur yang sudah diinokulasi suspensi *swab* kloaka diinkubasikan pada suhu antara 36-37°C selama 1-3 hari, serta diamati kondisi telur dengan cara *candling* setiap hari. Telur yang telah mati dikeluarkan dari inkubator kemudian disimpan pada lemari pendingin sedangkan telur yang masih hidup sampai hari ke-3 dimatikan dengan cara dimasukkan ke dalam lemari pendingin (Ulum *et al.*, 2013). Telur ayam berembrio yang mati dalam jangka waktu kurang dari 24 jam atau kondisi busuk tidak digunakan untuk pemeriksaan lanjutan, karena dianggap terkontaminasi bakteri.

Panen cairan allantois dilakukan dengan cara sebagai berikut: telur yang embrionya sudah mati dikeluarkan dari inkubator lalu dimasukkan ke lemari pendingin selama beberapa

jam. Selanjutnya cangkang telur dibuka dengan cara dipotong menggunakan gunting pada daerah kantong udara. Cairan alantois diisap menggunakan pipet dan ditampung pada tabung *ependorf* dan disimpan ke dalam *freezer* (Mahardika *et al.*, 2018).

Suspensi eritrosit 1% pada uji HA/HI dibuat sesuai prosedur OIE (2012) yang telah dimodifikasi dengan teknik sebagai berikut: sebanyak 2,5 mL darah ayam diambil melalui vena brachialis dengan menggunakan *disposable syringe* volume 3 mL. Darah ayam selanjutnya ditampung pada tabung steril yang telah diisi antikoagulan alselver sebanyak 2,5 mL. Sel darah merah ayam dibilas dengan cara ditambahkan 5 mL PBS pH 7,2 ke dalam tabung yang berisi larutan darah, selanjutnya dicampur secara perlahan-lahan agar sel darah merah tidak rusak. Sampel darah kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Selanjutnya darah dipisahkan dari *buffy coat* dan supernatan, sehingga yang tinggal dalam tabung hanya endapan sel darah merah. Proses selanjutnya dilakukan pembilasan kembali sel darah merah dengan cara ditambahkan PBS sampai 2/3 tabung lalu dihomogenkan. Proses pembilasan darah diulang kembali dengan cara yang sama sebanyak tiga kali. Endapan sel darah merah kemudian diukur konsentrasinya dengan cara disentrifugasi menggunakan mikrohematokrit. Sel darah merah diukur *Paked Cell Volume* (PCV) lalu diencerkan dengan PBS menjadi konsentrasi 1% dan siap digunakan untuk uji HA/HI (Kencana *et al.*, 2016).

Pada uji HA digunakan kontrol positif antigen AI-H5N1 isolat Bali dan kontrol negatif berupa kontrol perlakuan cairan alantois dari telur ayam berembrio yang tidak diinokulasi. Sebelum dilakukan uji hemaglutinasi teknik mikrotiter, terlebih dahulu dilakukan uji hemaglutinasi cepat, dengan cara cairan alantois dan suspensi sel darah merah diambil dengan pipet Pasteur masing-masing sebanyak satu tetes lalu dimasukkan ke dalam sumuran *microplate* lalu aduk beberapa saat hingga tercampur merata. Reaksi dinyatakan positif jika ditandai dengan adanya aglutinasi sel darah merah pada dasar *plate*. Cairan alantois yang menunjukkan reaksi positif selanjutnya digunakan untuk uji HA secara mikrotiter untuk mengetahui titer isolat (Ulum *et al.*, 2013).

Pengujian hemaglutinasi sel darah merah mengikuti metode standar dari *Office international des Epizootic* (OIE., 2012). Uji HA dilakukan dengan menggunakan *microplate bottom U*. Reagen yang diperlukan antara lain larutan PBS, antigen AI (H5N1), dan suspensi sel darah merah unggas 1%. Larutan PBS dimasukkan ke dalam sumur-sumur *microplate* sebanyak 25  $\mu$ L, ditambahkan 25  $\mu$ L suspensi antigen ke dalam sumur pertama dan kedua *microplate* dan dilakukan pengenceran seri dari sumur ke-2 sampai sumur ke-11. Larutan PBS ditambahkan 25  $\mu$ L pada setiap sumur, kemudian ditambahkan 5  $\mu$ L RBC 1% ke dalam setiap

sumur. Komponen-komponen tersebut dicampur pada *microplate* dan diinkubasikan selama 30 menit pada suhu kamar. Hasil penilaian jika kontrol (sumuran nomor 12) sudah terjadi endapan sel darah merah. Hemaglutinasi menunjukkan ada antigen virus dengan konsentrasi yang cukup untuk menggaglutinasi sel darah merah. Titer antigen ditentukan pada pengenceran tertinggi dari antigen yang masih mampu menggaglutinasi sel darah merah ayam secara komplit.

Uji hambatan hemaglutinasi merupakan pengujian serologis berupa hambatan antibodi spesifik terhadap aktivitas hemaglutinasi antigen virus AI. Titer antibodi ditentukan berdasarkan atas hambatan pada pengenceran tertinggi yang masih mampu mengikat antigen (pada konsentrasi 4 HAU) dan menghambat aglutinasi sel darah merah (Janovie *et al.*, 2014).

Uji hambatan hemaglutinasi dilakukan menggunakan antigen virus inaktif AI-H5N1 pada titer 4 HAU sebanyak 25 µL dan sel darah merah 1%. Sumuran ke-1 sampai ke-12 dari *microplate* diisi dengan PBS masing-masing sebanyak 25 µL. Ditambahkan 25 µL sampel serum pada sumuran pertama dan kedua, kemudian dilakukan pengenceran bertingkat kelipatan dua dari sumuran ke-2 sampai sumuran ke-10, pada sumuran ke-10 suspensi dibuang sebanyak 25 µl. Kemudian ditambahkan 25 µl virus standar (4 HAU) pada semua sumuran, kecuali sumuran ke-12 yang hanya diisi 25 µl PBS. Setelah dicampur sampai homogen menggunakan *mikroshaker* selama 30 detik, kemudian *microplate* diinkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit. Suspensi sel eritrosit 1% ditambahkan sebanyak 25 µl kedalam setiap sumuran *microplate* yang berisi suspensi yang diuji, lalu diayak kembali menggunakan *mikroshaker* selama 30 detik. *Microplate* selanjutnya diinkubasikan kembali pada suhu ruangan selama 60 menit dengan selalu diamati setiap 15 menit. Sampel dinyatakan positif apabila sel darah merah mengendap pada dasar sumuran *microplate*. Perhitungan titer HI didapat berdasarkan pengenceran tertinggi serum yang berhasil menetralkan virus yang ditandai dengan pengendapan sel darah merah (Frisa dan Elfidasari, 2018).

Isolasi RNA virus dilakukan jika sampel hasil panen cairan alantois hasil inokulasi sampel *swab* kloaka dan menunjukkan hasil positif pada uji HA/HI. Selanjutnya sampel RNA diisolasi dengan metode Trizol. Sebanyak 0,25 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung endorf lalu ditambahkan 0,75 mL Trizol LS. Setelah diinkubasikan pada suhu ruang (15-30°C) selama lima menit, ditambahkan 0,2 mL kloroform ke dalam campuran. Suspensi spesimen, trizol, dan kloroform dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 *relative centrifuge force* (RCF) selama 15 menit. Bagian *aquaeus* diambil dan dimasukkan ke dalam tabung steril. Lalu

tambahkan isopropil alkohol sebanyak 0,5 mL dan diinkubasikan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 RCF selama lima menit, supernatan dibuang dan ditambahkan kembali alkohol 70% sebanyak 1 mL. Setelah divorteks dengan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 7.500 RCF selama lima menit, supernatan dibuang, sedangkan peletnya dikeringkan, dan disuspensi kembali dengan *diethylpirocarbonate* (DEPC)-*treated water*.

Amplifikasi RT-PCR dilakukan dengan *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Siklus RT-PCR dilakukan pada suhu 50°C selama satu jam, 95°C selama 45 detik, 52°C selama 45 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 90 detik disebut satu siklus. Siklus pertama diulang kembali sebanyak 44 kali. Penyempurnaan kerja enzim dilakukan pada suhu 72°C selama lima menit untuk memperoleh fragmen sempurna.

Pengamatan hasil RT-PCR dilanjutkan dengan mengambil 10% dari produk RT-PCR yang kemudian ditambahkan *loading dye* (*Bromphenol-blue* dan *Cyline Cyanol*) sebanyak 1 µL, dan selanjutnya dielektroforesis pada gel konsentrasi 1% (1 g agarose dalam 100 mL *tris acetic* EDTA) kemudian ditambahkan sebanyak 2,5 µL *etidium bromide* bersama 100-bp *ladder* (Invitrogen) sebagai *marker*. *Transluminator ultraviolet* (UV) digunakan untuk visualisasi DNA, dan hasilnya didokumentasikan dengan kamera (Kencana *et al.*, 2012). Data hasil uji HA dan HI dianalisis dengan uji sidik ragam dan apabila terdapat perbedaan yang signifikan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan serta analisis regresi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji dari 100 sampel *swab* kloaka ayam petelur pravaksinasi dan pascavaksinasi dengan vaksin inaktif *Avian Influenza* sub tipe H5N1 isolat asal Bali pada peternakan komersial di Desa Perean, Kabupaten Tabanan tidak menunjukkan adanya *shedding* virus. Hasil uji dinyatakan negatif pada pengujian hemaglutinasi cairan alantois dari sampel *swab* kloaka yang diisolasi pada telur ayam berembrio umur 10 hari. Waktu panen cairan alantois beragam tergantung kematian embrio yang dapat diketahui dengan metode *candling* yaitu antara 2-3 hari pascainokulasi. Hasil uji hemaglutinasi (HA) dimuat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil hemaglutinasi (HA) *swab* kloaka pada ayam petelur.

Periode Pengambilan	Jumlah Sampel	Uji Hemaglutinasi
Pravaksinasi	20	Negatif
Pascavaksinasi 1	20	Negatif
Pascavaksinasi 2	20	Negatif
Pascavaksinasi 3	20	Negatif
Pascavaksinasi 4	20	Negatif

Berdasarkan Tabel 1, dari 100 sampel *swab* kloaka yang diambil periode pravaksinasi dan pascavaksinasi: periode satu minggu, dua minggu, tiga minggu, dan empat minggu pascavaksinasi tidak ditemukan adanya *shedding* virus. Hal tersebut dibuktikan karena pada pengujian hemaglutinasi (HA) menunjukkan bahwa seluruh sampel yang diuji mempunyai nilai titer  $2^0$  atau negatif yang berarti tidak ada reaksi aglutinasi antara antigen dan sel darah merah. Pada sampel kontrol perlakuan menggunakan telur ayam berembrio yang tidak diinokulasi *swab* kloaka juga menunjukkan hasil negatif uji HA. Karena uji HA sampel *swab* kloaka hasilnya semua negatif maka pengujian sampel tidak dilanjutkan lagi dengan uji serologis hambatan hemaglutinasi (HI) maupun uji molekuler dengan RT-PCR.

Vaksinasi merupakan tindakan pencegahan terhadap penyebaran virus AI. Meskipun begitu masih dijumpai kasus AI pada unggas, yang dikhawatirkan akibat terjadinya pergeseran sub tipe virus AI pada unggas yang beredar di peternakan di Bali, yang dapat menyebabkan kegagalan vaksinasi menggunakan vaksin AI sub tipe H5N1 (Kencana *et al.*, 2020).

Menurut Offlu (2013) dan OIE (2007) vaksin berkualitas tinggi yang sesuai dengan standar OIE yaitu memiliki kandungan antigen yang sama dengan kondisi virus AI yang bersirkulasi di lapangan, supaya dapat menurunkan peluang infeksi, meningkatkan resistansi, dan mengurangi *shedding* virus.

Vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali yang diuji lapang ini merupakan vaksin baru dibuat dan dalam dalam taraf penelitian (Kencana *et al.*, 2020). Oleh karena itu perlu dilakukan uji keamanan tentang vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali yang aplikasinya dilakukan pada peternakan ayam petelur di Bali. Keberhasilan vaksinasi *Avian Influenza* bergantung pada tingkat kecocokan antara strain virus AI lapangan dengan vaksin yang digunakan (Kencana *et al.*, 2014). Oleh karena itu sebaiknya penggunaan biang/*seed* vaksin memiliki homologi genetik dan antigenik yang homolog dengan virus yang beredar di wilayah bersangkutan, karena penggunaan biang/*seed* vaksin yang tidak sesuai dapat menurunkan protektivitas vaksin, serta dapat mengakibatkan tingginya beban virus (*virus burden*) pada lingkungan (Mahardika *et al.*, 2009).

Peneliti terdahulu menyebutkan bahwa perubahan yang terjadi akibat infeksi virus yang dipropagasi pada ruang alantois telur ayam berembrio diantaranya berupa kematian embrio, hiperemi, hemoragi, edema, embrio kerdil, pembengkakan dan pembentukan *pock* pada membran alantois, serta pada cairan alantoisnya ditemukan replikasi virus yang dapat dideteksi melalui aktivitas hemaglutinin dengan uji hemaglutinasi (Qosimah *et al.*, 2017). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa propagasi sampel *swab* kloaka pada telur ayam berembrio berumur 10 hari melalui ruang alantois tidak menunjukkan adanya kematian embrio akibat virus AI-H5N1

Berdasarkan hasil uji terhadap 100 sampel *swab* kloaka yang dipropagasi pada telur ayam berembrio umur 10 hari, cairan alantoisnya diuji HA, didapatkan hasil bahwa seluruh sampel negatif virus *Avian Influenza*. Seluruh sampel *swab* yang deteksi virus *Avian Influenza* H5N1 dinyatakan negatif atau tidak ada tumbuhan virus pada telur ayam berembrio. Hasil uji HA sampel cairan alantois terdeteksi tidak memiliki aktivitas aglutinasi sel darah merah unggas 1%. Hal ini menandakan bahwa pada cairan alantois hasil panen tidak mengandung virus AI-H5N1 dengan protein permukaan hemaglutinin (HA) yang seharusnya dapat mengikat sel darah merah unggas 1% (Rachmawati *et al.*, 2020). Karena seluruh sampel menunjukkan hasil negatif, sehingga tidak dilanjutkan dengan uji *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Syarat vaksin *Avian Influenza* H5N1 yang baik yaitu mampu memberikan proteksi sekurang-kurangnya 90%, serta mampu mengurangi dan menghentikan *shedding* virus pada hari ke-8 (Indriani *et al.*, 2014). Dengan demikian vaksin AI inaktif subtype H5N1 isolat dari Bali ini dapat dinyatakan aman digunakan karena tidak ditemukan *shedding* virus pascavaksinasi. Maka dapat dikatakan bahwa biang/*seed* vaksin yang digunakan sudah terinaktivasi sempurna.

Tindakan vaksinasi AI selain bertujuan untuk memberikan proteksi individu pada unggas atau kelompok terhadap infeksi baru, tetapi juga untuk mengurangi *shedding* virus yang dapat menginfeksi, sehingga dapat mengurangi kontaminasi virus di lingkungan dari hewan sakit atau menjadi karier virus AI (Indriani *et al.*, 2005). Tindakan vaksinasi yang tepat, dapat menimbulkan reaksi antibodi yang sesuai sehingga mampu mencegah terjadinya *shedding* virus (Rachmawati *et al.*, 2020).

Tidak ditemukan adanya *shedding* virus maka tidak membahayakan bagi lingkungan, karena *shedding* virus merupakan salah satu bentuk transmisi cemaran virus AI ke lingkungan (Dharmayanti *et al.*, 2016). Walaupun unggas tampak sehat pascavaksinasi, namun apabila masih mampu mengeluarkan virus, hal ini dapat menjadi faktor risiko terjadinya penyebaran

virus *Avian Influenza* dari unggas ke unggas lain, sehingga dapat memungkinkan terjadinya penularan atau wabah dari unggas ke manusia (Dharmayanti *et al.*, 2016). Virus *Avian Influenza* mampu bersifat infeksiif dalam feses selama 30-35 hari pada suhu 4°C dan selama tujuh hari pada suhu 20°C. Sifat tersebut memungkinkan terjadinya penyebaran virus *Avian Influenza* di lingkungan akibat penularan tidak langsung melalui udara, material ataupun debu yang sudah mengandung virus *Avian Influenza* (Hewajuli dan Dharmayanti, 2008).

### **SIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa tidak ditemukan adanya *shedding* virus vaksin *Avian Influenza* sub tipe H5N1 isolat dari Bali pada *swab* kloaka ayam petelur pascavaksinasi. Berdasarkan hal tersebut, vaksin inaktif *Avian Influenza* sub tipe H5N1 isolat dari Bali memiliki keamanan yang baik.

### **SARAN**

Hasil penelitian vaksinasi dengan *Avian Influenza* sub tipe H5N1 isolat Bali memiliki keamanan yang baik, meskipun demikian tindakan biosekuriti, kebersihan dan sanitasi kandang tetap harus dijaga dengan baik dan konsisten untuk menghindari kemungkinan terjadinya kontaminasi dan penularan dalam lingkungan kandang.

### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Penelitian ini merupakan Hibah Invensi Udayana 2021 dengan nomor kontrak B/96-62/UN14.4.A/PT.01.05/2021. Penulis mengucapkan terima kasih utamanya kepada mitra industri PT. Sanbio Laboratories di Bogor, peternakan ayam petelur komersial Tubagus Oky Farm di Perean, Baturiti, Tabanan. Terimakasih kepada Laboratorium Virologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana atas fasilitas risetnya.

### **DAFTAR PUSTAKA**

- Bouvier NM, Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26: D49–D53.
- Dharmayanti NLPI, Damayanti R, Wiyono A, Indriani R, Darminto. 2004. Identifikasi virus *Avian influenza* isolat indonesia dengan reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9: 136-142
- Dharmayanti NI, Indriani R. 2016. Efikasi Vaksin Inaktif Bivalen Avian Influenza Virus Sub tipe H5N1 (Clade 2.1. 3. dan Clade 2.3. 2) di Indonesia. *Jurnal Biologi Indonesia* 11(2): 169-176.
- Frisa A, Elfidasari D. 2018. Seroprevelensi Virus *Avian Influenza* Sub tipe H5N1 pada Unggas Domestik Peliharaan Masyarakat di Kawasan Cagar Alam Pulau Dua Serang Provinsi Banten. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi* 4(2): 74-82.

- Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI. 2008. Karakterisasi dan identifikasi virus *Avian Influenza* (AI). *Wartazoa* 18(2): 86-100.
- Indriani R, Dharmayanti NLPI, Parede L, Adjid RMA. 2014. Kajian Vaksinasi *Avian Influenza* Subtipe H5N1 pada Burung Puter (*Streptopelia bitorquata*) dan Merpati (*Columba livia*). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 19(3): 812-816.
- Indriani R, Dharmayanti NLPI, Syafriati T, Wiyono A, Adjid RMA. 2005. Pengembangan Prototipe Vaksin Inaktif *Avian Influenza* (AI) H5N1 Isolat Lokal dan Aplikasinya pada Hewan Coba di Tingkat Laboratorium. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 10(4): 315-321.
- Janovie A, Rusdi R, Supiyani A. 2014. Uji efektivitas vaksin flu burung subtipe H5N1 pada ayam kampung di Legok, Tangerang, Banten. *Bioma* 10(2): 35-40.
- Kalthoff D, Breithaupt A, Teifke JP, Globig A, Harder T, Mettenleiter TC, Beer M. 2008. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in experimentally infected adult mute swans. *Emerging Infectious Diseases* 14(8): 1267-1271.
- [Kementan] Kementerian Pertanian. 2013. Keputusan Menteri Pertanian No.4026/Kpts/OT.140/4/2013. Tentang Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis, Jakarta. [www.keswan.ditjen.pertanian.go.id](http://www.keswan.ditjen.pertanian.go.id). Diakses tgl 2 Mei 2016.
- Kencana GAY, Kardena IM, Mahardika IGNK. 2012. Peneguhan diagnosis penyakit Newcastle Disease lapang pada ayam buras di Bali menggunakan teknik RT-PCR. *Jurnal Kedokteran Hewan* 6(1): 28-31.
- 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
- Kencana GAY, Suartha IN, Nurhandayani A, Ramadhan M. 2014. Kepekaan telur *specific pathogen free* dan *clean egg* terhadap virus flu burung. *Jurnal Veteriner* 15(1): 87-93.
- Kencana GAY, Suartha IN, Paramita NMAS, Handayani AN. 2016. Vaksin Kombinasi Newcastle Disease dengan *Avian Influenza* Memicu Imunitas Protektif pada Ayam Petelur terhadap Penyakit Tetelo dan Flu Burung. *Jurnal Veteriner* 17(2): 257-264.
- Kim H, Webster RG, Webby RJ. 2018. *Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen*. *Viral Immunology* 31(2): 174-183.
- Mahardika IGNK, Astawa INM, Kencana GAY, Suardana IBK, Sari TK. 2018. *Teknik Lab Virus*. Denpasar. Udayana University Press. Hlm. 34-35.
- Mahardika IGNK, Suartha IN, Suardana IBK, Kencana IGAY, Wibawan IWT. 2009. Perbandingan sekuens konsensus gen hemaglutinin virus *avian influenza* subtipe H5N1 asal unggas di indonesia dengan subtipe H5N2 dan H5N9. *Jurnal Veteriner* 10(1): 12-16.
- [Offlu] Joint OIE-FAO Global Network of Expertise on Animal Influenzas. Developing guidance on vaccines and vaccination against HPAI from lessons learned. 4 to 6 December 2013 in Beijing, China. OFFLU technical meeting. [http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/meetingreports/pdf/OFFLU\\_Beijing\\_2013/OFFLU\\_Recommendations\\_Beijing\\_Dec\\_2013\\_final.pdf](http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/meetingreports/pdf/OFFLU_Beijing_2013/OFFLU_Recommendations_Beijing_Dec_2013_final.pdf). [03 Mei 2018].
- OIE/FAO/IZS/VE Scientific Conference, coorganised and supported by European Union Vaccination: a tool for the control of avian influenza, Verona (Italy), 20-22 March 2007. <https://www.oie.int/doc/ged/D4410.PDF>. [3 Juni 2017].
- [OIE] Office International Des Epizooties. 2012. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal Chapter. Chapter 2.3.14. Newcastle Disease. Hlm. 1-9. [www.oie.int](http://www.oie.int). Diakses tgl 2 Mei 2016.

- Qosimah D, Murwani S, Amalia I. 2017. *Penyakit Viral pada Unggas*. Malang. Universitas Brawijaya Press. Hlm.11-12.
- Rachmawati PD, Adikara TS, Plumeriastuti H, Ernawati R, Rahmahani J, Handijatno D, Nugroho CMH. 2020. Analisis Filogenetik Gen Hemagglutinin dan Neuraminidase *Avian Influenza* H9N2 Asal Ayam Petelur di Jawa Timur. *Jurnal Veteriner* 21(2): 216-226.
- Soejoedono RD, Ekowati H. 2005. *Flu burung*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Spickler AR, Trampel DW, Roth JA. 2008. The onset of virus *shedding* and clinical signs in chickens infected with high-pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Pathology* 37(6): 555-577.
- Suardana IW. 2015. *Buku Ajar Zoonosis: Penyakit Menular dari Hewan ke Manusia*. Yogyakarta. PT Kanisius. Hlm. 255-256.
- Suartha IN, Wirata IW, Putra IGNN, Dewi NMRK, Anthara IMS, Wibawan IWT, Mahardika IGK. 2012. Vaksin Polivalen untuk Mencegah Penyakit Flu Burung. *Jurnal Veteriner* 13(2): 13-117.
- Ulum F, Susanti R, Bintari SH. 2013. Isolasi dan Identifikasi Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 pada Unggas di Pasar Tradisional Semarang. *Biosaintifika: Journal of Biology and Biology Education* 5(2): 130-137.
- Webster RG, Hulse DJ. 2004. Microbial adaptation and change: avian influenza. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 23(2): 453-466.