

## Karakterisasi Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 Isolat Lapang Asal Bali Untuk Kandidat Vaksin

(ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1  
SUBTYPE FIELD ISOLATES FROM BALI FOR VACCINE CANDIDATES)

Gusti Ayu Yuniati Kencana<sup>1\*</sup>, I Nyoman Suartha<sup>2</sup>,  
I Made Kardena<sup>3</sup>, Arini Nurhandayani<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Veteriner

<sup>3</sup>Laboratorium Patologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

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

<sup>4</sup>PT Sanbio Laboratories

Desa Wanaherang, Gunung Putri, Bogor, Jawa Barat

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

### ABSTRACT

A research on the isolation and characterization of the Avian Influenza H5N1 subtype field isolate has been carried out at the BSL-3 Laboratory of PT Sanbio Laboratories, Bogor. The aim of the study was to prepare a candidate for the H5N1 subtype Avian Influenza virus vaccine. Virus isolates were taken from field isolates from Bali. A total of seven field H5N1 AI subtypes from Bali were characterized in Bogor. The isolates were: isolate 3A, isolate 4A, isolate 9C, isolate 10 A, isolate 10 C, isolate P65, isolate P67. The passage of isolates was carried out on 9-day-old embryonic Specific Pathogenic (SPF) chicken eggs by injecting 0.1 mL of SPF isolates/eggs through the allantoic cavity. Each isolate was placed in five SPF eggs and then incubated in an incubator at 37 C and candled every day. Since day 2-4 post inoculation, embryo death has occurred. The eggs are harvested by their allantoic fluid and tested for haemagglutination test(HA/HI). The HI test results were confirmed by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using the front primer FPHA232\_13 (ATTGGTTAYCATGCAAAYAACTCG) and the back primer BPHA232\_597 (GGAAAYATAGGTRGTTGGRTTYTGATAG) The results were five of the seven isolates were positive AI subtype B5 585 - 581 The five isolates of AI subtype H5N1 were subsequently sequenced, the results were all positive for AI virus subtype H5N1 clade 2.3.2. Each field isolate was given the name A / Chicken / Bali3A / GAY / 2019; A / Chicken / Bali9C / GAY / 2019; A / Chicken / BaliA4 / GAY / 2019; A / Chicken / Bali10A / GAY / 2016 and A / Chicken / Bali10C / GAY / 2019. One A / Chicken / Bali 9C / GAY / 2016 isolate was subsequently repeated 7 times until a stable H5N1 subtype AI virus titer was obtained. The results of matching with bioinformatics turned out that A / Chicken / Bali 9C / GAY / 2016 isolates had a kinship of 98.62% with AI subtype H5N1 Banyuwangi, amounting to 98.45% with AI subtype H5N1 Lamongan, amounting to 98.10% with AI-H5N1 Lumajang, 97.58% with AI-H5N1 Kediri, 97.07% with AI-H5N1 Blitar, 96.72% with AI-H5N1 Denpasar, 96.72% with AI-H5N1 Buleleng and 96.72% with AI-H5N1 Sukoharjo. The conclusion is one of isolate namely A / Chicken / Bali 9C / GAY / 2019 including AI subtype H5N1 clade 2.3.2, is't stable at passage on SPF eggs, has a kinship of 96.72% with A / duck / Sukoharjo / BBVW-1428- 9/2012, the virus content is 10<sup>6.9</sup> ELD<sub>50</sub> so it is potential for vaccine candidates

Keywords: Avian Influenza virus, H5N1, chicken, field isolates from Bali, characterization

### ABSTRAK

Penelitian tentang isolasi dan karakterisasi virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 isolat lapang telah dilakukan di Laboratorium BSL-3 PT Sanbio Laboratories, Bogor. Tujuan penelitian adalah untuk menyiapkan kandidat vaksin virus Avian Influenza subtipe H5N1. Isolat virus diambil dari isolat lapang asal Bali. Sebanyak tujuh isolat AI subtipe H5N1 lapang asal Bali dikarakterisasi di Bogor. Isolat-isolat tersebut adalah: isolat 3A, isolat 4A, isolat 9C, isolat 10 A, isolat 10 C, isolat P65, isolat P67.

Pasase isolat dilakukan pada telur ayam Specific pathogen free (SPF) berembrio umur 9 hari dengan menyuntikkan masing-masing 0,1 mL isolat/ butir telur SPF melalui ruang alantois. Masing-masing isolat dipasase pada telur lima SPF lalu diinkubasi pada inkubator bersuhu 37 C dan di-*candling* setiap hari. Sejak hari 2-4 post inokulasi terjadi kematian embrio. Telur dipanen cairan alantoisnya dan diuji hemaglutinasi (HA/HI). Hasil uji HI dikonfirmasi dengan *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan primer depan FPHA232\_13 (ATTGGTTAYCATGCAAAYAACTCG) dan primer belakang BPHA232\_597 (GGAAAYATAGGTRGTTGGRTTYTGATAG) Hasilnya lima dari tujuh isolat tersebut positif AI sub tipe H5N1 dengan panjang basa 585-600 bp. Kelima isolate AI sub tipe H5N1 selanjutnya disekuensing, hasilnya semuanya positif virus AI sub tipe H5N1 clade 2.3.2. Isolat lapang masing-masing diberi nama A/Chicken/Bali3A/GAY/2019; A/Chicken/Bali9C/GAY/2019; A/Chicken/BaliA4/GAY/2019; A/Chicken/Bali10A/GAY/2016 dan A/Chicken/Bali10C/GAY/2019. Salah satu isolat A/Chicken/Bali 9C/GAY/2016 selanjutnya dipasase sebanyak 7 kali sampai diperoleh titer virus AI sub tipe H5N1 yang stabil. Hasil penyepadanan dengan bioinformatika ternyata isolat A/Chicken/Bali 9C/GAY/2016 memiliki kekerabatan 98,62% dengan AI sub tipe H5N1 Banyuwangi, sebesar 98,45% dengan AI sub tipe H5N1 Lamongan, sebesar 98,10% dengan AI-H5N1 Lumajang, sebesar 97,58% dengan AI-H5N1 Kediri, sebesar 97,07% dengan AI-H5N1 Blitar, sebesar 96,72% dengan AI-H5N1 Denpasar, sebesar 96,72% dengan AI-H5N1 Buleleng dan sebesar 96,72% dengan AI-H5N1 Sukoharjo. Kesimpulannya adalah satu isolat yakni A/Chicken/Bali 9C/GAY/2019 termasuk AI sub tipe H5N1 clade 2.3.2, bersifat stabil tujuh kali pasase pada telur SPF, memiliki kekerabatan 96,72% dengan A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012, kandungan virus nya  $10^{6,9}$  ELD50 sehingga berpotensi untuk kandidat vaksin.

Kata-kata kunci: virus Avian Influenza, H5N1, ayam, isolat lapang asal Bali, karakterisasi

## PENDAHULUAN

Penyakit *Avian Influenza* (AI) mengakibatkan kerugian ekonomi yang tinggi pada peternakan unggas karena sangat menular, menyebar dengan cepat disertai dengan kematian yang tinggi pada populasi unggas sehingga dikelompokkan ke dalam penyakit menular strategis (Kementan.,2013). Berdasarkan atas keganasannya virus AI dikelompokkan menjadi dua kelompok yakni virus AI yang ganas (*Highly Pathogenic Avian Influenza*=HPAI) dan virus AI yang kurang ganas (*Low Pathogenic Avian Influenza*=LPAI).

Virus AI sub tipe H5N1 adalah virus yang ganas dan bersifat zoonosis. Keganasan virus dapat diketahui berdasarkan atas hasil uji filogenetik dan karakterisasi isolat (Cattoli *et al.*, 2009). Penelitian yang berkelanjutan tentang infeksi virus AI sub tipe H5N1 penting dilakukan karena virusnya mudah bermutasi.

Abdel-Moneim *et al.*, (2010) mengatakan bahwa dengan ditemukannya virus AI pada keledai menandakan bahwa virus AI memiliki kisaran hospes yang luas (unggas dan mamalia). Hal ini berimplikasi terhadap epidemiologi virus dan perlunya dilakukan pengawasan yang sistematis terhadap AI-H5N1 pada hewan yang berada disekitar halaman belakang (*backyard farming*) terutama untuk daerah endemis.

Pencegahan terhadap penyakit Avian Influenza baik pada manusia maupun unggas dilakukan dengan vaksinasi dan hasil vaksinasi

selalu dimonitoring serta dilakukan dengan pendekatan *one health* (Kayali *et al.*, 2016). Kegagalan vaksinasi pada unggas dapat berpengaruh terhadap berkembangnya penyakit AI ganas yang dapat menulari manusia. Diagnosis laboratorium sangat penting dilakukan dalam penanggulangan dan pemberantasan penyakit AI meliputi isolasi dan identifikasi virus.

Di Indonesia, penyakit AI sub tipe H5N1 pada manusia dikenal juga dengan nama Flu burung. Kejadian Luar Biasa (KLB) kasus Flu burung di Indonesia tahun 2003-2006 terjadi pula di Kabupaten Tabanan, Bali. Kabupaten Tabanan merupakan salah satu sentra industri peternakan ayam di Bali. Kasus Flu burung juga pernah di laporkan di Kabupaten Tabanan pada saat terjadi KLB Flu burung di Indonesia tahun 2003-2006. Penyebaran virus AI terjadi secara kontak langsung maupun tidak langsung melalui cemaran dari sekreta maupun eksreta unggas terinfeksi baik itu berupa feses maupun lewat lendir dari unggas sakit.

Pemerintah telah melakukan pencegahan dengan membuat vaksin AI sub tipe H5N1 disamping juga melakukan program vaksinasi secara rutin pada unggas baik itu pada peternakan skala industri maupun peternakan rakyat. Meskipun vaksinasi sudah rutin dilakukan namun kasus AI pada unggas masih ditemukan. Dikhawatirkan penyebabnya adalah karena terjadi pergeseran sub tipe virus AI yang beredar di peternakan ayam di Bali sehingga berdampak pada kegagalan vaksinasi menggunakan vaksin

AI subtype H5N1. Selain karena faktor antigen vaksin, kegagalan vaksinasi dapat pula disebabkan karena kekebalan yang dimiliki ayam tidak protektif (titer antibodi < 2<sup>4</sup> HI unit).

Pada ayam yang sakit dengan gejala klinis AI, deteksi virus dilakukan dengan cara isolasi swab kloaka dan swab trakea atau dari sampel organ hewan sakit yang denekropsi. Isolasi virus dapat dilakukan pada telur ayam bertunas umur 9-10 hari. Identifikasi virus secara serologi dengan uji hemaglutinasi (HA/HI) dan konfirmasi dengan uji molekular *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untuk mengetahui munculnya virus AI *clade* baru karena virus AI mudah mengalami mutasi (Cattoli *et al.*, 2009). Untuk memilih *seed* vaksin AI perlu dilakukan karakterisasi dan sekuensing guna mengetahui hubungan kekerabatan dan homologi virus isolat lapang dengan virus vaksin yang digunakan di Indonesia.

Tujuan penelitian untuk mengetahui sifat karakteristik isolat virus AI subtype H5N1 lapang asal Bali yang telah berhasil diisolasi dari swab kloaka, swab trakea maupun ayam sakit dari Kabupaten Tabanan, Bali untuk dipilih menjadi *seed* vaksin.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Lab BSL-3 milik Perusahaan Vaksin Unggas PT Sanbio Laboratories, Bogor. Tahapan penelitian meliputi isolasi dan pasase virus pada telur ayam *Specific Pathogen Free* (SPF), identifikasi virus dengan uji serologi HA/HI, uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan sekuensing.

Sebanyak sembilan isolat lapang virus AI subtype H5N1 asal Bali dengan kode: isolat 3A, A4, 9C, 10A, 10C, P65, P67 dipasase pada telur ayam SPF. Semua isolat terlebih dahulu diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis menjadi konsentarsi 10%, lalu masing-masing isolat diinokulasikan sebanyak 0,2 mL per-butir pada telur ayam berembrio SPF umur 9 hari, melalui ruang alantois. Telur diinkubasikan pada inkubator bersuhu 37<sup>o</sup> selama 2 hari dan di *candling* setiap hari. Pada akhir masa inkubasi semua telur ayam SPF baik yang mati maupun tidak, disimpan di dalam *cool room* 2-4<sup>o</sup>C selama semalam. Telur dikeluarkan dari *cool room* selanjutnya dicuci dengan larutan desinfektan. Cairan allantois dipanen, kemudian disentrifuse, supernatannya diambil dengan

pipet lalu suspensi virus disimpan dalam tabung steril dan ditempatkan pada suhu 4 <sup>o</sup>C. Uji HA/HI dilakukan untuk mendapatkan titer virus tertinggi.

Virus diidentifikasi dengan uji Hema-glutnasi (HA) teknik mikrotiter yang diawali dengan cara ditambahkan masing-masing 0,025 mL PBS pada setiap sumuran plat mikro 96 sumuran dengan menggunakan pipet mikro. Sebanyak 0,025 mL antigen ditambahkan pada sumuran pertama. Pengenceran dilakukan berseri seri kelipatan dua dimulai dari sumuran ke-1 sampai ke-11 dengan menggunakan mikropipet. Selanjutnya sebanyak 0,025 ml PBS ditambahkan ke setiap sumuran plat mikro. Kemudian 0,025 mL sel darah merah unggas 1% ditambahkan ke dalam setiap sumuran plat mikro lalu digoyang-goyangkan menggunakan pengayak mikro selama 15 detik. Plat mikro dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruangan. Diamati terbentuknya reaksi positif yang ditandai dengan adanya bentukan berpasir pada sumuran plat mikro akibat reaksi haemaglutinasi. Pembacaan titer HA dilakukan dengan memiringkan plat mikro e<sup>o</sup> 45<sup>o</sup> dan penentuan titer HA dari pengenceran antigen tertinggi yang masih dapat menghaemaglutinasi sel darah merah 1%. Hasil uji HA selanjutnya dibuat menjadi antigen 4 HA unit untuk uji HI.

Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) digunakan untuk mengidentifikasi isolat virus AI yang diperoleh. Sebanyak 0,025 mL PBS dimasukkan kedalam setiap sumuran plat mikro. Sumuran pertama diisi dengan 0,025 mL serum AI standar kemudian diencerkan secara berseri kelipatan dua mulai dari sumuran ke-1 sampai ke-10 dengan pengencer mikro dan dari sumuran nomor 10 suspensi dibuang sebanyak 0.025 mL. Masing-masing sumuran plat mikro ditambahkan dengan 0,025 mL antigen 4 unit HAMulai dari sumuran nomor 1 sampai nomor 11. Plat mikro diayak selama 15 detik dengan *mikroshaker* kemudian dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruangan. Suspensi sel darah merah 1% ditambahkan ke dalam sumuran ke-1 sampai ke-12 sebanyak 0,025 mL lalu diayak kembali selama 15 detik. Plat mikro dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar. Hasil uji HI dibaca jika pada sumuran nomor 11 sudah tampak adanya aglutinasi eritrosit dan pada sumuran nomor 12 terlihat endapan eritrosit. Titer HI dibaca dengan memiringkan plat mikro dan melihat ada atau tidak sel darah merah yang turun (*tear-shaped*). Titer HI ditentukan dengan melihat pengenceran serum tertinggi

yang masih mampu menghambat aglutinasi eritrosit.

Setelah isolat teridentifikasi AI secara serologi lalu konfirmasi dengan RT-PCR untuk menentukan subtipe virus AI. Untuk ekstraksi RNA digunakan kit komersial dari Qiagen dengan Superscript III one Step RT-PCR system Fouchier *et al.* (2000), Primer H5, dan program RT-PCR yang digunakan sesuai dengan Lee *et al.* (2001), sedangkan primer N1 dan program RT-PCR yang digunakan sesuai dengan Wright *et al.* (1995). Apabila sampel tidak dapat diamplifikasi dengan primer H5, dan program RT-PCR dilakukan sesuai dengan Lee *et al.* (2001), sampel diuji dengan primer H5, dan program RT-PCR sesuai dengan Dharmayanti *et al.* (2016). Hasil amplifikasi divisualisasi dengan UV transiluminator untuk didokumentasikan. Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan Mega 6 untuk mengetahui hubungan kekerabatan dan homologi virus AI sampel.

Satu isolat virus AI dengan titer  $2^{10}$  HA unit dengan kode 9C diberi nama isolat A/Chicken/Bali 9C/GAY/2019, selanjutnya dipasase pada telur ayam SPF sampai diperoleh titer virus yang stabil untuk dijadikan *seed* vaksin AI subtipe H5N1. Pasase isolat virus A/Chicken/Bali 9C/GAY/2019 pada telur ayam SPF dilakukan sebanyak 7 kali. Suspensi virus hasil pasase ke-7 pada telur SPF selanjutnya diuji kandungan virusnya dengan uji *Virus Content* untuk *seed* kandidat vaksin.

Tahap selanjutnya adalah uji sterilitas *seed* kandidat vaksin yang dilakukan dengan cara menginokulasikan 0,5 mL suspensi virus ke dalam TGC cair dan Na selanjutnya yang diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan  $22^{\circ}\text{C}$  selama 14 hari. Suspensi virus dinyatakan steril jika warna cairannya jernih yang menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi isolat virus AI subtipe H5N1 asal Bali pada telur ayam *Specific Pathogen Free* (SPF) mengakibatkan kematian 70% embrio. Semua telur sebelum dipanen dimasukkan ke dalam kulkas atau *cool room* bertujuan untuk mengurangi perdarahan pada saat dilakukan panen cairan allantois. Hasil pasase ke dua dari tujuh isolat yang dipasase, ada 5 isolat AI subtipe H5N1 yang stabil yakni : isolat 3A, 4A, 9C, 10A, 10C dengan titer virus yang bervariasi mulai dari 5 log 2 sampai 9 log 2 seperti dimuat pada Tabel 1.

Konfirmasi uji serologi dilakukan dengan uji RT-PCR dan sekuensing. Hasil uji RT-PCR ditemukan lima isolat positif AI subtipe H5N1 yakni isolat 3A, 4A, 9C, 10A, 10C dengan panjang basa 585 sampai 600 bp, sedangkan isolat P65 dan P67 negatif. Hasil uji RT-PCR isolat AI subtipe H5N1 dimuat pada Gambar 1.

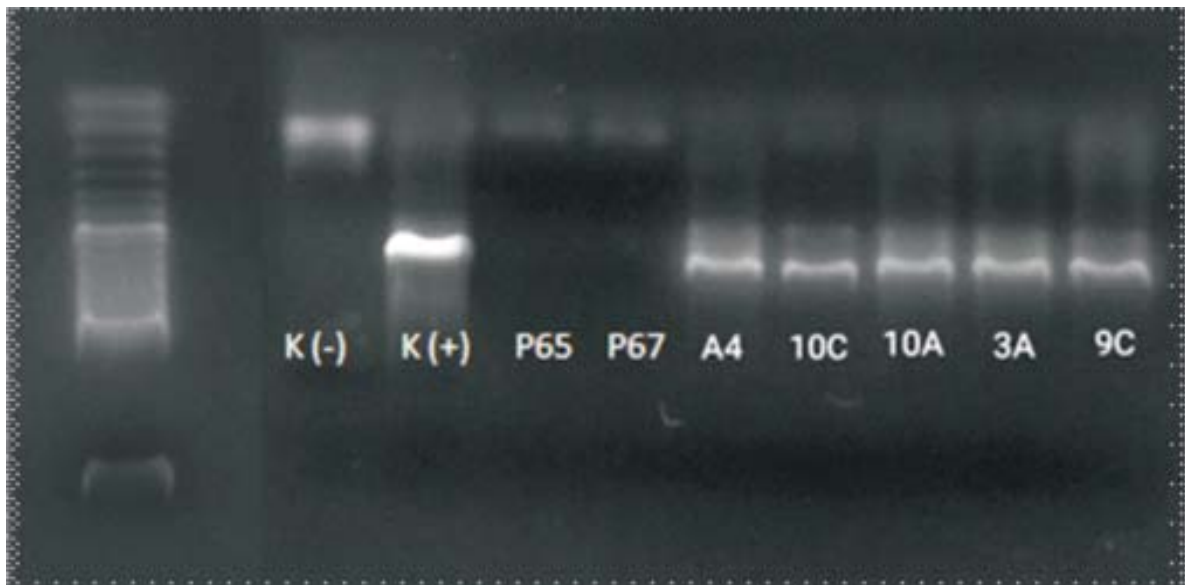
Hasil sekuensing selanjutnya dianalisis dengan bioinformatika Mega 6. Sebanyak lima isolat AI subtipe H5N1 asal Bali menunjukkan isolat-isolat tersebut termasuk virus AI subtipe H5N1 clade 2.3.2. yang termasuk kelompok virus AI ganas (*Highly pathogenic Avian Influenza* (HPAI) (Swayne and Swartz., 2000; OIE, 2012). Hasil analisis filogenetik isolat AI subtype H5N1 asal Bali dimuat pada Gambar 2.

Satu isolat A/Chicken/Bali9C/GAY/2019 setelah dipasase ke-2 pada telur ayam SPF dihasilkan titer virus 10 log 2. Hasil pasase sampai 7 kali pada telur SPF ternyata titernya tetap stabil yakni 2 log sehingga dipilih menjadi kandidat *seed* vaksin AI subtipe H5N1. Untuk mengetahui kekerabatan isolat virus isolat A/Chicken/Bali9C/GAY/2019 telah dilakukan penyepadanan dengan virus AI subtipe H5N1 asal Bali dan Jawa Timur, juga dengan virus

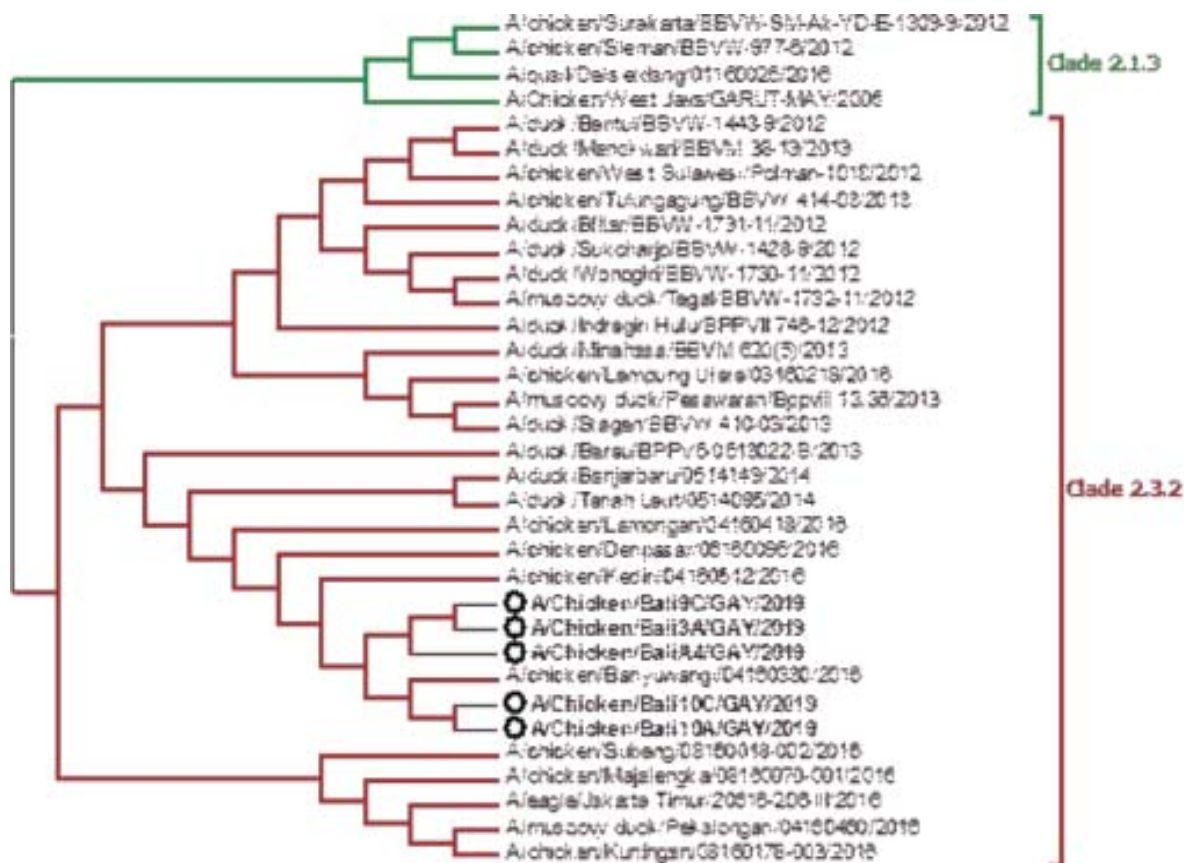
Tabel 1. Hasil pasase kedua dari isolat virus AI subtipe H5N1 asal Bali

Kode Sampel	Jumlah Kematian Hari ke-					Hasil	
	1	2	3	4	5	Uji HACepat	Titer HA Lambat (log 2)
3A		2				(+)	8
A4		2				(+)	8
9C		2				(+)	9
10A		2				(+)	8
10C		1				(+)	5
P65						(-)	0
P67						(-)	0





Gambar 1. Hasil uji RT-PCR isolat AI subtype H5N1 asal Bali.  
 Keterangan : K (-) : Kontrol Negatif, K (+) : Kontrol Positif AI H5, P65 : Sampel Swab, P67: Sampel Swab, A4: Sampel, 10C : Sampel , 10 A : Sampel , 3A : Sampel , 9C : Sampel.



Gambar 2. Analisis filogenetik isolat AI subtype H5N1 asal Bali dengan virus AI subtype H5N1 di *Genbank*

Tabel 2. Hasil uji *virus content* isolat A/Chicken/Bali9C/GAY/2019

Nama virus: AI subtype H5N1 clade 2.3.2; Tanggal uji: 19 Juli 2019; Asal telur/jumlah telur: SPF/17 butir

Pengenceran	No. Telur	Pengamatan hari ke-							Penilaian hasil	Hasil titrasi virus	
		1	2	3	4	5	6	7			
-5	1	M							(+)	5/5	10 <sup>6.9</sup> /0.1 mL
	2	-	-	M					(+)		
	3	-	-	M					(+)		
	4	-	-	M					(+)		
	5	-	-	M					(+)		
-6	1	-	-	M					(+)	5/5	
	2	-	-	M					(+)		
	3	-	-	M					(+)		
	4	-	-	M					(+)		
	5	-	-	M					(+)		
-7	1	-	-	M					(+)	2/5	
	2	-	-	M					(+)		
	3	-	-	-	-	-	-	-	(-)		
	4	-	-	-	-	-	-	-	(-)		
	5	-	-	-	-	-	-	-	(-)		
Kontrol (-)	12	-	-	-	-	-	-	-	(-)		
Kontrol (+)	12	M							(+)		

AI subtype H5N1 standar pemerintah A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012.

Hasil penyepadanan virus A/Chicken/Bali9C/GAY/2019 ternyata mempunyai hubungan kekerabatan dengan AI subtype H5N1 asal Banyuwangi sebesar 98,62%, dengan AI subtype H5N1 asal Lamongan sebesar 98,45%, dengan AI subtype H5N1 asal Lumajang sebesar 98,10%, dengan AI subtype H5N1 asal Kediri sebesar 97,07%, dengan AI subtype H5N1 asal Blitar sebesar 97,07%, dengan AI subtype H5N1 asal Denpasar sebesar 96,72%, dengan AI subtype H5N1 asal Buleleng sebesar 96,72% dan dengan AI subtype H5N1 Sukoharjo yang merupakan isolat *seed* vaksin virus AI subtype H5N1 standar pemerintah, sebesar 96,72%.

Untuk mengetahui keganasan virus maka dilakukan uji *virus content* pada telur ayam SPF dimuat pada Tabel 2.

Hasil Uji *virus content* isolat virus AI subtype H5N1 isolat A/Chicken/Bali9C/GAY/2019 yang dinyatakan dengan EID<sub>50</sub> sebesar 10<sup>67.9</sup>/mL. Hasil tersebut sebagai tanda bahwa isolat AI subtype H5N1 asal Bali (A/Chicken/Bali9C/GAY/2019) bersifat virulen dan cocok untuk kandidat *seed* vaksin karena mempunyai kekerabatan yang dekat yakni sebesar 96,72%

dengan virus AI standar pemerintah A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012. Hasil uji sterilitas *seed* vaksin AI subtype H5N1 isolat A/Chicken/Bali9C/GAY/2019 itu steril ditandai dengan suspensi yang jernih.

## SIMPULAN

Hasil uji karakterisasi isolat virus AI subtype H5N1 asal Bali ditemukan bahwa satu isolat yakni A/Chicken/Bali 9C/GAY/2019 termasuk AI subtype H5N1 clade 2.3.2, bersifat stabil dengan tujuh kali pasase pada telur SPF, memiliki kekerabatan 96,72% dengan A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012, kandungan virusnya 10<sup>7.9</sup> EID<sub>50</sub>/ML sehingga berpotensi untuk kandidat vaksin.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang kandidat vaksin isolat virus AI subtype H5N1 asal Bali (A/Chicken/Bali9C/GAY/2019) untuk dikembangkan menjadi vaksin inaktif.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan Hibah Riset Terapan Ristek Dikti dengan kontrak penelitian nomor 492.58/UN14.4.A/LT/2019. Penulis mengucapkan terimakasih kepada LPPM Udayana yang telah mengusulkan proposal ini dan Ristekdikti yang telah mendanai penelitian ini. Ucapan terima kasih kepada PT. Sanbio Laboratories, Bogor atas fasilitas penelitiannya

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Moneim AS., Abdel-Ghany AE., Salama AS Shany SAS 2010. Isolation and characterization of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 from donkeys. *Journal of Biomedical Science*. <http://www.jbiomedsci.com/content/17/1/25research>
- Cattoli G, Monne I, Fusaro A, Joannis TM, Lombin LH, Aly MM, Arafa AS, Sturm-Ramirez KM, Hymann EC, Awuni JA, Batawui KB, Awoume KA, Aplogan GL, Sow A, Ngangnou AC, El Nasri HamzaIM, Gamatie D, Dauphin G, Domenech JM, Capua I. 2009. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H5N1 in Africa: A Comprehensive Phylogenetic Analysis and Molecular Characterization of Isolates. *PLoS ONE* | [www.plosone.org](http://www.plosone.org) Volume 4 | Issue 3 | e4842
- de Jong MM, Hien TT. 2006. Avian Influenza A (H5N1). *J Clin Virol* 35: 2-13.
- Hewajuli DA., Dharmayanti NLP, Wibawan IWT. 2017. Deteksi, Isolasi, dan Identifikasi Avian influenza Subtipe H5N1 pada Unggas di Pulau Jawa, Indonesia Tahun 2016. *Jurnal Veteriner* 18(4): 496-509.
- Kayali G, Kandeil A, El-Shesheny R, Kayed AS, Maatouq AM, Cai Z, McKenzie PP, Webby RJ, Refaey SE, Kandeil A, Ali MA. 2016. Avian Influenza A(H5N1) Virus in Egypt. *Emerging Infectious Diseases* 22(3): 379-388.
- [Kementan] Kementerian Pertanian 2013. Keputusan Menteri Pertanian No. 4026/Kpts/OT.140/4/2013. Tentang Penetapan jenis Penyakit Hewan Menular Strategis, Jakarta.
- Kencana GAY, 2010. Analisis Sekuens Non-Coding dan Coding Region Ujung-5' Gen Polimerase Kompleks Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Asal Unggas dan Babi di Indonesia. (*Disertasi*). Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada
- Kencana GAY, Mahardika IG NK, Suardana IBK, Mantik Astawa IN, Krisna Dewi NM, Narendra Putra GN. 2012<sup>a</sup>. Pelacakan kasus flu burung pada ayam dengan *reverse transcriptase polymerase chain*. *Jurnal Veteriner* 13(3): 303-308.
- Kencana GAY., Suartha IN, Handayani AN., Ramadhan M. 2014<sup>a</sup>. Kepekaan Telur *Specific Pathogen Free* Dan *Clean Egg* Terhadap Virus Avian Influenza Subtipe H5N1. *Jurnal Veteriner* 15(1): 87-93.
- Kencana GAY., Arini Nur Handayani., Steffi Ong., Suartha IN., Mesakh., Robert T., Syamsidar, Aprilia K. 2014<sup>b</sup>. Antisipasi perkembangan virus AI H5N1 dan ND di Indonesia. Disampaikan pada forum Seminar dan Pameran Industri Perunggasan Indolivestock di Jakarta Convention Centre (JCC), tanggal 18 Juni 2014.
- Kencana GAY, Arini Nur Handayani, Steffi Ong, Suartha IN, Mesakh, Robert T, Syamsidar, Aprilia K. 2014<sup>c</sup>. Efektivitas vaksin kombinasi ND-AI dalam upaya penanggulangan terhadap penyakit unggas menular strategis. Proseding Seminar Nasional Sains dan Teknologi. Universitas Udayana, Denpasar tanggal 18-19 September 2014.
- Kencana GAY., Suartha IN., Sintya Paramita NMA, Handayani . 2016. Vaksin kombinasi Newcastle Disease dan Flu Burung memicu respon protektif pada ayam petelur. *Jurnal Veteriner* 17(2): 257-264.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3 : Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Kusumastuti A, Syamsidar, Paderi AZ, Nurhandayani A, Kencana GAY. 2015. Identifikasi Secara Serologi Galur Virus Flu Burung Subtipe H5N1 *Clade* 2.1.3 dan *Clade* 2.3.2 pada Ayam Petelur. *Jurnal Veteriner* 16(3): 371-38

- Li KS, Guan Y., Wang, J., Smith, G.J., Xu, K.M., Duan, L., Raharjo, A. P., Puthawathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoe-pangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H. T., Hanh, N.T., Webby, R. J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Webster, R. G., and Peiris, J. S., 2004. Genesis of a Highly Pathogenic and Potentially Pandemic H5N1 Influenza Virus in Eastern Asia. *Nature*, 430: 209-213.
- OIE. 2009. Office International des Epizooties (OIE). Terrestrial Manual: Chapter 2.3.4. Avian Influenza. [http://www.oie.int/filedadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/filedadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf)
- Saitou N, Nei .1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425
- Salomon R, Franks J, Govorkova EA, Ilyushina NA, Yen HL, Post Djh, Jennifer H, Trichet M, Rehg JE, Webby RJ, Webster RG, Hoffmann E. 2006. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *JEM* 203(3): 689-697.
- Salzberg SL, Kingsford C, Cattoli G, Spiro DJ, Janies DA, Aly MM, Brown IH, CouacyHymann E, De Mia GM, Dung DH, Guercio A, Joannis T, Ali ASM, Osmani A, Padalino I, Magdi D, Saad MD, Saviæ V, Sengamalay NA, Yingst S, Zaborsky J, Zorman-Rojs O, Ghedin E, Ilaria Capua. 2007. Genome analysis linking recent European and African Influenza (H5N1) viruses. *Emerging Infectious Diseases* 13(5): 713-718.
- Swayne, D.E., and Suarez, D.L., 2000. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech* 19: 463-482.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS* 101: 11030-11035
- Taubenberger, JK., AH Reid, RM Lourens, R Wang, G Jin, dan TG Fanning, 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437: 889- 893
- Webster RG, Guan Y, Poon L, Krauss S, Webby R, Govorkovai E, Peiris M. 2005. The Spread of The H5N1 Bird Flu Epidemic in Asia in 2004. *Arch Virol suppl* 2005: 117-129.
- Wright PE, Webster RG. 2001. Orthomyxoviridae. In *Fields Virology*. 4 ed. Edited by Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE. Philadelphia. Lippincott William Wilkins. Hlm. 1533-1568.