

REISOLASI KANDIDAT *MASTERSEED* VIRUS TANTANG *HIGH PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA* SUBTIPE H5N1

Ramlah, Hidayanto K, Natih KKN, Suryanti S, Suryati S, Mukartini S

BBPMSOH

ABSTRAK

Virus AI subtype H5N1 masih menjadi perhatian utama. Berdasarkan hasil pertemuan IVM tahun 2015-2016 diperoleh 4 kandidat virusantang yang akan dipergunakan untuk uji efikasi dan potensi vaksin AI yang beredar di Indonesia. Isolat *masterseed* virus AI diperoleh dari BBVet Wates, yang kemudian dimurnikan di BBPMSOH. Isolat virus AI H5N1 diberi kode A (A/chicken/Barru/BBVM41-13/2013 clade 2.1.3), kode B (A/duck/Tanah Laut/0514095/2014 clade 2.3.2), kode C (A/chicken/Semarang/04141225-07/2014 clade 2.3.2.1c) dan kode D (A/chicken/Sleman/BBVW-1908-12/2012 clade 2.1.3). Reisolasi virus AI dilakukan dengan pengenceran 10^2 dan 10^3 . Virus AI H5N1 diinfeksi pada telur SPF umur 10 hari. Pengamatan terhadap telur terinfeksi dilakukan selama 2 hari. Terjadi kematian embrio pada hari pertama dan kedua post infeksi. Pada saat kematian embrio, telur terinfeksi selanjutnya disimpan pada suhu 4°C selama 12 jam, kemudian diambil cairan allantoisnya dan diamati gejala klinis embrio. Selanjutnya dilakukan uji aglutinasi dengan hasil positif aglutinasi cepat dan lambat. Kemudian dilakukan uji HA-HI untuk memastikan virus tidak terkontaminasi ND, EDS dan murni virus AI. *Masterseed* virus AI dilanjutkan sampai pasase ke 4 dengan prosedur *limited dilution* pada telur SPF dengan pengenceran 10^3 sampai dengan 10^8 . Isolat virus Kode A dilakukan sampai pada pasase ke 3 dengan titer HA peningkatan titer sebesar 512 HAU (9log₂). Isolat virus Kode B, C dan D dilanjutkan sampai pada pasase ke 4. Isolat virus Kode C menunjukkan peningkatan titer sebesar 256 HAU (8log₂). Berdasarkan kenaikan titer pada tiap pasase dan gejala klinis embrio, isolat virus kode A dan C dipilih sebagai *masterseed* virusantang AI. Selanjutnya virus AI kode A dan C dititrasi di telur SPF dan sel CEF. Titer virus AI kode A ditelur SPF adalah $10^{8.3}$ EID₅₀ dan pada kode C adalah $10^{8.7}$ EID₅₀. Titer virus AI kode A pada sel CEF adalah $10^{8.5}$ TCID₅₀ dan pada kode C adalah $10^{8.75}$ TCID₅₀.

Kata Kunci : AI, Reisolasi, H5N1, Hemaglutinasi, EID₅₀

PENDAHULUAN

Virus avian influenza H5N1 bersifat pathogen dan menarik banyak perhatian selama ini, karena telah terjadi wabah pada unggas domestik maupun liar. Tingkat virulensi virus pun meningkat tidak hanya pada unggas, burung liar namun dapat pula menginfeksi spesies mamalia. Virus AI H5N1 yang sangat patogenik di Asia terjadi pada unggas dan sangat menular dan mematikan. Virus ini pertama kali terdeteksi pada tahun 1996 pada angsa di Cina. H5N1 Asia pertama kali terdeteksi pada manusia pada tahun 1997 saat terjadi wabah unggas di Hong Kong dan sejak itu terdeteksi pada unggas dan burung liar di lebih dari 50 negara di Afrika, Asia, Eropa, dan Timur Tengah. Enam negara dianggap endemik untuk virus HPAI H5N1 Asia pada unggas (Bangladesh, China, Mesir, India, Indonesia, dan Vietnam).

Di Indonesia program vaksinasi masih menjadi salah satu cara daam menanggulangi kasus AI sejak tahun 2004. Berbagai merk vaksin AI telah beredar namun masalah AI maasih menjadi perhatian bagi pihak yang berkecimpung di sektor perunggasan. Dalam rangka memonitor penyebaran

penyakit AI, pemerintah Indonesia kini menerapkan sistem monitoring AI secara on line. Pelaksanaan Program *Influenza Virus Monitoring* secara Online (IVM Online) merupakan langkah strategis untuk dapat secara mudah dan cepat memantau perkembangan sirkulasi virus AI serta mendeteksi varian-varian virus baru. Berdasarkan hasil pertemuan tim monitoring virus influenza dan investigasi epidemiologi molekular Virus HPAI tahun 2014-2016, maka dilakukan uji reisolasi kandidat virus tantang AI H5N1 yang telah diperoleh dari BBVET Wates untuk dipergunakan uji efikasi dan potensi terhadap vaksin AI yang beredar di Indonesia.

TUJUAN

Tujuan studi ini untuk reisolasi kandidat virus tantang AI H5N1 untuk dipergunakan uji efikasi dan potensi terhadap vaksin AI yang beredar.

MATERI DAN METODE

Materi

Isolat AI Virus sebanyak 4 sampel, telur ayam berembrio (TAB) *Specific Pathogen Free* (SPF) bertunas umur 9-11 hari, Posphat buffer Saline (PBS), pennisilin streptomycin (PS), sel *Chicken Embrio Fibroblast* (CEF), serum AI H5N1, Serum *Newcastle Disease* (ND) dan serum *Egg Drop Syndrom* (EDS). *Safety cabinet*, inkubator telur, sentrifuge dingin, tabung *sentrifuge*, *stirrer*, *micropipet* dan *tip*, *microplate 96 well*, *microplate 24 well*

Tabel 1. Kandidat Virus AI H5N1 berasal dari BBVET WATES

No	Sampel Virus AI H5N1	Kode
1	A/chicken/Barru/BBVM41-13/2013 clade 2.1.3	A
2	A/duck/Tanah Laut/0514095/2014 clade 2.3.2	B
3	A/chicken/Semarang/04141225-07/2014 clade 2.3.2.1 c	C
4	A/chicken/Sleman/BBVW-1908-12/2012 clade 2.1.3	D

Metode

Reisolasi virus AI dilakukan dengan pengenceran 10^2 dan 10^3 . hasil pengenceran difilter dengan ukuran $0,45\mu$. Virus AI H5N1 diinfeksi pada TAB SPF umur 10 hari. Pengamatan dilakukan tiap hari. Embrio yang mati disimpan pada suhu 4°C selama kurang lebih 12 jam. Kemudian diambil cairan allantoisnya dan diamati gejala embrionya, Selanjutnya dilakukan uji aglutinasi cepat menggunakan RBC 3% dan lambat RBC 1%. Kemudian dilakukan uji HA-HI untuk memastikan virus tidak terkontaminasi ND, EDS dan murni virus AI. Kandidat *Masterseed* virus AI dilanjutkan sampai pasase ke 4 dengan prosedur *limited dilution* pada telur SPF dengan pengenceran

10^3 sampai dengan 10^8 . Kandidat masterseed virus AI kemudian dipropagasi dengan pengenceran 10^3 dan diinfeksi pada telur SPF umur 10 hari sebanyak 20 butir telur. Selanjutnya di titrasi pada telur SPF dengan pengenceran 10^5 sampai dengan 10^8 . Dan juga dititrasi pada sel CEF dengan pengenceran 10^1 sampai dengan 10^{10} . Metode uji HA- HI (OIE, 2012)

Titration pada sel Chicken Embryo Fibroblast (CEF)

Larutan tripsin 0,025% sebanyak 15 ml ditambahkan kedalam larutan PBS sebanyak 135 ml dipanaskan pada suhu 37°C di *waterbath*. Telur SPF umur 8 hari dicandling untuk melihat embrio yang hidup, kulit telur lalu dibersihkan dengan kapas alkohol. Cawan petri disiapkan, kerabang telur dipecahkan, embrio diambil dan embrio dimasukkan ke dalam cawan petri, dipisahkan kepala, kaki, sayap dan organ visceral, kemudian dicuci dengan PBS+PS1%. Embrio dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*, ditambahkan 100 ml PBS+PS1% dan *distirrer* 5 menit, kemudian cairan bagian atas dibuang hati-hati. Tripsin hangat ditambahkan dan *distirrer* lagi selama 10-15 menit. Suspensi sel disaring dengan filter kawat kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya supernatan dibuang, dan *pellet* yang didasar tabung ditambahkan media GM sebanyak 5 ml dan dilakukan pipeting dengan menggunakan pipet komagome ke masing-masing tabung sentrifuse, kemudian larutan media sel dijadikan ke satu tabung, disentrifuse kembali dengan kecepatan 3000 rpm, selama 5 menit. Kemudian supernatan dibuang dan *pellet* sel ditambahkan GM sebanyak 20 ml, dilakukan pipeting dan disaring menggunakan filter kawat dan dilakukan penghitungan sel dengan menggunakan kamar hitung. Penghitungan sel sebanyak 10^6 (1 Juta Sel), dan ditambahkan media GM sesuai kebutuhan. kemudian didistribusikan pada plate 96 *well* sebanyak $100\mu\text{l}$. Pengenceran virus dibuat dengan kelipatan 10 x dari 10^{-1} sampai 10^{-10} . Inokulasikan 0.1 ml pengenceran virus/ *well*. Setiap pengenceran memakai 4 *well*. Sel yang telah diinfeksi diinkubasi selama 7 hari dalam inkubator CO_2 37°C . Diamati setiap hari adanya *Cytopathic effect* (CPE).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 4 sampel virus AI diinfeksi ke telur SPF dengan pengenceran 100x sampai 1000x, masing-masing menggunakan telur SPF 4 butir dengan dosis 0,1 ml. Pada sampel virus kode A dan C, semua embrio terjadi kematian pada hari pertama, 24 jam paska infeksi. Sedangkan sampel B, D terjadi kematian embrio pada hari pertama dan ke dua paska infeksi. Embrio yang pada saat diamati telah mati langsung dimasukkan ke refrigerator 4°C . Selanjutnya cairan allantois kemudian dipanen dan dilakukan uji HA cepat. Masing-masing sampel di lakukan uji HA lambat dengan dua kali pengulangan (duplo). Kemudian dilanjutkan dengan uji HI terhadap serum ND, serum EDS. Sampel virus A,B, C dan D memiliki titer uji HI terhadap

serum ND dan EDS, kurang dari 2 atau secara kualitatif disebut negatif. Masing-masing sampel pun di uji HI terhadap serum AI clade 2.1.3, hasilnya secara kuantitatif lebih besar atau sama dengan 16 (Tabel 3). Pengujian HI terhadap serum ND dan EDS bertujuan agar virus AI H5N1 yang dijadikan sebagai kandidat *masterseed*antang telah murni AI dan tidak terkontaminasi dengan virus ND dan EDS. Virus ND dan EDS mampu mengaglutinasi sel darah merah seperti dengan virus AI (Swayne, 2003).

Tabel 2. Hasil Pasase 1 Kandidat Virus Tantang AI H5N1

Pengenceran Sampel Virus AI	Tanggal Kematian Embrio		HA cepat	HA lambat (Log 2)
	H-1	H-2		
A 10 ²	4/4	-	++	6
A 10 ³	4/4	-	++	5
B 10 ²	-	4/4	+	1
B 10 ³	¼	¾	+	2
C 10 ²	-	4/4	++	5
C 10 ³	-	4/4	++	5
D 10 ²	-	4/4	++	7
D 10 ³	¾	¼	++	5

Tabel 3. Hasil Uji HI Kandidat Virus Tantang AI H5N1 (P1)

SERUM	Virus AI H5N1				Ag ND ISCHII Ag EDS	
	A	B	C	D		
Hasil Uji HA	7	3	6	6		
ND Strain B1	<2	<2	<2	<2	-	-
	<2	<2	<2	<2	-	-
ND strain Clone 45	<2	<2	<2	<2	-	-
	<2	<2	<2	<2	-	-
ND strain Lasota	<2	<2	<2	<2	-	-
	<2	<2	<2	<2	-	-
ND strain Ischii	<2	<2	<2	<2	>8	-
	<2	<2	<2	<2	>8	-
EDS	<2	<2	<2	<2	-	>8
	<2	<2	<2	<2	-	>8
AI H5N1 Clade 2.3.2	2	1	3	2	-	-
	2	1	3	2	-	-
AI H5N1 Clade 2.1.3	6	6	7	7	-	-
	6	6	7	7	-	-

Setelah itu dilakukan passase ke 2 sampai dengan ke 4 dengan cara *limited dilution* dari pengenceran 10³ sampai dengan 10⁹. Pada Pasase ke 2, sampel virus AI H5N1 dengan kode A di peroleh hasil titer uji HA paling

tinggi sebesar 7 log 2, sampel D sebesar 5 log 2, sampel C sebesar 2 Log 2 dan paling rendah kode sampel B sebesar <2 . Tiap pasase pun, dilakukan pengujian titrasi pada telur SPF dimana titer hasil uji paling tinggi pada sampe A sebesar $10^{9.7} \text{EID}_{50}$, titer sampel C $10^{8.1} \text{EID}_{50}$, sampel D $10^{7.7} \text{EID}_{50}$ dan paling rendah pun pada sampel B yaitu $10^{6.7} \text{EID}_{50}$. Dari hasil pasase ke 2, masih dilanjutkan ke pasase berikutnya dengan maksud agar masing-masing sampel virus AI H5N1 diperoleh hasil titer HA yang tinggi dan begitupula dengan titer pada TAB. Pasase ke 3, sampel virus kode A, memiliki titer HA yang tetap dan hasil titrasi di telur mengalami penurunan titer, namun dari hasil pengamatan kematian embrio yang meningkat di tiap pengencerannya, maka virus kode sampel A tidak lagi dilanjutkan ke pasase berikutnya. Sedangkan pada ke tiga sampel lainnya yakni kode sampel B, C dan D masih dilanjutkan ke pasase ke 4, hasil uji ke tiga sampel dari angka kematian telur masih beragam di tiap pengenceran pada uji titrasi di telur ayam SPF. Selanjutnya kode sampel B,C dan D dilanjutkan sampai pada ke pasase ke 4. Sampel kode B, memiliki titer rendah yakni 4 log 2, sedangkan titer pada TAB meningkat yakni $10^{8.3} \text{EID}_{50}$. Sample kode C memiliki peningkatan titer baik pada hasil uji HA dan titer TAB yakni 7 log 2 dan $10^{8.9} \text{EID}_{50}$. Sampel kode D dengan hasil uji HA mengalami peningkatan sebesar 8 log 2 , namun terjadi penurunan titer pada TAB sebesar $10^{6.9} \text{EID}_{50}$. (Tabel 4)

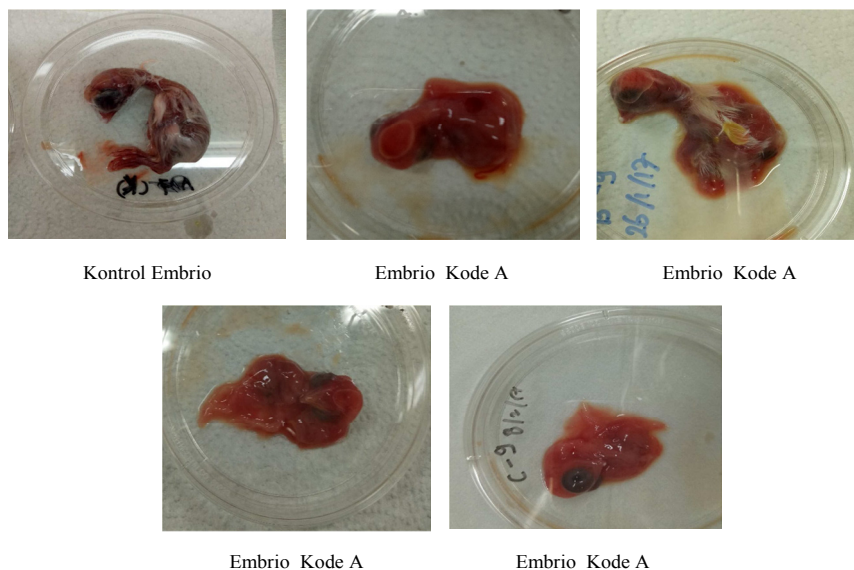
Pada tiap pasase dari keempat sampel mengalami keberagaman hasil uji HA maupun titer dengan metode uji titrasi pada TAB. Sampel virus kode A pasase ke 3 dan C pasase ke 4 dari hasil uji titrasi pada TAB, mengalami kematian embrio yang meningkat pada tiap pengenceran yaitu mati pada hari pertama sampai dengan hari ke2. Sehingga dari hasil uji pun menunjukkan titer yang lebih tinggi dari persyaratan titer virus AI H5N1 yang dipergunakan untuk uji tantang vaksin AI yakni sebesar $10^{6.0} \text{EID}_{50}$. (OIE,2012). Penelitian serupa pernah dilakukan oleh Ramlah *et al* (2017), pada proses pemurnian virus AI H5N1 Clade 2.3.2 diperoleh titer virus AI H5N1 sebesar 8 log 2 dan hasil uji titrasi pada TAB, yakni $10^{7.9} \text{EID}_{50}$.

Tabel 4. Hasil uji HA dan Titer Pada Telur SPF P2, P3 dan P4

No	Sampel	Titer P2		Titer P3		Titer P4	
		Log 2 (HAU)	EID ₅₀	Log 2 (HAU)	EID ₅₀	Log 2 (HAU)	EID ₅₀
1	A	7	$10^{7.5}$	4	$10^{9.7}$	-	-
2	B	<2	$10^{7.9}$	8	$10^{6.7}$	4	$10^{8.1}$
3	C	2	$10^{8.5}$	5	$10^{8.1}$	7	$10^{8.9}$
4	D	5	$10^{8.3}$	3	$10^{7.8}$	8	$10^{6.7}$

Setelah panen cairan allantois, dilakukan pengamatan embrio ayam yang telah terinfeksi virus H5N1 dengan kode A, B, C dan D. Gambaran makroskopis terhadap embrio ayam memperlihatkan hemoragi pada seluruh

permukaan embrio, pertumbuhan mengecil, terhambat n menipisnya lapisan bulu pada bagian punggung dan leher . Gambar 1. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Wibowo *et al* (2006), bahwa semua isolat virus AI yang berasal dari DI Yogyakarta dan Jawa Tengah dengan gejala klinis tersifat flu burung mampu menyebabkan kematian embrio berumur 9-11 hari dalam waktu 44-72 jam pasca infeksi.



Gambar 1. Gejala Klinis Embrio yang terinfeksi virus AI H5N1 dan embrio control.

Sampel Virus AI H5N1 kode A P3 dan C P4 selanjutnya dilakukan propagasi agar diperoleh volume dari virus AI H5N1 yang lebih banyak dan penggunaan sebagai *working seed*, di *aliquot* dan disimpan pada suhu -20°C . Virus AI dengan kode A dan C tetap dilakukan uji HA, titrasi pada TAB dan sel CEF. Hasil uji HA dari hasil propagasi meningkat yakni kode sampel A, 9 log 2 dan Kode sampel C, 8 log 2. Titer tersebut mengalami peningkatan yang lebih tinggi. Begitupula dengan hasil uji titrasi pada TAB dan sel CEF, yakni sampel virus H5N1 kode A yakni $10^{8,3}$ EID₅₀ dan $10^{8,5}$ TCID₅₀. Sampel virus AI H5N1 kode sampel C yakni $10^{8,7}$ dan $10^{8,75}$ TCID₅₀. (Tabel 5)

Tabel 5. Hasil uji HA, Titer Pada Telur SPF dan Pada Sel CEF

No	Sampel	Titer		
		HA (HAU)	EID ₅₀	TCID ₅₀
1	A	9	$10^{8,3}$	$10^{8,5}$
2	C	8	$10^{8,7}$	$10^{8,75}$

KESIMPULAN DAN SARAN

Reisolasi virus AI H5N1 Isolat virus AI H5N1 yang berasal dari BBVET WATES sebanyak 4 isolat yakni kode A (A/chicken/Barru/BBVM41-13/2013 clade 2.1.3), kode B (A/duck/Tanah Laut/0514095/2014 clade 2.3.2), kode C (A/chicken/Semarang/04141225-07/2014 clade 2.3.2.1c) dan kode D (A/chicken/Sleman/BBVW-1908-12/2012 clade 2.1.3). Kode A dilakukan sampai pada pasase ke 3 dengan titer HA peningkatan titer sebesar 9 log 2. Isolat virus Kode B, C dan D dilanjutkan sampai pada pasase ke 4. Isolat virus Kode C menunjukkan peningkatan titer sebesar 8 log 2. Berdasarkan kenaikan titer pada tiap pasase dan gejala klinis embrio, isolat virus kode A dan C dipilih sebagai *masterseed* virus tantang AI yakni A/chicken/Barru/BBVM41-13/2013 clade 2.1.3 dan A/chicken/Semarang/04141225-07/2014 clade 2.3.2.1c. Ke2 isolat virus AI H5N1 kemudian ditransi di telur SPF dan sel CEF. Titer virus AI H5N1 A/chicken/Barru/BBVM41-13/2013 ditelur SPF adalah $10^{8.3} \text{EID}_{50}$ dan titer pada sel CEF adalah $10^{8.5} \text{TCID}_{50}$. Titer virus AI H5N1 A/chicken/Semarang/04141225-07/2014 clade 2.3.2.1c adalah $10^{8.7} \text{EID}_{50}$ dan titer pada sel CEF adalah $10^{8.75} \text{TCID}_{50}$.

Virus AI H5N1 masih menjadi perhatian ditiap tahunnya, maka tetap diperlukan monitoring tiap tahunnya tentang perubahan virus AI H5N1 yang beredar di Indonesia. Pengambilan sampel swab unggas yang diduga terinfeksi AI dan dilanjutkan isolasi dan karakterisasi virus AI.

DAFTAR PUSTAKA

- Office International des epizooties Terrestrial Manual 2008. 2012. Avian Influenza. Chapter 2.3.12.
- Ramlah, Setiawaty R, Emilia, Natih KKN, Suryati Y, Djusa ER. Pemurnian virus *avian influenza*(ai) h5n1 clade 2.3.2 sebagai *masterseed* virus tantang yang homolog. Buletin BBPMSOH
- Swayne, D.E and D.A. Harvorson. 2003. Influenza. In. Diseases of Poultry. Saif, Y.M. 11th.Ed. Iowa State Univ. Press. USA.
- Wibowo, M.H., W. Asmara, dan C.R. Tabbu. 2006. Isolasi dan identifikasi serologis Avian Influenza dari sampel unggas yang diperoleh di DI Yogyakarta dan Jawa Tengah. Jurnal Sain Veteriner. 24:77-83.
- Wiyono A, R. Indriani, N.L.P.I Dharmayanti, R Damayanti, L Parede, T Syafriati, da Darminto. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Virus Highly Pathogenic Avian Influenza Subtipe H5 dari Ayam Asal Wabah di Indonesia. JITV 9 (1) : 61-71