

POTENSI VAKSIN AI INAKTIF *CLADE 2.1.3* DAN *CLADE 2.3.2* TAHUN 2013

Ramlah, Emilia, Yati Suryati, Ketut Karuni NN

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor 16340

ABSTRAK

Vaksinasi merupakan salah satu kebijakan strategi pemerintah dalam pengendalian dan penanggulangan AI di Indonesia. Vaksin AI yang digunakan produksi lokal atau dalam negeri mengingat Indonesia telah mampu memproduksi dan memenuhi kebutuhan vaksin AI nasional sejak tahun 2012. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi vaksin AI inaktif *clade 2.1.3* dan *clade 2.3.2* selama tahun 2013 secara serologi dan ujiantang. Hasil dari uji HI, vaksin AI inaktif *clade 2.1.3* (A, B, D, dan G) dan vaksin AI inaktif *clade 2.3.2* (C, E, dan F) memperlihatkan hasil titer GMT pada kisaran 34,296 sampai dengan 256. Hasil respon titer antibodi vaksin AI inaktif ≥ 16 dan hasil titer kontrol ≤ 4 , sesuai dengan persyaratan mutu vaksin. Vaksin AI inaktif kemudian dilanjutkan dengan ujiantang di laboratorium BSL3. Seluruh vaksin ditantang dengan menggunakan virus AI strain *A/Chicken/West Subang/29/2007* dan untuk vaksin AI inaktif *clade 2.3.2* ditantang dengan virus homolog yaitu AI strain *A/duck/Sukoharjo/BBVW 1428-9/2012* dengan titer $10^{6.0}$ EID₅₀ dosis 0,1 mL. Hasil ujiantang di kelompok ayam dan itik yang divaksinasi 100% hidup dan tidak ada gejala klinis, sedangkan untuk ayam dan itik kelompok kontrol adalah 100% mati. Seluruh sampel vaksin AI *clade 2.1.3* dan *clade 2.3.2* menunjukkan *shedding* virus negatif.

Kata Kunci : vaksin AI inaktif, uji HI, ujiantang

ABSTRACT

*Vaccination is one of the government's policy strategy in the control and prevention of AI in Indonesia. AI vaccine used local or domestic production because Indonesia has been able to produce and meet the needs of the national AI vaccine since 2012. The aim of this research was to study potential of AI inactivated vaccine clade 2.1.3 and clade 2.3.2 for the year 2013 by serology and challenge test. The results of the HI test, vaccine inactivated AI clade 2.1.3 (A, B, D and G) and inactivated AI vaccine clade 2.3.2 (C, E and F) show the results of 34.296 GMT titers up to 256. The results of antibody titer response to inactivated vaccine AI ≥ 16 and the results of the control titer ≤ 4 in accordance with the requirements of the quality of the vaccine. AI inactivated vaccine followed by a challenge test in BSL3 laboratory. The entire vaccine were challenged with using AI virus strain *A/Chicken/West Subang/29/2007* and for vaccine inactivated AI clade 2.3.2 challenged with homologous virus AI strain *A/duck/Sukoharjo/BBVW 1428-9/2012* with $10^{6.0}$ titres EID₅₀ dose of 0.1 mL. Challenge test results in the group vaccinated chickens and ducks 100% live and no clinical symptoms, where as chickens and ducks for the control group was 100% dead. The entire sample of AI vaccines clade 2.1.3 and clade 2.3.2 show a negative viral shedding.*

Keywords : vaccine AI inactive, HI test, challenge test

PENDAHULUAN

Avian influenza (AI) adalah penyakit menular pada unggas yang disebabkan oleh virus *influenza A*. Vaksin unggas yang dibuat harus cocok dengan virus yang akan mewabah, karena vaksin untuk infeksi subtipe virus tertentu tidak efektif digunakan sebagai vaksin untuk infeksi subtipe virus lain. Oleh karena virus *influenza* mudah berubah sifat, maka sangat penting upaya bisa memprediksi virus yang akan mewabah guna pembuatan vaksin. Hal ini tentunya diperlukan tenaga ahli di bidang epidemiologi dan juga peralatan laboratorium yang memadai. Unggas yang sehat yang berada sekitar 5 kilometer sekitar daerah wabah harus divaksinasi darurat⁽³⁾.

Vaksinasi merupakan salah satu alat utama dalam program pengendalian dan penanggulangan AI di Indonesia, untuk pengendalian AI *clade* 2.1.3, Indonesia telah mampu memenuhi kebutuhan vaksin dengan produksi dalam negeri sejak tahun 2012. Pencapaian lainnya adalah ketika terjadi wabah AI *clade* 2.3.2, pemerintah berhasil melakukan isolasi virus dengan cepat untuk kemudian dikembangkan menjadi *seed* untuk produksi vaksin. Saat ini vaksin untuk *clade* 2.3.2 telah diproduksi dalam negeri. Dalam rangka program pengendalian dan penanggulangan AI secara bertahap, pemerintah telah mengembangkan *Road map* pembebasan AI dengan target Indonesia bebas AI pada tahun 2020 sejalan dengan target dari ASEAN⁽¹⁵⁾.

Sebuah vaksin yang efektif tidak hanya membutuhkan antigen yang baik tetapi juga *adjuvant* lebih baik untuk meningkatkan imunogenisitas antigen. *Adjuvant* ini digunakan untuk meningkatkan respon imun *humoral* dan seluler, tetapi *adjuvant* juga akan menyebabkan efek samping pada tubuh, seperti peradangan, kerusakan jaringan dan nyeri. Vaksin emulsi minyak bisa meningkatkan titer antibodi dan

memperpanjang jangka waktu imunitas. Namun, minyak mineral berada di tempat suntikan dalam waktu yang relatif lama, dan akan menyebabkan peradangan dan nekrosis jaringan lokal⁽³⁾.

Penyakit AI pada unggas yang disebabkan oleh virus AI H5N1 *clade* 2.1.3. telah berlangsung di Indonesia selama lebih dari 10 tahun. Pada akhir tahun 2012 dan awal tahun 2013 wabah AI yang biasanya menyerang ayam, mulai menyebabkan banyak kematian pada itik. Hasil pemeriksaan laboratorium menunjukkan adanya virus AI H5N1 *clade* 2.3.2. yang belum pernah ditemukan sebelumnya. Memasuki pertengahan sampai menjelang akhir tahun 2013, kejadian penyakit AI terus menurun secara signifikan, namun meningkat kembali pada akhir tahun 2013 sampai Februari tahun 2014⁽⁴⁾. *Masterseed* virus vaksin AI lokal yang dipergunakan sesuai dengan Surat Edaran Direktur Jenderal Peternakan tanggal 30 September 2009 tentang Kebijakan Vaksin AI yang menetapkan penggunaan 4 *masterseed* vaksin lokal H5N1 (strain Nagrak, Pekalongan, Garut, Purwakarta dengan isolat tantang strain Subang, dan Sukabumi) dan Kebijakan Strategi Vaksinasi AI Secara Tertarget⁽¹⁵⁾.

Program penting lainnya dalam pelaksanaan pengendalian dan penanggulangan penyakit hewan adalah peningkatan ketersediaan obat hewan yang bermutu. Adanya Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) telah memberikan jaminan bahwa obat yang beredar dan telah disertifikasi di Indonesia berkualitas dari segi mutunya⁽¹⁶⁾. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi vaksin AI inaktif *clade* 2.1.3 dan *clade* 2.3.2 selama tahun 2013 secara serologi dan uji tantang.

MATERI DAN METODE

Materi

Bahan yang digunakan meliputi ayam *Specific Pathogen Free* (SPF) umur 4 minggu sebanyak 40 ekor per sampel vaksin, vaksin AI inaktif 2 botol, antigen AI strain *A/Chicken/West Java-Subang/29/2007*, sel darah merah 1%, larutan *phosphate buffered saline* (PBS-Oxoid), *alsever*, iodium dan Telur Ayam Berembrio (TAB). Sampel terdiri dari tujuh vaksin AI inaktif strain lokal yang masuk ke BBPMSOH selama tahun 2013, vaksin tersebut berasal dari *clade* yang berbeda, yaitu *clade* 2.1.3 (vaksin A, B, C, D, dan G) dan *clade* 2.3.2 (vaksin E dan F)

Peralatan yang digunakan antara lain plat mikro 96 *well v-bottom* (Nunc), *pipette tips 10-100 µL*, *multichannel 1-100 µL*, *single channel 25-100 µL*, *pipet aids*, *biosecurity cabinet* (BSC) (Hitachi), *shaker*, kapas alkohol, masker N95, sarung tangan, *baker* plastik, *syringe 3 mL*, *needle 18 G* (Terumo), dan inkubator 37°C (Memmert).

Metode

Uji Potensi dengan Metode HI Test

Sepuluh ekor ayam SPF divaksinasi vaksin AI inaktif dengan 1 dosis/ekor secara *intra muscular* (IM) sedangkan 10 ekor lainnya tidak divaksinasi sebagai kelompok kontrol. Pada minggu ke-4 semua ayam, dikoleksi serumnya secara individual untuk uji HI dengan menggunakan antigen AI strain *A/Chicken/West Subang/29/2007*. Interpretasi hasil: Lebih dari 90% ayam pascavaksinasi memiliki titer antibodi $\geq 16^{(1)}$.

Uji *Haemagglutination* (HA) pada plat mikro

PBS pH 7,0-7,4 dimasukkan 0,025 mL ke dalam masing-masing sumuran pada plat mikro bentuk V. Antigen AI dimasukkan pada sumuran pertama sebanyak 0,025 mL. Selanjutnya antigen AI 0,025 mL diencerkan dua kali (1:2 sampai pengenceran 1:1028). Kemudian PBS 0,025 mL

dimasukkan pada semua sumuran. Sel darah merah 1% kemudian dimasukkan ke semua sumuran sebanyak 0,025 mL. Dihomogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan diinkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang (20-24°). Hasil dapat dibaca dengan memiringkan plat mikro ketika sel darah merah kontrol sudah turun ⁽¹⁴⁾.

Uji *Haemagglutination Inhibition* (HI)

PBS pH 7,0-7,4 sebanyak 0,025 mL dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran pada plat mikro bentuk V. Serum ayam potensi dimasukkan 0,025 mL ke dalam sumuran pertama. Lalu dibuat pengenceran dua kali 0,025 mL serum. Antigen AI strain *A/Chicken/West Subang/29/2007* 4 HAU dimasukkan 0,025 mL pada semua sumuran dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya RBC 1% dimasukkan 0,025 mL ke semua sumuran. Kemudian dihomogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan diinkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang. Hasil dibaca dengan memiringkan plat mikro agar terlihat ada tidaknya aliran sel darah merah. Aliran sel darah merah dianggap sebagai positif HI ⁽¹⁴⁾.

Uji Potensi dengan Metode Uji Tantang di Laboratorium *Animal Biosecurity Level 3* (ABSL-3)

Sepuluh ekor ayam SPF, umur 21-28 hari, divaksinasi 1 dosis secara IM. Sepuluh ekor ayam lainnya digunakan sebagai kelompok kontrol dan tidak divaksinasi. Dua puluh satu hari setelah vaksinasi, semua ayam ditantang dengan 0,1 mL isolat lapang virus AI galur ganas yakni virus AI strain *A/Chicken/West Subang/29/2007* dengan konsentrasi $10^{6,0} \text{EID}_{50}$ secara IM. Pengamatan dilakukan selama 14 hari.

Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila :

- a. Tidak kurang dari 90% ayam kelompok vaksinasi tetap sehat dan tidak menunjukkan gejala klinis penyakit AI, dan tidak kurang dari 90% ayam kelompok kontrol mati dengan menunjukkan gejala klinis penyakit AI.

- b. Tidak terjadi *shedding* virus setelah hari ke-7 pascatantang virus AI.

Prosedur uji *shedding* virus secara ringkas adalah sebagai berikut :

Hari ke-8 pascatantang virus, semua ayam kelompok vaksinasi diambil usap trakea dan kloaka untuk dianalisis *shedding* virus. Suspensi dari tiap usap diinokulasikan pada TAB, tiap sampel menggunakan 3 butir TAB umur 9-10 hari. Pengamatan dilakukan selama 7 hari. Pada hari ke-7 semua cairan allantoik telur diambil, lalu diulangi prosedur diatas sampai pasase ketiga. Cairan allantoik kemudian diuji dengan uji HA⁽²⁾.

HASIL dan PEMBAHASAN

Pengujian Potensi menggunakan metode uji HI

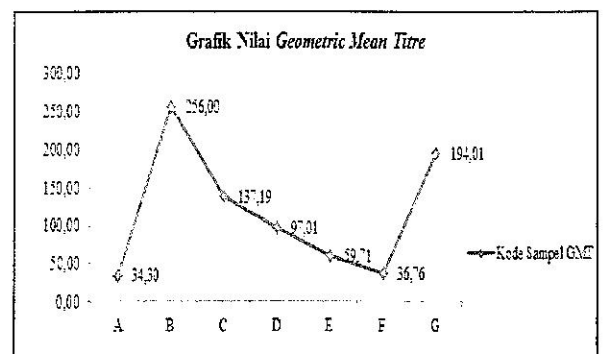
Pada tahun 2013 sampel vaksin AI inaktif lokal yang terdaftar di BBPMSOH ada 7 (tujuh) vaksin. Semua vaksin tersebut kemudian dilakukan uji di BBPMSOH diantaranya uji umum, uji inaktivasi, uji keamanan, dan uji potensi. Uji potensi dilanjutkan ke uji serologik dengan menggunakan metode uji HI dan ujiantang. Uji potensi vaksin AI inaktif dilakukan selama 4 minggu. Setelah waktu pengujian potensi vaksin AI inaktif kelompok ayam vaksinasi dan kontrol diambil darah, kemudian serum dipisahkan secara individual dan disimpan di kulkas suhu 4°C untuk dilakukan uji HI. Uji HI dan perhitungan antibodi secara *Geometric Mean Titre* (GMT) adalah teknik terbaik untuk mengukur tingkat perlindungan pada ayam yang divaksinasi dan untuk memeriksa efektivitas vaksin. Pengujian serupa pernah dilakukan oleh Meulemans *et al.* di dalam Faraz *et al.* (2009) yang melakukan penelitian menggunakan metode uji HI, *Agar Gel Precipitation* (AGP) dan ELISA untuk mengukur antibodi terhadap infeksi virus *avian influenza*.

Tabel 1. Hasil Geometric Mean Titre Vaksin AI

No.	Kode Sampel	GMT	Penilaian
1	A	34,296	MS
2	B	256	MS
3	C	137,187	MS
4	D	97,005	MS
5	E	59,714	MS
6	F	36,758	MS
7	G	194,011	MS

*MS : Memenuhi Syarat

Serum ayam yang telah dipisahkan secara individual selanjutnya diuji HI. Pada pengujian ini antigen AI yang digunakan adalah antigen AI *strain A/Chicken/West Subang/29/2007* yang merupakan antigen standar produksi Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA). Titer standar antigen AI yang digunakan adalah 4 HAU. Hal ini sesuai dengan OIE (2012), titer standar antigen yang digunakan pada uji HI yaitu 4 HAU dan 8 HAU. Hasil titer antibodi, seluruh vaksin AI inaktif menunjukkan hasil GMT berkisar 34,296 sampai dengan 256 (Tabel 1).



Gambar 1. Grafik Nilai Geometric Mean Titre (GMT) 7 vaksin AI

Nilai GMT masing-masing sampel vaksin AI dapat dilihat pada Gambar 1. Grafik nilai GMT tertinggi pada sampel vaksin kode B dengan nilai GMT yaitu 256 dan yang terendah kode A yaitu 34,296. Dari Tabel 1. vaksin AI inaktif A, B, D dan G (*clade* 2.1.3) memperlihatkan titer antibodi ayam kelompok vaksinasi dengan persentase $100\% \geq 16$ dan hasil titer antibodi ayam kelompok kontrol ≤ 4 . Begitu pula dengan vaksin AI inaktif C, E, dan F (*clade* 2.3.2) memperlihatkan hasil titer antibodi yang sama dengan persentase $100\% \geq 16$ dan titer antibodi kontrol ≤ 4 . Interpretasi hasil menurut FOHI (2007), 90% serum ayam memiliki titer antibodi $\geq 1:16$ (GMT: 4 Log 2) dan semua ayam kontrol mempunyai titer antibodi $\leq 1:4$. Nilai dan grafik GMT serum pengujian vaksin AI inaktif tahun 2013 dapat dilihat pada Tabel 1. dan Gambar 1.

Menurut OIE (2012) bahwa uji titer HI positif bila titer yang dihasilkan ≥ 16 (2^4 atau 4 log 2) bila menggunakan antigen AI, titer HA standar 4 HAU, namun bila uji titer HI positif yang dihasilkan ≥ 8 (2^3 atau 3 log 2) dengan menggunakan antigen AI titer HA standar yaitu 8 HAU. Penelitian lain menunjukkan hasil uji potensi terhadap vaksin AI inaktif strain lokal menunjukkan bahwa dari 8 sampel vaksin yang diambil 7 vaksin diantaranya mempunyai presentase 90-100% nilai titer HI ≥ 16 terhadap antigen AI H5N1 dengan antigen yang berasal dari *clade* 2.1.3 dan *clade* 2.3.2⁽⁸⁾.

Data Tabel 1. hasil titer HI menunjukkan perbedaan respon antibodi antar vaksin AI inaktif. Menurut Indriani R *et al.* (2011), bahwa perbedaan ini dapat disebabkan oleh kualitas vaksin (kandungan dari *massa* antigen vaksin, jenis *adjuvant* serta homogenitas), serta komparabilitas antigen vaksin dengan antigen yang digunakan dalam pengujian HI. Peneliti yang lain pun menyatakan variasi titer antibodi dapat dipengaruhi oleh beberapa kondisi diantaranya,

kesehatan ayam, jumlah virus yang menginfeksi, dan perbedaan waktu infeksi. Ayam yang sehat akan menunjukkan respon imun yang maksimal. Mekanisme imunitas dapat dipicu apabila dirangsang oleh paparan dosis virus yang cukup. Lamanya virus yang telah menginfeksi ayam juga mempengaruhi titer antibodi⁽⁸⁾. Selain itu menurut Kim *et al.* (2008) dalam penelitiannya memperlihatkan efikasi AI H5 rg dari 3 produk vaksin yang mengandung *clade* yang berbeda (*clade* 1, *clade* 2.2, dan *clade* 2.3.4), dengan jumlah protein HA $1\mu\text{g}$ per dosis mampu memberikan perlindungan pada itik domestik (Peking) dari klinis dan *shedding* terhadap infeksi virus H5N1 *clade* 2.3.4, walaupun titer antibodi AI H5 yang ditimbulkan rendah.

Pengujian Potensi menggunakan Metode Uji Tantang Vaksin AI inaktif ditantang dengan virus AI *clade* 2.1.3

Selain uji secara serologik yang dilakukan di BBPMSOH, vaksin AI inaktif harus dilakukan ujiantang. Sesuai dengan Surat Edaran Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan tanggal 20 Desember 2011 strain virusantang AI yang digunakan antara lain adalah virus AI *strain A/Chicken/West Subang/29/2007*.

Tabel 2. Hasil Uji Potensi Vaksin AI Inaktif dengan Metode Uji Tantang menggunakan Strain Virus AI Clade 2.1.3

No.	Kode Sampel	Strain	Hasil Uji	Hasil Shedding	Penilaian
1	A	<i>A/Chicken WJ.PWT-WIJ.2006 (Clade 2.1.3)</i>	100% Ayam kelompok vaksinasi Hidup dan Sehat, 100% Ayam Kelompok Kontrol mati	Negatif	MS
2	B	<i>A/Chicken WJ.PWT-WIJ/2006 (Clade 2.1.3)</i>	100% Ayam kelompok vaksinasi Hidup dan Sehat, 100% Ayam Kelompok Kontrol mati	Negatif	MS
3	C	<i>A/duck Sukoharjo/BBW-1428-9.2012 (Clade 2.3.2)</i>	100% Ayam kelompok vaksinasi Hidup dan Sehat, 100% Ayam Kelompok Kontrol mati	Negatif	MS
4	D	<i>A/Ck WestJava(Nagrak).30.2007 A/Ck.Runtang-Tangerang 019.2009 (Clade 2.1.3)</i>	100% Ayam kelompok vaksinasi Hidup dan Sehat, 100% Ayam Kelompok Kontrol mati	Negatif	MS
5	E	<i>A/duck Sukoharjo/BBW1428-9.2012 (Clade 2.3.2)</i>	100% Ayam kelompok vaksinasi Hidup dan Sehat, 100% Ayam Kelompok Kontrol mati	Negatif	MS
6	F	<i>A/duck Sukoharjo/BBW1428-9.2012 (clade 2.3.2)</i>	100% Ayam kelompok vaksinasi Hidup dan Sehat, 100% Ayam Kelompok Kontrol mati	Negatif	MS
7	G	<i>A/IPB-SGT/1.2004/H5N1-PR8 (Clade 2.1.3)</i>	100% Ayam kelompok vaksinasi Hidup dan Sehat, 100% Ayam Kelompok Kontrol mati	Negatif	MS

*MS : Memenuhi Syarat

Pengujian potensi vaksin AI inaktif dengan metode tantang dilakukan di laboratorium BSL3. Hal ini dilakukan karena virus AI bersifat zoonosis dan manipulasinya harus dilaksanakan di laboratorium BSL3. Pada pengujian ini ayam dikelompokkan menjadi 2 yaitu ayam vaksinasi dan ayam kontrol. Ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol setelah 21 hari pascavaksinasi ditantang dengan virus tantang AI strain *A/Chicken/West Subang/29/2007* dengan titer $10^{6.0} \text{EID}_{50}$ dengan dosis 0,1 mL. Pada hari ke-3 pascatantang ayam kelompok kontrol mulai terlihat gejala klinis antara lain ayam terlihat lemah, tidak nafsu makan dan merunduk. Hari ke-4 sampai dengan hari ke-7 semua ayam kelompok kontrol telah mati (Data tidak dilampirkan). Penelitian lain memperlihatkan hasil yang sama dimana kelompok ayam yang telah ditantang dengan

virus H5N1 memperlihatkan gejala klinis seperti kelesuan, duduk membungkuk, kegagalan berdiri tegak, turunnya sayap⁽¹¹⁾. Menurut Swayne *et al.* (2003), bahwa pada unggas masa inkubasi virus AI sangat pendek hanya membutuhkan beberapa jam, jika infeksi secara alami pada individual unggas sampai 3 hari dan pada kelompok/flok sampai 14 hari. Masa inkubasi tersebut tergantung pada berbagai faktor, antara lain: dosis virus, rute paparan, dan kemampuan mendeteksi gejala klinis.

Seluruh sampel vaksin AI ayam kelompok vaksinasi memperlihatkan hasil pascatantang sampai hari ke-14 adalah 100% hidup dan tidak ada gejala klinis. Hal ini sama dengan penelitian lain bahwa pada uji efikasi vaksin AI inaktif *bivalent* pada kelompok ayam vaksinasi ayam broiler dan ayam jantan yang ditantang dengan virus H5N1,

mendapatkan perlindungan 100% dan untuk kelompok ayam kontrol dari ayam broiler dan ayam jantan, mendapatkan perlindungan 0% ⁽¹²⁾. Menurut Indriani *et al.* (2011) bahwa vaksin AI yang homolog subtipenya dengan virusantang memiliki tingkat proteksi yang lebih tinggi.

Hari ke-8 pascatantang untuk ayam kelompok vaksinasi dilakukan pengambilan usap pada kloaka dan trakea, yang akan dilanjutkan ke uji *shedding*. Uji *shedding* dilakukan dengan menginokulasikan usap trakea dan kloaka ke dalam 3 butir TAB SPF dan dilakukan pasase 3 kali. Pada hari ke-7 semua telur dipanen cairan allantoisnya secara individual, dan dilakukan uji HA. Hasil uji *shedding* semua vaksin AI menunjukkan negatif *shedding* virus (vaksin A, B, C, D, E, F, dan G) (Tabel 2). Sampel vaksin AI tersebut *shedding* virus dinyatakan negatif, berarti memenuhi syarat kelulusan hasil uji mutu vaksin dan hasil ini sesuai dengan persyaratan yang terdapat pada FOHI (2013) bahwa salah satu persyaratan untuk lulus uji vaksin AI inaktif adalah tidak terjadi *shedding* setelah hari ke-7. Hal ini mirip dengan penelitian Indriani R *et al.* (2011) bahwa kelompok ayam yang divaksinasi vaksin AI H5N1 yang ditantang dengan virus H5N1 memberikan perlindungan 100% dan *shedding* virus mulai tidak terdeteksi pada hari ke-8 pascatantang.

Vaksin AI inaktif *clade* 2.3.2

Sampel vaksin C, E, dan F merupakan vaksin yang mengandung *seed* virus AI asal itik (Tabel 3). Pengujian vaksin AI yang mengandung *seed* virus asal itik direkomendasikan menggunakan 2 jenis virusantang yaitu virus standar (*A/Chicken/West Subang/29/2007/clade 2.1.3*) dan virus homolog (*A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 clade 2.3.2*). Menurut Andesfha *et al.* (2013) bahwa hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa virus dari itik merupakan varian baru di Indonesia yang termasuk dalam *clade* 2.3.2 dengan pola *cleavage*

site PQRESRRKKR, dan memiliki tingkat homologi yang rendah dengan virus AI yang beredar di Indonesia yaitu *clade* 2.1.3 dengan pola *cleavage site* PQRERRRKR. Hasil tantang dengan menggunakan virusantang dengan *clade* 2.1.3 dapat dilihat pada Tabel 2.

Virus strain asal itik tersebut virus AI yang mengalami perubahan *antigenic drift*. *Antigenic drift* merupakan keadaan di mana virus AI mengalami mutasi dengan adanya perubahan urutan nukleotida pada gen HA atau NA atau keduanya. Sifat virus ini selalu dikaitkan dengan timbulnya suatu epidemi dari penyakit tersebut. Walaupun subtipenya sama, tetapi mempunyai nilai homologi yang berbeda di antara subtype tersebut. Berkaitan dengan reaksi netralisasi yang dilakukan oleh antibodi maka terlihat sangat erat hubungannya dengan epitop (*antigenic determinants*) yang dimiliki oleh protein HA dan NA. Protein permukaan HA memiliki 5 epitop dan protein NA memiliki 4 epitop. Bila terjadi mutasi pada gen HA dan NA, karena sifat *antigenic drift*, maka dapat merubah susunan atau bahkan menghilangkan epitop yang terdapat pada HA dan NA, sehingga tidak dapat dikenali oleh antibodi yang sudah ada di dalam tubuh unggas dan tidak bisa diatasi oleh vaksin yang ada ⁽¹⁴⁾.

Tabel 3. Hasil Uji Potensi Vaksin AI Inaktif dengan Metode Uji Tantang Menggunakan Strain Virus AI Clade 2.3.2

No	No. Uji	Strain	Hasil Uji PT	Hasil Shedding	KET
1	C	<i>A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012</i>	100% itik kelompok vaksinasi hidup, 100% itik gejala klinis dan mati	Negatif	MS
2	E	<i>A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012</i>	100% itik kelompok vaksinasi hidup dan sehat, 100% itik kelompok kontrol mati	Negatif	MS
3	F	<i>A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012</i>	100% itik kelompok vaksinasi hidup dan sehat, 100% itik kelompok kontrol mati	Negatif	MS

*MS : Memenuhi syarat, KET: keterangan

Vaksin AI inaktif C, E, dan F *clade* 2.3.2 diuji dengan menggunakan itik *chicken antibody negative* (SAN) dengan umur yang sama yaitu 4 minggu. Kelompok itik divaksinasi dengan vaksin C, E, dan F, 1 dosis secara IM. Setelah 21 hari pascavaksinasi itik kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol ditantang dengan AI *strain A/duck/Sukoharjo/BBVW 1428-9/2012* dengan titer yang sama yaitu $10^{6,0}$ EID₅₀ dengan dosis 0,1 mL. Hari ke-2 pascatantang itik diamati dan itik kelompok kontrol mulai lemah, agak merunduk, kurang nafsu makan. Hari ke-3 sampai hari ke-6 pascatantang itik kontrol mulai terjadi kematian. Dari hasil kajian patologi, gejala klinis pada itik terlihat sakit, *tortikolis*, paralisa pada kaki, dan keputihan pada mata. Lesi makroskopis itik yang paling dominan berupa *multifokal nekrotik* dengan infiltrasi limfosit yang disertai *perivascular cuffing* ⁽⁵⁾. Hasil ini mirip dengan yang diteliti oleh Kim *et al.* (2008), bahwa pada uji efikasi vaksin H5N1 pada itik, sehari pascatantang ayam kontrol memperlihatkan gejala yang ringan, terlihat pula gejala syaraf, dan kematian itik kontrol dimulai pada hari ke 4 sampai dengan hari ke-5 pascatantang. Perlakuan yang sama dengan vaksin AI inaktif *clade* 2.1.3 pada saat uji *shedding*, vaksin AI inaktif *clade* 2.3.2 pada hari ke-8 itik kelompok vaksinasi

diambil usap trakea dan kloaka. Kemudian diinokulasikan ke-3 butir TAB SPF dan dilakukan pasase 3 kali. Selanjutnya telur tersebut dipanen cairan allantoisnya secara individual, dan dilakukan HA. Hasil *shedding* virus dari vaksin AI *clade* 2.3.2 adalah negatif. Hasil *shedding* virus tersebut sesuai dengan FOHI (2013) bahwa salah satu persyaratan untuk lulus uji vaksin AI inaktif adalah tidak terjadi *shedding* setelah hari ke-7. Pada penelitian lain bahwa itik yang telah divaksinasi dengan vaksin AI H5N1 ditantang dengan virus AI H5N1, pada hari ke 3,5,7 dan 10 pascatantang memperlihatkan hasil *shedding* negatif ⁽¹³⁾. Seluruh vaksin AI inaktif pada tahun 2013 baik yang berasal dari *clade* 2.1.3 dan *clade* 2.3.2 dilihat dari uji potensi secara serologik dan uji tantang memiliki hasil yang sesuai yaitu memenuhi syarat. Secara uji HI, titer antibodi vaksin AI inaktif ≥ 16 (2^4 atau $4 \log 2$). Hasil uji tantang di laboratorium BSL3 kelompok ayam dan itik yang divaksinasi 100% hidup dan tidak ada gejala klinis, sedangkan untuk kelompok kontrol adalah 100% mati. Vaksin AI *clade* 2.3.1 dan *clade* 2.3.2 hasil *shedding* virus menunjukkan hasil negatif (Tabel 2 dan Tabel 3). Maka pembahasan tersebut di atas, menunjukkan bahwa vaksin AI inaktif dengan pengujian tantang di laboratorium BSL3, hasil yang didapatkan memenuhi syarat kualitas mutu vaksin^(1,2).

KESIMPULAN

1. Potensi vaksin AI inaktif *clade 2.1.3* dan *clade 2.3.2* dengan metode uji secara serologik dan secara uji tantangan di laboratorium BSL-3 menunjukkan hasil yaitu memenuhi syarat kualitas mutu vaksin.
2. Vaksin AI inaktif yang homolog dengan virusantang memiliki tingkat proteksi yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Anonim.** 2007. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 3. Direktorat Kesehatan Hewan. Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan. Departemen Pertanian. Hal.: 59-60
2. **Anonim.** 2013. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid I (Sediaan Biologik) Edisi 4. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian. Hal.: 69-70
3. **Anonim.** 2014. Penyakit viral (AI & POX). www.imbang.staff.umm.ac.id diunduh tanggal 5 Oktober 2014
4. **Anonim.** 2014. Balitbangtan Kembangkan Vaksin *Seed* Virus AI H5N1 *clade 2.3.2*. Info Aktual Berita Balitbangtan.htm. www.litbang.pertanian.go.id diunduh tanggal 4 Januari 2015
5. **Irawati CD., Budiantono., Kamal M., Emilia., Ramlah., Setiawaty R., Suryati Y., Djusa ER., Mucharini H., Wisindie R. & Kusumastuti MD.** 2013. Kajian Patologi Unggas yang Telah Diinfeksi Dengan Virus *Avian Influenza H5N1 Clade 2.3.2* Pada Kandang BSL3. Prosiding RATEKPIL Kesehatan hewan 2013 Vol. 1 No. 4. Hal. : 46-63.
6. **Darmawi., Manaf ZH., Darniati., Fakhurrrazi., Abrar A. & Erina.** 2012. Deteksi Antibodi Serum Terhadap Virus *Avian Influenza* Pada Ayam Buras. *Agripet* Vol 12, No. 1: 23-27, April.
7. **Deborah M., Bingham J., Selleck P., Lowther S., Gleeson L., Lehrbach P., Robinson S., Rodenberg J., Kumar M. & Andrew M.** 2007. *Efficacy Of Inactivated Vaccines Against H5N1 Avian Influenza In Ducks.* *Virology* 359: 66-71
8. **Emilia., Ramlah., Setiawaty R. & Suryati Y.** 2014. Pengkajian Mutu Vaksin *Avian Influenza* (AI) Pada Beberapa Provinsi di Indonesia. *Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan* No.21 Tahun 2014. Hal.: 28-33.
9. **Andesfha E., Ramlah., Natih KKN., Djusa ER. & Mucharini H.** 2013. Identifikasi Molekular Dinamika Genetik Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 *Clade 2.1.3* dan *Clade 2.3.2*. *Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan* No. 20 Tahun 2013. Hal.: 34-45.
10. **Faraz S., Abubakar M., Farooque M., Fazlani SA. & Jaffar GH.** 2009. *Comparative Study Of Haemagglutination Inhibition, Agar Gel Precipitation Test, Serum Neutralization And Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection To Avian Influenza Viruses.* Vol.2, No.2, 97-100 (2010) doi:10.4236/health.2010.22016.
11. **Indriani R., Dharmayanti NLPI. & Adjid RMA.** 2011. Tingkat Proteksi Beberapa Vaksin *Avian Influenza* Unggas Terhadap Infeksi Virus Isolat Lapangan *A/chicken/West-Java/Smi-pat/2006* dan *A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008* Pada Kondiasi Laboratorium. *JITV* 16(2): 153-161.
12. **Indriani R. & Dharmayanti NLPI.** 2013. Studi Efikasi Vaksin *Bivalen* AI Isolat Lokal Terhadap Beberapa Karakter Genetik Virus AI subtipe H5N1. *Jurnal Biologi Indonesia* 9(1): 21-30

13. Kim JK., Seiler P., Forrest HL., Khalenkov AM., Franks J., Kumar M., Karesh WB., Gilbert M., Sodnamdarjaa R., Douangneun B., Govorkova EA. & Webster RG. 2008. *Pathogenicity and Vaccine Efficacy of Different Clades of Asian H5N1 Avian Influenza A Viruses In Domestic Ducks*. J.Virol. vol.82 no. 22 11374-11382.
14. (OIE) *Office International Des Epizooties*. 2012. OIE Terrestrial Manual. Avian Influenza. Chapter 2.3.4. www.oie.int diunduh tanggal 20 November 2014
15. Pudjiatmoko. 2012. Kebijakan Penggunaan Vaksin Flu Burung. Jurnal atani tokyo. htm.atanitokyo.blogspot.com diunduh tanggal 20 November 2014
16. Suseno PP. 2014. Dukungan Kesehatan Hewan Bagi Pembangunan Peternakan Indonesia. keswan.ditjennak.pertanian.go.id diunduh 20 November 2014.
17. Swayne DE. & Havorson DA. 2003. *Influenza*. Editor Saif YM dalam Disease of Poultry. Edisi 11. Blackwell Publishing. Hal.: 135-160.