

PURIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA (AI) H5N1 CLADE 2.3.2 SEBAGAI MASTERSEED VIRUS AI CHALLENGE

Ramlah, Rahajeng Setiawaty, Emilia, Yati Suryati, Enuh Rahardjo Djusa

Unit Uji Virologi

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

ABSTRAK

Avian Influenza merupakan penyakit zoonosa yang menginfeksi saluran pernafasan unggas dan mammalia. Virus Influenza A orthomyxovirus yang secara alami mempengaruhi unggas. Banyak spesies unggas menunjukkan kepekaan terhadap infeksi virus influenza A dan unggas air adalah reservoir utama virus. Sampai sekarang sudah dikenali 16 subtype H (H1-H16) dan 9 subtype N (N1-N9). Virus *highly virulent* influenza A yang menghasilkan penyakit klinis akut pada ayam, kalkun dan unggas lain yang mempunyai arti penting secara ekonomis dikaitkan dengan subtype H5 dan H7. Kebanyakan virus subtype H5 dan H7 yang diisolasi dari unggas *low virulen* pada *poultry*, tetapi resiko virus H5 atau H7 *low virulence* menjadi virulen akibat mutasi, sehingga semua virus H5 dan H7 diidentifikasi sebagai *Notifiable avian influenza (NAI)*. Pengkajian dilakukan terhadap virus AI clade 2.3.2 dengan cara mempurifikasi isolat lapang dan membuat masterseed. Isolat yang berasal dari organ itik di propagasi kemudian di pasase pada telur SPF, dipanen dan dihitung titernya serta dilakukan reaksi silang dengan berbagai serum hyperimmune AI. Selanjutnya isolat virus dikarakterisasi dengan cara dipasase berulang kali dengan cara yang sama. Virus AI asal bebek atau itik yang telah terpurifikasi dan dijadikan master seed yaitu 2 kode isolat virus IB (asal Sukoharjo) dan IIIA (asal Sleman). Titer virus AI asal itik dilakukan pada telur SPF dan sel MDCK. Titer virus AI pada telur SPF kode IB (asal Sukoharjo) $10^{7.9}EID_{50}$ dan kode IIIB (asal Sleman) $10^{7.9}EID_{50}$. Pada sel MDCK titer isolat IB (asal Sukoharjo) $10^{4.5}TCID_{50}$.

Kata kunci: purifikasi, virus AI, masterseed, itik

ABSTRACT

Avian Influenza is a zoonotic disease that infects the avian and mammalian respiratory tract. Influenza Virus A orthomyxovirus that naturally affects poultry. Many poultry species shows sensitivity to influenza A virus infection and waterfowl is the main reservoir of the virus. To recent, 16 subtypes H (H1-H16) and 9 N (N1-N9) subtypes have been identified. Highly virulent influenza A virus that produces acute clinical disease in chickens, turkeys, and other poultry that are economically important are associated only with subtypes H5 and H7. Most H5 and H7 subtype viruses are isolated from low virulence in poultry, but the risk of H5 or H7 low virulence virus becomes virulent due to mutations, so that all H5 and H7 viruses are identified as Notifiable Avian Influenza (NAI). The assessment was carried out on AI clade 2.3.2 virus by purifying field isolates and producing masterseed. The isolates originating from the duck organs were propagated and passaged in SPF eggs, harvested, counted titer and cross reacted with

various serum of hyperimmune AI. Then isolates of virus were characterized by re-passaged. AI virus from duck that has been purified and produced as master seed was 2 codes isolates IB virus (origin Sukoharjo) and IIIA (origin Sleman). AI viral titers from the origin of ducks were done on SPF and MDCK cells. Titer of AI virus in egg SPF code IB (origin Sukoharjo) $10^{7.9}EID_{50}$ and code IIIB (origin Sleman) was $10^{7.9}EID_{50}$. In MDCK cell isolate IB titer (origin Sukoharjo) was $10^{4.5}TCID_{50}$.

Keywords: *purification, AI virus, masterseed, duck*

PENDAHULUAN

Penyakit flu burung atau *Avian Influenza* (AI) adalah penyakit zoonosa yang sangat fatal. Penyakit ini menginfeksi saluran pernapasan unggas dan juga mamalia. Penyakit ini ditempatkan sebagai *Notifiable avian influenza* (NAI) oleh *Office International Des Epizooties* (OIE). disebabkan oleh infeksi virus-virus dari famili *Orthomyxoviridae* dan ditempatkan pada genus *influenzavirus A*. Virus Influenza A hanya orthomyxovirus yang secara alami mempengaruhi unggas. Banyak spesies unggas menunjukkan kepekaan terhadap infeksi virus influenza A dan unggas air adalah reservoir utama virus ini. Sampai sekarang sudah dikenali 16 subtipe H (H1-H16) dan 9 subtipe N (N1-N2). Virus *highly virulent* influenza A yang menghasilkan penyakit klinis akut pada ayam, kalkun dan unggas lain yang mempunyai arti penting secara ekonomis dikaitkan dengan subtype H5 dan H7. Kebanyakan virus subtype H5 dan H7 yang diisolasi dari unggas low virulen untuk *poultry*, tetapi resiko virus H5 atau H7 *low virulence* berubah menjadi virulen akibat mutasi, sehingga semua virus H5 dan H7 diidentifikasi sebagai *Notifiable avian influenza* (NAI) ⁽⁵⁾.

Kasus AI H5N1 di Indonesia pertama kali dilaporkan pada bulan Agustus 2003, menyerang beberapa peternakan ayam ras komersial di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Direktur Jenderal Peternakan pada tanggal 25 Januari 2004 dan dengan Surat Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 96/KPTS/PP.620/2/2004 tanggal 3 Pebruari 2004 tentang Pernyataan Berjangkitnya Wabah Penyakit Hewan Menular *Influenza* pada Unggas (*Avian Influenza*) di beberapa provinsi di wilayah Indonesia, sebagaimana telah diubah terakhir dengan Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 393/Kpts/PD.620/7/2007, menetapkan bahwa Indonesia telah terjangkit wabah penyakit AI pada unggas yang disebabkan oleh virus *influenza* tipe A subtipe H5N1 yang tergolong *Highly Pathogenic Avian Influenza* (Ditjennak 2008). Kasus ini kemudian meluas ke berbagai daerah di Indonesia dan telah menyerang berbagai jenis unggas.

Akhir tahun 2012 penyakit *Avian influenza* (AI) merebak kembali. Wabah penyakit ini terjadi pada itik bukan pada ayam seperti tahun sebelumnya. Laporan terakhir menyebutkan bahwa sedikitnya 320.000 bebek atau itik di Jawa Tengah, Jawa Barat, dan Jawa Timur mati diduga akibat terserang virus flu burung. Virus flu burung yang menyerang itik lokal ini ditemukan pertama kali di Indonesia dan merupakan clade atau virus flu burung yang baru ⁽⁴⁾.

MATERI DAN METODE

Materi

Telur SPF bertunas umur 9-11 hari, PBS + PSK, Monolayer CEF, Kapas alkohol, *Maintenance medium*,

Tabel 1. Isolat organ Virus AI asal Itik :

No	Virus	Spesies	Lokasi	Asal lab	Tahun
1	A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012	Itik	Sukoharjo	BBVW	2012
2	A/duck//Sleman/BBVD 1463-10/2012	Itik	Sleman	BBVW	2012

Peralatan

Safety cabinet, inkubator, sentrifuge dingin, Filter 0,22, tabung sentrifuge, rak telur, stirrer, *disposable syringe*, *micropipet* dan *tip*, *microplate 96 well*, *pipet Aid*, MDCK (*Madin Darby Canine Kidney cell line*), CEF (*Chicken Embrio Fibroblast Cell*), *microplate 24 well*.

Propagasi Virus

Propagasi virus dilakukan dengan menggunakan telur ayam SPF berembrio umur 10 hari. Isolat virus AI dari itik, dilakukan pengenceran 10x dengan pelarut PBS + PSK 1%, dan di filter. Diinokulasikan sebanyak 0.1 ml virus AI pada khorio allantois (CA) telur SPF. Masing-masing isolat virus di inokulasikan ke 2 telur SPF, tutup lubang telur dengan lilin/*paraffin*. Inkubasikan dalam inkubator suhu 37°C selama 4-7 hari. Panen cairan allantois secara individual dan dilakukan cek hemaglutinasi (HA) cepat, jika positif ada aglutinasi, maka cairan allantois di*pool* pada tabung sentrifuge. Sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan diambil, dan dilakukan uji HA cepat dan HA lambat dengan RBC 1 %. Hasil panen propagasi

isolat virus asal itik ini disebut *pasasse I (PI)*. *Pasasse* isolat virus asal itik dilakukan sebanyak 4 kali dengan metode yang sama.

Hasil HA dari *pasasse I* yang positif dilanjutkan dengan uji hemaglutinasi inhibisi (HI) terhadap serum AI (*Avian Influenza*) dan Serum ND (*Newcastle Disease*). Uji HI dilakukan terhadap serum AI dan serum ND dengan posfat buffer saline (PBS) dengan pengenceran seri kelipatan 2 didalam *microplate* dasar V, sehingga diperoleh 2 kali lipat, 4 kali lipat, 8 kali lipat dan seterusnya sampai 12 kali pengenceran . Setiap pengenceran volume sebanyak 0,025 ml, mengacu pada OIE (2012).

Metode Pembuatan CEF

Growth medium mengandung FBS (*Foetal Bovine Serum*) dengan konsentrasi 5%. Maintenance Medium mengandung FBS dengan konsentrasi 1%. Larutan tripsin 0,025% sebanyak 10 ml ditambahkan kedalam larutan PBS+PS1% sebanyak 90 ml. Setelah telur dicandling untuk melihat embrio, 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 5 menit. Tabung sentrifuse sebanyak 2 buah disiapkan, suspensi jaringan disaring dengan filter kawat kemudian dimasukkan kedalam tabung sentrifuse dan disentrifuse 1000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya supernatan dibuang, dan *pellet* yang didasar tabung ditambahkan media *Growth Medium* (GM) dan dilakukan pipeting dengan menggunakan pipet komagome sebanyak 5 ml ke masing-masing tabung sentrifuse, kemudian larutan media sel dijadikan ke satu tabung, disentrifuse kembali dengan kecepatan 1000 rpm, selama 5 menit. Kemudian supernatan dibuang dan *pellet* sel ditambahkan GM sebanyak 20 ml, dilakukan pipeting dan dilakukan penghitungan sel dengan menggunakan kamar hitung. Penghitungan sel sebanyak 10^6 (1 Juta Sel), kemudian didistribusikan ke *cell culture dish* sebanyak 5 ml, dan diamati sampai terbentuk monolayer sel.

Pengenceran serum dibuat dengan kelipatan 10 x dari 10^{-1} sampai 10^{-5} . Buang cairan dari monolayer CEF. Inokulasikan 0.1 ml pengenceran virus/ well ke dalam monolayer CEF. Setiap pengenceran memakai 5 well. Inkubasikan pada inkubator CO_2 37°C selama 1 jam. Tambahkan

1 ml/well *maintenance medium*. Diinkubasikan selama 7 hari dalam inkubator CO₂ 37°C. Diamati setiap hari adanya *Cytopathic effect* (CPE).

Uji patogenitas pada biakan sel primer *chicken embryo fibroblast* (CEF) dilaksanakan dengan cara menginfeksi isolat virus pada biakan tersebut tanpa penambahan tripsin. Virus yang dapat menyebabkan timbulnya *cytopathic effect* (CPE) pada sel tersebut tanpa penambahan tripsin berarti merupakan virus patogen (7).

Hasil dan Pembahasan

Tabel 2. Hasil Pasase 1(P1) isolat itik

Isolat	Kematian	HA Cepat	Titer HA
A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012 (I A)	Hidup	(-)	<2
A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012 (I B)	Embrio mati 48 jam	(+)	128
A/duck//Sleman/BBVD 1463-10/2012 (IIIA)	Hidup	(-)	<2

Dua (2) isolat virus asal itik yang diperoleh dari BBVet Wates , diinokulasikan ke telur SPF masing-masing 2 butir dan setelah dilakukan panen dilakukan uji HA cepat dan lambat. Dari HA cepat diperoleh hasil negatif dari 2 sampel yaitu sampel nomor IA, IIIA dan 1 sampel positif yaitu IB . dari HA lambat diperoleh kisaran titer antara <2 sampai 128. Hasil dapat dilihat di tabel 2. Menurut Fakhrrurazi dan Budiman H (2009), karakteristik terhadap virus AI meliputi sifat pertumbuhan pada telur ayam berembrio berumur 9-11 hari, kemampuan melakukan hemaglutinasi serta hambatan hemaglutinasi yang dalam hal ini digunakan untuk identifikasi serologis terutama untuk menganalisis antigen influenza

Isolat itik yang memiliki titer HA 128 (IB) di karakterisasi dengan uji HI, menggunakan antisera postvaksinasi yaitu antisera AI strain Nagrag, Purwakarta, dan antisera ND strain Lasota, B1, Clone, Komarov. Dari hasil yang ditunjukkan pada tabel 3 dapat dilihat bahwa isolat asal itik dengan antisera postvaksinasi AI lebih tinggi titernya dibandingkan dengan antisera postvaksinasi ND.

Tabel 3. Hasil HI Isolat AI asal itik

Antisera	Titer Antigen
	Isolat AI IB
AI strain Nagrag	32

AI strain Purwakarta	64
ND strain Lasota	<2
ND strain B1	<2
ND strain Clone	<2
ND strain Komarov	2

Untuk memperkuat hasil karakterisasi diatas, maka dilakukan uji reaksi silang antara isolat virus (IB, IIIA, AI strain Legok, AI strain Subang, ND strain Lasota, ND strain G7, ND strain Sato, dan ND strain ITA) dengan antisera postvaksinasi yaitu AI strain Purwakarta (PWT), AI strain Nagrak, AI strain legok, ND strain lasota, ND strain G7, ND strain Sato, dan ND strain ITA. Diperoleh gambaran hasil reaksi silang antara antisera postvaksinasi AI dengan isolat virus asal itik memiliki titer yang lebih tinggi, dibandingkan dengan antisera postvaksinasi ND lebih rendah. Sedangkan antisera postvaksinasi ND strain ITA, hasil titer reaksi silang umumnya sebesar 8 dengan isolat virus asal itik, dan >256 dengan virus ND strain Lasota, G7, Sato dan ITA, hal ini disebabkan karena antisera postvaksinasi ND strain ITA merupakan hasil vaksinasi dengan vaksin kombinasi antara ND-AI-IB (Tabel 4).

Tabel 4 . Hasil crossreaksi uji HI isolat virus dengan antisera Legok, Subang, ND Lasota, ND G7, ND sato, ND ITA

No	Strain Virus	AI IB (P1)	AI IIIA	AI Legok	AI Subang	ND Lasota	ND G7	ND Sato	ND ITA
	HA	256	64	256	512	1024	256	256	256
	Serum	256	64	256	512	1024	256	256	256
1	PWT	256	128	128	32	<2	<2	<2	<2
		256	128	128	32	<2	<2	<2	<2
2	Nagrak	64	32	256	64	<2	<2	<2	<2
		64	32	256	64	<2	<2	<2	<2
3	Legok	64	32	256	16	2	2	2	2
		64	32	256	16	2	2	2	2
4	Lasota	<2	<2	<2	<2	128	128	256	256
		<2	<2	<2	<2	128	128	256	256
5	G7	<2	<2	<2	<2	>256	256	256	256
		<2	<2	<2	<2	>256	256	256	256
6	Sato	<2	<2	<2	<2	32	16	16	16
		<2	<2	<2	<2	32	16	16	16
7	ITA	8	4	8	8	>256	>256	256	256

		8	4	8	8	>256	>256	256	256
--	--	---	---	---	---	------	------	-----	-----

Selanjutnya tahapan karakterisasi isolat virus asal itik, dilakukan Pasase berulang kali dengan cara yang sama. Menurut Swayne *et al* (2003), umumnya pada inokulasi pertama, pertumbuhan virus belum memiliki kemampuan mengaglutinasi sel darah merah dan selanjutnya dilakukan kembali pasase. Sampel nomor IB dilakukan pasase ke-2 pada telur SPF sebanyak 5 butir dan kematian telur terjadi pada hari ke-2 post inokulasi. Titer yang diperoleh yaitu $10^{8.5}$ EID₅₀ (Tabel 5). Sedangkan sampel nomor III dilakukan pasase ke-2 di telur SPF masing-masing 2 dan 3 butir. Diperoleh titer masing-masing lebih dari 10^5 EID₅₀. (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil Titer Telur Pasase ke-2 (EID₅₀)

No	Virus	Titer P2
1	A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012 (IB)	$> 10^{8.5}$ EID ₅₀
2	A/duck//Sleman/BBVD 1463-10/2012 (IIIA)	$> 10^{5.5}$ EID ₅₀

Sebagian dari hasil panen isolat dari pasase-2 dititrasikan pada sel monolayer asal embrio bebek dimulai dari pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} . (Tabel 6)

Tabel 6. Hasil Inokulasi dari DEF (Duck Embrio Fibroblast) ex P2

Isolat Bebek Wates (10/12/12)		Hasil	HA Lambat	
A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012 (IB)	10^{-7}	+ CPE	8	M enurut Kuchipu di <i>et al</i>
	10^{-8}	+ CPE	4	
	10^{-9}	+ CPE	<1	
A/duck//Sleman/BBVD 1463-10/2012 (IIIA)	10^{-7}	+ CPE	8	
	10^{-8}	+ CPE	4	
	10^{-9}	+ CPE	<1	
	10^{-9}	+ CPE	<1	

(2012) inokulasi virus AI pada sel DEF (*Duck Embrio Fibroblast*) menghasilkan kematian sel (*CPE*) lebih tinggi dibandingkan dengan CEF (*Chicken Embrio Fibroblast*). Kerusakan sel (*CPE*) pada *Duck Embrio cell* terjadi pada 24-48 jam post infeksi, hal ini dapat dilihat di gambar 1 dan 2, dimana terjadi *CPE* dari setiap pengenceran yang dilakukan. Setelah terlihat adanya *CPE* pada sel, maka dilakukan pasase ke telur ayam dan bebek untuk purifikasi virus.



Gambar 1. *Duck Embryo Fibroblast (DEF)* normal



Gambar 2. *Duck Embryo Fibroblast (DEF)* dengan CPE

Tabel 7. Hasil Titer Telur Pasase ke-3 dan ke-4 (EID₅₀)

No	Virus	P3 (Telur Bebek SPF)	P4 (Telur ayam SPF)
1	A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012 (IB)	10 ^{8,5} EID ₅₀	10 ^{7,9} EID ₅₀
2	A/duck//Sleman/BBVD 1463-10/2012 (IIIA)	> 10 ^{8,1} EID ₅₀	10 ^{7,9} EID ₅₀

Isolat virus AI asal itik atau bebek, dilanjutkan dengan pasase ke-3 dengan menggunakan telur bebek SPF dengan hasil titer pada Tabel 7. Kemudian kembali dilakukan pasase ke-4 pada telur ayam SPF dengan masing-masing isolat AI mempunyai titer yang sama yakni 10^{7,9} EID₅₀ (Tabel 7). Pemilihan isolat virus asal itik ini, didasarkan diantaranya dari hasil uji HA. Dimana pada tiap pasase isolat virus itik di peroleh titer AI untuk isolat IB lebih konstan dengan titer HA sebesar 256 HAU dan IIIA dengan titer 64 HAU. Standar tes Isolasi virus AI yakni dari hasil panen cairan allantois, memiliki aktivitas mampu mengaglutinasi sel darah merah ⁽⁹⁾. Peran hemaglutinasi (gen HA) yang dihasilkan oleh virus AI digunakan sebagai penentu virus AI subtype H5N1. Gen HA adalah sebagai pembeda utama dalam patogenitas pada ayam. Tetapi kumpulan dari 8 segmen gen dibutuhkan agar virulensinya bisa terlihat secara maksimal. Secara

singkat, meleluknya gen HA menjadi protein HA1 dan HA2 sangat dibutuhkan oleh virus agar infeksius dan memproduksi replikasi yang berulang, HPAI virus mempunyai gen HA yang meleluk pada ubikoulus protease furin yang ada pada banyak sel dari organ dalam sistem syaraf dan sistem kardiovaskular ⁽⁹⁾.

Titer dengan menggunakan telur bebek SPF lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan telur ayam SPF. Hal ini dikarenakan isolat virus AI tersebut berasal dari itik atau bebek. Setelah dilakukan pasase sekaligus propagasi dilanjutkan dengan *Serum Netralisasi* (SN) antar isolat virus dengan hyperimun berikut : Isolat IB + hyperimun legok, isolat IB + hyperimun purwakarta (pwt), dan isolat IB + hyperimun Nagrak dan diinokulasi sebanyak 0,1 ml/butir ke telur SPF.

Hasil SN antar isolat dengan hyperimun kemudian dipanen dan diinokulasikan pada sel MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) dari mulai pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-8} . Titer dari isolat IB pada sel sebesar $10^{4.5}TCID_{50}$ dan dapat dilihat pada tabel 8. Titer yang diperoleh pada sel MDCK masih tergolong rendah dibandingkan titer pada telur SPF, karena virus AI asal isolat bebek belum beradaptasi dengan sel MDCK.

Tabel 8. Hasil pengenceran isolat pada sel MDCK

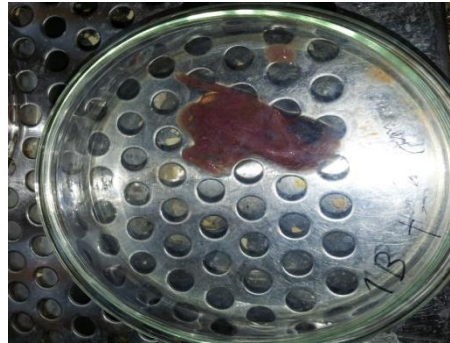
Pengenceran							
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-

Keterangan: Positif = CPE (Cytophatic Effect), Negatif = Tidak terlihat CPE

Dimulai dari pengenceran 10^{-1} sampai dengan pengenceran 10^{-8} (Tabel 8) cairan sel yang timbul CPE dikumpulkan (*pooled*) ke dalam masing-masing 1 tabung. Pada pengenceran 10^{-4} dimana CPE terakhir timbul, dinokulasikan sebanyak 0,5 ml suspensi ke dalam sel MDCK berukuran 25 ml dan diinkubasikan ke dalam inkubator CO2 5%, setelah itu dilakukan pengamatan timbulnya CPE selama 5 hari. Dari hasil pengamatan selama 5 hari, tidak terlihat adanya CPE pada flask yang berisi isolat IB + hyperimun nagrak, dengan isolat IB + hyperimun Legok. Hasil yang diperoleh bahwa isolat IB dapat ternetralisasi. Sel MDCK merupakan sel

lestari yang sangat mudah untuk ditangani, sensitif dan merupakan standar sel untuk propagasi *virus influenza* ⁽¹¹⁾.

Menurut *Fakhrurrazi dan Budiman* (2009), berdasarkan uji propagasi secara *in ovo* menunjukkan bahwa virus AI mampu mematikan embrio ayam dengan perubahan makroskopis berupa pertumbuhan embrio mengecil, bulu rontok serta hemoragi berat pada seluruh permukaan embrio seperti diperlihatkan pada gambar isolat itik yang diisolasi di telur SPF (P1).



Gambar 3. Isolat IB (embrio mati)



Gambar 4. Isolat III (embrio hidup)

Gambaran makroskopis terhadap embrio ayam yang mati memperlihatkan pertumbuhan yang mengecil dan hilangnya lapisan bulu pada bagian punggung dan leher serta terjadinya hemoragi yang berat pada seluruh permukaan embrio. 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 nokulasi.

Menurut *Esterday et al* (1997), virus AI berkembang baik pada telur ayam berembrio umur 9-11 hari yang diinokulasikan melalui kantong alantois, tetapi tidak menyebabkan kematian embrio. Namun demikian ada juga beberapa strain virus AI dapat menyebabkan

kematian embrio 24-48 jam setelah diinokulasikan 0,2 ml ke dalam ruang alantois telur ayam berembrio berumur 10-11 hari ⁽⁹⁾.

Munculnya gambaran makroskopis tersebut berhubungan dengan sifat patogenesis penyakit flu burung. Pada kasus yang patogenesisnya tinggi (HPAI) kematian embrio umur 9-11 hari dapat terjadi 48-72 jam setelah inokulasi, sedangkan kasus yang kurang patogenik (LPAI) umumnya tidak menyebabkan kematian embrio ⁽²⁾.

Secara makroskopis menunjukkan pertumbuhan embrio yang kerdil, hemoragi berat serta adanya kerontokan bulu ⁽¹⁰⁾. Pertumbuhan embrio yang kerdil disertai dengan warna merah cerah sampai gelap dengan indikasi kongesti pada kulit dan otot. Sedang adanya hemoragi ditemukan pada kulit dan otot kerangka dengan kongesti renalis dapat terjadi pada embrio berumur 12 hari atau lebih. Kematian embrio menunjukkan adanya pembengkakan atau "*tumefaction*" ⁽⁸⁾.

KESIMPULAN

Purifikasi dari isolat virus AI asal itik atau bebek yang berasal dari Sukoharjo dan Sleman. Isolat virus AI dibagi menjadi 3 kode isolat yaitu IA, IB dan IIIA. Setelah dilakukan pasasse pertama sampai dengan pasasse ke-4 dengan menggunakan telur SPF, dengan metode pengujian HA-HI dan pengamatan CPE pada sel CEF, diperoleh virus AI asal bebek atau itik yang telah terpurifikasi dan dijadikan master seed yaitu 2 kode isolat virus AI IB dan IIIA. Titer virus AI asal itik dilakukan pada telur SPF dan sel MDCK. Titer virus AI pada telur SPF kode IB (asal Sukoharjo) $10^{7.9}$ EID₅₀ dan kode IIIB (asal Sleman) $10^{7.9}$ EID₅₀. Pada sel MDCK titer isolat IB (asal Sukoharjo) $10^{4.5}$ TCID₅₀. Perlu dilakukan kajian tentang adaptasi dan gambaran CPE virus AI asal itik (Sukoharjo dan Sleman) pada tiap sel.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Beard, C.W.** 1989. Influenza dan Serologic Procedure. Dalam A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3th ed. Kendall/Hunt Publishing Company.
2. **Esterday, B.C., V.S Hinshaw. & D.A Halvorson.** 1997. Influenza. In Disease of Poultry. Hofstad, MS (Eds). 10th ed. Iowa State University Press, Ames, USA.

3. **Fakhrurrazi & Budiman H.** 2009. Isolasi dan karakterisasi virus Avian Influenza berdasarkan gambaran makroskopis embrio ayam kampung. *J. Ked. Hewan* 3(2) : 266-272.
4. <http://cetak.kompas.com/read/2012/12/11/03343016/320.000.bebek.mati.kena.virus.flu.burung>
5. **Kuchipudi S.V. Dunham S.P. Neil Rahul. White G.A. Coward V.J. Slomka M.J. Brown I.H. & Chan K.C.** 2012. Rapid death of duck cells infected with influenza: a potential mechanism for host resistance to H5N1. *Immunol Cell Biol.* 90(1) : 116-123.
6. **Office International des epizooties Terrestrial Manual.** 2008. 2012. Infectious Bursal Disease. Chapter 2.3.12.
7. **Office International des epizooties Terrestrial Manual.** 2008.2000a.
8. **Stubbs, E.L.** 1965. Fowl Plaque. In. *Diseases of Poultry.* Biester, HE and L.H Schwarte. 5th.Ed. Iowa State Univ.Press. USA.
9. **Swayne, D.E & D.A. Harvorson.** 2003. Influenza. In. *Diseases of Poultry.* Saif, Y.M. 11th.Ed. Iowa State Univ. Press. USA.
10. **Wibowo, M.H., W. Asmara. & 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.
11. **Yuan, O.D., I.G. Barr, J.A. Mosse & K.L Laurie.** 2008. MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent, human infulenza viruses compared to conventional MDCK cells. *J.Clin. Microbiol.* Vol 46 no.7 2189-2194.