



BULETIN VETERINER FARMA

MEDIA INFORMASI KEGIATAN
BALAI BESAR VETERINER FARMA PUSVETMA

Pembuatan Antigen Rabies untuk Kit ELISA Rabies Tahun 2020 - 2022

Pengembangan Metode Inaktivasi Antigen Rabies Dengan
Cara Pemanasan untuk Optimasi Kit ELISA Rabies Pusvetma

Pengembangan Produksi Vaksin Avian Influenza Bivalen
HPAI H5N1 dan LPAI H9N2

Pengkajian Pembuatan Vaksin Afluvet Kombinasi Highly Pathogenic Avian
Influenza (HPAI) H5N1 Strain Tanggamus dan ND Lasota

Validasi Pengujian Kit Diagnostik Sebagai Tugas
BBVF Pusvetma Sebagai Laboratorium
Rujukan Penyakit Mulut dan Kuku Di Indonesia



Suscribe Now!
pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id

PENGAJIAN PEMBUATAN VAKSIN AFLUVET KOMBINASI *HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA (HPAI) H5N1 STRAIN TANGGAMUS DAN ND LASOTA*

Rinasti RP¹, Petri Nandatina S¹, Murtining Dyah K¹, Jossie Intan C¹, Misnan¹
¹Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma

ABSTRAK

High Pathogenic Avian Influenza (HPAI) dan *Newcastle Disease (ND)* adalah penyakit unggas strategis endemic di Indonesia sampai saat ini. Salah satu pengendalian yang dilakukan pemerintah dan peternak adalah program vaksinasi. Penelitian ini merupakan pembuatan vaksin kombinasi HPAI – ND dengan dua formula yang berbeda. Pembuatan vaksin menggunakan virus HPAI clade 2.3.2 Tanggamus dan ND strain *Lasota*. Masing-masing formula vaksin menggunakan sepuluh ekor ayam specific antibody negative (SAN) untuk uji potensi yang dilakukan penyuntikan 2 dosis secara *intra muscular (IM)*, selanjutnya 5 ekor untuk uji keamanan, serta tiga ekor untuk ujiantang terhadap virus ND. Pengambilan darah dilakukan sebelum vaksinasi dan 4 minggu setelah vaksinasi. Hasil Pengujian stabilitas menunjukkan hasil vaksin A dan B kurang stabil ditandai dengan terbentuknya *cracking* pada vaksin yang disimpan pada suhu 37°C. Hasil uji potensi dilihat dari uji HI serum ayam, vaksin A memberikan perlindungan 100% terhadap HPAI clade 2.3.2 Tanggamus, 90% terhadap HPAI clade 2.3.2 Semarang, 90 % terhadap ND-LS, vaksin B memberikan perlindungan diperoleh hasil menunjukkan 86,7% terhadap AI Tanggamus, 50% terhadap AI Semarang, 100 % terhadap ND-LS. Hasil Uji keamanan menunjukkan 100% ayam tidak menunjukkan gejala spesifik AI dan ND. Hasil penelitian menunjukkan vaksin kombinasi AI ND baik A dan B dapat memberikan respon imun terhadap HPAI clade 2.3.2 Tanggamus, HPAI clade 2.3.2 Semarang, namun vaksin formula A menunjukkan hasil uji potensi lebih baik daripada vaksin B dan ND LS, namun hasil uji stabilitas kurang baik.

Kata kunci: *High Pathogenic Avian Influenza (HPAI)*, *ND-Lasota*, *vaksin kombinasi*

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Avian Influenza (AI) adalah penyakit pada unggas yang sangat menular, disebabkan oleh virus influenza tipe A, termasuk dalam famili Orthomyxoviridae (Lamb dan Krug, 2001). *Newcastle Disease* (penyakit ND, tetelo) merupakan penyakit virus yang sangat menular, menyerang unggas liar maupun ayam (Alexander, 2001). Kedua penyakit ini menyebar merata di seluruh dunia termasuk Indonesia. Pengendalian penyebaran penyakit yang disebabkan virus HPAI dan ND pada unggas dilakukan pemusnahan unggas terinfeksi, penerapan konsep biosekuriti dan dilanjutkan dengan vaksinasi yang tepat. *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) adalah virus flu burung yang ganas, menular dan mematikan bagi dunia peternakan Indonesia sampai saat ini, Penyakit ini mempunyai diagnosa banding dengan penyakit ND bahkan seringkali menyerang bersamaan sehingga menimbulkan kerugian yang sangat besar bagi peternak karena angka morbiditas dan mortalitas tinggi, depopulasi unggas secara masal, peningkatan biaya untuk sanitasi dan desinfeksi area kandang, air dan peralatan peternakan (Swayne & Suarez, 2000). Vaksinasi AI H5N1 pada unggas tidak hanya mampu mencegah gejala klinis dan penyakit, namun dapat mencegah dan mengurangi jumlah *shedding* virus secara signifikan, yang dapat menjadi sumber infeksi bagi unggas lain (Lee & Suarez, 2005).

Epidemi virus ND di Indonesia pertama kali terjadi di Jawa pada tahun 1926. Kasus ND merupakan ancaman serius bagi industri perunggasan di Indonesia karena penyakit ini endemik (Saliu *et al*, 2009) (Moomivand *et al*, 2013). Kencana *et al* (2017) dan Wibowo *et al*. (2006) menyatakan bahwa penyakit ND di Indonesia endemik karena ada kasus ND di seluruh tahun di berbagai daerah yang berpotensi menyebabkan wabah yang merugikan. Kasus ND masih dilaporkan di Sumatera, terutama di provinsi-provinsi Lampung, Sumatera Selatan, Bengkulu, dan Bangka Belitung (BeVet, 2019). ND dan AI adalah dua penyakit mematikan pada unggas coba, yang menyebabkan kerugian ekonomi yang besar bagi unggas mencoba industri dan mengganggu ketahanan pangan. Berdasarkan Kementerian Pertanian, Indonesia (Kepmentan, 2013) ND dan penyakit AI merupakan jenis penyakit menular strategis yang dapat mengancam dan menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar kerugian bagi

peternakan unggas. Vaksin yang efektif membutuhkan antigen yang baik. Studi tentang respons dosis vaksinasi sangat ideal untuk mengidentifikasi kandungan antigen vaksin dan tingkat antibodi yang diproduksi untuk memicu perlindungan dan mencegah pelepasan virus dari hewan (Maas *et al.*, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan keamanan dan kemanjuran vaksin kombinasi ND-AI H5N1 dengan dua formula yang berbeda yang selanjutnya akan dievaluasi hasil uji berupa pemeriksaan fisik, respons imun dan perlindungan terhadap uji tantang virus ND.

B. Rumusan Masalah / Hipotesa

Apakah vaksin kombinasi virus HPAI dan ND *LaSota* dapat yang dibuat dapat lulus uji serta memiliki potensi untuk dijadikan kandidat vaksin yang memenuhi persyaratan Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI).

C. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah menentukan keamanan dan kemanjuran vaksin kombinasi AI ND dengan dua formula yang berbeda yang selanjutnya akan dievaluasi hasil uji berupa pemeriksaan fisik, respons imun dan perlindungan terhadap uji tantang virus ND yang memenuhi syarat sesuai standar mutu FOHI.

D. Manfaat

Pengembangan kombinasi virus HPAI dan ND *LaSota* dalam satu formula vaksin, diharapkan dapat memenuhi syarat mutu sesuai standar FOHI sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan dan mencegah penyakit *avian influenza* (AI) dan *Newcastle Disease* (ND) pada unggas di Indonesia.

TINJAUAN PUSTAKA

Avian Influenza H5N1 clade 2.3.2 **Tanggamus**

Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1 pertama kali dilaporkan pada tahun 1996 di Provinsi Guangkong, Tiongkok. Penyakit ini telah menyebar luas ke seluruh dunia dan menyebabkan dampak yang sangat signifikan di negara-negara yang terkena dampak termasuk Indonesia (Wiyono *et al.*, 2004). Virus HPAI H5N1 sangat menular pada unggas dan menghasilkan mortalitas tinggi hingga 100%. Agen etiologi

HPAI termasuk keluarga *Orthomyxoviridae* (OIE, 2018). Ayam kampung yang diinfeksi HPAI H5N1 dalam waktu 24 jam akan menunjukkan gejala klinis ringan seperti bulu berdiri dan lemah, setelah 48 jam kesembilan ayam mati, sedangkan kedua itik tetap hidup dengan gejala klinis sangat berat. Virus HPAI H5N1 berhasil diisolasi dari preparat usap (*swab*) yang berasal dari ayam dan itik tersebut, menandakan bahwa mereka terinfeksi virus tersebut. Secara mikroskopik, ayam kampung menunjukkan ensefalitis, trakheitis, miokarditis, pneumonia interstitialis, hepatitis, proventrikulitis, enteritis, pankreatitis, nefritis dan bursitis yang kesemuanya bersifat peradangan *non-supuratif*. Lesi dominan lainnya yaitu nekrosis pada limpa dan pankreas. Virus H5N1 HPAI *clade* 2.3.2 dideteksi dengan metode imunohistokimia dan ditemukan pada hampir semua organ visceral yang terserang. Virus H5N1 *clade* 2.3.2 di Indonesia sangat patogen untuk ayam dan itik asli Indonesia. Bebek yang terinfeksi dapat menularkan virus ke ayam asli Indonesia dengan mudah dan menyebabkan kematian tinggi (Damayanti *et al.*, 2016).

Avian influenza (AI) merupakan penyakit sistem pernapasan akut pada unggas yang disebabkan oleh virus *single-stranded* RNA sense negatif dengan genom tersegmentasi dari famili *Orthomyxoviridae*, genus *Influenzavirus A*, merupakan virus beramplop dengan diameter 80 – 100 nm. Sifat antigenesitas pada virus *avian influenza* karena keberadaan glikoprotein, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), Virus influenza A diklasifikasikan menjadi 18 subtipe HA (H1-H18) dan sebelas subtipe NA (N1-N11) Virus influenza tipe A dibagi menjadi berbagai subtipe berdasarkan hubungan antigenik antara glikoprotein yang terdapat pada permukaan partikel virus, yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA), pada virus influenza tipe A telah diidentifikasi 18 subtipe HA (H1-H18) dan 11 subtipe NA (N1-N11) (Alexander 2007; Tuscany 2016). Setiap virus influenza A memiliki masing-masing satu jenis antigen permukaan HA dan NA. Kedua protein inilah yang menentukan subtipe virus AI dan merupakan protein terpenting dalam menimbulkan respon imun (Knipe and Howley, 2007; Tong *et al.*, 2013). Tiga virus AI subtipe H5N1 isolat yang menginfeksi unggas air (Trimurjo, Pesawaran, dan Muara Enim) merupakan strain virus yang berbeda dengan virus AI subtipe H5N1 di Indonesia yang telah ditemukan/diisolasi sebelumnya. Tiga isolat HPAI tersebut membentuk *clade* baru

yang dekat dengan clade virus unggas asal Vietnam yaitu clade 2.3.2 (Pfeiffer *et al.*, 2009; Wibawa *et al.*, 2012).

Menurut hasil investigasi wabah BBVET Wates tahun 2012 kasus kematian itik yang cukup tinggi terjadi di daerah Jawa Tengah, DI Jogjakarta dan Jawa Timur ditemukan isolat H5N1 yang termasuk ke dalam clade 2.3.2. (Wibawa *et al.* 2012). Penelitian pembuatan vaksin menggunakan *seed* virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 sebagai benih vaksin pada itik lokal menunjukkan mampu memberikan perlindungan 100% dari kematian dan *shedding* terhadap infeksi virus HPAI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 dan *clade* 2.1.3 sehingga *seed* vaksin ini dapat menjadi pilihan terbaik untuk digunakan pada itik (Dharmayanti, 2014)

Newcastle Disease strain LaSota

Newcastle Disease (penyakit ND, tetelo) merupakan penyakit virus yang sangat menular, menyerang unggas liar maupun ayam (Alexander, 2001). Virus ND diklasifikasikan sebagai *superfamili* dari Mononegavirales dalam *famili* Paramyxoviridae, genus *Avulavirus* (Mayo, 2002 a). Isolat yang dikategorikan sebagai virulen untuk ayam ada tiga patotipe utama tergantung keparahan dari penyakit. Isolat lentogenik adalah isolat yang paling rendah virulensinya, sedangkan virus dengan virulensi *intermediate* adalah mesogenik. Virus dengan virulensi tertinggi menyebabkan mortalitas yang tinggi pada ayam digolongkan ke dalam neurotropik atau viscerotropik. Virus ND *velogenic* adalah virus yang dikategorikan sebagai patogen *List A* dalam pedoman OIE dan kejadiannya harus dilaporkan. OIE mendefinisikan ND sebagai infeksi yang disebabkan oleh virus APMV-1 dengan indeks ICPI 0,7 atau lebih besar bila disuntik pada ayam umur sehari (OIE, 2000). Vaksin ND yang beredar di pasaran Indonesia dan digunakan, umumnya bersifat lentogenik (Lasota atau B1) dan mesogenik (Kumarov) sebagai vaksin hidup (*live*). Strain ND LaSota dapat melindungi dari tantangan heterolog dan merupakan strain yang paling banyak digunakan di dunia terutama di Indonesia (Comax *et al.*, 2012) (Ma *et al.*, 2017)

MATERI DAN METODE

A. Materi

Bahan :

Telur ayam berembrio (TAB) umur 9 – 11 hari *Specific Antibody Negative* (SAN) 21 - 28 hari, virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 Tanggamus A/Chicken/Tanggamus/03.0872/2016, virus ND LaSota, kapas, alkohol 70%, Phosphat Buffer Saline (PBS), bahan inaktivasi formalin, adjuvan minyak Montanide Seppic ISA 70, media untuk sterilitas : *Heart Infusion Agar* (HIA), *Thioglycolate broth* (TGC), *Soybean Casein Digest* (SCD), sel darah merah ayam (DMA), antigen AI H5N1 *clade* 2.3.2 Tanggamus, antigen AI H5N1 *clade* 2.3.2 Semarang, antigen ND.

Alat :

Inkubator telur, spuit *disposable* ukuran 1 ml dan 3 ml, mikroplate, *multichannel* pipet, *singlechannel* pipet, mikrotip, *vortex mixer*, erlenmeyer, gelas beker, botol laboratorium, tabung gelas ukuran 10 ml, tabung gelas ukuran 20 ml, gelas ukur ukuran 50 ml, rak tabung, timbangan, mesin sentrifuse, inkubator, *Bio Safety Cabinet* (BSC) level 2, botol vaksin, *magnetic stirrer*, *magnetic bar*, *ultrathorax*.

B. Metode

1. Titrasi virus

Titrasi virus bertujuan untuk mengetahui nilai EID_{50} dari virus yang dipakai dan pembuatan *working seed*. Suspensi virus ditipiskan 10 kali sampai dengan 10^{-9} , kemudian suspensi pada penipisan 10^{-5} s/d 10^{-9} diinokulasikan pada TAB umur 9-11 hari. TAB yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$, untuk virus ND LS diinkubasi selama 4 hari, untuk virus AI H5N1 selama 36 jam. Selama masa inkubasi, TAB yang sudah diinokulasi diobservasi atau di *candling* dua kali sehari untuk memisahkan tab yang mati dan yang hidup. TAB H5N1 yang mati diatas 24 jam paska inokulasi di chilling di suhu $2-8^{\circ}C$ untuk selanjutnya allantois dipanen dan dilakukan uji HA. TAB ND LS yang mati diatas 72 jam paska inokulasi dan embrio yang masih hidup sampai hari ke 4 masa inkubasi di chilling di suhu $2-8^{\circ}C$ untuk selanjutnya allantois di chilling dan dipanen serta dilakukan uji HA untuk

menghitung nilai *Embryo Infectious Dose 50* (EID₅₀). Pasase virus diulang sampai mendapatkan nilai EID₅₀ yang tinggi. Setelah mendapatkan nilai EID₅₀ minimal 10⁸, suspensi allantois dipanen untuk dijadikan *working seed*.

2. Propagasi dan panen virus.

Seed virus ditipiskan 10 kali sampai dengan 10⁻⁴, kemudian suspensi pada penipisan 10⁻⁴ diinokulasikan pada TAB umur 9-11 hari untuk ND LS dan TAB umur 11-13 hari untuk H5N1. TAB yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37°C, untuk virus ND LS diinkubasi selama 4 hari, untuk virus AI H5N1 selama 36 jam. Selama masa inkubasi, TAB yang sudah diinokulasi diobservasi atau di *candling* dua kali sehari untuk memisahkan tab yang mati dan yang hidup. TAB H5N1 yang mati diatas 24 jam paska inokulasi di chilling di suhu 2-8°C untuk selanjutnya allantois dipanen dan dilakukan uji HA. TAB ND LS yang mati diatas 72 jam paska inokulasi dan embrio yang masih hidup sampai hari ke 4 masa inkubasi di chilling di suhu 2-8°C untuk selanjutnya allantois di chilling dan dipanen serta dilakukan uji HA. Cairan allantois yang telah dipanen selanjutnya disebut produk antara.

3. Inaktivasi virus

Cairan allantois hasil panen ditambah bahan inaktivan formalin sebanyak 0,1% kemudian dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang selama 36 jam. Uji inaktifasi menggunakan 10 butir TAB SAN umur 9-11 hari untuk ND LS dan umur 11-13 hari untuk H5N1. Setiap butir TAB diinokulasi cairan allantois sebanyak 0,02 ml yang telah diinaktifasi. TAB diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. Selama 5 hari TAB diobservasi setiap hari, untuk mengamati hidup dan mati TAB yang diinokulasikan. Pada akhir masa inkubasi cairan allantois dipanen dan dilakukan uji HA cepat, apabila tidak terdapat aglutinasi maka dilanjutkan sampai pasase dua dan tiga dengan cara yang sama. Hasil akhir inaktif apabila cairan allantois yang dipanen tidak terdapat aglutinasi pada uji HA cepat (FOHI, 2018).

4. Formulasi vaksin dan pembotolan

Allantois atau produk antara yang telah memenuhi hasil uji sterilitas dan hasil uji inaktivasi selanjutnya diformulasi menggunakan adjuvant. Adjuvant yang digunakan adalah adjuvant minyak komersial yang disimpan pada botol glassware kurang lebih 1 bulan dari tabung drum. Proses mixing adjuvant dan allantois dilakukan selama 30 menit sampai terbentuk emulsi dan homogen. Produk vaksin yang telah jadi dilakukan beberapa pengujian sesuai ketentuan FOHI. Vaksin diformulasi dengan dua formula yang berbeda. Formula vaksin A menggunakan perbandingan allantois ND LS sebesar 17,5%, allantois AI 232 TG sebesar 22,5% serta adjuvant sebesar 60%. Formula B menggunakan perbandingan allantois ND LS sebesar 15%, allantois AI 232 sebesar 15% serta adjuvant sebesar 70%, adjuvant yang digunakan adalah adjuvant minyak komersial. Adjuvan dihomogenasi menggunakan *ultrathurax* selama 5 menit dengan kecepatan 5000 rpm, kemudian ditambahkan cairan allantois yang berisi kultur virus inaktif secara bertahap sampai terbentuk emulsi. Homogenisasi dilakukan di suhu 25°C selama selama 30 menit dengan kecepatan 9000 rpm sampai produk tercampur sempurna sampai membentuk emulsi, selanjutnya produk siap untuk dilakukan pembotolan.

5. Pengujian mutu vaksin

Pengujian mutu vaksin dilakukan sesuai standar yang telah ditetapkan dalam FOHI (2018). Uji mutu vaksin meliputi uji fisik, uji sterilitas, uji stabilitas emulsi, uji inaktivasi, uji keamanan dan uji potensi secara serologis.

a. Uji Fisik

Uji fisik adalah uji yang dilakukan untuk melihat warna, homogenitas, volume, dan ada tidaknya partikel asing. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila setiap sediaan mempunyai volume dan warna yang sama, homogen dan tidak mengandung partikel asing.

b. Uji Sterilitas

Uji sterilitas dilakukan pada media *Thioglycollate* (TGC), *Soybean Casein Digest* (SCD) dan *Heart Infusion Agar* (HIA). Sebanyak 1 ml vaksin dimasukkan ke dalam masing-masing 4 tabung yang berisi 20 ml media. Untuk vaksin yang diuji dalam media TGC dan SCD diinkubasi pada 2 suhu yang berbeda. Dari keempat tabung uji, 2 tabung diinkubasi pada suhu 37°C

selama 14 hari dan 2 tabung yang lain diinkubasi pada suhu 22⁰C selama 14 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke 3, 7 dan 14. Sedangkan vaksin yang diuji pada media HIA inkubasi hanya dilakukan pada suhu 37⁰C selama 7 hari. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan fungi (kapang dan khamir) pada media yang digunakan.

c. Uji Stabilitas Emulsi

Uji stabilitas emulsi bertujuan untuk melihat stabilitas emulsi vaksin pada berbagai suhu. Dua botol vaksin ditempatkan ke dalam inkubator suhu 37⁰C selama 14 hari tanpa digoyang-goyang. Vaksin dikatakan stabil/tidak rusak apabila pada akhir pengamatan, emulsi vaksin tidak mengalami *cracking*/pecah, apabila dikocok vaksin akan kembali homogen.

d. Uji Inaktivasi

Uji inaktivasi menggunakan 10 butir TAB umur 9-11 hari. Setiap butir TAB diinokulasi dengan 0,2 ml vaksin ke cairan alantois. TAB diinkubasi pada 37⁰C selama 7 hari. Pada hari ke-7 cairan alantois dari setiap butir TAB diambil dan diuji HA. Selanjutnya dilakukan 2 kali pasase dengan cara yang sama. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua TAB yang diinokulasi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan virus AI yang dapat dilihat melalui perubahan embrio maupun uji HA.

e. Uji Keamanan

Uji keamanan menggunakan 16 ekor ayam umur 21-28 hari, 5 ekor untuk vaksin A dan 5 ekor untuk vaksin B, masing-masing dilakukan vaksinasi 2 ml. 6 ekor untuk ayam kontrol yang tidak divaksinasi. Ayam diperiksa titer terhadap AI 323 TG dan ND LS untuk memastikan titer antibody terhadap kedua penyakit tersebut 0. Pengamatan dilakukan selama 2 minggu. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat apabila semua ayam kelompok vaksinasi dan kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala abnormal (FOHI, 2013).

f. Uji Potensi

Pada uji ini digunakan 20 ekor ayam umur 21–28 hari yang dibagi dalam 2 kelompok. Ayam uji diperiksa titer antibodi AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus dan ND LS untuk memastikan titer antibodi terhadap kedua

penyakit tersebut 0. Kelompok perlakuan (KP) terdiri dari 10 ekor ayam yang masing-masing divaksin sebanyak 2 dosis secara IM dan kelompok kontrol (KK) terdiri dari 10 ekor ayam tanpa vaksinasi. Serum diambil pada minggu ke 1, 3, dan 4 setelah vaksinasi dan diuji titer antibodinya menggunakan uji hambatan aglutinasi (HI). Vaksin dinyatakan memenuhi syarat H5N1 apabila 4 minggu setelah vaksinasi tidak kurang dari 90% ayam vaksinasi mempunyai titer antibody tidak kurang dari 16 (2^4) dan semua ayam kontrol mempunyai titer antibody tidak lebih dari 4 (2^2) (FOHI, 2007). Vaksin dinyatakan memenuhi syarat ND LS apabila tidak kurang dari 90% dari ayam kelompok vaksinasi tetap hidup tanpa menunjukkan gejala klinis ND dan 100% ayam kelompok kontrol mati (FOHI, 2013).

HASIL PENELITIAN

Nilai EID50 virus yang digunakan

Nilai EID50 dari masing masing virus dihitung menggunakan metode Muench (OIE), nilai *Egg Infectious Dose 50* (EID50) yang diperoleh dari titrasi virus sebelum inaktivasi masing masing menunjukkan nilai sebagai berikut ND LS adalah $10^{9.16}$ EID₅₀, virus AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus : $10^{7.9}$ EID₅₀. Hasil uji hemaglutinasi pada virus AI sebelum inaktif adalah 1024 atau 2^{10} , setelah inaktif adalah 512 atau 2^9 . Pada virus ND LS sebelum inaktif dan setelah inaktif menunjukkan hasil yang sama yaitu 1024 atau 2^{10} .

Konfirmasi Uji Inaktivasi pada Virus

Vaksin kombinasi AI ND merupakan vaksin inaktif, sehingga perlu dilakukan uji inaktivasi untuk mengetahui apakah virus dalam vaksin sudah inaktif. Uji inaktif dilakukan baik sebelum formulasi dan setelah formulasi. Uji inaktivasi menggunakan TAB yang diinokulasi produk antara dan vaksin. Pengujian dilakukan sampai pasase ke 3, alantois hasil inokulasi dilakukan uji HA cepat untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan virus. hasil uji baik dari produk antara dan vaksin menunjukkan hasil inaktif.

Uji Sterilitas dan Safety pada Persiapan Vaksin

Produk antara selanjutnya diuji sterilitas menggunakan HIA, TGC dan SCD di suhu 37°C dan 22°C. Pengamatan dilakukan sampai hari ke 14, hasil uji steril tidak ada pertumbuhan bakteri dan jamur baik pada produk antara dan vaksin A serta vaksin B. Kedua vaksin kombinasi menunjukkan hasil aman pada ayam yang divaksinasi, dimana tidak ada tanda-tanda klinis penyakit atau lesio setelah vaksinasi dosis ganda yang ditemukan pada ayam SAN yang divaksinasi. Hasil pengujian produk antara AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus dan ND *lasota* dapat dilihat di Tabel 1

Tabel 1 Hasil Pengujian Produk Antara Sebelum Formulasi

		H5N1 TG		ND	
Nilai EID₅₀		10 ^{7.9} EID ₅₀		10 ^{9.16} EID ₅₀	
Titer HA	Sebelum inaktif	1024 atau 2 ¹⁰		1024 atau 2 ¹⁰	
	Setelah Inaktif	512 atau 2 ⁹		1024 atau 2 ¹⁰	
Pasase	1	Inakif		Inakif	
	2	Inakif		Inakif	
	3	Inakif		Inakif	
Uji sterilitas	Suhu Inkubasi	22°C	37°C	22°C	37°C
	HIA	steril	steril	steril	steril
	TGC	steril	steril	steril	steril
	SCD	steril	steril	steril	steril

Uji Fisik dan Stabilitas Vaksin

Uji stabilitas emulsi bertujuan untuk mengetahui kestabilan emulsi vaksin pada suhu ekstrim yaitu 37°C. Kestabilan emulsi akan menjaga ikatan antara antigen (allantois) dan adjuvant di dalam vaksin. Hasil uji stabilitas menunjukkan vaksin A dan B kurang stabil, hal ini ditunjukkan dengan adanya *cracking* pada kedua emulsi vaksin.

Evaluasi Respon Immune Menggunakan Uji HI

Monitoring respon imun terhadap virus ND

Sampel serum ayam diambil sebelum vaksinasi dan pada minggu ke 4 paska vaksinasi. Hasil respon imun menunjukkan bahwa respon imun terhadap virus ND hasil vaksinasi menggunakan vaksin B melindungi 100% populasi ayam SAN, sedangkan hasil vaksinasi vaksin A melindungi 90% populasi ayam SAN. Hasil ini menunjukkan vaksin B lebih baik dalam memberikan perlindungan terhadap penyakit ND pada ujiantang daripada vaksin A.

Monitoring respon imun terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 Tanggamus dan AI H5N1 clade 2.3.2 Semarang

Sampel serum ayam diambil sebelum vaksinasi dan pada minggu ke 4 paska vaksinasi. Sampel serum diuji menggunakan dua antigen untuk mengetahui proteksi silang terhadap AI H5N1 clade 2.3.2 strain Semarang. Hasil uji HI menunjukkan bahwa vaksin A menimbulkan respon imun terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 Tanggamus sebesar 100% dan vaksin B menimbulkan respon imun sebesar 86,7%. Respon imun hasil vaksinasi vaksin A terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 Semarang menunjukkan perlindungan sebesar 90%, sedangkan vaksin B menghasilkan respon imun sebesar 50%. Hasil pengujian produk vaksin formula A dan formula B dapat dilihat di Tabel 2.

Efektivitas perlindungan dari vaksin yang disiapkan terhadap virus ND yang Virulen

Uji tantang terhadap virus ND virulen dilakukan untuk mengevaluasi efesiensi perlindungan dari kedua kelompok vaksin, ayam kelompok A dan B ditantang dengan virus ND virulen pada minggu kedua post vaksinasi. Setelah dilakukan uji tantang virus ND virulen kelompok ayam B tidak menunjukkan tanda-tanda klinis penyakit dan tidak ada kematian setelah 14 hari pasca-tantang. Kelompok Ayam A terdapat kelainan dan kematian pada 2 ekor ayam atau 10% ayam dari total formulasi. Titer HI rata-rata untuk kelompok A adalah 4 log₂ setelah minggu ke-2 post tantang, sedangkan di kelompok B, titer masing-masing adalah 6,4 log₂. Semua ayam kontrol yang tidak divaksinasi menunjukkan gejala yang khas tanda klinis NDV virulen post tantang.

Tabel 2 Hasil Uji Vaksin Kombinasi AI-ND LS

Uji pada Vaksin		Vaksin A	Vaksin B
		ND LS 17,5%, AI 232 TG 22,5%, adjuvant 60%	ND LS 15%, AI 232 15%, adjuvant 70%
Uji Fisik	Warna	Uniform	Uniform
	Partikel Asing	Tidak ada	Tidak ada
	Homogenitas	Homogen	Homogen
	Volum	Uniform	Uniform
Uji Inaktivasi		100% HA negatif	100% HA negatif

Uji Sterilitas		Steril	Steril
Uji Stabilitas Emulsi		Kurang	Kurang
Uji Safety		100% tidak menunjukkan gejala abnormal	100% tidak menunjukkan gejala abnormal
Uji Potensi	AI Subtipe H5N1 Clade 2.3.2 Tanggamus	100% (Terhadap AI clade 232 Tanggamus)	86,7% (Terhadap AI clade 232 Tanggamus)
	AI Subtipe H5N1 Clade 2.3.2 Semarang	90% (Terhadap AI clade 232 Semarang)	50% (Terhadap AI clade 232 Semarang)
	ND-LS	90% titer antibody ≤ 16 (2 ⁴)	100% titer antibody ≤ 16 (2 ⁴)

PEMBAHASAN

Newcastle Disease dan *Avian Influenza* adalah dua penyakit unggas yang mematikan, yang menyebabkan kerugian ekonomi yang besar pada industri unggas. dan mengganggu ketahanan pangan. Berdasarkan data Kementerian Pertanian, Indonesia (Kepmentan, 2013). ND dan AI merupakan jenis penyakit menular strategis yang dapat mengancam dan menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar kerugian bagi peternakan unggas. Penyebaran HPAI H5N1 sudah menyebar ke seluruh dunia, pengendalian difokuskan untuk mencegah penyebaran penyakit dan mengurangi dampak ekonomi, langkah pengendalian difokuskan pada program vaksinasi. Vaksin komersial impor tidak bisa memberikan perlindungan yang maksimal dikarenakan ketidakcocokan virus yang ada dilapangan dengan virus yang ada di dalam vaksin (Kim *et al*, 2010). Vaksin kombinasi ND-AI merupakan vaksin kombinasi HPAI inaktif dan ND Lasota inaktif berbentuk emulsi air dan minyak. Vaksin kombinasi ND-AI menggunakan virus AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus dan virus ND *Lasota*. Virus ND *Lasota* digunakan karena *Lasota* dapat melindungi dari tantangan heterolog dan merupakan strain yang paling banyak digunakan di dunia terutama di Indonesia (Cornax *et al*, 2012; Ma *et al*, 2017). Isolat virus AI yang digunakan adalah Virus AI H5N1 clade 2.3.2 Tanggamus A/Chicken/Tanggamus/03.0872/2016. Virus AI H5N1 clade 2.3.2 Tanggamus merupakan virus avian influenza H5N1 pada unggas di wilayah kerja Balai Veteriner Lampung tahun 2014-2017 (Tyas, 2017).

Perhitungan *egg infectious dose 50* (EID50) yang diperoleh dari titrasi virus sebelum inaktivasi masing masing menunjukkan nilai sebagai berikut ND *lasota* adalah

$10^{9.16}$ EID₅₀, virus AI H5N1 Tanggamus : $10^{7.9}$ EID₅₀. Hasil uji hemaglutinasi pada virus AI sebelum inaktif adalah 1024 atau 2^{10} , setelah inaktif adalah 512 atau 2^9 . Pada virus ND *lasota* sebelum inaktif dan setelah inaktif menunjukkan hasil yang sama yaitu 1024 atau 2^{10} . Kandeil *et al* (2017) menyatakan bahwa vaksin AI yang dihasilkan dari virus dengan titer $10^{7.5}$ EID₅₀/0,1 ml mampu menimbulkan titer antibody protektif dalam satu kali vaksinasi. Nilai titer virus yang digunakan pada penelitian ini sudah memenuhi syarat untuk digunakan sebagai bahan baku vaksin. Kandungan antigen menjadi faktor utama dalam menentukan efisiensi vaksin dan kemampuan untuk menghasilkan perlindungan terhadap virus, terdapat hubungan antara kandungan antigen vaksin, respons imunogenik, dan pengurangan replikasi virus saat dilakukan ujiantang virus. Kandungan antigen menentukan kemanjuran vaksin H5N1 HPAI inaktif untuk unggas, strain virus serta homologi virus memainkan peran dalam hal antigen yang diperlukan untuk keberhasilan dari proses vaksinasi (Swayne *et al.*, 2000a; Swayne *et al.*, 2000b). Derajat kekebalan dan perlindungan dari vaksin dapat diimplikasikan melalui hasil serologis. Liu *et al.* (2003) menjelaskan kematian pada ayam dapat dihindari ketika nilai titer HI hasil vaksinasi adalah 40 atau lebih dan replikasi virus dapat dicegah ketika titer HI di atas 120 (Swayne *et al.*, 2006). Telah dilaporkan terjadi kasus penularan virus H5N1 HPAI pada tingkat HI di bawah 4 (Swayne *et al.*, 2001).

Vaksinasi kombinasi AI ND menggunakan vaksin inaktif, vaksin inaktif terdiri atas virus yang dimatikan atau protein viral yang spesifik (Stauffer *et al.* 2006). Sifat virus H5N1 HPAI dan ND yang memiliki virulensi yang tinggi maka proses inaktivasi virus menjadi hal yang penting untuk menghasilkan vaksin yang aman namun tetap memiliki potensi yang tinggi. Proses inaktivasi menggunakan formalin dicapai dengan alkilasi amino dan kelompok sulfidrilat protein dan basa purin (De Benedictis *et al.*, 2007). Menurut WHO (2005) pemberian konsentrasi formalin tidak dianjurkan melebihi 0,1%. Formalin merupakan turunan aldehida, mengikat protein virus yang menghambat replikasi virus (Swayne dan Kapczynski, 2008). Senyawa ini merupakan agen cross-linking yang dapat merusak epitop virus dan dapat menyebabkan penurunan imunogenisitas yang dapat memperparah penyakit pada kondisi tertentu. Pada virus avian influenza, inaktivasi terjadi melalui degradasi RNA virus, sehingga antigenisitas dan aktivitas HA serta NA dapat dipelihara (Swayne *et al.* 2013). Möller *et al.* (2015) menyatakan bahwa inaktivasi dengan formaldehid pada suhu rendah (4 °C) sering

menyebabkan inaktivasi tidak sempurna sedangkan inaktivasi yang dilakukan pada suhu lebih tinggi (25 °C) dapat menginaktivasi virus secara menyeluruh dan lebih efisien. Hasil penelitian Möller *et al.* (2015) menunjukkan bahwa inaktivasi suspensi virus dengan menggunakan formaldehid bergantung pada suhu, waktu inkubasi, tipe virus dan faktor lain seperti konsentrasi formaldehid, pH, dan sebagainya. Aktivitas inaktivasi oleh formaldehid dapat dibagi dua, yaitu aktivitas terhadap protein di permukaan partikel virus dan aktivitas terhadap asam nukleat virus.

. Vaksin kombinasi AI ND adalah vaksin emulsi air dan minyak (*water in oil*). Emulsi merupakan suatu system yang tidak stabil dalam emulsi, tegangan antar muka mempengaruhi terjadinya emulsi. Semakin kecil tegangan antar muka, emulsi yang terbentuk akan semakin stabil. Naiknya suhu secara linier akan menurunkan tegangan permukaan. Kerusakan pada sediaan emulsi biasanya ditandai terbentuknya *flokulasi*, *creaming*, *koalesen* dan *demulsifikasi* (Foudazi *et al.*, 2015). Hasil uji stabilitas vaksin kombinasi AI ND menunjukkan emulsi vaksin kurang stabil dengan adanya *cracking*/tidak homogen setelah disimpan pada suhu 37°C selama 14 hari. *Cracking* adalah terjadinya pemisahan fase air dan minyak yang merupakan suatu bentuk kerusakan yang dapat diakibatkan oleh kurangnya surfaktan/minyak yang digunakan, sehingga lapisan pelindung pada permukaan tetesan lemah. Tetesan tersebut akan berfusi (bergabung) membentuk suatu tetesan yang berdiameter lebih besar. Kerusakan ini bersifat *irreversibel*. Stabilitas vaksin adalah salah satu parameter terpenting, karena memiliki arah langsung efek pada keamanan dan kemanjuran (Foudazi *et al.*, 2015). Emulsi *water in oil* (W/O) akan mempertahankan keberadaan antigen di dalam minyak kecuali emulsi pecah. Pada emulsi W/O, antigen masih terperangkap dalam tetesan air dan sifat-sifatnya emulsi dipertahankan. Stabilitas pada 37°C juga memberikan informasi tentang perilaku emulsi setelah injeksi (Aucouturier *et al.*, 2001).. Emulsi dianggap tidak stabil ketika tidak ada penggabungan tetesan pada uji stabilitas di air sesaat setelah selesai dilakukan formulasi vaksin (Lyssant, 1984)

Adjuvant yang digunakan pada penelitian ini adalah Montanide (*Seppic Adjuvant Incomplete*) ISA 70, adalah bahan pembantu minyak non mineral yang terdiri dari minyak tanaman dan pengemulsi halus dari keluarga monooleat manida. Pada penelitian sebelumnya vaksin formulasi dengan Montanide menginduksi kekebalan yang kuat dalam jangka waktu yang lama. Emulsi yang dihasilkan bersifat stabil dan

mudah disuntikkan memiliki kapasitas imunopotensiasi tinggi dan menunjukkan efek samping yang lebih rendah (Aucouturier *et al.*, 2001, 2002; Toledo *et al.*, 2001). Vaksin yang efektif tidak hanya membutuhkan antigen yang baik tetapi juga adjuvant yang lebih disukai untuk ditingkatkan imunogenisitas antigen. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa vaksin inaktif emulsi air-dalam-minyak mampu menginduksi respon imun terhadap melindungi unggas (Kilany *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017). Adjuvan yang digunakan pada penelitian ini sebelumnya disimpan pada botol kaca selama satu bulan. Minyak yang berasal dari tanaman atau *natural oil* dapat rusak karena reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi pada minyak tanaman dimulai dengan adanya pembentukan radikal bebas yang dipercepat oleh cahaya, panas, logam (besi dan tembaga), dan senyawa oksidator pada bahan pangan yang digoreng (seperti klorofil, hemoglobin, dan pewarna sintetik tertentu). Faktor lain yang mempengaruhi laju oksidasi adalah jumlah oksigen, derajat ketidakjenuhan asam lemak dalam minyak, dan adanya antioksidan, reaksi ini akan menurunkan mutu minyak pada adjuvant (Rorong *et al.*, 2008).

Hasil uji potensi terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus menurut ketentuan FOHI memenuhi syarat apabila menghasilkan titer $> 2^4$ dengan perlindungan 80% terhadap populasi hewan uji. Vaksin a dan vaksin B memenuhi syarat FOHI, namun vaksin A menghasilkan perlindungan lebih baik yaitu 100%. Terdapat proteksi silang dari vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 strain Tanggamus terhadap virus AI H5N1 clade 2.3.2 strain Semarang, hasil uji vaksin A cukup baik karena dapat memberikan perlindungan 90% pada populasi ayam SAN. Nilai antibodi terhadap AI H5N1 clade 2.3.2 strain Semarang ini dapat disebabkan karena adanya reaksi cross protection dari antibodi yang diinduksi vaksin AI dari galur yang heterolog. Keterpaparan ayam terhadap agen infeksi virus AI subtipe H5N1 clade 2.3.2 di peternakan juga dapat terjadi secara alami yang berasal dari lingkungan (Kusumastuti *et al.*, 2015).

Hasil uji tantangan terhadap virus ND baik vaksin A dan B menunjukkan hasil yang baik dan lulus menurut ketentuan FOHI yaitu protektifitas $> 90\%$. Hasil uji Potensi Alan *et al* (1978) melaporkan 100% kematian karena tantangan dengan virus ND yang ganas ketika titer HI adalah $2 \log_2$ atau kurang. Sebaliknya tidak ada kematian ketika titer antibodi HI unggas antara $4 \log_2$ dan $6 \log_2$ dengan rata-rata titer antibodi HI $5,2 \log_2$. Kedua kandidat vaksin bivalen yang telah disiapkan aman untuk vaksinasi

pada ayam dan keduanya mampu menginduksi respon imun terhadap virus ND dan AI H5N1 TG, tetapi vaksin bivalen A yang mengandung formula ND LS 17,5%, AI 232 TG 22,5%, adjuvant 60% Montanide ISA70 memberikan respon imun yang lebih baik dan lebih tinggi dibandingkan dengan vaksin bivalen B. Penelitian Cahyani *et al.*, (2020) menunjukkan vaksin bivalen yang menggunakan Montanide ISA 70 menunjukkan hasil yang baik terutama uji stabilitas fisik bahwa tidak satu pun dari kedua vaksin bivalen yang diuji menunjukkan kerusakan emulsi setelah pengujian.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian pembuatan dan pengujian vaksin bivalen kombinasi AI ND formula A lebih baik daripada vaksin formula B, namun kedua vaksin belum memenuhi standar FOHI karena hasil uji stabilitas belum memenuhi syarat. Proses formulasi dan penyimpanan adjuvant selanjutnya perlu diperbaiki dan diperhatikan agar menghasilkan vaksin yang stabil.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J. 2001. Newcastle disease. *British Poult Sci.* 42: 5 – 22.
- Aucouturier J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V. 2002. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1:111–118
- Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19:2666–2672
- Balai Veteriner. 2019. *Laporan Kejadian Newcastle Disease 5 tahun Terakhir di Sumatra*. Balai Veteriner Lampung, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian, Indonesia.
- Cahyani JI, Widyarini S, Wibowo MH. 2020. Comparative safety and efficacy of two bivalent vaccines containing Newcastle disease LaSota and avian influenza H9N2 Sidrap isolate formulated with different oil adjuvants, *Veterinary World*, 13(11): 2493-2501.
- Comax I , Miller PJ, Afonso, C.L. (2012) Characterization of live LaSota vaccine strain-induced protection in chickens upon early challenge with a virulent Newcastle disease virus of heterologous genotype. *Avian Dis.*, 56(3): 464-470.
- Damayanti, R. Wiyono, A. Nuradji, H. Cahyono, MI. 2016. The pathogenicity of H5N1 highly pathogenic Avian Influenza (HPAI) virus *clade* 2.3.2 in Indonesia indigenous chicken by contact transmission with infected duck. *JITAA* 42.2.72-80.doi:10.14710
- De Benedictis, P., Beato, M.S., Capua, I., 2007. Inactivation of avian influenza viruses by chemical agents and physical conditions: a review. *Zoonoses Public Health*: 54, 51–68.

- Dharmayanti, IRNLP. 2014. Prototipe Virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 Sebagai Kandidat Vaksin AI Subtipe H5N1 *Clade* 2.3.2 pada itik lokal. *BBLitVet Master JITV*
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2007. *Farmakope Obat Hewan Indonesia* Jilid I Edisi 3 [FOHI]. Kementerian Pertanian Republik Indonesia: Jakarta
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018. *Farmakope Obat Hewan Indonesia* Jilid I Edisi 5 [FOHI]. Kementerian Pertanian Republik Indonesia: Jakarta
- Foudazi, S. Qavi, I. Masalova, A.Y. Malkin, Physical chemistry of highly concentrated emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 220 (2015) 78–91.
- Kandeil A, Mostafa A, El-Shesheny R, Nageh A, Gomaa M, Gala H, Kayali G, Ali MA. 2017. Avian Influenza H5N1 Vaccination Efficacy In Egyptian Backyard Poultry. *Vaccine.* 2017: 35 – 45: 6195-6201.
- Kencana, G.A.Y, Suartha, I.N., Paramita, N.M.A. and Handayani, A.N. (2017) Vaksin kombinasi Newcastle disease dengan Avian influenza memicu imunitas protektif pada ayam petelur terhadap penyakit tetelo dan flu burung [Combined Newcastle disease (ND) and Avian influenza (AI) vaccines induce protective immune response in commercial broiler]. *J. Vet.*, 17(2): 257-264.
- Keputusan Menteri Pertanian. 2013. Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) No: 4026/kpts/ OT.140/4/2013. Kementerian Pertanian, Indonesia.
- Keputusan Menteri Pertanian. 2013. *Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS)* No: 4026/kpts/ OT.140/4/2013. Kementerian Pertanian, Indonesia.
- Kilany, W.H., Bazid, A.I., Ali, A., El-deeb, A.H., El-Abideen, M.A.Z., El Sayed, M. and El-kady, M. (2016) Comparative effectiveness of two oil adjuvant inactivated Avian influenza H9N2 vaccines. *Avian Dis.*, 60(1 Suppl): 226-231.
- Kim JK, Kayali G, Walker D, Forrest HL, Ellebedy AH, Griffin YS, Aldridge JR. 2010. Puzzling inefficiency of H5N1 influenza vaccines in Egyptian poultry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 11044-11049.
- Kusumastuti Aprilia 1, Syamsidar1, Agustin Zaharia Paderi1, Arini Nurhandayani1, Gusti Ayu Yuniati Kencana. 2015. Identifikasi Secara Serologi Galur Virus Flu Burung Subtipe H5N1 *Clade* 2.1.3 dan *Clade* 2.3.2 pada Ayam Petelur. *Jurnal Veteriner.* Vol. 16 No. 3 : 371-38
- Lamb RA, Krug RM. 2001. Orthomyxoviridae: The Virus and Their Replication. In: *Fields Virology*, ed. Knipe DM, Howley PM, fourth edition. pp. 1487-1532. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins Publisher
- Lee CW, Suarez DL. 2005. Avian influenza virus prospects for prevention and control by vaccination. *Anim Health Res Rev.* 6:1-15doi:10.1079/ahr2005101.
- Lissant KJL.1984. Emulsions and emulsion technology, part III. Kenneth J Lissant editor. *Surfact. Sci. Series* 6, 206–210 (1984)
- Ma, J., Lee, J., Liu, H., Mena, I., Davis, A.S., Sunwoo, S.Y., Lang, Y., Duff, M., Morozov, I., Li, Y., Yang, J., Garcia- Sastre, A., Richt, J.A. and Ma, W. (2017) Newcastle disease virus-based H5 influenza vaccine protects chickens from lethal challenge with a highly pathogenic H5N2 Avian influenza virus. *NPJ Vaccines*, 2:33.

- Maas R, Tacken M, van Zoelen D, Oei H (2009) Dose response effects of avian influenza (H7N7) vaccination of chickens: serology, clinical protection and reduction of virus excretion. *Vaccine* 27: 3592-3597.
- MAYO, M.A. 2002a. Virus Taxonomy-Houston. *Arch. Virol.* 147: 1071 – 1079.
- Möller L, Schünadel L, Nitsche A, Schwebke I, Hanisch M, Lauel M. 2015. Evaluation of virus inactivation by formaldehyde to enhance biosafety of diagnostic electron microscopy. *Viruses*. 7(2):666–679.
- Moomivand, H., Bassami, M.R., Faramarzi, S., Stabraghil, E., Ghaedi, A., Ghabel, H., Zarghami, A. and Banaei, M. (2013) Serological and clinical survey of Newcastle disease in broiler chickens of East Azarbayjan by HI tests. *Eur. J. Exp. Biol.*, 3(6): 311-314.
- OIE. 2000. Newcastle disease. *In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th Edition.* World Organization for Animal Health, Paris, France. pp. 221 – 232.
- OIE. 2018. Avian Influenza (infection with avian influenza viruses). *OIE Terrestrial Manual 2018.*
- Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM. 2018. *Plotkin's Vaccines.* 7th edition; Philadelphia.
- Pfeiffer, J., M. Pantin-Jackwood, T.L. To, T. Nguyen, and D.L. Suarez. 2009. Phylogenetic and biological characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses (Vietnam 2005) in chickens and ducks. *Virus Research.* 142:108-120.
- Rorong J, Henry Aritonang1 dan Ferdinan P Ranti. 2008. Sintesis metil ester asam lemak dari minyak kelapa hasil pemanasan. *Chem. Prog.* Vol. 1, No. 1, 2008.
- Saliu, O.J., Sanda, M.E. and Audu, S.I. (2009) Adoption of vaccination against Newcastle disease by rural poultry women farmers in the North Central Zone of Nigeria. *Int. J. Poult. Sci.*, 8(5): 500-503.
- Stauffer F, El-Bacha T, Da Poian AT. 2006. Advances in the development of inactivated virus vaccines. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 1(3):291-296.
- Swayne DE, Beck JR, Perdue ML, Beard CW. 2001. Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza. *Avian Disease* 45: 355-365.
- Swayne DE, Garcia M, Beck JR, Kinney N, Suarez DL. 2000. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine* 18: 1088-1095.
- Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suaarez, Nair V. 2013. *Diseases of Poultry 13th ed.* Iowa (US): Wiley-Blackwell. hlm 106,188.
- Swayne DE, Lee CW, Spackman E. 2006. Inactivated North American and European H5N2 avian influenza virus vaccines protect chickens from Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathology* 35: 141-146.
- Swayne DE, Perdue ML, Beck JR, Garcia M, Suarez DL (2000b) Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years. *Veterinary microbiology* 74: 165-172.
- Swayne DE, Suarez DL, Spackman E, Jadhao S, Dauphin G, Kim- Torchetti M, McGrane J, Weaver J, Daniels P, Wong F, Selleck P, Wiyono A, Indriani R, Yupiana Y, Sawitri Siregar E, Prajitno T, Smith D, Fouchier R (2015) Antibody

- Titer Has Positive Predictive Value for Vaccine Protection against Challenge with Natural Antigenic-Drift Variants of H5N1 High-Pathogenicity Avian Influenza Viruses from Indonesia. *Journal of Virology* 89: 3746–3762.
- Swayne DE, Suarez DL. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *J Rev Sci Tech* .19: 463–482.
- Swayne, D.E., Kapczynski, D.R., 2008. *Vaccines, vaccination, and immunology for avian influenza viruses in poultry*. In: Swayne, D.E. (Ed.), *Avian Influenza*. Black-well Publishing, Oxford; USA, pp. 407–452.
- Toledo H, Baly A, Castro O, Resik S, Laferte J, Rolo F et al. 2001. A phase I clinical trial of a multi-epitope polypeptide TAB 9 combined with Montanide ISA720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers. *Vaccine*. 19:4328–4336
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., et al., 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9, e1003657
- Tuscany N. 2016. Evaluasi keberadaan antibodi asal induk terhadap virus *avian influenza* dan *infectious bursal disease* pada ayam broiler [skripsi]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Tyas ASW, Wuryastuti H, Warsito, R. 2017. Karakterisasi Gen Hemagglutinin Virus Avian Influenza H5n1 Pada Unggas Di Wilayah Kerja Balai Veteriner Lampung Tahun 2014-2017. *Thesis*. Yogyakarta.id
- WHO. 2005. *Avian Influenza : Assessing the pandemic threat*. WHO/CDS/2005.29
- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti NLP I, Irianingsih SH, Miswati Y, A Rohmah, Andesyha E, Romlah, Daulay RSD, Safitria K. 2012. Investigasi wabah penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta dan Jawa Timur: Identifikasi sebuah *clade* baru virus avian influenza subtype H5N1 di Indonesia. *Buletin Laboratorium Veteriner*. 12:2-8.
- Wibowo, M.H., Susetya, H., Untari, T., Putri, K., Tabbu, C.R. and Asmara, W. (2006) Molecular study on the pathogenicity of Avian influenza virus. *Indones. J. Biotechnol.*, 11(2): 901-907.
- Wiyono, A., R. Indriani, N. Dharmayanti, R.Damayanti, L. Parede and T. Syafriati. 2004. Isolasi Dan Karakterisasi Virus Highly Pathogenic Avian Influenza Subtipe H5 Dari Ayam Asal Wabah Di Indonesia (Isolation And Characterization Of Virus Of Highly Pathogenic Avian Influenza H5 Subtype Of Chicken From Outbreaks In Indonesia). *JITV* 9: 2004
- Zhao, J., Yang, H., Xu, H., Ma, Z. and Zhang, G. (2017) Efficacy of an inactivated bivalent vaccine against the prevalent strains of Newcastle disease and H9N2 Avian influenza. *Virol. J.*, 14(1): 56.