

# Prototipe Virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 Sebagai Kandidat Vaksin AI Subtipe H5N1 Clade 2.3.2 pada Itik Lokal

Indriani R, Dharmayanti NLPI

Balai Besar Penelitian Veteriner Jl. RE Martadinata no 30, Bogor 6114  
E-mail : risain52@yahoo.com

(diterima 10 April 2014 ; disetujui 18 Juni 2014)

## ABSTRACT

Indriani R, Dharmayanti NLPI. 2014. Prototipe of A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 subtype H5N1 clade 2.3.2 as vaccine on local duck. JITV 19(2): 152-158. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i2.1044>

A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 virus subtype H5N1 clade 2.3.2 as seed vaccine on local duck. AI H5N1 clade 2.3.2 vaccine containing 256 HAU per dose was formulated using adjuvant ISA 71VG Montanide™. Six groups of one day old local duck were used in this study. Three groups (10 ducks per group) were vaccinated and 3 groups (9 duck per group) were served control. Vaccination was conducted when the duck were three weeks old of age using single dose. Three weeks after vaccination when the duck were challenged either with HPAI H5N1 clade 2.3.2, or HPAI H5N1 clade 2.1.3 virus at dose  $10^6$  EID<sub>50</sub>/ 0.1 ml by drops intranasally. Result showed that vaccination produced 100% protection compared to unvaccinated ducks against HPAI subtype H5N1 clade 2.3.2, and 100% protection against HPAI H5N1 clade 2.1.3 (A/ck/wj/Subang-29/2007 and A/ck/wj/Smi-Part/2006), while unvaccinated ducks showed virus shedding on day 3 post infection.

**Key Words:** Duck, Influenza, Clade 2.3.2, Clade 2.1.3, Vaccine

## ABSTRAK

Indriani R, Dharmayanti NLPI. 2014. Prototipe virus A/Duck/ Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 subtype H5N1 clade 2.3.2 sebagai vaksin pada itik lokal. JITV 19(2): 152-158. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i2.1044>

Virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 subtype H5N1 clade 2.3.2 sebagai benih vaksin pada itik lokal. Vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 mengandung antigen 256 HAU per dosis dan diformulasi dengan adjuvan ISA 71VG Montanide™. Enam kelompok itik lokal digunakan dalam penelitian ini, yaitu 3 kelompok divaksinasi AI H5N1 clade 2.3.2 (masing-masing 10 ekor DOD) dan 3 kelompok control (masing-masing 9 ekor DOD). Pada saat umur 3 minggu, itik divaksinasi dengan 1 dosis vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 dan saat umur 6 minggu (3 minggu pascavaksinasi) ditantang dengan virus AI H5N1 clade 2.3.2 (A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012) dan 2 virus tantang AI H5N1 clade 2.1.3 (A/ck/wj/Subang-29/2007 dan A/ck/wj/Smi-Part/2006) sebanyak  $10^6$  EID<sub>50</sub> per 0,1 ml melalui intranasal. Hasil penelitian ini memperlihatkan vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 mampu memberikan perlindungan dari kematian dan *shedding* virus 100% dibandingkan itik tidak divaksinasi terhadap virus tantang AI H5N1 clade 2.3.2 (A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012), dan terhadap virus tantang AI H5N1 clade 2.1.3 (A/ck/wj/Subang-29/2007 dan A/ck/wj/Smi-Part/2006), itik divaksinasi mendapat perlindungan 100%, sedangkan itik tidak divaksinasi memperlihatkan *shedding* virus tantang pada hari ke 3 pascainfeksi. Kesimpulan penelitian ini mengindikasikan vaksin inaktif AI subtipe H5N1 clade 2.3.2 (A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012) sangat baik dan dapat menjadi pilihan untuk digunakan pada itik lokal.

**Kata Kunci:** Itik, HPAI, Avian Influenza, Clade 2.3.2, Clade 2.1.3, Vaksin

## PENDAHULUAN

Virus *High Pathogenic Avian Influenza subtype H5N1 clade 2.3.2* untuk pertama kalinya diisolasi dari Itik dan Angsa di China dan Vietnam pada tahun 2005 (Chen et al. 2006, Robertson et al. 2006). Virus H5N1 clade 2.3.2.1 yang merupakan nomen clature baru dari clade 2.3.2 (WHO/OIE/FAO 2012) telah diisolasi dari burung migran air di Jepang pada tahun 2008 (Uchida et al. 2008) di Cina pada tahun 2009 (Li et al. 2011), di Mongolia pada tahun 2009 dan 2010 (Sakoda et al.

2010), di Rusia pada tahun 2009 dan 2010 (Sharshov et al. 2010), dan di Korea pada tahun 2010 dan 2011 (Kwon et al. 2011). Virus H5N1 clade 2.3.2 ini juga telah dikarakterisasi, sebagai isolat dominan dalam unggas dan burung liar (Ellis et al. 2009; Jiang et al. 2010; Kou et al. 2009; Smith et al. 2009).

Di Indonesia kasus kematian itik cukup banyak dilaporkan terjadi pada akhir tahun 2012, dan merebak hampir di seluruh propinsi Indonesia (Dirjen PKH 2012). Kematian itik ini disebabkan oleh virus AI subtipe H5N1 yang termasuk ke dalam clade 2.3.2.

(Wibawa et al. 2012), sebelumnya itik dan unggas air lainnya dianggap relatif lebih tahan terhadap infeksi virus HPAI clade 2.1.3 yg beredar di Indonesia (Wibawa et al. 2012). Virus H5N1 clade 2.3.2 ini mempunyai jarak keragaman pasangan nucleotide antar spesies (*average pairwise distance*) lebih dari 1,5% terhadap virus AI H5N1 clade 2.1.3 yang telah ada di Indonesia, dan terdefinisi sebelumnya (Wibawa et al. 2012). Itik disarankan untuk divaksinasi AI H5N1 agar terhindar dari serangan virus AI H5N1 clade 2.3.2 dilapang (Dirjen PKH 2013). Respon pascavaksinasi AI H5 pada itik telah banyak dilakukan diluar Indonesia. Tian et al. (2005) menjelaskan, itik lapang yang divaksinasi AI H5N1 rg, memberikan respon titer antibodi 8 log<sub>2</sub> setelah 4 minggu pascavaksinasi, dan mendapat perlindungan 100% dari penyakit dan kematian terhadap infeksi virus HPAI saat titer antibodi menurun 6log<sub>2</sub> (pada 52 minggu pascavaksinasi). Selanjutnya Beato et al. (2007) dalam penelitiann itik Paking yang divaksinasi vaksin tidak aktif H5N2, memperlihatkan respon titer antibodi 3log<sub>2</sub> setelah 4 minggu pascavaksinasi dan meningkat menjadi 7,7 log<sub>2</sub> setelah 2 minggu pascavaksinasi booster, dan itik mendapatkan perlindungan dari kematian dan shedding virus ketika terinfeksi virus A/duck/Vietnam/12/2005 H5N1. Deborah et al. (2007) menerangkan, itik divaksinasi vaksin bivalen H5N9+H7N1, memperlihatkan respon vaksinasi 4-8 log<sub>2</sub>, sedangkan itik divaksinasi monovalent H5N3 respon titer antibodi lebih tinggi yaitu; 8-64 log<sub>2</sub>, namun itik-itik tersebut mendapat perlindungan 100% dari kematian dan menurunkan shedding virus, ketika di infeksi virus A/Muscovy duck/Vietnam/453/2004. Indriani et al. (2014) dalam penelitian efikasi vaksin AI H5N1 clade 2.1.3 yang beredar saat ini, memperlihatkan efektivitasnya pada itik Mojosari dengan tingkat perlindungan 67-100% terhadap infeksi virus AI H5N1 clade 2.3.2., dan shedding virus terdeteksi hingga hari ke 7 pascainfeksi. Sementara acuan FOHI (2013) vaksin AI yang baik, tidak memperlihatkan *shedding* virus setelah 8 hari pascainfeksi.

Virus AI H5N1 A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 clade 2.3.2 ditetapkan pemerintah Indonesia sebagai benih vaksin, guna pengendalian kematian itik oleh virus AI H5N1 clade 2.3.2 di lapang (Dirjen PKH 2013). Virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 ini mempunyai tingkat *cross* reaksi yang baik terhadap benih virus AI H5N1 clade 2.1.3 seperti; virus AI H5N1 A/Ck/Wj/Pwt-Wij/2006 dengan uji hemaglutinasi (BBPMSOH 2014). Penelitian efektifitas benih vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 pada itik terhadap infeksi virus AI H5N1 clade 2.3.2 dan clade 2.1.3 perlu diketahui. Hasil penelitian prototipe A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 subtype H5N1 clade 2.3.2 sebagai kandidat vaksin pada itik lokal ini dalam penelitian ini, diharapkan mendukung kebijakan pemerintah Indonesia

dalam penanggulangan kasus kematian itik oleh virus AI H5N1 clade 2.3.2.

## MATERI dan METODE

### Vaksin inaktif AI H5N1 clade 2.3.2

Vaksin inaktif AI H5N1 clade 2.3.2 dipersiapkan dari isolat virus AI H5N1 A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 (Balai Besar Veteriner, Wates-Jogjakarata). Virus A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 (Sukoharjo) dipropagasi dalam telur ayam *specific pathogenic free* (SPF) tertunas umur 11 hari. Virus AI H5N1 Sukoharjo sebanyak 10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub> dalam 0,1 ml disuntikan ke dalam cairan alantoik telur ayam SPF tertunas, kemudian diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama ≤ 30 jam. Cairan alantoik yang terinfeksi virus di koleksi dan *dipool*. Selanjutnya kandungan titer virus ditentukan dengan uji titrasi (log<sub>10</sub>) dalam telur ayam SPF tertunas umur 11 hari. Hasil pool virus AI H5N1 Sukoharjo diinaktivasi dengan β-propiolacton (1:3000) pada suhu 4<sup>0</sup>C selama semalam. Keberhasilan inaktivasi di uji dengan menumbuhkan suspensi (setelah diencerkan 1:10) ke dalam ruang alantois telur ayam SPF 11 hari, dengan 3 kali lintasan. Virus AI H5N1 Sukoharjo dinyatakan inaktif, bila tidak memperlihatkan kematian pada telur SPF uji dan hasil hemaglutinasi pada cairan alantois negatif. Virus yang telah inaktif, diformulasi dengan mencampur virus inaktif dalam *phosphate buffer saline* (PBS) dan 70% adjuvant ISA 71VG Montanide<sup>TM</sup>.

### Virusantang

Virus HPAI A/ck/wj/Smi-Part/2006 subtype H5N1 clade 2.1.3 (Balai Besar Penelitian Veteriner), A/ck/wj/Subang-29/2007 subtype H5N1 clade 2.1.3 (Dirjen PKH 2009) dan A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 subtype H5N1 clade 2.3.2 (Balai Besar Veteriner Wates-Jogjakarta), digunakan sebagai virusantang dalam penelitian ini. Setiap virus dilintaskan dalam telur ayam SPF tertunas unur 11 hari, untuk memastikan virus hidup sebelum diinfeksi pada hewan coba.

### Hewan coba

Itik Lokal Cianjur umur 1 hari yang berasal dari peternakan di kabupaten Cianjur dan diketahui tidak bebas AI. Itik umur 1 hari dipelihara dalam kandang coba, diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Itik dibagi menjadi 2 kelompok yaitu; kelompok 1 sebanyak 30 ekor itik divaksinasi dengan satu dosis vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 secara intramuskuler, dan kelompok 2 tidak divaksinasi (sebagai kontrol) sebanyak 27 ekor.

Selanjutnya pada umur 6 minggu itik dibagi menjadi 3 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 10 ekor (itik yang divaksin) dan 9 ekor (itik tidak divaksin). Kelompok 1 ditantang virus HPAI A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 clade 2.3.2, kelompok 2 dengan virus HPAI A/ck/wj/Smi-Part/2006 clade 2.1.3 dan kelompok 3 dengan virus HPAI A/ck/wj/Subang-29/2007 clade 2.1.3. Setiap itik diinfeksi virus tantangan sebanyak  $10^6$  EID<sub>50</sub> per ekor secara intra nasal (Swayne 2007), di dalam kandang isolator BSL-3 Modular.

### Pengamatan pascavaksinasi dan uji tantangan

Ketiga kelompok itik coba diambil sampel darah sebelum divaksin, 3 minggu setelah divaksinasi dan 2 minggu setelah ditantang. Uji hemaglutinasi inhibisi (HI) (OIE 2012; Indraini et al. 2004) dilakukan untuk mendeteksi antibodi terbentuk akibat vaksinasi dan tantangan. Pengamatan pascatantang dilakukan selama 14 hari (setiap pagi dan sore hari), dan diamati klinis dari morbiditas/mortalitas yang terjadi.

### Uji reisolasi virus tantangan

Pola pelepasan virus tantangan dan waktu *shedding* ditentukan dengan mendeteksi virus hidup melalui orofaring dan kloaka. Pengamatan *shedding* virus dilakukan dengan mengoleksi swab orofaring dan kloaka pada hari ke 3, 7 dan 14 pascatantang, kemudian diuji reisolasi virus secara individual. *Shedding* dari virus tantangan pada itik coba, dideteksi dengan reisolasi virus. Setiap sampel swab orofaring dan kloaka dari setiap ekor itik coba dalam media transport (*Dulbecco's modified eagle medium*, 500 IU Penicillin-Streptomycin, Gentamycin, Fungizone dan 2% *Foetal calf serum*), di sentrifugasi pada kecepatan 1000x g selama 10 menit. Kemudian supernatan dari setiap swab atau trakhea secara individual diambil dan

diinokulasikan sebanyak 0,1 ml ke dalam intra alantoik telur ayam SPF tertunas umur 11 hari, dan setiap swab diinokulasikan sebanyak 3 telur SPF. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Cairan alantois dari telur yang telah terinfeksi, diuji terhadap aktivitas haemaglutinasi (HA), apabila hasil uji memberikan reaksi negatif, maka dilintaskan kembali dalam telur tertunas lainnya hingga 3 lintasan untuk menyatakan bahwa isolasi virus negatif (Swayne & Jackwood 2006).

### Analisa statistik

Data hasil uji serum berupa kandungan antibodi (titer HI) dari sampel serum sebelum vaksinasi dan pascavaksinasi serta pascatantang di analisa dengan *non parametric-wilcoxon signed ranks test*.

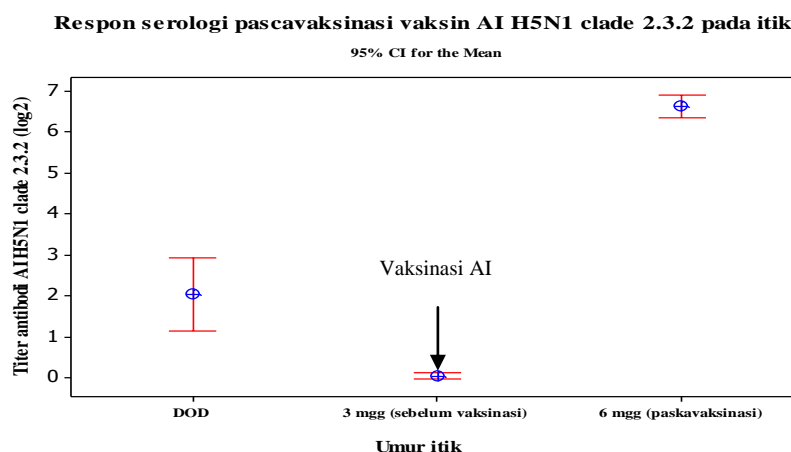
## HASIL

### Vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 (Sukoharjo)

Hasil pool virus AI H5N1 clade 2.3.2 (Sukoharjo) sebelum inaktif mengandung titer virus sebanyak  $10^{7.6}$  EID<sub>50</sub> per 0,1 ml, dan setelah inaktif di formulasi sebagai vaksin dengan kandungan massa antigen 256 HAU per dosis/0,3 ml.

### Respon pascavaksinasi AI H5N1 clade 2.3.2 pada itik lokal

Respon antibodi AI H5N1 pada itik lokal disampaikan di dalam Gambar 1. Itik lokal *day old duck* (DOD) memperlihatkan maternal titer antibodi AI H5N1 dengan rata-rata 2 log<sub>2</sub> dan *confidence interval* (CI) 1-3. Pada saat itik umur 3 minggu (sebelum vaksinasi) titer antibodi telah mencapai 0 log<sub>2</sub>, kemudian divaksin inaktif AI H5N1 clade 2.3.2.



Gambar 1. Titer antibodi AI H5N1 clade 2.3.2 pada itik coba

Itik umur 6 minggu (3 minggu pascavaksinasi), titer antibodi terhadap antigen AI H5N1 clade 2.3.2 (A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012), meningkat tajam secara individu dengan rata-rata titer antibodi 6,6 log<sub>2</sub> (*significance* P<0,05) terhadap kelompok itik kontrol.

### Morbiditas dan mortalitas itik lokal coba pascatantang

Itik yang divaksinasi dan ditantang dengan virus H5N1 A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012, A/ck/wj/Subang-29/2007 dan A/ck/wj/ Smi-Part/2006 disampaikan dalam Tabel 1. Itik yang divaksinasi dan ditantang virus AI H5N1 Sukoharjo (Kelompok 1). (tidak memperlihatkan morbiditas dan mortalitas hingga akhir pengamatan (14 hari pascatantang), sedangkan kelompok itik kontrol (tidak divaksinasi) memperlihatkan morbiditas dan mortalitas dengan *mean dead time* (MDT) 6,1 hari pascainfeksi.

Itik yang divaksinasi dan ditantang virus AI H5N1 Subang (Kelompok 2), tidak memperlihatkan morbiditas dan mortalitas. Sementara pada itik kontrol ditantang virus AI H5N1 Subang, memperlihatkan klinis ringan 3 dari 9 ekor pada hari ke 2-4 pascainfeksi seperti; bulu pada bagian kepala berdiri, namun berangsur pulih dan tidak memperlihatkan kematian hingga akhir pengamatan.

Itik divaksinasi dan ditantang virus AI H5N1 Smi-Part (Kelompok 3) tidak memperlihatkan morbiditas

dan mortalitas, demikian pula kelompok itik kontrol diinfeksi AI H5N1 Smi-Part tidak memperlihatkan klinis yang jelas hingga akhir pengamatan.

### Shedding virusantang

*Shedding* virus itik kelompok 1, 2 dan 3 disampaikan pada Tabel 1. Kelompok 1 itik divaksinasi AI H5N1 clade 2.3.2, setelah diinfeksi virus AI H5N1 Sukoharjo, tidak memperlihatkan *shedding* virus pada hari ke 3, 7 dan 14 pascatantang, baik melalui orofaring maupun kloaka. Sedangkan itik kontrol memperlihatkan *shedding* virusantang, melalui orofaring dan kloaka pada hari ke 3 pascainfeksi.

Kelompok 2. Itik divaksinasi AI H5N1 clade 2.3.2, setelah diinfeksi virusantang AI H5N1 Subang, tidak memperlihatkan *shedding* virus pada hari ke 3, 7 dan 14 pascainfeksi virusantang. Kelompok itik kontrol, diinfeksi virus AI H5N1 Smi-Part, memperlihatkan *shedding* virus 3 dari 9 ekor melalui orofaring, dan 3 dari 9 ekor melalui kloaka, pada hari ke 3 pascainfeksi. Kelompok 3. Itik divaksinasi AI H5N1 clade 2.3.2, setelah diinfeksi virusantang AI H5N1 Smi-Part, tidak memperlihatkan *shedding* virus pada hari ke 3, 7 dan 14 pascainfeksi, baik melalui orofaring maupun kloaka. Sedangkan kelompok itik kontrol, memperlihatkan *shedding* virusantang 2 dari 9 ekor melalui orofaring, dan 2 dari 9 ekor melalui kloaka, pada hari ke 3 pascatantang.

**Tabel 1.** Tingkat Perlindungan vaksin inaktif AI H5N1 clade 2.3.2 terhadap virusantang HPAI clade 2.3.2 dan clade 2.1.3 pada itik lokal

| Kelompok virusantang        | Mortalitas jumlah/total | Reisolasi virusantang 3 hari PT |                      | Reisolasi virusantang 7 hari PT |                      | Reisolasi virusantang 14 hari PT |                      |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|
|                             | MDT                     | Orofaring positif/total         | Kolaka positif/total | Orofaring positif/total         | Kolaka positif/total | Orofaring positif/total          | Kolaka positif/total |
| K1. Clade 2.3.2 (Sukoharjo) |                         |                                 |                      |                                 |                      |                                  |                      |
| Kontrol                     | 9/9 (6.1)∅              | 9/9*                            | 9/9*                 | TD                              | TD                   | TD                               | TD                   |
| Vaksinasi                   | 0/10                    | 0/10                            | 0/10                 | 0/10                            | 0/10                 | 0/10                             | 0/10                 |
| K2. Clade 2.1.3 (Subang)    |                         |                                 |                      |                                 |                      |                                  |                      |
| Kontrol                     | 0/9                     | 5/9#                            | 3/9#                 | 0/9                             | 0/9                  | 0/9                              | 0/9                  |
| Vaksinasi                   | 0/10                    | 0/10                            | 0/10                 | 0/10                            | 0/10                 | 0/10                             | 0/10                 |
| K2. Clade 2.1.3 (Smi-Part)  |                         |                                 |                      |                                 |                      |                                  |                      |
| Kontrol                     | 0/9                     | 6/9**                           | 2/9**                | 0/9                             | 0/9                  | 0/9                              | 0/9                  |
| Vaksinasi                   | 0/10                    | 0/10                            | 0/10                 | 0/10                            | 0/10                 | 0/10                             | 0/10                 |

MDT = mean dead time

TD = tidak dilakukan

∅ = satu ekor itik kontrol setelah 14 PT tidak mati, dan mengalami torticollis

\* = kematian embrio pada isolasi virus 24 jam

# = kematian embrio pada isolasi virus 72 jam

\*\* = kematian embrio pada reisolasi virus 30 jam

**Titer Antibodi AI H5N1 pada itik coba 14 hari pascatantang**

Kandungan titer antibodi AI H5N1 pascatantang disampaikan pada Tabel 2. Kelompok 1 itik divaksinasi AI H5N1 clade 2.3.2, setelah 14 hari pascainfeksi virus AI H5N1 Sukoharjo memperlihatkan titer antibodi dengan rata-rata 7log<sub>2</sub> terhadap antigen homolog AI H5N1 Sukoharjo. Sedangkan terhadap antigen AI H5N1 clade 2.1.3 Subang dan Smi-Part adalah 2,9 log<sub>2</sub> dan 1 log<sub>2</sub> secara berurutan. Itik kontrol (*not recovery*) diinfeksi virus AI H5N1 Sukoharjo, memperlihatkan titer antibodi 8log<sub>2</sub> terhadap antigen AI H5N1 Sukoharjo dan 1 log<sub>2</sub> baik terhadap antigen AI H5N1 Subang maupun AI H5N1 Smi-Part.

Kelompok 2. Itik divaksinasi AI H5N1 clade 2.3.2, setelah diinfeksi virus AI H5N1 Subang. Titer antibodi memperlihatkan dengan rata-rata 5,4 log<sub>2</sub> terhadap antigen homolog Sukoharjo, sementara terhadap antigen AI H5N1 Subang dan Smi-Part, rata-rata titer antibodi 2,1 log<sub>2</sub> dan 1,1 log<sub>2</sub> secara berurutan. Itik kontrol diinfeksi virus H5N1 Subang (tidak menyebabkan kematian), rata-rata titer antibodi 0,2 log<sub>2</sub> terhadap antigen AI H5N1 Sukoharjo, dan 2,6 log<sub>2</sub> dan 1,3 log<sub>2</sub> terhadap antigen AI H5N1 Subang dan AI H5N1 Smi-Part secara berurutan.

Kelompok 3, itik divaksinasi AI H5N1 clade 2.3.2, setelah diinfeksi virus AI H5N1 Smi-Part, memperlihatkan rata-rata titer antibodi 5,8 log<sub>2</sub> terhadap antigen AI H5N1 clade 2.3.2 Sukoharjo, sementara terhadap antigen AI H5N1 Subang dan AI H5N1 Smi-Part, rata-rata titer antibodi 1,2 log<sub>2</sub> dan 2,1 log<sub>2</sub> secara berurutan. Itik kontrol diinfeksi virus AI H5N1 clade 2.1.3 Smi-Part (tidak menyebabkan kematian), dan memperlihatkan titer antibodi 0,3 log<sub>2</sub> terhadap antigen

AI H5N1 Sukoharjo, sedangkan terhadap antigen AI H5N1 Subang dan Smi-Part adalah 1,3 log<sub>2</sub> dan 2,9 log<sub>2</sub> secara berurutan

**PEMBAHASAN**

Hasil penelitian vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 (A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012) pada itik lokal umur 3 minggu (sudah tidak memiliki maternal antibodi), memperlihatkan respon pascavaksinasi yang baik. Vaksin ini mengandung antigen 256 HAU dalam 1 dosis, memberikan respon titer antibodi yang baik pada itik coba dengan rata-rata 6,6 log<sub>2</sub> setelah 3 minggu pascavaksinasi. Itik coba yang mendapat vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 (A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012), mendapatkan perlindungan dari klinis dan kematian, serta shedding virus akibat infeksi virus HPAI subtipe H5N1 clade 2.3.2 dan subtipe H5N1 clade 2.1.3. Walaupun kedua virus (AI subtipe H5N1 clade 2.3.2 dan AI subtipe H5N1 clade 2.1.3) memiliki perbedaan kekerabatan 7-9% pada asam nukleat (Wibawa et al. 2012). Selain itu 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 1µg 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. Sementara Swayne (2014) telah menyarankan 1024 HAU antigen dalam vaksin bivalen (clade 2.1.3 dan 2.3.2), untuk mengantisipasi perubahan virus AI H5N1 saat ini dilapang.

Itik tidak divaksinasi (kontrol), diinfeksi virus AI subtipe H5N1 clade 2.1.3 (A/ck/wj/Subang-29/2007

**Tabel 2.** Kandungan antibodi AI H5N1 pada itik coba pascatantang

| Virus tantang                  | Rataan Titer antibodi HI AI (log <sub>2</sub> ) |                |                  |
|--------------------------------|---|----------------|------------------|
|                                | Ag H5N1 Sukoharjo                               | Ag H5N1 Subang | Ag H5N1 Smi-Part |
| Kelompok 1. ( H5N1 Sukoharjo ) |   |                |                  |
| Itik Vaksinasi                 | 7   | 2,9            | 1                |
| Itik Kontrol                   | 8*  | 1              | 1                |
| Kelompok 2. ( H5N1 Subang )    |   |                |                  |
| Itik Vaksinasi                 | 5,4   | 2,1            | 1,1              |
| Itik Kontrol                   | 0,2   | 2,6**          | 1,3              |
| Kelompok 3. ( H5N1 Smi-Part )  |   |                |                  |
| Itik Vaksinasi                 | 5,8   | 1,2            | 2,1              |
| Itik Kontrol                   | 0,3   | 1,3            | 2,9 <sup>#</sup> |

\* = Itik kontrol (satu ekor) tidak mati, namun *torticolis*

\*\* = Itik kontrol tidak mati

# = Itik kontrol tidak mati

dan A/ck/wj/Smi-Part/2006), tidak memperlihatkan gejala klinis HPAI yang jelas hingga akhir pengamatan. Fenomena ini belum diketahui penyebabnya, hal serupa pernah disampaikan oleh Wibawa et al. (2014), itik Peking diinfeksi virus AI H5N1 clade 2.1.3 Indonesia dengan dosis  $10^{7.7}$  EID<sub>50</sub>, tidak menimbulkan gejala klinis HPAI yang jelas hingga 18 hari pascainfeksi, namun shedding virus terdeteksi baik melalui uji reisolasi maupun RRT-PCR. Sedangkan ayam broiler diinfeksi virus H5N1 clade 2.1.3 Indonesia, memperlihatkan klinis HPAI, berupa cyanosis pada wajah dan pial, setelah 24 jam pascainfeksi dan mengakibatkan kematian setelah 30 jam pascainfeksi (Wibawa et al. 2014). Pada penelitian ini itik lokal tidak divaksinasi (kontrol), tidak memperlihatkan kematian hingga hari ke 14 pascainfeksi, sementara titer antibodi terdeteksi dengan rata-rata 2,6 log<sub>2</sub> terhadap antigen AI H5N1 Subang dan 2,9 log<sub>2</sub> terhadap antigen AI H5N1 Smi-Part. Hal ini menunjukkan virus tantangan memberikan respon imun pada itik lokal, walaupun titer tantangan virus A/ck/wj/Subang-29/2007 dan A/ck/wj/Smi-Part/2006 memperlihatkan sedikit penurunan setelah digunakan uji tantangan yaitu;  $10^{5.6}$  EID<sub>50</sub> dan  $10^{5.7}$  EID<sub>50</sub> secara berurutan, hal ini bisa disebabkan pengaruh suhu lingkungan dan lamanya waktu saat virus digunakan untuk uji tantangan.

*Shedding* virus tantangan AI H5N1 clade 2.1.3 (Subang dan Smi-Part) pada kelompok itik divaksinasi AI H5N1 clade 2.3.2 (Sukoharjo) tidak terdeteksi sejak 3 hari pascainfeksi, sedangkan pada kelompok itik kontrol *shedding* virus terdeteksi pada hari ke 3 pascainfeksi. Hal ini memperlihatkan itik divaksinasi AI H5N1 Sukoharjo tidak mengsekresi virus tantangan dan mencemari lingkungan, sementara itik tidak divaksinasi mengsekresikan virus tantangan dan berdampak mencemari lingkungan, walaupun virus AI H5N1 clade 2.1.3 yang digunakan pada penelitian ini tidak menimbulkan penyakit dan klinis.

Hasil efikasi vaksin pada penelitian ini menunjukkan virus AI H5N1 A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012 sangat baik, sebagai benih vaksin AI H5N1 clade 2.3.2, dan sesuai acuan FOHI (2013) dan (Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2014) mampu memberikan perlindungan 100% dari kematian dan *shedding* virus tantangan HPAI H5N1 clade 2.3.2 dan clade 2.1.3.

Saran vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 (Sukoharjo) perlu dilakukakan uji lapang terbatas, agar efektifitas vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 (Sukoharjo) pada kondisi lapang dalam memberikan respon vaksinasi serupa dengan hasil uji skala laboratorium, perlu diperhatikan formulasi serta kondisi dari vaksin AI H5N1 clade 2.3.2 saat digunakan dilapang serta cara pemeliharaan itik dilapang dengan manajemen yang baik (Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2014).

## KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan vaksin inaktif AI subtype H5N1 clade 2.3.2 (A/Duck/Sukoharjo/Bbv-1428-9/2012) pada itik lokal, mampu memberikan perlindungan 100% dari kematian dan *shedding* terhadap infeksi virus HPAI subtype H5N1 clade 2.3.2, dan clade 2.1.3, sehingga seed vaksin ini dapat menjadi pilihan terbaik untuk digunakan pada itik.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terlaksana atas anggaran penelitian dana DIPA BBLitvet tahun 2013. Penghargaan dan ucapan terimakasih disampaikan kepada Saudara Apipudin, Ali Haminudin dan semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- [BBPMSOH] Balai Besar Pengujian Mutu Sertifikasi Obat Hewan. 2014. Dalam rapat: Vaksinasi AI pada Itik /Unggas. Surat Keputusan no. 03051/PD 620/F/01/2013. 03 Januari 2013, Jakarta.
- Beato MS, Toffan A, Nardi RD, Cristalli A, Terregino C, Cattoli G, Capua I. 2007. A conventional, inactivated oil emulsion vaccine suppresses shedding and prevents viral meat colonisation in commercial (Pekin) ducks challenged with HPAI H5N1. *Vaccine*. 25:4064-4072
- Chen H, Smith GJ, Li KS, Wang J, Fan XH, Rayner J.M., Vijaykrishna D, Zhang JX, Zhang LJ. 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci*. 103:2845-2850.
- 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 infection in ducks. *Virology*. 359:66-71
- [Dirjen PKH] Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2012. Data Statistik Peternakan tahun 2012.
- [Dirjen PKH] Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2013. Vaksinasi AI pada Itik /Unggas. Surat Keputusan No. 03051/PD 620/F/01/2013. 03 Januari 2013, Jakarta.
- [Dirjen PKH] Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2014. Rumusan Vaksin dan Vaksinasi. 20 Februari 2014, Semarang.
- Ellis TM, Dyrting KC, Wong CW, Chadwick B, Chan C, Chiang M, Li C, Li P, Smith GJ, Guan Y, Peiris JSM. 2009. Analysis of H5N1 avian influenza infections from wild bird surveillance in Hong Kong from January 2006 to October 2007. *Avian Pathol*. 38:107-119.

- [FOHI] Farmakope Obat Hewan Indonesia. 2013. Vaksin Influenza Inaktif. Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. Edisi 4. hlm. 69-70.
- Indriani R, Dharmayanti NPLI, Parede L, Wiyono A, Darminto. 2004. Deteksi respon antibodi dengan uji hemagglutinasi inhibisi dan titer proteksi terhadap virus Avian Influenza subtype H5N1. *JITV*. 9:204-209.
- Indriani R., Dharmayanti NLPI, Adjid RMA. 2014. Efikasi vaksin AI H5N1 clade 2.1.3 yang beredar di Indonesia pada itik Mojosari terhadap virus tantang AI H5N1 clade 2.3.2. *JITV*. 19:59-66.
- Jiang WM, Liu S, Chen J, Hou GY, Li JP, Cao YF, Zhuang QY, Li Y, Huang BX, Chen JM. 2010. Molecular epidemiological surveys of H5 subtype highly pathogenic avian influenza viruses in poultry in China during 2007-2009. *J Gen Virol*. 91:2491-2496.
- Kim KJ, Seiler P, Forrest HL, Khalenkov AM, Franks J, Kumar M, Karesh WB, Gilbert M, Sodnomdarjaa 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*. 82:11374-11382.
- Kou Z, Li Y, Yin Z, Guo S, Wang M, Gao X, Li P, Tang L, Jiang P, Luo Z, Xin Z, Ding C, He Y, Ren Z, Cui P, Zhao H, Zang Z, Tang S, Yan B, Lei F, Li T. 2009. The survey of H5N1 flu virus in wild birds in 14 Provinces of China from 2004 to 2007. *PLoS ONE* 4, e6926.
- Kwon HI, Song MS, Pascua PN, Baek YH, Lee JH, Hong SP, Rho JB, Kim JK, Poo H, Kim CJ, Choi YK. 2011. Genetic characterization and pathogenicity assessment of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated from migratory wild birds in 2011, South Korea. *Virus Res*. 160:305-315.
- Li Y, Liu L, Zhang Y, Duan Z, Tian G, Zeng X, Shi J, Zhang L and Chen H. 2011. New avian influenza virus (H5N1) in wild birds, Qinghai, China *Emerg Infect Dis*. 17:265-267
- [OIE] Office International Des Epizooties. 2012. Manual of Standards for Diagnostik Tests and Vaccines. Edisi 7. pp 436-452.
- Robertson SI, Bell DJ, Smith GJ, Nicholls JM, Chan KH, Nguyen DT, Tran PQ, Streicher U, Poon LL, Chen H, Horby P, Guardo M, Guan Y, Peiris JSM. 2006. Avian influenza H5N1 in viverrids: implications for wildlife health and conservation. *Proc Biol Sci*. 273:1729-1732.
- Swayne DE, Patin-Jackwood M. 2006. Pathogenicity of avian influenza viruses in poultry. *Dev Biol*. 124:61-67.
- Swayne, DE. 2007. Progress report of vaccine efficacy. International Avian Influenza vaccination. Jakarta 11-12 Juni 2007. FMPLI,DEPTAN, USDA.
- Swayne, DE. 2014. Dalam : Rumusan Seminar Vaksin dan Vaksinasi. Semarang 20 Februari 2014. Dir Kes Wan.
- Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y & Yamamoto N. 2010. Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology*. 406:88-94.
- Sharshov K, Silko N, Sousloparov I, Zaykovskaya A, Shestopalov A, Drozdov I. 2010. Avian influenza (H5N1) outbreak among wild birds, Russia, 2009. *Emerg Infect Dis*. 16:349-351.
- Smith GJ, Vijaykrishna D, Ellis TM, Dyrting KC, Leung YH, Bahl J, Wong CW, Kai H, Chow MK, Duan L, Chan ASL, Zhang LJ, Chen H, Luk GSM, Peiris JSM, Guan Y. 2009. Characterization of avian influenza viruses A (H5N1) from wild birds, Hong Kong, 2004-2008. *Emerg Infect Dis*. 15:402-407.
- Tian G, Suhua Z, Yanbing Li, Zhigao B, Peihong L, Jinping Z, Chengjun Li, Jianzhong S, Kangzhen Y, Hualan C. 2005. Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology*. 341:153-162
- Uchida Y, Mase M, Yoneda K, Kimura A, Obara T, Kumagai S, Saito T, Yamamoto Y, Nakamura K, Tsukamoto K, Yamaguchi S. 2008. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) isolated from whooper swans, Japan. *Emerg Infect Dis*. 14:1427-1429.
- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti NLPI, Irianingsih SH, Miswati Y, 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*. Balai Besar Veteriner Wates Jogjakarta. 2:2-8
- Wibawa H, Bingham J, Nuradji H, Lowthera S, Paynea J, Harpera J, Wonga F, Lunta R, Junaidic A, Middletona D, Meersb J. 2014. The pathobiology of two Indonesian H5N1 avian influenza viruses representing different clade 2.1 sublineages in chickens and ducks. *Microbiol Infect Dis*. 36:175-191.
- [WHO/OIE/FAO] World Health Organization/Office International Des Epizooties/Food Agriculture Organization. H5N1 Evolution Working Group (2012). Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. *Influenza Other Respir Viruses*. 6:1-5.