

Vaksin Polivalen Untuk Mencegah Penyakit Flu Burung

(POLIVALEN VACCINE TO PREVENT BIRD FLU DISEASES)

I Nyoman Suartha¹, I Wayan Wirata², I Gusti Ngurah Narendra Putra², Ni Made Ritha Krisna Dewi², I Made Suma Anthara³, I Wayan Teguh Wibawan⁴, I Gusti Ngurah Kade Mahardika²

¹Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Veteriner,
²Laboratorium Biomedika, ³Laboratorium Farmakologi,
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
Jl Raya Sesetan Gang Markisa No 6 Denpasar Telp (0361) 8423042
⁴Laboratorium Zoonosis Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor
Email : Suartha@khunud@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan vaksin flu burung polivalen yang mengandung dua, tiga atau lebih isolat yang merupakan representasi virus yang bersirkulasi. Penelitian ini menggunakan tiga *seed* virus yaitu (1) Chicken/Denpasar/Unud-01/2004 (H5N1), (2) Chicken/Klungkung/Unud-12/2006 (H5N1), dan (3) Chicken/Jembrana/Unud-17/2006 (H5N1). Ketiga *seed* virus itu dicampur menjadi satu (AI3G) kemudian disuntikkan pada ayam petelur (jenis Isa Brown) umur tiga minggu dan diulang pada umur lima minggu secara intramuskuler. Dosis tiap-tiap *seed* virus yang digabung adalah 2⁷ HA unit. Serum dipanen seminggu dan dua minggu setelah vaksinasi kedua. Hasil pengujian silang berbagai serum ayam diperoleh bahwa aritmatik mean titer (AMT) dari serum yang diuji dengan virus yang sama lebih tinggi dibandingkan dengan pengujian menggunakan virus yang berbeda. Penggunaan virus berbeda untuk pengujian HI, Rataan titer yang dihasilkan lebih rendah 1-2 log. Serum ayam yang divaksin dengan AI3G menunjukkan AMT yang seragam pada uji HI menggunakan isolat-isolat tersebut. Selanjutnya serum ayam percobaan dengan vaksin homolog komersial H5N1 dan heterolog komersial H5N2 menunjukkan AMT yang 1-4 log lebih rendah dibandingkan dengan vaksin AI3G. Disimpulkan vaksin polivalen dengan *seed* vaksin dari virus lapangan direkomendasikan untuk diaplikasikan pada peternakan.

Kata Kunci: vaksin polivalen, flu burung, unggas

ABSTRACT

This study was carried out to determine the use of bird flu polyvalent vaccines containing two or three or more virus isolates representating of circulating viruses in the region. Three seed isolates of avian influenza H5N1 virus were used in this experiment. The isolates were Chicken/Denpasar/Unud-01/2004, Chicken/Klungkung/Unud-12/2006, and Chicken/Jembrana/Unud-17/2006. The seeds were inactivated using 0.01% formaldehyde than mixed (AI3G) aluminium hidroxide adjuvant and then injected intramuscularly to Isa Brown layer chicken at 3 weeks of age and repeated at the age of 5 weeks. The dose of each seed virus was 2⁷ HA units. Sera were collected at one and two weeks after the second vaccination. The result showed that the arithmetic meant titer (AMT) of sera that tested with homologous isolate was higher than the test using a heterologous isolates, in the standard haemagglutination inhibition (HI) assay. The mixed AI3G vaccine produced a uniform AMT against the constituent isolates, while vaccines with individual isolate yielded a lower and more variation in AMT. Further experiments using a commercial homologous H5N1 and heterologous H5N2 commercial vaccines has resulted AMT that 1-4 log lower than AI3G vaccine. It is concluded that polyvalent vaccine with field seed isolates is recommended to be applied in the poultry farm in Indonesia.

Keywords: polivalen vaccine, bird flu, poultry,

PENDAHULUAN

Virus flu burung atau avian influenza (VAI) yang sangat patogen (*highly pathogenic avian influenza virus*/HPAI) subtype H5N1, telah mewabah pada unggas di Indonesia sejak akhir 2003 (WHO, 2005). Wabah flu burung yang

sangat patogen tersebut dapat mengakibatkan kehancuran industri ternak unggas (Webster dan Govorkova, 2006). Kerugian ekonomi yang berdampak langsung adalah kematian unggas yang terserang dan pemusnahan unggas dalam radius satu kilometer dari wilayah wabah. Dampak ekonomi secara tidak langsung adalah

kehilangan pekerjaan bagi pekerja kandang, penyedia jasa peternakan unggas, dan kehilangan sumber pendapatan keluarga peternak. Biaya yang besar dan waktu yang lama diperlukan untuk pencegahan penyebaran lebih lanjut (WHO, 2005). Selama wabah berlangsung di Indonesia dan negara lain di dunia, ratusan juta ayam, itik dan jenis unggas lainnya, telah dimusnahkan untuk menghentikan laju penyebaran wabah flu burung. Bagi negara berkembang yang memerlukan unggas dan telur sebagai sumber utama protein, dampak wabah flu burung terhadap keadaan gizi rakyatnya juga sangat besar. Kerugian ekonomi yang ditimbulkan akibat wabah flu burung di seluruh dunia diperkirakan sebesar 10 miliar AS dolar (FAO 2005).

Infeksi virus flu burung menyebabkan kerugian ekonomi yang besar dan ancaman pada ketahanan pangan. Virus HPAI tersebut juga telah terbukti dapat melompati barrier spesies unggas-manusia dan dapat menjadi ancaman pandemi (De Jong *et al.*, 1997; Fouchier *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004). Oleh karena itu, pencegahan infeksi pada unggas sangat penting. Strategi yang umum dilakukan untuk pengendalian flu burung pada unggas adalah pemusnahan unggas yang tertular dalam radius tertentu (*stamping out/preemptive culling*), biosekuriti, dan vaksinasi.

Berbagai sediaan vaksin flu burung untuk unggas telah banyak dicoba, akan tetapi sediaan yang umum untuk penggunaan komersial adalah vaksin virus inaktif dalam *adjuvant* minyak (Van der Goot *et al.*, 2005). Vaksin jenis tersebut telah terbukti dapat melindungi unggas dari gejala klinis dan kematian, tetapi tidak menekan ekskresi virus (Capua *et al.*, 2002). Fakta tersebut menimbulkan keraguan tentang daya-guna vaksinasi dalam mencegah penyebaran antar hewan. Penularan yang tak kasat mata tersebut (*silent transmission*) meningkatkan risiko wabah baru dan membawa ancaman pada kesehatan masyarakat. Salah satu masalah dalam strategi vaksinasi adalah penentuan *seed* virus yang digunakan sebagai bibit vaksin yang baku. Virus influenza merupakan virus yang secara antigenik sangat labil sehingga penentuan *seed* vaksin menjadi masalah yang pelik.

Akhir-akhir ini, banyak kalangan mengeluhkan daya-perlindungan vaksin flu burung dan tingginya prevalensi virus dari unggas hidup yang dipasarkan. Hal tersebut

diduga karena penggunaan vaksin yang tidak tepat. Vaksin yang tersedia umumnya hanya mampu mencegah dengan sempurna timbulnya gejala klinis akan tetapi tidak mampu menekan pengeluaran virus (*virus shedding*) secara sempurna, jika unggas yang divaksin terpapar virus lapang yang ganas. Hal itu dapat menyebabkan virus flu burung dapat dideteksi dari unggas sehat yang diperjualbelikan dipasar, dengan persentase dibawah 5% (FAO, 2008).

Penelitian sebelumnya menyimpulkan bahwa semua virus flu burung H5N1 Indonesia berevolusi dari satu introduksi tunggal (Smith *et al.*, 2006), dan telah diprediksi berasal dari unggas domestik di Cina Selatan (Li *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). Virus flu burung telah mencapai kondisi endemik di Indonesia dan berkembang menjadi kelompok-kelompok genetik A, B, dan C dengan sebaran geografis yang bervariasi. Sub-kelompok A ditemukan di Jawa, Sulawesi Selatan, dan Timor Barat. Sub-kelompok B terisolasi dari Jawa, Bali, Flores dan Timor Barat, dan sub-kelompok C berasal dari isolat Jawa dan Sumatra (Smith *et al.*, 2006). Penggunaan vaksin heterolog H5N2 dan H5N9 tampaknya juga tidak memberikan proteksi yang sempurna, karena dari analisis materi genetik dan asam amino protein hemagglutinin (HA) menunjukkan perbedaan yang cukup jauh dengan virus flu burung H5N1 asal Indonesia (Mahardika *et al.*, 2009). Penelitian ini bertujuan mencari vaksin yang ideal dan dapat digunakan di seluruh wilayah Indonesia. Vaksin yang dicoba adalah vaksin campuran (polivalen) yang mengandung representasi ketiga kelompok virus flu burung H5N1 Indonesia.

METODE PENELITIAN

Keamanan Laboratorium

Semua pekerjaan laboratorium dengan virus aktif dilakukan dalam ruangan khusus yang kedap udara dengan fasilitas penyaring udara masuk dan keluar dengan HEPA filter, yang didalamnya dilengkapi dengan Biosafety Cabinet Class III (BSC-III) bertekanan negatif dan *autoclave*. Semua bahan yang hendak dibuang dan alat yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dalam *autoclave* sebelum dikeluarkan dari ruangan. Tenaga kerja yang bekerja dalam ruangan tersebut selalu dilengkapi dengan *Personal Protective Equipment* (PPE) baku.

Bibit Vaksin dan Antibodi Standar

Tiga isolat virus HPAI H5N1 yang digunakan untuk bibit vaksin (*seed* vaksin) adalah isolat virus flu burung asal ayam kampung dari Bali yaitu (1) Chicken/Denpasar/Unud-01/2004 (H5N1), (2) Chicken/Klungkung/Unud-12/2006 (H5N1), dan (3) Chicken/Jembrana/Unud-17/2006 (H5N1) (Mahardika dan Tim Kajian AI FKH Unud 2006). Ketiga bibit vaksin itu telah dikarakterisasi dan tersedia di laboratorium Biomedik FKH Unud. Anti VAI-H5N1 dan anti NDV standar diperoleh dari Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.

Pembuatan Vaksin Poliklonal

Pembuatan vaksin poliklonal khas masing-masing isolat (Chicken/Denpasar/Unud-01/2004 (H5N1), Chicken/Klungkung/Unud-12/2006 (H5N1), dan Chicken/Jembrana/Unud-17/2006 (H5N1)) dilakukan dengan mencampur masing-masing isolat virus dengan titer 2^7 yang telah diinaktivasi dengan *adjuvant* aluminium hidroksida dengan perbandingan 50:50. Vaksin campuran representasi ketiga kelompok genetik dan antigenik virus flu burung H5N1 Indonesia (AI3G) dilakukan dengan mencampur masing-masing isolat dengan dosis masing-masing 2^4 dengan *adjuvant* aluminium hidroksida dengan perbandingan 50:50.

Prosedur Vaksinasi

Ayam petelur (jenis Isa Brown) umur tiga minggu digunakan dalam penelitian ini. Masing-masing isolat (vaksin) menggunakan 10 ekor ayam sebagai ulangan. Penyuntikan vaksin (vaksinasi) dilakukan secara intramuskuler dan pengulangan vaksinasi dilakukan dua minggu kemudian. Panen serum untuk mengetahui titer antibodi dilakukan sebelum vaksinasi, dua minggu pascavaksinasi I, dan dua minggu pascavaksinasi II.

Uji Hambatan Hemaglutinasi

Penapisan (*screening*) serum untuk melacak antibodi dilakukan dengan uji hambatan hemaglutinasi (HI) cepat. Ke dalam plat mikro, ditetaskan sebanyak 0,025 ml serum yang telah diperlakukan awal dan 0,025 ml antigen *avian influenza* 4 HA unit. Selanjutnya plat mikro beserta isinya digoyang selama 30 detik, kemudian dieramkan selama 30 menit. Sebanyak 0,05 ml suspensi sel darah merah 5% ditambahkan kembali ke dalam lubang tersebut lalu digoyang selama 30 detik. Hasil dapat diamati setiap 15 menit setelah perlakuan

terakhir. Kontrol virus dibuat bersama-sama dengan saat melakukan uji HI, dengan materi berupa 0,025ml PBS, 0,025ml *antigen avian influenza* 4 HA unit, dan 0,05ml suspensi sel darah merah 0,5%. Kontrol darah dibuat dengan mengikuti langkah yang sama dengan materi berupa 0,05 ml PBS dan 0,05 ml suspensi sel darah merah. Serum diperiksa lebih lanjut dengan uji HI titrasi apabila terbentuk endapan nyata di dasar tabung.

Untuk mengetahui titer antibodi, maka dilakukan uji HI titrasi dengan dua kali ulangan. Phosphat buffer saline sebanyak 0,025 ml, dimasukkan ke dalam lubang ke-2 sampai ke-12 dari lubang pertama dan kedua diisi dengan serum dan kemudian diencerkan secara seri kelipatan dua dari lubang kedua sampai dengan lubang ke-11 dengan pengencer mikro. Ditambahkan masing-masing 0,025 ml suspensi antigen 4 HA unit ke dalam lubang ke-1 sampai ke-11. Lubang ke-12 hanya diisi dengan PBS 0,025 ml. Setelah menyelesaikan prosedur, dilakukan penggoyangan selama 30 detik dan diinkubasi dalam suhu kamar selama 30 menit. Ditambahkan 0,05 ml suspensi sel darah merah 0,5% ke dalam lubang ke-1 sampai ke-12 dan digoyang kembali selama 30 detik. Kemudian plat mikro diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam dan diamati setiap 15 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian silang berbagai serum ayam yang divaksinasi dengan berbagai vaksin monovalen maupun polivalen AI3G serta vaksin komersial homolog H5N1 dan heterolog H5N2 dan diuji dengan HI dengan antigen bervariasi ditampilkan pada Tabel 1. Geometrik Mean Titer (GMT) dari serum yang diuji dengan virus yang sama, yaitu sesuai dengan kandungan bibit vaksin selalu paling tinggi dibandingkan dengan pengujian menggunakan virus yang berbeda. Jika menggunakan virus berbeda untuk pengujian HI, rata-rata titer yang dihasilkan lebih rendah 1-2 log. Pengujian serum A/Jembrana/2006 dengan virus A/Klungkung/2006 menunjukkan 4 log lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan virus yang sama. Serum ayam yang divaksin dengan AI3G yang merupakan gabungan tiga isolat yaitu A/Denpasar/2004, A/Klungkung/2005, dan A/Jembrana/2006 menunjukkan GMT yang seragam pada uji HI. Selanjutnya serum ayam percobaan dengan vaksin homolog komersial

Tabel 1. Rataan titer aritmatik (Aritmathic mean titer/AMT) serum ayam percobaan yang divaksinasi dengan berbagai vaksin yang diproduksi dan vaksin komersial homolog dan heterolog

Vaksin	AMT dengan antigen			Rataan
	A/Dps/04	A/Jbr/06	A/Klk/06	
A/Dps/04	6,7	5,8	4,6	5,7
A/Jbr/06	6,9	8,3	4,3	6,5
A/Klk/06	5,4	5,7	6,4	5,8
AI3G	7,7	6,3	7,4	7,2
H5N1 Komersial	4,0	4,6	4,2	4,3
H5N2 komersial	5,2	4,2	5,0	4,8

H5N1 dan vaksin heterolog komersial H5N2 menunjukkan GMT yang 1-4 log lebih rendah dibandingkan dengan vaksin yang dicobakan dalam penelitian ini.

Vaksin AI dengan *seed* virus homolog H5N1 dan *seed* virus heterolog H5N2 komersial banyak beredar dan digunakan di peternakan. Vaksin komersial dengan *seed* virus homolog H5N1 bukan merupakan *seed* virus asal Indonesia. Idealnya, vaksin yang digunakan mestinya mempunyai homologi genetik dan antigenik yang mendekati sempurna dengan virus yang beredar di wilayah yang bersangkutan (Mahardika *et al.*, 2009).

Kajian yang dilaporkan oleh Smith *et al.*, (2006) dan juga Chen *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa virus-virus asal Indonesia tidak bereaksi dengan antibodi terhadap representatif virus asal Vietnam, demikian juga sebaliknya, namun masih menunjukkan reaksi silang dengan virus asal Hong Kong dan Cina. Variasi antigenik juga tampak jelas antar virus-virus asal Indonesia. Variasi antigenik tersebut bahkan ditunjukkan dengan reaksi silang antara antibodi yang berasal dari satu grup titer antibodi terhadap virus-virus dari masing-masing subkelompok sampai empat log (Smith *et al.*, 2006).

Adanya ancaman dari penyakit flu burung, maka vaksinasi flu burung merupakan komponen penting dalam mempertahankan produksi dan kelangsungan peternakan ayam, baik ayam petelur maupun pedaging komersial, yang berskala besar, menengah, atau kecil. Akhir-akhir ini, banyak kalangan mengeluhkan daya-perlindungan vaksin flu burung dan tingginya prevalensi virus dari unggas hidup yang dipasarkan. Hal tersebut diduga karena penggunaan vaksin yang tidak tepat.

Proteksi yang tidak sempurna juga tampaknya terjadi akibat penggunaan vaksin

yang heterolog H5N2 atau H5N9. Jarak genetik protein hemaglutinin semua isolat H5N2 dan H5N9 dengan H5N1-isolat hewan asal Indonesia, masing-masing 9,7% dan 6,8%, terlalu jauh untuk menimbulkan proteksi yang sempurna. Jarak itu makin jauh lagi pada analisis bagian hemaglutinin yang telah diketahui berperan dalam menginduksi kekebalan protektif (13,1% pada H5N2 dan 8,8% pada H5N9) (Mahardika *et al.*, 2009).

Kasus-kasus kegagalan vaksinasi mungkin akan semakin sering terjadi. Kalaupun unggas yang divaksin tetap tidak menunjukkan gejala klinis yang nyata, penurunan produksi dan tingginya beban virus (*virus burden*) pada lingkungan dapat menjadi konsekuensi logis pada penggunaan *seed* vaksin yang tidak sesuai. Dengan demikian risiko kerugian ekonomi dan kesehatan masyarakat akan tetap tinggi, disamping itu, penggunaan vaksin ditenggarai dapat memicu munculnya varian akibat mutasi dan vaksinasi menyembunyikan virus menular (*masking effect*) (Webster dan Hulse 2004) dapat menjadi ancaman baru.

Virus flu burung H5N1 asal Indonesia telah berevolusi dan kian menyebar di Indonesia melalui perantara lalu lintas unggas dan produk perunggasan (Chen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). Fakta perkembangan virus flu burung di Indonesia dan perbedaan genetik virus H5N2 dan H5N9 dengan virus H5N1-isolat hewan asal Indonesia mempunyai implikasi yang besar dalam pemilahan bibit vaksin yang hendak digunakan di suatu wilayah. Dengan bukti di atas dapat digunakan sebagai dasar untuk mengatakan vaksin yang ideal dan dapat digunakan untuk seluruh Indonesia adalah vaksin campuran yang mengandung representasi ketiga kelompok virus flu burung H5N1 Indonesia.

SIMPULAN

Untuk mengatasi masalah variasi antigenik virus lapang, vaksin polivalen dengan campuran seed virus yang beredar di lapang direkomendasikan untuk diaplikasikan pada peternakan. Konstituen vaksin dapat diganti sesuai dengan perkembangan virus lapang.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui protektivitas antibodi yang terbentuk melalui uji tantang dengan virus flu burung H5N1 HPAI.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia atas bantuan dana penelitian melalui proyek Riset Insentif Terapan Tahun 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF. 2002. Development of DIVA strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol* 32:47-55.
- Chen H, Smith GJD, Li KS, Wang J, Fan XH, Rayner JM, Vijaykrishna D, Zhang JX, Zhang LJ, Guo CT, Cheung CL, Xu KM, Duan L, Huang K, Qin K, Leung YHC, Wu WL, Lu HR, Chen Y, Xia NS, Naipospos TSP, Yuen KY, Hassan SS, Bahri S, Nguyen TD, Webster RG, Peiris JSM, Guan Y. 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 Influenza virus in Asia: implication for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2845-2850.
- De Jong MM, Hien TT. 1997. Avian Influenza A (H5N1). *J Clin Virol* 35 : 2-13
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2005. A Global Strategy for the progressive control of highly pathogenic avian influenza (HPAI). Rome, Food and Agriculture Organization.
- Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SAG, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Doornum GJJV, Koch GBA, Koopmans M, Osterhaus ADME. 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and fatal case of acute respiratory distress syndrome. *PNAS* 101: 1356-1361.
- Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Raharjo AP, Puthawathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepongastie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS. 2004. Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern asia. *Nature* 430:209-213.
- Mahardika IGNK dan Tim Kanjian AI FKH Unud. 2006. "Laporan Kajian AI pada Babi dan Monyet Tahun 2006" . FKH Unud, Denpasar, 2006.
- Mahardika IGNK, Suartha IN, Suardana IB, Kencana IGAY, Wibawan IWT. 2009. Perbandingan Sekuens Konsensus Gen Hemagglutinin Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Asal Unggas di Indonesia dengan Subtipe H5N2 dan H5N9 . *Jurnal Veteriner* 10 (1):12-16.
- Smith GDJ, Naipospos TSP, Nguyen TD, De Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YLC, Cheung CL, Rayner , Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Yuan G. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human host in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350: 258-268.
- Webster RG, and Hulse DJ. 2004. "Microbial Adaptation and Change : Avian Influenza". *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 23(2):453-465.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992. "Evolution and Ecology of Influenza A Viruses". *Microbiological Reviews.* 56(1):152-179.
- Webster RG, Govorkova EA. 2006. H5N1 continuing evolution and spread. *N Engl J. Med* 355: 2174-2177
- WHO 2005. Evolution of H5N1 avian Influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis* 11:1515-1521.