

ISSN : 1411-8327

# Jurnal Veteriner

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN INDONESIA

39 39  
**Vol. 9, No. 3, September 2008**

Terakreditasi Dirjen Dikti S.K. No. 55/DIKTI/Kep/2005

FILOGENETIK & STRUKTUR ANTIGENIK  
VIRUS FLU BURUNG UNGGAS AIR

AMINO TERMINUS GEN POLIMERASE BASIK-2  
VIRUS FLU BURUNG  
PADA HEWAN-HEWAN DI INDONESIA

VIABILITAS OOSIT ASAL OVARIUM DOMBA  
PASCAIMPLANTASI DALAM UTERUS KELINCI

MENGHAMBAT ENZIM ALPHA GLIKOSIDASE  
PADA TIKUS DIABETES

MELACAK VIRUS TETELO DENGAN RT-PCR

GAMBARAN AORTA TIKUS SIROSIS  
SETELAH PEMBERIAN ENDOTOKSIN E.COLI

MHC SAPI MADURA

MENURUNKAN KOLESTEROL SERUM DAN TELUR

## Filogenetik dan Struktur Antigenik Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Isolat Unggas Air

(PHYLOGENETIC AND ANTIGENIC STRUCTURE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS OF H5N1 SUBTYPE ISOLATED FROM WATERFOWLS)

R Susanti<sup>1</sup>, Retno Damajanti Soejoedono<sup>2</sup>, I Gusti Ngurah Kade Mahardika<sup>3</sup>,  
I Wayan Teguh Wibawan<sup>2</sup>, Maggy Thenawidjaja Suhartono<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang (UNNES)  
Gedung D6 Lt 1. Kampus Sekaran Jl. Raya Sekaran, Gunungpati, Semarang.  
Telepon: (024) 8508033; E-mail: rsant\_ti@yahoo.com

<sup>2</sup>Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet FKH IPB,  
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor

<sup>3</sup>Laboratorium Virologi; Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Hewan  
FKH Universitas Udayana,

Jl. Raya Sesetan Gang Markisa No. 6 Denpasar, Bali

<sup>4</sup>Fakultas Tekonologi Pertanian IPB, Jl. Kamper Kampus IPB Dramaga, Bogor

### ABSTRACT

A study was carried (1) to analyze the phylogenetic relationship of fragment hemagglutinin (HA) gene of avian influenza viruses (AIV) subtype H5N1 isolated from apparently healthy backyard waterfowls in West Java with representative of animal and human isolates from Indonesia and some countries in Asia; (2) to find out cross-reactivity of those viruses with a standard Indonesian strain. Nucleotide sequences of HA gene of AIV H5N1 from backyard waterfowls along with other H5N1 isolates of Indonesian and Asian origin were aligned using with ClustalW of MEGA 3.1 program. Estimation of genetic distance and the construction phylogenetic tree were conducted by Neighbor Joining method and calculation of distance matrix using Kimura 2-parameter. Antigenic analysis was conducted using hemagglutination inhibition (HI) test. Result of phylogenetic analysis indicated that all viruses from backyard waterfowls form three distinct sublineages. One lineage was located in Indonesia cluster and two lineages in Asia cluster. In the phylogenetic analysis, it was concluded that multiple introductions of AIV H5N1 to Indonesia have occurred. Six AI H5N1 viruses from backyard waterfowls (IPB1-RS to IPB6-RS) appeared to be different ancestors those isolated previously in Indonesia. Cross-antigenic analysis showed that nine viruses isolates used in this study were antigenically different to Legok 2003 chicken strain of AIV H5N1. The HI titer of anti-Legok 2003 antibody with all newly isolated viruses is up to 6 log lower than the HI titer using homolog strain.

Key word: phylogenetic, antigenic, avian influenza viruses H5N1, waterfowls

### PENDAHULUAN

Virus Avian Influenza (VAI) subtipe H5N1 dari berbagai negara, secara filogenetik terpisah menjadi 2 *clade*. *Clade* 1 adalah virus yang diisolasi pada unggas dan manusia di Kamboja, Thailand, Vietnam, Laos, Korea Selatan, dan Jepang tahun 2003-2004. *Clade* 2 terbagi menjadi 3 *subclade*. *Subclade* 1 adalah virus dari Indonesia tahun 2004-2006 dan isolat Hongkong tahun 2003. *Subclade* 2 adalah isolat virus dari Rusia, Turki, dan Timur Tengah tahun 2005-2006. *Subclade* 3 adalah isolat dari Laos, Thailand, Kamboja, dan Vietnam tahun

2005-2006 (WHO, 2005; Webster dan Govorkova, 2006).

Virus-virus dalam *clade* dan *subclade* terpisah mempunyai perbedaan struktur antigenik, sehingga setiap *clade* atau *subclade* memerlukan vaksin yang berbeda. Studi pada *feret* menunjukkan bahwa vaksin terhadap satu *clade* tidak protektif terhadap *clade* lainnya. Sejalan dengan temuan itu, virus Indonesia juga dilaporkan tidak bereaksi dengan antibodi terhadap virus Vietnam dan sebaliknya virus Vietnam tidak bereaksi dengan antibodi terhadap virus Indonesia (Smith *et al.*, 2006a). Di samping struktur antigenik, antar *clade* dan

*subclade* yang berbeda juga menunjukkan perbedaan sensitivitas terhadap obat antivirus influenza (Webster dan Govorkova, 2006). Mayoritas virus *clade* 1 resisten terhadap *amantadin* dan *rimantadin*, namun mayoritas virus *clade* 2 sensitif terhadap kedua jenis antivirus tersebut. Meskipun demikian, semua VAI sub tipe H5N1 sensitif terhadap *inhibitor neuraminidase* (Kandun *et al.*, 2006; Webster dan Govorkova, 2006).

VAI sub tipe H5N1 di Indonesia termasuk genotipe Z. Genotipe ini pertama kali ditemukan pada unggas di Cina Selatan tahun 2002 (Smith *et al.*, 2006a). Infeksi VAI sub tipe H5N1 pada manusia mulai terjadi pada Juli 2005. Infeksi VAI sub tipe H5N1 pada manusia terjadi secara sporadis dan menyerang beberapa *cluster/*klaster famili (Kandun *et al.*, 2006; Sedyaningsih *et al.*, 2007). Sejak awal infeksi VAI sub tipe H5N1 sampai bulan Juni 2006, tercatat 54 kasus infeksi dan 21 infeksi di antaranya terjadi pada 7 klaster famili (Sedyaningsih *et al.*, 2007). Kasus infeksi VAI sub tipe H5N1 pada klaster famili kemungkinan dipengaruhi oleh faktor genetik, tingkah laku, imunologik, dan lingkungan (Kandun *et al.*, 2006). Semua kasus infeksi VAI sub tipe H5N1 di Indonesia merupakan VAI sub tipe H5N1 *clade* 2 *subclade* 1 (Kandun *et al.*, 2006; Sedyaningsih *et al.*, 2007).

Analisis filogenetik gen HA VAI sub tipe H5N1 dari berbagai wilayah geografi dan berbagai spesies hewan di Indonesia menunjukkan bahwa virus Indonesia membentuk satu klaster, terpisah dengan isolat dari negara lain. Analisis serupa juga menunjukkan bahwa VAI sub tipe H5N1 Indonesia mengelompok berdasarkan wilayah geografis, sehingga terbentuk 3 grup (A, B, dan C). Grup A adalah kelompok virus dari kawasan tengah dan timur Indonesia, yaitu Jawa, Sulawesi Selatan, dan Timor. Grup B juga terdiri atas isolat virus di kawasan tengah dan timur Indonesia yaitu Jawa, Bali, Flores, dan Timor. Termasuk grup C adalah isolat virus dari pulau Jawa, Sumatera, dan Bangka (Smith *et al.*, 2006a).

VAI sub tipe H5N1 yang diisolasi dari unggas air sehat di peternakan skala rumah tangga di Jawa Barat secara molekuler termasuk *high pathogenic avian influenza* (HPAI) (Susanti *et al.*, 2008a *in press*). Analisis molekuler lebih lanjut pada gen hemagglutinin virus HPAI sub tipe H5N1 isolat unggas air menunjukkan dengan jelas bahwa unggas air berperan sebagai

tempat evolusi VAI, namun spesifisitas reseptor avian  $\alpha$ -2,3NeuAcGal masih tetap dipertahankan (Susanti *et al.*, 2008b *in press*). Untuk mengungkap hubungan kekerabatan dan asal usul VAI sub tipe H5N1 ke Indonesia perlu dilakukan analisis filogenetik VAI isolat unggas air tersebut dengan VAI sub tipe H5N1 asal Indonesia dan negara-negara Asia lainnya.

Artikel ini membahas (1) hasil analisis hubungan filogenetik fragmen gen hemagglutinin (HA) VAI sub tipe H5N1 yang diisolasi dari unggas air yang secara klinis sehat di peternakan skala rumah tangga di Jawa Barat dengan representasi VAI sub tipe H5N1 asal hewan dan manusia di Indonesia dan beberapa negara Asia, (2) hasil percobaan reaksi silang VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air tersebut dengan *strain* VAI sub tipe H5N1 standar Indonesia.

## METODE PENELITIAN

### Analisis Filogenetik

Sikuens nukleotida penyandi hemagglutinin (HA) dan asam amino turunannya dari 9 isolat VAI sub tipe H5N1 asal unggas air diperoleh dari *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) dengan primer yang dirancang khusus (*GeneBank* EF646265-EF646273; Susanti *et al.*, 2008b *in press*, Mahardika, 2003) dan isolat VAI sub tipe H5N1 lain dari Indonesia dan Asia (diperoleh dari *GeneBank*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) disepadankan dengan program ClustalW. Nomor akses *GeneBank* dari isolat yang dianalisis ditampilkan pada Tabel 1. Konstruksi pohon filogeni dianalisis dengan metode *Neighbor-Joining* (Saitou dan Nei, 1987). Persentase replikasi pohon pada yang taksa membentuk klaster di setiap percabangan diuji menggunakan tes *bootstrap* dari 1000 replikasi (Felsenstein, 1985). Kalkulasi *distance matrix* dengan model Kimura 2-parameter (Kimura, 1980), dalam unit dari setiap nomor substitusi basa per *site*. Posisi kodon termasuk *1st+2nd+3rd*. Semua posisi yang mengandung *gap* dan *missing* data dieliminasi dari *dataset* (*complete deletion option*). Analisis filogenetik diimplementasikan dalam program MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

### Uji Antigenesitas Virus

Virus yang diuji dalam penelitian ini adalah 9 isolat VAI sub tipe H5N1 asal unggas air yang

secara klinis sehat di peternakan skala rumah tangga di Jawa Barat (Susanti *et al.*, 2008c *in press*). Gen HA dari virus tersebut telah dianalisis secara molekuler (Susanti *et al.*, 2008b *in press*), dan berdasarkan asam amino bagian *cleavage site*-nya, virus tersebut termasuk HPAI (Susanti *et al.*, 2008a *in press*). Uji antigenesitas dilakukan dengan tes *hemagglutination inhibition* (HI). Antibodi yang digunakan dalam uji ini adalah antibodi VAI subtipe H5N1 yang diproduksi pada marmut setelah disuntik dengan vaksin H5N1 (VAI subtipe H5N1 *strain* ayam Legok 2003). Sumur

1–12 dari *microplate* diisi dengan PBS pH 7,2 masing-masing 25  $\mu$ l. Isolat virus sebanyak 25  $\mu$ l (4 HAU) dimasukkan ke dalam sumur pertama, dan diencerkan bertingkat kelipatan dua dengan PBS sampai sumur ke-12. Sebanyak 25 ml antibodi kemudian ditambahkan pada semua sumur. Setelah dicampur sampai homogen, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Suspensi sel darah merah (SDM) ayam 0,5% ditambahkan ke dalam seluruh sumur. *Microplate* dikocok dengan cara digoyang-goyangkan, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama kurang lebih 30 menit. Sampel

Tabel 1. Nomor akses Genbank isolat virus avian influenza subtipe H5N1 yang dianalisa dalam artikel ini

No	Nama isolat virus	Nomor akses GenBank
1	A/chicken/Bangli Bali/BPPV6-1/2005 (H5N1)	DQ497656
2	A/chicken/Deli Serdang/BPPVI/2005 (H5N1)	EU124108
3	A/chicken/Indonesia-4/2004 (H5N1)	AY651324
4	A/chicken/Indonesia-BL/2003 (H5N1)	AY651321
5	A/chicken/Kulonprogo/BBVW/2005 (H5N1)	DQ497652
6	A/chicken/Magetan/BBVW/2005 (H5N1)	DQ497643
7	A/chicken/Malang/BBVet-IV/2004 (H5N1)	DQ497642
8	A/chicken/Pangkal pinang/BPPV3/2004 (H5N1)	DQ497663
9	A/chicken/Purworejo/BBVW/2005 (H5N1)	DQ497648
10	A/chicken/Indonesia/MS/2004 (H5N1)	AY651322
11	A/duck/Pare-pare/BBVW/2005 (H5N1)	DQ497659
12	A/Indonesia/CDC7/2005 (H5N1)	CY014177
13	A/Indonesia/CDC742/2006 (H5N1)	CY014537
14	A/Indonesia/CDC1046/2007 (H5N1)	CY019416
15	A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1)	NC_007362
16	A/environment/Qinghai/2005 (H5N1)	DQ320922
17	A/chicken/Jilin/ho/2003 (H5N1)	DQ997355
18	A/chicken/Hongkong/86.3/2002 (H5N1)	DQ320927
19	A/chicken/Vietnam/8/2003 (H5N1)	DQ497693
20	A/duck/Uthithani/NIAH6-3-0008/2005 (H5N1)	EF582399
21	A/duck/Guangxi/xa/2001 (H5N1)	DQ997513
22	A/duck/Hubei/3/20/2005 (H5N1)	DQ520856
23	A/goose/Fujian/bb/2003 (H5N1)	DQ997405
24	A/goose/Kamboja/28/2004 (H5N1)	EF473070
25	A/goose/Vietnam/264/2004 (H5N1)	DQ497707
26	A/quail/Malaysia/2004 (H5N1)	DQ320935
27	A/goose/Klapanunggal/IPB7-RS/2006 (H5N1)	EF646265
28	A/muscovy duck/Cileungsi/IPB5-RS/2006 (H5N1)	EF646266
29	A/duck/Parung/IPB8-RS/2006 (H5N1)	EF646267
30	A/duck/Parung/IPB9-RS/2006 (H5N1)	EF646268
31	A/duck/Nagrak/IPB6-RS/2006 (H5N1)	EF646269
32	A/muscovy duck/IPB1-RS/2006 (H5N1)	EF646270
33	A/goose/Leuwiliang/IPB4-RS/2006 (H5N1)	EF646271
34	A/duck/Leuwiliang/IPB3-RS/2006 (H5N1)	EF646272
35	A/goose/Bojonggenteng/IPB2-RS/2006 (H5N1)	EF646273

dinyatakan positif apabila SDM pada sumur sampel mengendap. *Titer* HI dihitung berdasarkan pengenceran tertinggi isolat virus yang mengendapkan SDM (WHO, 2002).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis filogenetik 1.074 nukleotida gen HA dari 9 VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air (*GeneBank* EF646265-EF646273) dan 12 isolat VAI sub tipe H5N1 Asia serta 14 isolat VAI sub tipe H5N1 Indonesia baik asal hewan maupun manusia ditampilkan pada Gambar 1. Sebanyak 1.074 nukleotida yang dianalisis dalam penelitian ini adalah nukleotida nomor 79 sampai 1.152. Pohon filogenetik pada Gambar 1 menunjukkan bahwa dari semua virus yang dianalisis, secara umum membentuk dua klaster terpisah, yaitu klaster Indonesia (klaster 1) dan klaster Asia (klaster 2). VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air asal Jawa Barat berada di kedua klaster tersebut. Tiga VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air (IPB7-RS, IPB8-RS, IPB9-RS) berada pada klaster Indonesia bersama-sama dengan isolat VAI sub tipe H5N1 Indonesia lainnya baik asal hewan (Grup A) maupun manusia. Enam VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air lainnya (IPB1-RS s/d IPB6-RS) berada di klaster Asia. Pada klaster Asia terbentuk 2 subklaster, yaitu subklaster 1 dan 2. VAI sub tipe H5N1 isolat IPB6-RS berada di subklaster 1, terpisah dengan subklaster virus Asia lainnya (subklaster 2). Lima VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air (IPB1-RS s/d IPB5-RS) membentuk subklaster 2 dengan virus Asia lainnya termasuk isolat Gs/GD/1/96.

Analisis filogenetik tersebut menunjukkan bahwa 6 VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air (IPB1-RS s/d IPB6-RS) merupakan *strain* virus yang berbeda dengan VAI sub tipe H5N1 di Indonesia yang telah ditemukan/diisolasi sebelumnya. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa isolat IPB7-RS, IPB8-RS, IPB9-RS merupakan virus-virus yang berevolusi dari virus yang telah diintroduksi ke Indonesia sejak tahun 2003 (Chen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006a). Enam isolat yang lain, yaitu IPB1-RS s/d IPB6-RS berkerabat jauh dengan isolat Indonesia lainnya, dan mengelompok dengan virus klaster Asia. Hasil ini sekaligus mengubah postulat bahwa semua VAI sub tipe H5N1 Indonesia membentuk satu kelompok terpisah dengan kelompok virus dari negara-negara lain

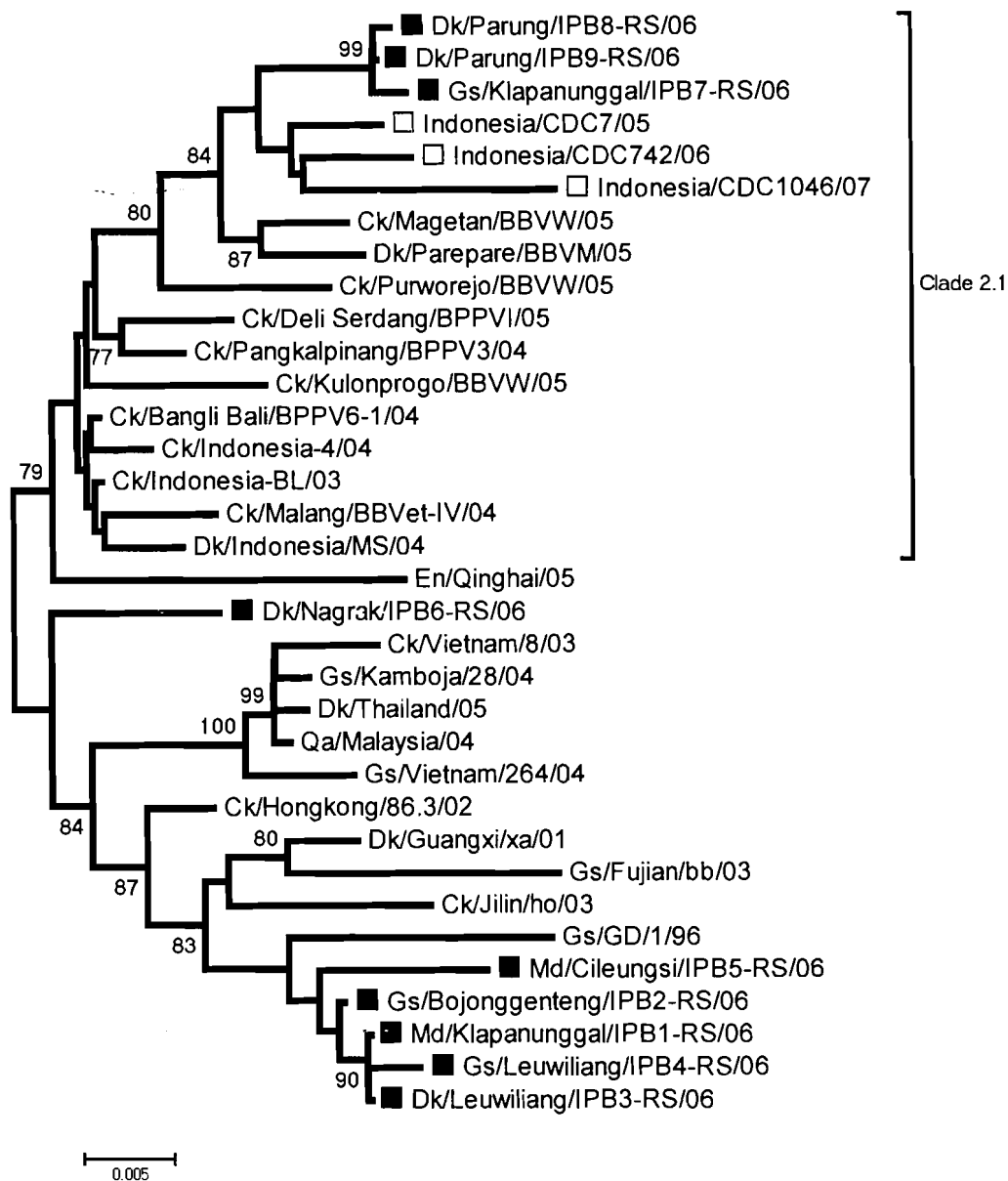
(Smith *et al.*, 2006a). Perbedaan temuan ini dapat terjadi karena isolat yang dianalisis sebagian besar berasal dari kasus klinis, serta waktu isolasi antara tahun 2003-2005. Isolat-isolat yang ditemukan dalam penelitian Susanti *et al.* (2008c *in press*) ini kemungkinan besar merupakan introduksi baru setelah masa itu.

Analisis genotipe VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air perlu dilakukan untuk mengetahui adanya *reasorsi* pada virus ini. Fenomena *reasorsi* telah diungkapkan pada VAI sub tipe H5N1 unggas air di Cina Selatan dan Hongkong. *Genotyping* VAI sub tipe H5N1 yang diisolasi dari unggas air sehat di Cina Selatan menunjukkan bahwa virus tersebut merupakan hasil *reasorsi* antara gen HA virus A/Gs/Gd/1/96 dengan gen internal lainnya dari VAI Eurasia, membentuk 9 macam genotipe (Chen *et al.*, 2004). Munculnya genotipe G VAI sub tipe H5N1 isolat itik Vietnam (Dk/VNM/568/05) merupakan *reasorsi* dari VAI genotipe Z dengan gen PB2 dari virus influenza lain (Smith *et al.*, 2006a). Wabah VAI sub tipe H5N1 di Hongkong tahun 2001 juga berasal dari *reservoir* itik dan angsa yang mengalami *reasorsi* dengan VAI unggas air lainnya sehingga muncul virus yang bersifat patogenik pada unggas darat (Sturm-Ramirez *et al.*, 2004).

Temuan ini tampaknya tidak serupa dengan fenomena dominasi virus *Fujian-like* (Smith *et al.*, 2006b). Dominasi *strain Fujian-like* diduga merupakan *strain* yang terseleksi akibat penerapan vaksinasi pada unggas. Sedangkan VAI sub tipe H5N1 isolat IPB1-RS s/d IPB6-RS bukan merupakan turunan virus khas Indonesia, sehingga dapat dipastikan tidak muncul (*escape*) akibat cekaman imunologis karena vaksinasi. Virus-virus tersebut tampaknya merupakan turunan virus yang baru diintroduksi ke Indonesia. Sebaran geografis turunan VAI sub tipe H5N1 isolat IPB1-RS s/d IPB6-RS mendesak untuk dipelajari dengan cara melakukan sikuensing isolat-isolat baru dari seluruh Indonesia.

### Uji Antigenesitas

Hasil uji HI VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air dalam penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan *titer* HI yang mencolok (3-6 log) antara VAI sub tipe H5N1 *strain* ayam Legok dengan 9 VAI sub tipe H5N1 isolat asal unggas air. *Titer* antibodi antar VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air menunjukkan perbedaan yang tidak terlalu jauh satu sama lain (Tabel 2). Perbedaan



Gambar 1. Pohon filogenetik 1074 nukleotida gen HA virus AI H5N1 isolat unggas air asal Jawa Barat dipadankan dengan virus asal Indonesia baik dari hewan dan manusia, serta virus asal Asia. Cabang dimana virus yang dipelajari pada penelitian ini ditandai %; virus asal manusia Indonesia ditandai ;%. Hanya presentase yang lebih dari 75% yang terlihat pada setiap percabangan

*epitop* daerah antigenik antara virus isolat unggas air dengan vaksin menyebabkan perbedaan antigenesitas. Vaksin AI sub tipe H5N1 dibuat dari VAI sub tipe H5N1 isolat ayam Legok tahun 2003, sehingga tidak bereaksi/ bereaksi rendah terhadap VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air. Temuan sebelumnya juga mengungkapkan bahwa diversitas antigenik juga terjadi antar *strain* VAI Indonesia. VAI

sub tipe H5N1 isolat ayam (Ck/Yogyakarta/BBVet-IX/04 dan Ck/Tarurung/BPPVI/05) hanya bereaksi rendah dengan antibodi terhadap VAI isolat itik (Dk/IDN/MS/04) (Smith *et al.*, 2006a).

Analisis numerik *titer* HI memvisualisasikan kemiripan reaksi antigenik dari berbagai virus yang diuji (Smith *et al.*, 2006b). Pola reaksi antigenesitas biasanya menun-

Tabel 2. Hasil uji HI virus avian influenza sub tipe H5N1 isolat unggas air terhadap antibodi hasil vaksinasi dengan vaksin AI H5N1 (strain ayam Legok 2003)

No	Isolat	Spesies Inang	Kelompok (Klaster, Subklaster)	Titer HI**
1	Virus Legok 2003	Ayam	-	2 <sup>6</sup>
2	IPB1-RS	Entok	(2.2)	2 <sup>3</sup>
3	IPB2-RS	Angsa	(2.2)	2 <sup>0</sup>
4	IPB3-RS	Itik	(2.2)	2 <sup>1</sup>
5	IPB4-RS	Angsa	(2.2)	2 <sup>0</sup>
6	IPB5-RS	Entok	(2.2)	2 <sup>3</sup>
7	IPB6-RS	Itik	(2.1)	2 <sup>3</sup>
8	IPB7-RS	Angsa	(1)	2 <sup>0</sup>
9	IPB8-RS	Itik	(1)	2 <sup>0</sup>
10	IPB9-RS	Itik	(1)	2 <sup>0</sup>

\*\* Uji HI dilakukan dengan 2 kali ulangan

jukkan pola yang sama dengan pengelompokan pada pohon filogenetik (WHO, 2005; Smith *et al.*, 2006b), dan perbedaan asam amino pada subunit HA1 (WHO, 2005). Uji HI menggunakan serangkaian serum anti VAI sub tipe H5N1 merupakan metode baku untuk karakterisasi antigenik virus influenza (WHO, 2005). Ikatan antibodi dengan hemaglutinin virus akan menghambat hemaglutinasi. Antibodi yang homolog dengan virus membuat aktivitas penghambatan hemaglutinasi lebih tinggi sehingga *titer* HI tinggi. Hilangnya respon antibodi terhadap hemaglutinin virus menyebabkan tidak ada hambatan hemaglutinasi sehingga *titer* HI rendah bahkan nol (Stephenson *et al.*, 2006).

Rendahnya reaksi antigenik VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air terhadap antibodi hasil vaksinasi dengan vaksin AI sub tipe H5N1 (ayam Legok 2003) mengindikasikan adanya hanyutan antigenik, sehingga tidak dapat melindungi unggas air secara sempurna terhadap infeksi VAI sub tipe H5N1 yang ada di alam. Hal serupa pernah dilaporkan di Vietnam. Vaksin AI sub tipe H5N1 dilaporkan bersifat protektif pada ayam, namun tidak protektif pada unggas air domestik (Webster dan Govorkova, 2006). Vaksinasi konvensional menggunakan VAI sub tipe H5N1 isolat itik yang dilemahkan mampu menghambat munculnya gejala klinis, ekskresi virus dan replikasi virus pada daging dan organ internal itik (Beato *et al.*, 2007).

Pembuatan vaksin spesifik untuk unggas air perlu segera dilakukan untuk mencegah penularan virus HPAI sub tipe H5N1 dari unggas

air ke ayam, manusia, dan lingkungan. Vaksin yang dibuat dari *strain* virus yang mempunyai antigenesitas tinggi dengan *strain* virus yang bersirkulasi di alam dapat memicu kekebalan yang bersifat protektif (WHO, 2005). Protektivitas vaksin AI sub tipe H5N1 (ayam Legok 2003) terhadap infeksi VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air perlu diuji lebih lanjut.

Perbedaan antigenesitas antara VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air klaster 1 tahun 2006 dengan VAI sub tipe H5N1 isolat ayam Legok tahun 2003, menunjukkan adanya hanyutan antigenik pada VAI sub tipe H5N1 di Indonesia. Mekanisme virus untuk menghindari dari sistem imun inang/hospes merupakan tekanan untuk mutasi secara *gradual* sehingga muncul *strain-strain* virus baru yang secara imunologik berbeda (hanyutan antigenik) (Munch *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004). Hanyutan antigenik akibat perubahan atau mutasi pada daerah antigenik dan atau posisi glikosilasi pada VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air, menunjukkan bahwa evolusi virus terjadi pada unggas air (Susanti *et al.*, 2008b *in press*).

Program vaksinasi pada unggas air sebagai *reservoir* HPAI sub tipe H5N1 perlu segera dilakukan (Webster dan Govorkova, 2006). Adanya *strain* virus baru (VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air klaster Asia) dan didukung rendahnya antigenesitas virus isolat unggas air dengan virus bibit vaksin AI sub tipe H5N1 (*strain* ayam Legok 2003), menuntut perlunya pergantian bibit vaksin yang sesuai dengan perkembangan genetik dan antigenik VAI sub tipe H5N1 di Indonesia.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

VAI subtipe H5N1 isolat unggas air dari Jawa Barat membentuk 3 percabangan secara terpisah, yaitu 1 percabangan pada klaster Indonesia dan 2 percabangan pada klaster Asia. Enam VAI subtipe H5N1 isolat unggas air asal Jawa Barat (IPB1-RS s/d IPB6-RS) merupakan *strain* virus yang berbeda dengan VAI subtipe H5N1 di Indonesia yang telah diisolasi sebelumnya. Introduksi VAI subtipe H5N1 ke Indonesia tampaknya telah terjadi lebih dari satu kali. Reaksi silang antara VAI subtipe H5N1 isolat ayam Legok 2003 dengan 9 VAI subtipe H5N1 isolat unggas air menunjukkan bahwa semua virus mempunyai antigenesitas yang berbeda dengan *strain* ayam Legok. Titer HI antara antibodi anti VAI subtipe H5N1 *strain* ayam Legok 2003 dengan 9 VAI subtipe H5N1 isolat unggas air menunjukkan perbedaaan sampai 6 log lebih rendah dibandingkan dengan titer HI menggunakan *strain homolog*.

### Saran

*Genotyping* VAI subtipe H5N1 isolat unggas air dari peternakan skala rumah tangga di Jawa Barat perlu dilakukan untuk mengetahui kemungkinan adanya *reasorsi* pada VAI subtipe H5N1 isolat unggas air. Protektivitas vaksin-vaksin AI komersial terhadap infeksi VAI subtipe H5N1 isolat unggas air perlu diuji lebih lanjut. Evaluasi bibit vaksin dengan virus-virus Indonesia perlu dilakukan secara berkelanjutan. Adanya *strain* baru yang tidak sesuai dengan bibit vaksin sebelumnya perlu segera diantisipasi dengan pergantian bibit yang sesuai dengan perkembangan genetik dan antigenik VAI subtipe H5N1 Indonesia.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Program BPPS Dikti, Depdiknas, yang telah mendanai penelitian ini, dan seluruh staf Laboratorium Imunologi dan Laboratorium Terpadu Departemen IPHK FKH IPB atas bantuan dan fasilitas yang telah diberikan selama penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Beato MS, Toffan A, DeNardi R, 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: 4054-4072
- Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster RG, Yu K. 2004. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10452-10457
- 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: implications for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2845-2850
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791
- Kandun IN, Wibisono H, Sedyaningih ER, Yusharmen, Hadisoedarsuno W, Purba W, Santoso H, Septiawati C, Tresnaningsih E, Heriyanto B, Yuwono D, Harun S, Soeroso S, Giriputra S, Blair PJ, Jeremijenko A, Kosasih H, Putnam SD, Samaan G, Silitonga M, Chan KH, Poon LLM, Lim W, Klimov A, Lindstrom S, Guan Y, Donis R, Katz J, Cox N, Peiris M, Uyeki TM. 2006. Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005. *N Engl J Med* 355: 2186-2194
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Molecular Evolution* 16:111-120
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3 : Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163



- Mahardika IG NK. 2003. Polymerase Chain Reaction, *J Vet* 4: 21-36
- Munch M, Nielsen LP, Handberg KJ, Jorgensen PH. 2001. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol* 146: 87-97
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425
- Sedyaningsih ER, Isfandari S, Setiawaty V, Rifati L, Harun S, Purba W, Imari S, Giriputra S, Blair PJ, Putnam SD, Uyoki TM, Soendoro T. 2007. Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005-June 2006. *J Infect Dis* 196: 522-527
- Smith GDJ, Lapedes AS, de Jong JC, Bastebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305: 371-375
- Smith GDJ, Naipospos TSP, Nguyen TD, jeJong MD, Vijaikrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YILC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LLM, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y. 2006a. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350: 258-268
- Smith, GDJ, Fan XH, Wang J, Li KS, Qin K, Zhang JX, Vijaykrishna D, Cheung CL, Huang K, Rayner JM, Peiris JSM, Chen H, Webster RG, Guan Y. 2006b. Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16936-16941
- Stephenson I, Wood JM, Nicholson KG, Zambon MC. 2006. Sialic acid receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin. *J Med Virol* 70: 391-398
- Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, Poon L, Guan Y, Peiris M, Webster RG. 2004. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J Virol* 78: 4892-4901
- Susanti R, Soejoedono RD, Mahardika IG NK, Wibawan IWT, Suhartono MT. 2008a. Identifikasi patogenitas virus avian influenza subtipe H5N1 isolat unggas air berdasarkan sekuen asam amino bagian *cleavage site* hemagglutinin. *In press*
- Susanti R, Soejoedono RD, Mahardika IG NK, Wibawan IWT, Suhartono MT. 2008b. Analisis molekuler gen penyandi hemagglutinin virus *highly pathogenic avian influenza* subtipe H5N1 isolat unggas air. *In press*
- Susanti R, Soejoedono RD, Mahardika IG NK, Wibawan IWT, Suhartono MT. 2008c. Isolasi dan Identifikasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Unggas Air Sehat di Peternakan Skala Rumah Tangga di Jawa Barat. *In press*
- Webster RG, Govorkova EA. 2006. H5N1-continuing evolution and spread. *N Engl J Med* 355: 2174-2177
- [WHO] World Health Organization. 2002. WHO manual on animal influenza. Diagnosis and surveillance. <http://www.who.int/>. [12 November 2004]
- [WHO] World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis*. 11:1515-1521