

KEMAMPUAN NETRALISASI ANTIBODI SPESIFIK AVIAN INFLUENZA H5 TERHADAP BEBERAPA VIRUS H5N1 ISOLAT LAPANG¹⁾

*(Neutralization Ability of Specific Antibody of Avian Influenza H5
to Several Viruses of H5N1 Field Isolates)*

Andrijanto H. Angi, I Wayan T. Wibawan²⁾, dan Sri Murtini²⁾

ABSTRACT

Avian Influenza (AI) is well known as Avian flu, Fowl pest, Fowl plaque, or Flu burung, caused by influenza virus type A. This virus is belonged to Orthomyxoviridae and could infect many kind of species such as bird, pig, horse, cat, as well as human. Vaccination is applied to control the disease using inactivated vaccine, which induced the specific antibody against H5 antigen. Passive immunization using specific antisera against H5 antigen is thought to be usefull in controlling the disease especially in the treatment of infected host. In this experiment the neutralization ability of specific antisera against H5 were studied using various field viral isolates subtype H5N1. Antisera was developed in Cavia porcellus which vaccinated with AI subtype H5N1 in activated vaccine. The titre of antisera obtained is 2^8 used HI test. Four AI virus subtype H5N1 isolates from 2003 to 2006 agains viral were we as tested virus. The neutralization test showed that the sera were able to neutralizing 10^{-4} EID₅₀ AI virus H5N1 with neutralization index range of 1.1-1.3. The result indicated that the specific antisera had the neutralization potency to the field virus.

Key words: avian influenza, neutralization test, neutralization index

PENDAHULUAN

Penyakit *Avian Influenza* (AI) yang disebut juga *Flu burung*, *Fowl pest*, *Fowl plaque*, atau *Avian flu* adalah suatu penyakit menular yang disebabkan oleh virus influenza tipe A. Virus ini berasal dari kelompok famili *Orthomyxoviridae*, serta dapat menginfeksi berbagai macam spesies diantaranya unggas, babi, kuda, serta manusia (Easterday dan Hinshaw, 1991). Sejak tahun 2003 hingga tahun 2008, sudah 31 provinsi dari 33 provinsi di Indonesia yang terjangkiti, 26 di antaranya endemis. Tindakan pencegahan dan pengendalian penyakit *Avian Influenza* di Indonesia sesuai dengan rencana dan strategi nasional pengendalian *Avian Influenza*, yaitu mencegah penularan dan memutus mata rantai penyebaran virus flu burung sedini mungkin, melakukan tindakan pengendalian virus pada daerah yang terjangkit, serta menyediakan dan mengembangkan pembuatan obat antivirus dan vaksin dari benih virus (*seed*) Indonesia (Bappenas, 2005). Tindakan pencegahan penyakit *Avian influenza* dapat dilakukan dengan pemberian vaksin. Vaksinasi memberikan peningkatan respons kekebalan aktif.

Selain vaksinasi, kekebalan dapat juga diberikan melalui pemberian zat kebal secara langsung yang dikenal dengan respons kekebalan pasif. Sebagai

¹⁾ Bagian dari tesis penulis pertama, Program Studi Sains Veteriner, Sekolah Pascasarjana IPB

²⁾ Berturut-turut Ketua dan Anggota Komisi Pembimbing

sampel pada pemberian serum kebal bagi penderita rabies. Alternatif pengendalian penyakit yang tertuang dalam rencana strategis pengendalian *Avian influenza* adalah penelitian pengaruh obat bagi penderita *Avian influenza*. Pemberian antibodi langsung dalam bentuk kekebalan pasif dapat dilakukan sebagai alternatif pencegahan penyakit *Avian influenza*.

Secara umum, virus influenza dapat mengalami mutasi spontan pada saat virus memperbanyak diri di dalam sel inang. Beberapa tipe virus influenza dapat menginfeksi manusia dan hewan, yaitu virus influenza A, B, dan C. Penggolongan virus influenza didasarkan pada perbedaan *antigenic* NP dan M1 dari masing-masing virus. Tidak seperti virus influenza B dan C, virus influenza A mempunyai dua sifat yang mudah berubah, yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift* (pergeseran genetik). *Antigenic drift* adalah perubahan pada satu titik dari genom virus influenza A, perubahan ini sebagai penyebab wabah flu musiman yang sering terjadi. *Antigenic drift* melibatkan perubahan minor antigenik pada HA dan/atau NA, sedangkan *antigenic shift* melibatkan perubahan antigenik mayor pada HA dan/atau NA (Easterday *et al.*, 1997). *Antigenic shift* adalah perubahan yang lebih besar dari genom virus, meliputi minimal 1 segmen dari 8 segmen virus influenza. Perubahan ini sebagai penyebab terjadinya wabah berkala setiap abad, seperti *Pandemi influenza*. *Antigenic shift* yang dikenal dengan proses reassortasi (*reassortment*), merupakan proses terjadinya pemilihan dan pencampuran secara genetis virus dari dua sub tipe virus berbeda yang berasal dari dua induk semang berbeda sehingga terbentuk jenis sub tipe virus baru yang berbeda dengan dua sub tipe induknya (*Parent viruses*). Sub tipe virus baru ini (*reassortant influenza virus*) mampu beradaptasi pada jenis makhluk hidup lain. *Antigenic shift* dalam hubungannya dengan kemunculan strain virus baru, terjadi ketika virus yang membutuhkan gen HA baru (dan NA pada beberapa kasus) mengkode sebuah protein baru yang memiliki karakteristik antigenik yang baru. Dalam sub tipe viral baru, virus mengalami evolusi di bawah tekanan selektif imunitas inang. Strain yang mampu tumbuh dan berkembang adalah yang mampu mengakumulasi mutasi yang cocok pada gen yang mengkode HA. Perubahan asam amino HA berhubungan dengan perubahan minor sifat antigenik (Both dan Sleight, 1981).

Vaksinasi dapat menyebabkan tekanan terhadap virus sehingga mengurangi peluang terjadinya mutasi alami melalui pengurangan jumlah virus yang bersirkulasi. Berbagai isolat lapang yang diperoleh serta diteliti memperlihatkan bahwa isolat virus unggas yang dikumpulkan selama wabah *Avian influenza* yang berlangsung tahun 2003, 2004, dan 2005 dari berbagai daerah tertular di Indonesia masih berada dalam satu *cluster* yang sama. Studi sekuensing nukleotida menunjukkan bahwa kebanyakan virus HPAI memiliki ciri-ciri yang sama dalam gen HA pada ayam, sebagai penanda virulensi (Harder dan Werner, 2006; Neuman *et al.*, 2003).

Berdasarkan hasil pemetaan gen dapat diketahui bahwa virus H5N1 pada unggas di Indonesia selama ini belum menunjukkan indikasi mengalami mutasi yang nyata. Belum adanya perubahan genetik yang drastis (mutasi) dari virus *Avian influenza* H5N1 yang ada di Indonesia memberi peluang bagi dilakukannya penelitian. Penelitian ini bertujuan memperoleh Ab anti H5 yang memiliki kemampuan menetralisasi isolat virus AI H5N1 asal lapang serta melihat dinamika virus AI H5N1 berdasarkan ekspresi biologis virus.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH IPB, kandang hewan percobaan FKH IPB. Penelitian dilaksanakan bulan Desember 2007 sampai dengan bulan Juli 2008.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahap sebagai berikut.

Tahap kesatu: titrasi virus dengan uji haemoglutinasi (HA) mikrotitrasi dan uji egg infectious Dose₅₀(EID₅₀)

Titrasi virus

Sebelum digunakan sebagai antigen penguji virus AI H5N1, isolat tahun 2003-2006 dititrasi terlebih dahulu untuk mengetahui titer virusnya. Uji titrasi dilakukan dengan uji HA mikrotitrasi dan EID₅₀.

Uji HA mikrotitrasi

Pada sumur pertama hingga duabelas plat mikrotiter ditambahkan 0.025 ml PBS. Pada sumur pertama ditambahkan larutan virus yang akan diuji sebanyak 0.025 ml dan diaduk dengan mikrotiter pipet dengan menghisap dan menekannya secara perlahan-lahan (sebanyak lima kali). Selanjutnya dari sumur pertama dipindahkan 0.025 ml ke sumur kedua dan diaduk seperti di atas dan dipindahkan ke sumur ketiga, demikian seterusnya sampai sumur terakhir. Dengan demikian, didapatkan pengenceran seri virus kelipatan 2 ($\log_2$). Pada setiap sumur pengenceran ditambahkan 0.025 ml PBS sehingga volume setiap sumur sama, yaitu 0.050 ml. Selanjutnya, pada setiap pengenceran ditambahkan 0.025 ml suspensi sel darah merah (sdm) 0.5 %, kemudian plat digoyang secara manual dengan tangan selama 1 menit, lalu dидiamkan. Hasil dibaca bila kontrol negatif (sumur tanpa virus) sdm-nya telah mengendap dan kontrol positif (sumur yang berisi suspensi virus AI H5N1 yang diketahui) telah menunjukkan aktivitas hemaglutinasi sempurna sekitar dalam waktu 30-45 menit. Titer HA adalah pengenceran tertinggi yang masih memperlihatkan hemaglutinasi sempurna.

Uji egg infectious Dose₅₀ (EID₅₀)

Uji Egg Infectious Dose₅₀ (EID₅₀) dilakukan dengan menggunakan telur berembrio, PBS, tabung pengenceran, pipet 1 ml, dan isolat AI H5N1 koleksi FKH IPB terpilih (tahun 2003-2006). Sebelum melakukan inokulasi di telur ayam berembrio (TAB) dibuat pengenceran virus secara desimal (dimulai dari 10^{-5} sampai 10^{-12}). Dengan teknik yang steril suspensi virus pada pengenceran 10^{-5} sampai dengan 10^{-12} diinokulasikan ke telur sebanyak 0.1 ml per butir dan tiap pengenceran diinokulasikan ke 3 butir telur. Setelah inokulasi, telur diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari. Telur di *candling* (diamati) setiap hari dan telur yang mati setelah inkubasi dapat dilakukan pengujian terhadap cairan alantoisnya. Setelah empat hari dilakukan uji cepat (*rapid test*) pada semua telur untuk dihitung dosis infeksiya terhadap 50% jumlah telur yang digunakan.

Perhitungan nilai EID₅₀

Nilai EID₅₀ dihitung menggunakan metode Reed and Muench (Mohd *et al.*, 2008). Tabel 1 menyajikan prosedur perhitungan *endpoint* 50% untuk mengetahui nilai EID₅₀.

Tabel 1. Perhitungan *endpoint* 50%

Log dari pengenceran virus (pengenceran)	Unit uji yang terinfeksi	Kumulatif terinfeksi (A)	Kumulatif tidak terinfeksi (B)	Rasio A/(A+B)	Persentase terinfeksi
-	-	-	-	-	-

$$\text{Jarak perbandingan (I)} = \frac{(\% \text{ positif di atas } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ positif di atas } 50\% - \text{positif di bawah } 50\%)}$$

Titer *endpoint* 50% = $10^{\log \text{ total dilution di atas } 50\% - (I \times \log h)}$
dengan I = jarak perbandingan, h = faktor pengenceran

Tahap kedua: produksi antibodi terhadap Avian influenza H5N1 (Ab anti H5)

Produksi antibodi anti H5 menggunakan hewan coba marmut (*Cavia porcellus*) lokal 8 ekor dengan kisaran bobot 0.2-0.4 kg, dalam kondisi sehat. Vaksin yang digunakan adalah produksi PT Vaksindo berupa vaksin AI inaktif komersial H5N1 (Batch: 21666 PTP, ex. Date 2008). Produksi antibodi AI (antibodi anti H5) dilakukan dengan menyuntik 0.3 ml suspensi vaksin secara intramuskuler dan diulang (*booster*) dua minggu setelah penyuntikan pertama. Vaksinasi dilakukan sebanyak tiga kali. Serum dikoleksi (panen) satu minggu setelah vaksinasi kedua.

Tahap ketiga: identifikasi dan titrasi antibodi

Antibodi anti H5 (antisera) yang diperoleh dari marmut diuji dan dititrasi dengan uji agar gel presipitasi (uji AGP) dan uji penghambatan aglutinasi (HI *test*).

Uji agar gel presipitasi (Uji AGP)

Agar gel dibuat dengan mencampur 0.4 g agarose, 1.2 g poly ethylene glycol (PEG) 6000, 20 ml PBS (pH 7.6), serta 20 ml aquades. Campuran atau larutan ini dipanaskan dalam penangas air sampai larut dan warna larutan menjadi bening. Kemudian larutan dipipet dengan pipet Mohr sebanyak 3.75 ml, dan dituangkan di atas kaca objek. Agar didiamkan sampai beku. Selanjutnya, agar dilubangi dengan pelubang agar. Pada sumur tengah dimasukkan 25 ul antigen virus AI H5N1 dan pada tepi di sekelilingnya diteteskan masing-masing serum hasil produksi pada *cavia*. Kaca objek ditempatkan di bak lembab yang dialasi dengan kertas buram yang lembab dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya garis presipitasi di antara sumur antigen dan antibodi.

Uji HI (haemagglutination inhibition)

Uji HI dilakukan untuk mengetahui titer antibodi yang diperoleh dari marmut menggunakan virus standart dari BBalitvet dan juga menggunakan virus isolat lapang tahun 2003-2006 untuk melihat adanya perbedaan ekspresi antigen HA dari masing-masing isolat virus yang diuji.

Pada tiap sumur plat mikrotiter dimasukkan 0,025 ml PBS. Selanjutnya, 0.025 ml antibodi hasil produksi dimasukkan kedalam sumur pertama dan dihomogenkan lalu dipindahkan 0.025 ml ke sumur kedua dan seterusnya hingga sumur ke 12. Pada sumur terakhir diambil 0.025 ml dan dibuang. Virus atau antigen standart ditambahkan isolat lapang sebanyak Empat HAU/0.025 ml tiap sumur sebanyak 0.025 ml dan dibiarkan selama 30 menit pada temperatur kamar (20°C) atau 60 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya kedalam tiap sumur ditambahkan 0.025 ml suspensi sel darah merah 0.5%, kemudian dikocok perlahan agar homogen dan biarkan sekitar 40 menit pada temperatur kamar (20°C) atau 60 menit pada suhu 4°C. Titer HI adalah serum dengan pengenceran tertinggi yang menyebabkan penghambatan aglutinasi lengkap 4 HAU antigen (OIE, 2004). Aglutinasi dibaca dengan cara memiringkan plat. Hanya sumur-sumur dengan kecepatan aliran sel darah merah yang sama dengan sumur kontrol (mengandung 0.025 ml sel darah merah dan 0.025 ml PBS) yang menunjukkan inhibisi.

Tahap keempat: uji SNT Prosedur β -netralisasi

Antisera (Ab anti H5) yang bertiter 2^8 , 2^7 , 2^6 , 2^5 , 2^4 . Hasil dari masing-masing pengenceran diambil 1 ml kemudian ditambahkan 1 ml titer 10^4 EID₅₀ isolat lapang untuk uji netralisasi. Campuran virus dengan antibodi anti H5 didiamkan dalam suhu kamar selama 30 menit kemudian diambil 0.2 ml untuk diinokulasi ke TAB umur 9-11 hari (15 butir untuk masing-masing isolat uji terpilih koleksi FKH IPB). Hari keempat dilakukan panen cairan alontoik hasil uji netraliasi, kemudian dilakukan rapid test untuk dihitung *endpoint* netralisasi dan nilai indeks netralisasi.

Dalam interpretasi hasil, tingkat infeksi virus dinyatakan dengan terjadi atau tidaknya agglutinasi dari cairan alontoik yang dipanen setelah dicampur dengan volume tertentu yang sama dengan suspensi sel darah merah 5%. Selanjutnya, dilihat timbulnya reaksi agglutinasi.

Perhitungan indeks netralisasi Prosedur -B

Endpoint 50% dari netralisasi dihitung dengan metode Reed and Muench, saat banyaknya residual virus diuji dengan banyaknya suatu respons. Indeks netralisasi merupakan perhitungan dari nilai *endpoint* ini (Swayne *et al.*, 1998). Untuk masing-masing respons *endpoint* adalah pengenceran dari antibodi terhadap AI H5N1 ketika ternetralisasi 50% pada virus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Titration Virus Isolat Uji

Berdasarkan hasil titration virus dengan uji Hemagglutination (HA) tampak bahwa virus AI koleksi FKH IPB tahun 2003-2006 memiliki titer yang cukup tinggi (Tabel 2). Uji HA merupakan suatu uji untuk mengetahui keberadaan antigen virus yang dapat mengagglutination sel darah merah (sdm) (WHO, 2002). Reaksi agglutination ini dapat dihalangi atau dihambat dengan antibodi spesifik terhadap antigen sehingga reaksi ini digunakan sebagai dasar pada isolasi virus serta diferensiasi pada strain varian yang sering muncul (Klasse dan Sattentau, 2002). Virus influenza mengandung dua antigen glikoprotein pada permukaannya, yaitu HA dan NA. HA secara spesifik mengandung reseptor *sialic acid* pada permukaan selnya dan

sebagai tempat untuk proses infeksi. Reseptor ini hampir sama dengan reseptor permukaan yang ada pada membran plasma sel darah merah sehingga jika sel darah merah dicampur dengan virus influenza dengan rasio sama akan dihasilkan jembatan antara sel darah merah dengan virus sehingga terbentuk aglutinasi. Aglutinasi sempurna pada pengenceran tertinggi dinyatakan sebagai *endpoint* dan memiliki titer 1 HAU (Hamaglutinasi Unit). 1 HAU setara dengan 10^7 partikel virus.

Tabel 2. Titer virus isolat koleksi dengan uji HA

Asal isolat terpilih	Tahun koleksi	Titer hasil HA test
Bogor	2003	2^9
Bogor	2004	2^8
Tasik	2005	2^9
Cikole	2006	2^9

Uji HA menghitung jumlah virus baik yang telah mati (tidak infeksi) maupun virus yang masih hidup (infeksi). Titrasi virus yang infeksi dapat diukur menggunakan uji EID_{50} atau dosis yang digunakan yang mampu menginfeksi 50% populasi embrio. Titer virus H5N1 dari isolat asal lapang terpilih (Koleksi FKH IPB) dengan uji EID_{50} disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Titer virus dengan uji EID_{50}

Asal isolat terpilih	Tahun koleksi	$\log_{10} ID_{50}$
Bogor	2003	$10^{8.3} ID_{50}/ml$
Bogor	2004	$10^{10.8} ID_{50}/ml$
Tasik	2005	$10^{10.8} ID_{50}/ml$
Cikole	2006	$10^{11.8} ID_{50}/ml$

Uji EID_{50} merupakan uji titrasi virus yang dapat mengukur titer virus yang hidup dalam suatu suspensi virus. Prinsip uji EID_{50} adalah menghitung dosis virus yang dibutuhkan untuk menginfeksi 50% inang (hewan, telur, dan kultur jaringan) (Swayne *et al.*, 1998). Dosis ini ditandai dengan infeksius dose 50 (ID_{50}) atau lethal dose 50 (LD_{50}) untuk tingkat infeksi atau kematian, yang terjadi melalui pengenceran virus dan diinokulasi pada telur ayam berembrio. Pengamatan atau hasil inokulasi dilihat dengan jumlah respons positif dan negatif hasil uji cepat (*rapid test*). Hasil uji EID_{50} menunjukkan bahwa suspensi virus isolat terpilih FKH IPB masih hidup serta memiliki titer yang cukup tinggi serta layak digunakan sebagai virus uji.

Produksi Antibodi

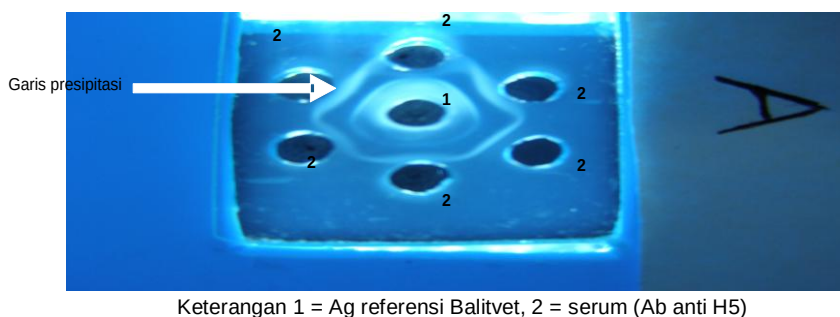
Marmut (*Cavia porcellus*) yang divaksinasi sudah mampu memproduksi antibodi terhadap *Avian influenza* H5N1 satu minggu setelah vaksinasi kedua. Antiserum anti H5 yang dikoleksi memiliki titer 2^9 . Koleksi antibodi terhadap H5 (antibodi anti H5) dilakukan dua kali. Koleksi kedua dilakukan seminggu setelah revaksinasi ketiga. Vaksinasi kedua dilakukan setelah seminggu koleksi antibodi anti H5. Waktu vaksinasi dan koleksi Ab anti H5 serta titer Ab anti H5 dengan uji HI menggunakan antigen standar dari BBAIvet dari hasil produksi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Waktu vaksinasi serta respons titer Ab anti H5 pada kelompok marmut

Waktu (vaksinasi)	Titer Ab ($\log_2$)	Keterangan
Sebelum	0	Koleksi Ab dilakukan seminggu setelah <i>post</i>
1 minggu <i>post</i> vaksinasi kedua	9	<i>vaksinasi</i> kedua dan seminggu setelah <i>post</i>
1 minggu <i>post</i> vaksinasi ketiga	8	<i>vaksinasi</i> ketiga

Identifikasi Serum Kebal (Antibodi Anti H5)

Hasil koleksi serum kesatu marmut (*Cavia porcellus*) mampu menghasilkan antibodi anti H5 (antisera anti H5) dengan titer yang tinggi yaitu 2^9 menggunakan antigen standar H5N1 dari BBalitvet. Produksi antibodi pada hewan yang divaksinasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya adalah umur hewan, ukuran molekul antigen, kerumitan struktur kimiawi antigen, konstitusi genetik, metode pemasukan antigen dan dosis yang tepat dapat menginduksi terbentuknya antibodi yang lebih baik (Liddell dan Weeks, 1995). Pengikat antara antigen dan antibodi memerlukan struktur yang cocok antara keduanya (Kennedy, 1985). Identifikasi serum kebal (antibodi anti H5) dengan uji imunodifusi agar gel presipitation (AGP) menunjukkan reaksi positif dengan Ag AI standar. Hal ini menunjukkan adanya homologi antara Ag dengan Ab yang dicerminkan oleh adanya garis presipitasi (Gambar 1). Pada uji presipitasi, suatu Ab yang berdifusi ke agar memiliki kecocokan atau homologi dengan Ag akan berikatan dengan Ag yang berdifusi dalam agar sehingga terlihat berupa garis presipitasi.



Gambar 1. Garis presipitasi pada uji AGPT menunjukkan adanya reaksi homolog antara Ab anti H5 dengan Ag referensi Bbalitvet

Titration Antibody Anti H5

Antisera anti H5 yang diperoleh dititration menggunakan virus *Avian influenza* H5N1 asal lapang terpilih koleksi FKH IPB tahun 2003-2006. Berdasarkan hasil titration dengan uji HI tampak adanya variasi titer antibodi terhadap virus uji. Adanya variasi titer menunjukkan bahwa terdapat perubahan struktur antigenik dari antigen hemagglutinin masing-masing isolat. Uji HI memiliki sensitivitas tinggi karena pada uji ini antibodi spesifik terhadap hemagglutinin virus AI tertutup oleh paratop dari antibodi sehingga menghambat adanya aglutinasi. Nilai HI terhadap isolat koleksi disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Nilai HI test terhadap isolat koleksi FKH IPB (isolat terpilih)

Asal isolat terpilih	Tahun koleksi	Titer hasil HI test
Bogor	2003	2 ⁸
Bogor	2004	2 ⁹
Tasik	2005	2 ⁶
Cikole	2006	2 ⁵

Protein hemagglutinin (HA) dan neuramidase (NA) yang terdapat pada amplop virus menjadi tumpuan dasar yang berperan pada uji HI dalam melaksanakan diagnosa virus AI H5N1. Kedua protein ini menjadi target awal dalam pembentukan antibodi inang. Pada awal infeksi, protein ini akan berikatan dengan reseptor sel inang dan melepaskan ribonukleoprotein (RNP). Akibat dari aktivasi prekursor HA (HA0) oleh protease inang atau inang, protein akan terbelah menjadi HA1 dan HA2. Protein HA1 akan berikatan dengan reseptor dan merupakan target utama untuk timbulnya respons imun, sedangkan protein HA2 akan memfasilitasi fusi antara amplop virus dan membran endosomal inang (Suzuki dan Nei, 2002). Perbedaan kepekaan protein HA virus AI terhadap protease inang akan berhubungan dengan tingkat virulensi virus. Virus yang termasuk dalam kelompok HPAI mempunyai hemagglutinin yang sangat peka terhadap protease endogen atau seluler inang (Alexander, 2000). Protein hemagglutinin dan neuraminidase juga dapat berubah secara periodik akibat *antigenic drift* dan *antigenic shift*. Perubahan antigen permukaan ini merupakan mekanisme virus dalam menghindari respons imun inang (Munch *et al.*, 2001).

Uji Netralisasi Virus

Antisera meskipun memiliki titer Ab yang tinggi menjadi tidak bermanfaat bila tidak mampu menetralkan antigen (virus). Uji netralisasi merupakan uji untuk identifikasi antigen/antibodi dan merupakan uji yang mampu melihat kemampuan netralisasi Ab terhadap Ag. Hasil uji netralisasi antisera anti H5 terhadap berbagai isolat FKH IPB disajikan pada Tabel 6 sampai Tabel 9.

Tabel 6. Uji netralisasi isolat tahun 2003 dengan metode Reed and Muench

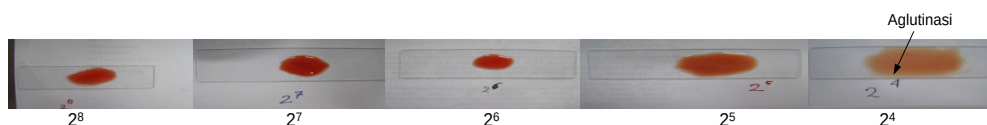
Pengenceran serum		Tingkat infeksi Ratio ^a	Respons		Nilai akumulasi			infeksi ----- % -----	protektif
Kuantitatif	Log ₁₀		Terinfeksi	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	Rasio		
1:2 (2 ⁸)	10 ^{-0.3}	0/3	0	3	0	11	0/11	0	100
1:4 (2 ⁷)	10 ^{-0.6}	0/3	0	3	0	8	0/8	0	100
1:8 (2 ⁶)	10 ^{-0.9}	0/3	0	3	0	5	0/5	0	100
1:16 (2 ⁵)	10 ^{-1.2}	1/3	1	2	1	2	1/3	33	67 ₅₀
1:32 (2 ⁴)	10 ^{-1.5}	3/3	3	0	4	0	4/4	100	0

Keterangan: a adalah jumlah terinfeksi di atas jumlah diinokulasi (jumlah percobaan)

$$PD = \frac{50-33}{100-33} = \frac{17}{67} = 0.25$$

$$\begin{aligned} \text{Penguraian dari 50\% endpoint netralisasi} &= 0.25 \times (-1.5 - (-1.2) - (-1.2)) \\ &= -0.25 \times 0.3 - 1.2 = -1.275 \\ &= -1.3 \end{aligned}$$

Endpoint 50% netralisasi adalah 10^{-1.3} atau 1:20. Netralisasi indeks (NI) adalah 1.3



Gambar 2. Reaksi agglutinasinya hasil uji netralisasi untuk isolat tahun 2003

Tabel 7. Uji netralisasi untuk isolat tahun 2004 dengan metode Reed and Muench

Pengenceran serum		Tingkat infeksi	Respons		Nilai akumulasi		infeksi	protektif
Kuantitatif	Log ₁₀		Terinfeksi	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	Tidak terinfeksi		
1:2 (2 ⁸)	10 ^{-0.3}	0/3	0	3	0	10	0	
1:4 (2 ⁷)	10 ^{-0.6}	0/3	0	3	0	7	0	100
1:8 (2 ⁶)	10 ^{-0.9}	0/3	0	3	0	4	0	100
1:16 (2 ⁵)	10 ^{-1.2}	2/3	2	1	2	1	67	100
1:32 (2 ⁴)	10 ^{-1.5}	3/3	3	0	5	0	100	0

Keterangan: a adalah jumlah terinfeksi di atas jumlah diinokulasi (jumlah percobaan)

$$PD = \frac{50-0}{67-0} = \frac{50}{67} = 0.75$$

$$\begin{aligned} \text{Penguraian dari 50\% endpoint netralisasi} &= 0.75 \times (-1.2 - (-0.9)) - (-0.9) \\ &= -0.75 \times 0.3 - 0.9 = -1.125 \\ &= -1.1 \end{aligned}$$

Endpoint 50% netralisasi adalah 10^{-1.1} atau 1:13. Netralisasi indeks (NI) adalah 1.1

Tabel 8. Uji netralisasi untuk isolat tahun 2005 dengan metode Reed and Muench

Pengenceran serum		Tingkat infeksi	Respons		Nilai akumulasi		infeksi	protektif
Kuantitatif	Log ₁₀		Terinfeksi	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	Tidak terinfeksi		
1:4 (2 ⁸)	10 ^{-0.6}	0/3	0	3	0	11	0	100
1:16 (2 ⁷)	10 ^{-1.2}	0/3	0	3	0	8	0	100
1:64 (2 ⁶)	10 ^{-1.8}	0/3	0	3	0	5	0	100
1:256 (2 ⁵)	10 ^{-2.4}	1/3	1	2	1	2	33	67
1:1024 (2 ⁴)	10 ^{-3.0}	3/3	3	0	4	0	100	0

Keterangan: a adalah jumlah terinfeksi di atas jumlah diinokulasi (jumlah percobaan)

$$PD = \frac{50-33}{100-33} = \frac{17}{67} = 0.25$$

$$\begin{aligned} \text{Penguraian dari 50\% endpoint netralisasi} &= 0.25 \times (-1.5 - (-1.2)) - (-1.2) \\ &= -0.25 \times 0.3 - 1.2 = -1.275 \\ &= -1.3 \end{aligned}$$

Endpoint 50% netralisasi adalah 10^{-1.3} atau 1:20. Netralisasi indeks (NI) adalah 1.3

Tabel 9. Uji netralisasi untuk isolat tahun 2006 dengan metode Reed and Muench

Pengenceran serum		Tingkat infeksi	Respons		Nilai akumulasi		infeksi	protektif
Kuantitatif	Log ₁₀		Terinfeksi	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	Tidak terinfeksi		
1:4 (2 ⁸)	10 ^{-0.6}	0/3	0	3	0	11	0	100
1:16 (2 ⁷)	10 ^{-1.2}	0/3	0	3	0	8	0	100
1:64 (2 ⁶)	10 ^{-1.8}	0/3	0	3	0	5	0	100
1:256 (2 ⁵)	10 ^{-2.4}	1/3	1	2	1	2	33	67
1:1024 (2 ⁴)	10 ^{-3.0}	3/3	3	0	4	0	100	0

Keterangan: a adalah jumlah terinfeksi di atas jumlah diinokulasi (jumlah percobaan)

$$PD = \frac{50-33}{100-33} = \frac{17}{67} = 0.25$$

$$\begin{aligned}\text{Penguraian dari 50\% endpoint netralisasi} &= 0.25 \times (-1.5 - (-1.2) - (-1.2)) \\ &= -0.25 \times 0.3 - 1.2 = -1.275 \\ &= -1.3\end{aligned}$$

Endpoint 50% netralisasi adalah $10^{-1.3}$ atau 1:20. Netralisasi indeks (NI) adalah 1.3

Netralisasi pada virus merupakan gagalnya infeksi virus secara *in vitro* akibat adanya antibodi yang mengikat antigen sehingga antigen target tidak mampu menempel pada reseptor sel (Dimmock, 1984). Pengumpulan virion oleh antigen *binding site* dari Ab dapat mempengaruhi tingkat infeksi, hal ini ditunjukkan dengan adanya CPE pada kultur sel sebagai media uji (Mandel, 1978).

Antibodi mengikat bagian permukaan virus dan netralisasi uji atau menghambat interaksi dengan sel inang. Antibodi menghalangi infeksi virus saat virus menempel pada permukaan inang, penetrasi virus dalam sel serta pada saat virus melepaskan selubung pembungkus di dalam sel inang.

Dari hasil uji netralisasi terhadap isolat tahun 2003, 2004, 2005, dan 2006 diketahui bahwa Ab yang diproduksi mampu menetralkan tetapi indeks netralisasinya rendah, yaitu pada titer 2^8 dapat menetralkan 100% virus dengan titer 10^4 EID₅₀, indeks netralisasi antisera terhadap virus isolat tahun 2003, 2005, dan 2006 adalah 1.3, sedangkan terhadap isolat tahun 2004 indeks netralisasinya adalah 1.1. Hasil ini berbeda dengan temuan Wibawan *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa Ab anti H5 dari unggas (IgY) dapat menetralkan virus dengan titer 10^4 EID₅₀ secara sempurna pada titer 2^4 . Rekomendasi OIE (2004) menyatakan bahwa pada unggas titer antibodi terhadap AI dikatakan protektif jika memiliki titer lebih dari 2^3 . Dari hasil penelitian juga menunjukkan titer antibodi mamalia (marmut) memiliki kemampuan efikasi lebih rendah daripada antibodi asal unggas. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya perbedaan konformasi antibodi mamalia (IgG) dengan antibodi unggas (IgY). Perbedaan utama IgG dan IgY di antaranya, IgG memiliki jumlah antibodi/minggu 200 mg IgG/darah (dalam 40 ml darah), sedangkan IgY 50-100 mg IgY/telur. Perbedaan lain IgG memiliki jumlah antibodi spesifik 5%, sedangkan IgY hanya 2-10% (Wibawan *et al.*, 2003). Perbedaan konsentrasi ini yang membuat perbedaan efikasi dari IgG.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

- (1) Serum koleksi yang diproduksi dari marmut (*Cavia porcellus*) lokal sebagai antibodi anti H5 (antisera anti H5) memiliki kemampuan menetralkan virus asal isolat lapang dengan angka Indeks Netralisasi 1.1–1.3.
- (2) Terdapat perbedaan ekspresi biologis antigen hemaglutinin (H5) virus AI H5N1 antarisolat lapang dari tahun 2003 sampai 2006.

Saran

- (1) Perlu dilakukan penelitian lanjutan kemampuan biologis IgG yang diperoleh dalam mencegah infeksi pada hewan coba.
- (2) Perlu dilakukan uji lanjut antibodi spesifik H5 skala lapang dengan ujiantang lapang serta pengembangan antibodi spesifik H5 sebagai alternatif pencegahan virus AI H5N1.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J. 2000. A review of Avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74:3-13.
- [Bappenas] Badan Perencanaan Pembangunan Nasional. 2005. Strategi Nasional Kesiagaan Menghadapi Pandemi Influenza. Rencana Strategis 2006-2008. Bappenas. Hal 9-22.
- Both, G.W. and Sleight, M.J. 1981. Conservation and Variation in the Hemagglutinin of the Hong Kong Subtype Influenza Virus During Antigenic Drift. *Journal of Virology*. Hal. 663-672. Vol. 39 No.3.
- Dimmock, N.J. (1984). Mechanisms of neutralization of animal viruses. *Journal of General Virology* 65, 1015-1022.
- Easterday, B.C. and Hinshaw, V.S. 1991. Avian Influenza. In: *Diseases of Poultry* 9th ed. Iowa, USA: Iowa State University Press Ames. Hal. 532-551.
- Easterday, B.C., Hinshaw, V.S., and Halvorson, D.A. 1997. *Influenza. Disease of Poultry* 10th ed. Iowa, USA: Iowa State University Press Ames. Hal. 532-551.
- Harder, T.C. and Werner, O. 2006. Avian Influenza. *Influenza Report*. In: Influenza Report. Eds: Bernd, SK, Hoffmann C, and Preiser. Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla: Flying Publisher. [28-4-.2008].
- Kennedy, R.C. 1985. *Idiotypic Networks in Hepatitis B Virus Infections*. Microbiology and Immunology. Vol. 119. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. Hal. 811-816.
- Klasse PJ and Sattentau QJ. 2002. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *Journal of General Virology* . 83: 2091-2108.
- Lee, C.W., Suarez, D.L. 2005. Avian Influenza Virus: prospects for prevention and control by vaccination. *Anim Health Res Rev* 6:1-15.
- Li, Y., Li, H., Smith-Gill, S.J., and Mariuzza, R.A. 2000. *Ag-Ab Reactions*. Biochemistry 39, 6296, 2000.
- Liddell E, Weeks I. 1995. *Antibody Technology*. JM. Graham dan D. Billington (Ed.). Oxford, UK: BIOS Scientific Publisher Ltd.
- Mandel, B. 1978. Neutralization of animal viruses. *Advances in Virus Research* 23, 205-268.
- Munch, M., Nielsen, L.P., Handberg, K.J., and Jorgensen, P.H. 2001. Identification and Subtyping of Avian Influenza Viruses by Reverse Transcriptase-PCR. *J Virol Methods* 97:13-27.
- Neuman, G., Hatta, M., and Kawaoka, Y. 2003. Reverse genetics for the control of Avian influenza. *Avian Diseases* 47:882-887.
- [OIE] Office International des Epizooties. 2004. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. Hal. 212- 219.

- [OIE] Office International des Epizooties. 2005. Highly pathogenic avian influenza in Mongolia: in migratory birds. http://www.oie.int/eng/info/hebdo/ais_55.htm. [24-3-2008].
- Suzuki, Nei, Y. 2002. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Bio Evol* 19:501-509.
- Swayne, D.E., John, C.R., Jackwood, W.M., and Reed, M.W. 1998. *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. Fourth Edition. 255-265.
- Swayne, D.E. and Suarez, D.L. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech*. 19:463- 8. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=10935274>. [20-2-2005].
- [WHO] World Health Organization. 2002. Manual on Animal Influenza. Diagnosis and Surveillance. [http : //WHO/CDS/CSR/NCS/2002](http://WHO/CDS/CSR/NCS/2002). 5. [10-5-2008].
- [WHO] World Health Organization. 2005. Avian Influenza: Assessing the pandemic threat. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/H5N1-9reduit.pdf>. [20-2-2008].
- Wibawan, W.T., Soejoedono, R.D., Damayanti, S.C., dan Tauffani, B.T. 2003. Diktat imunologi. Bogor: Lab. Imunologi, Departemen Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Wibawan, W.T., Murtini, S., dan Soejoedono, R.D. 2008. Prospek pemanfaatan telur ayam berkhasiat anti virus Avian influenza dalam usaha pengendalian infeksi virus flu burung dengan pendekatan pengebalan pasif. *Laporan Riset Unggulan Insentif (RUI)*.