

Sirkulasi Virus Flu Burung Subtipe H5 pada Unggas di Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur Sepanjang Tahun 2008-2009

(CIRCULATION OF AVIAN INFLUENZA OF H5 SUBTYPE ON BIRDS
IN WEST JAVA, BANTEN AND EAST JAVA DURING 2008-2009)

Dyah Ayu Hewajuli¹, Ni Luh Putu Indi Dharmayanti¹

¹Departemen Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner,
Badan Litbang, Kementerian Pertanian Jl.R.E.Martadinata No 30
PO Box 151, Bogor 16114, Telp(0251)8331048, 8334456
Fax(0251)8336425 e-mail:drh_juli@yahoo.com

ABSTRAK

Kasus epidemik flu burung (*Avian Influenza*) yang disebabkan oleh virus *Avian Influenza* (AI) subtipe H5 pertama kali terjadi di Indonesia pada akhir tahun 2003 yang menyebabkan angka kematian sampai 100%. Laporan terakhir menunjukkan bahwa *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H5N1 bersifat endemis dan telah menyebar luas di sebagian besar wilayah Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sirkulasi virus AI sub-tipe H5 sepanjang tahun 2008-2009. Metode penelitian yang digunakan adalah *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain reaction* (RT-PCR) untuk mengetahui sirkulasi virus AI subtipe H5 dan *Hemagglutination Inhibition* (HI) untuk mengetahui sebaran virus AI pada unggas. Hasil penelitian sebaran antibodi AI subtipe H5 pada unggas yang berasal dari Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur menunjukkan bahwa 64% sampel bereaksi negatif terhadap AI serta 36% sampel menunjukkan titer antibodi AI bervariasi dari rendah sampai tinggi. Sampel dari Kabupaten Cianjur memperlihatkan 30% positif terhadap AI subtipe H5 dan 1,9% sampel dari Kabupaten Blitar terdeteksi adanya virus AI subtipe H5. Sampel dari Kabupaten Tangerang menunjukkan 4,9% teridentifikasi virus AI subtipe H5. Selanjutnya sampel dari Kabupaten Serang memberikan hasil 12,7% positif terhadap AI subtipe H5 serta 17,4% sampel dari Kabupaten Pandeglang terdeteksi positif terhadap AI subtipe H5.

Kata-kata kunci : identifikasi, AI subtipe H5, HI dan RT-PCR

ABSTRACT

The epidemic of avian influenza (AI) in Indonesia initially occurred at the end of 2003 which caused 100% death of the affected chickens. It was caused by avian influenza virus (AIV) subtype H5. Recent data showed that highly pathogenic avian influenza (HPAI)-H5N1 virus is still endemic among bird population in Indonesia. A study was therefore conducted to find out the distribution of AIV-H5N1 in several regions in Indonesia. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the presence of AI-H5 virus and hemagglutination inhibition (HI) test was used to detect the presence of anti-AIV-H5 antibody. Results showed that anti-AIV-H5 antibody was detected in 36 % and was not detected in 64% of tested birds in West Java, Banten and East Java. The AIV-H5 antibody titer varied from low to high titer. The AIV-H5 was detected in samples from Cianjur (30%), Blitar (1.9%), Serang (12.5%) and pandeglang (17.5%). It was evident that AIV-H5 is still endemic in Indonesia.

Keywords : identification, AI of subtype H5, HI and RT-PCR

PENDAHULUAN

Virus influenza merupakan virus RNA beruntai tunggal yang mempunyai delapan segmen, berpolaritas negatif dan berbentuk bulat atau filamen dengan diameter 50-120 nm x 200-300 nm. Virus ini termasuk famili *Orthomyxoviridae*. Masing-masing segmen dari virus influenza tipe A terdiri dari protein *Polymerase component 2* (PB2), *Polymerase component 1* (PB1) dan *Polymerase component* (PA) yang mengkode *Polymerase*, *Hemagglutinin* (HA), *Nucleocapsid* (NP), *Neuraminidase* (NA), *Matrix Protein 1* (M1), *Matrix Protein 2* (M2), *Non Structural Protein 1* (NS1), dan *Non Structural Protein 2* (NS2). Protein-protein tersebut mempunyai peran masing-masing terhadap kehidupan virus influenza tipe A. Berdasarkan perbedaan antigen nukleoprotein dan *matriks* yang menyusunnya, virus ini diklasifikasikan menjadi tiga tipe yaitu virus Influenza tipe A, B, dan C (Murphy dan Webster, 1985; Easterday *et al.*, 1997).

Virus influenza A ditemukan pada unggas, manusia, babi, kuda, dan kadang-kadang pada mamalia lain, misalnya cerpelai, anjing laut, dan ikan paus, sedangkan virus Influenza B dan C hanya ditemukan pada manusia. *Hemagglutinin* (HA) dan *Neuraminidase* (NA) bertanggung jawab terhadap virulensi, keganasan dan proteksi terhadap virus. Berdasarkan antigenitasnya, HA virus influenza tipe A dikenal 16 macam (H1-H16) sedangkan NA dikenal sembilan macam (N1-N9) (Webster *et al.*, 1992, Fouchier *et al.*, 2005). Pengklasifikasian lebih lanjut virus Influenza tipe A menjadi subtipe didasarkan pada kedua glikoprotein tersebut menjadi : H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H5N2, H7N1, H7N7, H7N3 (Kamps dan Reyes Teran, 2006).

Virus *Avian Influenza* berdasarkan patogenitasnya dapat dibedakan menjadi dua bentuk yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Bentuk HPAI ditandai dengan angka kematian sampai 100% pada unggas terutama ayam buras dan ras dengan atau tanpa menunjukkan gejala klinis sebelum terjadi kematian. Di Asia, virus AI sub-tipe H5N1 termasuk virus *strain* HPAI. Unggas air dan burung liar merupakan *reservoir* alami HPAI, karena tidak menunjukkan gejala klinis HPAI. Dengan demikian, kedua unggas ini merupakan salah satu media perantara yang dapat menyebarkan virus *strain* HPAI menjadi

semakin luas, sedangkan bentuk LPAI ditunjukkan dengan gejala klinis yang lebih ringan, di antaranya gangguan saluran pernafasan, depresi, dan penurunan produksi telur (Senne *et al.*, 1996; Perdue dan Swayne, 2005; Olsen *et al.*, 2006).

Namun demikian, virus *strain* LPAI dapat bermutasi menjadi *strain* HPAI. Proses mutasi ini kemungkinan terjadi setelah virus *strain* LPAI yang terdapat di unggas liar ditularkan pada unggas peliharaan. *Strain* virus tersebut selanjutnya bersirkulasi selama beberapa bulan dalam unggas peliharaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus *strain* LPAI mengalami mutasi *antigenic drift* selama bersirkulasi dalam tubuh unggas peliharaan. Berdasarkan alasan tersebut maka *World Organization for Animal Health* sekarang menetapkan sistem penamaan HPAI dan LPAI menjadi hanya *Avian Influenza*. termasuk dalam daftar A di OIE, karena flu burung merupakan suatu penyakit yang sangat berbahaya bagi kesehatan hewan dan manusia (EID, 2006).

Wabah virus HPAI H5N1 pertama kali dilaporkan di Cina Selatan tahun 1996-1997, yang kemudian menyebabkan kematian unggas di Vietnam, Thailand, Indonesia dan negara Asia timur sejak awal tahun 2004 (Smith *et al.*, 2006). Hasil penelitian flu burung di Indonesia pernah dilaporkan dan telah berhasil diisolasi virus LPAI dari itik, burung pelikan, bebek dan diidentifikasi sebagai virus AI subtipe H4N6 dan H4N2 (Ronohardjo, 1983). Dharmayanti *et al.*, (2004) melaporkan bahwa wabah flu burung yang terjadi pertama kali pada tahun 2003 dan awal tahun 2004 di Indonesia diidentifikasi sebagai AI subtipe H5 berdasarkan metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

Pada bulan November tahun 2004, virus AI telah menginfeksi spesies unggas lain seperti burung merak dan merpati di Jakarta. Dharmayanti *et al.*, (2005b) juga berhasil mengidentifikasi dan mengkarakterisasi tujuh isolat virus AI yang berasal dari Jakarta tersebut dengan metode RT-PCR dan sekuensing. Virus tersebut dikelompokkan sebagai HPAI subtipe H5N1 yang mempunyai motif *multiple basic asam amino* pada daerah *cleavage site* gen HA. Virus AI pada tahun 2006 masih bersirkulasi di Indonesia (Dharmayanti *et al.*, 2005a). Data terakhir menunjukkan bahwa virus HPAI H5N1 dinyatakan endemik di hampir seluruh wilayah di Indonesia. Mengingat penyebaran flu

burung di Indonesia yang begitu cepat maka diperlukan monitoring sirkulasi virus AI untuk mengetahui situasi terkini penyakit dan antibodi terhadap flu burung di Indonesia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mengidentifikasi sirkulasi virus AI pada unggas di Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur pada tahun 2008 dan 2009 dengan menggunakan metode RT-PCR dan HI untuk memonitor sebaran antibodi terhadap virus H5 pada unggas. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya yang berguna untuk program pengendalian kasus flu burung di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Sampel

Sampel serum diambil dari unggas (ayam buras, ayam ras, itik, dan entok) yang hidup. Sampel usap kloaka diambil dari unggas yang hidup maupun mati di Kabupaten Tasikmalaya, Cianjur, Sukabumi, Bekasi, dan Kerawang (Jawa Barat), Kabupaten Tangerang, Serang, dan Pandeglang (Banten), serta Kabupaten Blitar, Kediri, dan Tulung Agung (Jawa Timur). Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Juni sampai dengan Desember 2008 dan Maret sampai dengan April 2009.

Sampel usap kloaka, trakea dan kandang selanjutnya disimpan dalam media transport (DMEM) yang mengandung antibiotik (penisilin 2000 unit/ml, sterptomisin 2 mg/ml). Setiap 2-3

sampel usap kloaka dikumpulkan (*pooled*) menjadi satu berdasarkan spesies dan pemilik, sehingga didapatkan 396 *pool* inokulum dari Jawa Barat, 540 *pool* inokulum dari Banten dan 210 *pool* inokulum dari Jawa Timur. Sampel serum unggas dari Jawa Barat diperoleh sebanyak 1021 serum, 1508 serum berasal dari Banten, serta 577 serum didapatkan dari Jawa Timur. Sampel serum, usap kloaka dan trakea segera diperiksa setelah diinkubasi selama 1 sampai 2 jam dalam suhu ruangan. Apabila sampel tidak memungkinkan untuk dikerjakan secepatnya, sampel disimpan pada suhu 4°C selama empat hari. Pada penyimpanan lebih dari empat hari, sampel disimpan pada suhu -80°C (OIE, 2008). Perolehan sampel serum dan *swab* dari berbagai Kabupaten di Jawa Barat, Banten dan Jawa Timur disajikan pada Tabel 1.

Identifikasi dengan Metode Uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI)

Pemeriksaan serologi dengan uji HI dilakukan untuk mengetahui adanya pembentukan antibodi terhadap virus flu burung A sub-tipe H5N1 yang dapat diamati pada hari ke-7 sampai ke-10 pascainfeksi. Uji HI dilakukan sesuai dengan standar (OIE, 2008). Sampel serum diencerkan secara seri (dua kali) dalam 25 mikroliter PBS pH 7,4. Setiap pengenceran serum ditambahkan 25 mikroliter antigen AI sub-tipe H5N1 yang mengandung 4 HAU kemudian digoyang pada suhu ruang (37°C) selama 1 menit setelah itu diinkubasi selama 30 menit. Sebanyak 25 mikroliter suspensi 1%

Tabel 1. Perolehan jumlah sampel serum darah unggas yang berasal dari Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur pada tahun 2008 - 2009

Asal Sampel (Kabupaten/Provinsi)	Bulan/Tahun Pengambilan Sampel	Jenis Sampel					
		Ayam Buras	Ayam Petelur	Ayam Broiler	Ayam Arab	Entok	Itik
Cianjur/Jawa Barat	Juli/2008	-	183	-	-	-	-
Sukabumi/Jawa Barat	Juli/2008	-	60	-	-	-	-
Tasikmalaya/Jawa Barat	Agustus/2008	271	11	69	-	27	-
Tangerang I/Banten	Agustus/2008	186	40	-	-	116	158
Serang/Banten	Agustus/2008	35	-	-	-	25	45
Pandeglang/Banten	Agustus/2008	78	-	-	-	18	-
Bekasi/Jawa Barat	September/2008	46	40	-	71	43	-
Kerawang/Jawa Barat	September/2008	30	40	30	-	60	40
Blitar/Jawa Timur	(Oktober-November/2008)	-	200	-	-	-	-
Kediri/Jawa Timur	(Oktober-November/2008)	65	125	-	-	6	13
Tulung Agung/Jawa Timur	(Oktober-November/2008)	36	105	-	-	-	27
Tangerang II/Banten	(Desember/2008)	90	40	-	-	58	112
Serang/Banten	(Maret-April/2009)	158	-	-	-	122	25
Pandeglang/Banten	(Maret-April/2009)	139	-	-	-	49	14

sel darah merah ayam ditambahkan ke dalam setiap lubang yang berisi campuran serum dan antigen, lalu diinkubasikan pada suhu ruang (37°C) selama 45 menit. Titer HI dihitung berdasarkan pengenceran tertinggi sampel serum yang masih menghambat aglutinasi sel darah merah dengan sempurna dan titer HI dinyatakan dalam log 2.

Identifikasi dengan RT-PCR

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan QIAmp RNA mini kit (*Qiagen*) yang tersedia secara komersial. Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *Superscript III one Step RT-PCR system (Life Technology)*. Primer NP, H5, dan program RT-PCR yang digunakan sesuai dengan Lee *et al.*, (2001). Hasil amplifikasi divisualisasi dengan UV transiluminator dan didokumentasikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji HI

Hasil pengujian sampel serum yang diperoleh pada pengujian dengan metode HI disajikan pada Tabel 2.

Hasil uji hemaglutinasi terhadap 3106 serum unggas menunjukkan bahwa serum unggas bereaksi negatif terhadap antigen H5N1 sebanyak 1985 tetapi bereaksi positif terhadap antigen H5N1 dengan titer kurang dari 4 log 2

sebanyak 160 serum, 638 serum dengan titer 4 s/d 7 log 2 dan 323 serum dengan titer lebih dari 7 log 2. Gambaran tersebut memperlihatkan bahwa serum unggas yang diambil dari Jawa Barat, Banten, serta Jawa Timur kebanyakan tidak mempunyai titer antibodi terhadap AI (64%) tetapi mempunyai titer antibodi AI rendah (5%), titer antibodi AI sedang (21%) dan titer antibodi AI tinggi (10%). Hasil titer antibodi AI dianggap rendah apabila kurang dari 4 log 2, titer antibodi AI sedang antara 4 s/d 7 log2, titer antibodi AI tinggi apabila lebih dari 7 log2 (Indriani dan Dharmayanti, 2006).

Menurut Peraturan Menteri Pertanian, pemeriksaan serologi yang dilakukan dengan uji HI yang menggunakan antigen H5 pada unggas yang divaksinasi dengan vaksin AI, titer protektif adalah sekitar lebih dari 4 log 2. Lebih lanjut dinyatakan bahwa suatu *flock* dari peternakan unggas dinyatakan protektif apabila lebih dari 70% dari sampel yang diambil memiliki titer protektif terhadap AI (Indriani *et al.*, 2004). Meskipun demikian pada kondisi lapangan, titer yang dianggap protektif bervariasi tergantung dari kondisi peternakan tersebut. Apabila mengacu pada Peraturan Menteri Pertanian (2008), hasil pengujian HI yang dilakukan terhadap 3106 serum unggas dari Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur menunjukkan sebanyak 961 unggas protektif terhadap infeksi virus AI. Hal tersebut dengan

Tabel 2. Hasil uji hemaglutinasi inhibisi sampel serum darah unggas yang berasal dari Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur pada Tahun 2008 – 2009

Bulan/Tahun Pengambilan Sampel	(Kabupaten/Provinsi) Asal Sampel	Jumlah Serum	Titer antibodi (log 2)			
			-ve	<4	04-7	>7
Juli/2008	Cianjur/Jawa Barat	183	4	7	65	107
Juli/2008	Sukabumi/Jawa Barat	60	1	1	17	41
Agustus/2008	Tasikmalaya/Jawa Barat	378	304	27	28	19
Agustus/2008	Tangerang I/Banten	500	394	38	65	3
Agustus/2008	Serang/Banten	105	99	4	2	0
Agustus/2008	Pandeglang/Banten	96	94	1	1	0
September/2008	Bekasi/Jawa Barat	200	110	10	56	24
September/2008	Kerawang/Jawa Barat	200	159	4	22	15
(Oktober-November/2008)	Blitar/Jawa Timur	200	105	10	51	34
(Oktober-November/2008)	Kediri/Jawa Timur	209	202	0	1	6
(Oktober-November/2008)	Tulung Agung/Jawa Timur	168	64	0	38	66
(Desember/2008)	Tangerang II/Banten	300	249	7	41	3
(Maret-April/2009)	Serang/Banten	305	111	24	165	5
(Maret-April/2009)	Pandeglang/Banten	202	89	27	86	0
Total		3106	1985	160	638	323

asumsi bahwa pada peternakan tersebut titer antibodi AI yang terbentuk sebagai akibat adanya kegiatan vaksinasi.

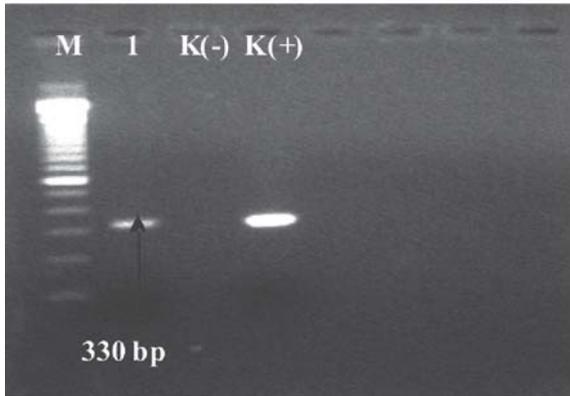
Melihat kondisi peternakan yang berbeda, tentunya akan berpengaruh terhadap tingkat proktektif titer antibodi AI yang terbentuk dari masing-masing peternakan unggas yang melakukan program vaksinasi tersebut. Berdasarkan hasil pengamatan di lapangan, sebagian besar peternakan unggas sektor 2 dan 3 sudah menerapkan program vaksinasi AI. Sementara pelaksanaan program vaksinasi di sektor 4 tidak merata sehingga titer antibodi AI yang terbentuk di sektor 4 bisa disebabkan hasil vaksinasi atau dari kekebalan alam. Dengan demikian, penentuan titer antibodi AI yang terbentuk pada peternakan sektor 4 dari lapangan dilakukan berdasarkan penelusuran riwayat hidup dari unggas tersebut. Hal tersebut juga disajikan pada Tabel 2, bahwa hasil uji HI dari sampel yang berasal dari Cianjur, dan Sukabumi tahun 2008 (Sektor 2 dan 3) dan Serang serta Pandeglang tahun 2009 menunjukkan sebagian besar pada titer antibodi $\geq 4 \log 2$ (sedang s/d tinggi). Sampel yang berasal dari Kabupaten Cianjur dan Sukabumi tersebut diambil dari peternakan ayam petelur yang menerapkan program vaksinasi AI. Sampel yang diperoleh dari Kabupaten Blitar, Kediri, dan Tulung Agung diambil dari Peternakan sektor 3 dan 4. Peternakan sektor 3 di Kabupaten Blitar dan Tulung Agung yang digunakan sebagai

sampling sudah menerapkan program vaksinasi AI. Hal tersebut terlihat dari hasil pengujian HI sampel dari peternakan sektor 3 menunjukkan titer antibodi AI $\geq 4 \log 2$ (sedang sampai dengan tinggi). Sampel yang berasal dari peternakan sektor 3 di Kabupaten Kediri tidak menerapkan program vaksinasi AI sehingga hasil HI tidak menunjukkan titer antibodi AI. Sampel yang berasal dari peternakan sektor 4 dari Kabupaten Kediri dan Tulung Agung sebagian besar tidak menunjukkan titer antibodi AI.

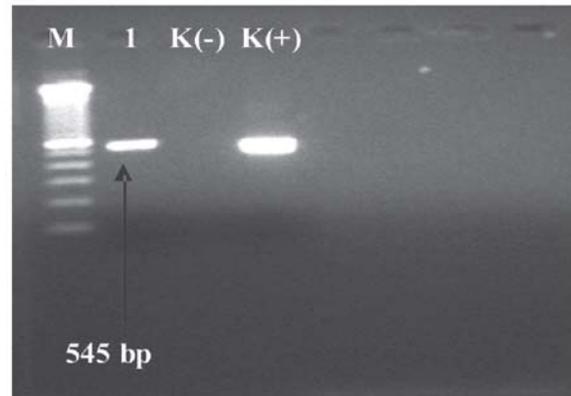
Sementara sampel yang berasal dari Kabupaten Tasikmalaya, Bekasi, Kerawang, Tangerang, Serang, dan Pandeglang berasal dari peternakan sektor 4 dengan program vaksinasi AI tidak merata. Sebenarnya kebijakan dari masing-masing Dinas Peternakan yang berkaitan sudah menerapkan program vaksinasi AI, akan tetapi dalam pelaksanaan di lapangan terdapat beberapa faktor yang menghambat optimalisasi dari program vaksinasi tersebut. Faktor-faktor tersebut di antaranya sebagian besar peternak masih menerapkan sistem pemeliharaan unggas yang diumbar, kurangnya dukungan operasional kepada petugas lapangan, kurangnya kesadaran dari peternak dalam mensukseskan program vaksinasi AI. Hal tersebut dapat dilihat dari hasil uji HI yang menunjukkan sebagian besar sampel bereaksi negatif terhadap AI serta sebagian sampel menunjukkan titer antibodi AI rendah.

Tabel 3. Hasil uji RT-PCR sampel ulas (Trakea, Kloaka, dan Kandang) unggas yang berasal dari Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur pada tahun 2008 - 2009

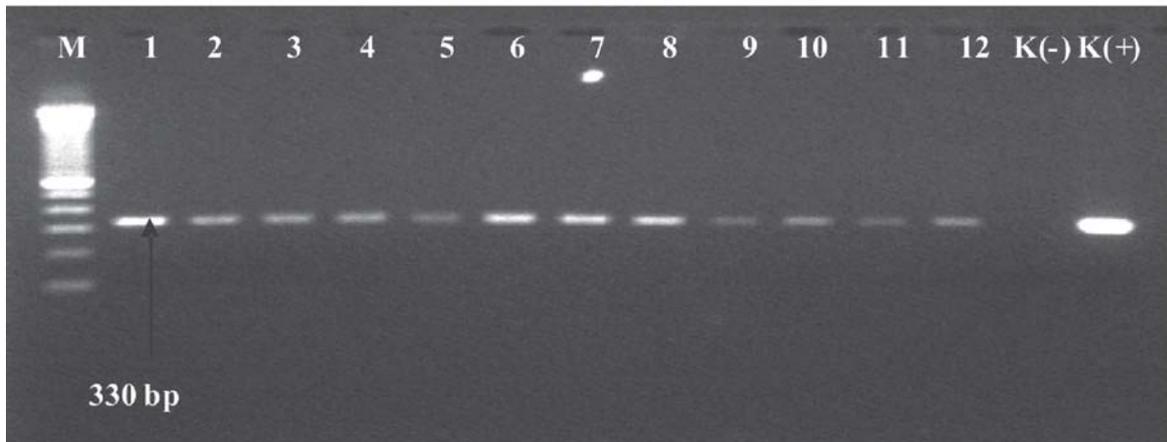
Bulan/Tahun Pengambilan Sampel	(Kabupaten/Provinsi) Asal Sampel	Jumlah Pool Inokulum	Hasil RT-PCR (NP)		Hasil RT PCR Subtipe H5	
			Negatif	Positif	Negatif	Positif
Juli/2008	Cianjur/Jawa Barat	52	40	12	40	12
Juli/2008	Sukabumi/Jawa Barat	19	19	0	19	0
Agustus/2008	Tasikmalaya/Jawa Barat	189	189	0	189	0
Agustus/2008	Tangerang I/Banten	173	173	0	173	0
Agustus/2008	Serang/Banten	39	39	0	39	0
Agustus/2008	Pandeglang/Banten	32	32	0	32	0
September/2008	Bekasi/Jawa Barat	65	65	0	65	0
September/2008	Kerawang/Jawa Barat	71	71	0	71	0
(Oktober-November/2008)	Blitar/Jawa Timur	52	51	1	51	1
(Oktober-November/2008)	Kediri/Jawa Timur	90	90	0	90	0
(Oktober-November/2008)	Tulung Agung/Jawa Timur	68	68	0	68	0
(Desember/2008)	Tangerang II/Banten	107	102	5	102	5
(Maret-April/2009)	Serang/Banten	115	102	13	102	13
(Maret-April/2009)	Pandeglang/Banten	74	63	11	63	11
Total		1146	1104	42	1104	42



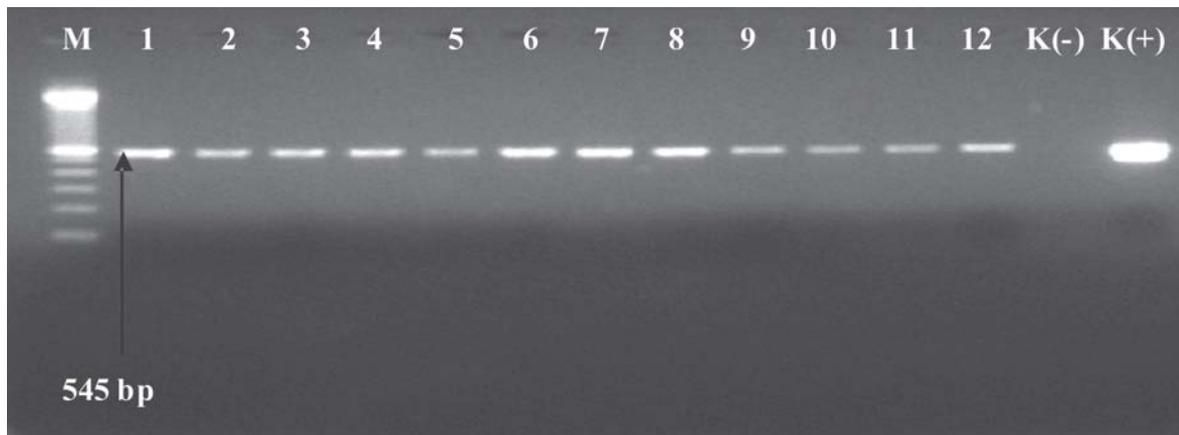
Gambar 1: Hasil Amplifikasi dengan Primer NP. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 adalah Sampel dari Kabupaten Blitar yang Mampu Mengamplifikasi Primer NP. K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 330 bp



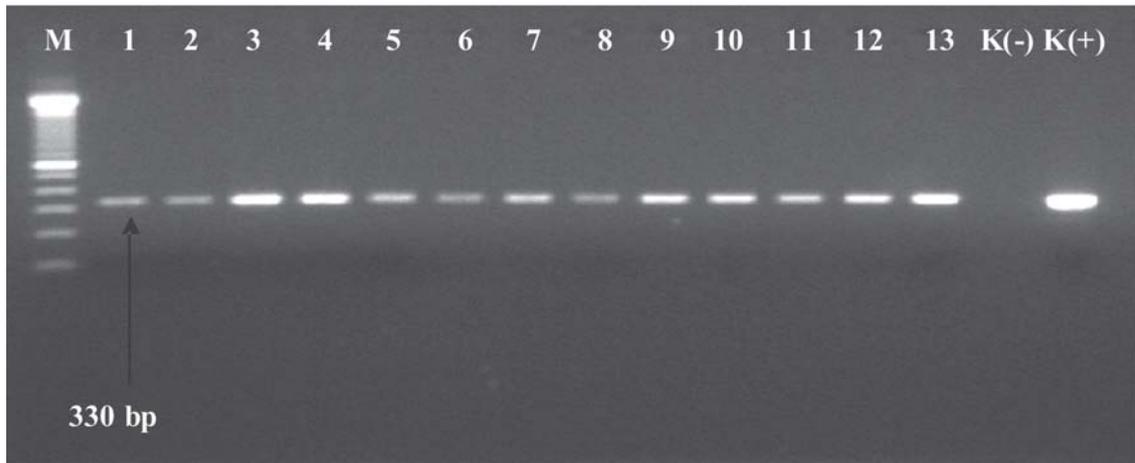
Gambar 2 : Hasil Amplifikasi dengan Primer NP. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 adalah Sampel dari Kabupaten Blitar yang Mampu Mengamplifikasi Primer H5. K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 545 bp



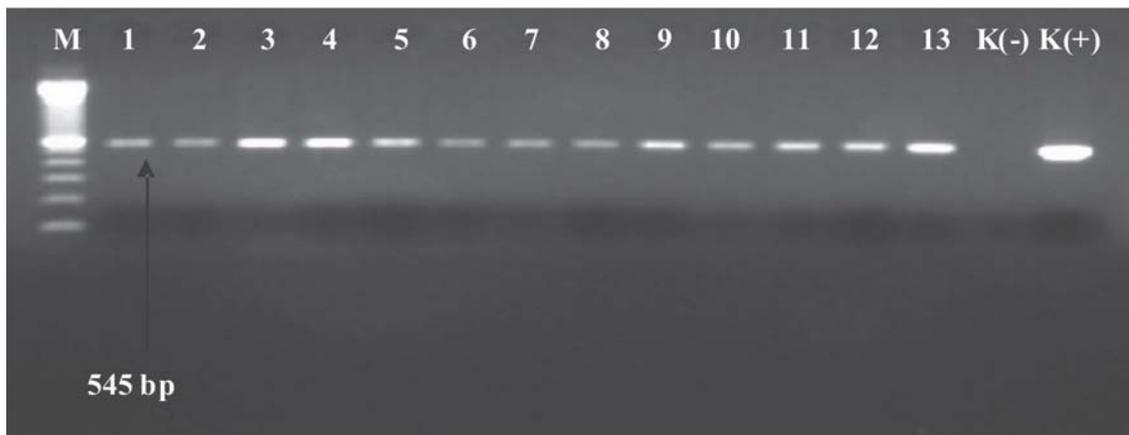
Gambar 3 : Hasil Amplifikasi dengan Primer NP. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 12 adalah sampel dari Kabupaten Cianjur yang Mampu Mengamplifikasi Primer NP, K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 330 bp



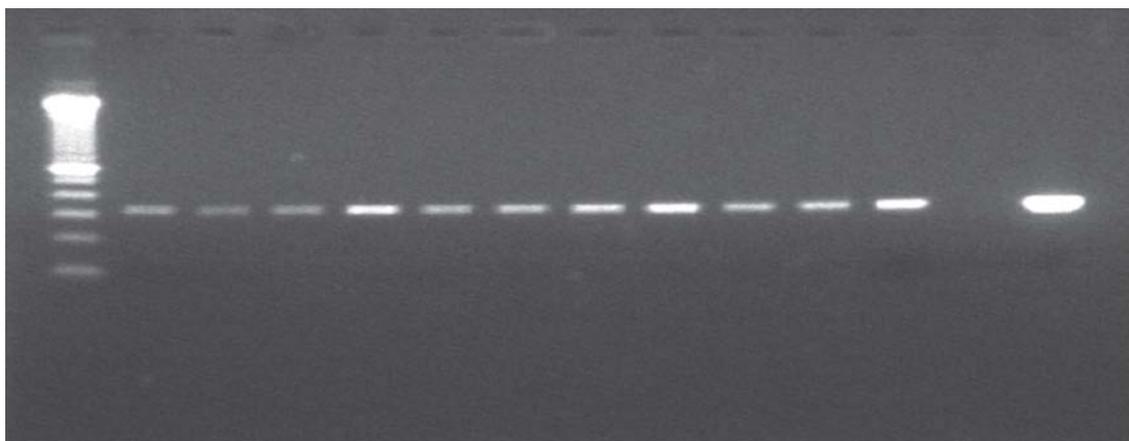
Gambar 4 : Hasil Amplifikasi dengan Primer H5. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 12 adalah sampel dari Kabupaten Cianjur yang Mampu Mengamplifikasi Primer H5, K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 545 bp



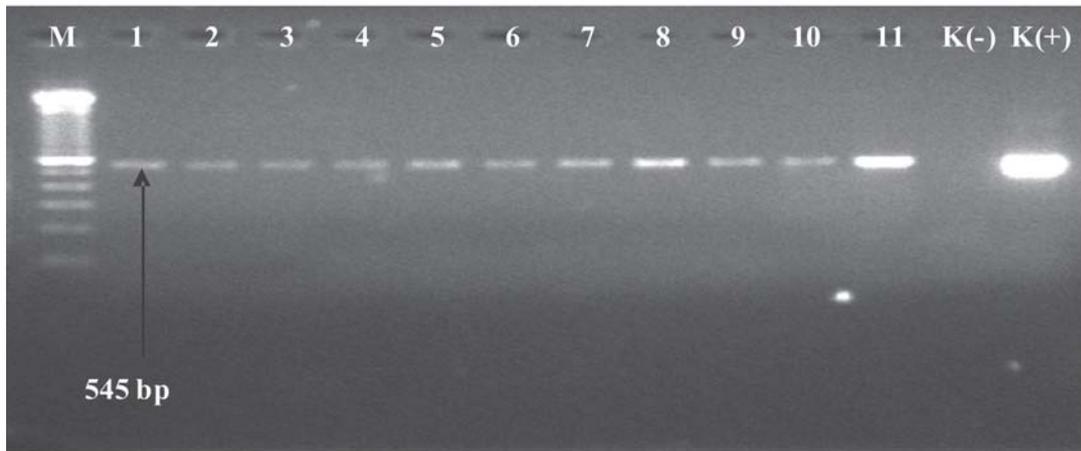
Gambar 5 : Hasil Amplifikasi dengan Primer NP. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 13 adalah sampel dari Kabupaten Serang yang Mampu Mengamplifikasi Primer NP, K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 330 bp



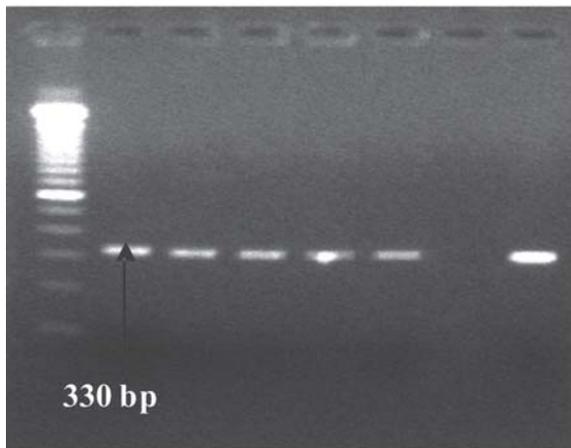
Gambar 6 : Hasil Amplifikasi dengan Primer H5. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 13 adalah sampel dari Kabupaten Serang yang Mampu Mengamplifikasi Primer H5, K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 545 bp



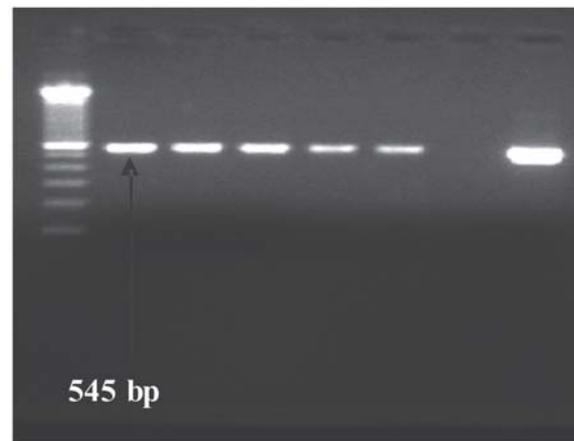
Gambar 7 : Hasil Amplifikasi dengan Primer NP. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 11 adalah sampel dari Kabupaten Pandeglang yang Mampu Mengamplifikasi Primer NP, K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 330 bp



Gambar 8 : Hasil Amplifikasi dengan Primer H5. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 11 adalah sampel dari Kabupaten Pandeglang yang Mampu Mengamplifikasi Primer H5, K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 545 bp



Gambar 9: Hasil Amplifikasi dengan Primer NP. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 adalah Sampel dari Kabupaten Tangerang yang Mampu Mengamplifikasi Primer NP. K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 330 bp



Gambar 10 : Hasil Amplifikasi dengan Primer NP. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 adalah Sampel dari Kabupaten Tangerang yang Mampu Mengamplifikasi Primer H5. K(-) adalah Kontrol Negatif dan K(+) adalah Kontrol Positif. Besar Amplikon adalah 545 bp

Hasil Uji RT-PCR

Sampel-sampel ulas kloaka, ulas trakea dan ulas kandang yang berasal dari Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur setelah diuji dengan metode RT-PCR disajikan pada Tabel 3.

Hasil amplifikasi yang positif terhadap primer NP pada Gambar 1,3,5,7,9 berasal dari sampel kabupaten Blitar, Cianjur, Serang, Pandeglang, dan Tangerang. Hal tersebut sesuai dengan Lee *et al.*, (2001) yang menunjukkan bahwa pita amplikon pada posisi 330 bp adalah positif flu burung. Identifikasi selanjutnya adalah identifikasi sub-tipe H5 sesuai dengan Lee *et al.*, (2001). Hasil amplifikasi

menunjukkan positif sub-tipe H5 yaitu pada posisi 545 bp (Lee *et al.*, 2001), ditunjukkan pada Gambar 2,4,6,8,10 yang merupakan amplikon positif sub-tipe H5 dari sampel Kabupaten Blitar, Cianjur, Serang, Pandeglang, dan Tangerang. Pada Tabel 3, disajikan 12 *pool* inokulum (Cianjur) dan 1 *pool* inokulum (Blitar) menunjukkan hasil RT-PCR positif terhadap primer NP dan H5, karena diperoleh potongan (*fragment*) berukuran 330 bp sehingga dapat terdeteksi adanya virus flu burung dan sub-tipe H5 pada potongan (*fragment*) berukuran 545 bp. Virus AI sub-tipe H5 tersebut diidentifikasi dari peternakan ayam petelur sektor 3 yang berada di Kabupaten Cianjur, dan Blitar. Peternakan-

peternakan tersebut menerapkan program vaksinasi AI. Chang *et al.*, (2004) melaporkan bahwa ayam yang telah divaksinasi dengan vaksin yang tidak homogen dengan strain virus AI (H5N2) akan terlindungi dari serangan AI (H5N1), tetapi tidak dapat mencegah *virus shedding*. Pada penelitian ini vaksin AI yang digunakan heterolog dengan virus AI yang bersirkulasi di lapangan, sehingga *shedding* virus masih terjadi.

Pada Tabel 3 terlihat bahwa sebagian besar (1104) *pool* inokulum *swab* tidak dapat diamplifikasi dengan primer NP dan H5. Mengacu pada Peraturan Menteri Pertanian, apabila hasil uji RT-PCR positif maka *flock* dan peternakan tersebut dinyatakan tertular AI. Apabila hasil uji RT-PCR negatif maka dalam jangka waktu 21 hari sejak diketahui hasilnya, diperlukan uji RT-PCR ulang dan jika hasilnya menunjukkan negatif maka *flock* dan peternakan dinyatakan bebas AI (Departemen Pertanian, 2008). Berdasarkan pengamatan di lapangan menunjukkan bahwa meskipun program vaksinasi di peternakan sektor 4 tidak merata, tetapi program desinfeksi dengan penyemprotan zat antivirus selalu diterapkan dalam pencegahan dan pengendalian penyebaran virus AI di lapangan. Hal tersebut sesuai dengan sifat virus AI, yang dapat diinaktifkan oleh desinfektan seperti formalin, *peracetic acid*, atau beberapa desinfektan yang telah direkomendasikan sebagai anti viral (Chang *et al.*, 2004).

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan pada bulan Juni sampai dengan Desember 2008 dan Maret sampai dengan April 2009. Pengambilan sampel sebagian besar dilakukan pada bulan Juni sampai dengan September 2008. Bulan-bulan tersebut termasuk dalam musim kemarau. Kondisi musim kemarau dengan suhu tinggi dan curah hujan kurang, sangat berpengaruh terhadap sirkulasi virus AI di lapangan. Pada suhu 56°C selama 3 jam atau suhu 60°C selama 30 menit, dengan pH kurang dari 5 atau pH lebih dari 8, virus AI dapat diinaktifasi (Chang *et al.*, 2004). Beberapa faktor di atas dapat berpengaruh terhadap hasil identifikasi virus AI di lapangan. Keadaan seperti tersebut dapat dilihat dari hasil pengujian RT-PCR pada sampel yang berasal dari Kabupaten Tasikmalaya, Sukabumi, Bekasi, Kerawang, Tangerang I, Serang, Pandeglang, Kediri, dan Tulung Agung tahun 2008 menunjukkan negatif terhadap virus AI sub-tipe H5. Pengambilan sampel di Kabupaten Tangerang II, Serang, dan Pandeglang yang dilakukan pada bulan Desember 2008 sampai dengan April 2009 menunjukkan 5 *pool*

inokulum *swab* (Tangerang), 13 *pool* inokulum *swab* (Serang) dan 11 *pool* inokulum *swab* (Pandeglang) positif terhadap virus AI sub-tipe H5. Hal tersebut disebabkan pada bulan Desember 2008 sampai dengan April 2009 termasuk dalam musim hujan dengan kondisi curah hujan tinggi berperan penting terhadap bertambahnya perkembangbiakan virus AI di lapangan.

Hasil uji dari beberapa daerah di Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur tersebut menggambarkan bahwa kejadian AI pada unggas di Indonesia cenderung menurun sejak tahun 2008 dan kejadiannya bersifat sporadis. Meskipun demikian, Indonesia masih merupakan negara dengan tingkat kasus flu burung yang tinggi baik pada unggas mau pun manusia, untuk itu kita harus tetap waspada terhadap fenomena munculnya kembali kasus AI yang hebat seperti dalam kurun tahun 2003 sampai dengan 2006.

SIMPULAN

Sebaran antibodi flu burung sub-tipe H5 pada unggas yang berasal dari Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur sebagian besar bereaksi negatif terhadap AI serta sebagian kecil sampel menunjukkan titer antibodi AI bervariasi dari rendah sampai tinggi. Keberadaan virus flu burung sub-tipe H5 dideteksi pada beberapa sampel dari Kabupaten Cianjur, Blitar, Tangerang, Serang, dan Pandeglang. Meskipun demikian, semua sampel dari Kabupaten Kediri dan Tulung Agung menunjukkan negatif terhadap virus flu burung sub-tipe H5.

SARAN

Perlu tetap waspada terhadap penyebaran virus flu burung yang cepat dan munculnya kembali fenomena kasus flu burung yang hebat dengan selalu melakukan monitoring sirkulasi virus flu burung untuk mengetahui situasi terkini penyakit dan antibodi terhadap flu burung di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari APBN 2008 dan 2009. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada teknisi dan laboran di Kelompok Penelitian Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor khususnya yang bekerja di Penelitian *Avian Influenza* yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chang W L, Senne DA, Suarez DL. 2004. Effect of vaccine in the evolution of mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J Virol* 78(15): 8372-8381
- Departemen Pertanian. 2008. Pedoman penataan kompartemen dan penataan zona usaha perunggasan. <http://www.deptan.go.id/> diakses pada 14 November 2008
- Dharmayanti NLPI, Damayanti R, Wiyono A, Indriani R, Darminto. 2004. Identifikasi virus avian influenza isolat indonesia dengan reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9:136-142
- Dharmayanti NLPI, Indriani R, Damayanti R, Wiyono A, Adjid RMA. 2005a. Karakterisasi molekuler virus *avian influenza* isolat indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 10 (2):127-133
- Dharmayanti NLPI, Indriani R, Adjid RMA. 2005b. Identifikasi virus *avian influenza* pada beberapa jenis unggas di taman margasatwa Ragunan dan upaya eradikasinya. *Media Kedokteran Hewan*. 22 (2) :79-83
- Easterday BC, Hinshaw WS, Halvorson D. 1997. Influenza. In: Calnek BW. (Ed) *Diseases of Poultry*. 10th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press. Pp 583-606.
- EID/Emerging Infection Diseases. 2006. Control of avian influenza in poultry. <<http://www.vetcite.org/publish/items/003162/index.html>> accessed on 12 September 2006
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelz-Waan F, Olsen B, Osterhaus ADME. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79 (5): 2814-2822.
- Indriani R, Dharmayanti NLPI. 2006. Deteksi antibodi *avian influenza* dalam kuning telur ayam pasca vaksinasi (AI) sub tipe H5N1. *Media Kedokteran Hewan* 22 (2): 84-88.
- Indriani R, Dharmayanti NLPI, Wiyono A, Darminto, Parede L. 2004. Deteksi respon antibodi dengan uji hemaglutinasi inhibisi dan titer proteksi terhadap virus avian influenza sub tipe H5N1. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9 (3) : 204-209.
- Kamps BS, Reyes-Teran G. 2006. Influenza 2006. *Influenza Report 2006*. <www.InfluenzaRepor.com>. accessed on 16 Februari 2007
- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 97, 13-22.
- Murphy BR, Webster RG. 1985. Influenza viruses. In Fields B. (Ed) *Virology*. New York: Raven Press. Pp. 1179-1240.
- OIE/Office International des Epizooties (OIE). 2008. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal. *World Organisation for Animal Health* 4: 258-269.
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. 2006. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 312:384-388.
- Perdue ML, Swayne DE. 2005. Public health risk from avian influenza viruses. *Avian Dis* 49:317-327.
- Ronohardjo P. 1983. Penyakit cengesan selesma pada itik Tegal, Bali, dan Alabio. *Penyakit Hewan* 15 (25):61-71
- Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Suss J, Lipkind M, Kida H, Webster R G. 1996. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis* 40:425-437.
- Smith GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, Dejong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YHC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang LJ, Poon LLM, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 56: 45-53
- Tabbu CR. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya*. Yogyakarta Penerbit Kanisius, Volume 1, 232-244
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol* 56: 152-179.