

KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA (AI)

DYAH AYU HEWAJULI dan N.L.P.I. DHARMAYANTI

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Makalah diterima 8 Desember 2007 – Revisi 28 Mei 2008)

ABSTRAK

Avian Influenza merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh virus Influenza tipe A, termasuk famili *Orthomyxoviridae*. Virus Influenza tipe A adalah suatu virus RNA beruntai tunggal yang mempunyai *envelope* dengan delapan segmen, berpolaritas negatif dan berbentuk bulat atau filamen dengan diameter 50 – 120 nm x 200 – 300 nm. Virus Influenza tipe A ditemukan pada unggas, manusia, babi, kuda dan kadang-kadang pada mamalia seperti cerpelai dan ikan paus. Virus ini dibedakan menjadi beberapa sub tipe berdasarkan protein antigen yang melapisi permukaan virus yaitu *Haemagglutinin* (HA) dan *Neuraminidase* (NA). Sehingga penamaan sub tipe berdasarkan HA dan NA yaitu HxNx, sebagai contoh H5N1, H9N2 dan lain-lain. Menurut patogenitasnya dapat dibedakan menjadi 2 bentuk yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Penularan virus *Avian Influenza* telah terjadi di benua Amerika, Eropa, Afrika dan Asia. Wabah *Avian Influenza* ini menyebabkan angka kematian yang tinggi pada unggas peliharaan dan juga telah dilaporkan adanya kasus kematian pada manusia yang disebabkan oleh virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1. Untuk mengantisipasi kondisi seperti ini, perlu adanya suatu usaha pencegahan terhadap penyebaran *Avian Influenza*. Usaha-usaha strategi itu meliputi peningkatan biosekuriti, depopulasi, vaksinasi, pengendalian lalu lintas unggas, surveilans burung dan evaluasi. Diagnosa laboratorium berperan penting terhadap keberhasilan program pencegahan, pengendalian dan pemberantasan *Avian Influenza*. Sekarang ini terdapat dua macam metode diagnostik terhadap virus *Avian Influenza* yaitu metode konvensional (aspek virologi) dan metode molekuler. Metode konvensional biasanya digunakan untuk diagnosis awal infeksi virus *Avian Influenza*. Metode konvensional biasanya membutuhkan lebih banyak waktu dan biaya. Oleh karena itu, sekarang telah dikembangkan metode molekuler yang lebih efektif dibandingkan metode konvensional. Berdasarkan teknik diagnostik yang ada, pada prinsipnya diagnosis virus *Avian Influenza* dilakukan dengan uji serologi, isolasi dan identifikasi virus serta uji patogenitas.

Kata kunci: *Avian Influenza*, Karakterisasi, Identifikasi, Diagnosa Laboratorium

ABSTRACT

CHARACTERISATION AND IDENTIFICATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (AI)

Avian Influenza is caused by Influenza A virus which is a member of *Orthomyxoviridae* family. Influenza A virus is enveloped single stranded RNA with eight-segmented, negative polarity and filament or oval form, 50 – 120 by 200 – 300 nm diameters. Influenza A viruses have been found to infect birds, human, pig, horse and sometimes in the other mammalian such as seal and whale. The viruses are divided into different subtypes based on the antigenic protein which covers the virus surface i.e. *Haemagglutinin* (HA) and *Neuraminidase* (NA). In addition, the nomenclature of subtype virus is based on HA and NA i.e HxNx, for example H5N1, H9N2 and the others. According to pathogenicity, it could be divided into two distinct groups, they are *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) and *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). The *Avian Influenza* viruses have been continuously occurred and spread out in some continents such as America, Europe, Africa and Asian countries. The outbreak of *Avian Influenza* caused high mortality on birds and it has been reported that in human case *Avian Influenza* subtype H5N1 virus has caused several deaths. To anticipate this condition, an effort to prevent the transmission of *Avian Influenza* is needed. These strategic attempts include biosecurity, depopulation, vaccination, control of virus movement, monitoring and evaluation. Laboratory diagnostic plays an important role for successful prevention, control and eradication programs of *Avian Influenza*. Recently, there are two diagnostic methods for *Avian Influenza*. They are conventional (virological diagnosis) and molecular methods. The conventional method is usually used for initial diagnostic of *Avian Influenza*. The conventional method takes more time and more costly, whereas the molecular method is more effective than conventional method. Based on the available diagnostic technique, basically diagnostic of *Avian Influenza* is done by serology test, isolation and identification as well as pathogenicity test.

Key words: *Avian Influenza*, Characterisation, Identification, Laboratory Diagnostic

PENDAHULUAN

Virus Influenza merupakan suatu virus RNA beruntai tunggal yang mempunyai *envelope* dengan delapan segmen, berpolaritas negatif dan berbentuk bulat atau filamen dengan diameter 50 – 120 nm x 200 – 300 nm. Virus ini termasuk ke dalam famili *Orthomyxoviridae*. Berdasarkan perbedaan antigen nukleoprotein dan matrik yang menyusunnya, virus ini diklasifikasikan menjadi tiga tipe yaitu virus Influenza tipe A, B dan C. 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 (OIE, 2004).

Penyakit *Avian Influenza* yang terjadi benua Amerika, Eropa, Afrika dan Asia disebabkan virus Influenza tipe A. Penyakit ini pertama kali ditemukan di Italia pada tahun 1878. Penyakit *Avian Influenza* ini ada yang tergolong *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Penyakit HPAI ini terdaftar sebagai penyakit list A pada OIE manual (OIE, 2006). Penelitian *Avian Influenza* di Indonesia pernah dilaporkan oleh RONOARDJO (1983); RONOARDJO *et al.* (1985); RONOARDJO *et al.* (1986) yang berhasil mengisolasi virus LPAI dari itik, burung pelikan, bebek dan diidentifikasi sebagai virus AI subtipe H4N6 dan H4N2. Namun semenjak itu tidak lagi terdengar beritanya sampai kemudian pada bulan September-Oktober 2003 di Jawa Timur dan Jawa Barat terjadi wabah flu burung pada ayam dengan mortalitas mencapai 100%. Wabah ini kemudian segera diikuti dengan wabah serupa di Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY), Sumatera Barat, Lampung, Bengkulu, Bali, Kalimantan Selatan, Kalimantan Barat dan yang terbaru terjadi wabah di Sulawesi Tenggara pada bulan Maret 2005 (DAMAYANTI *et al.*, 2005). Laporan terakhir juga menyebutkan bahwa *Avian Influenza* menyebabkan kematian pada manusia.

Melihat kondisi seperti ini maka Pemerintah Indonesia mengeluarkan kebijakan bahwa *Avian Influenza* termasuk dalam kategori penyakit strategis di Indonesia. Untuk itu perlu adanya pencegahan, pengendalian dan pemberantasan yang serius terhadap penyebaran virus *Avian Influenza* di Indonesia. Langkah-langkah strategis telah dilakukan Pemerintah Indonesia untuk penanggulangan wabah *Avian Influenza*. Karakterisasi dan identifikasi virus *Avian Influenza* secara cepat dan akurat merupakan bagian dari langkah-langkah strategis tersebut.

Laboratorium-laboratorium di Indonesia yang mempunyai tugas mendiagnosis *Avian Influenza*

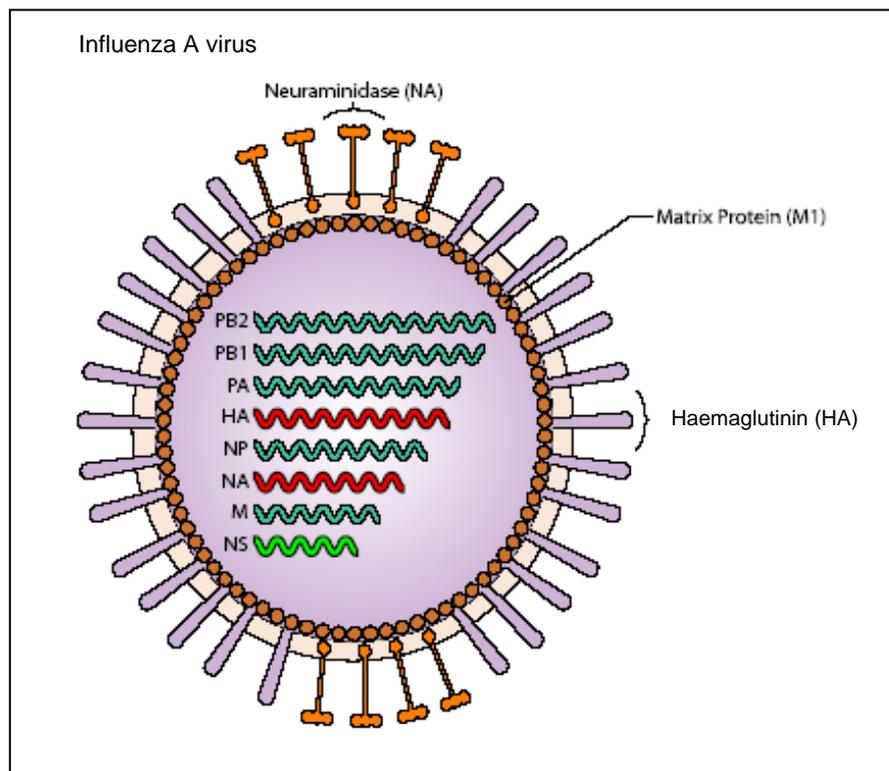
berperan penting terhadap keberhasilan program pencegahan, pengendalian dan pemberantasan *Avian Influenza*. Oleh karena itu, perlu adanya suatu pengetahuan dan kemampuan pengujian dari masing-masing laboratorium sesuai dengan standar OIE. Dalam makalah ini penulis mencoba melakukan kajian pustaka tentang bagaimana cara mengidentifikasi virus *Avian Influenza* secara laboratorium sesuai dengan standar OIE. Makalah ini diharapkan dapat memberikan manfaat untuk aplikasi diagnosis *Avian Influenza* pada skala laboratorium.

KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA

Morfologi virus *Avian Influenza*

Avian Influenza atau flu burung merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh virus yang termasuk virus Influenza tipe A. Masing-masing segmen dari virus Influenza tipe A terdiri dari protein *Polymerase component 2* (PB2), *Polymerase component 1* (PB1) dan *Polymerase component* (PA) yang mengkodekan *Polymerase*, *Haemagglutinin* (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. Gambar 1 menunjukkan struktur gen yang dimiliki oleh virus Influenza.

Diantaranya protein HA berperan dalam proses interaksi langsung dengan reseptor yang ada di permukaan sel (*attachment*). Sedangkan protein NA berperan dalam proses pelepasan virus dari sel (*budding*). Disamping peran yang disebutkan di atas, protein HA dan NA juga berfungsi sebagai antigen. Berdasarkan atas sifat antigen dari protein *Haemagglutinin* (HA) dan *Neuraminidase* (NA) yang menyusun Influenza tipe A maka virus ini dapat diklasifikasikan lagi menjadi beberapa subtipe. Sehingga penamaan subtipe virus Influenza tipe A berdasarkan HA dan NA ini yaitu HxNx, sebagai contoh H5N1, H9N2 dan lain-lain. Sampai saat ini ditemukan 15 jenis HA (H1 – H16) dan 9 jenis NA (N1 – N9) (HARDER dan WERNER, 2006). Virus Influenza tipe A yang menginfeksi manusia, babi dan kuda mempunyai protein HA dan NA yang berbeda sedangkan pada burung dapat ditemukan semua subtipe HA dan NA. Sehingga pada unggas kemungkinan bisa ditemukan 144 kombinasi antigen yang mampu membentuk subtipe yang berbeda (HALMINTON, 2007).



Gambar 1. Struktur gen virus *Avian Influenza*

Sumber: WELLENBERG (2006)

Karakterisasi virus *Avian Influenza*

Sifat Mutasi Virus Avian Influenza

Awalnya virus *Avian Influenza* bersifat *host specific*, artinya subtipe virus tertentu hanya spesifik terhadap induk semang tertentu. *Host specific* ini ditentukan oleh struktur reseptor yang berbeda diantara induk semang. Reseptor asam sialat *alpha 2,3-galaktosa* ditemukan pada unggas sedangkan asam sialat *alpha 2,6-galaktosa* terdapat pada manusia. Sebagai contoh subtipe H5N1 biasanya menginfeksi unggas sedangkan H1N1 ditemukan pada manusia. Namun demikian, akhir-akhir ini sering terjadi laporan kasus *Avian Influenza* pada manusia yang disebabkan oleh subtipe H5N1. Hal ini terjadi karena virus *Avian Influenza* mampu bermutasi melalui dua cara yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift*. *Antigenic drift* terjadi karena perubahan struktur antigen yang bersifat minor pada antigen permukaan HA atau NA. Pola mekanisme mutasi melalui *antigenic drift* ini hanya menyebabkan penambahan atau pengurangan urutan nukleotida antigen HA, NA atau keduanya tanpa menghasilkan subtipe virus baru. Sedangkan *antigenic shift* terjadi karena perubahan struktur antigen yang

bersifat dominan pada antigen permukaan HA atau NA melalui aktivitas dua macam subtipe virus *Avian Influenza* sehingga mampu menghasilkan virus subtipe baru sebagai hasil rekombinasi genetik (HARDER dan WERNER, 2006).

Berdasarkan uraian di atas, virus *Avian Influenza* mempunyai sifat mudah mengalami mutasi sehingga keadaan ini dapat membuat virus menjadi lebih patogen atau kurang patogen. 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 hampir 100% pada unggas terutama ayam buras dan ras dengan atau tanpa menunjukkan gejala klinis sebelum terjadi kematian. Di Asia, virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 termasuk virus *strain* HPAI. Unggas air dan burung liar merupakan *reservoir* alami HPAI, tanpa menunjukkan gejala klinis, sehingga 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, diantaranya gangguan saluran pernafasan, depresi dan penurunan produksi telur. 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. Kemudian strain virus ini 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 ini maka *World Organization for Animal Health* (OIE) sekarang menetapkan sistem penamaan HPAI dan LPAI menjadi hanya *Avian Influenza*. *Avian Influenza* termasuk dalam daftar A di OIE, karena *Avian Influenza* merupakan suatu penyakit yang sangat berbahaya bagi kesehatan hewan dan manusia (EID, 2006).

Sifat biologis virus Avian Influenza

Virus *Avian Influenza* tetap infeksi dalam feses selama 30 – 35 hari pada temperatur 4°C dan selama 7 hari pada temperatur 20°C. Hal ini menunjukkan bahwa virus *Avian Influenza* dapat bertahan di lingkungan dalam kurun waktu dan suhu tertentu. Sifat tersebut memungkinkan terjadinya penyebaran virus *Avian Influenza* di alam ini. Penularan virus *Avian Influenza* dapat terjadi melalui kontak langsung antara ayam sakit dengan ayam yang peka. Unggas yang terinfeksi virus *Avian Influenza* mengeluarkan virus dari saluran pernafasan, konjungtiva dan feses. Penularan dapat juga terjadi secara tidak langsung misalnya melalui udara yang tercemar material atau debu yang mengandung virus *Avian Influenza* (aerosol), makanan atau minuman, alat atau perlengkapan peternakan, kandang, pakaian, kendaraan, peti telur, *egg tray*, burung, mamalia, dan insekta yang mengandung virus *Avian Influenza* (TABBU, 2000).

Penyebaran virus Avian Influenza

Penularan virus *Avian Influenza* telah terjadi di benua Amerika, Eropa, Afrika dan Asia. Wabah *Avian Influenza* telah dilaporkan di Vietnam, Thailand, Kamboja, Cina, Indonesia, Malaysia, Jepang, Laos dan Korea Selatan. Wabah *Avian Influenza* ini menyebabkan angka kematian yang tinggi pada unggas peliharaan dan juga telah dilaporkan adanya kasus kematian pada manusia yang disebabkan oleh virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 (HARDER dan WERNER, 2006). Di Indonesia, wabah *Avian Influenza* pertama kali terjadi pada bulan Agustus 2003 di Kabupaten Pekalongan dan Tangerang. Wabah ini menyerang ayam ras petelur, ayam ras pedaging, burung puyuh, ayam kampung dan itik. Angka kesakitan (morbiditas) dan angka kematiannya (mortalitas) sangat tinggi yaitu mencapai 90%. Penyebaran wabah ini berlangsung sangat cepat. Dalam waktu yang sangat singkat, hampir seluruh wilayah Indonesia tertular *Avian Influenza*.

Penelitian yang dilakukan oleh DHARMAYANTI *et al.* (2004) menunjukkan bahwa wabah *Avian Influenza* yang terjadi di Indonesia telah dapat diidentifikasi dan ditentukan subtipe berdasarkan metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Hasil menunjukkan bahwa semua isolat Jawa Timur 1, Jawa Timur 2, Jawa Barat 1, Jawa Barat 2, Jawa Barat 3, Jawa Barat 4, Jawa Barat 5, Jawa Barat 6 dan DKI adalah virus *Avian Influenza* dengan subtipe H5. Kasus *Avian Influenza* yang menyebabkan kematian manusia di Indonesia dilaporkan pada bulan Juli 2005 (DHARMAYANTI *et al.*, 2004). Data setiap tahun menunjukkan bahwa terjadi penambahan jumlah kasus kematian pada manusia yang disebabkan oleh *Avian Influenza* di Indonesia. Akhir tahun 2006 wabah *Avian Influenza* kembali terjadi di Indonesia. Data terakhir menyebutkan bahwa kasus *Avian Influenza* pada manusia masih terjadi (KOMPAS, 2007). Melihat kondisi seperti ini, perlu adanya suatu usaha pencegahan terhadap penyebaran *Avian Influenza* supaya tidak meluas.

Metode diagnosis Avian Influenza

Gejala klinis dan perubahan patologi yang ditimbulkan oleh *Avian Influenza* sangat bervariasi. Sehingga *Avian Influenza* mempunyai diagnosis banding dengan beberapa penyakit lain diantaranya *New Castle Diseases*, *Infectious Laryngotracheitis*, *Fowl Plaque*, *Fowl Cholera* dan penyakit sistemik lainnya. Untuk itu diperlukan suatu diagnosis definitif berdasarkan hasil diagnosis laboratorium. Faktor-faktor penting yang perlu diperhatikan sebelum melakukan diagnosis laboratorium adalah jenis sampel dan cara penanganannya (HARDER dan WERNER, 2006). Sampel yang akan diperiksa dapat diperoleh dari unggas hidup maupun mati. Jenis sampel yang biasa diambil dari unggas mati meliputi organ (trakea, *air sac*, usus, ginjal, paru, otak, hati), *swab* kloaka, *swab* oro-nasal dan feses. Sedangkan yang dapat digunakan dari unggas hidup adalah *swab* kloaka, *swab* trakea, feses dan serum. Sampel *swab* kloaka dan organ ditempatkan dalam media transpor yang telah berisi larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan pH 7,0 – 7,4 dan antibiotik (penisilin 2000 unit/ml, streptomisin 2 mg/ml, gentamisin 50 µg/ml dan mycostatin 1000 unit/ml). Konsentrasi media transpor dinaikkan menjadi 5 kali lipat apabila digunakan untuk sampel *swab* kloaka dan feses. Sampel harus segera diperiksa setelah diinkubasi selama 1 sampai 2 jam dalam suhu ruangan. Tetapi apabila sampel tidak memungkinkan untuk dikerjakan secepatnya, maka sampel harus disimpan pada suhu 4°C selama 4 hari. Untuk jangka waktu penyimpanan lebih dari 4 hari, sampel harus disimpan pada suhu -80°C (OIE, 2004).

Pada saat ini, terdapat dua macam metode diagnostik yang diterapkan untuk infeksi virus *Avian Influenza* yaitu metode konvensional (aspek virologi) dan metode molekuler. Sampai saat ini metode konvensional merupakan metode yang masih rutin dilakukan di laboratorium-laboratorium diagnostik. Metode ini biasanya digunakan untuk diagnosis awal infeksi virus *Avian Influenza*. Akan tetapi uji-uji yang termasuk metode konvensional biasanya membutuhkan lebih banyak waktu dan biaya. Untuk itu sekarang telah dikembangkan suatu metode molekular yang lebih efektif dibandingkan metode konvensional (HARDER dan WERNER, 2006). Berdasarkan teknik diagnostik yang ada, pada prinsipnya diagnosis virus *Avian Influenza* dilakukan dengan uji serologi, isolasi dan identifikasi virus serta uji patogenitas. Gambar 2 di bawah ini menunjukkan tahapan deteksi dan klasifikasi virus *Avian Influenza* dalam laboratorium.

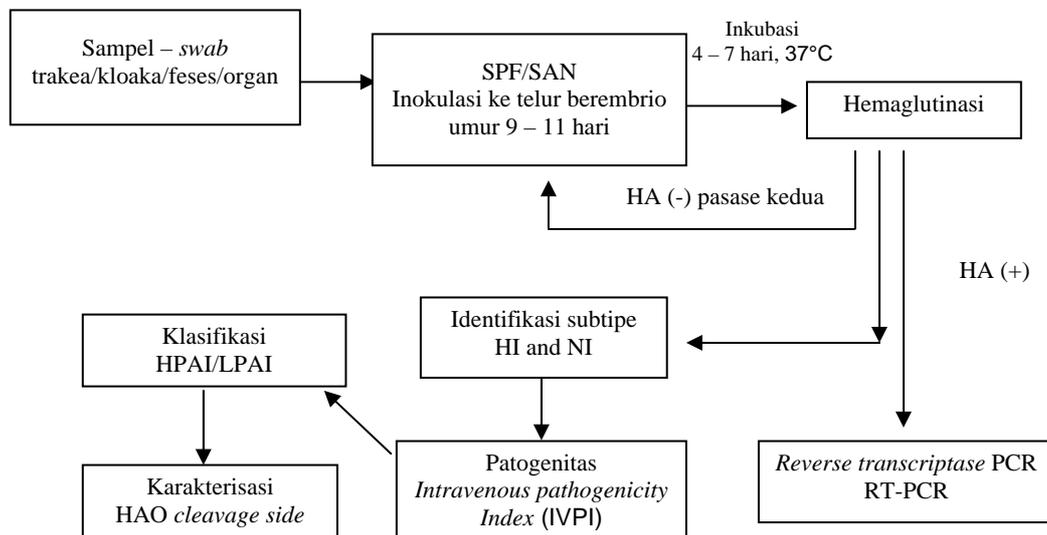
Metode konvensional

Uji serologi digunakan untuk mendeteksi titer antibodi terhadap virus *Avian Influenza*. Uji ini menggunakan sampel serum dari hewan yang diduga terinfeksi virus *Avian Influenza*. Sampel serum yang telah diperoleh dapat diuji dengan uji *Haemagglutination* (HA) dan *Haemagglutination Inhibition* (HI), *Neuraminidase Inhibition* (NI), *Agar Gel Immunodiffusion* (AGID), *Serum Neutralisation*

(SN) dan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Dalam makalah ini hanya dibahas tentang uji HA, HI, NI, AGID dan ELISA berdasarkan standar referensi OIE.

Haemagglutination (HA) dan Haemagglutination Inhibition (HI)

Uji HA dan HI dilakukan berdasarkan sifat virus *Avian Influenza* yang dapat mengaglutinasi sel darah merah (RBC) dan kemampuan antibodi spesifik untuk menghambat aglutinasi tersebut. Hemaglutinasi merupakan proses penggumpalan sel darah merah yang terlihat seperti butir-butir pasir. Uji ini merupakan salah satu uji serologi standar yang direkomendasikan OIE untuk mendeteksi keberadaan antibodi yang terdapat pada serum yang diperiksa. Pada prinsipnya uji HI adalah reaksi ikatan antara antibodi yang terkandung dalam serum yang diperiksa dan jumlah antigen hemaglutinin *Avian Influenza* yang digunakan sebanyak 4 HAU (*Haemagglutination Unit*). Umumnya uji ini cukup sensitif dan mampu memberikan hasil yang spesifik terhadap subtipe antigen virus *Avian Influenza*. Reaksi silang heterolog kemungkinan bisa terjadi antara subtipe-subtipe virus Influenza tipe A. Namun demikian, reaksi homolog akan selalu menunjukkan hasil yang lebih sering terjadi daripada reaksi heterolog.



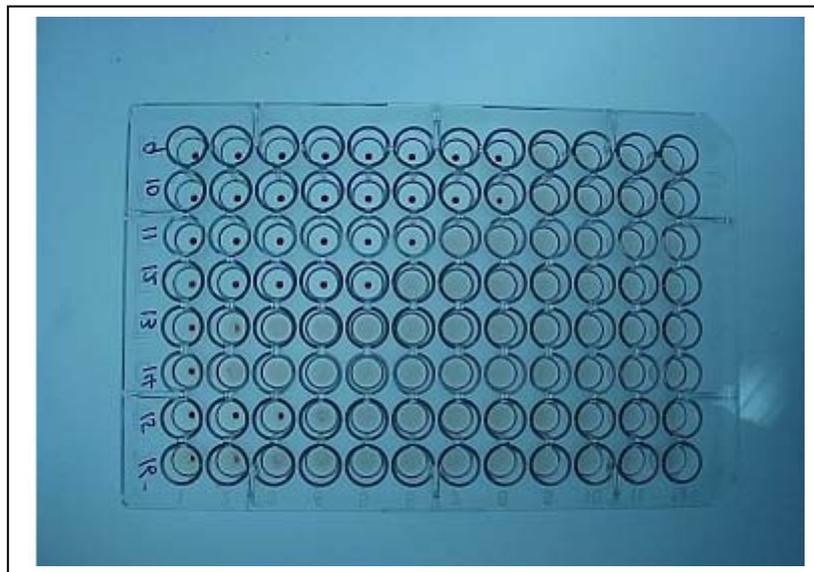
Gambar 2. Deteksi dan klasifikasi *Avian Influenza* (OIE edisi kelima, 2004)

Sumber: WELLENBERG (2006)

Disamping yang telah disebutkan di atas, uji HA dan HI juga masih mempunyai beberapa kelebihan dan kekurangan lainnya. Kelebihan dari uji ini adalah relatif simpel, murah serta reagen dan RBC yang diperlukan untuk pengujian dapat dipersiapkan dengan mudah oleh masing-masing laboratorium. Sedangkan kekurangan-kekurangan yang dimiliki uji ini diantaranya titrasi antigen harus dilakukan setiap pengujian, interpretasi hasil uji memerlukan keahlian khusus serta adanya prosedur yang berbeda dari masing-masing laboratorium dapat memberikan hasil yang berbeda (SELLECK, 2007).

Prosedur standar dalam uji HI menggunakan *microtiter plate V* dengan ukuran 0,075 ml. Reagen yang diperlukan dalam uji ini adalah PBS 0,1 M dalam kondisi pH 7,0 – 7,2. RBC dapat diambil dari minimal 3 ayam *Specific Pathogen Free* (SPF). Tetapi apabila tidak tersedia ayam SPF, maka RBC dapat diperoleh dari ayam *Specific Antibody Neutralisation* (SAN). Kemudian RBC yang telah diperoleh dilarutkan dalam larutan Alsever dengan perbandingan volume sama. Selanjutnya RBC harus dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali sebelum digunakan sebagai suspensi RBC 1%. Untuk mengidentifikasi antigen *Avian Influenza* maka diperlukan panel antigen AI subtipe H1-H16, apabila uji HI yang dilakukan menggunakan salah satu subtipe antigen AI serta mampu menghambat terjadinya aglutinasi maka positif terhadap subtipe tersebut. Setiap melakukan pengujian HI harus selalu menggunakan kontrol positif dan negatif terhadap antigen dan antisera (OIE, 2004).

Hasil uji HI dapat diinterpretasikan sebagai antibodi negatif terhadap subtipe antigen AI apabila serum kontrol menunjukkan aglutinasi serta serum yang diuji tidak mengalami inhibisi. Serum yang menunjukkan inhibisi pada pengenceran 1 : 16 atau lebih besar dari 4HAU maka antigen dinyatakan positif mengandung antibodi yang memadai. Namun demikian, ada beberapa laboratorium yang lebih memilih menggunakan 8HAU dalam melakukan uji HI (OIE, 2004). Pengujian HI di Balai Besar Penelitian Veteriner menggunakan 4HAU. Hasil titer antibodi AI dianggap rendah apabila $< 4 \log 2$, titer antibodi AI sedang antara $4 - 7 \log 2$, titer antibodi AI tinggi apabila $> 7 \log 2$. Peraturan Menteri Pertanian No 28/OT 140/5/2008 menyatakan pemeriksaan serologi yang dilakukan dengan uji HI yang menggunakan antigen H5 pada unggas yang divaksinasi dengan vaksin AI dianggap protektif apabila titer bereaksi positif $\geq 4 \log 2$. Namun demikian pada kondisi lapangan, titer yang dianggap protektif bervariasi tergantung dari kondisi peternakan tersebut. Penelitian yang dilakukan INDRIANI dan DHARMAYANTI (2006) untuk mendeteksi antibodi AI H5N1 dari ayam yang mendapat program vaksinasi menggunakan vaksin inaktif AI H5N1 pada sampel kuning telur memperlihatkan sampel ekstrak kuning telur dan serum baik dari flock yang divaksinasi dengan vaksin AI A/Chicken/West Java/67-2/2003, maupun flock yang divaksinasi dengan vaksin komersial memberikan hasil positif antibodi virus AI H5N1 dengan uji HI. Hasil titer antibodi virus AI H5N1 terlihat berkisar antara 2 – 9 $\log 2$ pada ekstrak kuning



Gambar 3. Visualisasi hambatan hemaglutinasi dari hasil uji HI. Bentuk butir darah merah yang menyerupai tetesan air mata menandakan reaksi aglutinasi hambat yang disebabkan oleh antibodi anti hemaglutinin di dalam sampel uji dengan antigen virus AI

Sumber: WELLENBERG (2006)

telur dan serum berkisar 4 – 8 log₂. Perbedaan ini mungkin disebabkan kandungan antibodi yang diturunkan oleh induk dalam kuning telur mempunyai titer antibodi lebih rendah dari kandungan titer antibodi yang terdapat di dalam serum induk. BECK *et al.* (2003) menyatakan juga bahwa antibodi AI dapat dideteksi lebih awal dari ayam yang terinfeksi virus hidup daripada ayam yang divaksinasi AI adjuvan.

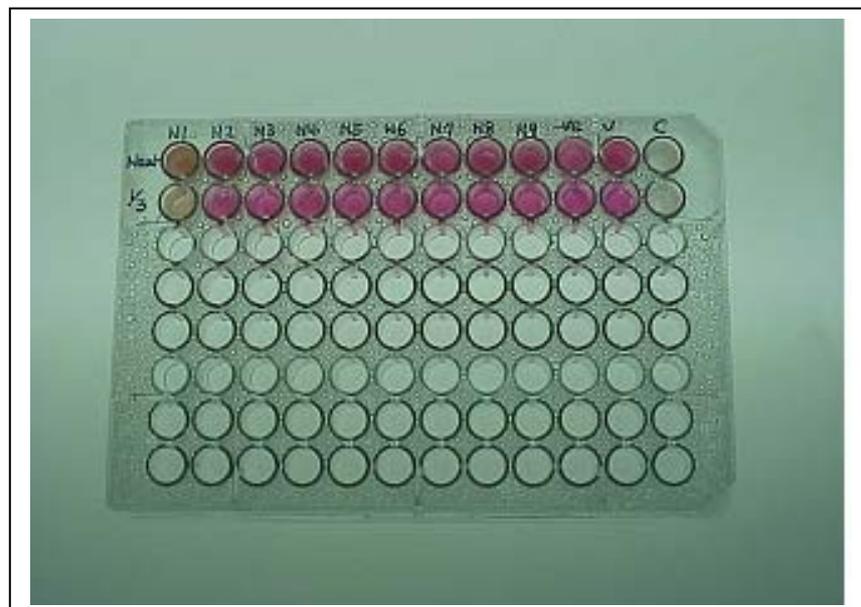
Neuraminidase Inhibition (NI)

Neuraminidase Inhibition merupakan suatu uji serologi untuk mengetahui titer antibodi dari hewan yang terinfeksi virus *Avian Influenza* serta untuk mengidentifikasi sub tipe *Neuraminidase* dari isolat virus *Avian Influenza*. Prinsip dasar dari uji ini adalah adanya suatu ikatan antara antibodi dalam serum yang diperiksa dan sub tipe antigen *Neuraminidase* tertentu. Reaksi silang heterolog antara sub tipe-sub tipe virus Influenza A tidak ditemukan dalam uji ini. Uji *Neuraminidase Inhibition* ini biasanya dilakukan sebagai *Differentiating Infected from Vaccinated Animal (DIVA)* untuk mendeteksi spesifik antibodi anti-N (OIE, 2004). Pada pengujian ini, enzim virus *Neuraminidase* bereaksi dengan substrat (fetuin) dan melepaskan *sialic acid*. Adanya *sialic acid* ditentukan secara *chemis* dan oleh *thiobarbituric acid* yaitu dihasilkan warna merah muda. Chromiphor warna merah muda ini dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 549 nm (WRINGATI, 2006).

Uji *Neuraminidase Inhibition* ini tidak umum dilakukan oleh laboratorium-laboratorium diagnostik dikarenakan lebih sulit, lebih lama dan diperlukan suatu keahlian khusus untuk interpretasi hasil serta membutuhkan *microtiter plate* tertentu. Gambar 4 menunjukkan visualisasi hasil uji *Neuraminidase Inhibition*. Timbulnya warna merah muda menunjukkan hasil negatif sedangkan tidak berwarna menunjukkan hasil positif. Kontrol fetuin harus menunjukkan warna merah muda.

Agar Gel Immunodiffusion (AGID)

Semua virus Influenza tipe A memiliki kemiripan dengan antigen protein Nukleokapsid dan Matrik. Hal inilah yang menjadi dasar dilakukan uji AGID. Uji AGID merupakan uji untuk mendeteksi antibodi terhadap kelompok virus Influenza tipe A. Dalam pelaksanaannya, uji ini relatif mudah dan murah sehingga uji AGID ini lebih banyak diaplikasikan di laboratorium-laboratorium diagnostik. Di Indonesia, terdapat beberapa laboratorium veteriner yang melakukan uji AI dengan AGID, diantaranya adalah Balai Besar Penelitian Veteriner, Balai Besar Veteriner, serta Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner. Akan tetapi, uji ini kurang sensitif serta tidak spesifik terhadap sub tipe virus *Avian Influenza* (SELLECK, 2007). BECK *et al.* (2003) mendeteksi antibodi dari serum dan kuning telur yang berasal dari 21 hari pasca vaksinasi AI dengan adjuvan memperlihatkan antibodi terdeteksi lebih awal dengan uji AGID daripada uji HI.



Gambar 4. Uji *Neuraminidase inhibition*

Sumber: WELLENBERG (2006)

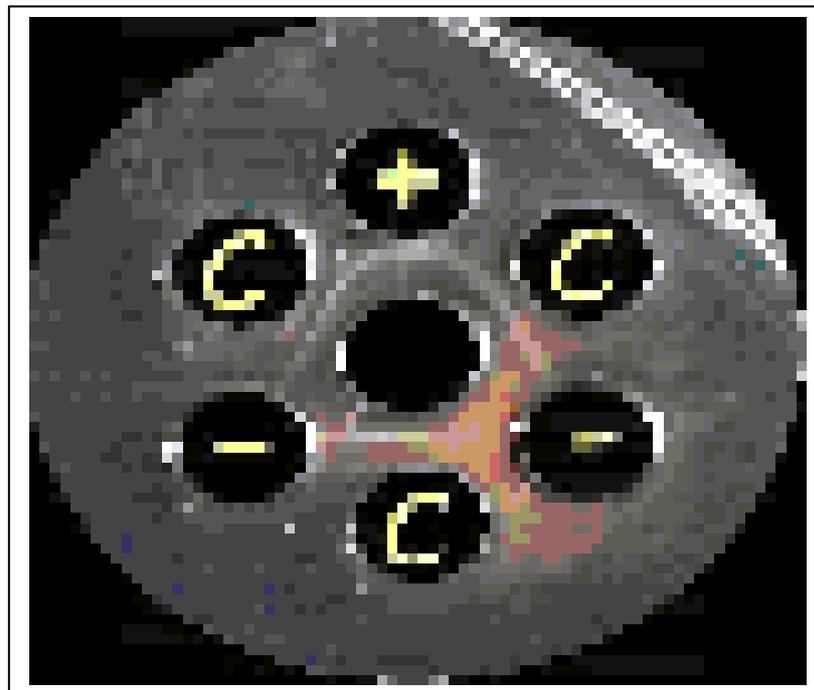
Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam pengujian ini adalah 8% NaCl dalam 0,1 M larutan PBS, 1% agarose, antigen, antiserum positif dan serum yang akan diperiksa. Suspensi agarose dengan larutan PBS dituang sebanyak 2 – 3 mm dalam cawan petri. Padatan agar yang telah terbentuk kemudian dibuat lubang dengan pola 6 lubang heksagonal mengelilingi 1 sentral lubang. Lubang sentral untuk pengenceran antigen, lubang no. 1, 3 dan 5 untuk pengenceran antiserum positif sedangkan lubang no. 2, 4 dan 6 untuk pengenceran serum. Antigen yang digunakan dalam pengujian ini diperoleh dari cairan *chorio-allantois* telur SPF umur 10 hari yang telah diinfeksi dengan virus Influenza tipe A yang sudah mengalami inaktivasi. Aktivasi cairan ini menggunakan larutan 0,1% formalin atau 1% beta propiolakton. Antigen dan antiserum positif yang akan digunakan sebaiknya dititrasi terlebih dahulu untuk menentukan *working solution* nya (OIE, 2004).

Interpretasi hasil dari AGID dilakukan setelah cawan petri tersebut diinkubasikan selama 24 – 48 jam. *Plate* diperiksa pada iluminator lapang gelap untuk melihat keberadaan garis presipitasi pada antiserum positif. Apabila garis presipitasi pada antiserum positif belum terbentuk selama inkubasi 24 jam maka *plate* diinkubasikan kembali setelah 24 jam. Serum positif antibodi ditunjukkan dengan adanya garis presipitasi penuh atau sebagian dengan ciri yang sama dengan

garis presipitasi yang terbentuk oleh antiserum positif. Apabila garis presipitasi terlihat tidak penuh atau berbelok dari antiserum positif maka diinterpretasikan sebagai serum positif lemah. Sedangkan serum negatif antibodi akan menunjukkan tidak ada garis presipitasi dengan anti serum positif. Masing-masing hasil interpretasi diberi skor dari negatif (-) sampai positif kuat ($> 3+$) tergantung pada kuat dan jarak garis presipitasi yang terbentuk (OIE, 2004).

Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Prinsip metode *immunoassay* adalah reaksi antara antigen dan antibodi spesifik dimana hasil reaksi dapat diamati dengan menggunakan suatu label atau *marker*. ELISA merupakan salah satu metode *immuno assay* yang paling banyak digunakan. Pada uji ini reaksi terjadi dengan mengabsorbirkan antigen atau antibodi pada suatu *solid phase* serta dengan memberi label suatu enzim. Enzim yang paling banyak digunakan adalah *Horseradish peroxidase* dan *Alkaline phosphatase*. Enzim ini dapat dilabel baik pada antibodi maupun antigen yang akan membentuk warna dengan penambahan suatu substrat. Pengujian secara kuantitatif dapat dilakukan dengan mengamati intensitas warna yang terbentuk (BURGESS, 1988).



Gambar 5. Uji agar immunodifusi

Sumber: PESONA SCIENTIFIC (2005)

Saat ini ELISA sudah tersedia dalam bentuk kit komersial sehingga mudah diaplikasikan. Uji ini juga sesuai untuk pengujian dalam jumlah banyak dikarenakan satu kit ELISA dapat digunakan untuk menguji sebanyak 48 sampel dalam satu kali pengujian. Spesifisitas dan sensitivitas dari uji ini dapat ditingkatkan sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi antigen atau antibodi yang lebih spesifik. Akan tetapi uji ini membutuhkan biaya dan peralatan yang mahal (SELLECK, 2007)

Teknik pengujian dengan metode ELISA dapat dilakukan dalam beberapa format, pemilihan format tergantung dari besar molekul yang akan dideteksi serta tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang dikehendaki. Terdapat dua format dalam metode ELISA yaitu *Competitive ELISA* dan *Non Competitive ELISA*. *Competitive ELISA* merupakan format yang banyak dipakai untuk pengujian antigen, toksin serta senyawa dengan molekul kecil. *Competitive ELISA* dapat dibedakan menjadi *Direct Competitive* dan *Indirect Competitive*. *Non Competitive Sandwich ELISA* terutama digunakan untuk mendeteksi makromolekul. Tetapi format ini kurang sensitif untuk mendeteksi senyawa dengan berat molekul kecil seperti antigen dan toksin (BURGESS, 1988).

Avian Influenza competitive ELISA (AIVc-ELISA) dikembangkan untuk menggantikan *Agar Gel Immunodiffusion Assay (AGID)* sebagai uji untuk mendeteksi antibodi terhadap kelompok Influenza tipe A. *AIVc-ELISA* dapat diterapkan pada serum ayam, babi, kuda dan manusia. Uji *AIVc-ELISA* lebih sensitif dibandingkan dengan uji AGID dan HI (ZHOU *et al.*, 1997).

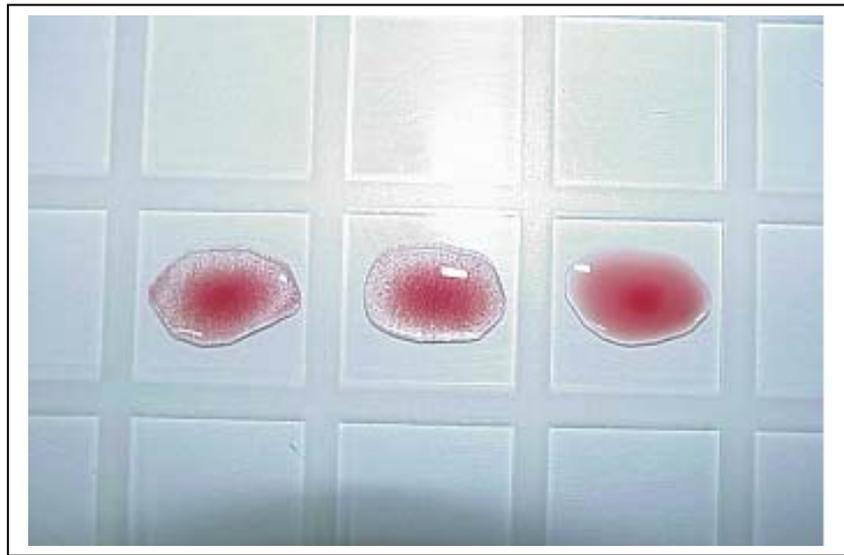
Antigen dan antibodi monoklonal yang akan digunakan harus distandardisasi terlebih dahulu untuk menentukan pengenceran yang tepat. Antigen distandardisasi pada pengenceran 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 1 : 1600, 1 : 3200, 1 : 6400 dan 1 : 12800 sedangkan standardisasi antibodi monoklonal dilakukan pada pengenceran 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 1 : 1600 dan 1 : 3200. Pengenceran yang paling tepat untuk digunakan dalam pengujian ini dilihat berdasarkan nilai tertinggi dari *Optical Density (OD)* dan *Percentage Inhibition (PI)*. Hasil titer antibodi dari serum yang diuji dengan *AIVc-ELISA* dihitung berdasarkan PI. PI merupakan persentase penghambatan dari antibodi monoklonal (yang secara normal tidak berada dalam serum) oleh antibodi yang ada dalam serum. Pengujian *Avian Influenza* dengan ELISA di Balai Besar Penelitian Veteriner hanya diaplikasikan untuk keperluan penelitian.

Isolasi dan identifikasi virus Avian Influenza

Sampel yang digunakan untuk isolasi virus *Avian Influenza* dapat diperoleh dari unggas hidup maupun mati. Sampel dari unggas hidup dapat berupa *swab* kloaka, *swab* trakea dan feses segar sedangkan dari unggas mati meliputi organ (trakea, *air sac*, usus, ginjal, paru, otak, hati), *swab* kloaka, *swab* oro-nasal dan feses. Apabila sampel dari feses atau organ maka terlebih dahulu harus disentrifus dengan kecepatan 1000 g untuk memperoleh supernatan. Supernatan yang telah diperoleh kemudian diinokulasikan pada telur ayam SPF atau SAN yang berumur 9 – 11 hari. Telur



Gambar 6. Isolasi virus AI dari telur ayam bertunas SPF



Gambar 7. Reaksi aglutinasi yang terjadi pada cairan allantois yang mengandung virus AI setelah direaksikan dengan RBC

Sumber: PESONA SCIENTIFIC (2005)

diamati setiap hari terhadap kematian embrio. Apabila kematian embrio terjadi kurang dari 24 jam pasca inokulasi maka dianggap sebagai kematian karena faktor non spesifik. Sedangkan telur-telur yang embrionya mati lebih dari 24 jam pascainokulasi maka harus dilanjutkan dengan pemeriksaan terhadap hemaglutinasi (HA) untuk mendeteksi virus Influenza tipe A atau *Avian Paramyxovirus*. Cairan alantois yang tidak menunjukkan aktivitas hemaglutinasi dianggap sebagai virus negatif hemaglutinasi. Namun demikian, partikel-partikel virus kemungkinan masih ada sehingga diperlukan pasase II. Tetapi jika pasase II, cairan alantois tidak menghasilkan aktivitas HA, maka sampel dianggap sebagai virus negatif hemaglutinasi (OIE, 2004).

Saat ini telah dikembangkan suatu uji yang langsung dapat mendeteksi virus Influenza tipe A dalam waktu 15 menit. Uji ini merupakan metode *immunoassay* dengan cara melabel enzim pada antibodi monoklonal sehingga mampu mengikat antigen *nucleo protein* dari virus Influenza tipe A. Secara komersial uji ini tersedia dalam bentuk kit (*rapid test*) dengan beberapa nama dagang. Sensitivitas dari uji ini bervariasi tergantung dari spesimen yang akan diperiksa. Kekurangan dari uji ini adalah harga kit yang mahal dan tidak mampu mendeteksi subtipe dari Influenza tipe A (CHAN *et al.*, 2002).

Uji patogenitas virus Avian Influenza

Bentuk *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) termasuk strain virus yang ganas. Gejala klinis yang

biasanya ditunjukkan oleh HPAI pada ayam adalah leleran mata yang berlebihan, gangguan saluran pernafasan, sinusitis, pembengkakan pada wajah dan kepala, sianosis pada kulit. Kematian mendadak pada ayam juga dapat terjadi tanpa menunjukkan gejala klinis. Namun demikian, gejala klinis yang ditimbulkan sangat bervariasi tergantung dari induk semang, umur, infeksi sekunder dan kondisi lingkungan. Kondisi lingkungan yang memburuk dapat menyebabkan bentuk LPAI berubah menjadi HPAI (TABBU, 2000). *Avian Influenza* termasuk dalam kategori penyakit berbahaya dan dapat menyebabkan angka kematian yang tinggi pada unggas dan manusia serta dapat ditularkan melalui inhalasi maka pelaksanaan uji patogenitas AI harus dilakukan dalam *Biosafety Level 3* (BSL 3) untuk menurunkan atau mengeliminasi potensi tertularnya virus AI ke lingkungan sekitar.

Uji patogenitas *Avian Influenza* dilakukan dengan menginokulasikan 0,2 ml virus *Avian Influenza* dari *allantoic-fluid* yang sebelumnya telah diencerkan 1/10 dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang mengandung antibiotika secara *intra vena* pada 8 ekor ayam berumur 4 – 8 minggu. Setiap melakukan uji patogenitas *Avian Influenza* diperlukan kontrol negatif, dengan cara menginokulasikan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) steril pada 2 ekor ayam berumur 4 – 8 minggu. Pengamatan terhadap gejala klinis yang timbul dilakukan setiap hari selama 10 hari (OIE, 2004).

Virus *Avian Influenza* mempunyai beberapa subtipe yang berbeda. Dari sekian banyak subtipe tersebut, hanya subtipe H5 dan H7 yang bersifat patogen. Namun demikian, tidak semua subtipe H5 dan H7 bersifat patogen (WELLENBERG, 2006). Klasifikasi

HPAI menurut OIE (2004) berdasarkan beberapa kriteria yaitu pertama, HPAI mampu menyebabkan angka kematian sebesar 70 – 80% pada ayam berumur 4-8 minggu apabila virus diinokulasikan melalui intravena (*Intravenous Pathogenicity Index*). Kedua, isolat bukan termasuk HPAI apabila *Intravenous Pathogenicity Index* menunjukkan angka kematian hanya 10 – 50% serta tidak ditemukannya *Cytopathic Effect* (CPE) pada biakan jaringan yang mengandung tripsin. Ketiga, LPAI tidak akan menimbulkan CPE pada biakan jaringan yang tidak mengandung tripsin serta hasil *sequencing* menunjukkan H5 dan H7 yang tidak patogen (OIE, 2004).

Patogenitas dari virus *Avian Influenza* sub tipe H5 dan H7 dapat dikonfirmasi berdasarkan *sequencing* genom. Virus *Avian Influenza* sub tipe H5 dan H7 disebut patogen apabila pada *sequencing* ditemukan adanya asam amino ganda (arginin atau lisin) pada *cleavage site*. Sebagai contohnya sub tipe H7 LPAI mempunyai susunan asam amino –PEIPKGR*GLF- atau –PEPKGR*GLF- pada *cleavage site*. Sedangkan sub tipe H7 HPAI mempunyai susunan asam amino –PEIPKKKKR*GLF-, -PETPKRKRKR*GLF-, -PEIPKKR EKR*GLF-, -PETPKRRRR*GLF pada *cleavage site* (OIE, 2004). Saat ini *sequencing* genom virus *Avian Influenza* sudah dapat dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner.

Metode molekuler

Kualitas sampel adalah faktor penting dalam isolasi dan identifikasi virus Influenza. Jaringan yang sudah mengalami autolisis atau *swab* yang terkontaminasi dapat mengurangi sensitivitas dan spesifitas pada isolasi dan identifikasi virus Influenza sehingga diperlukan uji yang lebih sensitif dan spesifik. Karena alasan inilah, teknik-teknik yang berkembang saat ini seperti *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) banyak digunakan untuk mendeteksi virus Influenza (OIE, 2004). Waktu yang dibutuhkan juga lebih cepat apabila dibandingkan dengan isolasi dan identifikasi dengan kultur pada jaringan atau telur SPF. Hal ini dikarenakan teknik RT-PCR langsung dapat mendeteksi *Avian Influenza* dari *swab* kloaka atau *swab* trakea dalam media transpor. Selain itu, isolat virus *Avian Influenza* dari cairan allantois telur SPF juga dapat digunakan sebagai sampel untuk RT-PCR (SUAREZ *et al.*, 1997).

Avian Influenza adalah virus *single-stranded RNA* sehingga pada reaksi PCR diperlukan suatu tahap sintesa *copi DNA* (cDNA). Tahap ini membutuhkan suatu enzim transcriptase balik (*reverse transcriptase*) (DIAMOND, 2006). Beberapa enzim transcriptase balik yang dapat digunakan antara lain *Taq DNA Polymerase*, *mesophilic viral reverse transcriptase (RTase)* dan *Tth DNA Polymerase*. *Taq DNA Polymerase* adalah enzim

yang tahan pada suhu tinggi serta mempunyai laju polimerase yang tinggi dan kemampuan yang tinggi untuk menggabungkan nukleotida dengan suatu primer secara terus menerus tanpa terdisosiasi dari kompleks primer-DNA cetakan (prosesivitas). RTase yang dikode oleh virus *avian mycoblastosis (AMV)* atau *M-MuLV* bersifat sangat prosesif dan mampu mensintesis cDNA sampai sepanjang 10 kb, sedangkan *Tth DNA Polymerase* mampu mensintesis cDNA sampai sepanjang 1-2 kb. Berdasarkan alasan di atas, maka uji ini disebut sebagai *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* (YUWONO, 2006).

Reaksi transkriptase balik dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa macam primer yaitu *Oligo (dT)*, Heksanukleotida Acak dan Urutan Nukleotida Spesifik. *Primer Oligo (dT)* akan menghasilkan cDNA yang lengkap sedangkan *Heksanukleotida Acak* akan didapat cDNA yang tidak lengkap (parsial). Primer dengan urutan nukleotida spesifik dapat digunakan untuk menyalin mRNA secara selektif (YUWONO, 2006).

Prinsip dari RT-PCR adalah ekstraksi virus RNA disintesis menjadi *complementary DNA (cDNA)* dengan menggunakan *Reverse Transcriptase*. Kemudian cDNA digunakan sebagai *template* untuk PCR yang akan menghasilkan *complementary double strand (dsDNA)* yang dihasilkan melalui siklus denaturasi, *annaelling* dan ekstensi yang didukung dengan adanya *primer sense*, *antisense* spesifik dan *thermal stable Taq Polymerase* (VILJOEN *et al.*, 2005).

Dalam RT-PCR, tahap ekstraksi RNA merupakan tahap yang sering kali menghabiskan banyak waktu namun demikian merupakan tahap sangat penting dan sangat berpengaruh terhadap degradasi RNA. Metode ekstraksi RNA dengan *phenol chloroform-quanidium* (Trizol) merupakan metode yang lebih umum dilakukan di laboratorium. Namun demikian, masih terdapat beberapa metode ekstraksi RNA yang lain diantaranya metode pengendapan garam (*Purescript*) dan *spin column* (SUAREZ, 1997).

Metode RT-PCR sudah banyak digunakan untuk mendiagnosis virus *Avian Influenza*. Pengujian RT-PCR untuk mendiagnosis *Avian Influenza* dapat dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner baik untuk keperluan penelitian maupun diagnostik. Metode RT-PCR ini juga banyak diterapkan di laboratorium-laboratorium veteriner lain yang terdapat di seluruh wilayah Indonesia untuk keperluan pengujian *Avian Influenza*. Biasanya metode ini akan dilanjutkan dengan *sequencing DNA* untuk melihat lebih jauh tentang karakter molekul virus ini, seperti mutasi virus, hubungan kekerabatan dan untuk rekayasa genetika lainnya (DHARMAYANTI *et al.*, 2004). Saat ini terdapat beberapa teknik RT-PCR diantaranya *RT-PCR Conventional* dan *Real Time RT-PCR*. Hasil diagnosis RT-PCR Konvensional ditentukan berdasarkan

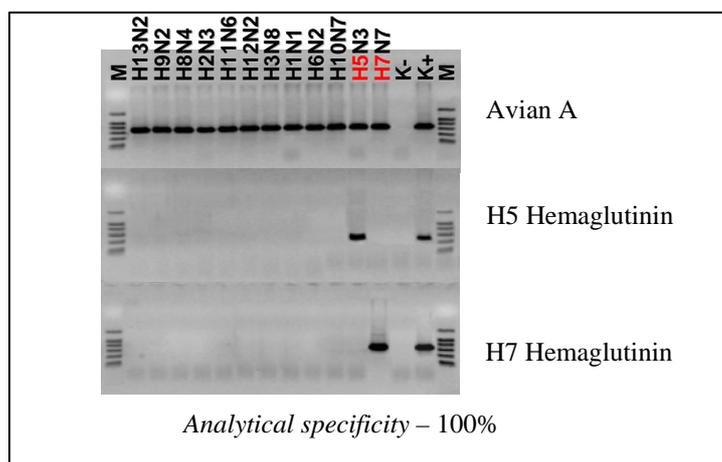
amplikon yang terlihat pada gel elektroforesis. Untuk primer Matrik, pita akan berada pada posisi 200 – 300 pasang basa dan pada posisi 500 – 600 pasang basa pada primer H5 (WELLENBERG, 2006). Elektroforesis adalah proses migrasi dari fragmen DNA di dalam gel yang terendam dalam larutan penyangga. Perjalanan molekul DNA di dalam gel mengikuti arus listrik dari kutub negatif menuju kutub positif. Penggunaan jenis gel disesuaikan dengan tujuan yang akan dicapai. *Electrophoresis Gel Agarose* (AGE) dengan visualisasi menggunakan *ethidium bromide* dan *Electrophoresis Gel Polyacrilamid* (PAGE) dengan visualisasi menggunakan *silver staining* (SULANDARI dan ZEIN, 2003).

Reaksi RT-PCR konvensional selama ini membutuhkan waktu kurang lebih 4 – 5 jam untuk ekstraksi RNA, proses 40 siklus PCR (denaturasi, *annealing* dan ekstensi DNA) serta elektroforesis pada gel. Oleh karena itu, saat ini telah dikembangkan suatu teknik terbaru RT-PCR yaitu *Real Time RT-PCR* (RRT-PCR). Dalam teknik ini, tahap elektroforesis dihilangkan dan hasil langsung dapat dibaca di layar monitor komputer sehingga waktu yang dibutuhkan lebih singkat, kurang lebih 2 jam. RRT-PCR mempunyai sensitivitas 10 – 100 kali lebih tinggi daripada RT-PCR (TRANI *et al.*, 2005).

Prinsip kerja dari RRT-PCR ini hampir sama dengan RT-PCR konvensional yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi. Namun di dalam RRT-PCR perjalanan reaksi dilihat per satuan waktu (siklus) dalam RRT-PCR digunakan *probe* (penanda) yang menempel pada cetakan DNA, dimana dalam *probe*

tersebut dilengkapi dengan *reporter* (pembawa sinyal) dan *quencher* (penahan sinyal). Jika primer memulai ekstensi DNA, selanjutnya ekstensi DNA yang diperantarai oleh enzim polimerase akan menghantam *probe* DNA menyebabkan lepasnya ikatan *reporter* dan *quencher*. Terlepasnya ikatan ini mengakibatkan terbacanya emisi sinyal *reporter* oleh perangkat filter dalam mesin Real Time PCR dalam bentuk sebuah grafik penambahan kopi DNA per satuan siklus PCR.

RRT-PCR dapat dibedakan menjadi dua metode yaitu *one-step* RRT-PCR dan *two-steps* RRT PCR. *One step* RRT-PCR merupakan metode yang lebih umum dilakukan karena reaksi RT dan reaksi siklus PCR dilakukan dalam satu langkah. Akan tetapi pada *two-steps* RRT-PCR, reaksi RT dan reaksi siklus PCR dilakukan secara terpisah. *Two-step* RRT-PCR juga menggunakan primer yang berbeda pada masing-masing reaksi. Umumnya primer yang digunakan pada reaksi RT adalah oligo-dT kemudian dilanjutkan menggunakan primer Urutan Nukleotida Spesifik pada reaksi siklus PCR. Sedangkan *One-step* RRT-PCR hanya memerlukan satu primer yang spesifik terhadap kedua reaksi tersebut (QIAGEN, 2007). RRT-PCR yang dilakukan dengan metode *One step* dapat menurunkan resiko terjadinya kontaminasi silang dan waktu yang dibutuhkan lebih cepat dibandingkan dengan *two-steps* RRT-PCR. Meskipun demikian *One step* RRT-PCR kurang sensitif jika dibandingkan dengan *two-step* RRT-PCR (TRANI, 2005). Pengujian RRT-PCR sampel *Avian Influenza* untuk keperluan penelitian di Balai Besar Penelitian Veteriner dilakukan dengan metode *one step*.



Gambar 8. Hasil elektroforesis fragmen gen H5 dan H7 virus *Avian Influenza*. Lajur M adalah penanda berat molekul (100 *bp* ladder)

Sumber: WELLENBERG (2006)

Hal lain yang perlu diperhatikan dalam RT-PCR adalah perencanaan laboratorium. Hal ini berhubungan dengan alur kerja dalam laboratorium PCR. Alur kerja RT-PCR dimulai dari isolasi RNA dan karakterisasi, sintesis cDNA, penyesuaian data RT-PCR dan diakhiri dengan evaluasi hasil PCR. Pekerjaan RT-PCR dilakukan berurutan sesuai dengan alur prosesnya. Hal ini dimaksudkan untuk mencegah dan meminimalisasi kontaminasi yang dapat mempengaruhi *valid* atau tidaknya hasil PCR (VILJOEN *et al.*, 2005).

Metode Imunohistokimia (IHK)

Jenis sampel yang biasanya digunakan untuk pewarnaan histokimia adalah kulit pial dan jengger, otak, trakea, jantung, otot dada dan paha, paru-paru, proventrikulus, hati, limpa, usus, ginjal dan ovarium. Organ-organ tersebut dipotong dengan tebal sekitar 0,5 cm dan difiksasi dalam larutan formalin 10% yang sudah dibufer selama minimal 24 jam. Organ tersebut kemudian diproses menjadi blok parafin sesuai dengan metode standar. Pewarnaan imunohistokimia biasanya menggunakan metode avidin biotin peroksidase kompleks (ABC). Prinsip dari perwarnaan imunohistokimia untuk diagnosis *Avian Influenza* adalah preparat histopatologi (HP) diaplikasikan dengan antisera terhadap virus AI subtipe H5N1 yang sudah distandarisasi sebelumnya melalui *checker board titration*. Antisera H5N1 diaplikasikan dengan konsentrasi 1 : 2000 dan selanjutnya diberi antibodi sekunder yang sudah dilabel dengan biotin. Setelah itu streptavidin peroksidase diaplikasikan dan untuk memvisualisasikan antigen yang terdapat pada preparat HP maka ditambahkan substrat *amino ethyl carbazole* (AEC) yang berwarna coklat. Suatu preparat dinyatakan positif mengandung antigen virus *Avian Influenza* apabila antigen dapat dideteksi secara definitif pada area intra-nuklear (di dalam inti sel) atau intra-sitoplasmik (di dalam sitoplasma). Substrat yang dipakai yaitu AEC yang berwarna coklat maka antigen juga berwarna coklat, dengan latar belakang biru hematoksilin. Sebaliknya preparat dinyatakan negatif jika pada preparat tidak dapat dideteksi warna coklat pada sel definitif sehingga preparat secara difus berwarna biru saja (DAMAYANTI *et al.*, 2004).

Pewarnaan imunohistokimia memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan pewarnaan konvensional hematoksilin dan eosin (H&E) yaitu pewarnaan imunohistokimia mampu mendeteksi antigen virus, reaksi warna yang terjadi pada metode IHK ini tergolong cukup permanen sehingga tidak perlu dilihat dengan mikroskop fluoresens serta selain visualisasi antigen, jaringan organ yang terinfeksi dan derajat keparahan lesi dapat terlihat dengan jelas.

Namun demikian pewarnaan ini juga menuntut kualitas yang tinggi untuk reagen yang digunakan, yakni dimulai pada saat pengambilan sampel hingga saat pengujian (DAMAYANTI *et al.*, 2005).

Penelitian yang dilakukan DAMAYANTI *et al.* (2005) untuk mendeteksi antigen virus AI subtipe H5N1 secara imunohistokimia terhadap sampel yang berasal dari Provinsi Jawa Barat (Kabupaten Bogor, Bekasi, Cianjur dan Sukabumi), Provinsi Banten (Kabupaten Tangerang), Provinsi DKI Jakarta dan Provinsi Jawa Timur (Kabupaten Madiun, Tulung Agung, Blitar dan Kediri) antara bulan Juni 2004 hingga Februari 2005 menunjukkan bahwa dari jumlah total sebanyak 212 sampel unggas, 39 sampel (18,4%) dinyatakan positif mengandung antigen virus AI subtipe H5N1 (DAMAYANTI *et al.*, 2004).

PENCEGAHAN DAN PENGENDALIAN AVIAN INFLUENZA

Upaya-upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah penyebaran *Avian Influenza* diantaranya adalah pengamanan biologis yang ketat, pelaksanaan aspek-aspek manajemen untuk menghilangkan sumber infeksi secara optimal serta vaksinasi. Dalam hal ini, pengamanan biologis merupakan upaya pertahanan yang paling utama. Mengingat bahwa virus *Avian Influenza* di luar tubuh induk semang mempunyai sifat mudah diinaktivasi oleh deterjen, formalin, beta-propiolakton, eter, hidrosilamin, ion-ion ammonium, panas, pH terlalu tinggi, kondisi non-isotonik dan kekeringan. Sifat yang dimiliki virus ini juga merupakan salah satu faktor yang mendukung program pertahanan pada unggas melalui pengamanan biologis menjadi lebih efektif. Sedangkan upaya pertahanan melalui vaksinasi akan memperoleh hasil yang lebih efektif apabila diikuti dengan pengamanan biologis yang ketat (EID, 2006).

Pedoman untuk pencegahan, pengendalian dan pemberantasan *Avian Influenza* secara lengkap telah ditetapkan oleh *World Organization for Animal Health* (OIE) dan *World Health Organization* (WHO) yang digunakan sebagai acuan program pencegahan, pengendalian dan pemberantasan *Avian Influenza* di seluruh dunia (EID, 2006). Pemerintah Indonesia melalui Dirjen Bina Produksi Peternakan No. 17/Kpts/PD.640/F/02.04 juga telah menetapkan langkah-langkah strategis untuk pencegahan, pengendalian dan pemberantasan *Avian Influenza* di Indonesia. Langkah-langkah strategis itu meliputi peningkatan biosekuriti, depopulasi, vaksinasi, pengendalian lalu lintas, surveilan, *restocking*, peningkatan kesadaran masyarakat, monitoring dan evaluasi (SYUKUR, 2006).

KESIMPULAN

1. Karakterisasi dan identifikasi virus *Avian Influenza* dilakukan melalui uji laboratorium dan harus mengacu pada standar prosedur OIE.
2. Terdapat dua macam metode karakterisasi dan identifikasi *Avian Influenza* secara laboratorium yaitu metode konvensional (aspek virologi) dan metode molekuler.
3. Metode konvensional (aspek virologi) biasanya digunakan untuk diagnosis awal *Avian Influenza*. Metode ini membutuhkan lebih banyak waktu dan biaya.
4. Metode molekuler merupakan metode yang lebih efektif daripada metode konvensional sehingga metode ini sekarang lebih sering diaplikasikan di laboratorium diagnostik.

DAFTAR PUSTAKA

- BECK, J.R., D.E. SWAYNE, S. CASAVANT dan C. GUTIERREZ. 2003. Validation of egg yolk antibody testing as a method to determine influenza status in White Leghorn Hens. *Avian Dis.* 47: 1196 – 1199.
- BURGESS, G.W. 1988. Basic Principle of ELISA and Variations in configuration. *ELISA Technology in Diagnostic Research*. Graduate School of Tropical Veterinary Science James Cook University of North Queensland Townsville, Australia. pp. 27 – 36.
- CHAN, K.H., N. MALDEIS, W. POPE, A. YUP, A. OZINSKAS, J. GILL, W.H. SETO, K. F. SHORTRIDGE and J.S.M. PEIRIS. 2002. Evaluation of The Direction Flu A and B Test for Rapid Diagnosis of Influenza Virus Type A and B Infections. *American Society for Microbiology*. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi/artid=130655>. (23 Februari 2002).
- DAMAYANTI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan DARMINTO. 2004. Deteksi virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 pada organ ayam yang terserang flu burung sangat patogenik di Jawa Timur dan Jawa Barat dengan teknik imunohistokimia. *JITV* 9(3): 197 – 203.
- DAMAYANTI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan R.M.A. ADJID. 2005. Monitoring kasus penyakit *Avian Influenza* berdasarkan deteksi antigen virus subtipe H5N1 secara imunohistokimia. *JITV* 10(4): 322 – 330.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. DAMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI dan DARMINTO. 2004. Identifikasi virus *Avian Influenza* isolat Indonesia dengan *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). *JITV* 9(2): 136 – 142.
- DIAMOND, L., R. GARTEN, R.J.P. ERICKSON, J. KUMM, R.O. DONIS and R.W. DAVIS. 2006. Rapid and Highly Informatif Diagnostic Assay for H5N1 Influenza Viruses. <http://www.google.co.id/search/hl=id=Rapid+and+Informatif+Diagnostik+Assay+for+H5N1+Influenza+Viruses&btnG=Telusur&meta=> (6 Februari 2006).
- EMERGING INFECTION DISEASES (EID). 2006. Control of Avian Influenza in Poultry. <http://www.vetcite.org/publish/items/003162/idex.html>. (12 September 2006).
- HALMINTON and. DISTRICT BUDGERIGAR SOCIETY INC. 2007. Avian Flu. <http://www3.sympatico.ca/davehansen/avianflu.html>. (20 Januari 2007).
- HARDER, T.C. and O. WERNER. 2006. Avian Influenza. <http://www.influenzareport.com/ir/ai.htm>. (6 Januari 2006).
- INDRIANI, R. dan N.L.P.I. DHARMAYANTI. 2006. Deteksi antibodi *Avian Influenza* dalam kuning telur ayam pascavaksinasi (AI) subtipe H5N1. *Media Kedokteran Hewan* 22: 84 – 88.
- KOMPAS CYBER MEDIA. 2007. Ibu dan Anaknya di Madiun Diduga Flu burung. <http://www.kompas.com/>
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). 2004. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal. World Organisation for Animal Health 4: 258 – 269.
- PESONA SCIENTIFIC. 2005. Avian Influenza A Virus Detection, Direct Molecular Detection Method, Polymerase Chain Reaction. Paper presented in the Workshop on Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. Indonesia – Netherlands. Bogor, 20 – 24 November 2006. BPMSOH and Animal Health Service Deventer, Netherland.
- QIAGEN. 2007. Critical factors for successful gene expression assays. <http://www1.qiagen.com/Products/Pcr/CriticalFactors.aspx>. (24 March 2007).
- RONOHARDJO, P. 1983. Penyakit cengesan sesama pada itik Tegal, Bali dan Alabio. *Penyakit Hewan* 15(25): 61 – 71.
- RONOHARDJO, P., S. HARDJOSWORO, S. PARTOATMOJO and M. PARTADIREDA. 1985. The identification and distribution of influenza A virus in Indonesia. *Penyakit Hewan XVII*(29): 249 – 257.
- RONOHARDJO, P., S. PARTOUTOMO, S. HASTIONO, N. GINTING and S. POERNOMO. 1986. The status of duck diseases in Indonesia. *Penyakit Hewan XVIII* (31): 86 – 93.
- SELLECK, P. 2007. Serological Tests for The Detection of Antibodies Against Avian Influenza. CSIRO Australian Animal Health Laboratory, Geelong, Australia.

- SUAREZ, D.L. 1997. Molecular diagnostic techniques: Can we identify influenza virus, differentiate subtype and determine pathogenicity potential of viruses by RT-PCR. Proc. of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Georgia Center for Continuing Education, The University of Georgia Athens, Georgia, USA. pp. 318 – 323.
- SULANDARI, S. dan M.S.A. ZEIN. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. hlm. 87 – 96.
- SYUKUR, D.A. 2006. Situasi Penyakit Flu Burung. http://www.disnakeswan-lampung.go.id/index.php?option=com_content&task=view&id=143&Itemid=9. (30 Desember 2006).
- TABBU, C.R. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya. Penerbit Kanisius, Yogyakarta 1: 232 – 244.
- TRANI, L.D., B.BEDINI, I. DONATELLI, L. CAMPITELLI, B. CHIAPPINI, M. A. DE MARCO, M. DELOGU, C. BUONAVOGLIA and G. VACCARI. 2005. A Sensitive One-Step Real Time PCR for Detection of Avian Influenza Viruses Using a MGB Probe and An Internal Positive Control. BioMed central Ltd. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/87>. (2 April 2005).
- VILJOEN, G.J., L.H.NELAND and J.R. CROWTHER. 2005. Molecular Diagnostic PCR Handbook. Published by Springer, Dodrecht, The Netherlands.
- WELLENBERG, G. 2006. Avian Influenza viruses: Detection methods. Paper presented in the Workshop on Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. Indonesia – Netherlands. Bogor, 20 – 24 November 2006. BPMSOH and Animal Health Service Deventer, Netherland.
- WRINGATI. 2006. Pengawasan dan diagnosa *Avian Influenza*. Bull. Veterinaria Farma 3(6): 16 – 19.
- YUWONO, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Penerbit Andi, Yogyakarta. hlm. 11 – 12.
- ZHOU, E.M., M. CHAN, R.A. HECKERT, J. RIVA and M.F. CANTIN. 1997. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for Avian Influenza serologic surveillance. Proc. of the Fourth International Symposium On Avian Influenza. Georgia Center for Continuing Education, The University of Georgia, Athens, Georgia, USA. pp. 305 – 312.