

Identifikasi Virus Avian Influenza Isolat Indonesia dengan Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

NLP. I. DHARMAYANTI, R. DAMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI dan DARMINTO

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16151

(Diterima dewan redaksi 16 Agustus 2004)

ABSTRACT

NLP. I. DHARMAYANTI, R. DAMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI and DARMINTO. Identification of avian influenza virus of Indonesian isolates by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method. *JITV* 9(2): 136-143.

An outbreak of avian influenza in Indonesia was reported at the first time at the beginning of September 2003 causing high mortality among poultry population especially commercial layer chicken farms in Java, Sumatra and Bali islands. From the outbreaks highly pathogenic avian influenza viruses have been isolated and characterized by *rapid*, HA, HI and AGP tests. However, these isolates are still needed to be further molecularly characterized. The aim of this study is to identify by further subtyping the avian viruses by means of RT-PCR using Matrix, H7 and H5 primers. The study reveals that the RT-PCR using Matrix primer amplified a 200-300 *basepairs* (bp) Jawa Timur isolates were collected from East Java, while Jawa Barat isolates were from West Java. The RT-PCR using H7 primers did not amplify any product, while H5 primer amplified a 500-600 bp product from the isolates. It is concluded that the outbreak of poultry disease in East and West Java was caused by an avian influenza H5 subtype.

Key words: Identification, avian influenza virus, RT-PCR, H5 subtype

ABSTRAK

NLP. I. DHARMAYANTI, R. DAMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI dan DARMINTO. Identifikasi virus avian influenza isolat Indonesia dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). *JITV* 9(2): 136-143.

Wabah penyakit avian influenza di Indonesia yang dilaporkan pada awal bulan September 2003 menimbulkan kematian yang sangat tinggi pada unggas terutama ayam petelur di Pulau Jawa, Sumatra dan Bali. Dari wabah tersebut telah berhasil diisolasi virus yang sangat patogen dan berdasarkan uji *rapid*, HA, HI dan AGPT diketahui merupakan virus avian influenza. Isolat tersebut perlu untuk dikarakterisasi lebih lanjut. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi yakni menentukan sub tipe isolat virus penyebab wabah di lapang dengan uji RT-PCR dengan menggunakan primer Matrix, H7 dan H5. Hasil uji RT-PCR dengan primer Matrix menunjukkan bahwa isolat yang berasal dari ayam petelur yaitu isolat Jawa Timur 1 dan isolat Jawa Timur 2, isolat Jawa Barat 1, Jawa Barat 2, Jawa Barat 3, Jawa Barat 4, Jawa Barat 5 dan Jawa Barat 6 dapat diamplifikasi dan menghasilkan amplicon sebesar 200-300 *basepairs* (bp). Sedangkan uji RT-PCR dengan primer H5 dan H7 menunjukkan bahwa semua isolat tidak teramplifikasi dengan primer H7 tetapi semua isolat dapat diamplifikasi dengan primer H5 dan menghasilkan amplicon sebesar 500-600 bp. Oleh karena itu disimpulkan bahwa wabah penyakit di Jawa Timur dan Jawa Barat yang telah banyak menimbulkan kematian pada unggas disebabkan oleh virus avian influenza dengan sub tipe H5.

Kata kunci: Identifikasi, virus avian influenza, RT-PCR, sub tipe H5

PENDAHULUAN

Virus influenza termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae* yang dapat menginfeksi beragam spesies termasuk unggas, babi, kuda, hewan air dan manusia (EASTERDAY *et al.*, 1997). Virus ini diklasifikasikan sebagai influenza A, B dan C berdasarkan pada perbedaan antigenik pada nucleoprotein (NP) dan protein matrix (M), dan avian influenza termasuk dalam tipe A. Selanjutnya subtyping ditetapkan berdasarkan antigenisitas pada dua buah glikoprotein permukaan yaitu, hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Terdapat sebanyak 15 sub tipe HA dan 9 sub tipe NA yang diidentifikasi pada influenza A

(MURPHY dan WEBSTER, 1996). Lebih jauh sekuen asam amino pada daerah HA1 bertanggung jawab terhadap antigenisitas HA, sedangkan perbedaan diantara sub tipe adalah sekitar 30% (ROHM *et al.*, 1996). Virus avian influenza dengan semua sub tipe ditemukan pada spesies unggas, sedangkan pada mamalia hanya 3 sub tipe HA yaitu sub tipe H1, H2, H3 dan 2 sub tipe NA yaitu N1 dan N2. Dari 15 sub tipe HA hanya virus influenza sub tipe H1, H2 dan H3 yang sebelumnya pernah menyebabkan penyakit dan kematian pada manusia (WELLS *et al.*, 1981; MURPHY dan WEBSTER, 1996; HARIMOTO dan KAWAOKA, 2001).

Virus avian influenza yang dapat menyebabkan pandemi pada manusia, yakni terjadi pada saat

reassortant yang menyebabkan gen hemagglutinin (HA) pada strain manusia digantikan gen allelic dari virus avian influenza A. Hal ini pernah terjadi pada tahun 1957 dan 1958 (KAWAOKA *et al.*, 1989). Dilaporkan bahwa strain virus influenza pada manusia berasal dari strain virus influenza dari unggas setelah berevolusi pada induk semang mamalia perantara (GORMAN *et al.*, 1992). Pada tahun 1997 virus avian influenza A yang sangat identik dengan *highly pathogenic* (HP) subtipe H5N1 telah diisolasi dari penyakit yang menyerang ayam dan anak-anak yang sakit di Hongkong (ANONIMOUS, 1998; SUBBARAO *et al.*, 1998). Virus avian influenza HP H5 telah diisolasi sebelumnya dari wabah influenza pada peternakan (PERDUE *et al.*, 1997; SWAYNE *et al.*, 1997; SHORTRIDGE *et al.*, 1998; CAPULLA *et al.*, 1999). Hal ini dicatat sebagai kasus yang pertama tentang infeksi virus avian influenza H5 langsung pada manusia tanpa terlebih dulu beradaptasi pada induk semang perantara mamalia. Untuk menetapkan virus avian influenza sebagai HP berdasarkan pada *intravenous pathogenicity index* (IVPI) isolat virus dan sekuen asam amino pada *cleavage site* HA (WOOD *et al.*, 1993).

Di Indonesia pada awal September 2003 hingga April 2004 telah terjadi wabah penyakit menular pada unggas yang menimbulkan kematian yang sangat tinggi terutama pada ayam petelur di Pulau Jawa, Sumatra dan Bali. Berdasarkan hasil pemeriksaan lapang, gejala klinis dan patologik (DAMAYANTI *et al.*, 2004a) dan imunohistokimia (DAMAYANTI *et al.*, 2004b) wabah tersebut didiagnosa sebagai wabah avian influenza HP. Dari wabah tersebut telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dengan menggunakan serum positif avian influenza sebagai virus avian influenza subtipe H5 (WIYONO *et al.*, 2004). Tujuan tulisan ini adalah untuk memaparkan hasil identifikasi dan karakterisasi virus avian influenza dengan cara menentukan subtipe isolat dengan uji RT-PCR.

MATERI DAN METODE

Isolat virus avian influenza

Isolat virus yang digunakan dalam tulisan ini adalah lima isolat yang telah diisolasi dari wabah tahun 2003 pada penelitian sebelumnya, yaitu dua isolat Jawa Timur (WIYONO *et al.*, 2004), tiga isolat Jawa Barat (SYAFRIATI *et al.*, 2003; data tidak dipublikasi) dan empat isolat virus yang berasal dari wabah tahun 2004 (INDRIANI dan DHARMAYANTI, 2004; data tidak dipublikasi). Kesembilan jenis isolat virus AI tersebut berasal dari Propinsi Jawa Timur dan Jawa Barat. Isolat dari Jawa Timur terdiri dari isolat Jawa Timur 1 berasal dari organ proventrikulus dan isolat Jawa Timur 2 berasal dari *swab* trakhea. Isolat dari Jawa Barat terdiri dari isolat Jawa Barat 1–5 berasal dari organ trakhea,

isolat Jawa Barat 6 berasal dari organ intestin, isolat DKI berasal dari campuran beberapa organ (Tabel 1).

Sampel

Sampel yang digunakan berupa cairan alantois yang diinfeksi isolat virus AI yang diperoleh pada bulan Oktober 2003 sampai Maret 2004 yang berasal dari daerah Jawa Timur dan Jawa Barat (WIYONO *et al.*, 2004; SYAFRIATI *et al.*, 2003; data tidak dipublikasi; INDRIANI dan DHARMAYANTI, 2004; data tidak dipublikasi). Sebagai bagian dari kontrol kualitas terhadap RT-PCR AI digunakan pula isolat virus *Newcastle Disease* (galur RIVS dan ITA) dan virus *Infectious Bronchitis* (serotipe I-37) sehingga spesifisitas *primer* avian influenza dapat diketahui.

Ekstraksi RNA virus

Ekstraksi RNA dilaksanakan dengan menggunakan *Trizol reagent*[®] yang tersedia secara komersial (*Life Technology*) dan dengan menggunakan metode sesuai instruksi pembuatan dengan modifikasi. Sebanyak 250 µl sampel cairan alantois yang diinfeksi dengan virus avian influenza dicampur dengan 750 µl *Trizol reagent* dalam tabung *microfuge* 1,5 ml dan dicampur hingga homogen sebelum diinkubasi selama 5 menit pada temperatur ruang. Kemudian larutan ditambah dengan kloroform sebanyak 200 µl, dan dicampur hingga homogen lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu larutan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan dipisahkan serta ditempatkan pada tabung baru. Setelah itu ditambahkan isopropanol (Sigma) sebanyak 500 µl, dan dicampur hingga homogen dan diinkubasi selama 10 menit. Setelah campuran diinkubasi, selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Pelet yang terbentuk dicuci dengan etanol-DEPC-dH₂O 70% dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Setelah campuran disentrifugasi, etanol-DEPC-dH₂O 70% dibuang dengan hati-hati supaya pelet RNA yang terbentuk tidak ikut terambil. Pelet RNA dikeringkan pada suhu ruang selama 15-20 menit sebelum diresuspensi dengan 10 µl *RNase-free water*. Suspensi RNA ini dapat langsung digunakan untuk sampel pada pengujian RT-PCR atau dapat disimpan pada -20°C sampai digunakan. Ekstraksi RNA dengan cara yang sama juga dilakukan terhadap virus ND dan IB karena kedua virus tersebut juga mempunyai materi genetik RNA.

Primer AI

Pada penelitian ini digunakan tiga macam *primer* virus avian influenza yaitu: (1) untuk mengamplifikasi gen Matrix digunakan *primer* M52C dan M253R sesuai

dengan FOUCHIER *et al.* (2000); (2) Untuk melakukan subtiping H5 digunakan primer H5-155f dan H5-699r (LEE *et al.*, 2001); dan (3) Untuk melakukan subtiping H7 digunakan primer H7-12f dan H7-645r sesuai dengan LEE *et al.* (2001). Primer gen Matrix dibuat dari Cybergene sedangkan primer H5 dan H7 dibuat dari Prologo. Berikut ini susunan sekuen primer yang digunakan :

Primer	Sekuen	Pustaka
M52C	CTTCTAACCGAGGTCGAAACG	FOUCHIER <i>et al.</i> (2000)
M253R	AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA	FOUCHIER <i>et al.</i> (2000)
H5-155f	ACACATGCYCARGACATACT	LEE <i>et al.</i> (2001)
H5-699r	CTYTGRTTYAGTGTGATGT	LEE <i>et al.</i> (2001)
H7-12f	GGGATACAAAATGAAYACTC	LEE <i>et al.</i> (2001)
H7-645r	CCATABARYYTRGCTCTGYTC	LEE <i>et al.</i> (2001)

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *Superscript One Step RT-PCR System* (Invitrogen) sesuai dengan instruksi penggunaan dengan mesin *Hybaid Termal Cycler*.

RT-PCR untuk gen matrix

Pada tahap awal, semua isolat dilakukan pengujian RT-PCR dengan primer Matrix dengan konsentrasi 20 pmol/ μ l (FOUCHIER *et al.*, 2000) dan sampel RNA sebanyak 10 μ l. Program RT-PCR yang digunakan untuk primer Matrix adalah sebagai berikut 42°C selama 30 menit (*reverse transcriptase*), 95°C selama 4 menit sebanyak satu kali, dan kemudian 95°C selama 1 menit (denaturasi), 45°C selama 1 menit (*annealing*) dan 72° selama 3 menit (ekstensi) sebanyak 40 kali (FOUCHIER *et al.*, 2000).

RT-PCR untuk subtiping H5 dan H7

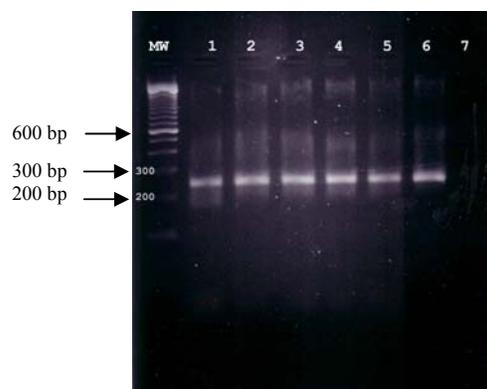
Jika hasil reaksi RT-PCR dengan primer Matrix menunjukkan 7 hasil positif avian influenza yaitu terdapat ampikon sebesar 200-300 pasang basa (*base pairs* = bp), maka dilanjutkan dengan pengujian RT-PCR dengan primer H7 dan H5 dengan konsentrasi 40 pmo/ μ l. Program RT-PCR yang digunakan untuk primer H5 dan H7 adalah sebagai berikut: kondisi reaksi RT pada suhu 42°C selama 45 menit dan 95°C selama 3 menit. Sedangkan kondisi reaksi PCR untuk denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 40 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 40 detik, diikuti dengan *final elongation* pada suhu 72°C selama 10 menit (LEE *et al.*, 2001).

HASIL

Hasil uji HA, HI dan AGID yang dilakukan pada isolat Jawa Timur 1, Jawa Timur 2, Jawa Barat 1, Jawa Barat 2 dan Jawa Barat 3 (WIYONO *et al.*, 2004; SYAFRIATI *et al.*, 2003; data tidak dipublikasi) menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh menunjukkan hasil bahwa isolat yang diperoleh adalah isolat virus hemagglutinasin bukan *Newcastle Disease* (ND). Sedangkan isolat Jawa Barat 5, isolat Jawa Barat 6 dan DKI 1 (INDRIANI dan DHARMAYANTI, 2004; data tidak dipublikasi) juga menunjukkan hasil yang sama dengan isolat-isolat virus AI sebelumnya.

Hasil pengujian RT-PCR

Hasil uji RT-PCR dengan primer Matrix menunjukkan bahwa isolat Jawa Timur 1, Jawa Timur 2, isolat Jawa Barat 1, Jawa Barat 2, Jawa Barat 3, Jawa Barat 4, Jawa Barat 5, Jawa Barat 6 dan DKI 1 dapat diamplifikasi dan menghasilkan ampikon pada posisi 200-300 (bp) sesuai dengan FOUCHIER *et al.* (2000) yang telah mengembangkan primer Matrix ini (Gambar 1 dan 2). Primer ini terbukti spesifik untuk avian influenza karena tidak mengamplifikasi sampel RNA yang diekstraksi dari virus *Newcastle Disease* (ND) galur Ita, ND galur RIVS dan virus *Infectious Bronchitis Connecticut* (Conn) (Gambar 2).



Gambar 1. Hasil amplifikasi dengan primer matrix avian influenza. Lubang MW adalah *molecular weight* 100 bp, lubang nomor 1 adalah isolat Jawa Timur 1, lubang nomor 2 adalah isolat Jawa Timur 2, lubang nomor 3 adalah isolat Jawa Barat 1, lubang nomor 4 adalah isolat Jawa Barat 2, lubang nomor 5 adalah isolat Jawa Barat 3, lubang nomor 6 adalah isolat Jawa Barat 4, lubang nomor 7 adalah kontrol negatif primer Matrix virus AI. Besar ampikon adalah sekitar 200-300 bp



Gambar 2. Hasil amplifikasi dengan primer matrix avian influenza. Lubang MW adalah *molecular weight* 100 bp, lubang nomor 1 adalah isolat Jawa Barat 5, lubang nomor 2 adalah isolat Jawa Barat 6, lubang nomor 3 adalah isolat DKI 1, lubang nomor 4 adalah kontrol negatif primer Matrix virus AI, lubang nomor 5 adalah virus ND galur Ita, lubang nomor 6 adalah virus ND galur RIVS, lubang nomor 7 adalah virus IB Connecticut. Besar amplicon adalah sekitar 200-300 bp

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa semua isolat yang diuji adalah virus avian influenza. Dari 15 subtipe HA dari virus avian influenza hanya H5 dan H7 yang sangat virulen pada ayam (ALEXANDER, 1995).

Pengujian dilakukan sesuai urutan identifikasi virus avian influenza yaitu jika positif dengan primer Matrix dilanjutkan dengan primer H7, jika dengan primer H7 hasilnya negatif maka pengujian dilanjutkan dengan primer H5. Pada penelitian ini diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa dengan primer Matrix diperoleh amplicon 200-300 bp, dipastikan bahwa isolat lapang yang diperoleh adalah virus avian influenza. Pengujian dilanjutkan dengan menggunakan primer H7 dan hasil RT-PCR menunjukkan bahwa semua isolat tidak teramplifikasi dengan primer ini. Sehingga pengujian dilanjutkan dengan menggunakan primer H5.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dugaan wabah yang disebabkan oleh virus avian influenza dapat dibuktikan yaitu dengan telah berhasil diidentifikasi dan ditentukan subtipenya berdasarkan metode *reverse transcriptase polimerase chain reaction* (RT-PCR). Hasil menunjukkan bahwa semua isolat yaitu 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 1 adalah virus avian influenza dengan subtipe H5 (Tabel 1).

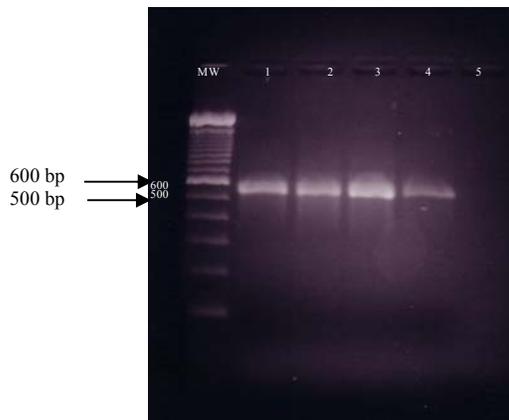
Hasil pengujian dengan primer H5 dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4 dimana dari delapan isolat yang diuji, semua isolat menunjukkan adanya amplicon pada posisi sekitar 500-600 bp, sesuai dengan LEE *et al.* (2001).

Tabel.1. Rekapitulasi nama isolat, asal organ, daerah dan hasil pengujian RT-PCR yang telah dilakukan

Nama isolat	Asal daerah	Asal organ	Induk semang	Isolasi virus	RT-PCR Matrix	RT-PCR H7	RT-PCR H5
Jawa Timur 1	Blitar	Proventrikulus	Ayam petelur	Positif	Positif	Negatif	Positif
Jawa Timur 2	Blitar	Swab trakhea	Ayam Petelur	Positif	Positif	Negatif	Positif
Jawa Barat 1	Bogor	Trakhea	Ayam Petelur	Positif	Positif	Negatif	Positif
Jawa Barat 2	Bogor	Trakhea	Ayam Petelur	Positif	Positif	Negatif	Positif
Jawa Barat 3	Bekasi	Trakhea	Ayam Petelur	Positif	Positif	Negatif	Positif
Jawa Barat 4	Sukabumi	Trakhea	Ayam Bibit	Negatif	Positif	Negatif	Positif
Jawa Barat 5	Sukabumi	Trakhea	Puyuh	Positif	Positif	Negatif	Positif
Jawa Barat 6	Bogor	Intestine	Burung Onta	Positif	Positif	Negatif	Positif
DKI 1	DKI	Campuran organ	Ayam Layer	Postif	Positif	Negatif	Positif



Gambar 3 Hasil amplifikasi dengan primer H5 avian influenza. Lubang MW adalah *molecular weight* 100 bp, lubang nomor 1 adalah isolat Jawa Timur 1, lubang nomor 2 adalah isolat Jawa Timur 2, lubang nomor 3 adalah isolat Jawa Barat 1, lubang nomor 4 adalah isolat Jawa Barat 2, lubang nomor 5 adalah isolat Jawa Barat 3, lubang nomor 6 adalah kontrol negatif primer H5. Besar amplikon adalah sekitar 500-600 bp.



Gambar 4. Hasil amplifikasi dengan primer H5 avian influenza. Lubang MW adalah *molecular weight* 100 bp, lubang nomor 1 adalah isolat Jawa Barat 4, lubang nomor 2 adalah isolat Jawa Barat 5, lubang no 3 adalah isolat Jawa Barat 6 lubang nomor 4 adalah isolat DKI 1, lubang nomor 5 adalah kontrol negatif primer H5. Besar amplikon adalah sekitar 500-600 bp.

PEMBAHASAN

Pengujian *hemagglutination*, *hemagglutination inhibition* (HI) dan AGID adalah metode diagnostik yang rutin dilakukan untuk mendeteksi dan subtyping virus influenza A (OIE, 2000). Namun demikian penggunaan teknik molekular yang secara langsung dapat mendeteksi virus dalam cairan allantois yang telah diinfeksi membuat identifikasi dan karakterisasi genetik virus influenza A termasuk avian influenza menjadi cepat dan akurat (OIE, 2000).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik yang mempunyai banyak kelebihan dalam mengidentifikasi genom, termasuk dalam hal ini genom virus avian influenza, ketika virus tidak dalam jumlah yang banyak. Hal ini terjadi pada isolat Jawa Barat 4. Pada isolat Jawa Barat 4, setelah ditanam di telur embrio bertunas, cairan allantois yang dipanen gagal untuk menunjukkan aktivitas HA. Menurut SWAYNE *et al.* (1997) hal ini biasanya dikarenakan kandungan virus yang sangat sedikit. Untuk dapat menunjukkan aktivitas HA biasanya membutuhkan 10^3 - 10^6 EID₅₀/ml. Untuk itu, isolat tersebut dipasase lebih lanjut agar hasil isolasi tidak hilang karena sedikitnya virus dalam sampel. Dalam kasus-kasus seperti inilah peran biologi molekuler sangat dibutuhkan. Untuk memastikan uji ini dilanjutkan dengan karakterisasi isolat virus secara molekular biologi yaitu dengan RT-PCR perlu dilakukan.

Genom virus avian influenza adalah *single-strand* RNA (EASTERDAY *et al.*, 1997) sehingga pada reaksi PCR dibutuhkan sintesa sebuah kopi DNA (cDNA) yang berkomplementar dengan RNA virus. *Reverse Transcriptase* (RT) adalah enzim polimerase yang digunakan untuk mensintesa cDNA. Sehingga reaksinya disebut RT-PCR. Metode RT-PCR sudah banyak digunakan untuk mendiagnosa adanya virus avian influenza, biasanya metode ini akan dilanjutkan dengan sekuensing DNA untuk melihat lebih jauh tentang karakter molekuler virus ini, seperti mutasi virus, hubungan kekerabatan dan untuk rekayasa genetik lainnya. Pada tulisan yang ditulis FOUCHIER *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2001; WEBSTER *et al.*, 2002; DONATELLI *et al.*, 2002; HIEN *et al.*, 2004) menyebutkan penggunaan RT-PCR dalam mendiagnosa virus avian influenza. WRIGHT *et al.* (1995) dan STOCKON *et al.* (1998) menggunakan RT-PCR untuk membedakan virus avian influenza subtipe H1 dengan H3 atau membedakan virus avian influenza N1 dari N2 (STOCKON *et al.*, 1998). RT-PCR selanjutnya diikuti oleh analisis sekuen asam amino dari *cleavage site* gen HA yang digunakan untuk menentukan secara cepat potensi virulensi virus H5 dan H7 pada unggas (HARIMOTO dan KAWAOKA, 1995; SENNE *et al.*, 1996).

CLAAS *et al.* (1993) dan YUEN *et al.* (1998) menyatakan bahwa PCR memberikan alternatif yang cepat dan efektif pada isolasi virus untuk mendeteksi virus influenza A. LEE *et al.* (2001) dalam tulisannya menyatakan bahwa RT-PCR memberikan hasil yang sangat konsisten dengan metode serologikal dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan subtiping HA virus avian influenza langsung dari homogenat organ.

Untuk sensitivitas dan spesifitas RT-PCR, pemilihan sekuen primer adalah merupakan satu hal yang sangat penting. Pada tulisan ini, pasangan primer spesifik yang digunakan dalam reaksi RT-PCR dirancang berdasarkan sekuen yang diketahui sebelumnya (FOUCHIER *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2001). Primer Matrix disusun berdasarkan daerah *conserved* pada gen matrix, yang telah dirancang untuk *single-tube reverse transcription-PCR* untuk mendeteksi virus influenza A dari berbagai spesies (FOUCHIER *et al.*, 2000). Pasangan primer yang spesifik untuk gen hemagglutinin (HA) biasanya berhubungan dengan virus avian influenza yang digunakan (LEE *et al.*, 2001). Primer H5 yang digunakan pada tulisan ini adalah primer spesifik yang didisain untuk mengamplifikasi gen HA virus avian influenza sub tipe H5, demikian juga dengan primer H7, yang didisain untuk mengamplifikasi gen HA sub tipe H7 (LEE *et al.*, 2001). LEE *et al.* (2001) telah merancang primer-primernya avian influenza sub tipe H1 sampai H15, untuk subtiping virus avian influenza dengan menggunakan RT-PCR yang didasarkan atas sekuen *conserved* pada gen HA1.

Tulisan ini telah menunjukkan bahwa dengan teknik RT-PCR, virus avian influenza dapat secara cepat dideteksi dalam cairan alantois yang telah diinfeksi dengan isolat virus penyebab wabah di lapangan, sehingga dengan tepat sudah dapat diketahui sekaligus meneguhkan diagnosis sebelumnya (WIYONO *et al.*, 2004; DAMAYANTI *et al.*, 2004a; DAMAYANTI *et al.*, 2004b; INDRIANI *et al.*, 2004) bahwa penyebab wabah yang telah banyak menimbulkan kematian pada unggas adalah virus avian influenza sub tipe H5.

Penelitian ini telah memberikan kontribusi nyata pada diagnosis dan subtiping isolat-isolat virus AI di Indonesia, namun demikian penelitian lebih lanjut masih diperlukan terutama untuk dapat mengetahui sub tipe gen NA dari virus AI di Indonesia, yakni dilakukan sekuensing DNA dan melaksanakan penelitian dinamika virus.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, wabah penyakit unggas di Jawa Timur dan Jawa Barat yang telah banyak menimbulkan kematian pada unggas disebabkan oleh virus avian influenza dengan sub tipe H5.

SARAN

Untuk melengkapi karakter molekuler virus influenza sub tipe H5, mengetahui sekuen *cleavage site* dan hubungan kekerabatan virus avian influenza isolat Indonesia dengan isolat avian influenza lainnya akan dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan sekuensing DNA dan analisis informasi genetik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Nana Suryana, Bapak Agus Winarsongo, Bapak Heri Hoerudin, Bapak Kusmaedi, atas bantuan teknisnya dan semua pihak yang telah terlibat dan banyak membantu pada penelitian ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

DAFTAR PUSTAKA

- ANONIMOUS. Centers for Disease Control and Prevention. 1998. Update: isolation of avian influenza A (H5N1) viruses from human-Hongkong, 1997-1998. morbid. *Mortal. Weekly Rep.* 46: 1245-1247.
- ALEXANDER, D. J. 1995. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J. Comp. Pathol.* 112: 105-126.
- CAPULA, I., S. MARANGON, L. SELLI, D.J. ALEXANDER, D.E. SWAYNE, M.D. POZZA, E. PARENTI and F.M. CANCELOTTI. 1999. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza (H5N2) in Italy during October 1997 to January 1998. *Avian Pathol.* 28: 455-460.
- CLAAS, E.C., A.J. VAN MILAAN, M.J. SPRENGER, M. RUITENSTUIVER, G.I. ARRON, P.H. ROTHBARTH and N. MASUREL. 1993. Prospective application of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosing influenza infection in respiratory samples from a children's hospital. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2218-2221.
- DAMAYANTI, R, NLP. I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan DARMINTO. 2004a. Deteksi virus avian influenza sub tipe H5N1 pada organ ayam yang terserang flu burung sangat patogenik di Jawa Timur dan Jawa Barat dengan teknik imunohistokimia. *JITV* 9: 202-208.
- DAMAYANTI, R, NLP. I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO and DARMINTO. 2004b. Gambaran klinis dan patologi ayam yang terserang flu burung sangat patogenik (HPAI) di beberapa peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat. *JITV* 9: 128-135.
- DONATELLI, I., L. CAMPITELLI, L.D. TRANI, S. PUZZELLI, L. SELLI, A. FIORETTI, D.J. ALEXANDER, M. TOLLIS, S. KRAUSS and R.G. WEBSTER. 2002. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian poultry. *J. Gen. Virol.* 2001: 635-630.

- EASTERDAY, B.C., V.S. HINSHAW and D.A. HALVORSON. 1997. Influenza, diseases of poultry. *In: Disease of Poultry*, 9th ed. B.W. CALNEK, H.J. BARNES, C.W. BEARD, L.R. MCDUGALD and Y.M. SAIF (Eds.). Ames, Iowa State University Press. pp. 583-605.
- FOUCHIER, R.A.M., T.M. BESTEBROER, S. HERFST, L. VAN DER KEMP, G.F. RIMMELZWAAN and A.D.M.E. OSTERHAUS. 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.* 38. 11: 4096-4101.
- GORMAN, O.T., W.J. BEAN and R.G. WEBSTER. 1992. Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution and stasis. *Curr. Top. Microbiol.* 172: 75-97.
- HARIMOTO, T. and Y. KAWAOKA. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 129-149.
- HARIMOTO, T. and Y. KAWAOKA. 1995. Direct reverse transcriptase RT-PCR to determine virulence potential of influenza A viruses in birds. *J. Clin. Microbiol.* 33: 748-751.
- HIEN, T.T., N.T. LIEM, N.T. DUNG, L.T. SAN, T.T. MAI, N.V.V. CHAU, P.T. SUU, V.C. DONG, L.T. MAI, N.T. THI, D.B. KHOA, L.P. PHAT, N.T. TRUONG, H.T. LONG, L.T. GIANG, N.D. THO, N.T.K. TIEN, L.H. SAN, L.V. TUAN, C. DOLECEK, T.T. THANH, M.D. JONG, C. SCHULTZ, P. SHENG, W. LIM and P. HORBY. 2004. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *New Eng. J. Med.* 350: 1179-1188.
- HORIMOTO, T., E. RIVERA, J. PEARSON, D. SENNE, S. KRAUSS, Y. KAWAOKA and R.G. WEBSTER. 1995. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology.* 213: 223-230.
- INDRIANI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI, A. WIYONO, DARMINTO, L. PAREDE and T. SYAFRIATI. 2004. Respon antibodi dengan uji hemaglutinasi inhibisi dan titer proteksi terhadap virus avian influenza subtipe H5N1. *JITV* 9: 209-215.
- KAWAOKA, Y., C.W. KRAUSS and R.G. WEBSTER. 1989. Avian-to-human-transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* 63: 4603-4608.
- MURPHY, B.R. and R.G. WEBSTER. 1996. Orthomyxoviruses. *In: Fields Virology*, 3rd ed. B.N. FIELDS, D.M. KNIPE, P.M. HOWLEY (Eds.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 1397-1445.
- LEE, M.S., P.C. CHANG, J.H. SHIEN, M.C. CHENG and H.P. SHIEH. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods.* 97: 13-22.
- OIE. 2000. Manual of Standards for Diagnostik Tests and Vaccines. OIE, Paris. pp. 212-219.
- PERDUE, M.L., M. GARCIA, D. SENNE and M. FRAIRE. 1997. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res.* 49: 173-186.
- ROHM, C., N. ZHOU, S. SUSS, J. MACKENZIE and R.G. WEBSTER. 1996. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: Criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 15: 508-516.
- SENNE, D.A., B. PANIGRAHY, Y. KAWAOKA, J.E. PEARSON, J. SUSS, M. LIPKIND, H. KIDA and R.G. WEBSTER. 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.
- SHORTTRIDGE, K.F., N.N. ZHOU, Y. GUAN, P. GAO, T. ITO, Y. KAWAOKA, S. KODIHALLI, S. KRAUSS, D. MARKHILL, G. MURTI, M. NORWOOD, D. SENNE, L. SIMS, A. TAKADA and R.G. WEBSTER. 1998. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hongkong. *Virology* 252: 331-342.
- STOCKTON, J., J.S. ELLIS, M. SAVILLE, J.P. CLEWLWY, M.C. JAMBON. 1998. Multiplex RT-PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2990-2995.
- SUBBARAO, K., A. KLIMOV, J. KATZ, H. REGNER, W. LIM, H. HALL, M. PERDUE, D. SWAYNE, C. BENDER, J. HUANG, M. HEMPHILL, T. ROWE, M. SHAW, X. XU, K. FUKUDA and N. COX. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279: 393-396.
- SWAYNE, D.E., M.L. PERDUE, M. GARCIA, E. RIVERA-CRUZ and M. BRUGH. 1997. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican avian influenza viruses in chickens. *Avian Dis.* 41: 335-346.
- WEBSTER, R.G., Y. GUAN, M. PEIRIS, D. WALKER, S. KRAUSS, N.N. ZHOU, E.A. GOVORKOVA, T.M. ELLIS, K.C. DYRTING, T. SIT, D.R. PEREZ and K.F. SHORTTRIDGE. 2002. Characterization of H5N1 influenza virus that continue to circulate in Geese in Southeastern China. *J. Virol.* 76: 118-126.
- WELLS, M.A., P. ALBRECHT and F.A. ENNIS. 1981. Recovery from a viral respiratory infection. I. Influenza pneumonia in normal and T-deficient mice. *J. Immunol.* 126: 1036-1041.
- WIYONO, A., R. INDRIANI, N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. DAMAYANTI dan DARMINTO. 2004. Isolasi dan karakterisasi virus *highly pathogenic avian influenza* subtipe H5 dari ayam asal wabah di Indonesia. *JITV* 9: 61-71.
- WOOD, G.W., J. W. MCCAULEY, J. B. BASHIRUDDIN and D.J. ALEXANDER. 1993. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch. Virol.* 130: 205-217.

- WRIGHT, K.E., G.A. WILSON, D. NOVOSAD, C. DIMOCK, D. TAN and J.M. WEBER. 1995. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by RT-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1180-1184.
- YUEN, K.Y., P.K. CHAN, M. PEIRIS, D.N. TSANG, T.L. QUE, K.F. SHORTRIDGE, P.T. CHEUNG, W.K. TO, E.T. HO, R.SUNG and A.F. CHENG. 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 351: 467-471.