

LAPORAN AKHIR
Incentif Riset SINas

Judul Topik Penelitian :

**Mekanisme Molekuler Penularan Virus Flu Burung H5N1 Dari
Manusia Ke Hewan**
(Model Transmisi Virus Flu Burung Pada Hewan Coba)

Bidang Prioritas Iptek :
Teknologi Kesehatan dan Obat

Kadek Rachmawati, drh., M.Kes.
Kholik, drh., M.Vet.
Ratnani Sri Hayati, drh

RD-2012-318

RUMAH SAKIT PUSAT TROPIK DAN INFEKSI
DIVISI INFLUENZA DAN ZONOSIS

Jalan Mulyorejo Kampus C Universitas Airlangga Surabaya 60115
Telp. 031-5992445-46/ 08123294525/kadekrachmawati@yahoo.co.id

LAPORAN AKHIR
Insentif Riset SINas

Judul Topik Penelitian :

**Mekanisme Molekuler Penularan Virus Flu Burung H5N1 Dari
Manusia Ke Hewan
(Model Transmisi Virus Flu Burung Pada Hewan Coba)**

**Bidang Prioritas Iptek :
Teknologi Kesehatan dan Obat**

**Kadek Rachmawati, drh.,M.Kes.
Kholik, drh.,M.Vet.
Ratnani Sri Hayati,drh**

RD-2012-318

**RUMAH SAKIT PUSAT TROPIK DAN INFEKSI
DIVISI INFLUENZA DAN ZONOSIS
Jalan Mulyorejo Kampus C Universitas Airlangga Surabaya 60115
Telp. 031-5992445-46/ 08123294525/kadekrachmawati@yahoo.co.id**


b. Lembar Identitas dan Pengesahan

1. Judul Penelitian : Mekanisme Molekuler Penularan Virus Flu Burung H5N Dari Manusia Ke Hewan (Model Transmisi Virus Flu Burung Pada Hewan Coba)
2. Bidang Ilmu : Teknologi Kesehatan dan Obat
3. Nama Peneliti : Kadek Rachmawati, drh., M.Kes
5. NIP : 196807251997022001
6. Institusi Tinggi Asal : RSPTI - Universitas Airlangga
9. Alamat : Jl Penjaringan IV no 42 Surabaya
10. No Telp / HP / Faks : (031) 8721325 / 08123294525 / -
Email : kadekrachmawati@yahoo.co.id
11. Lama Kegiatan : 2 tahun
12. Biaya yang diusulkan : Rp. 300.000.000,00

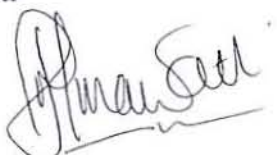
Surabaya, 5 Nopember 2012

Mengetahui,

Direktur Utama RSPTI


Prof. Dr. Boerhan Hidayat, dr., Sp.A(K)
NIP 19440912.197010.1.001

Peneliti


Kadek Rachmawati, drh., M.Kes.
NIP. 196807251997022001

Disahkan Oleh,
Ketua LPPM Unair



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si
NIP 19590805 198701 1 001

RINGKASAN

Avian influenza adalah penyakit viral pada unggas termasuk ayam dan unggas liar yang disebabkan oleh virus influenza tipe A. Selain pada unggas, virus avian influenza dapat pula menyerang mamalia termasuk manusia. Sejak tahun 2003 virus Avian Influenza sub tipe H5N1 telah menyebabkan wabah Flu Burung pada unggas dari tahun ke tahun. Bahkan virus Flu Burung sudah menyebabkan kasus pada manusia, dimana tidak kurang dari 399 orang telah dilaporkan terinfeksi virus Avian Influenza sub tipe H5N1 dan 251 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus Avian Influenza sub tipe H5N1 lebih dari 141 orang dan 115 orang diantaranya meninggal (WHO,2011). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nidom dkk (2006) menunjukan kucing yang berada di pasar wilayah Surabaya telah terinfeksi oleh virus Avian Influenza sub tipe H5N1 dan memiliki kemungkinan sebagai hospes perantara penularan virus Avian Influenza sub tipe H5N1 ke manusia. Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Revianny (2008) ditemukan 2 virus H5N1 pada ayam di pasar Surabaya tanpa menunjukkan gejala klinis. Virus Avian Influenza sub tipe H5N1 yang saat ini banyak menginfeksi ayam di Indonesia termasuk dalam *subclade* 2.1.3 yang memiliki kemampuan untuk menginfeksi hewan (unggas) dan manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakter molekuler virus Avian Influenza sub tipe H5N1 yang diisolasi dari lapangan serta menganalisis karakter molekuler genom virus Avian Influenza sub tipe H5N1 dan patogenisitas virus Avian Influenza sub tipe H5N1 yang diinfeksi pada hewan coba monyet dan ayam (model penularan virus AI H5N1 dari manusia ke hewan). Sampai dengan akhir penelitian sudah berhasil diperoleh sampel dari lapangan sebanyak 1.607 swab (865 swab ayam, 127 swab bebek, 94 swab burung puyuh, 178 swab kucing dan 343 swab babi). Hasil uji HA menunjukkan 83 sampel dari ayam dan 19 dari burung puyuh positif uji HA, sementara dari hasil uji RT-PCR ada 8 sampel dari ayam dan 1 sampel dari burung puyuh positif terhadap gen HA (H5). Berdasarkan analisis pohon filogenetik gen HA, semua virus yang diisolasi termasuk *subclade* 2.1.3. Sedangkan dari analisis pohon filogenetik gen HA, NA dan PB2, virus-virus yang berhasil diisolasi terbagi menjadi dua kelompok, dan berasal dari virus yang sudah bersirkulasi di Indonesia selama ini.

Kata Kunci :Virus , H5N1, transmisi, manusia, hewan

SUMMARY

The H5N1 avian influenza, commonly called “bird flu” is a viral disease on poultry including chickens and wild bird, caused by Influenza Virus type A. Since 2003, highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses have caused outbreaks among poultry in Indonesia every year, producing the highest number of human victims. In Indonesia, the number of people who have been infected with H5N1 viruses were 141 cases with 115 deaths. However, little is known about the H5N1 influenza viruses that have been circulating in Indonesia in recent years. We therefore conducted surveillance studies in some province in Indonesia, including Jakarta, West Java, East Java, East Kalimantan, South Kalimantan and Riau.

The purpose of this research was to analyzed molecular characteristic of H5N1 avian influenza viruses that isolated from field, and to analyzed molecular characteristic of H5N1 avian influenza virus genome that infected to laboratory animal including monkeys and chickens. Until now, we isolated eight H5N1 avian influenza viruses from chickens and one virus from quails. Phylogenic analysis of their hemagglutinin, neuraminidase and PB2 genes revealed that all nine viruses belonged to clade 2.1.3. However, on the basis of nucleotide differences, these viruses could be divided into two groups. Other viruses genetically closely related to these two groups of viruses were all Indonesian isolates, suggesting that these new isolates have been evolving within Indonesia. Among these viruses, two distinct viruses circulated in the Kalimantan island during the same season in 2012. Our data reveal the continued evolution of H5N1 viruses in Indonesia.

Keywords : H5N1 influenza virus, Indonesia, Phylogenic analysis, Genetic characterization

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami ucapkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulisan Laporan Akhir Program Riset Sinas dapat terselesaikan.

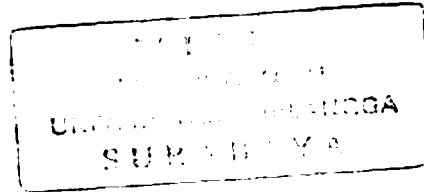
Maksud dan tujuan penulisan laporan ini untuk melaporkan kegiatan penelitian Program Riset Sinas yang telah kami lakukan mulai bulan April tahun 2012 melalui kegiatan surveilans virus Avian Influenza subtipe H5N1 di berbagai daerah di Indonesia seperti Jawa Timur, Jawa Barat, Tangerang, Banten, Jawa Tengah dan Kalimantan Timur untuk memperoleh sampel dari berbagai hewan seperti ayam, bebek, burung piaraan, kucing dan babi. Seperti diketahui virus Avian Influenza subtipe H5N1 telah menyerang ternak unggas di hampir seluruh wilayah Indonesia, termasuk juga telah menginfeksi manusia bahkan menimbulkan korban meninggal. Virus AI H5N1 sangat mudah bermutasi sehingga pemantauan virus melalui kegiatan surveilans setiap waktu sangat perlu dilakukan.

Kami mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi yang telah mendanai kegiatan riset kami, juga kepada Ketua LPPM Universitas Airlangga serta reviewer internal dari Universitas Airlangga yang telah banyak memberi masukan dalam penulisan laporan ini.

Demikian semoga penulisan laporan ini juga dapat bermanfaat bagi yang membaca.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR SINGKATAN	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan masalah	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Struktur Virus Avian Influenza	4
2.2. Sifat Virus Flu Burung	5
2.3 Penularan Virus Avian Influenza	6
2.4. Patogenisitas Virus	8
2.5. Epidemiologi Virus Avian Influenza	9
2.6 Antigenic shift dan Antigenic drift	11
2.7 Transmisi Virus Influenza A pada Manusia	12
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT	16
3.1 Tujuan	16
3.2 Manfaat	16
BAB 4. METODE	17
4.1 Koleksi Sampel	17
4.2 Inokulasi Medium Transport pada Telur Ayam Bertunas (TAB)	17
4.3 Metode Uji HA	17
4.4 Uji PCR	17
4.5 DNA Sequencing	18
BAB 5. RENCANA CAPAIAN, HASIL DAN PEMBAHASAN	19
5.1 Rencana Capaian	19
5.2 Hasil	19
5.3 Pembahasan	24
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	28
6.1 Kesimpulan	28
6.2 Saran	28
DAFTAR PUSTAKA	29



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Morfologi virus Avian Influenza yang terdiri dari 8 segmen	5
Gambar 2.2 Jalur Penularan Virus Avian Influenza pada Unggas dan Manusia	7
Gambar 2.3 Daerah endemis virus AI Subtipe H5N1 di Seluruh Indonesia	10
Gambar 2.4 Mekanisme Penularan Virus AI H5N1 pada Manusia	15
Gambar 5.1 Hasil uji PCR gen HA virus AI H5N1 Kalimantan Timur	21
Gambar 5.2 Hasil uji PCR Gen NA Virus AI H5N1 Kalimantan Timur	21
Gambar 5.3 Hasil Uji PCR Gen PB2 Virus AI H5N1 Kalimantan Timur	22
Gambar 5.4 Hasil Uji PCR Gen HA Virus AI H5N1 Jawa Tengah	22
Gambar 5.5 Hasil Uji PCR Gen HA Virus AI H5N1 Jawa Timur	23
Gambar 5.6 Hasil Uji PCR Gen HA Virus AI H5N1 Jawa Timur (Puyuh)	23

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Data Hasil Pengambilan Sampel dan Hasil pengujian dengan menggunakan uji HA dan uji PCR	22

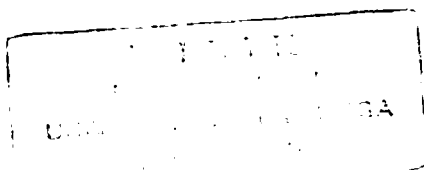
BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Avian influenza adalah penyakit viral pada unggas termasuk ayam dan unggas liar yang disebabkan oleh virus influenza tipe A. Penyakit ini dikenal juga dengan nama avian flu dan dapat menimbulkan penyakit dengan derajat keparahan yang sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat asimtomatik sampai penyakit fatal dan bersifat multisistemik (Swayne, 2000).

Sejak akhir tahun 2003, virus avian influenza subtype H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika (Steven *et al*, 2006). Di Indonesia infeksi virus H5N1 telah mengakibatkan kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor bahkan sampai dengan akhir februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di pulau Jawa yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan tengah (1 kabupaten) (Rahardjo dan Nidom, 2004).

Selain pada unggas, virus avian influenza dapat pula menyerang mamalia termasuk manusia. Tidak kurang dari 399 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus avian influenza subtype H5N1 dan 251 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 141 orang sampai dengan 22 Januari



2009 dan 115 orang diantaranya meninggal dunia (WHO,2009). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nidom dkk (2006) menunjukkan kucing yang berada di pasar wilayah Surabaya telah terinfeksi oleh virus flu burung subtype H5N1. Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Revianny (2008) ditemukan 2 virus H5N1 pada ayam di pasar Surabaya tanpa menunjukkan gejala klinis virus flu burung H5N1 dan 3 orang penjual ayam di pasar Surabaya memiliki antibodi terhadap virus flu burung sub tipe H5N1. Kajian mekanisme secara molekuler infeksi virus flu burung pada manusia dan hewan sangat dibutuhkan terutama terhadap daya adaptasi virus flu burung yang menular dari hewan ke manusia. Sehingga bisa dilakukan pencegahan secara dini baik pencegahan secara preventif yang meliputi imunisasi dengan menggunakan vaksin,KIE kepada masyarakat maupun pencegahan secara kuratif yaitu pemberian obat antara lain oseltamivir maupun herbal medicine.

Berdasarkan *roadmap* penelitian penelitian Universitas Airlangga bahwa penelitian ini merupakan rangkaian penelitian yang dilakukan oleh Tim peneliti Universitas Airlangga, dalam rangka melakukan pemetaan penyakit Influenza maupun penyakit Flu Burung H5N1. sejak tahun 2004 telah melakukan penelitian terhadap dinamika virus flu burung di lapangan. Beberapa virus telah berhasil diisolasi dari lapangan dengan karakter yang berbeda meskipun struktur virus yang diisolasi menunjukkan virus yang sangat ganas tetapi ayam yang membawa virus tersebut tidak menunjukkan gejala sakit atau kematian. Pada tahun 2003-2004, telah membantu mengidentifikasi kuman yang banyak menimbulkan kematian pada unggas. Surveilans dilanjutkan untuk mengisolasi virus H5N1 pada babi tahun 2005 dilanjutkan pada tahun 2006 dengan melakukan surveillans virus H5N1 pada kucing, juga telah mengidentifikasi virus H5N1 yang telah menginfeksi

manusia. Pada tahun 2007, telah dilakukan penelitian pada hewan coba yang menunjukkan keganasan (virulensi) yang berbeda pada tiap spesies. Oleh sebab itu, di tahun 2012-2013, tim peneliti Universitas Airlangga melaksanakan kajian secara menyeluruh terhadap virus flu burung dan menganalisis mekanisme secara molekuler infeksi virus flu burung dari manusia ke hewan. Ini disebabkan ketidaksamaan patogenitas dan virulensi virus flu burung yang menginfeksi dari hewan ke manusia dengan virus flu burung yang menginfeksi dari manusia ke hewan. Penyebab lainnya adalah manusia yang terinfeksi oleh virus flu burung dan mengalami *recovery* atau penyembuhan dapat sebagai hospes perantara dengan membawa virus sehingga kemungkinan untuk menular ke hewan dan terjadi perubahan terhadap struktur maupun daya virulensi dari virus flu burung harus dikaji secara mendalam.

1.2 Rumusan Masalah :

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut maka rumusan masalah yang diajukan :

1. Bagaimanakah karakter molekuler virus Avian influenza subtipe H5N1 yang menginfeksi berbagai hewan di Indonesia saat ini?
2. Bagaimanakah karakter molekuler virus Avian Influenza subtipe H5N1 yang diinfeksi pada hewan model monyet dan ayam (model transmisi virus AI H5N1 dari manusia ke hewan)?

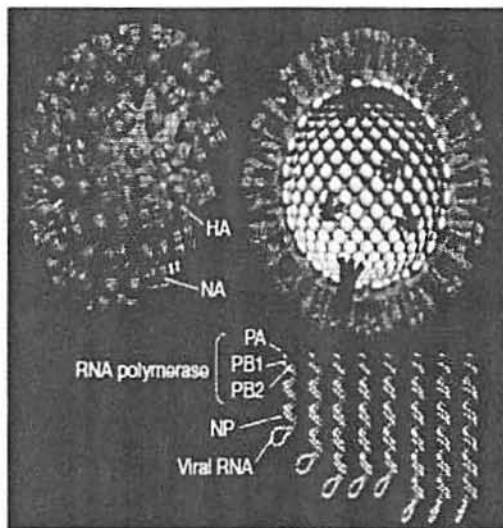
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Virus Flu Burung

Virus influenza adalah salah satu virus yang termasuk dalam golongan Orthomyxoviridae. Virus influenza terbagi menjadi virus influenza A, B dan C dan penggolongan inti didasarkan pada gen Matriks (M1) dan gen Nukleoprotein (Adwan, 2009). Virus Influenza A dapat dibagi menjadi subtype berdasarkan pada 2 protein permukaan yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) dan sampai dengan saat ini telah terdapat 16 subtype protein HA (Hemagglutinin) dan 9 NA (Neuraminidase) yang dapat ditemukan pada populasi burung liar (Smart dan Connely, 2008). Virus influenza A yang memiliki virulensi yang tinggi atau yang disebut dengan *Highly Pathogenic* terdapat pada virus influenza A subtype H5 dan H7 yang dapat menyebabkan kematian dengan angka 100% pada peternakan unggas dan juga pada manusia tetapi hanya bersifat asimtomatis atau tanpa gejala pada burung liar (Capua dan Marangon, 2006).

Virus Influenza A subtype H5N1 berbentuk *spherical* dengan diameter 100-200 nm dan terdiri atas 8 segmen atau gen dengan untai tunggal RNA negatif. Virus Flu Burung memiliki mRNA yang bersifat monosistronik yang mengkode 10 protein. Genome RNA virus Flu Burung terdiri atas gen nukleoprotein (NP) dan 3 subunit RNA polymerase complex (PA, PB1, dan PB2) yang memiliki peranan penting di dalam proses replikasi dan bergabung bersama dengan kompleks ribonukleoprotein (RNP). Bagian dalam amplop terdiri atas protein Matriks (M1) dan *channel ion* protein M2. Selain itu, juga terdapat protein non-struktural yaitu protein NS2 dan NS1. Protein NS2 memiliki peranan yang penting dalam mengambil RNP (*Ribonucleoprotein complex*) dari inti sel

dan berinteraksi dengan protein M1. Protein NS1 memiliki berbagai peranan antara lain mengatur pemisahan dan pengambilan bahan-bahan yang dibutuhkan dari nucleus menuju mRNA seluler dan memiliki peranan yang penting dalam menstimulasi terjadinya translasi untuk umpan balik terhadap aktifitas interferon pada hospes. Untuk protein HA dan NA yang terletak pada permukaan virus memiliki peranan dalam proses perlekatan, penggabungan dan masuk kedalam sel hospes, perkembangbiakan virus dari sel hospes yang terinfeksi oleh viru flu burung. Selain itu, protein HA dan NA merupakan dua protein yang bertanggungjawab secara langsung dengan terjadinya netralisasi antibodi dengan hospes (Adwan, 2009; Smart dan Connely,2008)



Gambar 2.1 Morfologi virus flu burung subtype H5N1 terdiri dari 8 segmen (Neumann,Noda dan Kawaoka, 2009)

2.2 Sifat-Sifat Virus Flu Burung

Virus Flu Burung memiliki sifat yang sama dengan virus lainnya yaitu tidak dapat bereplikasi di luar sel hospes. Virus Flu Burung ketika menginfeksi individu baru membutuhkan ketahanan agar dapat bertahan di lingkungan. Ini dapat dibuktikan bahwa virus Influenza dapat beradaptasi dengan baik di dalam air. Pada kondisi laboratorium

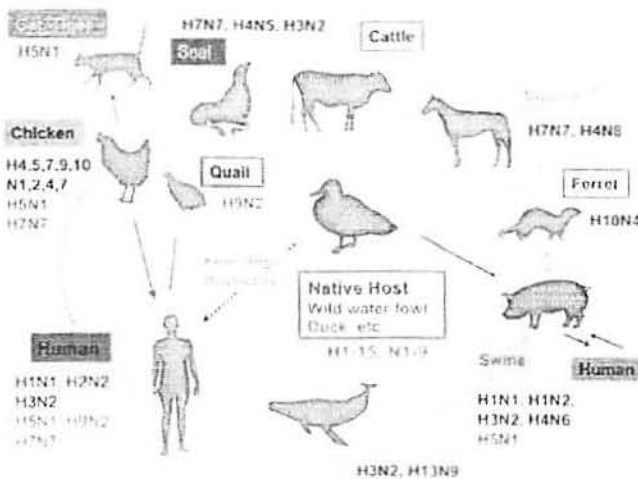
atau tahap eksperimen, virus Flu burung dapat disimpan pada air yang telah didestilasi yaitu pada suhu 28°C dan memiliki daya infeksi selama 100 hari, 17°C selama 200 hari dan mungkin lebih dari 1000 hari pada suhu 4°C. Pada kondisi normal, daya tahan virus Flu burung yang aktif dipengaruhi oleh pH, salinitas, radiasi UV dan kehadiran bahan biologi yang aktif seperti enzim yang memiliki kemampuan degradasi, bakteri dan mikroorganisme lainnya. Strain Flu Burung yang berasal dari isolat manusia dapat stabil pada pH netral sampai dengan pH 8,5 dan daya infeksi akan menurun secara drastis dibawa pH 6,0 tetapi masih dapat bertahan pada pH 4 bila dibandingkan dengan strain virus Influenza A lainnya yang berasal dari isolat manusia (Horimoto and Kawaoka, 2005).

Virus Flu Burung merupakan virus yang menyebar melalui aerosol. Aerosol yang mengandung virus Flu Burung mungkin masih infeksiif sampai dengan 24 jam atau lebih pada kelembaban yang rendah dan hanya 1 jam pada kelembaban yang tinggi (Rahardjo dan Nidom, 2005).

2.3 Penularan Virus Avian Influenza

Virus AI dapat terbawa di dalam saluran gastrointestinal burung liar ke seluruh dunia. Virus ini sangat berbahaya dan dapat menyebar di dalam saliva, cairan yang dikeluarkan melalui hidung dan feses dari burung yang terinfeksi H5N1. Virus AI secara normal bersifat asimtomatis pada burung liar tetapi dapat menyebabkan kematian pada ayam, bebek dan kalkun. Burung yang dipelihara dapat terinfeksi melalui kontak langsung dengan burung yang terinfeksi (antara burung liar dan burung yang dipelihara) atau melalui kontak dengan tanah yang terkontaminasi, sangkar dan air atau melalui makanan yang terkontaminasi dengan virus AI. Sebuah penelitian menemukan bahwa

virus AI H5N1 dapat disebarkan melalui burung yang bermigrasi di daerah Asia Tenggara (Webster, 2006). Selain burung liar, anjing dan kucing memiliki potensi dalam menyebarkan virus AI sub tipe H5N1. Ini didasarkan hasil penelitian dari tim FKH-UGM menemukan 2 ekor anjing dan kucing positif terhadap infeksi virus AI sub tipe H5N1 (Asmara, 2007). Selain itu, menurut hasil penelitian yang dilakukan di 6 kota di Indonesia ditemukan prevalensi kucing yang terinfeksi oleh virus AI sub tipe H5N1 adalah sebesar 19,8% dari 500 kucing (Nidom, 2006). Virus influenza dapat ditularkan melalui kontak dengan permukaan dan bahan yang terkontaminasi dengan virus AI atau melalui hospes perantara seperti babi. Karena manusia jarang terpapar oleh virus AI maka manusia memiliki imunitas yang sedikit terhadap partikel virus ini di dalam populasi yang besar. Ini menyebabkan virus AI menjadi ganas apabila terjadi penularan antar manusia dan dapat menyebabkan pandemik.



Gambar 2.2 Jalur Penularan Virus Avian Influenza pada Unggas dan Manusia (Sumber : Robertson, 2006)

Kebanyakan spesies unggas liar dan domestik peka terhadap infeksi virus influenza walaupun ada virus yang sangat patogen pada satu spesies tetapi bisa bersifat

tidak patogen pada spesies lain. Sebagai contoh, bebek cenderung tidak menunjukkan gejala klinis jika terinfeksi virus Avian Influenza yang bersifat letal pada ayam, walaupun virus tersebut dapat dideteksi di dalam berbagai organ dalam dan darah dari bebek yang terinfeksi. Di antara spesies unggas domestik, maka ayam dan kalkun merupakan spesies unggas yang paling sering mengalami *outbreak* virus avian influenza (Horimoto and Kawaoka, 2005).

2.4 Patogenisitas Virus

Berdasarkan patogenisitasnya maka virus avian influenza dapat dibagi dua yaitu Virus Avian Influenza Yang Sangat Patogen (*Highly Pathogenic Avian Influenza* = HPAI) dan Virus Avian Influenza yang Tidak Patogen (*Low Pathogenic Avian Influenza* = LPAI).

Virus avian influenza dikategorikan sebagai HPAI apabila virus tersebut memiliki skor *intravenous pathogenicity index (IVPI)* pada ayam umur enam minggu lebih dari 1,2 atau dapat menimbulkan mortalitas sebesar 75% pada ayam umur 4 – 8 minggu yang diinfeksi secara intravena. Untuk virus subtipe H5 dan H7 yang tidak memiliki IVPI lebih dari 1,2 maka untuk menentukan HPAI perlu dilihat adanya *multiple basic amino acid* pada *regio cleavage site* gen HA virus (Swayne, 2008).

Virus LPAI bereplikasi terutama di dalam usus dan organ respirasi yang selanjutnya dapat dikeluarkan melalui feses dari burung yang terinfeksi, sehingga transmisi virus melalui rute *faecal-contaminated-water-oral* merupakan mekanisme penularan virus di antara burung air. Infeksi oleh virus HPAI konsentrasi tinggi yang bereplikasi secara sistemik pada unggas juga dikeluarkan melalui feses. Namun virus

HPAI akan ditransmisikan diantara spesies unggas melalui rute nasal dan oral yang kontak dengan material yang terkontaminasi virus (Horimoto and Kawaoka,2005)

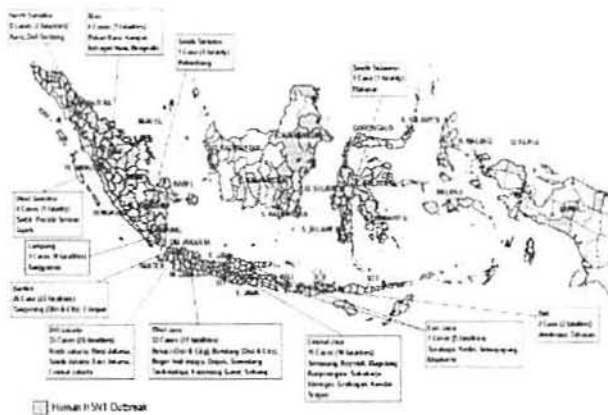
Virus LPAI menyebabkan infeksi lokal di dalam saluran pernafasan atau saluran pencernaan yang akan menimbulkan infeksi sedang/asimptomatik. Ayam yang terinfeksi virus HPAI menimbulkan gejala klinis umum seperti *swelling* endotel dari pembuluh darah kecil, *hemorrhagi* dan trombosis. Virus HPAI dapat bereplikasi dengan efisien di dalam endotel pembuluh darah dan sel-sel parenkim perivaskular sehingga dapat menimbulkan disseminasi virus serta infeksi sistemik (Horimoto and Kawaoka,2005).

Virus avian influenza juga dapat dikategorikan sebagai HPAI jika isolat tersebut dapat membunuh 1 – 5 ekor ayam walaupun tidak termasuk subtype H5 atau H7, atau kategori lain yang dipakai yaitu jika terjadi pertumbuhan virus dalam kultur sel dengan pembentukan CPE atau *plaque* tanpa menggunakan tripsin. Sebaliknya jika virus yang diinfeksi ke kultur sel tidak dapat tumbuh (tidak muncul CPE), maka isolat dikatakan tidak termasuk HPAI. Kategori lain yang digunakan untuk mengetahui virus HPAI yaitu untuk semua virus H5 atau H7 yang bersifat *low pathogenic*, tetapi memiliki pertumbuhan pada kultur sel tanpa trypsin, maka urutan asam amino dari *connecting peptide* gen HA harus ditentukan. Jika sekuennya mirip dengan isolat HPAI lain maka isolat yang diuji tersebut dikategorikan sebagai HPAI karena kebanyakan virus HPAI memiliki seri *basic amino acid* pada *cleavage site* gen HA.

2.5 Epidemiologi Virus Avian Influenza

Flu burung atau juga dikenal sebagai avian influenza merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus influenza tipe A Hingga saat ini, wabah flu burung dengan patogenisitas yang tinggi (*highly pathogenic*), disebabkan oleh virus influenza

subtipe H5 dan H7 (Behrens *and* Stoll, 2006). Flu burung *highly pathogenic* untuk pertama kalinya dikenal sebagai penyakit infeksi yang terjadi pada burung, unggas dan ayam di Itali pada tahun 1878 (Harder *and* Werner, 2006). Meskipun flu burung *highly pathogenic* jarang sekali ditemukan menginfeksi manusia akan tetapi flu burung juga dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada mamalia dan manusia (WHO, 2008).



Gambar 2.3 Daerah endemis virus AI Subtipe H5N1 di Seluruh Indonesia (Sumber: WHO, 2008)

Flu burung terjadi di Indonesia sejak pertengahan tahun 2003, akan tetapi baru pada 25 Januari 2004, Pemerintah mengumumkan secara resmi kepada masyarakat Indonesia bahwa telah terjadi wabah flu burung pada ayam dan unggas lainnya seperti ayam petelur, ayam bibit, ayam pedaging, bebek dan burung puyuh. Berdasarkan laporan resmi tersebut, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3

kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004).

Melalui analisis molekuler metode PCR telah diketahui sub tipe virus AI yang menyerang unggas di Indonesia mempunyai sub tipe H5N1, karena mempunyai homologi sekuens sebesar lebih dari 80% dengan sekuens H5N1 dari virus AI yang menginfeksi di daratan Cina (Nidom, 2005; Raharjo dan Nidom, 2004).

2.6 Antigenic Shift dan Antigenic Drift

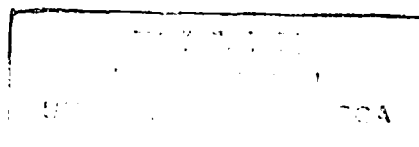
Virus Influenza A memiliki kemampuan untuk sering bermutasi sering mengalami mutasi titik dalam proses replikasi di dalam sel hospes yang terinfeksi dan biasanya disebut dengan antigenic drift. Selain antigenic drift juga dikenal virus influenza A terutama virus flu burung juga dapat mengalami antigenic shift. Antigenic shift merupakan hasil dari terjadinya reassortment secara genetik antara virus Influenza A yang berasal dari unggas (H5N1) dan virus Influenza dari manusia (H3N2,H1N1) sehingga menimbulkan perubahan pada gen HA dan tidak dikenali oleh imunitas pada populasi sehingga virus yang merupakan hasil dari reassortment antara virus yang berasal dari unggas dan manusia memiliki kemampuan untuk menyebar secara cepat dan menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Antigenic shift dapat dihasilkan dari tiga mekanisme yaitu 1) terjadinya reassortant antara subtype virus influenza A dan reassortant biasanya terjadi pada babi, unggas, kuda dan virus influenza A yang menginfeksi pada manusia. Mekanisme yang kedua adalah terjadinya perpindahan virus flu burung secara langsung dari 1 hospes ke hospes yang lain dan mekanisme yang ketiga adalah timbulnya virus yang telah lama menghilang atau tidak bersirkulasi kemudian muncul kembali pada sebuah spesies. Selain itu, Antigenic drift disebabkan terjadinya

perubahan yang kecil pada gen HA (Haemagglutinin) dan NA (Neuraminidase) yang disebabkan adanya akumulasi mutasi titik secara random merupakan penyebab terjadinya masa interpandemik dan permasalahan ketika produksi vaksin dilakukan secara massal (Stephenson dan Nicholson, 2001).

2.7 Transmisi Virus Influenza A pada Manusia

Pada umumnya virus avian influenza tidak bereplikasi secara efisien pada manusia, sehingga transmisi langsung virus avian influenza ke manusia sangat jarang terjadi. Penularan virus avian influenza ke manusia memerlukan paparan jumlah virus yang banyak untuk dapat menimbulkan tingkat replikasi virus yang cukup pada manusia. Kemampuan pertumbuhan virus avian influenza yang terbatas pada manusia diperkirakan sebagai barrier munculnya pandemi virus avian influenza melalui transmisi langsung dari unggas ke manusia (Horimoto and Kawaoka, 2005). Namun menurut WHO (2007), bahwa infeksi Virus AI H5N1 ke manusia dapat terjadi melalui penularan dari unggas ke manusia, mungkin dari lingkungan ke manusia dan penularan dari manusia ke manusia secara terbatas. Knipe (2007) menyebutkan bagaimanapun juga transmisi virus AI dari manusia ke manusia masih belum pernah dilaporkan.

Sebelum tahun 1977, transmisi virus avian influenza ke manusia masih belum menyebabkan gangguan kesehatan pada manusia. Asumsi ini berdasarkan penemuan secara eksperimental bahwa virus unggas tidak bereplikasi dengan efisien pada manusia dan oleh karena itu tidak ada kasus fatal pada manusia yang telah dilaporkan selama *outbreak* HPAI. Hal ini disebabkan karena terdapat perbedaan spesifisitas reseptor antara virus unggas dan manusia yang dipercaya sebagai *host range barrier* sehingga transmisi



virus unggas ke manusia tidak terjadi. Sampai tahun 1977, hanya ada tiga kasus transmisi langsung virus influenza dari unggas ke manusia (Knipe,2007).

Seperti pada kasus infeksi virus AI H5N1 di Hongkong tahun 1997 telah terjadi penularan langsung dari ayam ke manusia. Berdasarkan dari hasil analisisnya ternyata ke delapan segmen virus tersebut berasal dari virus unggas dan masih terikat ke reseptor unggas SA α -2,3. Kemudian diketahui pula bahwa donor gen HA virus tersebut adalah A/goose/Guangdong/I/96 (H5N1) yang masih terus bersirkulasi di Cina (Lipatov,2004). Berdasarkan studi epidemiologi menunjukkan bahwa transmisi langsung virus dari burung dan serologis bahwa kejadian transmisi dari manusia ke manusia hanya terbatas pada sedikit kasus, sehingga hal ini mengindikasikan bahwa virus masih belum beradaptasi penuh pada *host* manusia (Horimoto and Kawaoka,2005). Dari kasus infeksi H5N1 tahun 1997 di Hongkong nampak bahwa faktor keterbatasan spesifisitas reseptor dari sel inang tidak diperlukan lagi (Zhou, 1999). Tetapi pada tahun 2002 terjadi kasus infeksi H5N1 lain di Hongkong yang menunjukkan bahwa terjadi mutasi *antigenic drift* dan bersifat *highly pathogenic* pada bebek serta unggas air lain. Hal ini terus berlanjut pada awal tahun 2003 dimana virus H5N1 telah menginfeksi satu keluarga di Hongkong yang mengakibatkan kematian pada tiga orang dalam satu keluarga (Horimoto and Kawaoka, 2005).

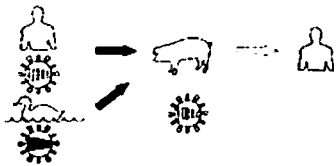
Perlu diketahui bahwa virus influenza tidak menyebabkan infeksi persisten atau laten pada manusia, tetapi virus influenza dipertahankan pada populasi manusia melalui penyebaran langsung dari manusia ke manusia selama infeksi akut (Knipe,2007). Namun demikian penularan virus AI H5N1 ke manusia dikhawatirkan dapat memicu terjadinya

pandemi influenza, apalagi bila penularan tersebut disertai dengan perubahan spesifisitas reseptor yang mengarah ke SA α -2,6 (Mansfield,2006).

Masa inkubasi virus influenza A sekitar tiga hari dan virus influenza B sekitar empat hari. Penyebaran virus influenza yang paling efektif pada manusia adalah melalui *aerosol droplet* yang terbentuk saat bersin maupun batuk dengan diameter kurang dari 2 μ m sehingga dapat langsung masuk ke saluran pernafasan bagian bawah. Dosis infeksi pada infeksi virus influenza A pada manusia sebesar 0,6 sampai 3 TCID₅₀ (dosis yang diperlukan untuk menginfeksi 50% kultur jaringan) saat diberikan secara intranasal (Knipe,2007).

Beberapa kemungkinan mekanisme penularan virus AI H5N1 pada manusia serta terjadinya pandemi influenza karena terjadi penularan antar manusia seperti pada Gambar 2.4. Pandemi influenza dapat terjadi jika suatu virus Influenza dari unggas memiliki protein permukaan HA yang tidak dapat dieliminasi oleh respon imun tubuh manusia (Nichol, 2000).

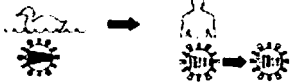
A. Reassortment in Pigs



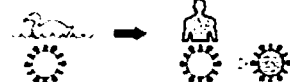
B. Adaptation in Pigs



C. Reassortment in Humans



D. Adaptation in Humans



Gambar 2.4 : Mekanisme Penularan Virus AI H5N1 pada Manusia (Sumber : Nichol,2000)

Gambar 2.4 pada bagian 1.A nampak peranan hewan babi sebagai tempat pencampuran (*reassortment*) virus Influenza asal unggas dan manusia, oleh karena babi memiliki kedua reseptor (SA α -2,3 dan SA α -2,6) sehingga virus hasil *reassortment* tersebut bisa memiliki spesifisitas reseptor SA α -2,6 maka dapat memicu penularan antar manusia. Sedangkan bagian 1B menunjukkan peranan babi sebagai tempat adaptasi suatu virus yang berasal dari unggas sehingga babi mampu mengubah spesifisitas reseptor dari virus tersebut ke SA α -2,6 dan akhirnya virus tersebut dapat menular ke manusia. Peranan manusia untuk melakukan *reassortment* virus Influenza asal unggas nampak pada 1C, jika manusia terinfeksi virus Influenza asal unggas maka virus tersebut akan mengalami *reassortment* dengan virus Influenza asal manusia sehingga akan memunculkan virus baru yang tidak dikenali oleh respon imun manusia. Manusia juga mampu mengadaptasi virus Influenza asal unggas di dalam tubuhnya sehingga akan memunculkan virus baru yang juga tidak dikenali oleh respon imun manusia (Nichol,2000). Semua mekanisme tersebut pada akhirnya akan menyebabkan virus Influenza dapat menular antar manusia sehingga dikhawatirkan memicu pandemi Influenza.

BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT

3.1 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Menentukan karakter virus Avian Influenza subtipe H5N1 yang diisolasi dari lapangan
2. Menganalisis karakter molekuler genom virus Avian Influenza subtipe H5N1 dan patogenisitas virus Avian Influenza subtipe H5N1 yang diinfeksi pada hewan coba monyet dan ayam (model transmisi virus AI H5N1 dari manusia ke hewan).

Sasaran dari penelitian ini diharapkan dapat mengungkap rantai penularan virus Avian Influenza subtipe H5N1 dari manusia ke hewan dan tingkat patogenisitas virus Avian Influenza H5N1 ketika menginfeksi pada hewan dan manusia.

3.2 Manfaat

Dengan tercapainya tujuan penelitian ini yaitu diketahuinya mekanisme molekuler penularan virus Avian Influenza subtipe H5N1 dari manusia ke hewan maka akan dapat diambil langkah terbaik dalam pencegahan penularan virus Avian Influenza subtipe H5N1 baik pada hewan maupun pada manusia.

BAB 4 METODE

4.1 Koleksi sampel

Cotton bud steril dioleskan pada bagian nasal dan nasopharink pada manusia dan hewan babi, bagian kloaka dan nasal pada unggas, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi medium transport dan disimpan di dalam lemari es - 80^o C sampai digunakan untuk proses PCR.

4.2 Inokulasi Medium Transport pada Telur Ayam Bertunas (TAB)

Tempatkan telur pada sisi tumpul bagian atas dan diberi kode. Usap bagian atas telur dengan menggunakan 70 % ethanol dan buat lubang pada batas ruang udara dan ruang alantois. Ambil 1 ml spesimen dari medium transport dengan menggunakan syringe. Pegang telur, tentukan lokasi embrio dengan menggunakan “*egg candler*” , masukkan jarum ke lubang pada telur, menembus membran amnion, dan inokulasikan 100 µl spesimen ke ruang amnion. Tarik jarum 0,5 cm dan inokulasikan 100 µl spesimen ke dalam ruang alantois. Tutup lubang telur dengan parafin cair dan inkubasi telur tersebut pada suhu 33-37^oC selama 2-3 hari.

4.3 Metode Uji HA

Masukkan 50 µl PBS pada lubang A2-H12 kemudian masukkan 50 µl kontrol antigen atau isolat lapangan dari A1-F1. Pindahkan 50 µl dari lubang pertama sampai dengan lubang terakhir kemudian tambahkan RBC *guinea pig* (Marmot) 0,75 % untuk sampel dari manusia dan babi, RBC ayam 0,6% untuk sampel dari unggas. Shake dengan mekanikal vibrator dan inkubasi dalam suhu 4° selama 30 menit. Lalu amati adanya aglutinasi di dasar sumuran dari *plate*.

4.4 Uji PCR

Ekstraksi RNA dari cairan alantois mengikuti prosedur dari *Qiagen RNAeasy TM RNA Isolation Kit*. Reaksi PCR dalam mendeteksi virus Flu Burung subtipe H5N1 yaitu untuk proses denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 50°C selama 1 menit dan *extension* selama 3 menit. Siklus PCR antara 25 sampai dengan 40 siklus kemudian hasil produk PCR dianalisis dengan metode Elektroforesis dan difoto untuk analisis hasil.

4.5 DNA Sequencing

DNA hasil PCR dari masing-masing isolat, setelah dimurnikan kemudian urutan DNA ditentukan dengan menggunakan mesin *ABI Prism 310 Genetic Analyser*, dengan menggunakan *Big Dye Terminator* (Perkin Elmer Cetus) dan dinalisa tingkat *homology* dengan menggunakan data dari *gene bank* menggunakan program *Genetic win* dan *Bioedit*.

BAB 5 RENCANA CAPAIAN, HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 RENCANA CAPAIAN

Penelitian ini direncanakan dilakukan 2 tahun (tahun 2012 dan tahun 2013).

*Target capaian tahun I (tahun 2012) : Penentuan karakter molekuler virus Avian Influenza sub tipe H5N1 hasil isolasi dari lapangan.

* Target capaian tahun II (tahun 2013) : Analisis karakter molekuler genoma virus Avian Influenza sub tipe H5N1 dan patogenisitas virus Avian Influenza sub tipe H5N1 yang diinfeksi pada hewan coba monyet dan ayam (model transmisi virus Avian Influenza sub tipe H5N1 dari manusia ke hewan).

5.2 HASIL

Telah dilakukan pengambilan sampel virus di lapangan dari berbagai daerah di Indonesia seperti Jakarta, Tangerang, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Kalimantan Timur, Kalimantan Selatan dan Riau. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil usapan (*swab*) dari bagian kloaka dan trakea unggas (ayam peliharaan), babi, bebek, kucing, burung piaraan (burung puyuh) dan kemudian dimasukkan ke dalam médium transport.

Sampel yang diperoleh kemudian di dalam laboratorium BSL3 dipreparasi serta dilanjutkan dengan inokulasi sampel ke dalam TAB (telur ayam bertunas) umur 9-10 hari. Hasil panen sampel dari cairan alantois kemudian dilakukan uji HA (uji Hemaglutinasi) untuk mengetahui titer antigen (hemaglutinin) di dalam sampel. Sampel yang menunjukkan hasil positif uji HA dilanjutkan dengan uji PCR yang didahului dengan ekstraksi RNA virus dari sampel.

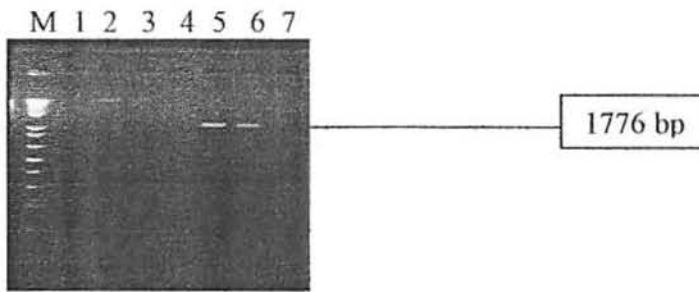
Sampai saat ini telah berhasil diperoleh sejumlah 1.607 sampel dari berbagai hewan di Indonesia dengan rincian berdasarkan daerah yaitu dari Jakarta sebanyak 256 sampel, Tangerang 234 sampel, Jawa Barat 242 sampel, Jawa Tengah 287 sampel, Jawa Timur 380, Kalimantan Timur 136 sampel, Riau sebanyak 22 sampel dan Kalimantan Selatan 20 sampel. Sementara jika sampel yang diperoleh dibedakan berdasarkan jenis hewan maka rinciannya seperti berikut yaitu dari ayam sejumlah 865 sampel, bebek 127 sampel, burung puyuh 94 sampel, kucing 178 sampel dan hewan babi 343 sampel. Sampel berupa swab trakea dan kloaka dalam médium transpor, kemudian diinokulasikan ke dalam TAB berumur 10 hari yang selanjutnya dilakukan uji hemaglutinasi dari cairan alantois. Data jumlah sampel yang telah diperiksa meliputi inokulasi sampel pada TAB, uji HA dan PCR seperti pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Data Hasil Pengambilan Sampel dan Hasil pengujian dengan menggunakan uji HA dan uji PCR

Spesies	Jumlah Sampel	Jumlah Sampel Positif	
		HA RBC Ayam	PCR
Ayam	865	83	8
Bebek	127	0	0
Burung	94	19	1
Kucing	178	0	0
Babi	343	0	0
Jumlah Total	1.607	102	9

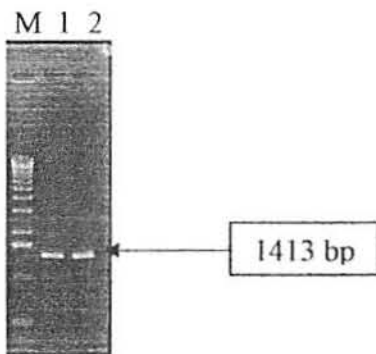
Hasil pengujian sampel virus dengan uji RT-PCR diperoleh hasil positif terhadap gen HA (H5) pada 8 sampel yang berasal dari hewan ayam dimana 4 sampel positif berasal dari Kalimantan Timur, 1 sampel berasal dari Jawa Tengah, 1 sampel dari Jawa Timur, 1 sampel dari Riau dan 1 sampel lagi dari Kalimantan Selatan. Sedangkan 1 sampel burung puyuh positif terhadap gen HA (H5) berasal dari Jawa Timur (Lamongan).

Hasil elektroforesis uji RT-PCR gen HA sampel ayam yang berasal dari Kalimantan Timur seperti pada Gambar 5.1. berikut ini.

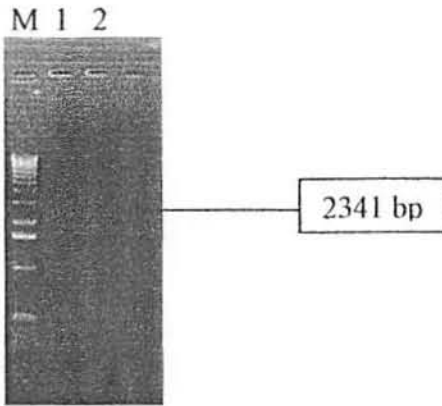


Gambar 5.1 : Elektroforesis hasil uji RT-PCR gen HA virus AI H5N1 (Sampel no 1,2,3,4,7 = negatif PCR HA/H5, no 5 dan 6= positif PCR HA/H5, M= marker 1 Kb)

Selanjutnya dari sampel yang sudah positif terhadap gen H5 dilakukan RT-PCR terhadap gen eksternal lain (gen Neuraminidase = NA/N1). Hasil RT-PCR gen NA yang spesifik menggunakan primer untuk N1 seperti tertera pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Elektroforesis hasil RT-PCR Gen NA Virus AI H5N1 sebesar 1413 bp. M = marker. 1 dan 2 = sampel positif



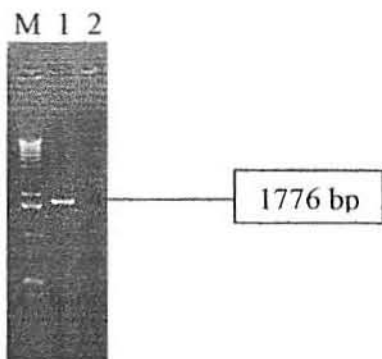
Gambar 5.3 Hasil RT-PCR Gen PB2 Virus H5N1 sebesar 2341 bp. M = marker, 1 dan 2 = sampel positif

Hasil uji RT-PCR sampel ayam dari Jawa Tengah seperti pada Gambar 5.4 di bawah ini.



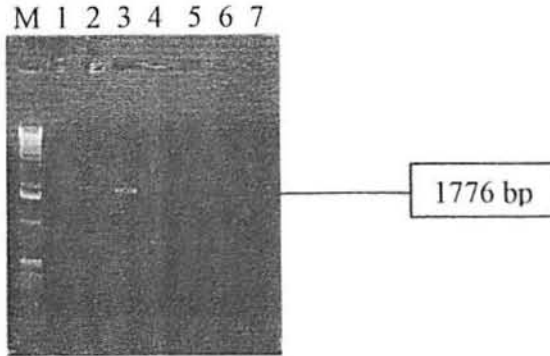
Gambar 5.4 : Elektroforesis hasil uji RT-PCR gen HA virus AI H5N1 (Sampel no 2 = positif, sampel no 1,3 dan 4 = negatif. M = marker 1 Kb)

Hasil uji RT-PCR gen HA (H5) sampel ayam dari Jawa Timur seperti pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5 : Elektroforesis hasil uji RT-PCR gen HA virus AI H5N1 (Sampel no 1= positif PCR HA/H5,sampel no 2 = negatif PCR HA/H5, M = marker 1 Kb)

Hasil uji RT-PCR gen HA (H5) sampel burung puyuh dari Jawa Timur (Lamongan) seperti pada Gambar 5.6 di bawah ini :



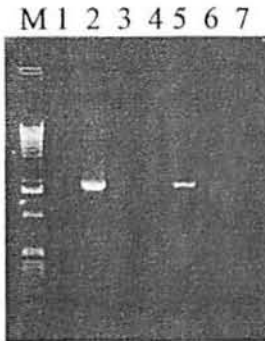
Gambar 5.6 : Elektroforesis hasil uji RT-PCR gen HA virus AI H5N1 (Sampel no 3 = positif PCR HA/H5, sampel no 1,2,4,5,6,dan 7 = negatif PCR HA/H5, M = marker 1 Kb)

Hasil Uji PCR gen HA (H5) sampel ayam dari Kalimantan Timur seperti pada Gambar 5.7 berikut ini.



Gambar 5.7 : Elektroforesis hasil uji RT-PCR gen HA virus AI H5N1 (Sampel no 1 dan 3 = positif PCR HA/H5, sampel no 2 = negatif PCR HA/H5, M = marker)

Hasil Uji PCR terhadap gen HA/H5 sampel ayam dari Riau dan Kalimantan Selatan seperti pada Gambar 5.8 berikut.



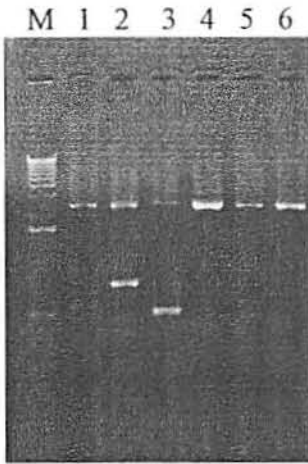
Gambar 5.8 : Elektroforesis hasil uji RT-PCR gen HA virus AI H5N1 (Sampel no 2 = positif PCR HA/H5 dari Riau, sampel no 5= positif PCR gen HA/H5 dari Kalimantan Selatan, sampel no 1,3,4,6 dan 7 = negatif PCR HA/H5, M= marker 1 Kb)

Hasil Uji PCR gen NA/N1 sampel ayam dari Jawa Tengah, Jawa Timur, Riau, Kalimantan Selatan dan Kalimantan Timur.



Gambar 5.9 : Elektroforesis hasil uji RT-PCR gen NA virus AI H5N1 (Sampel no 1,2,3,4,5 dan 6 = positif PCR NA/N1, M=marker 1 Kb).
No 1=sampel dari Jawa Tengah, no 2= dari Jawa Timur, no 3 = dari Riau, no 4= dari Kalimantan Selatan, no 5 dan 6 = dari Kalimantan Timur

Hasil Uji PCR gen PB2 sampel ayam dari Jawa Tengah, Jawa Timur, Riau, Kalimantan Selatan dan Kalimantan Timur.



Gambar 5.9 : Elektroforesis hasil uji PCR gen PB2 virus AI H5N1 (Sampel no 1,2,3,4,5 dan 6 = positif PCR NA/N1, M=marker 1 Kb).
No 1=sampel dari Jawa Tengah, no 2= dari Jawa Timur, no 3 = dari Riau, no 4= dari Kalimantan Selatan, no 5 dan 6 = dari Kalimantan Timur

Hasil PCR ke-9 sampel positif baik untuk gen HA, NA dan PB2 dilanjutkan lagi dengan sekuensing yang diawali dengan proses purifikasi produk PCR, labeling, presipitasi lalu memasukkan sampel ke mesin sekuensing. Hasil sekuensing berupa elektroferogram selanjutnya dilakukan analisis dengan program GeneticWin serta program Bioedit. Hasil pohon filogenetik gen HA, NA dan PB2 untuk sampel yang didapat tertera pada halaman lampiran.

5.3 PEMBAHASAN

Pengambilan sampel pada unggas karena unggas merupakan salah satu target dari infeksi virus Avian Influenza H5N1 terutama di daerah peternakan dan unggas yang dipelihara di belakang rumah (*back yard*). Infeksi virus Avian Influenza H5N1 pada unggas menyebabkan mortalitas sampai dengan 100% dengan tingkat kerugian pada usaha peternakan yang cukup tinggi. Infeksi virus Avian Influenza H5N1 pada unggas

biasanya ditandai dengan adanya gejala bulu rontok, cangkang telur yang tidak keras, depresi dan penurunan kondisi tubuh, penurunan produksi telur dengan drastis, kehilangan nafsu makan, *cyanosis* (warna ungu-kebiruan) pada jengger dan *wattles*, oedem dan pembengkakan pada kepala, kelopak mata, jengger, *wattles*, dan daerah di sekitar kaki, diare, terjadi sedikit perdarahan dari daerah nostril, kehilangan koordinasi termasuk kehilangan kemampuan berjalan dan berdiri, terdapat *hemorrhagic*/perdarahan (mudah terlihat pada daerah di sekitar kaki dan tulang kering).

Selain pada unggas, pengambilan sampel juga dilakukan pada babi. Ini disebabkan Babi merupakan salah satu hewan yang dipertimbangkan sebagai hewan perantara atau "*mixing vessels*" karena babi memiliki 2 spesifisitas reseptor yaitu SA α 2,3Gal dan SA α 2,6Gal pada sel epitel trakea sehingga babi memiliki kemampuan sebagai tempat replikasi virus influenza dari manusia dan unggas. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nidom, dkk (2010) bahwa ditemukan virus Avian Influenza H5N1 yang menginfeksi pada babi sebesar 7,4 % dan terdapat satu virus Avian Influenza yang memiliki spesifisitas reseptor SA α 2,3Gal dan SA α 2,6Gal sehingga hal ini memberikan indikasi bahwa virus Avian Influenza bereplikasi pada babi dan memiliki kemampuan untuk mengenali spesifisitas reseptor pada manusia.

Sedangkan pengambilan sampel pada kucing, karena kucing merupakan hewan mamalia yang juga memiliki potensi untuk terinfeksi virus Avian Influenza H5N1 dan menularkan pada lingkungan terutama pada manusia. Pada tahun 2008, peneliti Laboratorium Flu Burung Universitas Airlangga menemukan adanya infeksi virus flu burung pada kucing di Jakarta, Tangerang, Banten dan juga Surabaya sehingga monitoring infeksi virus flu burung terhadap kucing sangat diperlukan. Ini berkaitan

dengan adanya sifat *antigenic drift* dan *antigenic shift* pada virus Avian Influenza yang memicu timbulnya subtype virus influenza baru. Sebagaimana diketahui *antigenic drift* disebabkan adanya mutasi titik, sebagian kecil pada asam amino dan terjadi secara gradual pada gen HA dan NA. Pada mamalia, *antigenic drift* disebabkan adanya seleksi positif dari mutasi yang terjadi secara spontan oleh netralisasi antibodi. Antigenik drift biasanya dapat diobservasi pada peternakan dan jarang terjadi pada populasi manusia. Tingkat terjadinya mutasi asam amino terhadap gen HA dan NA secara frekuensi kurang dari 1% per tahun dan menyebabkan terjadinya epidemik.

Antigenic shift merupakan perubahan pada sebagian besar pada asam amino pada gen HA atau NA sehingga menghasilkan urutan asam amino baru pada HA atau NA. Apabila subtype HA atau NA yang sudah mengalami perubahan menginfeksi pada populasi manusia sehingga respon imun tidak mengenali virus influenza A akan menyebabkan terjadinya pandemi.

Dari pengambilan sampel didapatkan 1.607 sampel swab dan telah ditanam di telur ayam bertunas dengan usia 9-10 hari dan inkubasi selama 48-72 jam. Diagnostik yang digunakan untuk mendeteksi virus flu burung H5N1 adalah dengan menggunakan PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Deteksi RNA virus flu burung subtype H5N1 dengan menggunakan *Reverse Transcriptase PCR* merupakan *gold standart* untuk pemeriksaan infeksi virus flu burung. Keunggulan dari pemeriksaan dengan menggunakan *Reverse Transcriptase PCR* membutuhkan waktu antara 4 sampai dengan 6 jam dan dapat diketahui karakteristik genetik virus flu burung subtype H5N1 yang menginfeksi pada manusia. Kelemahaan dari metode *Reverse Transcriptase PCR* adalah harus mengganti primer dan probe yang terus-menerus disebabkan virus flu burung yang mudah mutasi

terutama pada gen HA (Haemagglutinin) dan NA (Neuraminidase). Pengujian secara serologik dan *rapid test* (*Directigen* Flu A dan B). *Rapid test Directigen* Flu A dan B maupun Flu OIA/B memiliki spesifisitas yang tinggi yaitu antara 95 % sampai dengan 100 % namun memiliki sensitifitas yang bervariasi yaitu antara 50 % sampai dengan 70 % dan lebih tinggi pada anak-anak dibandingkan pada kelompok dewasa (Gavin dan Thompson, 2003; Uyeki, 2006).

Kultur sel merupakan *gold standart* untuk diagnosis agen infeksi termasuk virus flu burung. Inokulasi virus flu burung dengan menggunakan kultur sel bertujuan untuk mempropagasi atau memperbanyak virus dan membutuhkan waktu minimal 48 jam untuk melihat pertumbuhan virus dan identifikasi virus yang spesifik (Ginocchio, 2007; Beigel, 2008). Kelemahan dari kultur sel adalah membutuhkan waktu yang agak lama untuk mengambil keputusan pemberian antiviral pada penderita yang terinfeksi oleh virus flu burung.

Pengujian dengan menggunakan mikroskop immunofluoresen biasanya digunakan untuk mendeteksi antigen virus flu burung. Sampel yang digunakan adalah jaringan dari sel epitel saluran pernafasan pada obyek gelas kemudian diwarnai dengan antibodi yang spesifik dan dilabel dengan substrat yang memiliki warna (Foo, 2009). Mikroskop immunofluoresen memiliki sensitifitas 80% apabila dibandingkan dengan deteksi secara langsung menggunakan *rapid test*. Sensitifitas dengan menggunakan teknik immunofluoresen dibandingkan dengan kultur sel memiliki rentang antara 70% sampai dengan 100%, spesifisitas antara 80% sampai dengan 100%; PPV (*Positive Predictive Value*) 85% sampai dengan 94% dan NPV (*Negative Predictive Value*) berkisar antara 96% sampai dengan 100%. Teknik immunofluoresen sangat bergantung pada kualitas dari

spesimen yang diuji dan tergantung pada jumlah sel epitel saluran pernafasan didalam spesimen yang akan digunakan untuk pengujian. Selain itu, analisa hasil teknik imunofluoresen juga dipengaruhi oleh adanya sel non spesifik dan debris yang dapat mengakibatkan terjadinya positif palsu dan negatif palsu (Gavin dan Thompson, 2003).

Pengujian secara serologik untuk mendeteksi antibodi IgG dan IgM dapat digunakan sebagai konfirmasi dan serokonversi dengan pengambilan darah 7-21 hari untuk mengetahui adanya peningkatan titer (Beigel,2008). Berdasarkan hasil penelitian telah dilakukan menunjukkan bahwa Elisa menunjukkan hasil yang lebih baik apabila dibandingkan dengan teknik imunofluoresen dalam mendeteksi virus influenza dengan sensitifisitas 70% dan teknik imunofluoresen 60% sampai dengan 65% dengan menggunakan spesimen dari aspirasi dan bilasan nasal. Namun pengujian Elisa memiliki kelemahan yaitu terdapat positif palsu di dalam proses analisa data (Dwyer *et al*, 2006;Alwynn *et al*, 2002).

Dari 1.607 sampel swab yang berhasil dikumpulkan, 8 sampel dari ayam menunjukkan hasil positif terhadap uji PCR gen H5 serta 1 sampel dari burung puyuh positif uji PCR gen H5. Untuk mengkarakterisasi ke-9 isolat positif tersebut maka dilanjutkan dengan sekuensing meliputi gen HA, NA dan PB2 yang dibandingkan dengan data dari *GeneBank*.

Setelah dilakukan analisis hasil sekuensing gen HA dengan data dari *GeneBank*, semua isolat yang didapat dalam penelitian ini termasuk ke dalam *subclade* 2.1.3 berdasarkan klasifikasi WHO/OIE. Dari analisis pohon filogenetik gen HA didapatkan bahwa virus yang berasal dari isolat ayam terbagi menjadi 2 kelompok. Sementara

analisis filogenetik gen NA juga menunjukkan hubungan yang serupa dengan gen HA (virus yang diperoleh terbagi menjadi dua kelompok virus).

Berdasarkan analisis pohon filogenetik gen HA dan NA dimana virus yang diperoleh dari ayam dibagi menjadi dua kelompok, kelompok virus pertama (Grup A) terdiri atas 7 virus yaitu virus yang diisolasi dari ayam di provinsi Jawa Timur, Jawa Tengah, Riau, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur (dua virus) serta virus dari burung puyuh, kelompok kedua (Grup B) terdiri atas 2 virus yang semuanya berasal dari Kalimantan Timur. Dari analisis kekerabatan gen HA nampak bahwa virus Grup A memiliki kekerabatan paling dekat (99%) dengan virus dari ayam yang diisolasi tahun 2010. Virus dari Grup B memiliki kekerabatan paling dekat dengan virus dari ayam yang diisolasi pada tahun 2007. Kenyataan ini menunjukkan bahwa virus yang berhasil diisolasi pada penelitian ini memiliki kekerabatan sangat dekat dengan virus yang bersirkulasi di Indonesia selama ini.

Beberapa virus yang didapat pada penelitian ini, khususnya dua virus dari Kalimantan Timur memiliki kekerabatan sangat dekat dengan virus dari provinsi lain yaitu Jawa tengah, Jawa Timur, Riau (Sumatra) dan Kalimantan Selatan, hal ini menunjukkan telah terjadi perpindahan virus antar provinsi, misalnya melalui terbawanya ayam yang telah terinfeksi oleh lalulintas manusia antar provinsi atau oleh migrasi burung liar.

Hasil analisis gen HA juga menunjukkan bahwa tidak satupun virus yang berhasil diisolasi pada penelitian ini mengalami mutasi yang bertanggungjawab terhadap pengenalan reseptor tipe manusia, artinya semua virus yang didapat di Indonesia tidak dapat mengenali reseptor tipe manusia. Sedangkan analisis asam amino gen NA

menunjukkan ke-9 isolat virus tersebut memiliki delesi 20 asam amino pada regio *stalk NA* yang menunjukkan adaptasi virus influenza dari unggas air ke ayam peliharaan.

Berdasarkan hasil analisis pohon filogenetik gen PB2, juga menunjukkan bahwa virus yang berhasil diisolasi terbagi menjadi 2 kelompok virus (Grup A dan Grup B dengan anggota virus yang sama). Virus dari Grup A memiliki kekerabatan dengan virus yang diisolasi dari ayam di Palu tahun 2010, sedangkan virus dari Grup B memiliki kekerabatan dengan virus yang diisolasi di Klaten dan Banjarbaru pada tahun 2010. Hal ini menunjukkan bahwa kedua kelompok virus tersebut dari analisis pohon filogenetik gen PB2 juga memiliki kekerabatan yang dekat dengan virus dari ayam yang bersirkulasi di Indonesia selama ini. Hasil analisis gen PB2 isolat yang diperoleh juga menunjukkan bahwa semua virus masih memiliki asam amino tipe unggas dimana asam amino pada posisi 627 diisi oleh asam amino Glutamat.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN

Kesimpulan yang bisa diambil dari penelitian ini yang sudah dijalankan yaitu :

1. Telah diperoleh sampel sebanyak 1.607 swab (ayam 865 sampel, bebek 127 sampel, burung puyuh 94 sampel, kucing 178 sampel dan hewan babi 343 sampel).
2. Sampel yang menunjukkan hasil positif uji HA yaitu 83 sampel dari ayam dan 19 sampel dari burung puyuh
3. Sampel yang menunjukkan hasil positif berdasarkan uji PCR gen HA,NA dan PB2 ada 9 sampel (8 dari sampel ayam, 1 dari sampel burung puyuh)
4. Virus yang diperoleh semua masuk ke dalam *subclade* 2.1.3 (berdasarkan gen HA)
5. Berdasarkan analisis pohon filogenetik, virus yang diperoleh dibagi menjadi 2 kelompok virus
6. Virus yang diperoleh berasal dari virus yang sudah bersirkulasi di Indonesia

6.2 SARAN

1. Perlu dilakukan uji patogenisitas virus yang diperoleh pada hewan coba
2. Perlu dilakukan surveilans secara rutin di berbagai wilayah di Indonesia

Tugas Masing-masing Peneliti, Kerjasama dan Hubungan Dengan SDM di Luar

Tugas masing-masing peneliti dalam proyek penelitian yang didanai oleh Kementrian Ristek telah sesuai dengan bidang pekerjaan yang tertulis di dalam proposal. Selain itu, kerjasama antara peneliti sudah baik. Ini dibuktikan dengan penelitian ini dapat diselesaikan sesuai dengan jadwal penelitian yang sudah ditetapkan. Indikator tugas peneliti dan kerjasama dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Nama Peneliti	Tugas Peneliti	Indikator Keberhasilan
Kadek Rachmawati	<ul style="list-style-type: none"> - Propagasi dan Inokulasi Virus pada TAB - Ekstraksi RNA, Uji PCR dan Sekuensing - Analisis Hasil 	<ul style="list-style-type: none"> - Telah dilakukan propagasi dan inokulasi virus H5N1 pada TAB - Telah dilakukan ekstraksi RNA, uji PCR dan Sekuensing - Sedang dilakukan analisis hasil sekuensing segmen dari Genom Virus H5N1 yang diperiksa
Kholik	<ul style="list-style-type: none"> - Pengambilan sampel dari lapangan - Preparasi sampel swab dari lapangan 	<ul style="list-style-type: none"> - Telah dilakukan pengam-Bilan sampel dari lapangan pada berbagai hewan - Telah dilakukan preparasi sampel swab dari lapangan
Ratnani Sri Hayati	<ul style="list-style-type: none"> - Propagasi dan Inokulasi Virus pada TAB - Uji HA sampel hasil panen dari TAB 	<ul style="list-style-type: none"> - Telah dilakukan propagasi dan Inokulasi Virus pada TAB - Telah dilakukan Uji HA sampel hasil panen dari TAB

**LAPORAN PENGGUNAAN KEUANGAN TAHAP 1 DAN TAHAP 2
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995247, 5995248, Fax. (031) 5962066
Website : <http://lppm.unair.ac.id>; E-mail : infolemlita.unair.ac.id

Judul Kegiatan : Mekanisme Molekuler Penularan Virus Flu Burung
H5N1 Dari Manusia Ke Hewan (Model Transmisi Virus
Flu Burung Pada Hewan Coba)
Ketua Pelaksana : Kadek Rachmawati, drh., M.Kes
Sumber Dana : Kementerian Ristek
Program / SKIM : Insentif Riset SINas
Jumlah Dana / Nilai kontrak : Rp 300.000.000,00

I. Jumlah Dana Tahap I : 30% X Rp 300.000.000		Rp 74.168.192
II Jumlah Dana Tahap II : 50% X Rp 300.000.000		Rp 123.613.636
III. Dropping Dana dari Rektor		Rp 197.781.828
No	Uraian	Jumlah Rp
1	Pembelian media transport	Rp10.000.000
2	Pembelian PBS	Rp 5.000.000
3	Pembelian Reagen Ekstraksi RNA dari Qiagen Kit	Rp 50.000.000
4	Pembelian Reagen PCR	Rp 50.000.000
5	Pembelian steril water	Rp 1.200.000
6	Pembelian TAB	Rp 15.000.000
7	Pembelian tabung eppendorf 1,5 ml dan 200 µL	Rp 4.000.000
8	Pembelian Blue tip, yellow tip dan white tip	Rp 5.000.000
9	Pembelian spuit 1 ml dan 3 ml	Rp 5.000.000
10	Pembelian Reagen Sekuensing	Rp 15.000.000
11.	Pembelian Enzim	Rp 22.500.000
12	Perjalanan Pengambilan sampel ke lapangan	Rp 10.000.000
13.	Honor Peneliti	Rp 15.000.000

Surabaya, 5 November 2012
Ketua Pelaksana

Mengetahui,
Ketua LPPM Unair,

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si
NIP 195908051987011 001

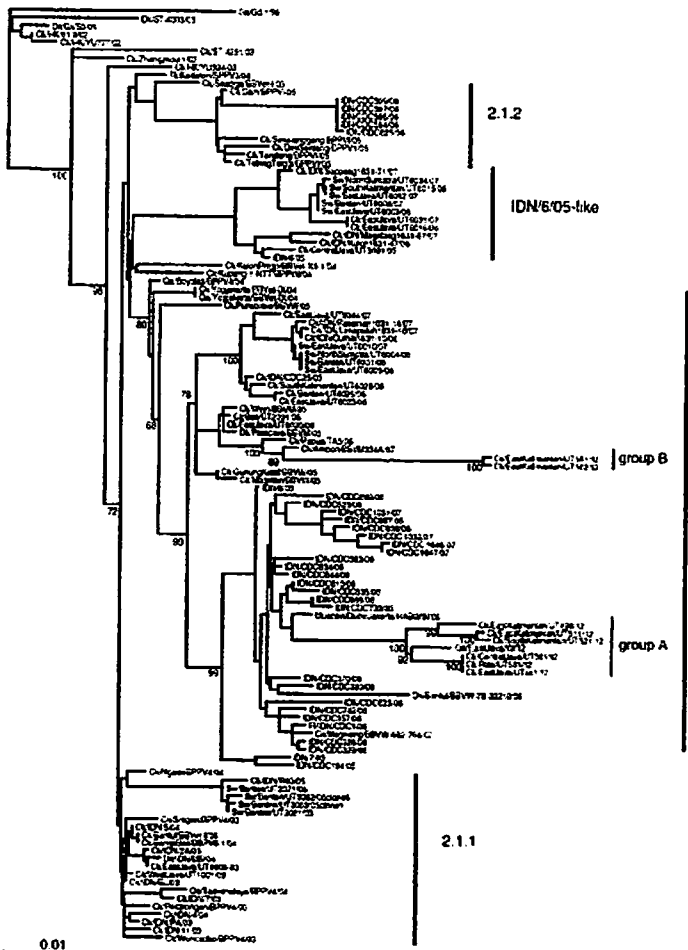
Kadek Rachmawati, drh., M.Kes
NIP 19680725 199702 2 001

DAFTAR PUSTAKA

- Asmara W, 2007. Peran Biologi Molekuler Dalam Pengendalian Avian Influenza Dan Flu Burung. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta 12 Maret 2007
- Capua I, and Marangon S, 2006. Control of Avian Influenza in Poultry. *Emerging Infectious Diseases* Vol.12 No.9:1319-1323.
- Horimoto T, Kawaoka Y, 2001. Pandemic Threat Posed By Avian Influenza A Viruses. *Clin Microbiol. Rev* 14:129-149
- Horimoto T and Kawaoka Y, 2005. Influenza : Lessons lish from past pandemics, warnings from current incidents. Nature Publishing group. Vol 3.
- Knipe DM, Peter MH, 2007. *Fields Virology*. 5th edition vol 2 Lippincott Williams & Wilkins 1691-1740
- Kobasa D, Jones SM, Sinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, Hatta Y, Kim JH, Halfmann P, Hatta M, Feldmann F, Alimonti JB, Fernando L, Li Y, Katze MG, Feldmann H, and Kawaoka Y, 2007. Aberrant Innate Immune Response In Lethal Infection of Manaqes with the 1918 Influenza Virus. *Nature* Vol 445 18 Jan 2007
- Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Amerongen GV, and Osterhaus ADM, 2003. Pathology of Human Influenza A (H5N1) Virus Infection in Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Vet Pathol* 40:304-310.
- Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, and Webster RG, 2004. Influenza : Emergence and Control *J Virol* 78:8951-8959.
- Mansfield KG, 2007. Viral Tropism and Pathogenesis of Influenza in the Mammalian Host. *The American Journal of Pathology*. 171:1089-1092.
- Neumann G, Noda T, and Kawaoka Y, 2009. Emergence and Pandemic Potential of Swine-origin H1N1 Influenza Virus. *Nature* Vol.459 : 18 June 2009/doi:10.1038/nature08157
- Nidom CA, 2005. Analisis Molekuler Genoma Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. Disertasi Doktor. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Nidom CA, Priyatna Y, Zarkasie K, 2006. Surveilans Virus Avian influenza H5N1 pada Babi dan Kucing Serta Analisis Filogenetik dengan Virus yang Menginfeksi Ayam dan Manusia. Dikti Depdiknas.
- Nichol ST, Arikawa J, and Kawaoka Y, 2000. Emerging Viral Disease. *PNAS* 97: 12411-12412

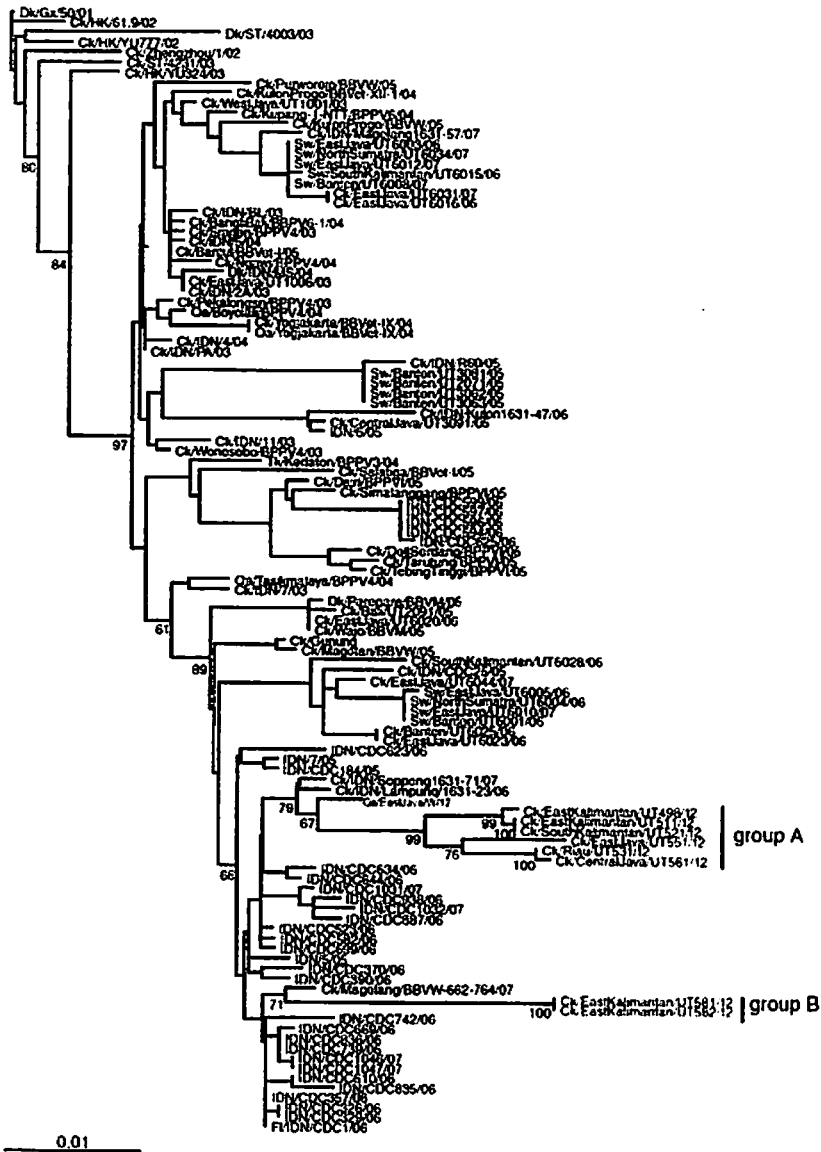
- Raharjo J, dan Nidom CA, 2004. *Avian Influenza : Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan*. GITA Pustaka. ISBN: 979-98585-0-X.
- Reviany VN, Yamaoka M, Nidom CA, Mubawadi T, Purwanto D, Ginting ET, Sinya K, Muramoto Y, Takano R, Kawaoka Y, 2008. *Surveillance of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Indonesia*. Asia Africa Research Forum (AARF). Hokkaido-Japan.2008.
- Swayne DE, Garcia M, Beck JR, Kinney N, and Suarez DL, 2000. *Protection Against Diverse Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Chickens Immunized with a recombinant Fowl Pox Vaccine Containing an H5 Avian Influenza Hemagglutinin Gene Insert Vaccine*. 18:1088-1095.
- Swayne DE, 2008. *Avian Influenza*. Blackwell Publish.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, and Kawaoka Y, 1992. *Evolution and Acology of Influenza A Viruses*. *Microbiological Reviews*.56(1).152-179.
- WHO, 2008. *Update on Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in Humans*. *N Engl of Med* 2008 358:261-273.
- WHO, 2009. *Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO*. Available via; http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_04_21/en/index.html. Accessed at 24 Apr 2009.
- Zhou NN, Shortridge KF, Claas ECJ, Krauss SL, Webster RG, 1999. *Rapid Evolution of H5N1 Influenza Viruses in Chickens in Hongkong*. *J Virol* 73:3366-3374.
- Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Wun-Ju Shieh, Zaki S, and Katz JM, 2002. *Pathogenesis of Avian Influenza A (H5N1) Viruses in Ferrets*. *Journal of Virology*. Vol.76 No.9 : 4420-4429.

Lampiran 1



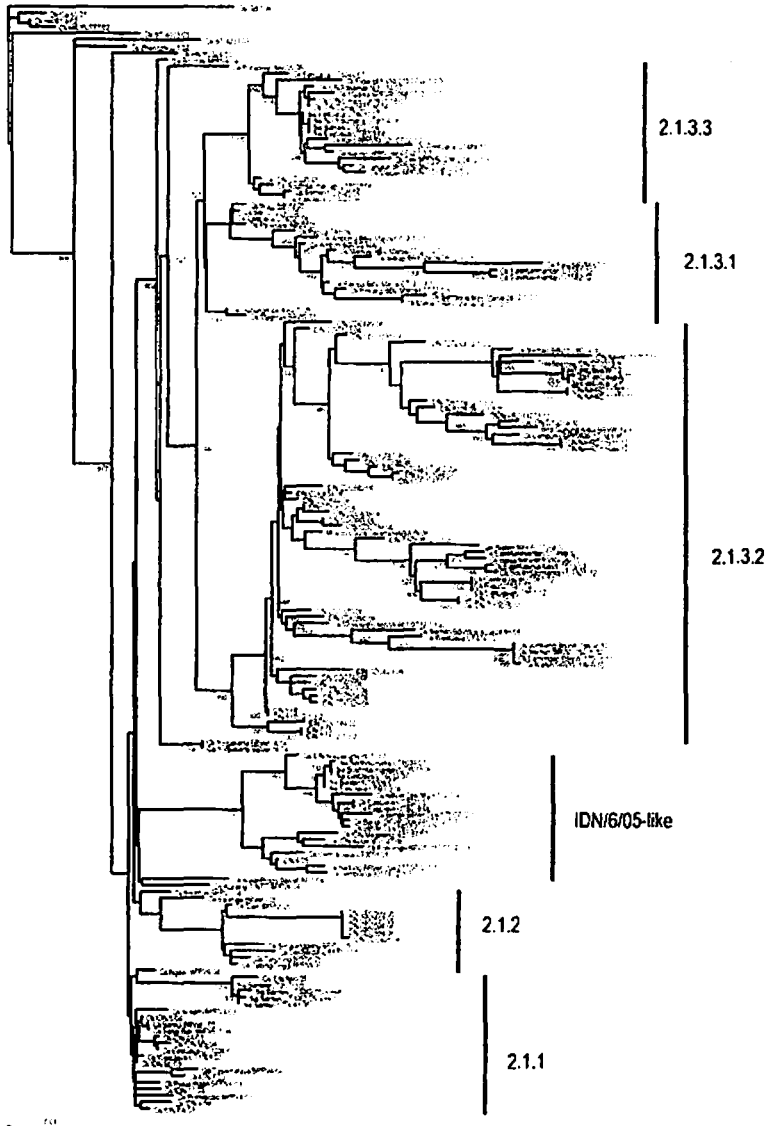
Pohon Filogenetik Gen HA

Lampiran 2



Pohon Filogenetik Gen NA

Lampiran 3



Pohon Filogenetik Gen PB2