

LAPORAN

Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch 1

(Klaster Gizi & Kesehatan)

Tahun Anggaran 2009



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**Molecular dan Sero-Surveillance Virus Avian Influenza
H5N1 Terhadap Potensial Reservoir di Kota Surabaya:
Suatu Analisis Potensi Penyebaran Dan Upaya
Antisipasi**

**Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh (Ketua)
Muchammad Yunus, Ph.D., M.Kes., Drh (Anggota)**

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen
Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah
Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Nomor:
171/SP2H/PP/DP2M/V/2009, Tanggal 30 Juli 2009**

**Universitas Airlangga
Desember 2009**

LAPORAN

Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch I

(Klaster Gizi & Kesehatan)

Tahun Anggaran 2009

44C
44
LP. 135 / 10
Etn
m



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Molecular dan Sero-Surveillance Virus Avian Influenza
H5N1 Terhadap Potensial Reservoir di Kota Surabaya:
Suatu Analisis Potensi Penyebaran Dan Upaya
Antisipasi

Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh (Ketua)
Muchammad Yunus, Ph.D., M.Kes., Drh (Anggota)

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen
Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah
Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Nomor:
171/SP2H/PP/DP2M/V/2009, Tanggal 30 Juli 2009

Universitas Airlangga
Desember 2009

LEMBAR PENGESAHAN

1. Judul Kegiatan/Riset : Molecular dan Sero-Surveillance Virus Avian Influenza H5N1 Terhadap Potensial Reservoir di Kota Surabaya: Suatu Analisis Potensi Penyebaran dan Upaya Antisipasi
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama Lengkap : Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc.,Drh.
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 130 531 805
 - d. Pangkat/Golongan : Pembina/IVb
 - e. Jabatan fungsional : Guru Besar
 - f. Bidang Keahlian : Imunologi
 - g. Fakultas : Kedokteran Hewan
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No.	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh	Imunologi	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
2.	Muchammad Yunus, Drh., M.Kes., Ph.D.	Biologi Molekuler	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian :
 - a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
 - b. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000,-
 - c. Biaya yang disetujui : Rp. 85.000.000,-

Surabaya, 13 Desember 2009

Ketua Peneliti,



Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Airlangga

Prof. H. Romziah Sidik, Ph.D., Drh.
NIP. 130 687 305

Prof. Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh
NIP. 130 531 805



Mengetahui
Pimpinan Unit Pelaksana Riset
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Prof. Dr. Bambang Sektiari, L., DEA., Drh
NIP. 131 837 004

RINGKASAN

Secara kontinu virus Influenza dapat menyebabkan keadaan epidemik dan pandemik yang dapat membawa korban jiwa jutaan manusia meninggal, sebagaimana wabah pada tahun 1918 dan kehilangan potensi ekonomi yang sangat besar. Virus Influenza H5N1 merupakan pemicu terjadi wabah influenza akhir-akhir ini yang telah menyebar ke beberapa benua yaitu Asia, Eropa dan Afrika. Wabah penyakit Avian Influenza (AI) atau juga dikenal sebagai Flu Burung terjadi di Indonesia sejak pertengahan tahun 2003. Secara resmi pemerintah mengumumkan kepada masyarakat Indonesia bahwa telah terjadi wabah penyakit AI pada ayam dan unggas lainnya di Indonesia pada tanggal 25 Januari 2004. Berdasarkan laporan resmi tersebut telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor. Sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat 6,2 juta ekor. Unggas yang banyak terserang yaitu ayam petelur, ayam bibit, ayam pedaging, bebek dan burung puyuh. Daerah yang terserang kebanyakan berada di pulau Jawa, yaitu propinsi Jawa Timur sebanyak tiga belas kabupaten; Jawa Tengah sebanyak tujuh belas kabupaten; Jawa Barat enam kabupaten; Banten satu kabupaten; Daerah Istimewa Yogyakarta sebanyak tiga kabupaten. Sementara itu wilayah luar Jawa yang terserang meliputi Propinsi Bali sebanyak lima kabupaten; Lampung tiga kabupaten; Kalimantan Selatan satu kabupaten; Kalimantan Timur satu kabupaten dan Kalimantan Tengah satu kabupaten (Rahardjo dan Nidom, 2004).

Pemerintah Indonesia pada pertengahan Juli 2005 telah mengumumkan bahwa keluarga yang terdiri dari Bapak dan dua anak dari Kota Tangerang, Propinsi Banten yang meninggal dengan gejala klinis bronkhopneumonia disebabkan oleh virus Avian Influenza H5N1. Hal ini setelah menerima hasil konfirmasi dari laboratorium rujukan Badan Kesehatan Dunia (WHO) di Hong Kong (Kompas, 20 Juli 2005).

Dengan menggunakan analisis molekuler berdasar metode Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk mendiagnosa penyebab penyakit yang telah mewabah tersebut, telah diketahui subtype virus AI tersebut. **Metode PCR ini di samping menggunakan pemicu (primer) dan gen PB2 dengan hasil 600 pasang basa. Hasil PCR tersebut selanjutnya dilakukan sekuensing dan hasilnya dilakukan analisis homologi dengan data nukleotida dari GenBank.**

Virus AI merupakan virus Influenza A yang menginfeksi unggas. Namun selain unggas, virus Influenza A dapat juga menginfeksi beberapa spesies mamalia, meskipun yang dipercayai sebagai inang alamiahnya yang bertindak sebagai penyimpan (reservoir) adalah unggas air liar yang termasuk dalam ordo *Anseriformes* dan *Charadriiformes* (Suarez *et al.*, 1998).

Meskipun virus Influenza A merupakan suatu agen yang bersifat enzootik pada unggas air liar, tetapi mekanisme penularan pada mamalia masih belum jelas benar. Faktor-faktor yang mempengaruhi adalah genetik virus lingkungan (Suarez *et al.*, 1998).

Hewan selain unggas yang telah terinfeksi oleh virus Avian Influenza subtype H5N1, yaitu macan, kucing dan leopard. Kenyataan ini menimbulkan suatu fenomena baru, karena ketiga macam hewan ini sebelumnya tidak pernah

dilaporkan rentan terhadap infeksi Avian Influenza (Kuiken *et al.*, 2004; Keawcharoen *et al.*, 2004).

Virus Influenza termasuk dalam famili Orthomyxoviridae dengan tiga macam tipe yaitu tipe A, tipe B dan tipe C. Pembagian ketiga tipe ini berdasarkan sifat antigenik yang terdapat pada gen matriks dan nukleoprotein. Tipe A dan B memiliki delapan macam fragmen gen yang dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu gen eksternal dan gen internal.

Gen eksternal terdiri dari gen hemagglutinin (HA) dan gen neuraminidase (NA) yang bersifat antigenik dan berfungsi dalam perlekatan pada sel hospes (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Harder dan Werner, 2006). Gen internal terdiri dari gen *polymerase basic 2* (PB2), *polymerase basic 1* (PB1), *polymerase acidic* (PA), *nucleoprotein* (NP), *matriks* (M) dan *non-structural* (NS). Gen internal ini berfungsi dalam replikasi dan transkripsi virus. Masing-masing fragmen menghasilkan satu macam protein, kecuali fragmen M dan fragmen NS, yaitu masing-masing menghasilkan dua macam protein, yaitu protein M1 dan M2 serta protein NS1 dan NS2 (Horimoto dan Kawaoka, 2001).

Pembagian sub tipe virus Influenza A didasarkan pada glikoprotein Hemagglutinin dan Neuraminidase. Sampai saat ini virus Influenza A memiliki 15 macam protein HA dan 9 macam protein NA. Asam amino yang terdapat pada *cleavage site* protein HA dapat digunakan untuk membedakan virulensi virus Influenza. Umumnya virus Influenza mempunyai asam amino arginin (R) pada ujung karboksil HA1 dan asam amino glisin (G) pada ujung amino HA2. Urutan nukleotida atau asam amino pada regio HA1 yang berperan sebagai antigenisitas merupakan faktor pembeda antar sub tipe. Perbedaan antar sub tipe pada regio ini minimal sebesar 30% (Horimoto and Kawaoka, 2001).

Sebagai reservoir seluruh sub tipe virus influenza pada umumnya adalah unggas air, terutama bebek, shorebirds dan burung camar. Pada unggas air ini, virus Influenza melakukan replikasi terutama di saluran pencernaan, sehingga dalam ekskretannya banyak terkandung virus influenza. **Analisis genom dan filogenetik dapat digunakan untuk mengetahui asal usul dari virus influenza yang terdapat di suatu tempat.**

Ternak babi sebagai hewan yang mempunyai peran untuk menimbulkan terjadinya penataan genetik ternyata masih banyak menimbulkan perdebatan. Hewan ini mempunyai dua macam reseptor yaitu 2,3 α asam sialat yang merupakan reseptor spesifik untuk virus Avian Influenza, disamping itu juga mempunyai reseptor 2,6 α asam sialat yang merupakan reseptor spesifik untuk virus Human Influenza. Berdasarkan kejadian di Eropa telah menunjukkan hipotesis tersebut yaitu terjadi penataan ulang (*reassortment*) antara fragmen-fragmen genom virus Avian Influenza sub tipe H1N1 dengan virus Human Influenza sub tipe H3N2 pada babi, kemudian virus hasil penataan ulang ini memudahkan terjadinya penularan pada anak-anak di Belanda (Horimoto and Kawaoka, 2001; Class *et al.*, 1994).

Keadaan yang terjadi pada babi tersebut lebih sering disebut dengan istilah *antigenic shift*. Perubahan ini terjadi secara drastis yang dapat menghasilkan sub tipe baru dan kalau sub tipe baru ini menginfeksi manusia, maka sistem imun manusia tidak akan tanggap terhadap sub tipe baru ini. Keadaan ini dapat menimbulkan kejadian epidemi global atau pandemi. Sifat ini hanya dimiliki oleh virus Influenza A. Penataan ulang fragmen virus Influenza tidak hanya terbatas

pada gen tertentu saja misalnya gen HA dan NA saja tetapi ke delapan fragmen memungkinkan mengalami penataan ulang. Penataan ulang fragmen virus Influenza ini mempunyai rentang waktu antara 8 sampai 10 tahun.

Sebaliknya perubahan antigenitas virus Influenza A yang bersifat tidak drastis dapat terjadi karena adanya mutasi titik, sehingga terjadi perubahan secara gradual yang disebut dengan *antigenic drift*. Mutasi titik ini tidak akan menghasilkan subtipe baru, melainkan hanya terjadi dalam satu subtipe. *Antigenic drift* ini memungkinkan terjadinya epidemi tahunan dengan wabah ulangan setiap satu sampai lima tahun.

Respon imun yang timbul dalam tubuh baik oleh infeksi alam, maupun akibat program vaksinasi dapat menimbulkan tekanan pada fragmen HA maupun fragmen NA yang akan menyebabkan terjadinya *antigenic drift*, sehingga adanya virus Influenza A ini di alam maupun penggunaan vaksin Influenza diperlukan koreksi dengan interval tertentu terhadap virus (seed) yang digunakan (Tamura and Kurata, 2004; Seo *et al.*, 2002).

Berdasarkan beberapa hasil survei terhadap bebek, ayam kampung, kucing dan pasar tradisional diduga dan berpengaruh terhadap penyebaran flu burung pada beberapa wilayah di Indonesia termasuk **Surabaya**. Ada beberapa alasan yang dapat dijadikan dasar atas dugaan dan pengaruh (memiliki hubungan signifikan) terhadap penyebaran penyakit flu burung (Avian Influenza/AI) tersebut. Beberapa alasan yang dimaksud adalah: 1. Bebek ditengarai mempunyai hubungan yang signifikan dengan kasus Flu Burung pada ayam dan manusia ; 2. Pasar tradisional/pasar becek mempunyai hubungan yang erat dengan distribusi kasus Flu Burung pada manusia di sekitar pasar. 3. Jaringan jalan raya dan pasar tradisional memiliki hubungan yang signifikan dengan penyebaran flu burung pada manusia. Hasil survei yang dilakukan Departemen Kesehatan, Departemen Pertanian dan USAID menemukan bahwa pasar tradisional dan jaringan transportasi pengiriman unggas ayam menjadi sumber penularan virus flu burung (avian influenza/AI). Selain itu, survei juga menyimpulkan unggas jenis bebek sangat rentan menularkan virus mematikan tersebut.

Beberapa faktor yang dapat menjadi pemicu timbulnya pandemik virus Influenza H5N1 meliputi reassortment, penularan antar spesies secara langsung dan terjadinya mutasi yang akan menyebabkan virus menjadi lebih patogen. Mekanisme secara pasti perubahan yang terjadi pada virus influenza khususnya H5N1 sampai saat ini belum banyak diketahui. **Oleh karena itu penelitian ini pada dasarnya ingin mengetahui dan menerangkan faktor-faktor yang akan mengendalikan terjadinya infeksi, adaptasi dan dapat bertahannya virus ini pada spesies yang berfungsi sebagai inang baru, melalui studi surveilans virologi molekular dan pedeteksian secara sero surveillance.**

SUMMARY

Influenza virus continuously can cause epidemic and pandemic conditions with million human die impact as in 1918 epidemic, the high loss of economical potency. H5N1 virus is trigger of the date influenza epidemic and have been spread on Asia, Europe and Africa. Avian influenza (AI) is also known as bird flu in Indonesia from mid of 2003. Formally, Indonesia government announce to Indonesian people that have been happened AI epidemic at chicken and other avian in Indonesia at 25th January 2004. Based on that formal report, there has been 4.7 millions chickens die. Up to the end of February 2004, avian death was recorded 6.2 millions. The most infected avian are layer, parent stock, broiler, duck and quail. Generally, epidemic area is Java, East Java province is thirteen regencies; Center Java is seventeen regencies; West Java is six regencies; Banten is one regency; Yogyakarta is three regencies. While suffered out of Java included Bali is five regencies; Lampung is three regencies; South Kalimantan is one regency; East Kalimantan is one regency and Center Kalimantan is one regency (Rahardjo and Nidom, 2004).

On mid July 2005, Indonesian government has been announced that the family consisted of father and two children from Tangerang, Banten were death with clinical symptom, bronchopneumonia that caused AI virus (H5N1). This condition has been confirmed with confirmatory laboratory of WHO in Hongkong (Kompas, 20th July 2005).

Surveillance of local chicken, duck and cat on all areas of Surabaya invoved 5 areas traditional markets (eastern, western, nortern, southern and centre) by stratified random sampling. Screening all samples examination showed that the presence H5N1virus in various precentages. The highest precentage was Pacar Keling traditional market and the lowest was Manukan and Kapasan traditional markets, Pacar Keling, 64.2%; Keputran, 35.7%; Wonokromo, 34.2%; Manukan, 1.4%; Kapasan, 1.4%, respectively.

By molecular analyses using Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnose of the causer of that epidemic disease, it was known that AI virus subtype. PCR uses primer and gen PB2 with 600 bp.. The result of that PCR then sequenced and its result was done homolog analyses using nucleotide data of GenBank.

PRAKATA

Puji syukur kami ucapkan kehadiran Allah swt bahwa penelitian yang berjudul: Molecular dan Sero-Surveillance Virus Avian Influenza H5N1 Terhadap Potensial Reservoir di Kota Surabaya: Suatu Analisis Potensi Penyebaran dan Upaya Antisipasi ini telah selesai, maka dengan ini kami berharap hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai landasan teori bagi pengembangan penelitian lain yang berkaitan.

Pada kesempatan ini, kami sampaikan terimakasih kepada berbagai pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini, antara lain:

1. Menteri Pendidikan Nasional Republik Indonesia cq Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia
2. Prof. Dr. H. Fasich Apt., selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya
3. Prof. Dr. Bambang Sektiari L., DEA., drh., selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
4. Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh., selaku Dekan FKH Unair
5. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini hingga selesai

Kami menyadari bahwa laporan penelitian ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran kami harapkan untuk kesempurnaan hasil penelitian ini. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi dunia kesehatan, peternakan dan perkembangan ilmu dan teknologi.

Desember, 2009

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	i
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	ii
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	13
BAB IV METODE PENELITIAN	15
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	22
BAB VI KESIMPULAN	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing yang berasal dari Pasar Pacar Keling	28
Tabel 2. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing yang berasal dari Pasar Keputran.....	28
Tabel 3. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing yang berasal dari Pasar Wonokromo.....	28
Tabel 4. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing yang berasal dari Pasar Manukan.....	28
Tabel 5. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing yang berasal dari Pasar Kapasan.....	29
Tabel 6. Polimorfisme Asam Amino pada Amino Terminus Gen PB2 dari isolat Virus Avian Influenza H5N1 Asal Berbagai Spesies Hewan yang Diperoleh dari Data yang Tersedia di GeneBank	34

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1. Screening sampel dari Pasar Pacar Keling dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan: total sampel positif H5N1= 64,2% 22
- Gambar 2. Screening sampel dari Pasar Keputran dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan: total sampel positif H5N1= 35,7% 23
- Gambar 3. Screening sampel dari Pasar Wonokromo dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan: total sampel positif H5N1= 34,2%..... 23
- Gambar 4. Screening sampel dari Pasar Manukan dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan: total sampel positif H5N1= 1,4%24
- Gambar 5. Screening sampel dari Pasar Kapasan dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan: total sampel positif H5N1= 1,4%24
- Gambar 6. RT-PCR hasil amplifikasi NCR ujung -5 dan amino terminus gen PB2 dari virus AI H5N1 32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Sarana dan prasarana penunjang penelitian yang telah dimiliki.....40

BAB I PENDAHULUAN

Penyakit influenza pada unggas (Avian Influenza/AI) yang saat ini kita kenal dengan sebutan flu burung adalah penyakit yang disebabkan oleh virus influenza tipe A dari Family Orthomyxomiridae. Virus ini dapat menimbulkan gejala penyakit pernafasan pada unggas, mulai dari yang ringan (Low pathogenic) sampai pada yang bersifat fatal (highly pathogenic). Virus AI dibagi kedalam sub type berdasarkan permukaan Hemagglutinin (HA) dan Neoraminidase (NA) ada 15 sub type HA dan 9 jenis NA.

Virus Influenza ada tiga tipe, yaitu tipe A (pada unggas), tipe B dan C (pada manusia). Influenza tipe A terdiri dari beberapa strain, antara lain H1N1, H3N2, H5N1 dan lain-lain. Influenza A (H5N1) merupakan penyebab wabah flu burung yang sangat mematikan di Hongkong, Vietnam, Thailand, Indonesia dan Jepang. Di Indonesia Virus Influenza tipe A subtype H5N1 tersebut diatas menyerang ternak ayam sejak bulan Oktober 2003 s/d Februari 2005 akibatnya 14,7 juta ayam mati.

Masa inkubasi (saat penularan sampai timbulnya penyakit) avian influenza adalah 3 hari untuk unggas. Sedangkan untuk flock dapat mencapai 14 – 21 hari. Hal itu tergantung pada jumlah virus, cara penularan, spesies yang terinfeksi dan kemampuan peternak untuk mendeteksi gejala klinis (berdasarkan pengamatan klinik).

Pada akhir tahun 2003 di sejumlah Negara telah tertular penyakit influenza pada unggas dan bersifat mewabah (pandemi) seperti Korsel, Jepang, Vietnam,

Thailand, Taiwan, kamboja, Hongkong, Laos, RRC dan Pakistan termasuk Indonesia.

Data terakhir menunjukkan bahwa sebanyak 139 Kabupaten/Kota di 22 Provinsi telah tertular (dan menjadi daerah endemis) Avian Influenza, yaitu Jabar, Banten, DKI Jakarta, Bali, NTB, NTT, Lampung, Sumsel, Bengkulu, Bangka Belitung, Sumbar, Jambi, Sumut, Kalbar, Kalteng, Kalsel, Kaltim, Sulsel dan Sultra. Sedangkan Jatim dan Surabaya sebagai ibukota propinsi belum termasuk wilayah yang dikatagorikan endemis dan kondisi seperti perlu diantisipasi.

Penyakit ini menimbulkan kematian yang sangat tinggi (hampir 90 %) pada beberapa peternakan dan menyebabkan kerugian ekonomi yang besar bagi peternak. Kemungkinan penularan kepada manusia dapat terjadi apabila virus avian influenza bermutasi dan kemungkinan itu bisa terjadi karena sifat virus ini yang sewaktu-waktu dapat bermutasi.

Unggas (ayam, burung dan bebek) merupakan sumber penularan virus influenza. Untuk unggas air lebih kebal (resistensi) terhadap virus avian influenza daripada unggas peliharaan, Sedangkan burung kebanyakan dapat juga terinfeksi, termasuk burung liar dan unggas air.

Flu burung merupakan infeksi oleh virus influenza A Subtipe H5N1 (H = hemagglutinin; N = Neuraminidase), sampai saat ini tidak ditemukan bukti ilmiah adanya penularan antar manusia. Tetapi pada keadaan sekarang ini virus flu burung belum mengalami mutasi pada manusia yang dapat mengakibatkan penyebaran dari manusia ke manusia.

Skenario menakutkan yang sedang dikaji Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mengingatkan dunia soal wabah flu Spanyol tahun 1918-1919. Saat itu

virus flu muncul dan menyebar ke seluruh dunia hanya dalam waktu enam bulan. Serangan ini telah mengakibatkan 40 juta orang meninggal dunia. Dua kasus pandemi flu lainnya juga pernah meledak tahun 1957 dan 1968. Pandemi tahun 1957 menewaskan empat juta orang dan pandemi 1968 menewaskan dua juta orang. Pandemi adalah sebutan bagi wabah yang terjadi serempak di kawasan geografi yang luas.

Kasus Flu Burung dalam perkembangan, bukan menyerang pada unggas saja, tetapi juga menyerang manusia. Pada Tahun 1997, 18 orang di Hongkong diserang flu burung, 6 orang meninggal dunia. Sementara data WHO yang telah dikonfirmasi untuk tahun 2003 di Vietnam ditemukan tiga kasus pada manusia dan ketiganya meninggal dunia (angka kematian 100 %), tahun 2004 kasus di Vietnam bertambah 29 kasus (20 meninggal), ditahun yang sama negara Thailand ada kasus Flu Burung pada manusia sebanyak 17 penderita (12 Penderita meninggal dunia). Tahun 2005: Vietnam 61 penderita (19 meninggal Dunia), Indonesia 16 Penderita (11 meninggal Dunia), Thailan 5 penderita (2 Meninggal Dunia), China 7 penderita (3 Meninggal Dunia), Kamboja 4 penderita (4 meninggal dunia) dan Turki 2 penderita dan keduanya meiniggal dunia.

Sementara penyebaran virus tersebut pada manusia di Indonesia sejak bulan Juli Tahun 2005 hingga 12 April 2006 telah ditemukan 479 kasus kumulatif yang dicurigai sebagai flu burung pada manusia, dimana telah ditemukan 33 kasus confirm flu burung, 24 diantaranya meninggal dunia. 115 Kasus masih dalam penyelidikan (36 diantaranya meninggal dunia), sementara yang telah dinyatakan bukan flu burung sebanyak 330 kasus.

Upaya untuk menekan danantisipasi penyebaran ke wilayah yang lebih luas seperti Surabaya perlu dilakukan mengingat kecepatan penyebaran yang tinggi. Untuk mewujudkan hal tersebut dilakukan surveilans dan gambaran genetik dari virus Avian Influenza subtipe H5N1 yang diisolasi dari potensial reservoir (ayam kampung, bebek dan kucing) di kota Surabaya sebagai wilayah masuknya berbagai komoditi perdagangan termasuk ayam kampung, bebek dari daerah-daerah Kabupaten disekitar Jawa Timur. Diikutsertakannya kucing sebagai obyek hewan untuk surveillence karena kucing termasuk potensial reservoir yang banyak keberadaannya di sekitar peternakan ayam kampung dan terjadi kontak antara ayam kampung dan kucing satu sama lain. Demikian juga karena kebanyakan sistem pemeliharaan ayam kampung di Indonesia yang cenderung menerapkan pencampuran ternak yang satu dengan lainnya, tanpa mengindahkan kaidah-kaidah kesehatan hewan, memungkinkan virus ini dapat menular kepada ternak atau hewan lainnya. Pada akhirnya penelitian yang dilakukan ini disamping untuk meminimalisasi kerugian ekonomi peternakan ayam akibat penyakit Avian Influenza, juga dapat dihindari timbulnya keadaan yang kritis pada masyarakat, antisipasi penyebaran virus Avian Influenza H5N1 di Kota Surabaya sebagai ibukota propinsi sebagaimana telah terjadi pada beberapa negara di dunia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Virus Avian Influenza

2.1.1 Etiologi dan Morfologi Virus Avian Influenza

Avian Influenza merupakan jenis penyakit viral yang tergolong ganas pada berbagai macam unggas yang menyerang saluran pernafasan, pencernaan dan sistem saraf. Penyakit Avian Influenza disebabkan oleh virus influenza (virus RNA) yang mempunyai aktifitas Hemaglutinin dan Neuraminidase dan tergolong dalam famili *Orthomyxoviridae*. Virus influenza terdiri dari tiga tipe antigenik yang berbeda yaitu tipe A, tipe B dan tipe C, dimana setiap tipe dari virus influenza ditentukan oleh struktur antigenik protein *nuclei* dan matrik antigen yang saling berhubungan erat di antara virus tertentu (Tabbu,2000; Harimoto dan Kawaoka, 2001). Virus influenza A ditemukan pada ayam, babi, kalkun, bebek, mentok, angsa, burung dan ikan paus. Selain itu, virus influenza A juga ditemukan pada manusia, sedangkan virus influenza C ditemukan pada manusia dan babi (Rantam,2004).

Virus influenza A dapat menyebabkan terjadinya epidemi dan pandemi pada mamalia dan unggas, sebab virus ini selain menginfeksi unggas juga dapat menginfeksi mamalia. Virus Influenza tipe B dan C dapat diisolasi dari manusia dan sifatnya kurang patogen dibandingkan dengan virus Influenza A. Perbedaan virus Influenza A dan B terdapat pada protein permukaan yang berfungsi sebagai saluran ion. Virus Influenza C mempunyai tujuh macam gen dan hanya mempunyai satu macam glikoprotein yaitu *Haemagglutinin-esterase-fusion* (HEF)

yang berfungsi seperti protein hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) pada tipe virus yang lain (Whittaker, 2001).

Bentuk virus influenza adalah pleomorfik, ovoid, sferik atau filamen dengan ukuran diameter 80-120 nm. Virus ini memiliki *envelope* dan memiliki genom ss RNA bersegmen sehingga dapat terjadi *genetic reassortment* (Rahardjo, 2004) dan memiliki struktur antigen permukaan seperti hemagglutinin (HA), neurominidase (NA), matriks protein dan nukleoprotein (NP) (Rantam, 2003). Virus Avian Influenza terdiri atas 15 subtipe (berdasarkan atas kandungan hemagglutinin) dan terdiri 9 subtipe (berdasarkan atas kandungan Neurominidase) (Rahadjo, 2004).

Virus Influenza A merupakan virus RNA dengan genom yang terdiri dari delapan gen RNA dan menghasilkan sepuluh protein. Kedelapan fragmen gen ini terbagi menjadi dua bagian yaitu gen eksternal dan gen internal. Gen eksternal terdiri dari gen hemagglutinin (HA) dan gen neuraminidase (NA) yang bersifat antigenik dan berfungsi dalam perlekatan pada sel hospes (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Harder dan Werner, 2006). Gen internal terdiri dari gen *polymerase basic 2* (PB2), *polymerase basic 1* (PB1), *polymerase acidic* (PA), *nucleoprotein* (NP), *matriks* (M) dan *non-structural* (NS). Gen internal ini berfungsi dalam replikasi dan transkripsi virus. Masing-masing fragmen gen virus Avian Influenza A menghasilkan satu macam protein, kecuali fragmen M dan fragmen NS, yaitu masing-masing menghasilkan dua macam protein, yaitu protein M1 dan M2 serta protein NS1 dan NS2 (Horimoto dan Kawaoka, 2001).

Hemagglutinin merupakan molekul glikoprotein selubung virus yang berfungsi untuk mengikatkan virus ke reseptor sel target dan mengawali

terjadinya infeksi. Selain dibutuhkan virus untuk melepas keturunan virus dari sel yang terinfeksi enzim neurominidase juga mempunyai aktifitas untuk melepas ikatan hemaglutinin dan permukaan eritrosit (Treanor, 2001).

Variasi antigenik pada virus influenza dapat ditemukan dengan frekuensi yang tinggi dan melalui dua cara, yaitu *drift* dan *shift*. Sifat *antigenic drift* merupakan keadaan virus A1 yang mengalami mutasi urutan nukleotida pada gen HA atau NA atau keduanya yang menyebabkan antibodi tidak bisa secara lengkap menetralsasi virus ini. Perubahannya bersifat terbatas (minor), tetapi subtipe nya tetap sama. Sedangkan sifat *antigenic shift* merupakan aktivitas dari dua macam virus Avian Influenza A yang menghasilkan segmen gen baru sebagai hasil rekombinan genetik. Aktivitas ini mengakibatkan antibodi yang sudah terbentuk di dalam tubuh tidak dapat menetralkan sama sekali terhadap virus baru tersebut. Jadi aktivitas ini akan menghasilkan sub tipe baru. Perubahannya dominan (mayor) dan dapat menimbulkan keadaan pandemik (Rahardjo, 2004).

2.1.2. Sifat Virus A1

Virus Avian Infuenza bersifat inaktif pada suhu 56 C selama tiga hari dengan temperatur 60°C selama tiga menit, pH asam, bahan kimia (oksidator, sodium doedecyl sulphate, lipid solven, B Propiolakton), desinfektansia (formalin dan senyawa Iodium), tetapi dapat bertahan lama pada jaringan hewan, feses dan air (Treanor, 2001).

Virus Avian Influenza terlindung oleh bahan organik yang ada dalam kandang seperti lendir, darah dan tinja. Virus Avian Influenza masih tetap infeksi f dalam feses selama 30-35 hari pada temperatur 4°C selama tujuh hari pada

temperatur 20°C. Virus influenza yang bersifat infeksius dapat diisolasi dari cairan kotoran ayam selama 105 hari setelah depopulasi ayam pada saat terjadinya letupan Avian Influenza. Virus influenza dapat bertahan lama dengan kondisi lembab dan dingin serta dapat diisolasi dari air danau atau air kolam yang terletak di daerah yang banyak dihuni oleh unggas air. Virus influenza bisa tumbuh di dalam telur ayam bertunas (TAB) yang berumur 9-11 hari. Virus ini juga tumbuh pada kultur jaringan *chicken embryo fibroblast* (CEF) dan uji *in vivo* bisa dilakukan pada ayam, kalkun dan itik (Tabbu, 2000).

2.1.3. Tingkat Keganasan

Virus Avian Influenza dikategorikan dalam patotipe yang berbeda berdasarkan kemampuannya untuk menyebabkan penyakit yang ringan atau ganas. Secara umum virus Avian Influenza dibedakan menjadi dua yaitu HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) dan LPAI (*Low Pathogenic Avian Influenza*) (Rahardjo, 2004).

Virus HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) bersifat tropisme untuk berkembang biak pada alat pernafasan, pencernaan, sistem saraf dan peredaran darah sehingga mampu menyerang dan merusak semua organ tubuh. Salah satu tanda *Highly Pathogenic Avian Influenza* adalah tingkat kematian yang sangat tinggi, yaitu mencapai 100 %. Virus yang bersifat HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) seperti H5 dan H7 mudah mengalami mutasi dan keganasannya ditentukan oleh waktu, tempat dan inang yang terinfeksi (Rahardjo, 2004). Hewan yang terinfeksi virus influenza yang bersifat LPAI (*Low Pathogenic Avian Influenza*) ini dapat sembuh dalam waktu seminggu dengan gejala pernafasan.

Hewan yang sembuh ini biasanya menularkan virus melalui tinjanya. Virus *Low Pathogenic Avian Influenza* mampu mengalami mutasi antigenik menjadi *Highly Pathogenic Avian Influenza*. Kematian akibat *Highly Pathogenic Avian Influenza* berlangsung cepat dan didahului dengan gejala pernafasan atau kadang tanpa gejala (Horimoto dan Kawaoka, 2001).

2.1.4. Penularan

Virus Avian Influenza dikeluarkan dari hidung, mulut, konjungtiva dan kloaka hewan yang terinfeksi. Hal ini karena virus Avian Influenza berkembang biak dalam saluran pencernaan, pencernaan, ginjal atau sistem reproduksi (Tabbu, 2000).

Virus ditularkan melalui kontak langsung dari unggas yang terinfeksi dan unggas peka melalui saluran pernafasan, konjungtiva dan tinja. Penularan juga dapat terjadi secara tidak langsung, misalnya melalui debu yang mengandung virus, ransum, air minum, kendaraan, burung, mamalia dan lain-lain (Tabbu, 2000).

Transmisi virus A1 sub tipe H5 yang menyerang peternakan terjadi melalui mekanisme : a) Transmisi langsung dari sekresi (feses dan sekresi saluran respirasi) burung yang terinfeksi; b) Telur yang terkontaminasi virus dalam inkubator dan pecah dapat menginfeksi anak ayam yang sehat (OIE, 2002); c) Peralatan kandang yaitu tempat telur ayam, truk pengangkut pakan, pakaian dan sepatu dari pekerja; d) Tempat air minum ternak yang terkontaminasi; e) Tempat sampah.

2.1.5. Patogenesis

Tahap pertama infeksi virus Avian Influenza terjadi secara inhalasi (menghirup) atau ingesti (memakan) virus Avian Influenza. Pada tahap kedua, virion masuk ke submukosa melalui kapiler, kemudian virus mengalami replikasi di dalam sel endotel dan menyebar melalui sistem peredaran darah atau sistem limfatik untuk selanjutnya menginfeksi sel organ visceral, otak dan kulit. Gejala klinis dan kematian disebabkan karena kegagalan multiplikasi organ.

Kerusakan yang disebabkan oleh virus Avian Influenza H5N1 ini berasal di antara satu dari tiga proses berikut:

1. Proses perbanyakan virus secara langsung dalam sel, jaringan dan otak
2. Efek secara tidak langsung dari produksi mediator seluler seperti sitokin
3. Ichemic (suplai darah yang tidak mencukupi) akibat adanya bekuan darah (thrombus) dalam jantung atau pembuluh darah.

Tahap ketiga dari patogenesis penyakit Avian Influenza yaitu replikasi virus biasanya terbatas pada saluran pernafasan atau pencernaan. Kematian dapat terjadi akibat kerusakan pada saluran pernafasan khususnya jika terjadi komplikasi dengan infeksi sekunder oleh bakteri. Virus Avian Influenza H5N1 juga dapat menyebar secara sistemik, memperbanyak diri dan menimbulkan kerusakan pada ginjal dan sel-sel organ yang lain (Radji, 2006).

2.1.6. Gejala Klinis

Masa inkubasi berkisar antara beberapa jam sampai 3 hari, tergantung dosis virus, rute kontak dan spesies yang terserang. Gejala penyakit sangat bervariasi dan tergantung pada spesies yang terinfeksi, galur virus dan faktor lingkungan.

Gejala yang terlihat dapat berbentuk gangguan pada saluran pernafasan, pencernaan, reproduksi atau sistem saraf (Tabbu, 2000).

Virus influenza tipe A dari berbagai subtipe dapat menimbulkan penyakit dengan derajat keparahan yang berbeda, mulai dari penyakit yang menyebabkan mortalitas yang tinggi dengan kematian yang mendadak tanpa didahului oleh gejala klinis tertentu atau hanya menunjukkan gejala yang ringan sampai pada bentuk penyakit yang sangat ringan atau tidak tampak secara klinis (Tabbu, 2000).

2.1.7. Diagnosa

Sehubungan dengan adanya gejala klinis dan perubahan patologis yang bervariasi maka diagnosis definitif hanya didasarkan atas isolasi dan identifikasi virus. Diagnosa sangkaan dapat didasarkan atas riwayat kasus, gejala klinis, perubahan patologis dan tidak adanya penyakit pernafasan yang lain (Beard, 2004).

Diagnosa Banding

Penyakit yang mirip dengan Avian Influenza adalah Newcastle Disease (ND), Infectious Bronchitis (IB), Infectious Laryngotrachitis (ILT), Swollen Head Syndrome (SHS), Avian Mycoplasmosis dan penyakit bakterial yang akut seperti Cholera dan *Escherichia coli* (Tabbu, 2000; Beard, 2004).

2.1.8. Pengendalian dan Pencegahan

Prinsip dasar kontrol penyakit viral adalah mencegah kontak antara hewan peka, hewan yang terinfeksi dan material yang telah tercemar virus. Sehubungan dengan hal tersebut, maka sangat penting untuk memisahkan unggas yang sensitif

dari unggas yang terinfeksi. Dalam hal ini, pengamanan biologis (biosecurity) adalah pertahanan yang paling depan (Tabbu, 2000).

Biosecurity merupakan hal yang penting dalam kontrol dan pencegahan penyakit ini, yaitu meliputi:

- Tata letak peternakan terisolasi untuk menghindari kontak dengan burung liar terutama unggas air.
- Unggas lain selain ayam komersial dicegah masuk lokasi kandang, terutama ayam dari daerah yang diketahui terkena wabah Avian Influenza
- Memberikan desinfektan pada kandang dan peralatan secara tepat dan cermat
- Pemeliharaan ayam satu umur dan satu jenis di satu lokasi peternakan pada waktu bersamaan.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I

3.1. TUJUAN KHUSUS

Tujuan Jangka Pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai adalah :

1. Deteksi antibodi terhadap virus Avian Influenza H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing di berbagai area farm komersial layer di Jawa Timur
2. Menganalisis urutan nukleotida dan asam amino genoma virus Avian Influenza A H5N1 yang menginfeksi ayam kampung, bebek dan kucing di berbagai area farm komersial layer di Jawa Timur
3. Membandingkan urutan nukleotida dari genoma virus Avian Influenza H5N1 yang menginfeksi ayam kampung, bebek dan kucing.

Tujuan Jangka Panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai adalah :

1. Melakukan pemetaan virus Avian Influenza H5N1 yang menginfeksi ayam kampung, bebek dan kucing di berbagai area farm komersial layer di Jawa Timur
2. Melakukan analisis filogenetik virus Avian Influenza H5N1 ayam kampung, bebek, kucing dan manusia, sehingga diketahui asal virus Avian Influenza H5N1 yang menginfeksi manusia.

3. Antisipasi penyebaran virus Avian Influenza H5N1 berdasarkan sinergisme antara kebijakan stakeholder dan tindakan-tindakan yang berdasarkan prosedur yang benar dan terprogram serta berkelanjutan.

3.2. Manfaat Penelitian Tahun Ke I

Manfaat penelitian ini adalah mengetahui:

- a. Data serologi antibodi terhadap virus Avian Influenza H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing di berbagai pasar di wilayah Surabaya
- b. Analisis sero-surveillance virus Avian Influenza pada ayam kampung, bebek dan kucing
- c. Data deteksi baik dengan isolasi maupun *Polymerase Chain Reaction* (PCR) virus Avian Influenza pada ayam kampung, bebek dan kucing di berbagai area pasar di wilayah Surabaya
- d. Data karakteristik molekuler virus Avian Influenza H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing di berbagai pasar di wilayah Surabaya
- e. Analisa resiko virus Avian Influenza H5N1 dari ayam kampung, bebek dan kucing di berbagai pasar di wilayah Surabaya
- f. Saran peringatan dini adanya potensi terjadinya penyebaran infeksi yang lebih luas pada manusia atau mungkin sebaliknya, dengan menggunakan fakta dan analisa ilmiah.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Surveillance

Surveillance dilakukan terhadap obyek survey antara lain ayam kampung, bebek dan kucing diseluruh wilayah Kotamadya Surabaya yang meliputi 5 wilayah (Surabaya timur, barat, utara, selatan dan tengah) dengan sistem stratified random sampling.

Melakukan pengambilan **sampel darah** dan **tracheal swab** dari ayam kampung, bebek dan kucing. Lokasi pengambilan sampel: pasar tradisional, tempat pertama kali masuknya ayam kampung, bebek dari daerah pemasok. Kelompok kucing yang menjadi target adalah: kucing peliharaan di perumahan, kucing liar di pasar tradisional

4.2. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif dengan jenis penelitian observasional laboratorik dengan menggunakan fasilitas laboratorium BSL-3 (Biosafety level-3). Pada penelitian ini dilakukan analisis diversitas genetik gen-gen virus Avian Influenza yang menginfeksi ayam kampung, bebek dan kucing. Gen-gen tersebut meliputi gen polymerase basic 2 (PB2); gen polymerase basic 1 (PB1); gen polymerase acidic (PA); gen Hemagglutinin (HA); gen nucleoprotein (NP); gen Neuraminidase (NA); gen Matriks (M) dan gen non-struktural (NS).

4.3. Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Sampel

Serum yang diambil dari ayam kampung, bebek dan kucing dilakukan analisis pengujian antibodi terhadap virus H5N1 dengan menggunakan uji Hemaglutinin Inhibisi (HI).

Sampel hasil swap diinokulasikan pada Telur Ayam Bertunas (TAB) dan diinkubasi kemudian isolate cairan alantois yang menunjukkan uji HA positif dan memenuhi kriteria untuk diidentifikasi dengan menggunakan metoda *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) terhadap kedelapan gen virus AI tersebut. Selanjutnya hasil PCR dapat disekuensing dengan menghasilkan urutan nukleotida yang jelas dari masing-masing kedelapan gen tersebut.

Teknik Pengambilan Sampel

Usapan (swap) dari hidung dan trachea, diinokulasikan pada telur ayam bertunas (TAB) berumur 9 sampai 11 hari yang bersifat *specific pathogen free* (SPF). Selanjutnya diinkubasi pada inkubator 37°C selama 4 hari. TAB ini diamati setiap dua jam untuk *dicandling* embrionya. Bagi embrio yang mati sebelum 4 hari, dikeluarkan, kemudian disimpan pada suhu 4°C. Jika sampai 4 hari embrio ternyata masih hidup, maka TAB tersebut dimasukkan ke dalam refrigerator dengan suhu 4°C.

Setelah 24 jam TAB berada di refrigerator, cairan alantoisnya dipanen. Setiap sampel organ yang ditanam pada TAB sebanyak 2 sampai 3 butir. Cairan alantois selanjutnya diuji dengan *Haemagglutination test* (uji HA). Isolat-isolat

cairan alantois ini digunakan sebagai sampel penelitian. Isolat-isolat yang dihasilkan selanjutnya disimpan pada refrigerator dengan suhu -80°C .

4.4. Bahan Penelitian dan Pelaksanaan Penelitian.

Inokulasi Virus AI pada TAB

Usapan (swap) ditempatkan pada cairan bufer PBS isotonik dengan pH 7,0 - 7,4 yang berisi antibiotik atau menggunakan Medium Transport 199 yang berisi antibiotik. Antibiotik yang digunakan adalah penicillin 2000 unit per ml, streptomycin 2 mg per ml, gentamycin 50 ug per ml dan mycostatin 1000 unit per ml. Konsentrasi antibiotik tersebut digunakan jika sampelnya berupa organ, tetapi jika digunakan feses atau usapan kloaka maka konsentrasi antibiotik tersebut berlipat lima kali. Perbandingan feses atau gerusan organ dengan PBS 1:5. Suspensi ini setelah diinkubasi selama satu jam harus segera diinokulasikan pada TAB. Tetapi jika tidak memungkinkan, suspensi tersebut disimpan pada suhu 4°C .

4.5. Identifikasi Isolat AI dengan Uji Hemaglutinin

Sifat virus AI yang dapat mengaglutinasi sel darah merah, dapat digunakan untuk menentukan titer virus, sekaligus untuk menentukan secara kualitatif virus ini. Pada uji ini digunakan microplate yang berbentuk "V". Semua lubang pada plate tersebut diisi dengan PBS sebanyak 50 μl , kecuali lubang pada lajur A (A1 – A12).

Masukkan sebanyak 100 μl isolat masing-masing ke dalam lajur A (A1 – A12), kemudian dibuat pengenceran secara serial dengan cara mengambil 50 μl dari lajur A kemudian dituang ke lajur B. Setelah dicampur dengan rata diambil

dari lajur B sebanyak 50 μ l ritual ke lajur C. Demikian seterusnya sampai lajur H. Sisa 50 μ l dibuang. Semua lubang diisi dengan sel darah merah 0,1% sebanyak 50 μ l, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Langkah terakhir dilakukan penentuan titer virus AI.

4.6. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan asumsi semua perlakuan diusahakan sama dari pengambilan sampel sampai dengan pengerjaan serta kondisi laboratorium.

Data profil antibodi terhadap virus Avian Influenza H5N1 dari bebek, ayam kampung dan kucing dianalisis dengan analisis komparasi dan deskriptif. Analisis homologi sekuen nukleotida dari isolate yang positif berdasarkan hasil PCR, selanjutnya dilakukan sekuensing gen H5 dengan primer H5-1 dan H5-3 (produk 219 bp). Sekuensing dilakukan di 1st BASE dengan metode dideoksi menggunakan automatic sequenser (ABI, Applied Biosystem). Runutan nukleotida hasil sekuensing setiap gen disepadankan dengan program Clustal W dengan model Kimura 2-parameter yang diimplementasikan dalam program MEGA 3.1.

Untuk memudahkan perhitungan statistik pada data tambahan yang melengkapi hasil penelitian secara komprehensif yang bersifat kuantitatif digunakan *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 10.0. Bila didapatkan harga kemaknaan (signifikansi atau dan mendekati signifikansi) yang lebih besar dari harga $\alpha = 0,05$ maka hipotesis nol (H_0) diterima dan bila didapatkan harga kemaknaan (signifikansi atau dan mendekati signifikansi) yang lebih kecil dari harga $\alpha = 0,05$ maka H_0 ditolak.

4.7. Variabel Penelitian

Klasifikasi variabel

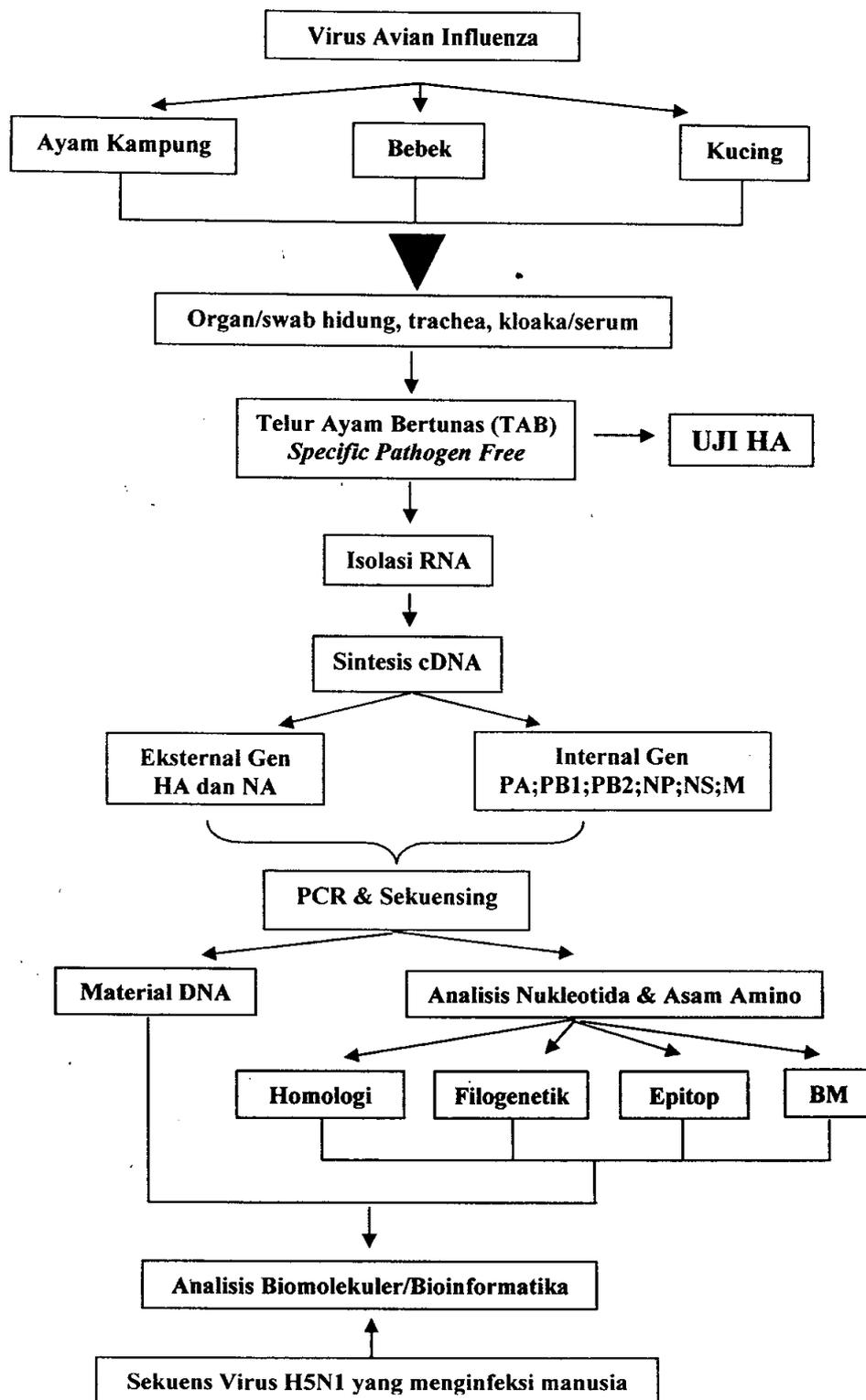
Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas (*independent variable*) yaitu darah dan *expected* antigen virus Avian Influenza H5N1 yang berasal dari swab, organ atau jaringan dari ayam kampung, bebek dan kucing.
2. Variabel tergantung (*dependent variable*) yaitu profil, titer antibodi dan karakter molekuler virus Avian Influenza H5N1 yang diekspresikan melalui urutan nukleotida dan asam amino genoma
3. Variabel kendali meliputi ketrampilan ahli madya sebagai kolektor sampel dan instrumen (apparatus) yang digunakan.

4.8. Prosedur Pengumpulan Data Penelitian

- Sampel swab kloaka dan darah untuk data dikoleksi dari pasar di 5 wilayah Surabaya
- Deteksi virus Avian Influenza H5N1 sampel (swab kloaka & darah) dari potensial reservoir (ayam, bebek dan kucing) menggunakan HA dan HI test
- Pengukuran konsentrasi atau titer antibodi terhadap virus Avian Influenza H5N1 menggunakan HI test
- RNA total diperoleh dengan RT-PCR dan sintesis cDNA dari RNA total, pita diperoleh melalui elektroforesis.
- Sequencing DNA menggunakan automatic sequenser (ABI, Applied Biosystem).

KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN



Hasil yang ditargetkan dari penelitian ini adalah mengetahui :

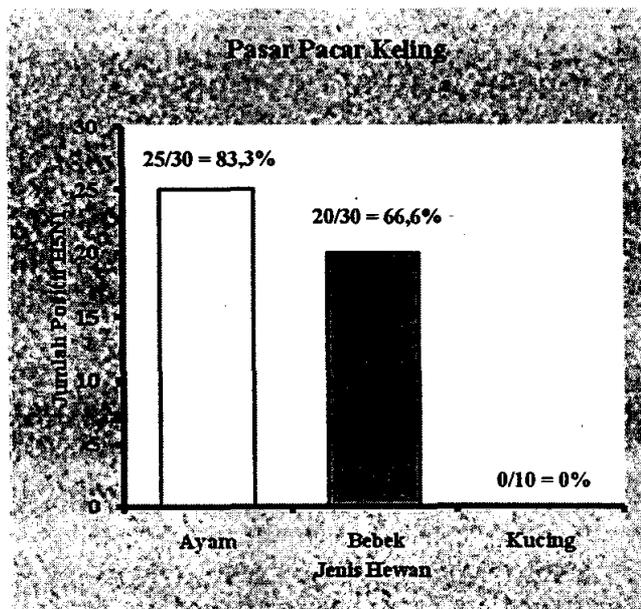
- g. Data serologi antibodi terhadap virus Avian Influenza H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing di Kota Surabaya
- h. Analisis sero-surveillance virus Avian Influenza pada ayam kampung, bebek dan kucing
- i. Data deteksi baik dengan isolasi maupun *Polymerase Chain Reaction* (PCR) virus Avian Influenza pada ayam kampung, bebek dan kucing di Kota Surabaya
- j. Data karakteristik molekuler virus Avian Influenza H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing di Kota Surabaya
- k. Analisa resiko virus Avian Influenza H5N1 dari ayam kampung, bebek dan kucing di Kota Surabaya.
- l. Saran peringatan dini adanya potensi terjadinya penyebaran infeksi yang lebih luas pada manusia atau mungkin sebaliknya, dengan menggunakan fakta dan analisa ilmiah.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

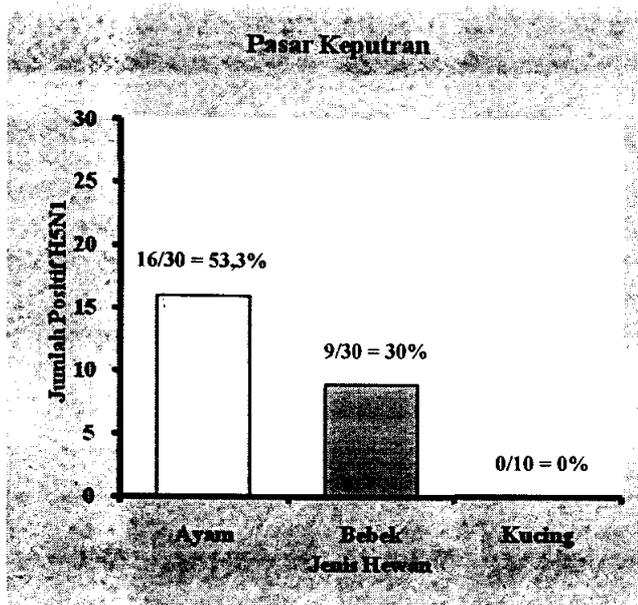
5.1. Hasil screening pemeriksaan sampel (swab kloaka ayam kampung dan bebek) dari seluruh pasar di wilayah Surabaya

Berdasarkan hasil screening pemeriksaan seluruh sampel (swab kloaka ayam kampung dan bebek) dari semua pasar yang merepresentasi pasar yang ada di wilayah kotamadya Surabaya menunjukkan hasil positif adanya infeksi virus flu burung (H5N1) dengan berbagai tingkatan persentase. Persentase tertinggi infeksi H5N1 pada unggas terdapat di pasar Pasar Pacar Keling dan terendah pasar Manukan dan Kapasan. Tingkatan persentase beberapa pasar di Surabaya berturut-turut (Pacar Keling, 64,2%; Keputran, 35,7%; Wonokromo, 34,2%; Manukan, 1,4%; Kapasan, 1,4%).

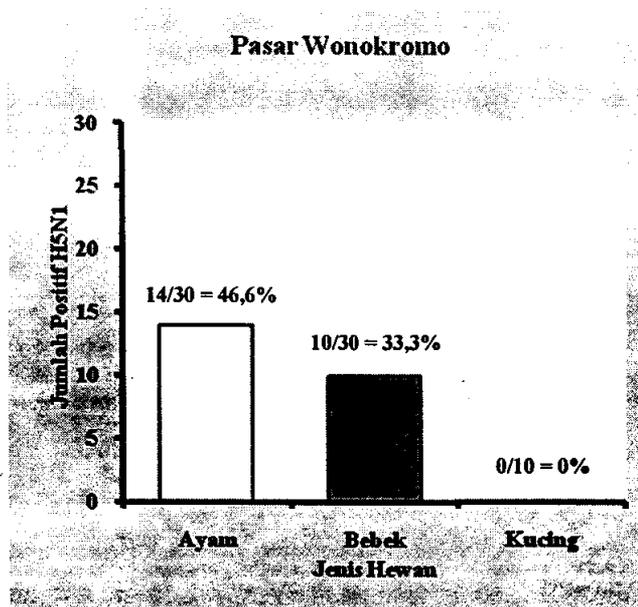
Persentase infeksi H5N1 berdasarkan jenis unggas masing-masing pasar bervariasi. Data secara terperinci dapat dilihat pada Gambar (1 – 5).



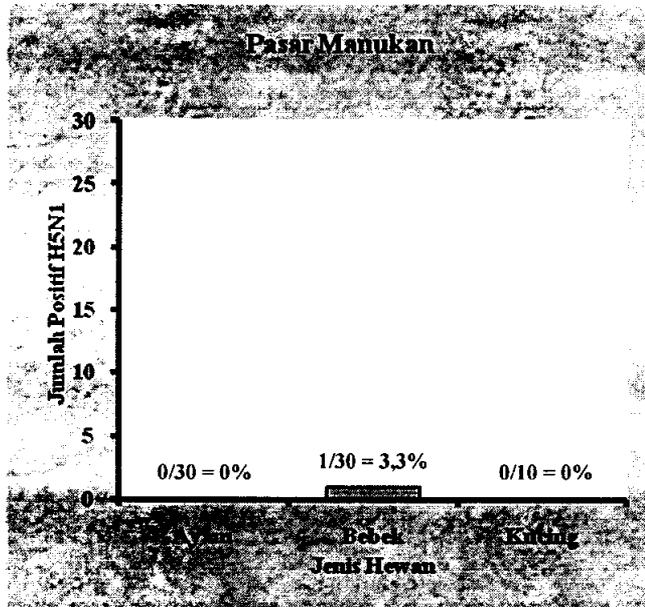
Gambar 1. Screening sampel dari **Pasar Pacar Keling** dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan; total sampel positif H5N1= 64,2%



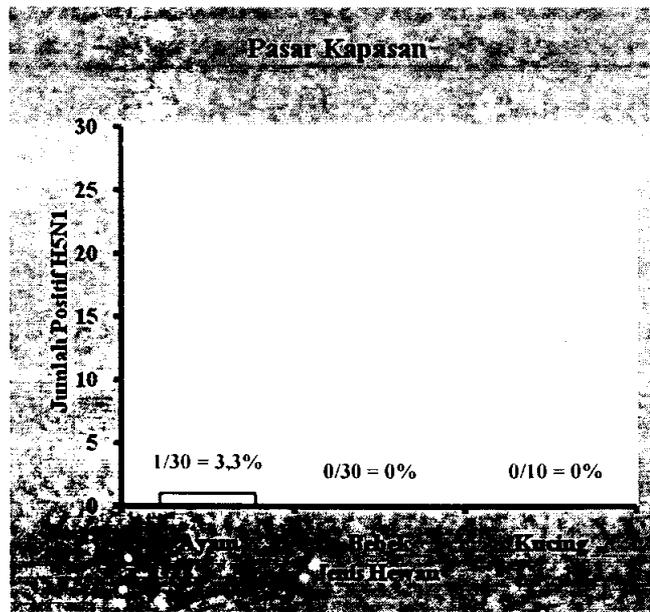
Gambar 2. Screening sampel dari **Pasar Keputran** dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan; total sampel positif H5N1= 35,7%



Gambar 3. Screening sampel dari **Pasar Wonokromo** dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan: total sampel positif H5N1= 34,2%



Gambar 4. Screening sampel dari **Pasar Manukan** dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan; total sampel positif H5N1= 1,4%



Gambar 5. Screening sampel dari **Pasar Kapasan** dengan uji HA dan HI (positif H5N1) berdasarkan jenis hewan: total sampel positif H5N1= 1,4%

Beberapa hasil survei terhadap bebek, ayam kampung, kucing dan pasar tradisional diduga dan berpengaruh terhadap penyebaran flu burung pada

beberapa wilayah di Indonesia termasuk Surabaya. Ada beberapa alasan yang dapat dijadikan dasar atas dugaan dan pengaruh (memiliki hubungan signifikan) terhadap penyebaran penyakit flu burung (Avian Influenza/AI) tersebut. Beberapa alasan yang dimaksud adalah: 1. Bebek ditengarai mempunyai hubungan yang signifikan dengan kasus Flu Burung pada ayam dan manusia ; 2. Pasar tradisional/pasar becek mempunyai hubungan yang erat dengan distribusi kasus Flu Burung pada manusia di sekitar pasar. 3. Jaringan jalan raya dan pasar tradisional memiliki hubungan yang signifikan dengan penyebaran flu burung pada manusia. Hasil survei yang dilakukan Departemen Kesehatan, Departemen Pertanian dan USAID menemukan bahwa pasar tradisional dan jaringan transportasi pengiriman unggas ayam menjadi sumber penularan virus flu burung (avian influenza/AI). Selain itu, survei juga menyimpulkan unggas jenis bebek sangat rentan menularkan virus mematikan tersebut. Sebagai reservoir seluruh subtype virus influenza pada umumnya adalah unggas air, terutama bebek, shorebirds dan burung camar. Pada unggas air ini, virus Influenza melakukan replikasi terutama di saluran pencernaan, sehingga dalam ekskretannya banyak terkandung virus influenza. Hal ini sesuai dengan fakta di lapangan pada saat dilakukan pengambilan sampel dari swab kloaka, sebagian bebek atau ayam kampung mengekresikan virus tersebut. Pada umumnya, kucing resisten terhadap infeksi oleh virus influenza A, tetapi peka terhadap infeksi virus influenza H5N1. Kucing yang diinfeksi secara buatan dengan pemberian pakan karkas ayam terinfeksi virus A1 H5N1 memperlihatkan gejala sakit suhu badan tinggi, gejala pernafasan parah dan berakhir dengan kematian. Selanjutnya virus A1 H5N1 dari kucing sakit dapat menular ke kucing lain yang sehat dan juga kepada macan

(harimau). Pada penelitian ini tidak didapatkan kucing dengan isolat positif H5N1 pada beberapa pasar di kota Surabaya memberikan gambaran infeksi dan penularan H5N1 ke kucing masih rendah, sebagai perbandingan kejadian kucing positif dengan H5N1 di kota Bandung hanya didapat 1 ekor dengan jumlah sampel 34 kucing liar dari seluruh wilayah yang ada di Bandung (Dewi dan Nidom, 2007).

Surabaya sebagai kota terbesar kedua di Indonesia dengan wilayah yang luas dan kepadatan penduduk yang tinggi, diperkirakan jumlah penduduk Surabaya berkisar kurang lebih 8-9 juta jiwa. Kondisi kepadatan tersebut membawa berpengaruh signifikan terhadap tingkat kebutuhan protein hewani baik yang berasal dari ternak besar, maupun unggas. Tingkat permintaan dan kebutuhan yang tinggi akan daging unggas (seperti ayam kampung, ayam ras dan bebek) menjadikan kondisi tingginya lalu lintas perdagangan unggas di Surabaya dan banyaknya pintu masuk ke wilayah Surabaya menjadikan wilayah ini mempunyai resiko yang tinggi terhadap penyebaran dan masuknya infeksi virus Avian Influenza H5N1 dari luar kota Surabaya dan dugaan tersebut diperkuat dengan temuan-temuan kasus infeksi di beberapa wilayah di luar kota Surabaya. Beberapa waktu yang lalu ditemukan kasus flu burung di daerah Kedurus Surabaya serta yang terakhir ditemukannya kasus di daerah Lamongan. Hasil penelitian ini memperkuat dugaan masuknya infeksi dari luar kota Surabaya ke Surabaya sebagai kota tujuan perdagangan unggas dari berbagai kota yang ada di Jawa Timur.

Hasil penelitian yang diperoleh Raharjo dan Nidom (2004) menunjukkan bahwa virus AI yang menginfeksi ayam dan unggas lainnya di Indonesia

merupakan subtipe H5N1, karena mempunyai homologi lebih dari 80% dengan urutan nukleotida subtipe H5N1 dari virus AI yang menginfeksi ayam di Guandong pada tahun 2004 di daratan China. Kode akses pada GenBank virus H5N1 ini AF-144305 (Raharjo dan Nidom, 2004).

Virus AI merupakan virus Influenza A yang menginfeksi unggas. Namun selain unggas, virus Influenza A dapat juga menginfeksi beberapa spesies mamalia, meskipun yang dipercayai sebagai inang alamiahnya yang bertindak sebagai penyimpan (reservoir) adalah unggas air liar yang termasuk dalam ordo *Anseriformes* dan *Charadriiformes* (Suarez *et al.*, 1998).

Meskipun virus Influenza A merupakan suatu agen yang bersifat enzootik pada unggas air liar, tetapi mekanisme penularan pada mamalia masih belum jelas benar. Faktor-faktor yang mempengaruhi adalah genetik virus lingkungan (Suarez *et al.*, 1998). Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ayam kampung dan bebek yang dijual atau disembelih di pasar yang berada di wilayah Surabaya sebagian terinfeksi virus H5N1 dan masih belum jelas darimana mereka tertular, sebab rata-rata mereka berasal dari daerah pensuplai yang ada disekitar wilayah Jawa Timur. Kepastian darimana unggas tersebut tertular merupakan faktor kesulitan tersendiri yang selama ini terjadi. Tetapi sudah dapat diprediksi bahwa Surabaya sebagai pusat perdagangan unggas (ayam kampung dan bebek) utamanya berasal dari daerah sekitar Jawa Timur yang sudah banyak tertular. Daerah yang terserang kebanyakan berada di pulau Jawa, yaitu propinsi Jawa Timur sebanyak tiga belas kabupaten (Rahardjo dan Nidom, 2004).

5.2. Konsentrasi atau titer antibodi (ayam kampung, bebek dan kucing) terhadap virus Avian Influenza H5N1 menggunakan HI test

Tabel 1. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek dan kucing yang berasal dari Pasar Pacar Keling

Macam Serum	Titer $X \pm SD$
Ayam	$7,38 \pm 0,9$
Bebek	$7,74 \pm 0,56$
Kucing	3 ± 0

Tabel 2. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek yang berasal dari Pasar Keputran

Macam Serum	Titer $X \pm SD$
Ayam	$7,69 \pm 0,79$
Bebek	$6,44 \pm 1,13$

Tabel 3. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek yang berasal dari Pasar Wonokromo

Macam Serum	Titer $X \pm SD$
Ayam	$6,86 \pm 1,41$
Bebek	$5,1 \pm 0,32$

Tabel 4. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek yang berasal dari Pasar Manukan

Macam Serum	Titer $X \pm SD$
Ayam	0 ± 0
Bebek	5 ± 0

Tabel 5. Titer antibodi terhadap virus H5N1 pada ayam kampung, bebek yang berasal dari Pasar Kapasan

Macam Serum	Titer
	$X \pm SD$
Ayam	5 ± 0
Bebek	0 ± 0

Hemaglutinin merupakan molekul glikoprotein selubung virus yang berfungsi untuk mengikat virus ke reseptor sel target dan mengawali terjadinya infeksi. Selain dibutuhkan virus untuk melepas keturunan virus dari sel yang terinfeksi enzim neurominidase juga mempunyai aktifitas untuk melepas ikatan hemaglutinin dan permukaan eritrosit (Treanor, 2001).

Variasi antigenik pada virus influenza dapat ditemukan dengan frekuensi yang tinggi dan melalui dua cara, yaitu *drift* dan *shift*. Sifat *antigenic drift* merupakan keadaan virus A1 yang mengalami mutasi urutan nukleotida pada gen HA atau NA atau keduanya yang menyebabkan antibodi tidak bisa secara lengkap menetralsasi virus ini. Perubahannya bersifat terbatas (minor), tetapi subtipenya tetap sama. Sedangkan sifat *antigenic shift* merupakan aktivitas dari dua macam virus Avian Influenza A yang menghasilkan segmen gen baru sebagai hasil rekombinan genetik. Aktivitas ini mengakibatkan antibodi yang sudah terbentuk di dalam tubuh tidak dapat menetralkan sama sekali terhadap virus baru tersebut. Jadi aktivitas ini akan menghasilkan subtype baru. Perubahannya dominan (mayor) dan dapat menimbulkan keadaan pandemik (Rahardjo, 2004).

Virus Avian Influenza terlindung oleh bahan organik yang ada dalam kandang seperti lendir, darah dan tinja. Virus Avian Influenza masih tetap infeksi dalam feses selama 30-35 hari pada temperatur 4°C selama tujuh hari pada

temperatur 20°C. Virus influenza yang bersifat infeksius dapat diisolasi dari cairan kotoran ayam selama 105 hari setelah depopulasi ayam pada saat terjadinya letupan Avian Influenza. Virus influenza dapat bertahan lama dengan kondisi lembab dan dingin serta dapat diisolasi dari air danau atau air kolam yang terletak di daerah yang banyak dihuni oleh unggas air. Virus influenza bisa tumbuh di dalam telur ayam bertunas (TAB) yang berumur 9-11 hari. Virus ini juga tumbuh pada kultur jaringan *chicken embryo fibroblast* (CEF) dan uji *in vivo* bisa dilakukan pada ayam, kalkun dan itik (Tabbu, 2000).

Virus Avian Influenza dikeluarkan dari hidung, mulut, konjungtiva dan kloaka hewan yang terinfeksi. Hal ini karena virus Avian Influenza berkembang biak dalam saluran pencernaan, pencernaan, ginjal atau sistem reproduksi (Tabbu, 2000).

Virus ditularkan melalui kontak langsung dari unggas yang terinfeksi dan unggas peka melalui saluran pernafasan, konjungtiva dan tinja. Penularan juga dapat terjadi secara tidak langsung, misalnya melalui debu yang mengandung virus, ransum, air minum, kendaraan, burung, mamalia dan lain-lain (Tabbu, 2000).

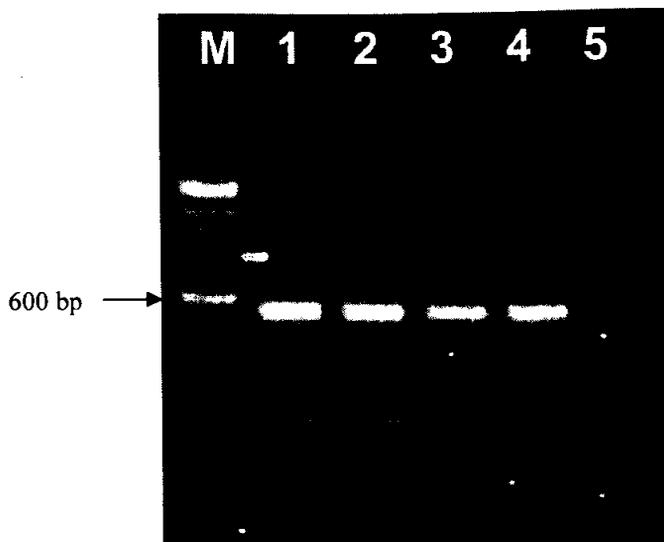
Transmisi virus A1 subtipe H5 yang menyerang peternakan terjadi melalui mekanisme : a) Transmisi langsung dari sekresi (feses dan sekresi saluran respirasi) burung yang terinfeksi; b) Telur yang terkontaminasi virus dalam inkubator dan pecah dapat menginfeksi anak ayam yang sehat (OIE, 2002); c) Peralatan kandang yaitu tempat telur ayam, truk pengangkut pakan, pakaian dan sepatu dari pekerja; d) Tempat air minum ternak yang terkontaminasi; e) Tempat sampah.

1.3. Primer amplifikasi *amino-terminus* gen PB2 dari VAI sub tipe H5N1

Dalam mengamplifikasi *amino-terminus* gen PB2 dari VAI sub tipe H5N1, digunakan primer depan (*forward primer*) standar dari Hoffman *et al.* (2001). Sementara primer belakang (*backward primer*) berdasarkan atas susunan gen dari genom VAI yang diambil dari *GeneBank* isolat VAI Indonesia. Daerah konservatif (*conserved*) pada posisi 400-500 basa dari informasi sikuens yang telah tersedia dipilih dengan berpedoman pada panduan yang dikutip dari Mahardika (2003). Panjang produk yang diharapkan adalah sekitar 500-600 *base pair* (bp). Susunan primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: PB2F universal (5'-TATTGGTCTCA- GGGAGCGAAAGCAGGTC-3' (Hoffmann *et al.*, 2001) dan PB2R507 (5'- CGACTTCCATGATGA-CATCTTGTGC-3'). Isolat yang tidak dapat diperbanyak dengan pasangan primer tersebut, diamplifikasi dengan primer PB2F universal dan primer alternative PB2200R (5'-GCCCTTGTTTCATTCCTTTC-3').

5.4. Hasil amplifikasi NCR ujung -5 dan *amino- terminus* gen PB2 VAI sub tipe H5N1 isolat lokal yang berasal dari ayam

Gambar 6 menunjukkan hasil PCR yang khas dari *amino-terminus* gen PB2 yang ditandai dengan panjang produk 600 bp. Panjang produk PCR tersebut sesuai dengan yang diharapkan, yaitu sekitar 100 bp untuk NCR dan sisanya merupakan gen ditambah dengan posisi primer belakang yang didesain khusus komplementer mulai dari posisi 507. Hal ini menandakan bahwa primer yang dirancang adalah spesifik untuk NCR ujung-5 dan *amino- terminus* gen PB2 VAI sub tipe H5N1 isolat lokal yang berasal dari ayam dan bebek Pasar Pacar Keling



Gambar 6. RT-PCR hasil amplifikasi NCR ujung -5 dan amino terminus gen PB2 dari virus AI H5N1 isolat lokal dalam gel agarose 1% dan divisualisasikan dengan ethidium bromide dan sinar ultraviolet. Isolat ayam Pacar Keling (jalur 1), isolat ayam Keputran (jalur 2), isolate bebek Pacar Keling (jalur 3), isolat bebek Keputran (jalur 4), kontrol negative (jalur 5) dan M adalah 100 bp ladder (marker). Posisi 600 bp pada marker ditunjukkan dengan

Hasil pembacaan sikuens dan pengujian BLAST yang tersedia di *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) menunjukkan bahwa informasi genetik yang dapat dibaca dan dikonfirmasi sebagai gen PB2 VAI subtype H5N1 mempunyai tingkat homologi sampai 97-99% dengan virus asal unggas dan manusia di Indonesia (data tidak ditampilkan).

Secara umum dinyatakan bahwa rentang inang dan patogenesis VAI bersifat poligenik, yaitu faktor determinan untuk rentang inang dan patogenesis terdapat pada semua fragmen gen (Wright dan Webster, 2001). Virulensi VAI dipengaruhi oleh beberapa fragmen gen, antara lain gen hemaglutinin (HA), gen-gen polimerase polimerase basik-1 (PB1), polimerase basik-2 (PB2), polimerase asidik (PA), gen neuraminidase (NA), dan gen non struktural (NS).

Kompleks gen polimerase diduga merupakan faktor utama bagi adaptasi VAI pada spesies tertentu. Kompleks enzim polimerase dari VAI

membentuk heterotrimer (PA, PB1, PB2) dan diketahui terlibat dalam banyak tahapan replikasi virus dan berinteraksi dengan berbagai protein sel, sehingga berperan dalam menentukan spesifisitas induk semang (Taubenberger *et al.*, 2005). Dalam kasus VAI subtype H5N1, Salomon *et al.* (2006) telah membuktikan bahwa gen yang berperan sebagai *barriers* spesies VAI subtype H5N1 berlokasi pada gen-gen polimerase.

Fokus penelitian yang dilakukan selama ini adalah pada daerah *coding region* (CR) dari segmen gen VAI. Perubahan asam amino pada gen polimerase PB2 daerah CR pada posisi 627 telah digunakan sebagai tanda perubahan VAI asal unggas ke VAI asal mamalia (Naffakh *et al.*, 2000). Namun, temuan tersebut tidak konklusif karena data yang tersedia di *GeneBank* menunjukkan banyak isolat AI H5N1 asal unggas yang mempunyai mutasi pada asam amino 627 PB2. Oleh karena itu *non-coding region* (NCR) dari gen-gen polimerase memberikan indikasi adaptasi VAI subtype H5N1 pada berbagai spesies. Bukti ilmiah bahwa daerah NCR berpengaruh pada efisiensi replikasi virus influenza telah pernah dilaporkan. Genom sebagian besar virus famili *Orthomyxoviridae* membentuk struktur seperti jepit rambut (*hairpin loop*) pada kedua ujung -5' dan -3' yang dibutuhkan untuk aktivitas endonuklease dari RNA polimerase virus influenza dalam proses *cap-snatching* (Leahy *et al.*, 2001). Fujii *et al.* (2005) juga membuktikan bahwa NCR gen NS ikut mempengaruhi transkripsi pada virus influenza A. Publikasi oleh Gultayev *et al.* (2007) mengungkapkan bahwa mutasi gen NS pada posisi 563 dari G menjadi C yang terjadi setelah tahun 2000 menyebabkan *hairpin loop* RNA menjadi kokoh, yang dihipotesiskan dapat meningkatkan kapasitas VAI subtype H5N1 untuk menginfeksi manusia dan menyebar ke seluruh dunia.

Hasil penyepadanan asam *amino-terminus* gen PB2 isolat yang dipelajari dalam penelitian ini dan yang diperoleh di *GeneBank* ditampilkan pada Tabel 6. Dari tabel tersebut tampak bahwa terdapat 20 titik asam amino yang polimorfik di antara semua virus yang dianalisis. Kecuali untuk isolat asal babi, residu yang khas isolate dari spesies tertentu tidak dapat diidentifikasi. Dengan lain perkataan, perubahan asam amino terjadi secara acak dan tidak berpola sesuai dengan spesies asal isolat. Hal yang sama berlaku untuk satu-satunya virus asal kucing yang informasi genetiknya tersedia di *GeneBank*. *Amino-terminus* protein PB2 darivirus Feline/Indonesia/CDC1/2006 bahkan 100% homolog dengan berbagai virus asal ayam, itik, dan puyuh.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan:

- Bebek dan ayam menjadi reservoir yang dominan terhadap penyebaran virus H5N1 di wilayah Surabaya yang dibuktikan dengan banyaknya sampel positif yang berasal dari kedua unggas tersebut.
- Sebagian besar unggas (ayam kampung dan bebek) pernah terpapar virus H5N1 yang dibuktikan dengan banyaknya titer positif terhadap H5N1.
- Kucing adalah reservoir yang paling lemah dalam penularan virus H5N1
- Semua VAI subtipe H5N1 isolat ayam dan bebek merupakan isolat virus dengan fragmen *amino-terminus* PB2 yang khas virus Indonesia.

Saran

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan sampel yang lebih banyak, sehingga hasil yang diperoleh lebih lengkap dan akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- CDC (Contagious Diseases Center). 2007. Avian Influenza Infection in Humans. <http://www.cdc.gov/> [30 Mei 2007].
- Chen, H., Deng, G., Li, Z., Tian, G., Li, Y., Jiao, P., Zhang, L., Liu, Z., Webster, R. G. and Yu, K. 2004. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *PNAS* 101: 10452-10457.
- Class, E. C. J., Kawaoka, Y., De Jong, J. C., Masurel, N. and Webster, R. G. 1994. Infection of Children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology* 172: 180-188.
- Creelan, J. L., Graham, D. A. and McCullough, S. J. 2002. Detection and Differentiation of pathogenicity of avian Paramixovirus Serotype 1 from Field Cases Using One-Step Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Avian Pathol.* 31: 493-499.
- Cross, K. J., Wharton, S. A., Shekel, J. J., Wiley, D. C. and Steinhauer, D. A. 2001b. Studies on influenza haemagglutinin fusion peptide mutants generated by Reverse genetics. *EMBO J.* 20: 4432-4442.
- Departemen Pertanian. 2006. Populasi itik menurut propinsi. <http://www.deptan.go.id/>. [15 Juli 2006].
- Departemen Kesehatan. 2007. Sudah 79 orang meninggal dunia akibat flu burung. <http://www.ppmpkp.depkes.go.id/>. [4 Juni 2007].
- Gilbert, M., Chaitaweesub, P., Parakamawongsa, T., Premashthira, S., Tiensin, T., Kalpravidh, W., Wagner, H. and Slingenberg, J. 2006. Free-grazing ducks and highly pathogenic avian influenza, Thailand. *EID CDC* 12: 56-62.
- Horimoto, T., Takada, A., Horimoto, K. I., Hatta, M., Goto, H. and Kawaoka, Y. 2003. Generation of Influenza A Viruses with Chimeric (Type A/B) Hemagglutinins. *J. Virol.* 77: 8031-8038.
- Horimoto, T. Kawaoka, Y. 2001. Pandemic Threat Posed By Avian Influenza A Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 129-149.
- Hulse, D. J., Webster, R. G., Russell, R. J. and Perez, D. R. 2004. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *J. Virol.* 78: 9954-9964.
- Hulse-Post, D. J., Sturm-Ramirez, K. M., Humberd, J., Sieler, P., Govorkova, E. A., Krauss, S., Scholtissek, C., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T. D., Long, H. T., Naipospos, T. S. P., Chen, H., Ellis, T. M., Guan, Y., Peiris, J. S. M. and Webster, R. G. 2005. Role of domestic ducks in the

propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *PNAS* 102: 10682-10687.

- Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R. A. M., Payungpong, S. and Poovorawan, Y. 2004. Avian Influenza H5N1 in Tigers and Leopards. *Emerging Infec. Dis.* 10: 2189-2191.
- Kishida, N., Sakoda, Y., Isoda, N., Matsuda, K., Eto, M., Sunaga, Y., Umemura, T. and Kida, H. 2005. Pathogenicity of H5N1 influenza viruses for ducks. *Arch. Virol.* 150: 1383-1392.
- Kuiken, T., Rimmelzwaan, G. F., Van Riel, D., Van Amerongen, G., Baars, M., Fouchier, R. A. M. and Osterhaus, A. D. M. E. 2004. H5N1 Influenza in Cats. *Science* 306: 341.
- Raharjo, J. dan Nidom, C. A. 2004. Avian Influenza; Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. GITA Pustaka. ISBN: 979-98585-0-X
- Rimmelzwaan, G. F., Van Riel, D., Baars, M., Bestebroer, T., Van Amerongen, G., Fouchier, R., Osterhaus, A. D. M. E. and Kuiken, T. 2006. Influenza A Virus (H5N1) infection In Cats Causes Systemic Disease with Potencial Novel Routes of Virus Spread Within and Between Host. *Am. J. Pathol.* 168: 176-183.
- Seo, S. H., Hoffman, E. and Webster. 2002. Lethal H5N1 Influenza Viruses Escape Host Anti-Viral Cytokine Responses. *Nature Med.* 8: 950-954.
- Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2006. Avian Influenza H5N1 in Naturally Infected Domestic Cats. *Cats Dis. CDC EID.* 12 (4)
- Suarez, D. L., Perdue, M. L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J. and Swayne, D. E. 1998. Comparisons of Highly Virulent H5N1 Influenza A Viruses Isolated from Humans and Chicken from Hong Kong. *J. Virol.* 72: 6678-6688.
- Suzuki, Y. 2005. Sialobiology of Influenza Molecular Mechanism of Host Range variation of Influenza Viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 28.
- Tamura, S. and Kurata, T. 2004. Defense Mechanisms Against Influenza Virus Infection in the Respiratory Tract Mucosa. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: 236-247.
- Treanor, J. J. 2004. Influenza Virus. In: Mandell, G. L., Bennett, J. E. and Dolin, R. eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 6th ed. Churchill Livingstone.

Whittaker, G. R. 2001. Intercellular Trafficking of Influenza Virus: Clinical Implications for Molecular Medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. <http://www.expertreviews.org/> [6 Desember 2006].

WHO (World Health Organization). 2003. WHO Manual on Animal Influenza Diagnostic and Surveillance. <http://www.who.int> [12 November 2004].

Lampiran 1. Sarana dan Prasarana Penunjang Penelitian Yang Telah Dimiliki

Laboratorium

No.	Nama Laboratorium	Jenis pekerjaan	Kemampuan
1.	Lab. Biologi Molekuler FKH Unair	Analisa dan Pengukuran titer antibodi	Memadai
2.	Lab. Virologi FKH Unair	Kultur dan Isolasi antigen virus AI sampel	Memadai
3.	Lab. DHF dan BSL-3, Institut Trop.Disease (ITD), Unair	Handling antigen virus, ELISA, PCR	Memadai

Peralatan utama yang tersedia

No	Nama alat	Lokasi	Kegunaan	Kemampuan
1.	ELISA reader	Lab. DHF ITD	Pembacaan hasil	Memadai
2.	Gen analyzer	Lab. Biologi Molekuler FKH Unair	Pengamatan hasil	Memadai
3.	Sequencing apparatus	Lab. Biologi Molekuler FKH Unair	Sequencing	Memadai
4.	Mikropipet	Lab. Virologi FKH	Isolasi dan karakterisasi protein	Memadai
5.	Inkubator	Lab. Virologi FKH	Inkubasi TAB	Memadai
6.	Autoclave	Lab. Virologi FKH	Sterilisasi peralatan	Memadai
7.	RT-PCR	Lab. Biologi Molekuler FKH Unair	Sintesis RNA dan amplifikasi cDNA	Memadai

Personalia Tenaga Peneliti

No.	Nama Dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi	Alokasi Waktu	
				Jam /Minggu	Bulan
1.	Prof. Dr.Rahayu	Virologi	FKH UNAIR	10	10
2.	Muchammad Yunus, Ph.D., M.Kes., Drh.	Biologi Molekuler	FKH UNAIR	8	10