

**TESIS**

**STUDI PENYEBARAN VIRUS INFLUENZA A DI DAERAH  
ALIRAN SUNGAI BENGAWAN SOLO JAWA TIMUR DENGAN  
MENGUNAKAN BEBEK SEBAGAI SANTINEL**

**PENELITIAN STUDI DESKRIPTIF**



**KHOLIK**  
**NIM 060942002**

**PROGRAM STUDI ILMU PENYAKIT DAN  
KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER  
PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2011**

**STUDI PENYEBARAN VIRUS INFLUENZA A DI DAERAH  
ALIRAN SUNGAI BENGAWAN SOLO JAWA TIMUR DENGAN  
MENGUNAKAN BEBEK SEBAGAI SANTINEL**

**PENELITIAN STUDI DESKRIPTIF**

**TESIS**

**Untuk Memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Penyakit dan  
Kesehatan Masyarakat Veteriner  
Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Surabaya**

**KHOLIK  
NIM 060942002**

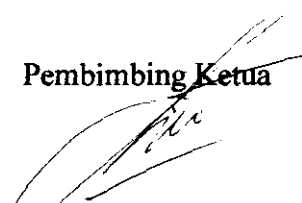
**PROGRAM STUDI ILMU PENYAKIT DAN  
KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER  
PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2011**

**LEMBAR PENGESAHAN**

LAPORAN PENELITIAN INI TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL : 29 Juli 2011

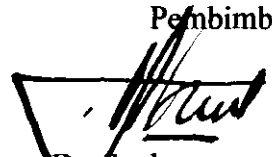
Oleh

**Pembimbing Ketua**



Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., M.S.  
NIP. 19580308194031003

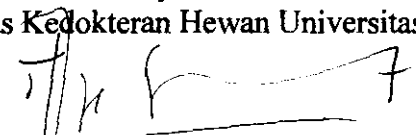
**Pembimbing**



Dr. Soeharsono, drh., M. Si.  
NIP. 196104021988031003

**Mengetahui :**

**Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga**



Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.  
NIP. 196208281989032001

Laporan penelitian tesis ini telah diujikan Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan dinilai  
Oleh panitia penguji pada

Pada Tanggal, 05 Agustus 2011

**Panitia Penguji**

1. Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., MS
2. Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH
3. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP
4. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., MS
5. Dr. Soeharsono, drh, MSi

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan Nama Allah yang Maha Pengasih dan Penyayang, segala puja dan puji syukur penulis panjatkan ke hadirat-Nya yang Maha Tinggi, serta shalawat dan salam saya haturkan kepada Baginda Rasulullah, keluarga dan sahabat-sahabatnya. Atas segala rahmat dan hidayah Allah SWT sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian yang merupakan syarat untuk melakukan penelitian dengan judul **STUDI PENYEBARAN VIRUS INFLUENZA A DI DAERAH ALIRAN SUNGAI BENGAWAN SOLO JAWA TIMUR DENGAN MENGGUNAKAN BEBEK SEBAGAI SANTINEL.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada kedua pembimbing sekaligus dosen pengajar selama menempuh pendidikan pasca sarjana yaitu Dr. H. Chairul Anwar Nidom, drh., MS., dan Dr. Soeharsono, drh, Mi.S atas bimbingan, dorongan dan saran yang telah diberikan sampai dengan selesainya penelitian ini. Semoga Allah SWT membalasnya dengan limpahan Rahmat.

Penulis menyampaikan dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati ucapan terima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., MS, Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH, dan Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP selaku dosen penguji penelitian yang dengan ikhlas meluangkan waktu untuk me serta dengan sabar menguji dan membimbing, memberikan masukan, serta motivasi yang tiada hentinya.dengan selesainya proposal penelitian ini. Semoga Allah SWT membalasnya dengan limpahan Rahmat.

Ucapan terima kasih juga penulis haturkan kepada *Laboratorium Avian Influenza, Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga* beserta seluruh tim kerja *Avian Influenza Research Centre* (bu Kadek Rachmawati, drh., M.Kes., mbak Emma, mbak Reviany, mbak Ratnani, mbak Mia, mbak Setyarina, mbak Titi, mas Yusuf, dan mas Surip) serta teman-teman sepenelitian yang telah memberikan segala bentuk bantuan sehingga membantu kelancaran penulis selama melaksanakan penelitian.

Terima kasih penulis sampaikan pula kepada Bapak Dr. Puji Srianto, drh., M.Kes, Dr. H. Chairul Anwar Nidom, drh., MS., dan istri beliau serta Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si, dan Trilas Sardjito, M.Si., drh atas segalanya yang saya anggap sebagai orang tua saya.

Terima kasih penulis sampaikan pula kepada ibu Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P., selaku dosen Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak, Ibu, yang telah memberikan segalanya, baik bantuan doa, dorongan, semangat, bantuan materiil serta spirituil. Terima Kasih pada semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu tetapi sudah membantu dalam penyusunan skripsi ini terimakasih banyak atas bantuan kalian.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh sebab itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan.

Demikian, semoga penelitian ini dapat menjadi informasi yang berharga bagi dunia veteriner.

Surabaya, 17 Juli 2011

Penulis

## RINGKASAN

Influenza adalah penyakit yang bersifat zoonosis. Virus Influenza terdiri dari tiga tipe yaitu tipe A, B dan tipe C. Ketiga tipe ini dapat dibedakan berdasarkan Ketiga tipe ini dapat dibedakan berdasarkan perbedaan antigenik yang terdapat pada nukleoprotein (NP) dan matriks (M). Virus Influenza A dapat menyebabkan pandemi dan epidemi pada mamalia dan unggas Virus Influenza A dapat menyebabkan pandemi dan epidemi pada mamalia dan unggas (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001; CDC, 2005). Saat ini virus Influenza A yang banyak dibahas adalah virus Avian Influenza (H5N1), virus flu babi (H1N1) dan juga seasonal flu (H3N2) karena dapat menyebabkan pandemi influenza (Steven, *et al* 2006). Influenza dapat ditularkan melalui tiga cara, yakni lewat aerosol, droplet dengan ukuran besar serta kontak langsung dengan sekresi atau muntahan (Tellier *et al*, 2006). Daerah aliran sungai Bengawan Solo merupakan aliran sungai yang banyak digunakan sebagai daerah pemeliharaan bebek dan memiliki potensi sebagai agen penularan virus Influenza A secara *water-borne* pada unggas maupun mamalia. Mengingat bahwa daerah aliran sungai Bengawan Solo mengalir 2 Propinsi di Jawa yaitu Jawa Timur dan Jawa Tengah ( Balai Besar Wilayah Bengawan Solo, 2008). Oleh sebab itu, studi penyebaran virus Influenza A pada daerah aliran Sungai Bengawan Solo butuh dilakukan sehingga dapat diketahui pola perubahan virus Influenza A pada bebek sebagai yang merupakan host reservoir virus Influenza A yang berpotensi dalam penyebaran maupun penularan virus Influenza A melalui daerah aliran sungai



sehingga dapat dilakukan pencegahan secara dini terhadap kasus virus Influenza A di Jawa Timur.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui penyebaran virus Influenza A di Daerah Aliran Sungai (DAS) Bengawan Solo dengan bebek sebagai hewan penanda (santinel). Penelitian ini dibagi dalam tiga tahap: Tahap pertama adalah memilih 150 bebek yang dijadikan sebagai sentinel dengan menggunakan uji HI (*Heamagglutination Inhibition Test*). Tahap kedua adalah pendistribusian bebek-bebek sentinel pada daerah yang ditentukan. Tahap ketiga adalah pengambilan sampel swab trakea dan kloaka yang diuji dengan HA (*Heamagglutination test*) and RT-PCR.

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa dari 275 sampel yang terkumpulkan, sebanyak 13 sampel dinyatakan positif dengan uji HA. Dari ke-13 sampel tersebut hanya 4 sampel yang positif dengan uji HI. Berdasarkan hasil uji PCR dari ke-4 sampel positif uji HI dinyatakan positif mengandung virus Influenza A.

Penelitian ini menggambarkan bahwa dalam studi penyebaran virus Influenza A di Daerah Aliran Sungai (DAS) Bengawan Solo dengan bebek sebagai sentinel tergantung pada jarak waktu pengambilan dan keadaan geografis dan demografis dari wilayah tersebut.

## SUMMARY

Influenza A virus is a zoonotic diseases. Influenza Virus consists of three types; A, B, and C. These types are distinguished from their antigenic distinction exist in Nucleoprotein (NP) and Metrics (M). Influenza A Virus is capable of causing pandemic and epidemic in mammalian and poultry (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001; CDC, 2005).. Nowadays, H5N1 Avian Influenza Virus, H1N1 (2009) Pandemic Virus, and H3N2 Seasonal Flu become the most common topic of discussion since these viruses are considered to cause pandemic influenza (Steven, *et al* 2006). There are three ways of transmitting Influenza Virus; aerosol, droplet with big size, and direct contact with secretion or excretion. These secretions are possibly carried out along with Influenza Virus through water captured by duck as reservoir animal (Tellier *et al*, 2006). Bengawan Solo River flows through two provinces in Java; East and Central Java that are mostly used as conservation areas of farms and also have potential to be transmitted agent of Influenza A Virus in poultry and mammalian through water( Balai Besar Wilayah Bengawan Solo, 2008). Therefore, study of spreading Influenza A Virus at Bengawan Solo River in East Java using duck as sentinel was important to be conducted in order to find out the changing pattern of Influenza A Virus in duck as sentinel and to set up such early prevention towards Influenza A Virus cases in East Java.

The aim of this research was to find out the spread of Influenza A Virus at Bengawan Solo River using ducks as sentinel. In this research was divided into three

steps; The first step selected 150 ducks by Heamaglutination Inhibition Test for animal models. The second step distributed ducks at selecting region. The third step collected sampling for Influenza A viral analysis. Influenza A viral analysis from tracheal and cloacal swabs by using Heamaglutination test and RT- PCR assay.

The result showed 13 positive by Haemaglutination test (HA test) among 275 samples. Result from Haemaglutination test (HI test) showed that 4 were positive among 13 samples were had been positive by HA test. Result from one-step PCR showed that 4 samples were positive Influenza A virus among 4 samples were had been positive positive by HI test.

This research described that the study of spreading of Influenza A Virus at Bengawan Solo River using ducks as sentinel depending of collecting sampling intervals and geographic and demographic regions.

**THE STUDY OF SPREADING INFLUENZA A VIRUS  
AT BENGAWAN SOLO RIVER IN EAST JAVA  
USING DUCKS AS SANTINEL**

**Kholik**

**ABSTACT**

The aim of this research was to find out the spread of Influenza A Virus at Bengawan Solo River using ducks as sentinel. Influenza Virus consists of three types; A, B, and C. These types are distinguished from their antigenic distinction exist in Nucleoprotein (NP) and Metrics (M). Influenza A Virus is capable of causing pandemic and epidemic in mammalian and poultry.

In this research was divided into three steps; The first step selected 150 ducks by Heamaglutination Test for animal models. The second step distributed ducks at selecting region. The third step collected sampling for Influenza A viral analysis. Influenza A viral was analyzed from tracheal and cloacal swabs by using Heamaglutination test and RT- PCR assay.

The result showed 13 positive by Haemaglutination test (HA test) among 275 samples. From these 13 samples, there were only 4 samples were positive seeing from Haemaglutination test (HI test). Result from one-step PCR showed that these 4 samples were positive Influenza A virus.

This research described that the study of spreading of Influenza A Virus at Bengawan Solo River using ducks as sentinel is depended on collecting sample intervals, geographic, and demographic regions.

Key words : Influenza A virus, Bengawan Solo rivers, PCR

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
<b>SAMPUL DALAM.....</b>	<b>i</b>
<b>PRASYARAT GELAR.....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....</b>	<b>iv</b>
<b>UCAPAN TERIMA KASIH.....</b>	<b>v</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRAC.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xviii</b>
<b>SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....</b>	<b>xix</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 . Rumusa Masalah.....	3
1.3.Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
<b>BAB 2 Tinjauan Pustaka.....</b>	<b>5</b>
2.1. Virus Influenza A.....	5

2.2. Replikasi Virus Influenza A.....	8
2.3. Peran Bebek dalam Penularan Virus Influenza A secara <i>Water Born</i> .....	10
2.4. Profil Daerah Aliran Bengawan Solo.....	12
2.5. Epidemiologi Influenza A.....	13.
BAB 3 Kerangka Konseptual Penelitian.....	17
3.1 Kerangka konseptual penelitian.....	14
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	21
4.1 Jenis Penelitian.....	21
4.2. Populasi dan Sample.....	21
4.3. Materi Penelitian.....	21
4.3.1. Bahan Penelitian.....	21
4.3.2. Alat Penelitian.....	22
4.4. Variabel Penelitian.....	24
4.4.1. Definisi Operasional Variabel.....	24
4.5. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	24
4.6. Metode Penelitian.....	25
4.7. Kerangka Operasional.....	39
4.8. Analisis Data.....	40
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	41
5.1 Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI Test).....	41
5.2 Uji Hemaglutinasi / <i>Hemagglutination Test (HA Test)</i> .....	41
5.3 Uji <i>One Step PCR</i> .....	44
BAB 6 PEMBAHASAN.....	46
6.1 Virus Influenza A pada Bebek.....	45
6.2 Uji RT PCR ( <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> ).....	52
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
7.1 Kesimpulan.....	54

7.2 Saran.....	54
Daftar Pustaka.....	55
Lampiran.....	59

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Gen, jumlah nukleotida, protein virus influenza A.....	6
Tabel 5.1 Hasil uji Hambatan hemaglutinasi pada bebek yang dijadikan sentinel....	41
Tabel 5.2. Hasil Uji HA Berdasarkan Jarak Waktu Pengambilan Sampel.....	42
Tabel 5.3. Hasil Uji HA Berdasarkan Lokasi Pengambilan Sampel (Kabupaten).....	42
Tabel 5.4. Hasil Uji HA Berdasarkan Jarak Waktu Pengambilan Sampel (Bebek yang dikandangkan).....	43
Tabel 5.5. Jumlah sampel dari hasil Uji HA dan antisera.....	43
Tabel 5.7. Jumlah sampel dari hasil Uji HA, antisera HI, PCR.....	45



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur virus influenza A.....	7
Gambar 2.2. Replikasi virus influenza.....	9
Gambar 2.3. Jalur penularan virus flu burung pada unggas dan manusia.....	11
Gambar 2.4. Peta Kabupaten yang dilalui oleh aliran Sungai Bengawan Solo.....	13
Gambar 2.5. Daerah endemis virus Flu Burung Subtipe H5N1 di Seluruh Indonesia.....	15
Gambar 3.1. Bebek sebagai reservoir virus Influenza.....	18
Gambar 3.2. Kerangka Konseptual Penelitian.....	20
Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis gen Matriks.....	44
Gambar 5.2 Hasil Elektroforesis gen Nukleoprotein.....	44
Gambar 6.1 Kabupaten Tertinggi Adanya Influenza A .....	51

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1 : Skema Uji HA Mikroteknik.....</b>	<b>59</b>
<b>Lampiran 2. Komposisi Bahan – Bahan untuk One step PCR.....</b>	<b>60</b>
<b>Lampiran 3. Foto-foto Dokumentasi Penelitian.....</b>	<b>61</b>
<b>Lampiran 4. Hasil Uji HA .....</b>	<b>64</b>

**SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG**

AI	: <i>Avian Influenza</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
BSL3	: <i>Biosafety Level3</i>
cDNA	: <i>complementary Deoxyribo Nucleic Acid</i>
DAS	: <i>Daerah Aliran Sungai</i>
HA	: <i>Haemeaglutination</i>
M	: <i>Matrix</i>
NA	: <i>Neuraminidase</i>
NS	: <i>Non-structural</i>
NP	: <i>Nucleoprotein</i>
PA	: <i>Polimerase Acid</i>
PB	: <i>Polimerase Basic</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer saline</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
Primer F	: <i>Forward Primer</i>
Primer R	: <i>Reverse Primer</i>
RBC	: <i>Red Blood Cell</i>
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
SPF	: <i>Specific Pathogen Free</i>
TAB	: <i>Telur Ayam Bertunas</i>
TBE	: <i>Tris Borat EDTA</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
µl	: <i>mikroliter</i>

**BAB 1**  
**PENDAHULUAN**

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Influenza adalah penyakit yang bersifat zoonosis. Virus Influenza merupakan virus yang dinamis dan terus menerus berevolusi. Virus Influenza terdiri dari tiga tipe yaitu tipe A, B dan tipe C. Virus Influenza A dapat menyebabkan pandemi dan epidemi pada mamalia dan unggas (Webster and Kawaoka, 1978; Xie et al., 2006). Virus Influenza tipe B dan C hanya menginfeksi manusia dan sifatnya kurang patogen dibandingkan virus Influenza A (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001; CDC, 2005). Saat ini virus Influenza A yang banyak dibahas adalah virus Avian Influenza (H5N1), virus flu babi (H1N1) dan juga seasonal flu (H3N2) karena dapat menyebabkan pandemi influenza. Sejak akhir tahun 2003, salah satu tipe virus Influenza A yaitu *Avian Influenza* (AI) subtipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika (Stevens, *et al* 2006). Di Indonesia, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Sejak tahun 2005, kasus influenza A subtipe H5N1 telah menginfeksi 176 orang dan yang meninggal dunia sebanyak 145 orang (Nidom, 2011). Kasus Influenza A subtipe flu pandemik H1N1 2009 di Indonesia sampai dengan 23 Agustus 2009 telah menyerang sebanyak 1.005 orang dengan 5 orang di antaranya dilaporkan meninggal dunia. Meskipun angka kematiannya (*Case Fatality Rate/CFR*) hanya sekitar 0,98% namun flu pandemik H1N1 2009 ini mudah menular

(Depkes RI, 2010). Virus Influenza A sub tipe H3N2 diketahui telah menyebabkan lebih dari 34.000 kematian di Amerika Serikat dan dikenal dengan nama "*Hong Kong flu*". Virus ini pertama kali dideteksi di Hong Kong pada awal tahun 1968 dan menyebar di Amerika Serikat pada akhir tahun 1968. Virus Influenza A dengan sub tipe H3N2 masih berada di lingkungan sampai dengan saat ini (Nidom, 2010).

Daerah aliran sungai Bengawan Solo merupakan aliran sungai yang banyak digunakan sebagai daerah pemeliharaan bebek dan memiliki potensi sebagai agen penularan virus Influenza A secara water-borne pada unggas maupun mamalia. Mengingat bahwa daerah aliran sungai Bengawan Solo mengalir 2 Propinsi di Jawa, yaitu Jawa Timur (13 Kabupaten) dan Jawa Tengah (17 Kabupaten) yang merupakan Propinsi terbesar terjadinya kasus flu burung. Kabupaten di Jawa Timur yang dilalui DAS Bengawan solo adalah: Madiun, Ngawi, Bojonegoro, Tuban, Lamongan dan Gresik. Kasus Influenza A (sub tipe H5N1) ditemukan di Lamongan pada sembilan kecamatan yakni Maduran, Sekaran, Solokuro, Karanggeneng, Sukodadi, Turi, Sugio, Kalitengah, dan Pucuk. Rata-rata yang terinfeksi flu burung jenis ayam kampung. Kasus ini ditemukan kembali sejak 17 Desember 2008 lalu pada ayam milik Siti warga Desa Siwuran, Kecamatan Maduran (Kompas, 2009) . Kasus tersebut juga ditemukan juga ditemukan di kabupaten Bojonegoro tepatnya di Kecamatan Ngraho, Baurano, dan kecamatan Kota yang mengakibatkan 94 ekor ayam dimusnahkan ( Gatra, 2000).

Penularan Influenza secara water-borne pada bebek telah ditemukan pada danau di beberapa negara di Seberia, Kanada, dan Alaska. Virus Influenza akan

melakukan replikasi di sel epitel kolon pada bebek dengan tidak menunjukkan gejala klinis tetapi mengeluarkan virus melalui feses (Kida, 1980; Soda, 2009).

Oleh sebab itu, studi tentang penyebaran virus Influenza A pada daerah aliran Sungai Bengawan Solo perlu dilakukan sehingga dapat diketahui pola penyebaran dan perubahan virus Influenza A di daerah aliran Sungai dengan menggunakan bebek sebagai hewan sentinel, sehingga dapat dilakukan pencegahan secara dini terhadap kasus virus Influenza A di Jawa Timur.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka disusun rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah daerah aliran sungai Bengawan Solo merupakan sumber penularan virus Influenza A?
2. Apakah terdapat perbedaan kasus Influenza A pada Daerah Aliran Sungai Bengawan Solo?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk melaksanakan studi penyebaran virus Influenza A di daerah aliran sungai Bengawan Solo sebagai informasi untuk tindakan pencegahan secara dini.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Tujuan Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk:

1. Mengetahui Daerah Aliran Bengawan Solo merupakan sumber penularan virus Influenza A
2. Mengetahui perbedaan kasus Influenza A terkait wilayah DAS Bengawan Solo

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan model penyebaran virus Influenza A di daerah aliran sungai Bengawan Solo sehingga dapat dijadikan data dasar dalam proses penyebaran virus tersebut.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat praktis mengenai hasil studi mengenai virus Influenza A yang terdapat di daerah aliran sungai Bengawan Solo sehingga dapat dijadikan acuan untuk tindakan penanggulangan secara dini.



**BAB 2**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Virus Influenza A

Virus Influenza terdiri dari tiga tipe yaitu tipe A, B dan tipe C. Ketiga tipe ini dapat dibedakan berdasarkan perbedaan antigenik yang terdapat pada nukleoprotein (NP) dan matriks (M). Virus Influenza A dapat menyebabkan pandemi dan epidemi pada mamalia dan unggas. Hal ini disebabkan karena selain dapat menginfeksi unggas juga dapat menginfeksi mamalia. Virus Influenza tipe B dan C hanya menginfeksi manusia dan sifatnya kurang patogen dibandingkan virus Influenza A. Virus Influenza tipe A dibagi menjadi berbagai sub tipe dan diberi nama berdasarkan atas dua jenis protein yang terletak di permukaan virus yaitu *hemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA). Berbagai kombinasi yang berbeda dari HA dan NA sangat mungkin terjadi. Beberapa sub tipe influenza A yang sering ditemukan pada manusia yaitu H1N1, H1N2 dan H3N2. Sedangkan tipe yang lain lazim ditemukan pada spesies binatang contohnya H7N7 dan H3N8 yang menginfeksi kuda, meski akhir-akhir juga ditemukan H3N8 dapat menginfeksi anjing (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001; CDC, 2005).

Virus Influenza A termasuk famili *Orthomyxoviridae* ((Scholtissek *et al*, 1983; Horimoto dan Kawaoka, 2001). Genom virus Influenza tipe A berupa rantai asam ribonukleat (ribo nucleic acid / RNA) untai tunggal, *sense* negatif, sepanjang kurang lebih 13.588 nukleotida yang tersusun dalam 8 segmen yang dibungkus oleh protein nukleokapsid yaitu *Polimerase Basic 1* (PB1), *Polimerase Basic 2* (PB2), *Polimerase Acidic* (PA), Hemagglutinin (HA atau H), Nukleokapsid (NP),

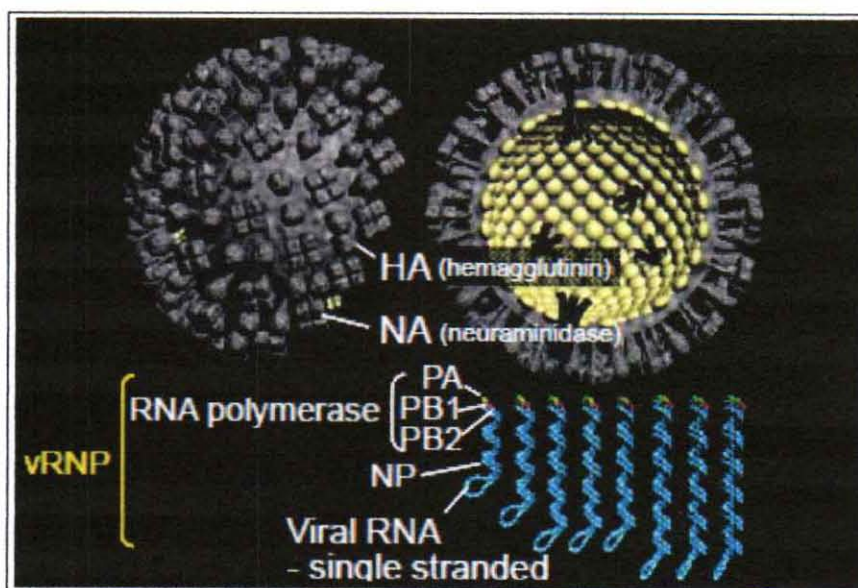
*Neuraminidase* (NA atau N), *Matrix* (M) dan *Non Structural* (NS). Kedelapan segmen ini bersama-sama membentuk ribonukleoprotein (RNP), dan setiap segmen akan menyandi protein yang memiliki fungsi penting. Total protein yang disandi kedelapan segmen ini adalah 10 macam protein yaitu : protein PB1, protein PB2, protein PA, protein HA, protein NP, protein NA, protein M1 dan M2 dan protein NS1 dan NS2(Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001).. Nama gen, jumlah nukleotida dan fungsi protein secara singkat, dapat dilihat pada tabel 2.1 dibawah ini:

**Tabel 2.1.** Gen, jumlah nukleotida, protein virus influenza A

Gen	Nukleotida	Protein	Fungsi
1	2341	PB2	<i>Transcriptase : cap binding</i>
2	2341	PB1	<i>Transcriptase : elongasi</i>
3	2233	PA	<i>Transcriptase : aktivitas protease (?)</i>
4	1778	HA	Hemaglutinin, berikatan dengan reseptor
5	1565	NP	Nukleoprotein : <i>RNA binding</i> ; bagian dari kompleks transkriptase; transportasi vRNA antara nukleus/sitoplasma
6	1413	NA	<i>Neuraminidase : pelepasan virus</i>
7	1023	M1	Protein matriks : komponen utama virion
		M2	<i>Protein integral membrane ; saluran ion</i>
8	890	NS1	Non-struktural, pada nukleus berefek pada transport RNA sel; <i>splicing</i> , translasi
		NS	Non-struktural pada nukleus dan sitoplasma

(Horimoto dan Kawaoka, 2001)

Virus influenza A mempunyai amplop dengan *lipid bilayer* yang berasal dari inang dan ditutupi dengan sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktifitas hemaglutinasi dan neuraminidase. Aktifitas ini diperankan oleh 2 glikoprotein utama pada permukaan virus yaitu hemaglutinin (HA) dan neuraaminidase (NA) yang berada dalam bentuk homotrimer dan homotetramer (Donatelli *et al*, 2001; Dybing *et al*, 2000; Hoffman *et al*, 2000, Swayne, 2004). Sampai dengan saat ini telah ditemukan 16 subtipe dari H dan 9 subtipe dari N. Virus Influenza A yang lazim didapatkan menginfeksi manusia adalah H1N1, H1N2 dan H3N2 atau disebut juga virus *Seasonal Influenza* tipe A (Horimoto dan Kawaoka, 2005; CDC, 2005). Struktur virus Influenza A secara skematis dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Struktur virus Influenza A (Kawaoka, 2010)

## 2.2 Replikasi Virus Influenza A

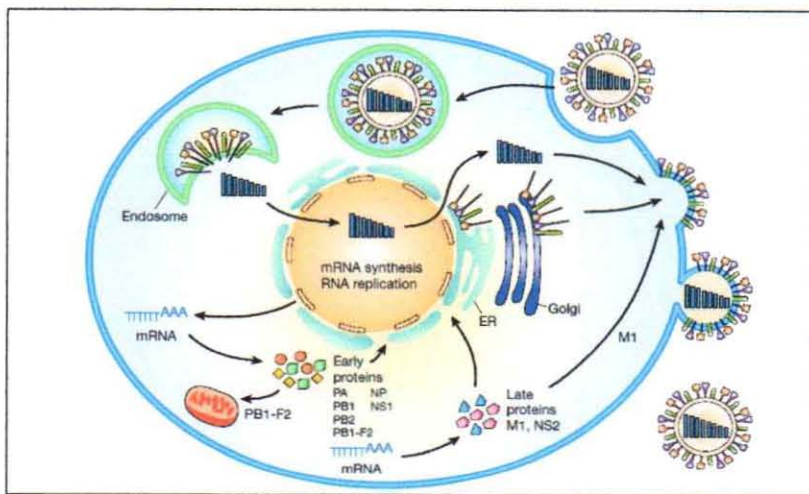
Genoma virus Influenza A berisi delapan segmen virus (vRNA) untai negatif. Selama siklus replikasi virus, genoma vRNA mengalami transkripsi menjadi untai positif mRNA dan RNA komplementer (cRNA) dalam inti sel. Mekanisme ini yang membedakan dengan virus RNA lainnya. Sebagai promoter sintesis mRNA diletakkan pada bagian struktur untai ganda RNA yang dibentuk dari urutan ujung 5' dan 3' dari segmen genoma vRNA (Honda *et al*, 2002; Mikulasova *et al*, 2000)

Selama replikasi, virus Influenza memerlukan aktivitas glikoprotein permukaan yaitu protein HA dan NA. Glikoprotein HA bertanggung jawab untuk berikatan dengan asam sialat yang terletak pada glikokonjugat permukaan sel, dan glikoprotein NA yang berfungsi dalam aktivitas enzimatis terhadap pelepasan asam sialat dari glikokonjugat sel dan juga dalam sintesis protein untuk memfasilitasi virion baru dalam *budding* sel (Kobasa *et al*, 2001).

Setelah berikatan dengan reseptor *tropism cell*, virus Influenza A akan masuk ke dalam sel melalui proses endositosis. Adanya pH yang rendah pada endosom akan menginduksi perubahan konformasi dalam protein HA menghasilkan fusi antara membran virus dengan membran endosom. Di dalam endosom, saluran proton M2 terbuka dan RNP akan keluar ke sitoplasma. Proses ini dapat berlangsung beberapa saat. Berdasarkan pengamatan di laboratorium, dalam waktu 10 menit, proses endositosis sudah berlangsung 50 %. Proses endositosis ini berlangsung sampai semua genoma RNA virus ke luar dan masuk ke dalam sitoplasma (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Raharjo dan Nidom, 2004).

Proses selanjutnya genom RNA akan masuk ke dalam inti sel dan mengalami transkripsi, guna mengubah bentuk polaritas negatif (-) menjadi polaritas positif (+). Sebagian genom keluar kembali masuk sitoplasma mengambil *cap* RNA sel inang dan poli A guna melakukan translasi untuk menghasilkan berbagai protein termasuk protein selubung yang selanjutnya digunakan oleh virus baru. Protein tersebut meliputi protein hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matriks (M) dan non struktural (NS) (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Raharjo dan Nidom, 2004).

Genom RNA sebanyak delapan segmen yang berada dalam inti sel melakukan replikasi. Setelah melakukan replikasi dalam inti sel, kedelapan segmen RNA ini akan dibungkus dengan protein HA, NA, M dan NS. Untuk keperluan pelepasan (*budding*) virus akan terjadi penempelan pada reseptor di permukaan luar sel yang akan dilakukan oleh protein NA. Proses replikasi virus ini dapat berlangsung selama dua jam sejak terjadinya penempelan virus Influenza pada reseptor sel (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Raharjo dan Nidom, 2004).



Gambar 2.2. Replikasi virus Influenza ( dikutip dari Neumann *et al*, 2009)

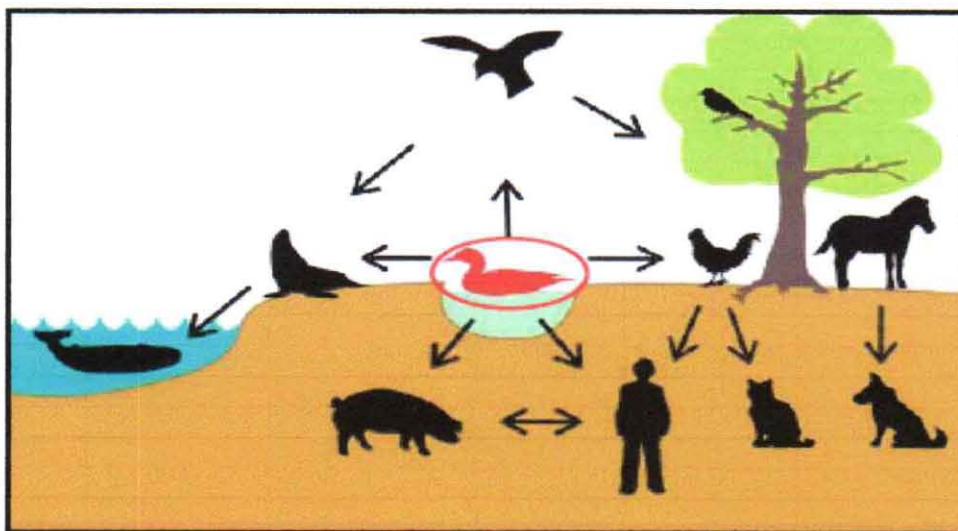
### 2.3 Peran Bebek dalam Penularan Virus Influenza A melalui air

Secara teori, Influenza dapat ditularkan melalui tiga cara, yakni lewat aerosol, droplet dengan ukuran besar serta kontak langsung dengan sekresi atau muntahan (Tellier *et al*, 2006). Aerosol merupakan suspensi partikel cair atau padat di udara (atau gas) yang memiliki ukuran cukup kecil sehingga memiliki kecepatan (*velocity*) yang rendah. Dengan demikian partikel tersebut akan tetap berada di udara dalam periode waktu yang lama. Semakin kecil ukuran partikel aerosol maka waktu berada di udara semakin lama (Nicas *et al*, 2005). Diameter partikel aerosol adalah bila  $\leq 5 \mu\text{m}$ . Hal ini disebabkan karena partikel dengan ukuran  $\leq 5 \mu\text{m}$  dapat berada lama di udara dan dapat dideposisi secara efektif di saluran nafas bawah (Nicas *et al*, 2005). Sedangkan droplet terjadi apabila suspensi partikel bersifat higroskopik dan apabila terjadi kelembapan maka akan menggumpal kembali misalnya di paru-paru. Aerosol yang berada lama di udara menyebabkannya mudah terbawa ke tempat lain sehingga dapat menyebabkan penyebaran infeksi dalam rentang jarak yang jauh. Penyebaran infeksi dengan rentang jarak yang jauh ini tergantung beberapa faktor, yaitu dilusi, dosis infeksius, jumlah partikel infeksius yang dihasilkan, waktu pengeluaran (*shedding*) agen infeksi dan persistensi agen infeksi di lingkungan (Knight *et al*, 1980).

Penularan Influenza melalui air (*water-borne*) pada bebek telah ditemukan di danau di beberapa Negara di Seberia, Kanada, dan Alaska. Virus influenza berlipkasi di sel epitel kolon pada bebek dengan tidak menunjukkan gejala klinis tetapi mengeluarkan virus melalui feses (Kida, 1980; Soda, 2009). Ketika bebek menjadi reservoir dari virus *Avian Influenza* dan resisten terhadap infeksi virus

avian influenza. Bebek maupun ayam pada epitel saluran pencernaannya mengekspresikan reseptor SA $\alpha$ 2,3-Gal dan juga didapatkan reseptor SA $\alpha$ 2,3-Gal dan SA $\alpha$ 2,6-Gal pada trachea dan beberapa organ lain (Kuchipudi *et al*, 2009). Hal ini diyakini bebek dapat terinfeksi oleh virus Influenza A yang mempunyai reseptor SA $\alpha$ 2,3-Gal dan SA $\alpha$ 2,6-Gal.

Peran bebek dalam penularan virus Influenza A adalah dengan terinfeksi bangsa bebek dengan virus Influenza A dari berbagai seperti H5N1, H1N1, H3N2 dan lain-lain, virus tersebut akan mengalami adaptasi pada usus yang meningkatkan jumlah virus tersebut pada saat dikeluarkan melalui feses yang akan menyebabkan penularan rute fekal-oral yang dipercaya merupakan rute peularan yang efisien. Apabila feses hasil *shedding* tersebut mengkontaminasi air dan lingkungan lain serta hewan lain akan meningkatkan distribusi penularan virus ini (Delogu *et al*, 2010). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 2.3 di bawah ini:



Gambar 2.3. Jalur penularan virus Influenza pada unggas dan mamalia (Kawaoka, 2010)



## 2.4 Profil Daerah Aliran Sungai Bengawan Solo

Profil Wilayah DAS Bengawan Solo Sungai Bengawan Solo, yang terletak di Propinsi Jawa Tengah dan Jawa Timur dengan luas total wilayah sungai  $\pm 19.778 \text{ km}^2$ , merupakan sungai terbesar di Pulau Jawa. , terletak di Propinsi Jawa Tengah dan Jawa Timur dengan luas wilayah sungai  $\pm 12\%$  dari seluruh wilayah Pulau Jawa pada posisi  $110^{\circ}18'$  BT sampai  $112^{\circ}45'$  BT dan  $6^{\circ}49'$  LS sampai  $8^{\circ}08'$  LS. Luas total wilayah sungai (WS) Bengawan Solo  $\pm 19.778 \text{ km}^2$ . Daerah Aliran Sungai (DAS), yaitu DAS Bengawan Solo dengan luas  $\pm 16.100 \text{ km}^2$ , DAS Kali Grindulu dan Kali Lorog di Pacitan seluas  $\pm 1.517 \text{ km}^2$ , DAS kecil di kawasan pantai utara seluas  $\pm 1.441 \text{ km}^2$  dan DAS Kali Lamong seluas  $\pm 720 \text{ km}^2$ . DAS Bengawan Solo merupakan DAS terluas di WS Bengawan Solo yang meliputi Sub DAS Bengawan Solo Hulu, Sub DAS Kali Madiun dan Sub DAS Bengawan Solo Hilir. Sub DAS Bengawan Solo Hulu dan sub DAS Kali Madiun dengan luas masing-masing  $\pm 6.072 \text{ km}^2$  dan  $\pm 3.755 \text{ km}^2$ . Bengawan Solo Hulu dan Kali Madiun mengalirkan air dari lereng gunung berbentuk kerucut yakni Gunung Merapi ( $\pm 2.914 \text{ m}$ ), Gunung Merbabu ( $\pm 3.142 \text{ m}$ ) dan Gunung Lawu ( $\pm 3.265 \text{ m}$ ), sedangkan luas Sub DAS Bengawan Solo Hilir adalah  $\pm 6.273 \text{ km}^2$ . Secara administratif WS Bengawan Solo mencakup 17 (tujuh belas) kabupaten dan 3 (tiga) kota, yaitu:

Kabupaten : Boyolali, Klaten, Sukoharjo, Wonogiri, Karanganyar, Sragen, Blora, Rembang, Ponorogo, Madiun, Magetan, Ngawi, Bojonegoro, Tuban. Lamongan, Gresik dan Pacitan.

Kota : Surakarta, Madiun dan Surabaya,  
( Balai Besar Wilayah Bengawan Solo, 2008)

Mengenai Kabupaten-kabupaten yang dilalui oleh aliran Sungai Bengawan Solo dapat dilihat pada Gambar 2.4 di bawah ini:

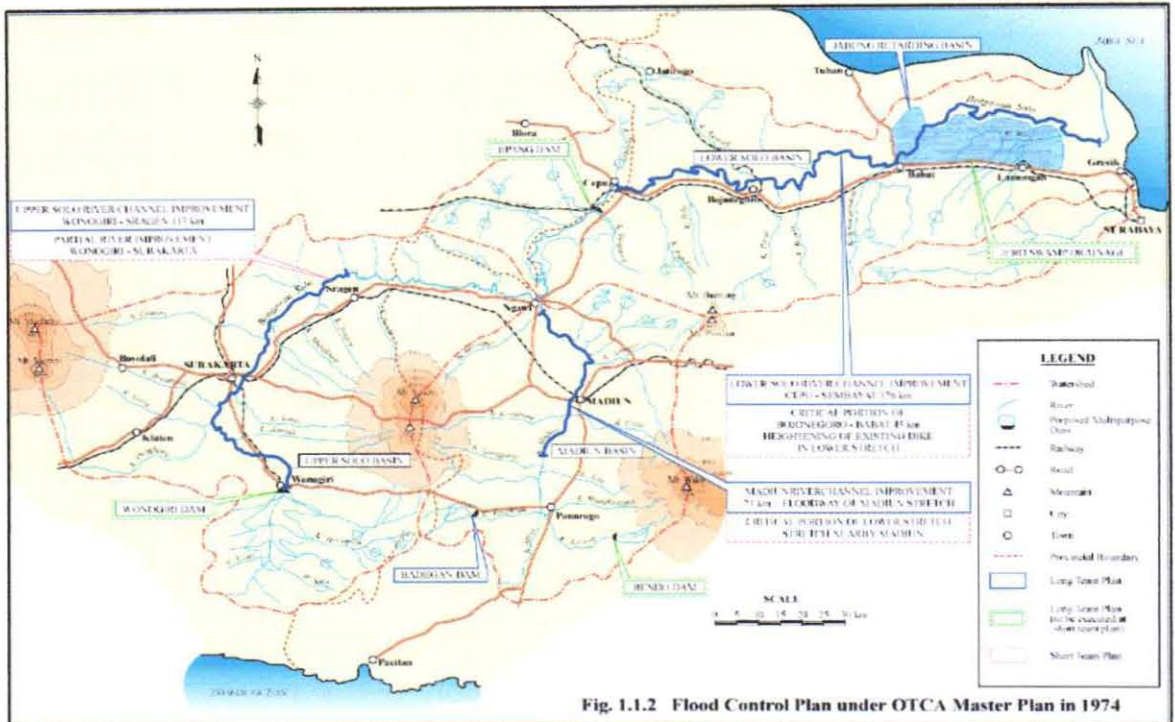


Fig. 1.1.2 Flood Control Plan under OTCA Master Plan in 1974

Gambar 2.4. Peta Kabupaten yang dilalui oleh aliran Sungai Bengawan Solo (Balai Besar Wilayah Bengawan Solo, 2008)

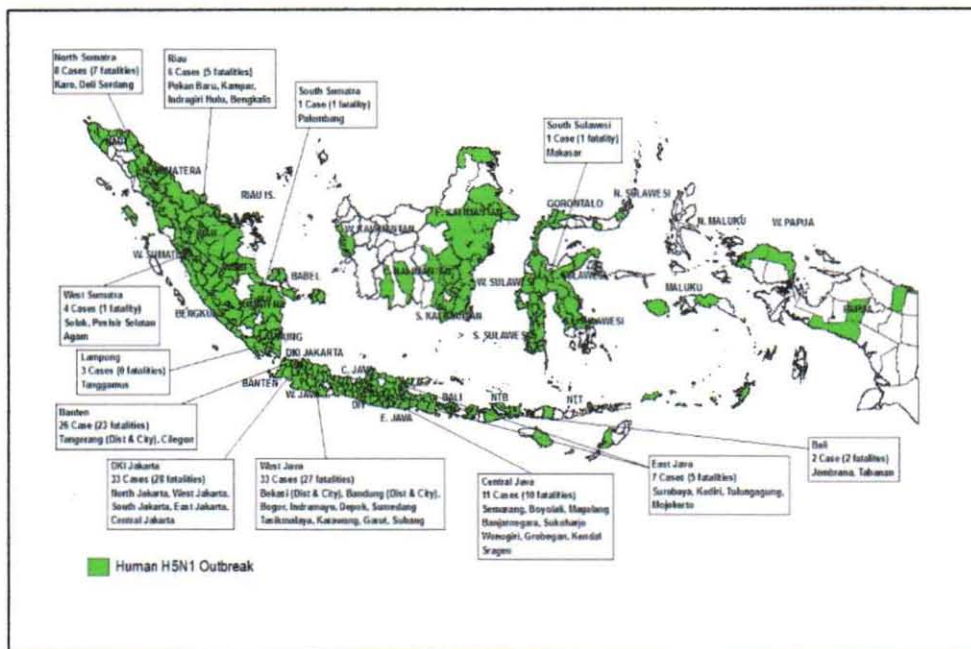
## 2.5 Epidemiologi Influenza A

Influenza A pada manusia telah menyebabkan sekitar setengah juta orang meninggal akibat setiap tahunnya. **Tahun 1918-1919**, Virus Influenza A sub tipe H1N1, menyebabkan tingkat kematian yang sangat tinggi dan dikenal dengan "**Spanish flu**". Jumlah kematian akibat virus ini adalah lebih dari 50 juta orang meninggal di seluruh dunia (Robin and Rabadan, 2007; Patterson and pley, 1991). Tahun **1957-1958**, Virus Influenza A sub tipe H2N2 telah menyebabkan kematian lebih dari 70.000 orang di Amerika Serikat dan pertama kali teridentifikasi di Cina pada akhir Februari sehingga pandemi ini dikenal dengan nama "**Asian flu**". Dalam waktu empat bulan Asian Flu menyebar telah menyebar di Amerika

Serikat pada sekitar Juni tahun 1957 . Tahun **1968-1969**, Virus Influenza A sub tipe H3N2 menyebabkan lebih dari 34.000 kematian di Amerika Serikat dan dikenal dengan nama "*Hong Kong flu*". Virus ini pertama kali dideteksi di Hong Kong pada awal tahun 1968 dan menyebar di Amerika Serikat pada akhir tahun 1968. Virus Influenza A dengan sub tipe H3N2 masih berada di lingkungan sampai dengan saat ini (Bush, 2007; Noble, 1982). Tahun 1996 ditemukan virus Influenza A H7N7 yang menginfeksi seorang wanita di Inggris yang ditransmisikan oleh bebek (Kurtz *et al.*,1996). Tahun 2003 H7N7 menginfeksi 89 orang di Belanda yang menyebabkan kematian dengan konjungtivitis (Fouchier *et al.*, 2004;Koopmans *et al.*, 2004).

Influenza A pada hewan telah diketemukan sejak 1918 saat terjadinya pandemik H1N1 pada manusia yang dikenal dengan nama classical swine influenza yang menginfeksi babi dengan gejala pernafasan yang bersifat akut. Virus H1N1 pada selain menyerang babi juga menyerang unggas yang dikenal dengan nama avian H1N1 strain (Murphy and Webster, 1996; Brown, 2000; Webby *et al.*, 2000). Sejarah menceitakan bahwa kuda telah terinfeksi virus Influenza A sub tipe H3N8 dan H7N7 yang menyebabkan gejala pernafasan akut. Outbreak virus Influenza A sub tipe H3N8 dan H7N7 pada saat ini tidak menginfeksi pada manusia (Robin and Rabadan, 2007). Sementara Influenza A yang menginfeksi bangsa unggas lebih dikenal dengan virus flu burung, Flu burung atau juga dikenal sebagai avian influenza merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus influenza tipe A (CDC, 2004; US Department of Labor, 2004; WHO, 2004; Omi, 2005; WHO, 2005; Behrens and Stoll, 2006). Hingga saat ini, wabah flu burung dengan patogenisitas yang tinggi (*highly pathogenic*), disebabkan oleh

virus influenza sub tipe H5 dan H7 (Swayne and Suarez 2000; Behrens and Stoll, 2006; Harder and Werner, 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 (US Department of Labor, 2004), akan tetapi WHO (2004) mengemukakan bahwa flu burung juga dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada mamalia dan manusia.



Gambar 2.5. Daerah endemis virus Flu Burung Sub tipe H5N1 di Seluruh Indonesia (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).

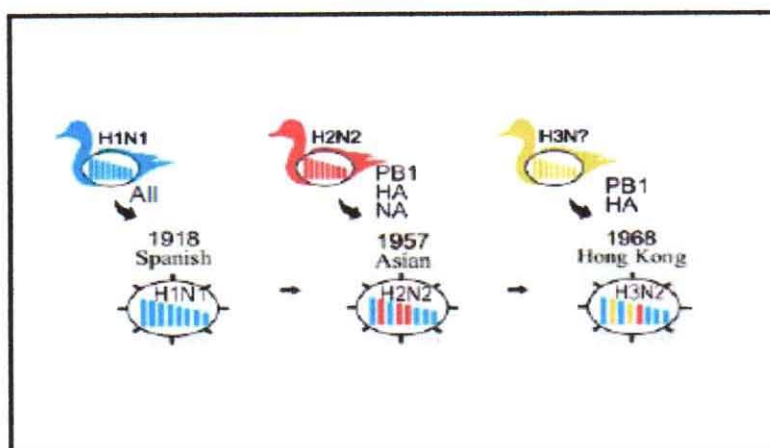
**BAB 3**  
**KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN**

## BAB 3 Kerangka Konseptual Penelitian

### 3.1 Kerangka konseptual penelitian

Daerah aliran sungai Bengawan Solo merupakan aliran sungai yang banyak digunakan sebagai daerah pemeliharaan bebek dan memiliki potensi sebagai agen penularan virus influenza A secara *water-borne* pada unggas maupun pada mamalia. Virus Influenza A dapat bertahan pada air sekitar 30 hari pada suhu 0 °C dan dapat bertahan diatas 4 hari pada suhu 22 °C (Khalenkov *et al.*, 2008). Virus Influenza A (H5 dan H7) dinyatakan dapat bertahan dalam air dengan berbagai temperature dan salinitas sehingga dapat berada dalam air dengan waktu cukup lama (Brown *et al.*, 2007). Mengingat bahwa daerah aliran sungai Bengawan Solo mengalir 2 Propinsi di Jawa, yaitu Jawa Timur dan Jawa Tengah yang merupakan Propinsi terbesar terjadinya kasus Influenza A subtype H5N1 diyakini bahwa limbah yang berasal dari berbagai sumber yang mengkontaminasi DAS Bengawan Solo akan tertangkap oleh bebek sebagai santinel. Bebek dijadikan santinel karena bebek resisten terhadap infeksi virus Influenza. Resistensi terjadi karena bebek mempunyai gen RIG-1, gen RIG-1 merupakan sensor terhadap RNA virus saat di sitoplasma yang dapat menginduksi pelepasan Interferon yang dapat mencegah replikasi virus Influenza A pada saat menginfeksi bebek (Barber *et al.*, 2009). Selain itu bebek dijadikan santinel karena pada epitel saluran pernafasan dan pencernaannya mengekspresikan reseptor SA $\alpha$ 2,3-Gal dan reseptor SA $\alpha$ 2,6-Gal sehingga dapat menangkap virus Influenza A baik yang beresepor SA $\alpha$ 2,3-Gal maupun beresepor SA $\alpha$ 2,6-Gal (Kuchipudi *et al.*, 2009). Bebek juga telah dinyatakan dapat menyebabkan terjadinya penyebaran virus Influenza yang

berasal dari unggas kepada manusia (Gambaryan *et al.*, 2008). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini:



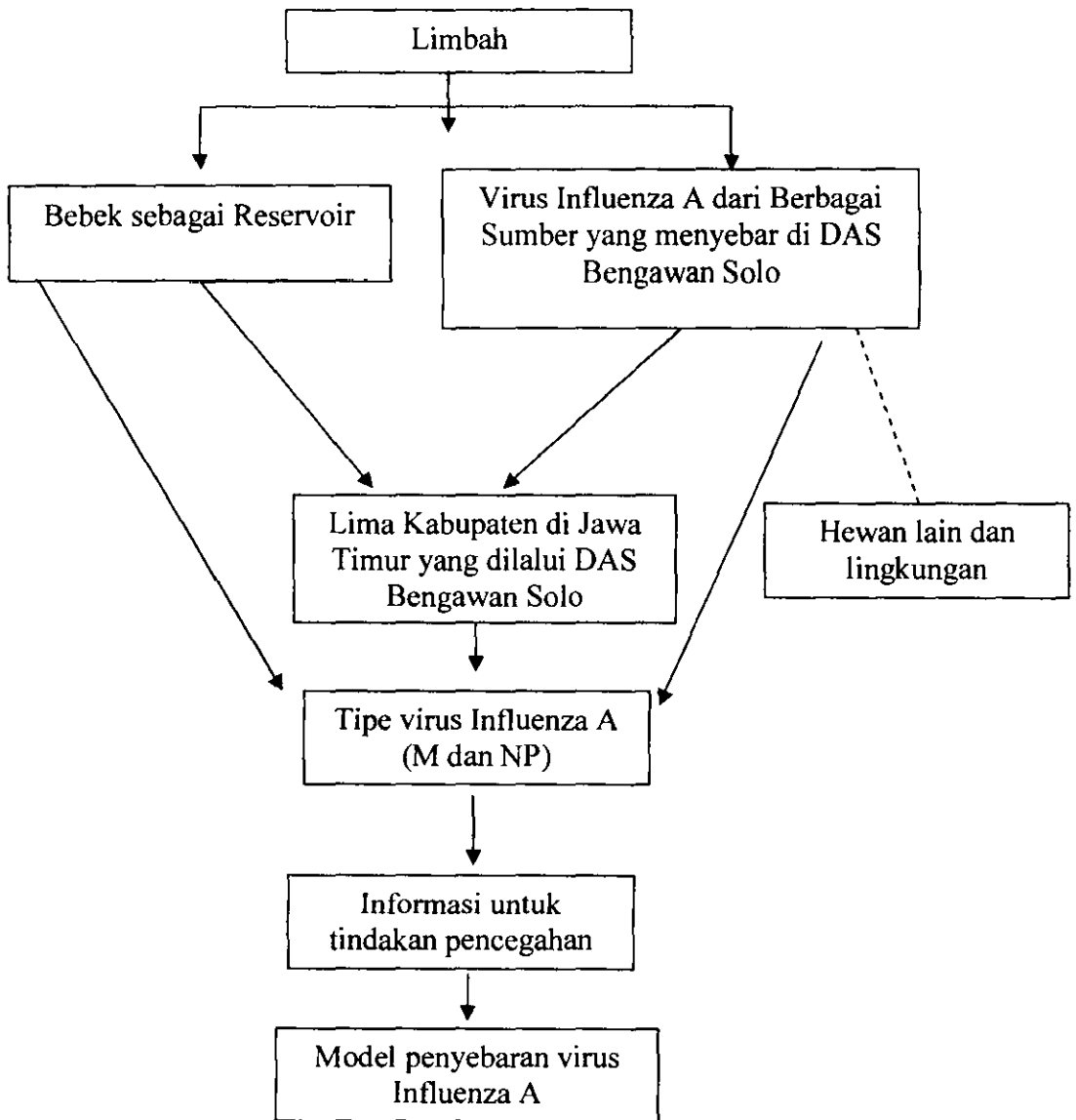
Gambar 3.1. Bebek sebagai reservoir virus Influenza (Kawaoka, 2010)

Gambar 3.1 di atas menyatakan bahwa bebek dapat menjadi reservoir terhadap berbagai virus Influenza A. Virus Influenza A yang tertangkap oleh bebek yang ditempatkan di lima Kabupaten di Jawa Timur yang teralui oleh DAS Bengawan Solo diharapkan dapat terdikripsikan melalui hasil pemeriksaan protein Matrik (M) dan Nukleoprotein (NP) karena protein tersebut merupakan protein yang konsisten pada virus Influenza A. Hasil pemeriksaan virus Influenza A pada sampel didapatkan M dan NP positif menunjukkan bahwa virus tersebut telah bereplikasi dalam tubuh bebek, apabila hanya M yang didapatkan maka virus tersebut belum bereplikasi sehingga bisa dikatakan virus kontaminasi.

Berdasarkan uraian di atas, survailans penyebaran virus Influenza A di daerah aliran Sungai Bengawan Solo yang berasal dari berbagai sumber akan tertangkap oleh bebek sebagai reservoir pada Lima kabupaten di Jawa Timur yang teralui oleh DAS Bengawan Solo. Virus Influenza A yang didapatkan akan menjadi data awal apa virus tersebut berasal dari hulu sampai ke hilir atau model virus tersebut berbeda disetiap kabupaten dan juga virus yang terdapat merupakan



hasil replikasi pada tubuh bebek sebagai santinel yang mungkin akan terungkap dengan analisis protein matrix dan nukleo protein, sehingga dapat memberikan informasi tentang keragaman virus Influenza A dari hulu ke hilir DAS Bengawan Solo sehingga dapat diketahui pola perubahan virus virus Influenza A pada bebek sebagai santinel, yang berpotensi dalam penyebaran maupun penularan virus Influenza A dan dapat dilakukan pencegahan secara dini terhadap kasus virus Influenza A di Jawa Timur.



**Keterangan**

————> : Variabel yang diteliti

-----> : Variabel yang tidak diteliti

Gambar 3.2. Kerangka Konseptual Penelitian

**BAB 4**  
**MATERI DAN METODE PENELITIAN**

## BAB 4 MATERI DAN METODA

### 4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk studi epidemiologi molekuler. Penelitian ini tergolong dalam epidemiologi yang bersifat deskriptif.

### 4.2 Populasi dan Sample

Hewan coba penelitian berupa 150 bebek petelur strain itik Mojosari berumur 4 bulan yang telah diuji HI (Heamsglutination Inhibition Test) negatif Influenza A.

### 4.3 Materi Penelitian

#### 4.3.1 Bahan Penelitian

Bahan- bahan untuk koleksi sampel adalah sebagai berikut: Medium transport (M199) dan Alkohol 70%.

Bahan - bahan untuk inokulasi dan pemanenan sampel pada TAB adalah sebagai berikut: Telur ayam bertunas (TAB) umur 9-11 hari yang bersifat SPF (*Specific Pathogenic Free*) yang berasal dari Biofarma (Bandung) dan Alkohol 70%.

Bahan - bahan untuk uji *Haemeagglutination test* (HA) adalah sebagai berikut: Cairan allantois hasil inokulasi dari TAB (Telut Ayam Bertunas), *PBS* (*Phosphat buffer saline*), RBC (*red blood cell*) ayam 0,5 %. antigen standart virus AI A/Ck/Ind/114/08 strain lapangan.

Bahan yang digunakan uji *Haemeagglutination Inhibition test* (HI) dan *Haemeagglutination Inhibition test* (HI) untuk antisera adalah sebagai berikut: sampel hasil inokulasi dari TAB dengan HA positif. Antiserum kontrol AI subtype H5N1 ayam dari *Laboratorium Avian Influenza Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga Surabaya, antigen standart virus AI A/Ck/Ind/114/08 strain lapangan, alkohol 70%, aquadest steril, *Red Blood Cell* (RBC) ayam 0.5%, *Phosphat Buffer Saline* (PBS).

Bahan – bahan untuk isolasi RNA virus Influenza A adalah sebagai berikut: Sampel ( allantois hasil inokulasi dari TAB yang positif HA dan HI antisera), *RNA extraction kit* (Qiagen, AS, dengan nomor katalog 52906) yang terdiri dari : bufer AVL, pembawa RNA, AW1, AW2, AVE, Etanol 98 %

Bahan - bahan untuk *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT PCR) adalah sebagai berikut: RNA virus, *RT-PCR kit* (dari *Applied biosystem*)

Bahan - bahan untuk Elektroforesis adalah sebagai berikut: Gel agarose 1% (Sigma), *Loading dye* (Fermentas), *Ladder (DNA marker)* (Invitrogen), Produk *PCR* ,*TBE 1x*, *Ethidium bromide* (Promega, AS).

#### 4.3.2 Alat Penelitian

Alat-alat untuk pengoleksian sampel adalah sebagai berikut : *cotton bud*, *cooler box*, gunting, kertas label, marker, masker N95 (FAO), spuit 1cc dan jarum 26G dan konikel 15 ml.

Penanaman virus menggunakan Telur Ayam Bertunas (TAB) dan pemanenan virus menggunakan alat-alat sebagai berikut : *Biosafety Cabinet*

(*NUIER*), *candling lamp*, spuit 1ml dan 10ml, jarum 24G dan 14 G, Konikal 15 ml, 50 ml. (Corning, Meksiko) , Blue tips, Yellow tips (Nichiryo, Jepang dan Gilson, Prancis) serta inkubator telur 37 °C (*NUIER*).

UJI *Haemeagglutination (HA) test* menggunakan alat-alat sebagai berikut : *Plate* dengan 96 sumuran dengan dasar sumuran berbentuk u atau v / *96-well U / V plate* (Nunc, Denmark) *96-well U / V plate*, Tip biru (LP Italiana, Italia), Tip kuning (LP Italiana, Italia), *Reservoir* (Nunc, Denmark), Konikal 15 ml, 50 ml (Corning, Meksiko), Pipet mikro 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l (multitip/multichannel) (Nichiryo, Jepang dan Gilson, Prancis).

Alat - alat yang digunakan uji *Haemeagglutination Inhibition test (HI)* anti sera adalah sebagai berikut: *Plate* dengan 96 sumuran dengan dasar sumuran berbentuk u atau v / *96-well U / V plate* (Nunc, Denmark) *96-well U / V plate*, Tip biru (LP Italiana, Italia), Tip kuning (LP Italiana, Italia), *Reservoir* (Nunc, Denmark), Konikal 15 ml, 50 ml (Corning, Meksiko), Pipet mikro 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l (multitip/multichannel) (Nichiryo, Jepang dan Gilson, Prancis)

Alat-alat untuk Ekstraksi RNA virus Influenza A adalah sebagai berikut: Tabung *ependorf* 1500  $\mu$ l (Corning, Meksiko), Pipet mikro 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l (Nichiryo, Jepang dan Gilson, Prancis), Tip biru (LP Italiana, Italia), Tip kuning (LP Italiana, Italia), Tip putih (LP Italiana, Italia), Tabung koleksi / *collecting tube* (Qiagen, AS).Mesin sentrifus (Hitachi, Jepang).

Alat-alat untuk *Reverse transcription polymerase chain reaction (RT PCR)* adalah sebagai berikut: Mesin *PCR* (BIOEUR, Jerman dan TAKARA, Jepang), *one step RT PCR kit* (komponen : *superscript*<sup>TM</sup> III RT 200 U/ $\mu$ l; 5X *First-Strand Buffer* / 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 M DTT), Tabung

*ependorf* 200  $\mu$ l (Corning, Meksiko), tabung 0,2 ml, Pipet mikro 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ l (Nichiryo, Jepang dan Gilson, Prancis), Tip putih (LP Italiana, Italia)

Alat – alat untuk Elektroforesis adalah sebagai berikut: Kertas parafilm (Asahi, Jepang), Pipet mikro 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ l (Nichiryo, Jepang dan Gilson, Prancis), Tip putih (LP Italiana, Italia), Mesin elektroforesis (Advance).

#### 4.4 Variabel Penelitian

Karena penelitian ini adalah penelitian deskriptif, maka tidak ada variabel penelitian.

##### 4.4.1 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional penelitian ini adalah :

1. Daerah Air aliran sungai Bengawan Solo adalah Air yang berasal dari aliran sungai Bengawan Solo yang berada pada Kabupaten yang telah ditentukan berdasarkan informasi *out break*
2. Bebek santinel adalah bebek yang dijadikan sebagai alat menjaring virus Influenza A
3. Tipe virus Influenza A adalah virus influenza yang terjaring oleh bebek yang pembedaannya ditentukan dengan protein Matrix dan nukleoprotein

#### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di 4 Kabupaten beberapa desa di daerah sekitar aliran sungai Bengawan Solo, desa – desa yang menjadi tempat distribusi bebek antara lain: Desa Lingkungan Tanjung Rejo Kecamatan Karang Tengah Kabupaten

Ngawi, Desa Kebo Melati Kecamatan Plumpang Kabupaten Tuban, Desa Ledok Kulon Kecamatan Bojonegoro Kabupaten Bojonegoro, Desa Sidorejo Kecamatan Bungah Kabupaten Gresik dan Desa Prijek Kecamatan Maduran Kabupaten Lamongan. Pengujian dan Analisis sampel di Lakukan di Laboratorium Avian Influenza dengan fasilitas Animal BSL-3 dan BSL-2 Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Oktober 2010 sampai dengan Maret 2011.

#### **4.6 Metode Penelitian**

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap:

- Tahap 1 : Pendistribusian bebek yang sebelumnya telah diuji dengan metode HA dan HI untuk memastikan bahwa bebek tersebut bebas terhadap virus influenza A
- Tahap 2 : Pengambilan sampel , sampel yang didapat diinokulasi pada TAB, hasil inokulasi kemudian dilanjutkan dengan uji HA.
- Tahap 3 : Hasil HA yang positif di PCR dengan menggunakan primer Matrix (M) dan Nukleo Protein (NP) untuk virus Influenza A



## Tahap 1

### a. Pemilihan bebek

Sebanyak 150 ekor yang akan dijadikan santinel, bebek-bebek tersebut dihomogenkan umurnya dan jenis kelaminnya kemudian dilakukan uji HI untuk memastikan bahwa bebek-bebek tersebut bebas dari virus Influenza A, sebelum bebek didistribusikan pada tempat yang telah ditentukan

### b. Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) Mikroteknik

Uji hambatan hemaglutinasi (HI) dapat digunakan untuk membantu diagnosis laboratorium terhadap kondisi infeksi yang sedang atau sudah berlalu dari suatu sumber agen infeksi terhadap inang, selain itu uji HI juga dapat digunakan untuk menentukan titer antibodi inang setelah vaksinasi, hewan sembuh dari penyakit, hewan baru terinfeksi penyakit atau sudah lama terinfeksi penyakit.

Uji hambatan hemaglutinasi (HI) adalah pemeriksaan serologis yang membuktikan pembentukan antibodi spesifik hemaglutinin (HA) dari virus *Avian Influenza* H5N1 dalam serum darah. Sampel yang diperiksa adalah serum darah bebek. Pada penelitian kali ini pengujian yang digunakan adalah uji hambatan hemaglutinasi dengan menggunakan RBC ayam 0,5 % dan inaktivasi pada sampel serum yang akan diperiksa.

Sebelum pengujian uji hambatan hemaglutinasi (HI), dilakukan retirasi antigen untuk mendapatkan titer  $2^2$  HAU. Pada uji ini antigen yang digunakan adalah antigen standart virus AI A/Ck/Ind/114/08 strain lapangan . Prosedur untuk retitrasi antigen empat HA unit adalah pengisian 50  $\mu$ l PBS ke dalam lubang

*microplate* nomor satu sampai nomor lima, kemudian antigen yang telah diencerkan menjadi empat HA unit dimasukkan pada lubang nomor satu sebanyak 50  $\mu$ l. Selanjutnya dilakukan pengenceran serial dengan mengambil 50  $\mu$ l dari lubang nomor satu dipindah ke nomor dua, dicampur sampai rata kemudian diambil dan dimasukkan pada lubang nomor tiga. Kegiatan ini dilakukan terus sampai lubang nomor empat, sisa 50  $\mu$ l dibuang. Pada lubang nomor lima digunakan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya semua lubang ditambah dengan RBC ayam 0,5% sebanyak 50  $\mu$ l. Setelah itu inkubasi dalam suhu kamar selama 30 menit sampai 60 menit. Bila pengenceran antigen empat HA tepat, maka pada lubang nomor satu dan dua akan terjadi aglutinasi (OIE, 2005).

Sebelum dilakukan pengujian, serum harus mendapat perlakuan khusus dengan melakukan inaktivasi untuk menghilangkan substansi non spesifik dari sampel serum yang mampu mengaglutinasi eritrosit (WHO, 2002). Serum diinaktivasi pada suhu 56<sup>0</sup>C selama 30 menit sampai 1 jam.

Langkah-langkah dalam uji HI mikroteknik diawali dengan memasukkan 25  $\mu$ l PBS kedalam tiap lubang *microplate* "V", kecuali lubang pada baris A (A1-A12). Sampel serum yang telah mendapatkan perlakuan dimasukkan kedalam baris A (A1-A12) sebanyak 50  $\mu$ l, kemudian dibuat pengenceran secara serial dengan cara mengambil 25  $\mu$ l dari baris A kemudian dituang ke baris B dan dicampur hingga merata, selanjutnya dari baris B diambil 25  $\mu$ l dan dimasukkan ke baris C, demikian seterusnya sampai lajur H. Sisa 25  $\mu$ l dibuang. Khusus untuk kolom 11 dan 12, pengenceran hanya dilakukan sampai baris G karena lubang H11 dan H12 digunakan untuk kontrol. Selanjutnya semua lubang *microplate* diisi dengan antigen AI A/Ck/Ind/114/08 strain lapangan 2<sup>2</sup> HAU sebanyak 25  $\mu$ l,

kecuali pada lubang H11 antigen  $2^2$  HAU diganti dengan PBS sebanyak 25  $\mu$ l. Lubang H11 ini tidak ada antigen didalamnya, sehingga eritrosit tidak mengalami aglutinasi. Oleh karena tidak ada aglutinasi yang terjadi maka titik ini digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan pada H12 tidak diberi serum, tetapi diberi antigen sehingga eritrosit yang ditambahkan akan mengalami aglutinasi, oleh karena itu lubang ini digunakan sebagai kontrol negatif. Setelah penambahan antigen, *microplate* digoyang hingga serum dan antigen merata, kemudian didiamkan pada suhu 22-25°C selama 30 menit. Selanjutnya semua lubang diisi dengan eritrosit marmut 0,75 % sebanyak 50  $\mu$ l, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit sampai 60 menit. Langkah terakhir dilakukan penentuan titer HI dari antiserum yang diperiksa. (OIE, 2005).

Reaksi hambatan hemaglutinasi (HI) dinyatakan dengan terjadinya pengendapan eritrosit pada dasar lubang *microplate* "V" yang terlihat seperti pada kontrol.

#### **b. Distribusi Bebek**

Bebek yang telah mengalami ramdomisasi didistribusikan ke 4 Kabupaten beberapa desa di daerah sekitar aliran sungai Bengawan Solo, desa – desa yang menjadi tempat distribusi bebek antara lain: Desa Lingkungan Tanjung Rejo Kecamatan Karang Tengah Kabupaten Ngawi, Desa Kebo Melati Kecamatan Plumpang Kabupaten Tuban, Desa Ledok Kulon Kecamatan Bojonegoro Kabupaten Bojonegoro, Desa Sidorejo Kecamatan Bungah Kabupaten Gresik dan Desa Prijek Kecamatan Maduran Kabupaten Lamongan. Jumlah Bebek yang disebar sebanyak 150 ekor, masing-masing tempat sebanyak 30 ekor. Lima ekor

bebek dikandangkan untuk membedakan penularan virus yang berasal selain dari aliran sungai Bengawan solo diletakkan di Desa Prijek Kecamatan Maduran Kabupaten Lamongan.

## **Tahap 2**

### **a. Koleksi sampel**

*Cotton swab* yang steril diusapkan pada bagian kloaka dan nasal pada unggas kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi medium transport (M199) dan disimpan di dalam lemari es - 80<sup>o</sup> C sampai digunakan untuk proses PCR.

### **b. Penanganan sampel di laboratorium**

Sampel hasil swab yang diperoleh divortex yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* dan disentrifuge dengan kecepatan 3000 *rpm* selama lima menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* yang baru sebagai bahan untuk diinokulasikan pada Telur Ayam Bertunas (TAB).

### **c. Inokulasi Sampel pada Telur Ayam Bertunas (TAB)**

Supernatan hasil dari sentrifuse diinokulasikan pada TAB berumur 9-11 hari yang bersifat SPF (*Specific Pathogenic Free*) (Biofarma, Bandung) yang telah didesinfeksi dengan alkohol 70%. Kemudian TAB diberi tanda batas dengan pensil antara rongga hawa dan isi telur dengan bantuan *egg candler*. Pembuatan tanda "x" untuk lubang tidak boleh dekat dengan embrio dan tidak boleh pada

tempat yang terdapat banyak pembuluh darah. Jarak pembuatan lubang kurang lebih 3-5 mm dari batas ruang hawa. TAB yang sudah diberi tanda "x" diberi iodine kemudian dilubangi dengan alat pelubang steril. Supernatan dari sampel diinokulasikan (0,2 ml/TAB) kemudian ditutup dengan parafin atau selotip kertas. TAB diinkubasikan pada inkubator 37°C selama empat hari. Setiap hari telur ayam bertunas ini diamati untuk *dicandling* embrionya. Embrio yang mati sebelum empat hari, dikeluarkan dari inkubator kemudian disimpan pada *refrigerator* 4°C. TAB yang belum mati setelah empat hari dimatikan dengan cara memindahkan TAB ke dalam *freezer* 4°C semalam atau TAB dimasukkan ke dalam *freezer* -5°C selama 2-3 jam kemudian dipindahkan pada lemari pendingin selama 1 jam.

Isolasi virus pada cairan *allantois* telur ayam berembrio (TAB) dan identifikasi dengan uji HA dilakukan berdasarkan prosedur baku (WHO, 2002). Kemudian TAB dibuka dan diambil cairan *allantoisnya* untuk diuji Hemaglutinasi (uji HA). Uji HA bertujuan untuk mendeteksi virus dan selanjutnya bila uji HA bernilai positif dilakukan pemanenan cairan *allantois*, untuk dilakukan identifikasi virus dengan uji HI (Ernawati dkk., 2007).

### **c. Pembuatan Suspensi *Red Blood Cell* (RBC) ayam 0.5%**

*Red Blood Cell* (RBC) yang digunakan dalam uji hambatan hemaglutinasi adalah *Red Blood Cell* (RBC) ayam, darah ayam yang digunakan sebanyak 5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi antikoagulan EDTA. Darah yang sudah terkumpul dimasukkan dalam tabung *conical* 15 ml dan ditambah dengan PBS sebanyak 10 ml, selanjutnya disentrifus 1500 rpm selama 15 menit.

Supernatan dibuang kemudian ditambah lagi dengan PBS sampai 15 ml dan dilakukan sentrifus lagi. Kegiatan ini diulang sampai tiga kali atau sampai supernatan jernih, hal ini dilakukan agar tidak ada eritrosit yang lisis.

Pembuatan suspensi *Red Blood Cell* (RBC) ayam 0.5 % adalah dengan cara mengubah konsentrasi *Red Blood Cell* (RBC) ayam 100% menjadi 0.5 % dengan rumus :

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ 100\% \times V_1 &= 0.5\% \times 10 \text{ ml} \\ V_1 &= \frac{0.5\% \times 10}{100\%} \\ V_1 &= 0.05 \text{ ml} = 50\mu\text{l} \end{aligned}$$

Keterangan: N1 : Konsentrasi eritrosit awal

V1 : Volume awal

N2 : Konsentrasi eritrosit akhir ( yang diharapkan )

V2 : Volume akhir ( yang diharapkan )

Jadi, untuk membuat suspensi *Red Blood Cell* (RBC) ayam 0.5% dari *Red Blood Cell* (RBC) ayam 100% adalah mencampurkan *Red Blood Cell* (RBC) ayam sebanyak 0.05ml ditambah PBS sampai volume total 10 ml.

#### **d. Uji Hemaglutinasi Mikroteknik**

Uji hemaglutinasi (uji HA) digunakan untuk mendeteksi virus yang memiliki hemaglutinin. Adanya hemaglutinin akan dapat mengaglutinasi eritrosit dari beberapa spesies seperti unggas, mamalia maupun manusia. Selain dapat

mendeteksi adanya virus yang memiliki hemaglutinin, uji HA juga bisa digunakan untuk mengukur titer antigen.

Uji HA mikroteknik pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui titer isolat dan juga digunakan untuk retitrasi. Pada uji ini menggunakan *microplate* "V". TAB yang telah mati dan dimatikan diperiksa dengan uji hemaglutinasi (HA) mikroteknik. Prosedur uji hemaglutinasi adalah sebagai berikut isi lubang *microplate* no. 2-12 baris A sampai baris H dengan PBS sebanyak 50  $\mu$ l. Lubang *microplate* pada baris H digunakan sebagai control eritrosit (tanpa antigen). Antigen dari cairan *allantois* TAB dimasukkan sebanyak 100  $\mu$ l kedalam lubang no 1 baris A sampai baris G, kemudian dibuat pengenceran secara serial dengan cara mengambil 50  $\mu$ l dari lubang no 1 pada baris A sampai baris G dan dilakukan pengenceran, dengan cara cairan *allantois* TAB yang telah diambil dari lubang no 1 pada baris A sebanyak 50  $\mu$ l dicampur dengan PBS pada lubang kedua, setelah dilakukan pencampuran hingga rata diambil 50  $\mu$ l dan dipindahkan pada lubang berikutnya, demikian seterusnya hingga lubang no 12 dan pada lubang *microplate* no 12 tersebut diambil 50  $\mu$ l untuk dibuang. Perlakuan tersebut juga dilakukan pada baris B hingga baris G. Langkah selanjutnya adalah mengisi semua lubang dengan *Red Blood Cell* (RBC) ayam 0.5% sebanyak 50  $\mu$ l, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Langkah terakhir dilakukan penentuan titer HA dari sampel yang diperiksa ( Pusat Veterinaria Farma, 2006).

#### **e. Uji Hambatan Aglutinasi (Heamaglutinasi Inhibition Test/HI) Antisera**

Reaksi hambatan hemaglutinasi ini dapat digunakan untuk membantu diagnosis laboratorium dalam melakukan identifikasi virus. Selain itu juga dapat

menentukan status kekebalan setelah vaksinasi atau sembuh dari penyakit dengan mengetahui titer antibodi atau antiserum.

Sebelum dilakukan Uji Hambatan Aglutinasi (HI) dilakukan retitrasi anti serum. Retitrasi adalah suatu metode untuk menguji ketepatan pengenceran antigen (antiserum) yang akan digunakan dalam uji hambatan hemaglutinasi. Cara pengujian yang dilakukan sama dengan metode hemaglutinasi.

Setelah mengetahui hasil titer hemaglutinasi antiserum, kemudian diencerkan sampai mencapai empat HA unit, dengan rumus  $N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$ .

Prosedur untuk retitrasi antigen empat HA unit adalah pengisian 50  $\mu$ l PBS ke dalam lubang *microplate* nomor satu sampai nomor lima, kemudian antigen yang telah diencerkan menjadi empat HA unit dimasukkan pada lubang nomor satu sebanyak 50  $\mu$ l. Selanjutnya dilakukan pengenceran serial dengan mengambil 50  $\mu$ l dari lubang nomor satu dipindah ke nomor dua, dicampur sampai rata kemudian diambil dan dimasukkan pada lubang nomor tiga. Kegiatan ini dilakukan terus sampai lubang nomor empat, sisa 50  $\mu$ l dibuang. Pada lubang nomor lima digunakan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya semua lubang ditambah dengan RBC ayam 0,5% sebanyak 50  $\mu$ l. Setelah itu inkubasi dalam suhu kamar selama 30 menit sampai 60 menit. Bila pengenceran antigen empat HA tepat, maka pada lubang nomor satu dan dua akan terjadi aglutinasi (OIE, 2005). Untuk uji HI selanjutnya, antiserum yang diperlukan adalah antiserum yang memiliki titer  $2^3$  HAU/0,05 ml berdasarkan Pusat Veterinaria Farma (2006). Setelah mengetahui hasil titer HI antiserum, kemudian diencerkan sampai mencapai  $2^3$  HAU, dengan rumus  $N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$ .



Langkah-langkah dalam uji HI antisera seperti HI mikroteknik biasanya yaitu sebagai berikut : Menyediakan *microplate* "V" *bottom* kemudian lubang *microplate* diisi PBS 25 µl dari lubang no 1 sampai 12 pada baris B sampai baris H. Masukkan sampel sebanyak 50 µl pada lubang no 1 sampai 12 pada baris A, kemudian dibuat pengenceran serial dengan cara mengambil 25 µl sampel dari lubang no 1 sampai 12 pada baris A kemudian dipindahkan ke lubang no 1 sampai 12 pada baris B dan dicampur hingga rata, dari lubang n0 1 sampai 12 pada baris B diambil 25 µl dan dipindahkan ke lubang no 1 sampai 12 pada baris C demikian seterusnya. Semua lubang ditambahkan dengan antiserum H5N1 asal Bogor 2<sup>3</sup> HAU/25 µl sebanyak 25 µl, kecuali lubang no 1 sampai 12 pada baris H, kemudian *microplate* diletakkan di *mechanical vibrator* hingga antiserum dan sampel tercampur rata, kemudian diinkubasikan pada suhu 22 °C -25°C selama 30 menit. Setelah diinkubasi semua lubang ditambahkan *Red Blood Cell* (RBC) ayam 0,5 % sebanyak 50 µl, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 30 menit. Langkah terakhir diadakan penentuan titer HI dari sampel yang diperiksa. Hasil uji HI positif ditandai dengan adanya pengendapan eritrosit berbentuk titik di tengah sumuran (Pusat Veterinaria Farma, 2006).

### **Tahap 3**

#### **a. Uji *one step RT-PCR***

*Polymerase chain reaction (PCR)* adalah suatu metode atau tehnik laboratorium untuk mengamplifikasi secara eksponensial suatu sekuens *DNA* dengan memiliki panjang tertentu (biasanya pendek, antara 100-600 basa) yang

terdapat didalam molekul DNA untai ganda yang lebih panjang. Metode ini menggunakan enzim (*DNA polymerase*) yang tahan terhadap panas dan merupakan metode *termal cycling* yaitu metode yang terdiri dari siklus reaksi pemanasan dan pendinginan yang berulang untuk pelelehan DNA (*DNA melting*) dan replikasi DNA secara enzimatik (Bartlett dan Stirling, 2003; Hunt, 2006). Untuk organisme yang memiliki genom berupa RNA, termasuk didalamnya adalah virus influenza maka metode amplifikasi yang digunakan adalah metode *reverse transcription PCR (RT-PCR)*, dimana untai RNA dilakukan *reverse transcribed* dulu menjadi *complement DNA (cDNA)* yang selanjutnya cDNA ini akan diamplifikasi (Hunt, 2006).

Metode *RT-PCR* memiliki dua pendekatan, yakni *one step* dan *two step RT-PCR*, dimana keduanya memiliki keuntungan dan kerugian. Keuntungan dari *one step RT-PCR* adalah lebih cepat, lebih murah dan handling dengan sampel lebih minimal sehingga mengurangi eror karena pemipetan, kontaminasi dan eror karena sebab lain. Pada *one step RT-PCR*, primer yang spesifik gen tertentu digunakan dan kedua proses (*reverse transcription* dan PCR) berada pada satu tabung yang sama, sehingga kerugiannya adalah gen lain (yang mungkin juga menarik perhatian peneliti) tidak diamplifikasi. Keuntungan utama dari metode *two step RT-PCR* adalah berbagai primer yang digunakan diletakkan dalam tabung yang terpisah. Hal ini menyebabkan semua urutan nukleotida pada RNA dapat dirubah menjadi cDNA sehingga dapat memungkinkan pengarsipan sampel dan analisis gen lain di masa datang (Wacker dan Godard, 2005).

Penelitian ini menggunakan tehnik *one step RT-PCR* untuk mengisolasi virus Influenza A yang dimulai dengan ekstraksi RNA. Ekstraksi RNA dari cairan

alantois mengikuti prosedur dari Qiagen *RNAeasy TM RNA Isolation Kit*. Reaksi PCR dalam mendeteksi virus Influenza A yaitu untuk proses Reverse Transcripts pada suhu 58°C selama inisiasi pada suhu denaturasi 94°C selama satu menit, annealing 50°C selama satu menit dan ekstensi selama tiga menit. Siklus PCR dilakuka antara 25 sampai dengan 40 siklus kemudian hasil produk PCR dianalisis di dalam Elektroforesis dan difoto untuk analisis hasil.

Prosedur *PCR One Step (Invitrogen)* adalah sebagai berikut: Sebanyak 140 µl cairan allantois digunakan untuk bahan ekstraksi *RNA*. *AVL buffer* (560 µl) dengan *RNA carrier* (5,6 µl) dicampur ke dalam tabung *ependorf*. 560 µl campuran tadi dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* yang baru. 140 µl sampel ditambahkan dalam tabung *ependorf*, dilakukan *pipetting* 15 detik, lalu dinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Etanol 98 % 560 µl, ditambahkan pada campuran dan diratakan dengan *vortex*, lalu dilakukan *spindown*. 630 µl cairan dipindahkan ke dalam kolom tabung koleksi, disentrifus 8000 rpm selama satu menit, filtrat dibuang. Sisa cairan yang ada dalam tabung *ependorf* dimasukkan dalam kolom tabung koleksi yang sama lalu di sentrifus 8000 rpm, satu menit kemudian penampang tabung koleksi diganti. 500 µl AW1 ditambahkan dalam campuran kemudian disentrifus 8000 rpm selama satu menit, kemudian filtrat dibuang dan penampang diganti. 500 µl AW2 ditambahkan dalam campuran, disentrifus 14000 rpm selama 3 menit, filtrat dibuang dan proses sentrifus di ulangi sekali lagi tanpa menambahkan AW2. Penampang tabung koleksi diganti dengan tabung *ependorf* 1,5 ml steril. 50-60 µl AVE dimasukkan tepat pada tengah kolom tabung koleksi. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu ruang,

selama 1 menit lalu disentrifus 8000 rpm selama satu menit, kemudian kolom tabung koleksi dibuang. *RNA* pada tabung *ependorf* siap digunakan.

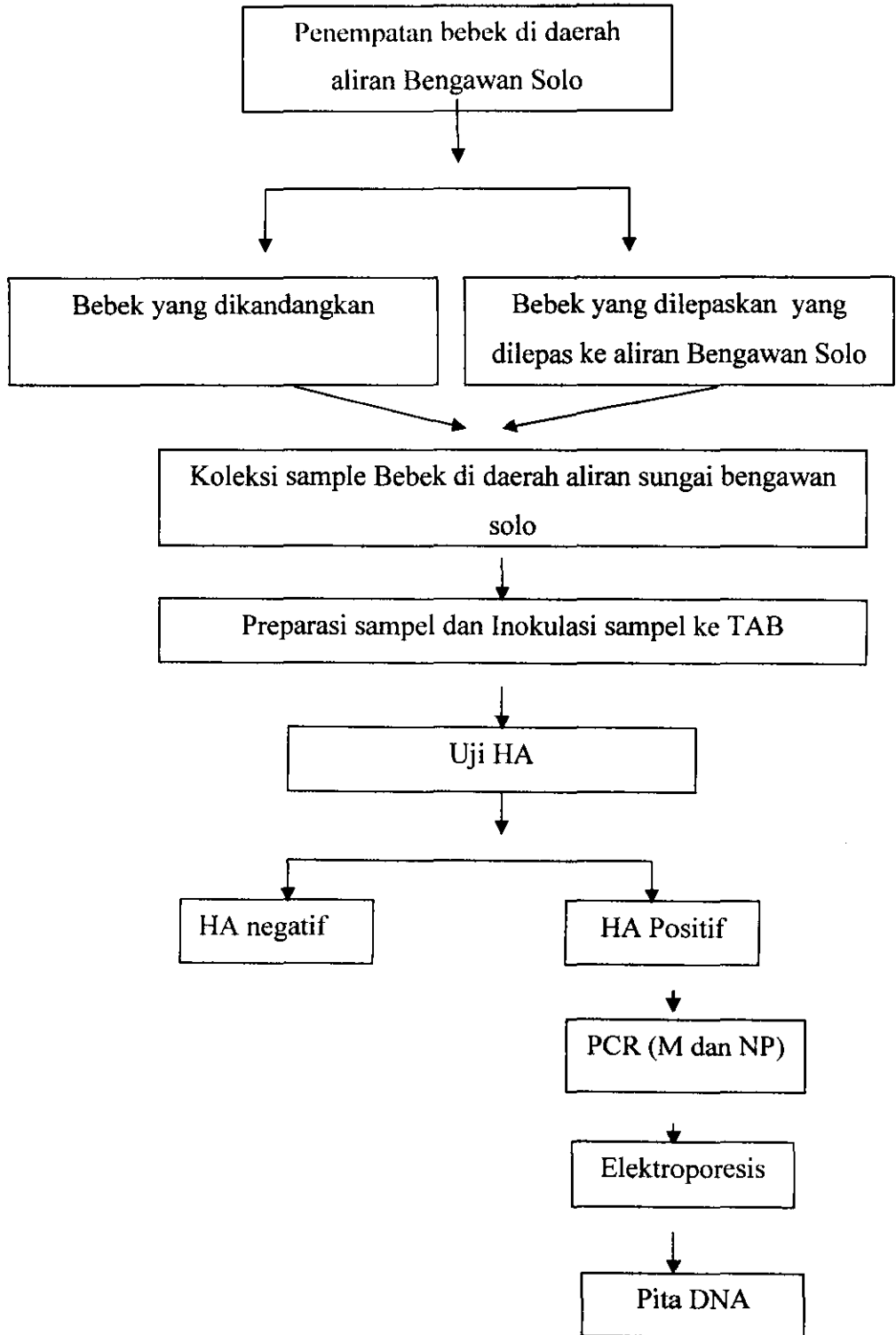
Selanjutnya Master mix untuk *RT PCR* disiapkan dalam *tube* 1,5 ml dengan komposisi : 125  $\mu$ l reaction mix, 2,5  $\mu$ l  $MgSO_4$ , *primer forward* dan *reverse* masing-masing sebanyak 1  $\mu$ l serta enzim 0,5  $\mu$ l. *DDW* ditambahkan sampai mendapat volume *master mix* 2,5  $\mu$ l. *RNA* yang telah jadi diambil sebanyak 5  $\mu$ l. campuran lalu dimasukkan dalam mesin *PCR*, suhu di set yaitu : Inisiasi 58<sup>0</sup>C selama 5 menit, denaturasi 94<sup>0</sup>C selama 30 detik, *annealing* 52<sup>0</sup>C selama 30 detik, *extension* 68<sup>0</sup>C selama 150 detik dan *final extension* 68<sup>0</sup>C selama 2 menit dengan jumlah siklus adalah 35 kali.

*Primer* yang digunakan adalah spesifik untuk gen Matrix dan Nukleoprotein virus Influenza A sebagaimana digunakan pada penelitian terdahulu. Primer Matriks yaitu sense (M-F): 5'-GAAGGTAGATATTGAAGATG-3' dan antisense (M-R) : 5'-GAAACAAGGTAGTTATTTATTA CTC-3'. Pita DNA yang diperoleh sebanyak 640 pasang basa (base pair/bp). Sementara itu primer Nukleoprotein yang digunakan yaitu sense (NP-F) : 5'-TTGACCACCTCTTGCGGTCTT ACG -3' dan antisense (NP-R): 5'-AGGTGCAAGAGTAAACTTTCG-3' dan pita DNA yang diperoleh sepanjang 110 pasang basa (base pair/bp) (Nidom, 2005)

**b. Prosedur Elektroforesis**

Gel *agarose* 2 % (yang telah ada *well* dan mengandung *ethidium bromide*) disiapkan. Gel lalu dimasukkan ke dalam mesin elektroforesis yang telah didisi oleh *TBE* 1x. Kertas parafilm disiapkan untuk mencampur *loading dye* dengan sampel (1  $\mu$ l *loading dye* ditambah 3  $\mu$ l sampel). Campuran diambil dengan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam *well* pada gel *agarose*, dengan urutan dari *well* 1 sampai *well* terakhir adalah : *marker*, kontrol negatif, sampel, kontrol positif. Mesin elektroforesis dinyalakan, waktunya diset selama 30 menit, 100 volt. Setelah selesai, mesin elektroforesis dimatikan kemudian gel *agarose* diambil dan difoto dengan menggunakan *UV box*.

#### 4.7 Kerangka Operasional



#### **4.8 Pengolahan Data**

Data yang diperoleh pada masing-masing hasil uji IIA dan hasil PCR disajikan secara deskriptif dengan berbentuk tabel dan gambar.

**BAB 5**  
**HASIL PENELITIAN**



## BAB 5 HASIL PENELITIAN

### 5.1 Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI Test)

Hasil uji Hambatan hemaglutinasi / *Heamaglutinstion Test (HI Test)* menunjukkan bahwa dari 150 ekor bebek yang dijadikan sentinel menunjukkan titer HI dibawah  $2^2$ , sehingga titer antibodi terhadap virus H5N1 negatif. Oleh karena itu bebek tersebut dapat dijadikan sebagai hewan coba sebagai hewan sentinel untuk menjaring virus Influenza A di Daerah Aliran Sungai Bengawan Solo. Hasil uji HI dapat dilihat pada Tabel 5.1 dibawah ini:

Tabel 5.1 Hasil uji Hambatan hemaglutinasi pada bebek yang dijadikan santinel

Jumlah Jenis Bebek Santinel	Titer Antibodi terhadap Virus Influenza H5
150 ekor Bebek Strain Mojosari (No.1 – 150)	Negatif

### 5.2 Uji Hemaglutinasi / *Hemaglutination Test (HA Test)*

Sampel swab trachea dan kloaka yang terkumpul sebanyak 275 sampel, diambil lima kali dengan interval pengambilan dua minggu per pengambilan di setiap Kabupaten. Setelah dilakukan preparasi terhadap sampel, kemudian sampel-sampel tersebut diinokulasikan pada Telur Ayam Bertunas (TAB). Setelah dilakukan Uji hemaglutinasi (HA) dilakukan terhadap cairan allaintois pada masing-masing sampel. Hasil uji HA dibagi menjadi dua bagian yaitu berdasarkan waktu pengambilan dan lokasi pengambilan (per Kabupaten) yang sebenarnya merupakan satu kesatuan. Hasil HA terhadap sampel swab trachea dan kloaka

pada bebek sentinel sebagai penangkap virus Influenza A di Derah Aliran Sungai (DAS) Bengawan Solo dapat dilihat pada Tabel 5.2 dan 5.3 di bawah:

Tabel 5.2. Hasil Uji HA Berdasarkan Jarak Waktu Pengambilan Sampel

Pengambilan ke-	Jumlah Sampel	Positif Uji HA
1	50	2
2	50	3
3	50	3
4	50	4
5	50	1
Total	250	13

Tabel 5.2 menunjukkan hasil uji HA pada pengambilan pertama sebanyak 2 sampel positif uji HA, pengambilan kedua sebanyak 3 sampel positif uji HA, pengambilan ketiga sebanyak 3 sampel positif uji HA, pengambilan keempat sebanyak 4 sampel positif uji HA dan pengambilan kelima sebanyak 1 sampel positif uji HA

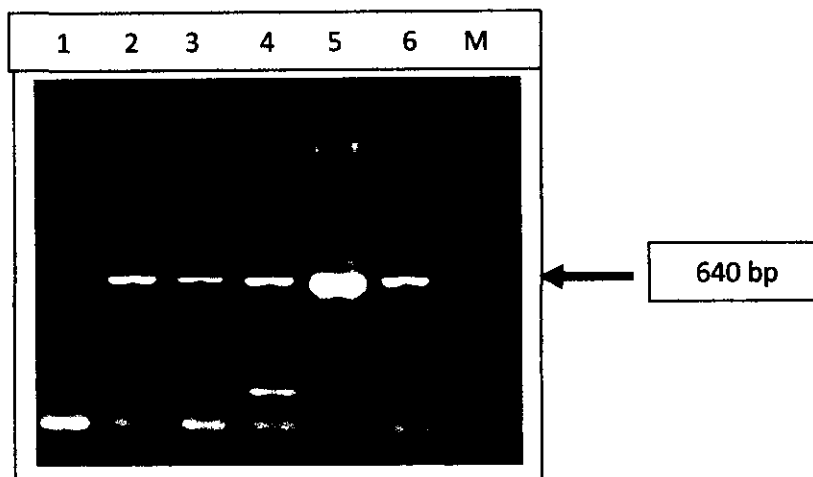
Sementara itu Tabel 5.3 menunjukkan bahwa hasil uji HA pada Kabupaten Ngawi yaitu sebanyak 2 sampel positif uji HA , Kabupaten Bojonegoro yaitu sebanyak 2 sampel positif uji HA, Kabupaten Tuban yaitu sebanyak 2 sampel positif uji HA, Kabupaten Lamongan dan Gresik masing yaitu sebanyak 3 sampel positif uji HA.

Tabel 5.3. Hasil Uji HA Berdasarkan Lokasi Pengambilan Sampel (Kabupaten)

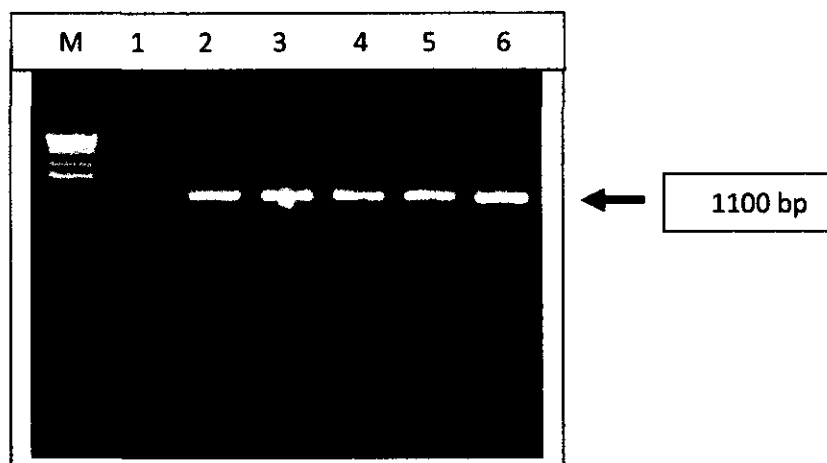
Kabupaten	Jumlah Sampel	Positif Uji HA
1. Ngawi	50	2
2. Bojonegoro	50	3
3. Tuban	50	2
4. Lamongan	50	3
5. Gresik	50	3
Total	250	13

### 5.3 Uji *One Step PCR*

Sampel-sampel yang diduga positif mengandung virus Influenza A melalui Uji Antisera HI, selanjutnya dilakukan uji PCR untuk gen Matriks (M) dan Nukleoprotein (NP). Hasil elektroforesis dari masing-masing sampel sebagaimana pada Gambar 5.1 dan 5.2 dibawah ini:



Gambar 5.1. Elektroforesis gen Matriks (M = Marker; 1 = kontrol negatif; 2 = kontrol positif; 3-6 = sampel penelitian)



Gambar 5.2. Elektroforesis gen Nukleoprotein (M = Marker; 1 = kontrol negatif; 2 = kontrol positif; 3-6 = sampel penelitian)

Sebagai data pembanding khususnya di Kabupaten Lamongan sebagai daerah endemik Influeanza A (H5N1) ditempatkan bebek yang dikandangkan sebagai penanda untuk membedakan bahwa virus yang tertangkap bebek – bebek yang dijadikan sebagai penjaring virus murni berasal dari DAS Bengawan Solo. Hasil uji HA pada bebek yang dikandangkan dapat dilihat pada Tabel 5.4 dibawah ini:

Tabel 5.4. Hasil Uji HA Berdasarkan Jarak Waktu Pengambilan Sampel (Bebek yang dikandangkan)

Pengambilan ke-	Jumlah Sampel	Positif Uji HA
1	5	0
2	5	0
3	5	0
4	5	0
5	5	0

Hasil uji HA yang positif kemudian dilanjutkan dengan uji anti sera sebelum dilanjutkan dengan one step PCR untuk protein Matrix (M) dan Nukleoprotein (NP) pada setiap pengambilan dan Kabupaten. Hasil rekapitulasi Uji Antisera dapat dilihat pada Tabel 5.5 dibawah ini:

Tabel 5.5. Jumlah sampel dari hasil Uji HA dan Antisera

Kabupaten	Jumlah Sampel	Positif Uji HA	Uji Antisera positif
1. Ngawi	50	2	0
2. Bojonegoro	50	3	1
3. Tuban	50	2	0
4. Lamongan	50	3	2
5. Gersik	50	3	1
Total	250	13	4

Setelah dilakukan pengujian PCR untuk mengetahui adanya virus influenza menunjukkan bahwa sampel yang menggunakan uji antisera positif memberikan hasil positif terhadap uji PCR, artinya sampel tersebut mengandung virus Influenza A. Hasil keseluruhan pengujian sampel isolate dari bebek di Daerah Aliran Sungai Bengawan Solo sebagaimana Tabel 5.7 di bawah ini .

Tabel 5.7. Jumlah sampel dari hasil Uji HA, Antisera, PCR

Kabupaten	Jumlah Sampel	Positif Uji HA	Uji Antisera positif	Uji PCR	
				Primer M	Primer N
1. Ngawi	50	2	0	0	0
2. Bojonegoro	50	3	1	1	1
3. Tuban	50	2	0	0	0
4. Lamongan	50	3	2	2	2
5. Gresik	50	3	1	1	1
Total	250	13	4	4	4

**BAB 6**  
**PEMBAHASAN**

## BAB 6 PEMBAHASAN

### 6.1 Virus Influenza A pada Bebek

Virus Influenza A termasuk famili *Orthomyxoviridae* ((Scholtissek *et al*, 1983; Horimoto dan Kawaoka, 2001). Genom virus Influenza tipe A berupa rantai asam ribonukleat (ribo nucleic acid / RNA) untai tunggal, *sense* negatif, sepanjang kurang lebih 13.588 nukleotida yang tersusun dalam 8 segmen yang dibungkus oleh protein nukleokapsid yaitu *Polimerase Basic 1* (PB1), *Polimerase Basic 2* (PB2), *Polimerase Acidic* (PA), Hemagglutinin (HA atau H), Nukleokapsid (NP), *Neuraminidase* (NA atau N), *Matrix* (M) dan *Non Structural* (NS). Kedelapan segmen ini bersama-sama membentuk ribonukleoprotein (RNP), dan setiap segmen akan menyandi protein yang memiliki fungsi penting. Total protein yang disandi kedelapan segmen ini adalah 10 macam protein yaitu : protein PB1, protein PB2, protein PA, protein HA, protein NP, protein NA, protein M1 dan M2 dan protein NS1 dan NS2. Nama gen, jumlah nukleotida dan fungsi protein secara singkat, dapat dilihat pada tabel 2.1. (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001). Virus Influenza terdiri dari tiga tipe yaitu tipe A, B dan tipe C. Ketiga tipe ini dapat dibedakan berdasarkan perbedaan antigenik yang terdapat pada nukleoprotein (NP) dan matriks (M). Secara teori, Influenza dapat ditularkan melalui tiga cara, yakni lewat aerosol, droplet dengan ukuran besar serta kontak langsung dengan sekresi atau muntahan (Tellier *et al*, 2006). Penularan Influenza secara water-borne pada bebek telah ditemukan di danau di beberapa Negara seperti di Seberia, Kanada, dan Alaska. Virus Influenza A bereplikasi di sel epitel

kolon pada bebek dengan tidak menunjukkan gejala klinis tetapi mengeluarkan virus melalui feses (Kida, 1980; Soda, 2009).

Daerah aliran sungai (DAS) B Sungai Bengawan Solo, yang terletak di Propinsi Jawa Tengah dan Jawa Timur dengan luas total wilayah sungai  $\pm 19.778$  km<sup>2</sup>, merupakan sungai terbesar di Pulau Jawa. , terletak di Propinsi Jawa Tengah dan Jawa Timur dengan luas wilayah sungai  $\pm 12\%$  dari seluruh wilayah Pulau Jawa. Daerah aliran sungai Bengawan Solo merupakan aliran sungai yang banyak digunakan sebagai daerah pemeliharaan bebek dan memiliki potensi sebagai agen penularan virus influenza A secara water-borne pada unggas maupun pada mamalia. Virus Influenza A dapat bertahan pada air sekitar 30 hari pada suhu 0 °C dan dapat bertahan diatas 4 hari pada suhu 22 °C (Khalenkov *et al.*, 2008). Pada penelitian ini, pemilihan lokasi penempatan bebek berdasarkan informasi wabah (*outbreak*). Mengingat bahwa daerah aliran sungai Bengawan Solo mengalir 2 Propinsi di Jawa, yaitu Jawa Timur (13 Kabupaten) dan Jawa Tengah (17 Kabupaten) yang merupakan Propinsi terbesar terjadinya kasus flu burung. Kabupaten di Jawa Timur yang dilalui DAS Bengawan solo adalah: Madiun, Ngawi, Bojonegoro, Tuban, Lamongan dan Gresik. Kasus Influenza A (H5N1) ditemukan di Lamongan pada sembilan kecamatan yakni Maduran, Sekaran, Solokuro, Karanggeneng, Sukodadi, Turi, Sugio, Kalitengah, dan Pucuk. Rata-rata yang terinfeksi flu burung jenis ayam kampung. Kasus ini ditemukan kembali sejak 17 Desember 2008 lalu pada ayam milik Siti warga Desa Siwuran, Kecamatan Maduran (Kompas, 2009) . Kasus tersebut juga ditemukan juga ditemukan di kabupaten Bojonegoro tepatnya di Kecamatan Ngraho, Baurano, dan kecamatan Kota yang mengakibatkan 94 ekor ayam dimusnahkan ( Gatra, 2000).



Pada penelitian ini digunakan bebek sebagai penjaring virus Influenza karena bebek resisten terhadap infeksi virus Influenza dan apabila terserang bersifat asimtomatis. Resistensi terjadi karena bebek mempunyai gen RIG-1, gen RIG-1 merupakan sensor terhadap RNA virus saat di sitoplasma yang dapat menginduksi pelepasan Interferon yang dapat mencegah replikasi virus influenza pada saat menginfeksi bebek (Barber *et al.*, 2009). Selain itu bebek dijadikan santinel karena pada epitel saluran pernafasan dan pencernaannya mengekspresikan reseptor SA $\alpha$ 2,3-Gal dan reseptor SA $\alpha$ 2,6-Gal sehingga dapat menangkap virus Influenza A baik yang berreseptor SA $\alpha$ 2,3-Gal maupun berreseptor SA $\alpha$ 2,6-Gal (Kuchipudi *et al.*, 2009). Bebek juga telah dinyatakan dapat menyebabkan terjadinya penyebaran virus Influenza yang berasal dari unggas kepada manusia (Gambaryan *et al.*, 2008). Peran bebek dalam penularan virus Influenza A adalah dengan terinfeksi bangsa bebek dengan virus Influenza A dari berbagai seperti H5N1, H1N1, H3N2 dan lain-lain, virus tersebut akan mengalami adaptasi pada usus yang meningkatkan jumlah virus tersebut pada saat dikeluarkan melalui feses yang akan menyebabkan penularan rute fekal-oral yang dipercaya merupakan rute penularan yang efisien. Apabila feses hasil *shedding* tersebut mengkontaminasi air dan lingkungan lain serta hewan lain akan meningkatkan distribusi penularan virus ini (Delogu *et al.*, 2010).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah Uji hemaglutinasi (uji HA) digunakan untuk mendeteksi virus yang memiliki hemaglutinin. Adanya hemaglutinin akan dapat mengaglutinasi eritrosit dari beberapa spesies seperti unggas, mamalia maupun manusia. Selain dapat mendeteksi adanya virus yang memiliki hemaglutinin, uji HA juga bisa digunakan untuk mengukur titer antigen.

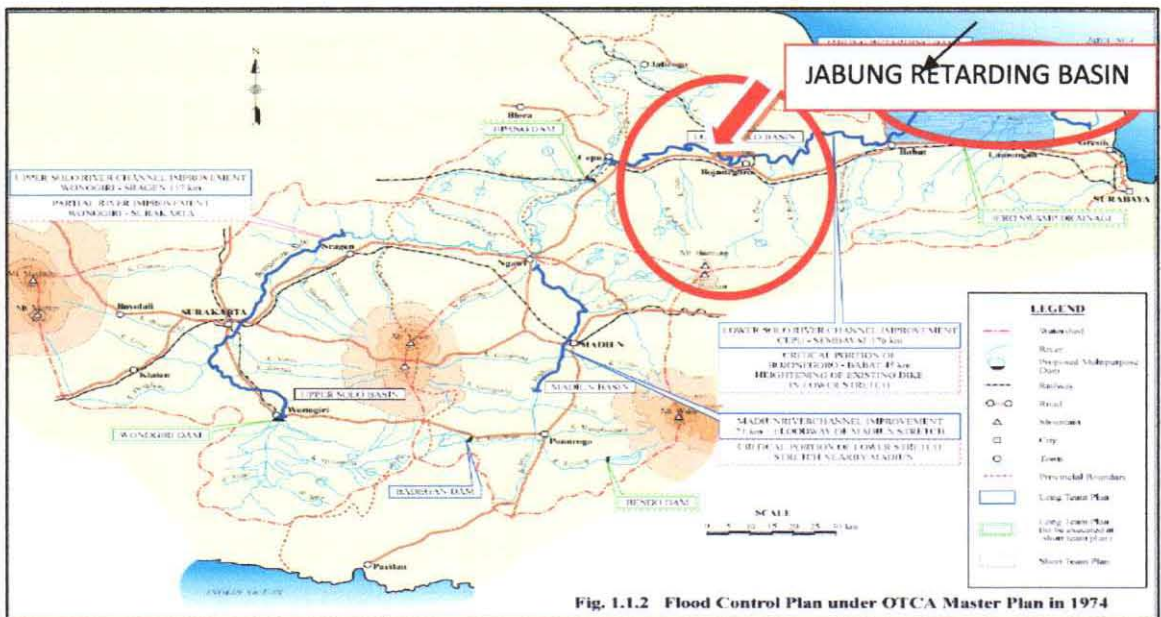
(Ernawati dkk., 2007). Virus Influenza merupakan virus yang memiliki hemagglutinin sehingga uji HA dapat digunakan untuk mendeteksi virus Influenza sebagai dugaan awal dan selanjutnya dilanjutkan dengan RT PCR untuk menyakinkan (konfirmasi) diagnosa adanya virus Influenza A.

Dari hasil penelitian tentang deteksi adanya virus Influenza A pada Daerah Aliran Sungai (DAS) Bengawan Solo pada sampel swab trachea dan kloaka bebek didapatkan hasil uji HA terjadi pada pengambilan ke-2, pengambilan ke-3, pengambilan ke-4 dan sementara itu dibanding hasil dari pengambilan sebelumnya, pada pengambilan ke-5 merupakan jumlah yang terendah. Hasil-hasil ini, diduga karena bebek-bebek yang dijadikan sampel sudah beradaptasi dan terbiasa terhadap cara pengembalaan sehingga makin seringnya kontak dengan aliran bengawan solo sehingga memungkinkan menangkap virus Influenza A. Virus Influenza A, khususnya subtipe H5 dan H7, dinyatakan bahwa virus ini dapat bertahan dalam air dengan berbagai temperature dan salinitas sehingga dapat berada dalam air dengan waktu cukup lama (Brown *et al.*, 2007). Debit air dalam aliran DAS Bengawan solo mungkin berpengaruh terhadap gambaran hasil ini. Menurut Delogu *et al* (2010) menyatakan bahwa virus Influenza A mengalami pengenceran yang progresif pada air yang mengalir dan secara gradual akan menurun selama berinteraksi dengan inang. Mengingat bahwa virus Influenza A (H5N1) dapat bersirkulasi sekitar 14 hari pada lingkungan yang terkontaminasi virus tersebut (Pasitek *et al* 2006; Siene 2006). Virus Influenza A diperkirakan akan mengalami peningkatan saat inang sudah beradaptasi dan sering kontak dengan aliran air Sungai Bengawan Solo. Hal tersebut terjadi pada pengambilan ke-2 karena pada pengambilan ke-2 bebek

tersebut sudah tinggal sekitar 28 hari yang otomatis sudah beradaptasi dengan sistem pengembalaan.

Hasil penelitian berdasarkan lokasi pengambilan (per kabupaten), uji HA tertinggi ditunjukkan pada Kabupaten Bojonegoro dan Gresik, diikuti oleh Kabupaten Lamongan Kabupaten Ngawi dan terendah pada Kabupaten Tuban dari sampel yang dikumpulkan. Hasil uji HA yang tinggi yang terdapat pada beberapa kabupaten tersebut diantaranya oleh karena penambahan aliran sungai-sungai. Sebagaimana di Kabupaten bojonegoro, diduga karena banyak terdapat aliran sungai kecil yang memungkinkan terjadinya masuknya limbah dari berbagai sumber (Balai Besar Wilayah Bengawan Solo, 2008). Gatra (2009), telah memberitakan bahwa wilayah yang menjadi pantauan tim PDSR, terutama difokuskan di sepanjang Daerah Aliran Sungai (DAS) Bengawan Solo, Sebab di daerah sepanjang DAS Bengawan Solo di Bojonegoro berpeluang muncul penyakit flu burung (subtipe dari virus Influenza A), karena sungai terpajang di Jawa itu, berpeluang menjadi tempat pembuangan bangkai ternak ayam. Data dari Dinas Peternakan dan Perikanan Kab. Bojonegoro, Populasi ayam di Bojonegoro jumlahnya mencapai tiga juta ekor, yang 800 ribu ayam ras di antaranya terbanyak di Kecamatan Kepuh (Gatra, 2009). Hal tersebut diyakini dapat meningkatkan tersebarnya virus Influenza A pada Aliran Sungai (DAS) Bengawan Solo. Sedangkan tingginya hasil uji HA pada Kab. Gresik disebabkan karena pada Kab. Gresik terdapat lembah sungai yang merupakan muara sungai Bengawan Solo. Pada Kabupaten Gresik terdapat *Jabung Retarding Basin* yang merupakan lembah sungai yang merupakan muara sungai dari Aliran Sungai (DAS) Bengawan Solo dan juga banyak terdapat sungai yang kecil-kecil (Balai Besar Wilayah Bengawan

Solo, 2008). Hasil penelitian terbesar juga terjadi pada karena Kab.Lamongan dinyatakan sebagai daerah dengan kondisi luar biasa (KLB) flu burung. Saat itu dinyatakan virus H5N1 penyebab flu burung ditemukan di sejumlah kecamatan dan beberapa orang terindikasi kuat suspect flu burung. Kepala Bidang Kesehatan Hewan Dinas Kesehatan Lamongan, menduga temuan flu burung tersebut diduga berasal dari Bengawan Solo yang mengalirkan bangkai ayam yang terjangkit virus flu burung. Bangkai ayam yang menepi kemudian menyebarkan virus avian influenza terhadap ayam-ayam di Lamongan. Indikasi tersebut diperkuat dengan wilayah yang ada kasus flu burung kebanyakan berada di sekitar aliran Bengawan Solo termasuk Gresik (Kompas, 2009). Hasil terendah yang terdapat pada Kab. Tuban merupakan suatu rangkain aliran sungai Bengawan solo yang terkontaminasi oleh virus Influenza A dari hulu ke hilir. Untuk lebih jelasnya mengenai Peta DAS Bengawan Solo dapat dilihat pada Gambar 6.1 dibawah ini:



Gambar 6.1 Kabupaten Tertinggi Adanya Influenza A dengan Uji HA

## 6.2. Uji RT PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*)

Pengujian melalui RT - PCR merupakan metode yang terbaik untuk mengidentifikasi Virus Influenza A pada saat kadar virus Influenza sangat rendah yang terkandung dalam sampel (WHO, 2002). Hal tersebut sangat cocok untuk mengidentifikasi virus Influenza A yang tersebar pada DAS Bengawan Solo. Mengingat DAS Bengawan Solo Sungai Bengawan Solo, yang terletak di Propinsi Jawa Tengah dan Jawa Timur dengan luas total wilayah sungai  $\pm 19.778 \text{ km}^2$ , merupakan sungai terbesar di Pulau Jawa. , terletak di Propinsi Jawa Tengah dan Jawa Timur dengan luas wilayah sungai  $\pm 12\%$  dari seluruh wilayah Pulau Jawa pada posisi  $110^{\circ}18'$  BT sampai  $112^{\circ}45'$  BT dan  $6^{\circ}49'$  LS sampai  $8^{\circ}08'$  LS. Luas total wilayah sungai (WS) Bengawan Solo  $\pm 19.778 \text{ km}^2$  (Balai Besar Wilayah Bengawan Solo, 2008). Hal tersebut dimungkinkan kandungan virus di DAS Bengawan Solo sangat rendah sehingga uji RT PCR sangat diperlukan untuk mengidentifikasi virus Influenza A di DAS Bengawan Solo.

Sebelum dilakukan pengujian melalui Uji RT-PCR dilakukan pengujian antisera H5 untuk melakukan pentapisan terhadap sampel yang menunjukkan hasil positif pada uji HA. Hal ini untuk memperkirakan adanya protein HA berasal dari virus Influenza A atau mikroorganisme lainnya, sehingga pengujian dengan RT-PCR bisa lebih efisien.

Dari hasil pengujian RT-PCR dengan menggunakan primer spesifik matriks (M) dan nucleoprotein, menunjukkan hasil yang selaras dengan hasil pengujian antisera. Dari total sampel sebanyak 250 ternyata berhasil diidentifikasi sebanyak 4 sampel positif dalam uji PCR baik dengan yang menggunakan primer

matriks maupun nucleoprotein. Ini menunjukkan bahwa bebek tersebut tertular pada saat berada di Airan Sungai Bengawan Solo, bukan oleh karena tertular melalui udara. Hal ini ditunjukkan tidak ditemukan adanya virus Influenza A yang dikandangkan tetapi setiap hari kontak melalui udara dengan bebek yang digembalakan pada air Bengawan Solo. Bebek yang dipelihara di Kabupaten Tuban dan Ngawi tidak menunjukkan adanya virus Influenza A, tidak seperti bebek yang ditempatkan pada kabupaten yang lain. Ini kemungkinan protein HA yang positif dari kedua kabupaten tersebut bukan berasal dari Virus Influenza A, tetapi dari mikroorganisme yang lain, seperti virus Newcastle Disease, Infectious Bronchitis dan lain sebagainya.

**BAB 7**  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

## **BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **7.1 Kesimpulan**

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan:

1. Berdasarkan pengujian dari bebek yang digunakan sebagai santinel menunjukkan bahwa Daerah Aliran Sungai Bengawan Solo dapat sebagai sumber penularan virus Influenza A.
2. Virus Influenza A yang diperoleh dari sampel bebek sebagai santinel menunjukkan perbedaan kandungan virus Influenza dari masing-masing kabupaten sepanjang Daerah Aliran Sungai Bengawan Solo.

### **7.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang karakter dan tingkat keganasan dari virus Influenza A yang berhasil diisolasi dari bebek yang dipelihara pada aliran sungai Bengawan Solo.
2. Studi lebih lanjut perlu dilakukan, terutama dikaitkan dengan musim, tingkat pencemaran oleh bahan lain seperti dikaitkan dengan tingkat BOD atau COD dan lain-lain.



**DAFTAR PUSTAKA**

## DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D. J. (2000), 'A review of avian influenza in different bird species', *Veterinary Microbiology* 74(1-2): 3-13.
- Balai Besar Wilayah Bengawan Solo, 2008. Facilitating IWRM in Planning and Implementation. Departemen Pekerjaan Umum. Dirjen Sumber Daya Air RI.
- Balai Besar Wilayah Bengawan Solo, 2008. Profil DAS Bengawan Solo. Departemen Pekerjaan Umum. Dirjen Sumber Daya Air RI.
- Barber, M.R.W., Aldridge, J.R., Webster, R.G., and Magor, K.E. 2010. Association of RIG-I with Innate Immunity of Ducks to Influenza. *PNAS*. 107(13): 5913-5918.
- Bartlett JMS, Stirling D, 2003. *A Short History of Polymerase Chain Reaction*. *Methods Mol Biol*, 226 : 3-6.
- Brown, J.D., Swayne, D.E., Cooper, R.J., Burns, R.E., Stallnecht, D.E. 2007. Persistence of H5 and H7 avian influenza Viruses in Water. *Avian Dis*. 50: 285-289.
- Bush, R.M. 2007. Influenza Evolution. Dept. of Ecology and Evolutionary Biology. University of California. Irvine, CA 92697, USA.
- CDC, 2005. *Questions and Answers About Avian Influenza (Bird Flu) and Avian Influenza A (H5N1) Virus*. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention
- Delogu, M., De Marco, M., Di Trani, L., Raffin, E., Claudia, C.C., Puzelli, S., Ostanello, F., Webster, R.G., Cassone, A., Donatelli, I. 2010. Can Preening Contribute to Influenza A Virus Infection in Wild Water Birds?. *J. Plos* 5(6): e11315.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2010. Seputar Penanggulangan Pandemi Flu Baru H1N1 oleh Departemen Kesehatan RI. (disitasi 22 Maret 2010, pukul 15.00 WIB). <http://www.depkes.go.id/h1n1/>.
- Donatelli, L., Campitelli, L., and Trani, L., 2001. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian Poultry, *J. Gen. Virol.* 82 : 623-630.
- Elbers, A. R. W., Fabri, T. H. F., de Vries, T. S., de Wit, J. J., Pijpers, A. and Koch, G. (2004), 'The highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus epidemic in The Netherlands in 2003 — Lessons learned from the first five outbreaks', *Avian Diseases* 48(3) :691-705.

- Ernawati. R., A. P. Rahardjo., N. Sianita., J. Rahmahani., F. A. Rantam dan Suwarno. 2007. *Petunjuk Praktikum Penyakit Viral*. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V. 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci (PNAS) USA*;101:1356-61.
- Gambaryan, A.S., Tuzikov, A.B., Pazynina, G.V., Desheva, J.A., Bovin, N.V., Matrosovich, M.N and Klimov, A.I. 2008. 6-sulfo sialyl Lewis X is the common receptor determinant recognized by H5, H6, H7 and H9 influenza viruses of terrestrial poultry. *J. Virol.* 5: 85
- Hoffman E, *et al.* 2005. Role Of Specific Hemagglutinin Amino Acids In The Immunogenicity And Protection Of H5N1 Influenza Virus Vaccine. *PNAS* 102(36): 12915-12920.
- Horimoto T. and Kawaoka Y., 2001. *Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses*. *Clin. Microbiol. Review.* 14(1).
- Honda, A. Mizumoto, K. Ishihama, A. 2002. Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *PNAS.* 99: 13166-13171.
- Hunt M, 2006. *Real Time PCR*. Microbiology and Immunology online University of South Carolina School of Medicine. (disitasi 22 Januari 2011 pukul 12.13 WIB). <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>.
- Kawaoka, Y. 2010. *Influenza Virus*. Presentation. University of Tokyo. Tokyo
- Khalenkov, A., Laver, W.G., Webster, R.G. 2008. Detection and Isolation of H5N1 Influenza virus from Volumes of Natural Water. *J. Virological Method.* 149: 180-183.
- Knight V. 1980. Viruses as agents of airborne contagion. *J. Ann NY Acad Sci.* 353:147-56.
- Knipe, D.M. Howley, P.M. 2007. *Fields Virology*. 5th ed. Lipincott Williams and Wilkins. USA.1647-1740.
- Kobasa, D. Wells, K. Kawaoka, Y. 2001. Amino acids responsible for the absolute sialidase activity of the influenza A virus neuraminidase : relationship to growth in the duck intestine. *J. Virol.* 75: 11773-11780.

- Kuchipudi, S.V., Nelli, R. White, G.A., Bian, M., Chang, K.C., and Dunham, S. 2009. Differences in Influenza Virus Receptors in Chicken and Duck: Implication for Interspecies Transmission. *J. Mol Genet Med* 3(1): 143-151
- Kurtz J, Manvell RJ, Banks J. 1996. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *J. Lancet*; 348:901-2.
- Murphy, B. R. and R. G. Webster. 1996. Orthomyxoviruses. *Fields Virology* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA. 1397-1445.
- Nicas M, Nazaroff WW, Hubbard A. 2005. Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens. *J. Occup Environ Hyg* ;2:143-54.
- Nidom C.A. 2005. Analisis Molekuler Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. Disertasi. Universitas Airlangga.
- Nidom, C.A. 2011. Flu Burung di Indonesia. Kompas edisi April.
- (OIE) Office International *des* Epizooties 2005. *Manual of Diagnosis Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. ([www.oie.int](http://www.oie.int)). [diakses pada 08 April 2010].
- Pusat Veterinaria Farma. 2006. Pengawasan dan Diagnosa *Avian Influenza*. Buletin Veterinaria Farma 3 (6). Surabaya.
- Rabadan, R., Robin, H. 2007. Evolution of Influenza A Virus: Some New Advances. *J. Evolutionary Bioinformatics Online*: 299-307
- Raharjo J. dan Nidom CA., 2004. Avian Influenza : Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. Gita Pustaka. Jakarta. ISBN: 979-98585-0-X.
- Revianny, V. N. 2008. Surveillance of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in Indonesia. Asian-African Research Forum On Emerging and Re-Emerging Infection, December 15-16,2008. Sapporo Japan.
- Scholtissek CH, Burger PA, Bachman and Hannoun C, 1983. *Genetic Relatedness of Hemagglutinins of The H1 Subtype of Influenza A Viruses Isolated from Swine and Birds*. *Virology* 129: 521- 523
- Soda, K. 2009. Studies on the development of vaccine and molecular basis of pathogenicity of avian influenza viruses for chicken. Thesis. Hokkaido University, Japan.

- Suarez, D. L. 2000. Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology* 74:15-27.
- Suarez, D. L. (2005), 'Overview of avian influenza DIVA test strategies', *Biologicals* 33(4): 221–226.
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taunberger., J.K., Paulso, J.C., and Wilson, I.A. 2006. Structure and Receptot specificity of Heamagglutination from an H5N1 Influenza Virus. *Science*. 312:404-410
- Tellier, R. 2006. Review of Aerosol Transmission of Influenza A Virus. Universty of Toronto, Canada .J. EID (12):11.
- Wacker MJ, Godard MP, 2005. *Analysis of One-Step and Two-Step Real-Time RT-PCR Using SuperScript III*. *Journal of Biomol Tech*. 16(3): 266–271
- Webby, R. J., S. L. Swenson, S. L. Krauss, P. J. Gerrish, S. M. Goyal and R. G. Webster. 2000. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *Journal of Virology* 74:8243-8251.
- WHO, 2008. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO August 11 2008 <http://www.who.int>
- WHO, 2002. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Atlanta,GA, USA
- Xie, Z., Pang, Y.P., Liu, J., Deng, X., Tang, X., Sun, J., Khan, M.I. 2006. A multiplex RT-PCR fot Detection of Type A Influenza Virus and Differentiation pf Avian H5, H7, H9 Heamagglutinin Subtypes. *Molecular and Cellular Probes* 20: 245-249.




# LAMPIRAN

LAMPIRAN

**Lampiran 1 : Skema Uji HA Mikroteknik**

Lubang no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Antigen	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		buang1										
RBC ayam 0,5%1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Inkubasi pada suhu ruang selama 30 – 60 menit

- Keterangan :
- PBS  1 = 50 µl
  - Antigen  1 = 50 µl
  - RBC ayam 0,5 %  1 = 50 µl

Interpretasi hasil :

- Hasil HA + : aglutinasi sempurna (100%), terlihat jelas berupa tanpa adanya pengendapan eritrosit berbentuk titik pada dasar lubang plate.



- Hasil HA - : pengendapan eritrosit pada dasar lubang 

**Lampiran 2. Komposisi Bahan – Bahan untuk One step PCR**

## 1. Komposisi untuk protein Matrix

2x <i>reaction mix</i>	12,5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	2,5 $\mu$ l
Primer F ( <i>Forward</i> )	1 $\mu$ l
Primer R ( <i>Reverse</i> )	1 $\mu$ l
Enzim	0,5 $\mu$ l
DDW	2,5 $\mu$ l
Template	5 $\mu$ l

Keterangan:

Primer F = K 581

Primer R = K582

Kontrol positif = S32 v.sel 0,2 11.02.11

## 2. Komposisi untuk Nukleoprotein

2x <i>reaction mix</i>	12,5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	2,5 $\mu$ l
Primer F ( <i>Forward</i> )	1 $\mu$ l
Primer R ( <i>Reverse</i> )	1 $\mu$ l
Enzim	0,5 $\mu$ l
DDW	2,5 $\mu$ l
Template	5 $\mu$ l

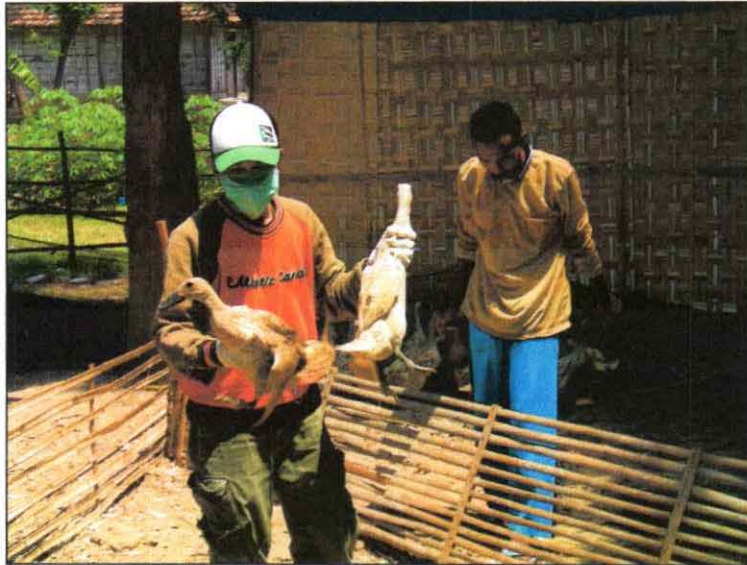
Keterangan:

Primer F = 274 *Universal* NP 1200FPrimer R = 275 *Universal* NP 1529r

Kontrol positif = S32 v.sel 0,2 11.02.11



**Lampiran 3. Foto-foto Dokumentasi Penelitian**



Pendistribusian bebek



Pengambilan Sampel



Bebek – Bebek Santinel



Inokulasi Sampel pada TAB



Alat dan Bahan HA Mikroteknik



Mesin RT PCR

**Lampiran 4. Hasil Uji HA****Kabupaten Ngawi****Pengambilan pertama**

Kode sampel	Well	1	2	3	4	5	6	7	8
B1.1N	1	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.2N	2	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.3N	3	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.4N	4	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.5N	5	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.6N	6	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.7N	7	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.8N	8	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.9N	9	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.10N	10	-	-	-	-	-	-	-	-

**Pengambilan kedua**

Kode sampel	Well	1	2	3	4	5	6	7	8
B2.1N	1	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.2N	2	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.3N	3	+	+	+	+	+	-	-	-
B2.4N	4	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.5N	5	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.6N	6	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.7N	7	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.8N	8	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.9N	9	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.10N	10	-	-	-	-	-	-	-	-

**Pengambilan ketiga**

Kode sampel	Well	1	2	3	4	5	6	7	8
B3.1N	1	-	-	-	-	-	-	-	-
B3.2N	2	-	-	-	-	-	-	-	-
B3.3N	3	-	-	-	-	-	-	-	-
B3.4N	4	-	-	-	-	-	-	-	-
B3.5N	5	-	-	-	-	-	-	-	-
B3.6N	6	-	-	-	-	-	-	-	-
B3.7N	7	+	+	+	+	+	-	-	-
B3.8N	8	-	-	-	-	-	-	-	-
B3.9N	9	-	-	-	-	-	-	-	-
B3.10N	10	-	-	-	-	-	-	-	-

**Pengambilan keempat**

Kode sampel	Well	1	2	3	4	5	6	7	8
B4.1N	1	-	-	-	-	-	-	-	-
B4.2N	2	-	-	-	-	-	-	-	-
B4.3N	3	-	-	-	-	-	-	-	-
B4.4N	4	-	-	-	-	-	-	-	-
B4.5N	5	-	-	-	-	-	-	-	-
B4.6N	6	-	-	-	-	-	-	-	-
B4.7N	7	-	-	-	-	-	-	-	-
B4.8N	8	-	-	-	-	-	-	-	-
B4.9N	9	-	-	-	-	-	-	-	-
B2410N	10	-	-	-	-	-	-	-	-

**Pengambilan kelima**

Kode sampel	Well	1	2	3	4	5	6	7	8
B5.1N	1	-	-	-	-	-	-	-	-
B5.2N	2	-	-	-	-	-	-	-	-
B5.3N	3	-	-	-	-	-	-	-	-
B5.4N	4	-	-	-	-	-	-	-	-
B5.5N	5	-	-	-	-	-	-	-	-
B5.6N	6	-	-	-	-	-	-	-	-
B5.7N	7	-	-	-	-	-	-	-	-
B5.8N	8	-	-	-	-	-	-	-	-
B5.9N	9	-	-	-	-	-	-	-	-
B5.10N	10	-	-	-	-	-	-	-	-

**Kabupaten Bojonegoro****Pengambilan pertama**

Kode sampel	Well	1	2	3	4	5	6	7	8
B1.1B	1	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.2B	2	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.3B	3	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.4B	4	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.5B	5	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.6B	6	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.7B	7	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.8B	8	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.9B	9	-	-	-	-	-	-	-	-
B1.10B	10	-	-	-	-	-	-	-	-

**Pengambilan kedua**

Kode sampel	Well	1	2	3	4	5	6	7	8
B2.1N	1	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.2N	2	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.3N	3	+	+	+	+	+	+	-	-
B2.4N	4	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.5N	5	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.6N	6	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.7N	7	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.8N	8	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.9N	9	-	-	-	-	-	-	-	-
B2.10N	10	-	-	-	-	-	-	-	-